مقـاله پژوهشی
سلامت جامعه
دوره هشتم، شماره۲، سال۱۳۹۳

بررسی تأثیر کورکومین (زردچوبه) بر بیان ژن‌های OCT4، Nano و Nucleostemin در رده سلول سرطانی AGS (آدنوکارسینومای معده)

محمدرضا میرزایی[1*]، مهدی محمودی[2]، محمدرضا حاجی‌زاده[3]، فهمیده بگرضایی[4]، وجیهه اکبرپور[5]، رضا بهرام‌آبادی[6]

تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۱۰/۲۱ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۴/۱/۱۵

خلاصه

مقدمه: کورکومین رنگدانه زرد طبیعی جدا شده از ریزوم زردچوبه می‌باشد و از بین برنده مقاومت سلول‌های سرطانی به داروهای شیمی درمانی است. هدف از مطالعه حاضر بررسی تأثیر غلظت‌های مختلف عصاره الکلی زردچوبه بر بیان ژن‌های اصلی کنترل کننده مسیر نامیرایی شامل OCT4، Nanog و Nucleostemin در رده سلولی AGS (آدنوکارسینومای معده) می‌باشد.

مواد و روش‌ها: رده سلول سرطانی آدنوکارسینوم معده (AGS) در محیط کشت RPMI 1640 کشت داده شد. پس از اطمینان از صحت سلول‌ها، سلول‌ها در دو گروه آزمون و کنترل با شرایط یکسان در پلیت‌های شش خانه‌ای مخصوص کشت سلول، کشت شدند. پس از رسیدن تراکم سلولی به ۷۰-۶۰ درصد، گروه آزمایش در معرض غلظت‌های ۲۰، ۴۰ و ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر کورکومین قرار گرفته و پس از گذشت بازه‌های زمانی ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت، سلول‌ها جدا شده، پس از تخلیص Total RNA و سنتز cDNA، میزان بیان ژن‌های مورد نظر (OCT4A، OCT4B، OCT4B1، Nanog و Nucleostemin) در هر دو گروه تعیین و میزان تغییرات بیانی این ژن‌ها با استفاده از فرمول $2^{-\Delta\Delta ct}$ تعیین گردید.

یافته‌ها: نتایج نشان داد کورکومین باعث کاهش بیان دو واریانت OCT4(OCT4A و OCT4B) و ژن‌های NANOG و Nucleostemin(GLN3) می‌شود در حالیکه واریانت OCT4B1، افزایش بیان نشان می‌دهد.

نتیجه‌گیری: نتایج این مطالعه نشان می‌دهد کورکومین می‌تواند به عنوان یک عامل مهار کننده تقسیمات سلولی، در پیشگیری از سرطان که بواسطه تقسیمات کنترل نشده سلولی ایجاد می‌شود، مورد توجه قرار گیرد. همچنین این مطالعه می‌تواند بستری برای مطالعات گسترده‌تر در خصوص تأثیر ضد سرطانی این ترکیب گیاهی باشد.

واژه‌های کلیدی: کورکومین، رده سلول سرطانی آدنوکارسینومای معده (AGS)، بیان ژن

۱* - استادیار عضو هیئت علمی، مرکز تحقیقاتی پزشکی ملکولی، دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان، رفسنجان ، ایران.(نویسنده مسئول)
تلفن: ۰۳۴۳۴۲۸۰۰۸۶ ، فاکس: ۰۳۴۳۴۲۸۰۰۹۷، پست الکترونیکی: mirzaeemr@gmail.com
۲ - استاد تمام عضو هیئت علمی، مرکز تحقیقاتی پزشکی ملکولی، دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان، رفسنجان ، ایران
۳- استادیار عضو هیئت علمی، مرکز تحقیقاتی پزشکی ملکولی، دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان، رفسنجان ، ایران
۴- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه بیوشیمی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان، رفسنجان ، ایران
۵- کارشناس آزمایشگاه، دانشکده پرستاری مامایی، دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان، رفسنجان ، ایران
۶- کارشناس آزمایشگاه، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان، رفسنجان ، ایران

مقدمه

زردچوبه (Curcuma longa) یک گیاه علفی است که از قسمت ریزوم آن به طور گسترده‌ای برای رنگ و طعم دادن به غذا استفاده می‌شود. عصاره ریزوم آن کورکومینوئید (Curcuminoid) نامیده می‌شود و شامل Curcumin (75-95%)، Dimethoxycurcumin و bisdimethoxycurcumin می‌باشد. ترکیبات شیمیایی متعددی از جمله روغن فرار، زینجیبرن آلفا و بتا، تورمرین و ترکیبات قندی از جمله آرابینوز، فروکتوز،گلوکز و نشاسته در ریزوم گیاه زردچوبه وجود دارد[۱]. اثر ضد سرطانی این ترکیب در رده های سلولی سرطان پستان، تخمدان، کولون، کبد، لوسمی، پانکراس و پروستات بررسی شده است[۲].

تحقیقات متعددی نشان داده‌اند که کورکومین از ایجاد سلول‌های توموری جلوگیری نموده و سرعت رشد و پیشرفت بسیاری از سرطان‌ها را کاهش می‌دهد. مطالعات متعدد نشان داده‌اند که استفاده از زردچوبه به عنوان چاشنی غذائی از سرطان‌های معده و کولون جلوگیری می‌کند[۳].

سلول بنیادی سرطان (Cancer stem cell) به عنوان سلول سرطانی که توانایی خودبازآفرینی، تقسیمات سلولی همسان و نا همسان و در نتیجه، ایجاد توده سرطانی را داراست شناخته می‌شود[۴]. سلول‌های اخیر (CSCs) از توده‌های سرطانی مربوط به سرطان‌های پستان [۵]، مغز [۶] ، ملانوما [۷]، پروستات [۸]، استئوسارکوما[۹] و بسیاری از تومورهای دیگر جدا شده‌اند. این مشاهدات منجر به ارائه نظریه "سلول بنیادی سرطانی" شده است. طبق این نظریه درون یک تومور، تعداد کمی از سلول‌ها با توانایی تکثیری نامحدود، رشد تومور را موجب می‌شوند. این نظریه، با این یافته که اکثر تومورها متشکل از جمعیت ناهمگونی از سلول‌ها با درجات متفاوتی از تمایز هستند، مطابقت می‌کند. همچنین شاید بتوان گفت دلیل این که درمان‌های رایج که سلول‌های در حال تقسیم را مورد هدف قرار می‌دهند و توده تومور را کاهش می‌دهند اما مانع رشد مجدد تومور نمی‌شوند این است که این شیوه درمانی، سلول‌های بنیادی سرطانی را تخریب نمی‌کند[۱۰].

امروزه ژن‌هایی که در کنترل خود بازآفرینی سلول‌های بنیادی نقش دارند، به عنوان دسته جدیدی از مارکرهای مولکولی سرطان معرفی شده‌اند که بیان کنترل نشده آنها از اهمیت زیادی در فرایند سرطانی شدن برخوردار است[۱۱]. مهم‌ترین این ژن‌ها شامل OCT4، Nanog، SOX2 و KLF4 می‌باشند. OCT4 یک عامل رونویسی دارای POU domain است که توسط همه سلول‌های پرتوان (Totipotent) در طی جنین‌زایی موشی بیان می‌شود و به طور فراوان توسط سلول‌های بنیادی جنینی(ESC) موش‌های تمایز نیافته و رده‌های سلولی سرطانی جنینی (embryonic cancer cell) نیز بیان می‌گردد. البته تا به امروز، آزمایشات نشان داده‌اند که بیان OCT4 در سلول‌های بنیادی جنسی عموماً ضعیف‌تر است. همچنین OCT4 به عنوان مارکری برای تومورهای گنادی انسان مورد استفاده قرار می‌گیرد[۱۲]. این ژن با فرآیند پردازش افتراقی (Alternative splicing) سه واریانت مختلف (OCT4A، OCT4B و OCT4B1) تولید می‌کند که از لحاظ سازمان‌بندی ژنی مشابه اما از لحاظ ساختمان پروتئینی و عملکرد متفاوتند[۱۳].

Nanog یک عامل رونویسی دارای Homeodomain است که به سلول‌های بنیادی توانایی خودبازآفرینی می‌دهد. نانوگ یکی از چندین فاکتوری است که در سلول‌های پرتوان (pluripotent) بیان می‌شود و در شروع تمایز، کاهش بیان پیدا می‌کند[۱۴]. نوکلئوستمین (Nucleostemin) ژنی است متعلق به خانواده پروتئین‌های متصل شونده به GTP و پروتئین تک زیر واحدی سنتز شده از این ژن، به طور عمده در داخل هستک و به صورت کم در شیره هسته حضور دارد. این ژن نقش مهمی در تنظیم پروتئین P53 دارد بنابراین، باعث تنظیم چرخه سلولی می‌شود[۱۵].

با توجه به شواهد موجود مبنی بر نقش کورکومین در درمان و پیشگیری از سرطان و نقش ژن‌های OCT4، NANOG و Nucleostemin در سلول‌های توموری، این مطالعه به منظور بررسی تأثیر کورکومین بر ژن‌های ذکر شده به عنوان ژن‌های اصلی کنترل کننده مسیر نامیرایی در رده سلولی آدنوکارسینومای معده (AGS) به عنوان نماینده رده-های سلول طراحی گردید.

مواد و روش‌ها

رده سلولی آدنوکارسینومای معده(AGS)

رده سلولی AGS (آدنوکارسینومای معده) از انستیتو پاستور ایران خریداری شد. سلول‌ها در محیط کشت RPMI1640(Gibco) حاوی ۱۰درصد سرم جنین گوساله (FBS)، آنتی‌بیوتیک های پنی‌سیلین (۱۰۰ u/ml) و استرپتومایسین (۱۰۰ gr/ml) کشت شده و در انکوباتور ۳۷ درجه با ۵ درصد Co_2 و رطوبت ۹۰ درصد انکوبه شدند.

تهیه عصاره زردچوبه: ریشه گیاه زردچوبه از هرباریوم گیاهان دارویی اصفهان تهیه شد و عصاره‌گیری با کمک دستگاه سوکسله انجام شد و نهایتاً مشابه مطالعات قبلی[۲۰]، سه غلظت ۲۰،۴۰ و ۱۰۰ میکروگرم در هر میلی لیتر از عصاره بدست آمده (کورکومین)، تهیه گردید.

آماده سازی سلول‌ها برای انجام مطالعه: برای بررسی تأثیر کورکومین بر رده سلولی مورد مطالعه، پس از کشت و چندین بار پاساژ (جهت اطمینان از صحت سلول‌ها و وضعیت تکثیر آنها)، نهایتاً تعداد $۲×۱۰^۵$ سلول در هر میلی‌لیتربه عنوان میزان مناسب سلول در کشت اولیه انتخاب گردید. سلول‌ها در دو گروه تست و کنترل و با تکرارهای سه‌گانه برای هر غلظت کشت داده شدند. به هر چاهک پلیت ۶ خانه‌ای مخصوص کشت سلول ۲۰۰ میکرولیتر (۴۰/۰۰۰ سلول) محیط کشت کامل حاوی سلول، افزوده شد. پلیت‌ها به انکوباتور منتقل و پس از ۲۴ ساعت غلظت‌های سه گانه مورد نظر به چاهک‌های حاوی سلول در پلیت‌های اختصاص داده شده به گروه‌های تست، اضافه گردید. به گروه کنترل آب مقطر استریل (به عنوان بافر تهیه غلظت‌ها)، افزوده شد.

برداشت سلول‌ها، تخلیص RNA و سنتز cDNA

پس از گذشت زمان‌های سه‌گانه ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت سلول‌ها در دو گروه تست (شامل سه غلظت مختلف)و کنترل، برداشت و پس از شستشو با بافر PBS، Total RNA سلولی با استفاده از کیت تخلیص RNA(IRAN RNX Plus, Sinagen) جدا گردید. برای خطی کردن RNA بدست آمده از مرحله قبل، در دستگاه ترموسایکلر ۶۰ درجه سانتیگراد به مدت ۱۰ دقیقه قرار داده شد تا مرحله Heat block انجام گردد. در ادامه تمامی ملکول‌های mRNA با استفاده از کیت سنتز cDNA به cDNA تبدیل و به فریزر 20^{oC}- منتقل شدند.

طراحی پرایمر: توالی پرایمرهای پیشرو (Forward) و پسرو (Reverse) ژن‌های OCT4 (واریانت‌های A، B و B1)، Nanog، Nucleostemin و بتا اکتین با استفاده از نرم افزار Primer design نسخه ۳ طراحی و سپس با Blast نمودن آنها در NBCI از صحیح بودن آنها اطمینان حاصل شد.(جدول ۱)

جدول ۱- مشخصات پرایمر ژن‌های مورد مطالعه

ژن	نوع پرایمر	توالی	طول قطعه
OCT4A	F	CGCAAGCCCTCATTTCAC	۱۱۱
	R	CATCACCTCCACCACCTG	
OCT4B	F	AGAACCGAGTGAGAGGCAAC	۱۷۱
	R	TGAGAAAGGAGACCCAGCA	
OCT4B1	F	GCACTTCTACAGACTATTCCTTGG	۱۲۸
	R	TGATCCTCTTCTGCTTCAGG	
Nanog	F	CCTATGCCTGTGATTTGTGG	۱۶۵
	R	AGTGGGTTGTTTGCCTTTG	
Nucleostemin	F	CAGAGATCCTCTTGGTTGCAG	۱۷۴
	R	AATGAGGCACCTGTCCACTC	
ß-actin	F	CACACCTTCTACAATGAGC	۱۶۰
	R	ATAGCACAGCCTGGATAG	

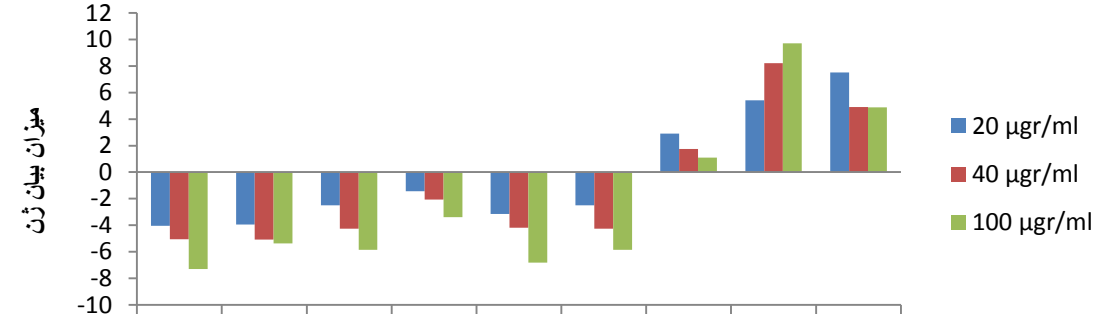
تکثیر ژن‌های مورد نظر:

بدین منظور ابتدا آماده سازی پرایمرها انجام شد و سپس به منظور تکثیر mRNA (cDNA) ژن‌های هدف از دستگاه Real-Time PCR استفاده گردید. ۴ میکرولیتر پرایمرهای اختصاصی فوروارد و ریورس، ۳ میکرولیتر cDNA، ۱۰ میکرولیتر مسترمیکس سایبرگرین و ۳ میکرولیتر آب DNase free (حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر) به هر چاهک پلیت مخصوص PCR اضافه شد و روی پلیت را با چسب مخصوص پوشانده تا از تبخیر جلوگیری شود. پلیت را داخل دستگاه Real-Time PCR Bio-RAD) گذاشته و با برنامه پیشنهادی شرکت سنتزکننده پرایمرها (یک سیکل ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه و ۴۵ سیکل با شرایط ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ ثانیه، ۶۲-۵۸ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ ثانیه و ۷۲ سانتی‌گراد به مدت ۲۰ ثانیه) تکثیر انجام شد. نمودارها و داده‌های دستگاه (عداد ct) مورد ارزیابی و آنالیز قرار گرفت و از ژن بتااکتین به عنوان کنترل داخلی استفاده شد.

یافته‌ها

الگوی بیانی واریانت های OCT4

بررسی الگوی بیانی واریانت‌های OCT4 نشان داد در غلظت‌های مورد مطالعه عصاره زردچوبه و پس از گذشت زمان‌های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت، بیان دو واریانت OCT4A و OCT4B کاهش می‌یابد در حالی‌که واریانت OCT4B1 افزایش بیان را نشان می‌دهد (شکل ۱).



	A-24	A-48	A-72	B-24	B-48	B-72	B1-24	B1-48	B1-72
20 µgr/ml	-4.05	-3.94	-2.51	-1.44	-3.16	-2.51	2.91	5.42	7.51
40 µgr/ml	-5.06	-5.09	-4.25	-2.06	-4.19	-4.25	1.76	8.22	4.92
100 µgr/ml	-7.31	-5.38	-5.85	-3.38	-6.81	-5.85	1.1	9.71	4.89

میزان بیان واریانت های OCT4A، OCT4B و OCT4B1 پس از گذشت زمان های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت

شکل ۱- الگوی بیانی واریانت‌های OCT4 (A،B و B1) پس از تأثیر غلظت‌های ۲۰،۴۰ و ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر عصاره زردچوبه در بازه‌های زمانی ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت در رده سلولی آدنوکارسینومای معده

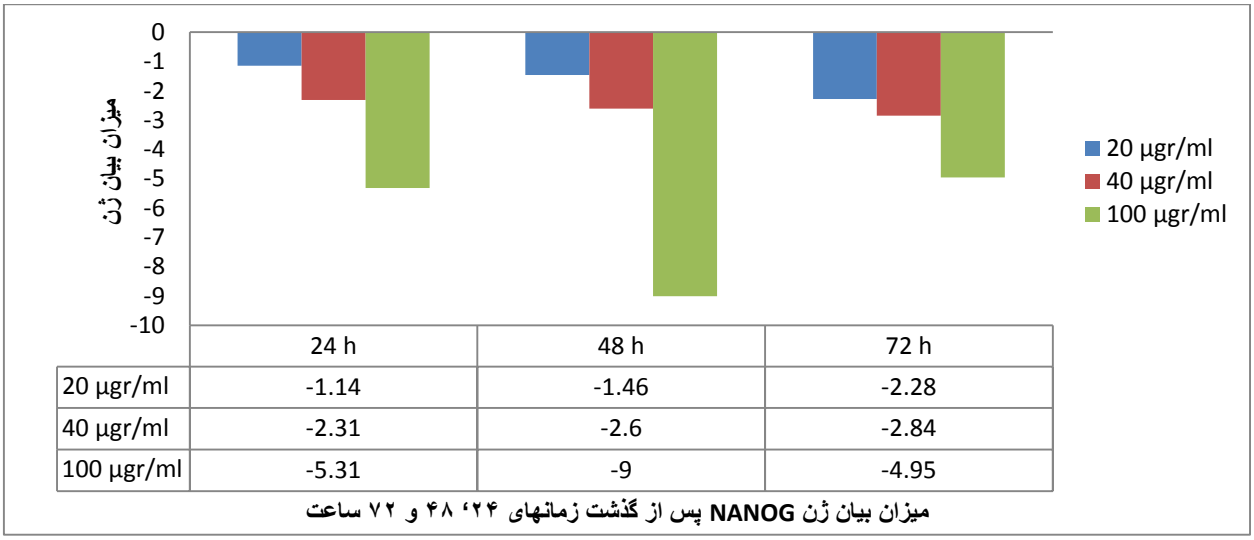
این نتایج نشان می‌دهد بیشترین میزان کاهش بیان واریانت OCT4A در غلظت ۲۰ میکروگرم بر میلی لیتر و زمان ۲۴ ساعت اتفاق می افتد و همراه با افزایش غلظت و گذشت زمان بیان این دو واریانت نیز کاهش را نشان می‌دهد. در حالیکه واریانت OCT4B در غلظت ۱۰۰میکروگرم بر میلی لیتر و زمان ۴۸ ساعت بیشترین کاهش بیان را نشان می‌دهد و در غلظت‌های ۲۰ و ۴۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر همسان با افزایش غلظت و گذشت زمان، افزایش کاهش بیان اتفاق می‌افتد.

واریانت OCT4B1 برخلاف دو واریانت دیگر افزایش بیان نشان می‌دهد و بیشترین افزایش بیان مربوط به غلظت ۱۰۰ میکروگرم و زمان ۴۸ ساعت است. این واریانت در غلظت ۲۰ میکروگرم با گذشت زمان افزایش بیان نشان می‌دهد اما در دو غلظت ۴۰ و ۱۰۰ میکروگرم بیشترین افزایش مربوط به زمان ۴۸ ساعت است.

الگوی بیانی ژن NANOG :

همان گونه که در شکل ۲ مشخص است بیان ژن NANOG با افزایش غلظت عصاره زردچوبه بیشتر کاهش بیان را نشان می‌دهد و حداکثر کاهش بیان ژن در غلظت

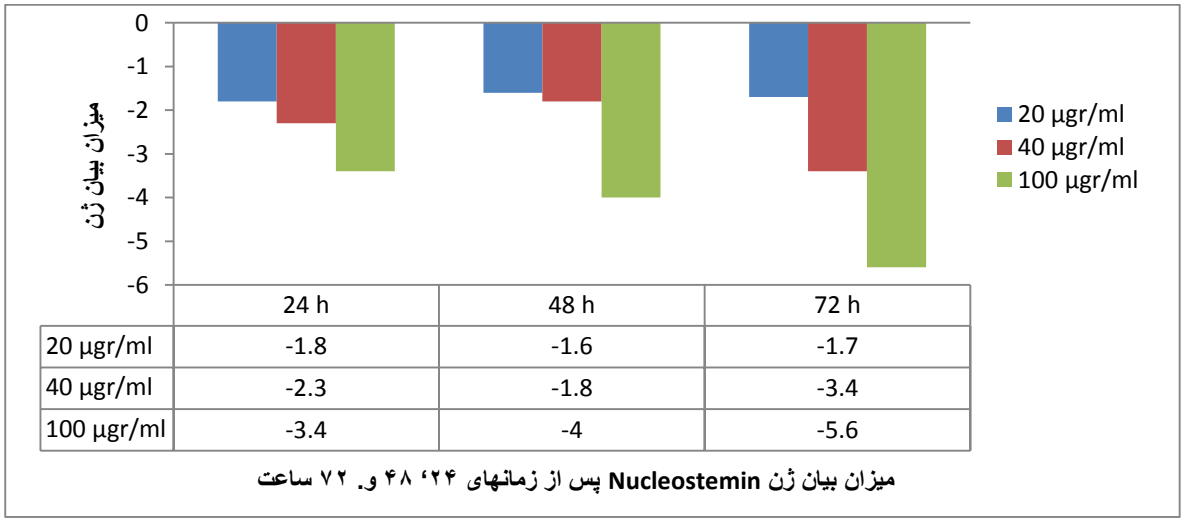
۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر و بازه زمانی ۴۸ ساعت اتفاق می‌افتد.



شکل ۲- الگوی بیانی ژن NANOG، پس از تأثیر غلظت‌های ۲۰، ۴۰ و ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر عصاره زردچوبه در بازه‌های زمانی ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت در رده سلولی آدنوکارسینومای معده

الگوی بیانی ژن NUCLEOSTEMIN:

نتایج الگوی بیانی ژن نوکلئوستمین در رده سلولی مورد مطالعه پس از تأثیر غلظت‌های عصاره زردچوبه نشان می‌دهد همراه با افزایش غلظت و گذشت زمان کاهش بیان ژن نیز افزایش می‌یابد. (شکل ۳) بیشترین کاهش بیان این ژن در غلظت ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر و زمان ۷۲ ساعت مشاهده گردید.



شکل ۳- الگوی بیانی ژن نوکلئوستمین، پس از تأثیر غلظت‌های ۲۰، ۴۰ و ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر عصاره زردچوبه در بازه‌های زمانی ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت در رده سلولی آدنوکارسینومای معده

بحث

در این مطالعه، تأثیر عصاره زردچوبه (کورکومین) بر بیان ژن‌های اصلی کنترل‌کننده مسیر نامیرایی در رده سلول سرطانی AGS مورد بررسی قرار گرفت و نتایج نشان داد بجز واریانت OCT4B1 دیگر واریانت‌های OCT4 و همچنین ژن‌های Nanog و Nucleostemin بدنبال تأثیر عصاره زردچوبه، کاهش بیان داشته‌اند و این کاهش بیان متناسب است با زمان تأثیر و غلظت عصاره زردچوبه، به عبارت دیگر، هرچه زمان تأثیر و غلظت عصاره زردچوبه بیشتر باشد تأثیر بیانی ژن‌ها نیز بیشتر است.

این که بیشتر بیماری‌ها از جمله سرطان در نتیجه اختلال در عملکرد ژن‌های مختلف و تغییر در میزان بیان و یا نحوه بیان ژن‌ها ایجاد می‌شود، مسلم و مورد تأئید است.

در خصوص ایجاد سرطان دو نظریه عمده مطرح است که نظریه اول، تمامی سلول‌های بافت را مستعد ایجاد سرطان می‌داند و نظریه دوم دلالت بر این دارد که دربافت‌ها، سلول‌هایی به نام سلول‌های بنیادی بالغین (Adult Stem Cells) وجود دارند و این سلول‌ها به علل ناشناخته‌ای (تغییر در بیان ژن‌های خاص) تبدیل به سلول‌های بنیادی سرطان (Cancer Stem Cell) شده عامل شکل‌گیری سرطان خواهند بود. طبق نظریه جدید Stem Cell Origin of Cancer بسیاری از تومورها از سلول‌های بنیادی بافت‌های تمایز یافته منشأ می‌گیرند. بر اساس این تئوری، امروزه عواملی که به مهار فرایند تمایز و یا به تکثیر کنترل نشده سلول‌های بنیادی بافتی منجر می‌شوند، از مهم‌ترین فاکتورهای دخیل تأییدکننده در فرایند سرطان‌زایی به شمار می‌روند از شواهد دیگر تأییدکننده این تئوری شباهت جمعیت اندکی از سلول‌های بافت‌های سرطانی به سلول‌های بنیادی می‌باشد، این جمعیت اندک سلولی دارای توانایی مقاومت در برابر عوامل القا کننده آپوپتوز و شیمی‌درمانی است که یکی از عوامل بازگشت سرطان پس از انهدام تومورهای اولیه می‌باشد[۴]. ژن‌های OCT4 ، Nanog وNucleostemin ژن‌های مهمی جهت ایجاد توانایی خود بازآفرینی و نامیرایی سلول بوده قابلیت خود تجدیدی سلول‌های بنیادی را حفظ می‌کنند[۱۱]. ژن OCT4 شامل سه واریانت (A ،B و B1) می‌باشد، واریانت OCT4B1 که اخیرا شناسایی شده است در سلول‌های سرطانی بیان بالایی دارد. این افزایش با توجه به درجه بدخیمی تغییر می‌کند که می‌تواند در تشخیص سرطان و تعیین درجه بدخیمی آن موثر باشد[۱۳]. واریانت OCT4B1 علاوه بر بیان در رده‌های سلولی سرطان، در سلول‌های بنیادی نیز مشابه رفتار OCT4A بیان می‌شود [در زیگوت بیان این دو شروع شده تا مرحله بلاستوسیست ادامه می‌یابد و پس از تمایز، بیان هر دو کاهش می‌یابد، اما در CSC فقط بیان OCT4B1 مجدداً دیده می‌شود[۱۶].

در مطالعات مرتبط با سرطان و ژن OCT4 که روی بافت‌های سرطانی متعلق به سرطان‌های مختلف و یا رده‌های مختلف سلول سرطانی انجام شده، نتایج جالبی به دست آمده است.

در مطالعه اطلسی و همکاران، مشخص گردید بیان سیتوپلاسمیOCT4B1 رابطه مستقیمی با بیان هسته‌ای OCT4A در سلول‌های بنیادی دارد، اما در سلول‌های سرطانی بیان OCT4A متوقف می‌شود در حالی که بیان OCT4B1 همچنان ادامه خواهد داشت. به عبارتی، بیان نابجای (Ectopic[OCT4 در سلول‌های زایشی اِپتلیالی باعث فعال شدن ژن های خودبازآفرینی (Self-renewal) و تبدیل این سلول‌ها به سلول سرطانی می‌شود، واریانت بیان شده در این سلول ها OCT4B1 است[۱۶].

درمان‌های متداول سرطان، دارای عوارض جانبی جدی بوده و در بهترین حالت، تنها چند سال بر طول عمر بیمار می‌افزایند. درمان‌های طب مکمل می‌توانند در کنترل سرطان سودمند واقع شوند و مطالعات زیادی برای یافتن ترکیبات ضد توموری مناسب در کشورهای مختلف انجام می‌شود. در تحقیقات متعدد نشان داده شده است که مصرف بعضی از مواد غذایی و گیاهان دارویی می‌تواند موجب مهار رشد سلول‌های سرطانی شود[۱۷].

Cine N و همکاران اثرات ضد متاستازی کورکومین را در سرطان سینه بررسی کردند[۱۸].

Duvoix A و همکاران نشان دادند که کورکومین در دوزهای خاص باعث القای آپوپتوزیس در بسیاری از سلول‌های سرطانی شده است. کورکومین باعث آزاد شدن سیتوکوروم C و ثبات P53 می‌شود[۱۹].

بخشی از آثار دارویی کورکومین به مهار تکثیر سلولی و القای مرگ برنامه‌ریزی شده مربوط می‌شود. کورکومین در واقع مهار کننده مراحل مختلف در شبکه رونویسی بوده و بدین صورت از تکثیر سلولی جلوگیری می‌نماید. این ترکیب دارویی در بسیاری از رده‌های توموری از قبیل سرطان کولون، سینه، مثانه، مغز، ریه و تخمدان سبب القای مرگ برنامه‌ریزی شده وابسته به P53 می‌شود[۵،۲۰]. در مطالعه دیگر نیز توقف چرخه سلولی و کاهش رشد که از آثار کورکومین است روی

سلول‌های آدنوکارسینومای معده مشاهده شد. در این مطالعه با افزایش زمان تیمار، به تدریج سلول‌های متوقف شده وارد مسیر مرگ برنامه‌ریزی شده می‌شوند پس از تیمار رده سلولی AGS با فرمول‌بندی دندروزوی کورکومین، سطح بیان پایه ژن Bax افزایش ۵۰ درصدی را نشان داد که نشانگر فعال شدن تدریجی مسیر میتوکندریایی مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی است[۲۱].

بررسی‌هایی که در سه دهه اخیر در زمینه جذب، توزیع، متابولیسم و دفع کورکومین صورت گرفته، نشان دهنده جذب ضعیف و متابولیسم سریع این ترکیب دارویی است به طوری که Fang و همکارانش در اولین بررسی خود روی موش‌های صحرایی جذب بسیار پایین آن توسط دستگاه گوارش را نشان دادند[۷]. برای افزایش پایداری و حلالیت کورکومین، Harvey و همکارانش پس از بررسی فعالیت ضد توموری کورکومین لیپوزومی روی سلول‌های کارسینومای پانکراس مشخص کردند که کورکومین مانع از رشد سلول‌های پانکراس می‌شود[۴]. از سوی دیگر، ناقلینی از جنس کمپلکس‌های میسل و فسفولیپید نیز قادر به افزایش جذب روده‌های این دارو بوده‌اند[۶].

با توجه به تأکید استفاده از داروهای گیاهی در درمان سرطان، در این پژوهش تأثیر غلظت‌های مختلف کورکومین بر بیان ژن‌های OCT4 (OCT4A، OCT4B و OCT4B1)، Nanog و Nucleostemin در رده سلولی آدنوکارسینومای معده مورد بررسی قرار گرفت و نتایج نشان داد عصاره زردچوبه (کورکومین) با تأثیر بر ژن‌های اصلی مسیر نامیرایی و کاهش بیان آنها کمک به کاهش میزان تقسیم سلولی می‌کند و این کاهش باعث عدم توسعه بافت سرطانی می‌شود. لذا می‌توان عنوان کرد مصرف زردچوبه به عنوان یک چاشنی در تهیه مواد غذایی باعث جلوگیری و سرکوب سلول‌های سرطانی می‌شود. نتایج این تحقیق می‌تواند به عنوان الگویی از کاربرد داروهای گیاهی در مطالعات مربوط به مکانیسم‌های ملکولی مسیرهای مختلف سرطان، کاربرد داشته باشد.

تشکر و قدردانی

این مقاله قسمتی از پایان نامه دانشجویی است و لازم می‌دانیم از همکاران حوزه پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان و مخصوصاً کارشناسان محترم مراکز تحقیقاتی سلولی ملکولی و فیزیولوژی – فارماکولوژی این دانشگاه که ما را در انجام این تحقیق یاری دادند تقدیر و تشکر نماییم.

References

1. Leung AY, Foster S. Encyclopedia of common natural ingredients used in food, drugs, and cosmetics: Wiley; 1980. A stonesong press book. William morrow and company, Inc, New york
2. Varalakshmi C, Ali AM, Pardhasaradhi B, Srivastava RM, Singh S, Khar A. Immunomodulatory effects of curcumin. International immunopharmacology 2008; 8(5): 688-700.
3. McMichael A, McCall M, Hartshore J, Woodings T. Patterns of gastro-intestinal cancer in european migrants to Australia: The role of dietary change. International Journal of Cancer 1980;25(4):431-7.
4. Gostjeva EV, Thilly WG. Stem cell stages and the origins of colon cancer. Stem Cell Reviews and Reports 2005;1(3):243-51.
5. Al-Hajj M, Wicha MS, Benito-Hernandez A, Morrison SJ, Clarke MF. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. Proceedings of the National Academy of Sciences 2003;100(7):3983-8.
6. Singh SK, Hawkins C, Clarke ID, Squire JA, Bayani J, Hide T, et al. Identification of human brain tumour initiating cells. nature 2004;432(7015):396-401.
7. Fang D, Nguyen TK, Leishear K, Finko R, Kulp AN, Hotz S, et al. A tumorigenic subpopulation with stem cell properties in melanomas. Cancer research 2005;65(20):9328-37.

8. Collins AT, Berry PA, Hyde C, Stower MJ, Maitland NJ. Prospective identification of tumorigenic prostate cancer stem cells. Cancer research 2005;65(23):10946-51.
9. Gibbs CP, Kukekov VG, Reith JD, Tchigrinova O, Suslov ON, Scott EW, et al. Stem-like cells in bone sarcomas: implications for tumorigenesis. Neoplasia 2005;7(11):967-76.
10. Reya T, Morrison SJ, Clarke MF, Weissman IL. Stem cells, cancer, and cancer stem cells. nature 2001;414(6859):105-11.
11. Avery S, Inniss K, Moore H. The regulation of self-renewal in human embryonic stem cells. Stem cells and development 2006;15(5):729-40.
12. Niwa H, Miyazaki J-i, Smith AG. Quantitative expression of OCT-3/4 defines differentiation, dedifferentiation or self-renewal of ES cells. Nature genetics 2000;24(4):372-6.
13. Yazd EF, Rafiee MR, Soleimani M, Tavallaei M, Salmani MK, Mowla SJ. OCT4B1, a novel spliced variant of OCT4, generates a stable truncated protein with a potential role in stress response. Cancer letters 2011;309(2):170-5.
14. Harvey RP. Homeobox Genes and Heart Development. Developmental biology 1996;178(2):203-16.
15. Masui S, Nakatake Y, Toyooka Y, Shimosato D, Yagi R, Takahashi K, et al. Pluripotency governed by Sox2 via regulation of OCT3/4 expression in mouse embryonic stem cells. Nature cell biology 2007;9(6):625-35.
16. Atlasi Y, Mowla SJ, Ziaee SA, Bahrami AR. OCT-4, an embryonic stem cell marker, is highly expressed in bladder cancer. International journal of cancer Journal international du cancer 2007;120(7):1598-602.
17. Dhillon N, Aggarwal BB, Newman RA, Wolff RA, Kunnumakkara AB, Abbruzzese JL,et al. Phase II trial of curcumin in patients with advanced pancreatic cancer.Clin Cancer Res 2008;14(14):4491-9.
18. Cine N, Limtrakul P, Sunnetci D, Nagy B, Savli H. Effects of curcumin on global gene expression profiles in the highly invasive human breast carcinoma cell line MDA-MB 231: A gene network-based microarray analysis. Experimental and therapeutic medicine 2013; 5(1):23-7.
19. Duvoix A, Morceau F, Delhalle S, Schmitz M, Schnekenburger M, Galteau MM, et al. Induction of apoptosis by curcumin: mediation by glutathione S-transferase P1-1 inhibition. Biochemical pharmacology 2003;66(8):1475-83.
20. Wargovich MJ. Nutrition and cancer: the herbal revolution. Current opinion in gastroenterology 1999;15(2):177.
21. Lin T, Ding Y-Q, Li J-M. Overexpression of Nanog protein is associated with poor prognosis in gastric adenocarcinoma. Medical Oncology 2012;29(2):878-85.

The survay of curcumin effect on the expressional profile of OCT4, Nanog and Nucleostemin genes in AGS (adenocarcinoma) cancer cell line

Mirzaei MR[1]*, Mahmoodi M[2], Hajizadeh MR[3], Bagrezaei F[4], Akbarpoor V[5], Bahramabadi R[6]

1- Asistant Prof, Molecular Medicine Research Center, Rafsanjan University of Medical Sciences, Rafsanjan, Iran. Phone:+98 3434280086 Fax: +98 3434280097
2-Prof, Molecular Medicine Research Center, Rafsanjan University of Medical Sciences, Rafsanjan, Iran.
3- Asistant Prof, Molecular Medicine Research Center, Rafsanjan University of Medical Sciences, Rafsanjan, Iran.
4- Bs., Biochemistry MSc. Student, school of medicine, Rafsanjan University of Medical Sciences, Rafsanjan, Iran.
5- Bs., Faculty of nursing and midwifery, Rafsanjan University of Medical Sciences, Rafsanjan, Iran.
6- Bs., school of medicine, Rafsanjan University of Medical Sciences, Rafsanjan, Iran.

Received: 21 January 2013 Accepted: 14 April 2015

Introduction: Curcumin is the natural yellow pigment in turmeric isolated from the rhizome of the plant Curcuma longa. Curcumin inhibits formation and invasive cancer cells and destroys cancer cells resistant to chemotherapeutic drugs. The purpose of this study was the survey of effects of different concentrations of alcoholic curcumin on the OCT4, Nanog and Nucleostemin genes in the AGS (gastric adenocarcinoma) cell line.

Material and Methods: The AGS cell line was cultured in RPMI-1640 (Gibco), supplemented with penicillin/streptomycin (100 U/ml and 100 lg/ml, respectively) and 10% fetal bovine serum, at 37°C in a humidified atmosphere of 5% CO2. in 60–70% cell confluence, the cells were treated with Curcumin Cocentration (20,40, 100) µl and incubated for 24,48 and 72 hours. Finally, total RNA werecextracted and cDNA were synthesized and the expression of mentioned genes was detected.

Results: expression rate of OCT4A, OCT4B, NANOG and Nucleostemin (GLN3) at concentrations less than 20 µg/ml were reduced but OCT4B1 expression showed increased by hours respectively.

Conclusion: The results showed that curcumin inhibited cell division, also, this study could be the basis for more extensive studies on the anti-cancer effect of the combined plants.

Key words: Curcumin, AGS cell line, gene expression

Please cite this article as follows:

Mirzaei MR, Mahmoodi M, Hajizadeh MR, Bagrezaei F, Akbarpoor V, Bahramabadi R. The survay of curcumin effect on the expressional profile of OCT4, Nanog and Nucleostemin genes in AGS (adenocarcinoma) cancer cell line.Community Health journal 2014; 8(2):19-27.

Funding: this research was funded by Rafsanjan University of Medical Sciences

Conflict of interest: none declared

Ethical approval: not necessary