

بررسی اثرات هم افزایی کورکومین با داروی سیس پلاتین بر بیان ژن Cdc42 در سلول‌های رده Calu-6 کارسینومای ریه در انسان

منا مطهری نیا و محمد نبیونی

گروه علوم سلولی و مولکولی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه خوارزمی، تهران، ایران

مسئول مکاتبات: محمد نبیونی، nabiuni@khu.ac.ir

چکیده. سرطان ریه دومین سرطان شایع است. ناکارآمد بودن درمان‌ها و عوارض جانبی داروهای شیمی درمانی، اهمیت مسیر درمان را صدچندان می‌نماید. هدف این مطالعه بررسی اثر کورکومین و مقایسه اثر آن با داروی سیس پلاتین و نیز اثر ترکیب همزمان آن‌ها بر رده سلولی Calu-6 و بیان ژن Cdc42 است. رده سلولی اپی تلیالی Calu-6 رده سلولی کارسینومای ریه انسان است که قبل و بعد از تیمار با دوز $0.5 \mu\text{g/ml}$ تا $8 \mu\text{g/ml}$ کورکومین و $0.1 \mu\text{g/ml}$ تا $50 \mu\text{g/ml}$ سیس پلاتین و تیمار با ترکیب هر دو طی ۲۴ و ۴۸ ساعت، شمارش و میزان بقای سلولی به وسیله روش MTT بررسی شد. برای بررسی آپوپتوز و تغییر بیان ژن Cdc42، که یک GTPase از خانواده Rho ها است و در سرطان‌های مختلف افزایش می‌یابد، از تکنیک‌های فلوسایتومتری و Real time PCR استفاده و داده‌ها توسط نرم‌افزارهای GraphPad prism، Linreg، Flowing software، Excel و Rest آنالیز شد. در سلول‌های تیمار شده با دوز $0.67 \mu\text{g/ml}$ کورکومین و $1.7 \mu\text{g/ml}$ سیس پلاتین (کمترین دوزهای موثر) طی ۲۴ ساعت کاهش زنده مانی سلول‌ها و همچنین القای مرگ سلولی نیز مشاهده شد به طوری که بیشترین مقدار آپوپتوز اولیه و آپوپتوز با تاخیر به ترتیب مربوط به تیمار با کورکومین و ترکیب همزمان کورکومین و سیس پلاتین بود. همچنین هم سیس پلاتین و هم کورکومین باعث بروز تغییرات مورفولوژیکی در سلول‌ها شدند. نتایج آنالیز ژن نشان داد کورکومین و سیس پلاتین باعث کاهش بیان ژن Cdc42 می‌شوند. در تمامی موارد اثرات سینرژیک کورکومین و سیس پلاتین مشاهده شد. بنابراین کورکومین می‌تواند گزینه خوبی برای استفاده ترکیبی با داروهای شیمی‌درمانی به منظور کاهش دوز مصرفی دارو و کاهش عوارض جانبی آنها باشد.

واژه‌های کلیدی. آپوپتوز، بقای سلولی، تکثیر، رده سلول اپی تلیالی

Study of synergic effects of Curcumin and Cisplatin on Cdc42 gene expression in human Calu-6 lung carcinoma cell line

Mona Motaharinia & Mohammad Nabiuni

Department of Cellular and Molecular Biology, Faculty of Biological Sciences, Kharazmi University, Tehran, Iran.

Correspondent author: Mohammad Nabiuni, nabiuni@khu.ac.ir

Abstract. Lung carcinoma is the second most common type of cancer. Inefficiency of the current treatments and the undesirable side effects of chemotherapy drugs made the know-how of the treatment important. The purpose of this study is to investigate the synergic effect of curcumin and Cisplatin in comparison with the sole application of each treatment on Calu-6 cell line, an epithelial cell line of human lung carcinoma, and the expression of Cdc42 gene. The viability of Calu-6 was examined after 24- or 48-hour treatment with doses of 0.5 to 8 $\mu\text{g/ml}$ of curcumin, 0.1 to 50 $\mu\text{g/ml}$ of cisplatin and combined doses of curcumin and Cisplatin by MTT assay. To measure apoptosis and the expression of Cdc42 gene, flow cytometry and Real-Time PCR were utilized. Decrease of cell viability and induction of cell death were observed in the cells treated with 0.67 $\mu\text{g/ml}$ of curcumin and 1.7 $\mu\text{g/ml}$ of cisplatin (the lowest effective dose) and the combined treatment with the same doses of each drug after 24-hour treatments. The maximum rates of early and late apoptosis were related to treatment with curcumin and the combined treatment. The gene expression analysis results indicated that both Curcumin and Cisplatin decrease the expression of Cdc42 gene, moreover, their co-administration showed synergic effects. Therefore, Curcumin could be an appropriate option for complementary administration with other chemotherapy agents in order to reduce their efficient dose, and to reduce their side effects.

Key words. apoptosis, cell viability, epithelial cell line, proliferation

مقدمه

شیوع و مرگ‌ومیر ناشی از سرطان ریه در همه کشورها در حال افزایش است. اگرچه در ایالات متحده آمریکا به دلیل کنترل مصرف دخانیات و اطلاع رسانی عمومی، شیوع سرطان کاهش یافته است اما مرگ‌ومیر هنوز بالاست (Groot et al., 2018). طبق آمارهای سال ۲۰۱۸ سرطان ریه دومین سرطان شایع بعد از سرطان پروستات در مردان و سرطان پستان در زنان است (Siegel et al., 2018). این سرطان اولین عامل منجر به مرگ در میان سرطان‌هاست (Ferlay et al., 2013). در دهه‌های اخیر به دلیل کاهش و توقف استعمال دخانیات میزان شیوع سرطان ریه در مردان دو برابر شیوع در زنان کاهش یافته است (Siegel et al., 2017). بیش از ۹۰ درصد بیماران مبتلا به سرطان ریه در کمتر از ۵ سال پس از تشخیص بیماری، جان خود را از دست می‌دهند که یکی از دلایل آن، تشخیص این بیماری در مراحل پیشرفته‌تر است (Langer et al., 2010; Ray & Jablons, 2009). یکی از روش‌های درمان سرطان ریه، شیمی درمانی و استفاده از سیس‌پلاتین است. سیس‌پلاتین (سیس-دی‌آمین‌دی‌کلروپلاتینوم) ترکیب موثری برای درمان سرطان‌های تخمدان، مثانه، بیضه و سرطان‌های پیشرفته ریه است که با اتصال به اجزای DNA و غیر DNA ایی در عملکرد طبیعی سلول اختلال ایجاد کرده و سرانجام موجب مرگ سلول از طریق نکروز یا آپوپتوز می‌گردد (Wiltshaw, 1979). اگرچه داروهای شیمیایی می‌توانند بر تکثیر، پیشرفت و متاستاز تومور تاثیرگذار باشند اما تاثیر مخرب آن‌ها بر سلول و بافت‌های سالم نیز عوارض جبران ناپذیری را به همراه دارد. امروزه با توجه به اثرات جانبی داروهای شیمی‌درمانی، دانشمندان برای درمان سرطان به ترکیبات طبیعی روی آورده‌اند. از جمله مواد طبیعی موثر در روند بهبود سرطان عصاره زردچوبه یعنی کورکومین است.

کورکومین پلی‌فنلی است که از ساقه‌های ریشه مانند گیاه *Curcuma longa* عضوی از تیره رنجبیلیان (Zingiberaceae) به‌دست می‌آید (Chattopadhyay et al., 2004). کورکومین دارای خواص زیادی از قبیل خواص آنتی‌اکسیدانی، ضد ویروسی، ضد التهابی و ضد سرطانی است که در زمینه خواص ضد سرطانی، در چندین نوع سرطان در انسان از قبیل سرطان‌های ملانوما، سر و گردن، پستان، کولن، پانکراس، پروستات و تخمدان بررسی شده است (Aggarwal et al., 2004; Siwak et al., 2005). مکانیسم‌هایی که کورکومین توسط آن‌ها خواص ضدسرطانی نشان می‌دهد متنوع هستند و اکثراً سطوح تنظیم در فرایندهای رشد سلولی و آپوپتوز را مورد هدف قرار می‌دهد (Oda, 1995).

کورکومین به‌وسیله افزایش بیان انکوپروتئین Bax، رهاسازی سیتوکروم C از میتوکندری و فعال کردن کاسپاز ۳ باعث مرگ سلول‌های سرطانی می‌شود. وضعیت BCL-2 بدون تغییر در EAC می‌ماند که نشان می‌دهد کورکومین از نقطه واریسی BCL-2 عبور می‌کند و اثر حفاظتی آن را بر آپوپتوز از بین می‌برد (Sumanpal et al., 2001). بعلاوه تیمار با کورکومین کلیواژ Bid را القا و بیان پروتئین BCL-2 را مهار می‌کند (Jia et al., 2009). کورکومین می‌تواند با هدف قرار دادن میتوکندری و با تاثیر گذاشتن بر سیگنالینگ وابسته به p53 و بلوکه کردن فعال سازی NF-KB، آپوپتوز را القا کند (Leu & Maa, 2002). القای آپوپتوز می‌تواند در اثر افزایش بیان کاسپازهای مختلف بخصوص کاسپازهای ۳، ۸ و ۹ در سلول‌های سرطانی رخ دهد (Ashokkhar et al., 1999; Wu et al., 2005).

ژن Cdc42 یک GTPase از خانواده Rhoها است که متعلق به سوپرفامیلی Ras است. Cdc42 به‌عنوان یک سوئیچ مولکولی مهم در برهمکنش با واکنشگرها و فعال کردن آن‌ها عمل می‌کند (Adams et al., 1990). برخی مطالعات بر روی ژن‌های مورد هدف سلول‌های پستانداران نشان داده است که Cdc42 به‌طور قابل توجهی در تشکیل فیلوپودیا، حرکت، مهاجرت و رشد سلولی درگیر است (Yang et al., 2006; Qadir et al., 2015). محققین دیگر یافته‌اند که Cdc42 در چندین نوع از سرطان‌ها در انسان افزایش می‌یابد. بیان بیش از اندازه Cdc42 با سرطان‌زایی و پیشرفت بسیاری از تومورهای انسانی مرتبط است (Sahai & Marshall, 2002; Liu et al., 2009). افزایش فعالیت Cdc42 مانع از تخریب EGFR توسط c-Cbl می‌شود در نتیجه فعالیت زیاد EGFR موجب القای تجزیه پروتئوزومی *P21^{cip1}* شده که باعث افزایش تکثیر سلولی و مهاجرت می‌شود (Bao et al., 2002; Hirsch et al., 2006). برخلاف آن، کاهش بیان Cdc42 رشد وابسته به تکیه‌گاه را مهار و آپوپتوز را توسط آبخارهای سیگنالی PI(3)K-Akt و Erk و سرکوبگر تومور P53 القا می‌کند (Zugasti et al., 2001).

در همین راستا، محققین در سال ۲۰۱۴ با بررسی اثر کورکومین به همراه سیس‌پلاتین در سلول‌های A549 سرطان ریه مشاهده کردند که کورکومین از طریق مهار مسیر FA/BRCA (روندهای تعمیر DNA آسیب دیده)، سلول‌های A549 را به سیس‌پلاتین حساس می‌کند و در کنار سیس‌پلاتین اثر سینرژیک بر سلول‌های مذکور داشته است (Ping et al., 2014). همچنین دیگر محققین در سال ۲۰۱۴ گزارش کردند که کورکومین با سیس‌پلاتین اثرات هم-افزایی دارند. کورکومین باعث افزایش سمیت در سلول‌های تیمار شده با سیس‌پلاتین در سرطان پستان می‌شود. این مقاله پیشنهاد

می‌کند که کورکومین گزینه خوبی برای استفاده به‌عنوان عامل سینرژیک برای سلول‌های تیمار شده توسط سیس‌پلاتین در سرطان پستان است (Baghi et al., 2014).

دیگر محققین در سال ۲۰۰۵ نشان دادند که کورکومین از طریق فعال سازی کاسپاز ۳ و ۹ باعث ایجاد اثرات آپوپتوتیک در سلول‌های رده HA22T/VGH در سرطان کبد می‌شود و در حالت ترکیب کورکومین با سیس‌پلاتین اثرات سینرژیک مشاهده شده است (Notarbartoloa et al., 2005). این موضوع که سلول‌های سرطانی مثانه به سیس‌پلاتین مقاومت نشان داده‌اند باعث شد که برخی محققین از ترکیب کورکومین و سیس‌پلاتین استفاده و مشاهده کردند که این ترکیب می‌تواند آپوپتوز را از طریق فعال سازی کاسپاز ۳ و محصولات ROS، القا کند (Park et al., 2016). کورکومین می‌تواند حساسیت سلول‌های بنیادی سرطان (CSC) در سرطان سلول‌های غیرکوچک ریه (NSCLC) را به آپوپتوز القا شده توسط سیس‌پلاتین افزایش و متاستاز را نیز مهار کند. بنابراین استفاده از کورکومین به همراه سیس‌پلاتین قدرت دارویی سیس‌پلاتین را افزایش می‌دهد (Puteri et al., 2016).

در این پژوهش هدف بررسی اثر کورکومین و سیس‌پلاتین و اثر هم افزایی آن دو بر بیان ژن Cdc42 و رده سلولی Calu-6 است که به این مهم دست یافته شود که آیا کورکومین به تنهایی و در حالت ترکیب با داروی سیس‌پلاتین می‌تواند بر سلول‌های Calu-6 و بیان ژن Cdc42 نیز مانند سایر ژن و سلول‌ها که در تحقیقات گذشته بررسی شده‌اند، تاثیر داشته باشد؟ آیا کورکومین می‌تواند جایگزینی بی‌خطر و طبیعی و در عین حال کم هزینه و در دسترس برای داروهای مورد استفاده کنونی در شیمی‌درمانی گردد و یا اثر سینرژیک در تاثیرگذاری داروها داشته باشد. برای این منظور از سیس‌پلاتین دارویی کاربردی و موثر در شیمی‌درمانی استفاده شد و اثر آن بر رده‌ای از سلول‌های کارسینومای ریه مورد بررسی و با تاثیر ماده طبیعی و در دسترسی به نام کورکومین مورد مقایسه قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه رده سلولی Calu-6 از انستیتو پاستور ایران تهیه شد. سلول‌ها در محیط کشت RPMI-1640 حاوی ۱۰ درصد FBS و یک درصد آنتی بیوتیک‌های پنی‌سیلین و استرپتومایسین که همه از شرکت Gibco-USA تهیه شده، در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و فشار CO₂ پنج درصد در فلاسک‌های چسبیده (Biofil- UK) کشت داده شد.

تیمار کردن سلول با سیس‌پلاتین و کورکومین

داروی سیس‌پلاتین ۵ mg/ml مورد نیاز برای این مطالعه از ابو فارما-اتریش تهیه گردید و دور از نور نگهداری شد. کورکومین از شرکت Sigma-USA خریداری شد. برای تهیه استوک کورکومین مقدار ۵mg پودر کورکومین را در ۱۰۰ μl DMSO که به‌طور تجربی به‌دست آمد، حل کرده و به‌صورت استوک‌هایی در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری و در زمان استفاده با محیط کشت به نسبت ۱:۱۰ رقیق شد. دی‌متیل سولفوکسید (DMSO) از شرکت Merck-Germany و پودر ۳- (۴،۵- Dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT) از شرکت Sigma-USA تهیه شد.

به منظور تیمار سلول‌ها با سیس‌پلاتین و کورکومین ابتدا تعداد بیست هزار سلول در هر چاهک پلیت ۲۴ خانه کشت داده شد. ۲۴ ساعت پس از کاشت سلول‌ها، به هر چاهک دوز معینی از سیس‌پلاتین یا کورکومین و یا ترکیبی از هر دو اضافه شد. در ابتدا دوزهای تیماری برای سیس‌پلاتین، ۰/۱، ۰/۲۵، ۰/۵، ۱، ۲/۵، ۵، ۱۰، ۱۵، ۲۰، ۵۰ و دوزهای استفاده شده برای تیمار با کورکومین ۰/۵، ۱، ۲، ۴، ۸، ۱۶، ۳۲ و ۶۴ ساعت مورد استفاده قرار گرفت.

شمارش سلول‌ها و تعیین درصد زنده مانی آن‌ها

پس از جدا کردن سلول‌ها با تریپسین و سانتریفیوژ با rpm ۱۵۰۰ به مدت ۵ دقیقه، سوسپانسیون سلولی یکنواختی تهیه و سپس ۱۰ μl از آن به همراه ۱۰ μl محلول تریپان‌بلو ۰/۴ درصد به زیر لامل روی لام نئوبار اضافه شد سپس با میکروسکوپ معکوس (Biomedica- Eropian) تعداد سلول‌ها در ۱ ml شمارش و از طریق فرمول زیر محاسبه شد:

$$\text{میانگین سلول‌های شمارش شده} \times 2 \times 10^4 = \text{تعداد سلول‌ها در ۱ ml محیط}$$

۱۰۰ × تعداد کل سلول‌ها / تعداد سلول‌های رنگ نگرفته = درصد سلول‌های زنده

تریپان بلو مورد استفاده از شرکت Merck-Germany و تریپسین EDTA ۰/۲۵ درصد تهیه شده از شرکت Gibco-UK استفاده شد.

جهت تعیین زنده مانی سلولی با استفاده از تریپان‌بلو برای تعیین میزان اثر داروی سیس‌پلاتین و یا کورکومین بر سلول‌های سرطانی به صورت زیر عمل گردید:

تعداد ۲ × ۱۰^۴ سلول در چاهک‌های پلیت ۲۴ خانه کشت داده و ۲۴ ساعت بعد با غلظت‌های مورد نظر تیمار شدند. پس از گذشت ۲۴ و ۴۸ ساعت از زمان تیمار سلول‌ها از کف چاهک‌ها با ۲۵۰ μl تریپسین جدا شده و به میکروتیوب منتقل شدند. پس از

1000 spectrophotometer (Thermo-Scientific, USA) استفاده شد. ساخت cDNA توسط کیت Fermentase (آلمان) و مطابق دستورالعمل انجام شد.

طراحی پرایمر برای ژن مورد نظر Cdc42 و ژن کنترل GAPDH
پرایمرهای مورد استفاده ابتدا توسط نرم افزار Oligo7 و پایگاه IDT طراحی شد و سپس با استفاده از Primer-Blast (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast>) پرایمرهای طراحی شده از لحاظ اختصاصیت اتصال به اهداف خود مورد بررسی قرار گرفتند که توالی رفت، 3'-TATGATTGGTGGAGAACCAT-5' و توالی برگشت 3'-ATTCTTTAGGCCTTTCTGTG-5' است. غلظت پرایمرهای مورد استفاده در واکنش معادل ۱۰ پیکومول در میکرولیتر بود. پرایمرها توسط شرکت Macrogen کشور کره جنوبی سنتز شدند.

واکنش‌های Real Time PCR

برای انجام واکنش‌های Real Time PCR کیت SYBER® Green Master mix مورد استفاده قرار گرفت که از شرکت یکتا تجهیز خریداری شد. دستگاه rotor-gene 6000 ساخت شرکت corbett جهت انجام واکنش Real Time PCR استفاده شد. در تمامی مراحل آنالیز بیان ژن، از نمونه‌های کنترل منفی استفاده شد. زمان، دما و تعداد چرخه‌های استفاده شده برای اندازه‌گیری تغییرات بیان ژن Cdc42 در این تکنیک به این صورت بود که مرحله واسرشته سازی یکبار در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد و به مدت ۷ دقیقه و به تعداد یک چرخه و بعد در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت زمان ۲۰ ثانیه و به تعداد ۴۰ چرخه انجام و سپس مرحله اتصال آغازگرها در دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۰ ثانیه، مرحله بسط آغازگرها در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۲ ثانیه و نهایتاً مرحله بسط نهایی آغازگرها در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد، به مدت ۱۰ دقیقه در یک چرخه انجام شد.

آنالیز داده‌ها

آنالیز داده‌های حاصل از MTT

نتایج حاصل از روش MTT از سه بار تکرار آزمایش به‌دست آمد. داده‌های خام با استفاده از نرم افزار GraphPad Prism به لحاظ آماری بررسی شد و مقدار $p > 0.05$ معنادار در نظر گرفته و نمودارها نیز با کمک نرم افزار ذکر شده رسم گردید.

آنالیز داده‌های فلوسایتومتری

آنالیز داده‌های فلوسایتومتری توسط نرم افزار Flowing انجام گرفت و نمودارهای میله‌ای توسط نرم افزار Instat رسم گردید.

آنالیز داده‌های Real time PCR

سانتریفیوژ محلول رویی دور ریخته شد و به هر کدام یک میلی‌لیتر محیط جدید اضافه شد و شمارش سلولی و تعیین درصد سلول‌های زنده با استفاده از رنگ تریپان‌بلو طبق روش بالا انجام شد.

سنجش زنده مانی سلولی با روش MTT

برای این روش حدود 2×10^4 سلول در پلیت ۲۴ خانه کشت داده شدند. سپس دوزهای مختلف سیس‌پلاتین و یا کورکومین به خانه‌های مربوط به تست اضافه شد و به مدت ۲۴ یا ۴۸ ساعت در انکوباتور و در تاریکی قرار گرفت. بعد از اتمام زمان انکوباسیون به هر چاهک ۱۰۰ میکرولیتر محلول MTT در شرایط تاریکی اضافه شد سپس به مدت چهار ساعت در تاریکی و در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت؛ سپس کریستال‌های فورمازان توسط DMSO به حالت محلول درآمدند. در نهایت جذب نوری در طول موج ۵۷۰ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفوتومتر (Milton Roy- Spectronic 21D- USA) خوانده شد و درصد بقای سلول‌ها از تقسیم جذب نوری خوانده شده برای گروه تست بر جذب نوری خوانده شده برای گروه کنترل، ضرب در صد به‌دست آمد.

بررسی آپوپتوز

برای بررسی آپوپتوز از روش فلوسایتومتری و کیت تشخیص آپوپتوز Annexin V-FITC از شرکت Abcam- UK استفاده شد. سلول‌ها در فلاسک‌های 25 cm^2 به تعداد 4×10^5 کشت داده شدند سپس با غلظت‌های خاصی که از نتایج تست MTT مناسب به نظر می‌رسید (غلظت $0.67 \mu\text{g/ml}$ برای کورکومین و $1/7 \mu\text{g/ml}$ برای سیس‌پلاتین و یا ترکیب همزمان هر دو، طی ۲۴ ساعت تیمار شد. پس از تریپسینه کردن، سلول‌ها یک بار با محیط کشت کامل شستشو داده می‌شوند. پس از سانتریفیوژ با دور ۱۵۰۰rpm به مدت ۵ دقیقه طبق دستورالعمل موجود در کیت سلول‌ها در ۵۰۰ میکرولیتر از بافر اتصال سوسپانسیون می‌شوند. پس از آن به ترتیب $5 \mu\text{l}$ Annexin V-FITC و $5 \mu\text{l}$ پروپیدیوم یدید به سوسپانسیون سلولی اضافه شده و به مدت ۵ دقیقه در دمای اتاق و در تاریکی انکوبه می‌شود. پس از اتمام زمان انکوباسیون میزان بیان انکسین V توسط دستگاه فلوسایتومتری (BD FACSCanto II) خوانده شد.

بررسی تغییر بیان ژن

برای بررسی تغییر بیان ژن از تکنیک Real Time PCR استفاده شد که در ابتدا استخراج RNA توسط ماده Ribo XE تولید شده توسط شرکت Geneall (کره جنوبی) انجام و بعد از استخراج، RNA از نظر کیفیت آن مورد بررسی قرار گرفت که برای این منظور از طریق طیف سنجی توسط نانودراپ ND-

ساعت به ترتیب $2 \mu\text{g/ml}$ و $1 \mu\text{g/ml}$ و دوز کشندگی (Emax) برای تیمارهای ۲۴ و ۴۸ ساعته به ترتیب $15 \mu\text{g/ml}$ و $8 \mu\text{g/ml}$ به دست آمد.

نتایج اثر سیس پلاتین بر میزان زنده مانی سلول‌های Calu-6 با استفاده از روش MTT

نتایج میزان زنده مانی سلول‌های Calu-6 پس از تیمار با غلظت‌های مختلف سیس پلاتین نشان داد که این دارو نیز اثراتی کاملاً وابسته به غلظت و زمان بر تکثیر سلول‌ها دارد. در شکل ۱ قسمت (B) درصد بقای سلولی پس از تیمار با غلظت‌های مختلف طی ۲۴ و ۴۸ ساعت آورده شده است. این کاهش درصد سلول‌های زنده نسبت به نمونه کنترل معنی‌دار ($p < 0.0001$) بود. IC_{50} برای تیمارهای ۲۴ و ۴۸ ساعت به ترتیب $5 \mu\text{g/ml}$ و $1 \mu\text{g/ml}$ و دوز کشندگی (Emax) برای تیمارهای ۲۴ و ۴۸ ساعته به ترتیب $100 \mu\text{g/ml}$ و $50 \mu\text{g/ml}$ به دست آمد.

بررسی اثر همزمان ترکیب کورکومین و سیس پلاتین بر میزان بقای سلول‌ها با استفاده از روش MTT

پس از تعیین دوزهای کشنده اثر سیس پلاتین و کورکومین به‌طور همزمان بر میزان زنده مانی سلولی مورد مطالعه قرار گرفت. در شکل ۱ قسمت (C) درصد زنده مانی سلولی پس از تیمار با غلظت‌های 0.67 و 0.34 میکروگرم بر میلی‌لیتر ($1/3$ IC_{50}) سیس پلاتین همراه با $1/7$ و 0.34 میکروگرم بر میلی‌لیتر ($1/3$ IC_{50}) کورکومین طی ۲۴ و ۴۸ ساعت آورده شده است. نتایج نشان داد که اضافه کردن کورکومین اثرات کشندگی سیس پلاتین را بیشتر می‌کند. میزان معناداری گروه‌های هم افزوده شده نسبت به کنترل به تنهایی در نمودار با ستاره مشخص شده است. این کاهش درصد سلول‌های زنده نسبت به نمونه کنترل معنی‌دار ($p < 0.0001$) بود.

با توجه به نتایجی که از مشاهدات در روش MTT به دست آمد، در بین دوزهای یکسانی که در ۲۴ و ۴۸ ساعت استفاده شد، معنی داری بیشتری در نمونه‌های تیمار شده طی ۲۴ ساعت دیده شد، بنابراین بررسی‌های بعدی در تیمار پس از ۲۴ ساعت در ۳ بار تکرار انجام شد.

همچنین ابتدا برای هر کدام دوزهایی که در آن ۵۰ درصد بقای سلولی وجود دارد (IC_{50}) به‌طور تجربی به دست آمد و سپس $1/3$ مقدار IC_{50} (کمترین دوزی که بر سلول‌ها تاثیر معناداری داشت) به‌عنوان دوز اصلی در این مطالعه انتخاب شد (کلیه تیمارها در شرایط تاریکی انجام شد).

بررسی تغییرات مورفولوژیکی سلول‌ها

در این مرحله سلول‌ها قبل و بعد از تیمار از نظر تغییرات ظاهری به‌وسیله میکروسکوپ معکوس مورد مطالعه قرار گرفتند.

داده‌های خام حاصل از Real Time PCR در داخل نرم افزار Linreg تجزیه تحلیل شد و کارایی تکثیر و اعداد Ct برای هر واکنش به دست آمد. سپس تغییرات بیانی ژن مورد مطالعه در تیمارهای مختلف با استفاده از خروجی Linreg توسط نرم افزار REST که مبتنی بر روش پی‌فاصل است، بررسی شد. و در نهایت از نرم افزار SPSS نسخه ۲۲ برای ثبت داده‌ها و آنالیز آماری استفاده شد. حدود اطمینان در تمامی آزمایش‌ها ۹۵ درصد در نظر گرفته شد و $P < 0.05$ معنی‌دار محسوب گردید.

نتایج

در این پژوهش از کورکومین به‌عنوان ماده‌ای موثر بر روند تکثیر سلولی استفاده شد. همچنین اثرات همزمان این ماده با سیس پلاتین به‌عنوان داروی ضد سرطان رایج در درمان سرطان ریه مورد بررسی قرار گرفت. نتایج آزمون‌های انجام شده به شرح زیر است:

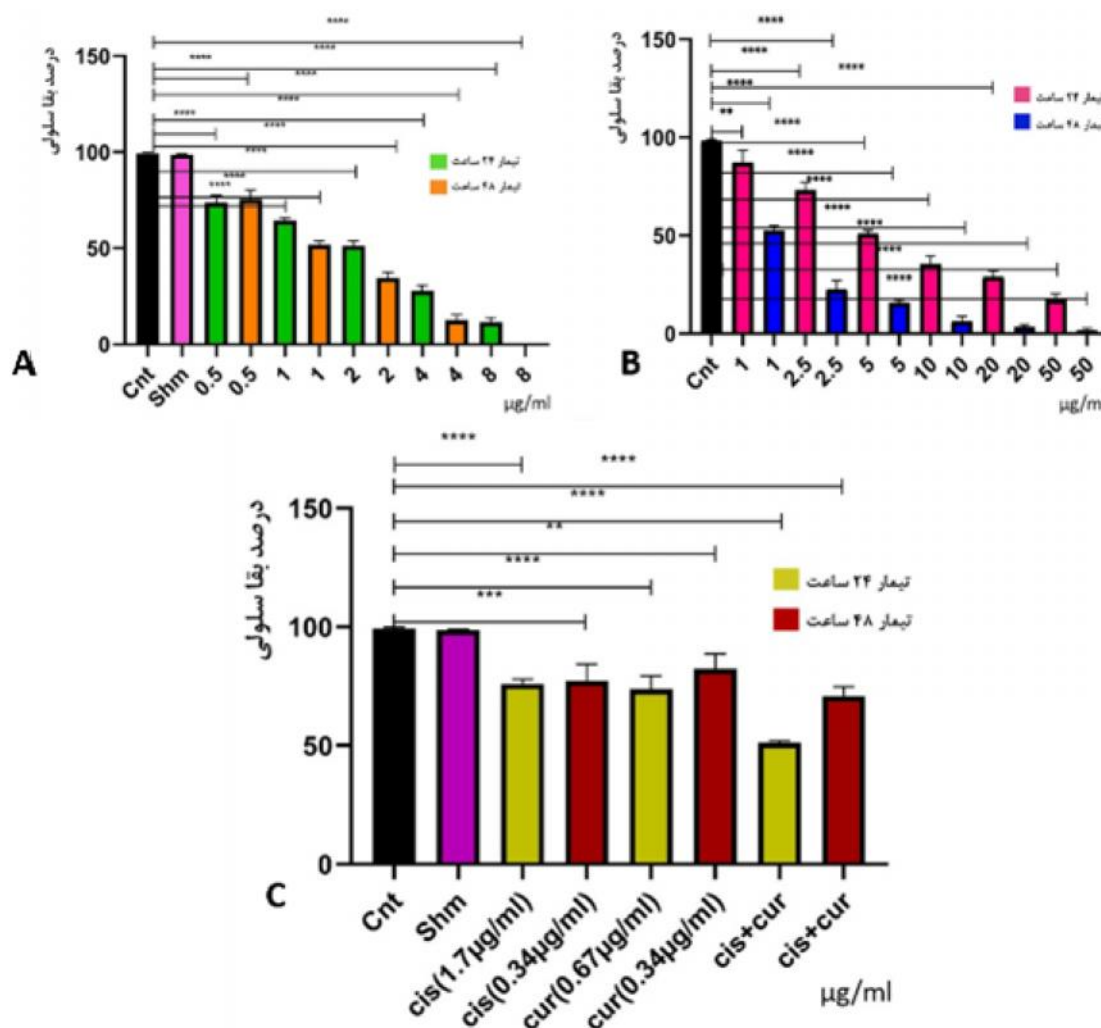
نتایج رشد و تکثیر سلول‌های Calu-6

پیش از بررسی اثر کورکومین و سیس پلاتین بر روند تکثیر سلولی، سرعت رشد و تکثیر این سلول‌ها بدون اثر دادن هر گونه ماده‌ای بررسی شد و نتایج نشان داد تعداد سلول‌های ابتدایی که بیست هزار عدد بود پس از گذشت ۲۴ ساعت به تعدادی نزدیک چهل هزار و پس از گذشت زمان ۴۸ ساعت به تعدادی حدود هفتاد و پنج هزار رسید.

بررسی زنده مانی سلولی

نتایج اثر کورکومین بر میزان بقای سلول‌های Calu-6 با استفاده از روش MTT

نتایج آزمون MTT برای نشان دادن درصد سلول‌های زنده پس از تیمار با غلظت‌های 0.5 تا 8 میکروگرم بر میلی‌لیتر کورکومین نشان داد که این ماده می‌تواند در غلظت‌های مختلف درصد سلول‌های زنده را نسبت به گروه کنترل به صورت وابسته به دوز و زمان کاهش دهد. در شکل ۱ قسمت (A) درصد بقای سلولی پس از تیمار با غلظت‌های مختلف طی ۲۴ و ۴۸ ساعت آورده شده است. همان‌طور که در این نمودار و نمودارهای بعدی نشان داده شده یک گروه به‌عنوان شم (شاهد) در نظر گرفته شده که حاوی بیشترین غلظت به‌کار رفته DMSO (مقدار DMSO در استوک تهیه شده از کورکومین 0.1 درصد و بر روی سلول‌ها در هر خانه از پلیت ۲۴ خانه، مقدار DMSO 0.0001 درصد است یعنی مقدار 0.0001 از هر حجمی از استوک و محیط بر روی سلول‌ها در هر خانه از پلیت، DMSO است) در دوزهای تیماری کورکومین است اما چون تاثیر حائز اهمیتی در کشندگی نداشت از آن صرف نظر شد. در تمام غلظت‌ها این کاهش درصد سلول‌های زنده نسبت به نمونه کنترل معنی‌دار ($p < 0.0001$) بود. IC_{50} برای تیمارهای ۲۴ و ۴۸



شکل ۱- اندازه‌گیری درصد بقای سلول‌های رده Calu-6 کارسینومای ریه انسان ۲۴ و ۴۸ ساعت پس از تیمار با غلظت‌های مختلف کورکومین، سیس‌پلاتین و ترکیب همزمان آن‌ها با استفاده از روش MTT. (سه بار تکرار). (A) کورکومین، (B) سیس‌پلاتین و (C) ترکیب سیس‌پلاتین و کورکومین (C) به صورت وابسته به دوز و زمان بر تکثیر سلول‌ها تاثیر معناداری داشتند. در حالت ترکیبی کورکومین در غلظت‌های ۰/۳۴ و ۰/۶۷ میکروگرم بر میلی لیتر و سیس‌پلاتین در غلظت ۱/۷ و ۰/۳۴ میکروگرم بر میلی لیتر طی تیمار به ترتیب ۲۴ و ۴۸ ساعت مورد استفاده قرار گرفتند. ستاره‌ها میزان معناداری در مقایسه با نمونه کنترل را نشان می‌دهند. (cnt: control, cis: cisplatin, cur: curcumin).

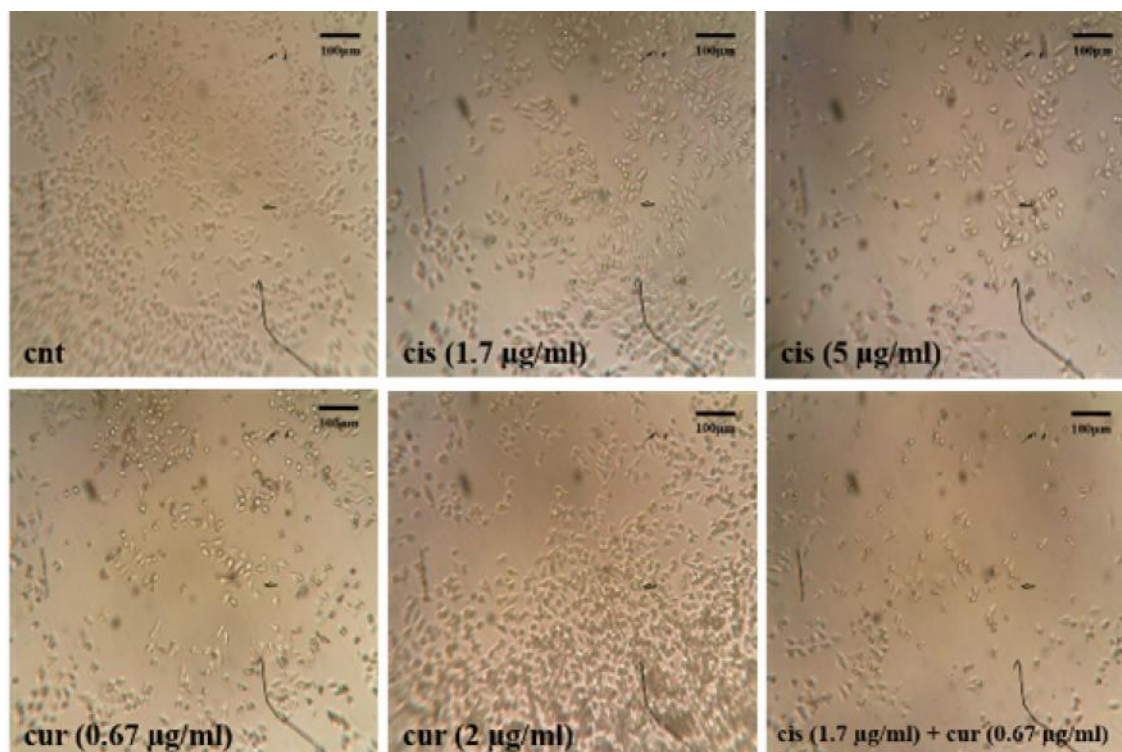
Figure 1. Measuring the viability rate of Calu-6 cells after treatment with curcumin, cisplatin and their combination using MTT method, (after three times repeats of 24- and 48- hour treatments). Curcumin (A), cisplatin (B) and cisplatin plus curcumin (C) significantly affect the proliferation of cells in a dose- and time-dependent manner. In the combination treatment, curcumin at concentrations of 0.67 and 0.34 $\mu\text{g/ml}$ and cisplatin at concentrations of 1.7 and 0.34 $\mu\text{g/ml}$ were utilized in 24- and 48- hour treatments, respectively. Stars show a significant change in viability rates in comparison with the control group (cnt: control, cis: cisplatin, cur: curcumin).

نتایج مشاهدات میکروسکوپی اثرات سیس‌پلاتین بر مورفولوژی سلول‌های Calu-6

تغییرات مورفولوژیک در سلول‌های تیمار شده با داروی سیس‌پلاتین در شکل نشان داده شده است. در میان گروه‌های تیمار شده با این دارو سلول‌هایی به چشم می‌خورد که دارای اندازه کوچک‌تر، هسته متراکم‌تر و غشا چروک خورده بودند که می‌تواند نشانه‌های سلول‌هایی باشد که دچار مرگ سلولی از نوع آپوپتوز

بررسی میکروسکوپی اثر داروی سیس‌پلاتین و کورکومین بر سلول‌های Calu-6

سلول‌ها پس از طی کردن مرحله تیمار مورد مشاهده قرار گرفته و با دوربین مخصوص میکروسکوپ از آن‌ها عکس‌هایی گرفته شد. عکس‌های تهیه شده از چاهک‌های مربوط به گروه‌های تیمار شده با کورکومین یا سیس‌پلاتین و یا چاهک‌های گروه کنترل گرفته شده و با هم مورد مقایسه قرار گرفتند.



شکل ۲- تصویر سلول‌های رده Calu-6 کارسینومای ریه انسان ۲۴ ساعت پس از تیمار با ۱/۷ و ۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر سیس‌پلاتین، ۰/۶۷ و ۲ میکروگرم بر میلی‌لیتر کورکومین و ترکیب همزمان آن‌ها. در حالت ترکیبی از ۱/۷ میکروگرم بر میلی‌لیتر سیس‌پلاتین و ۰/۶۷ میکروگرم بر میلی‌لیتر کورکومین به صورت همزمان استفاده شده است. مشاهدات مورفولوژیکی در مقایسه سلول‌های کنترل با سلول‌های تیمار شده نشان می‌دهند که با افزایش دوز تیمار، تعداد سلول‌های زنده کمتر و سلول‌های با ظاهر آپپتوتیک بیشتر می‌شوند. (cnt: control, cis: cisplatin, cur: curcumin)

Figure 2. Images of human lung carcinoma Calu-6 cell line after 24-hour treatment by 1.7 and 5 µg/ml of cisplatin, 0.67 and 2 µg/ml curcumin and their co-administration. Morphological examinations show that in comparison with the control group, cells exposed to treatments show that as the concentration of therapeutic agents increases, the number of living cells decreases and the number of cells with apoptotic morphology increases. (cnt: control, cis: cisplatin, cur: curcumin)

سیس‌پلاتین و همچنین سلول‌های تیمار شده با کورکومین سلول‌هایی به چشم می‌خورد که دارای اندازه کوچک‌تر، هسته متراکم‌تر و غشا چروک خورده بودند که می‌تواند نشانه‌های سلول‌هایی باشد که دچار مرگ سلولی از نوع آپپتوز شده‌اند؛ در نتایج این بررسی دیده شد که هرچه دوز سیس‌پلاتین و کورکومین استفاده شده بیشتر باشد یا زمان تیمار بیشتر باشد تعداد سلول‌های زنده کمتر و سلول‌هایی با ظاهر آپپتوتیک بیشتر می‌شود. این می‌تواند نشان‌دهنده این موضوع باشد که اثر سیس‌پلاتین و کورکومین بر سلول‌های Calu-6 وابسته به دوز است.

در حالت تیمار سلول‌ها با ترکیب دوز ۰/۶۷ µg/ml کورکومین و ۱/۷ µg/ml سیس‌پلاتین به‌طور همزمان نتایج نشان می‌دهد که با اثر سینرژیک کورکومین در کنار سیس‌پلاتین، تعداد

شده‌اند؛ در نتایج این بررسی دیده شد که هرچه غلظت سیس‌پلاتین استفاده شده بیشتر باشد یا زمان تیمار بیشتر باشد تعداد سلول‌هایی با این مورفولوژی بیشتر می‌شود. این می‌تواند نشان‌دهنده این موضوع باشد که اثر سیس‌پلاتین بر سلول‌های Calu-6 هم وابسته به دوز و هم وابسته به زمان است.

در غلظت IC_{50} ۱/۳ کورکومین یعنی ۰/۶۷ µl تعداد اندکی از سلول‌هایی به چشم می‌خورد که دارای اندازه کوچک‌تر، هسته متراکم‌تر، غشای چروک و گرد بودند که می‌تواند علائم سلول‌هایی باشد که دچار آپپتوز شده‌اند؛ اما در غلظت IC_{50} سلول‌های بیشتری با ویژگی‌های مذکور مشاهده می‌شود.

نتایج مشاهدات میکروسکوپی اثرات سیس‌پلاتین، کورکومین و

ترکیب هر دو بر مورفولوژی سلول‌های Calu-6

تغییرات مورفولوژیک در سلول‌های تیمار شده در شکل ۲ نشان داده شده است. در میان گروه‌های تیمار شده با داروی

تومورهای انسانی مرتبط است (Hirsch et al., 2006; Liu et al., 2009).

کاهش بیان Cdc42 به ترتیب توسط miR-137، miR-185 و miR-330 باعث مهار رشد و تحریک آپوپتوز در سلول‌های سرطانی کلورکتال می‌شود (Yuefeng et al., 2013). در این مطالعه با تکیه بر اینکه ژن Cdc42 نقش کلیدی در بوجود آمدن تومور دارد، تاثیر ماده شیمیایی (سیس‌پلاتین) که به‌طور قطعی در سرکوب روند سرطان تاثیرگذار است بر بیان ژن Cdc42 مورد بررسی قرار گرفت. از طرفی نیز مشخص شده که گیاه زردچوبه در درمان بسیاری از بیماری‌ها مفید است و از صدها سال قبل به‌عنوان راه‌های درمانی مورد استفاده قرار می‌گرفته است. امروزه علم برای یافتن راه‌های مناسب برای درمان بیماری‌ها به سمت طبیعت سوق یافته و با استفاده از مواد طبیعی نتایج چشمگیری نیز به‌دست آمده که کمترین آسیب را به بیماران و مبتلایان به امراض مختلف می‌رسانند. در این مطالعه نیز بررسی تاثیر کورکومین و مقایسه آن با داروی سیس‌پلاتین انجام گرفت که در نهایت به این مهم دست یافته شد که عصاره ماده طبیعی زردچوبه به‌عنوان یک ضد سرطان می‌تواند در کنار داروهای قوی شیمی درمانی برای سرکوب تومورزایی به‌عنوان گزینه‌ای بی‌خطر و کارآمد در نظر گرفته شود. در این مطالعه تاثیر داروی سیس‌پلاتین هم به‌عنوان یک کنترل مثبت برای اثبات موثر بودن کورکومین در سلول‌های Calu-6 کارسینومای ریه در نظر گرفته شد و هم به‌عنوان گزینه‌ای که قدرت سرکوب‌کنندگی و القا‌کننده آپوپتوزی آن با کورکومین مورد مقایسه و بررسی قرار گرفت. بر اساس تحقیقات پیشین، سیس‌پلاتین به تنهایی باعث آپوپتوز در سلول‌های سرطانی در بافت‌های مختلف می‌شود (Vanhoef et al., 1995).

نتایج به‌دست آمده از MTT نشان دادند که کورکومین باعث کاهش درصد بقای سلول‌های Calu-6 می‌شود که همسو با مشاهدات به‌دست آمده در مطالعه حاضر، محققین نشان دادند که عملکرد کورکومین به‌صورت وابسته به دوز و زمان است (Min-Liang et al., 1996). محققین با بررسی سلول‌های NCI-H460 تیمار شده با کورکومین مشاهده کردند غلظت‌های متفاوت کورکومین استفاده شده در زمان‌های متفاوت در سلول‌های NCI-H460 نتایج متفاوتی در مورفولوژی سلول‌ها و بقای سلولی را نشان می‌دهند و کورکومین به شیوه‌ای وابسته به دوز، تغییرات مورفولوژیک آپپتوتیک متفاوتی را القا می‌کند. همچنین پس از تیمار با کورکومین و گذشت ۲۴ ساعت، کاهش بقای سلول‌های NCI-H460 مشاهده شد (Shin-Hwar et al., 2010). دیگر محققین با مقایسه کورکومین با Mitomycin C

سلول‌های زنده کمتر و سلول‌های در حال مرگ بیشتر می‌شود و همچنین در این حالت نیز اثرات وابسته به دوز مشاهده شد.

بررسی نوع مرگ سلولی

بررسی نوع مرگ سلولی القا شده در سلول‌های Calu-6 توسط کورکومین، سیس‌پلاتین و حالت ترکیبی این دو و نیز بررسی کمی مرگ سلولی القا شده به روش فلوسایتومتری مورد بررسی قرار گرفت.

پس از کشت و تیمار سلول‌ها با غلظت‌های $0.67 \mu\text{g/ml}$ کورکومین، $1/7 \mu\text{g/ml}$ سیس‌پلاتین و یا هر دو، میزان بیان آنکسین و پروپیدیوم دیداندازگیری شد. نتایج آنالیز فلوسایتومتری نشان داد میزان آپوپتوز و نکروز در گروه کنترل به ترتیب (C) $2/56$ و $4/67$ ، در گروه تیمار شده با کورکومین (D) میزان آپوپتوز و نکروز به ترتیب $37/72$ و $0/58$ ، در گروه تیمار شده با سیس‌پلاتین (E) این درصدها به ترتیب $13/37$ و $1/01$ و در گروه تیمار همزمان (F) $30/53$ و $1/79$ بوده است (شکل ۳ a).

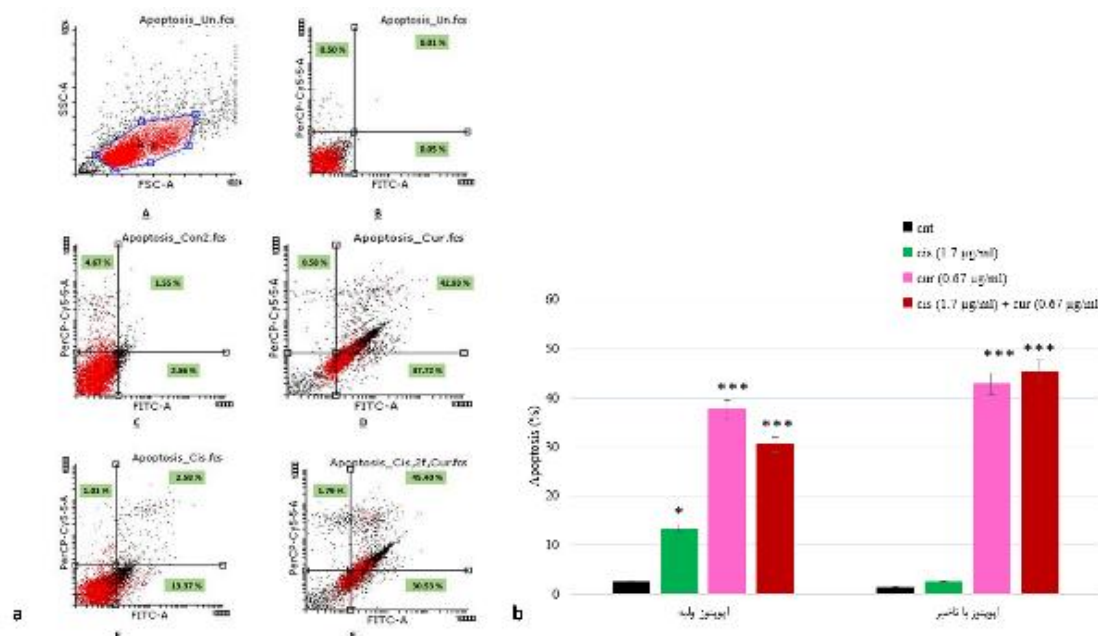
در شکل ۳ b میزان آپوپتوز در سلول‌های تیمار شده با داروی سیس‌پلاتین، ماده کورکومین و یا تیمار با هر دو به تفکیک آپوپتوز اولیه و آپوپتوز با تاخیر با هم مقایسه شده اند.

بررسی بیان ژن Cdc42

در این مطالعه برای بررسی اثر سیس‌پلاتین، کورکومین و ترکیب این دو بر بیان ژن Cdc42 تکنیک Real Time PCR مورد استفاده قرار گرفت که نتایج حاصل در تمام موارد کاهش بیان ژن معناداری را نشان می‌دهند. کاهش بیان ژن Cdc42 در گروه‌های تیمار شده با دوز $0.67 \mu\text{g/ml}$ کورکومین و دوز $1/7 \mu\text{g/ml}$ سیس‌پلاتین به‌صورت قابل ملاحظه‌ای دیده شد. البته همان‌طور که انتظار می‌رفت بیان ژن در حالت تیمار ترکیبی به‌صورت معنادارتری کاهش یافته که نشان دهنده تاثیر سینرژیک کورکومین و سیس‌پلاتین است.

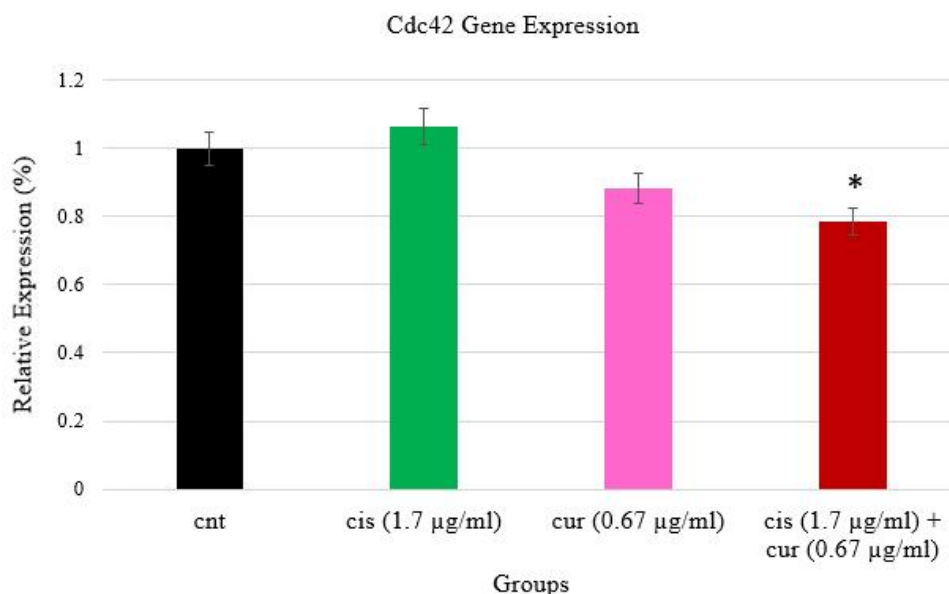
بحث

یکی از عواملی بروز سرطان ریه، اختلال در بیان نرمال ژن‌های دخیل در چرخه سلولی از جمله ژن Cdc42 است. افزایش بیان ژن Cdc42 در بسیاری از تومورهای انسانی دیده شده که این نشان می‌دهد ژن Cdc42 می‌تواند یک هدف کلیدی در درمان سرطان باشد. مطالعات قبل نشان دادند که کاهش بیان Cdc42 باعث توقف چرخه سلولی و در نتیجه مهار رشد، مهاجرت و تحریک آپوپتوز در سلول‌های سرطانی می‌شود (Yuefeng et al., 2013; Karin et al., 2013; Xiaolan et al., 2013). بیان بیش از اندازه Cdc42 با سرطان‌زایی و پیشرفت بسیاری از



شکل ۳- اندازه‌گیری میزان آنکسین و پروپییدیوم یدید و بررسی نوع مرگ القا شده در سلول‌های رده Calu-6 کارسینومای ریه انسان با استفاده از روش فلوسایتمتری (a). تصویر (A) بلانک یا کنترل دستگاه، (B) کنترل منفی، (C) گروه کنترل، (D) گروه تیمار شده با ۰/۶۷ µg/ml کورکومین، (E) تیمار شده با ۱/۷ µg/ml سیس‌پلاتین و (F) سلول‌های تیمار شده با ۰/۶۷ µg/ml کورکومین و ۱/۷ µg/ml سیس‌پلاتین به طور همزمان. نمودار میله‌ای نتایج حاصل از فلوسایتمتری و مقایسه میزان آپوپتوز اولیه و آپوپتوز باتاخیر در سلول‌ها پس از ۲۴ ساعت تیمار با کورکومین، سیس‌پلاتین و ترکیب آن‌ها (b).

Figure 3. Investigating the amount of Annexin and PI and the type of induced cell death in Calu-6 cell line using flow cytometry (a). (A) blank or device control, (B) negative control, (C) control group, (D) cells treated with 0.67 µg/ml curcumin, (E) cells treated with 1.7 µg/ml cisplatin and (F) cells treated with 0.67 curcumin and 1.7 cisplatin. Bar chart of flow cytometry results compare early and late apoptosis in cells after 24-hour treatments (b).



شکل ۴- نمودار تغییر بیان ژن Cdc42 بواسطه تیمار با کورکومین، سیس‌پلاتین و ترکیب هر دو. این نمودار کاهش بیان ژن Cdc42 را در تمام نمونه‌های تیمار شده طی آنالیز بیان ژن توسط تکنیک Real time PCR را نشان می‌دهد. در تمام موارد از دوزهای ۱/۳ IC₅₀ طی تیمار ۲۴ ساعت استفاده شده‌است. (cnt: control, cis: cisplatin, cur: curcumin).

Figure 4. Changes in the Expression of Cdc42 gene after 24-hour treatment with curcumin, cisplatin and their co-administration, as analyzed by Real Time-PCR. In all treatments the 1/3 IC₅₀ dose was utilized (cnt: control, cis: cisplatin, cur: curcumin).

بر سلول‌های لنفوسیت انسان، یک روند بقای وابسته به دوز برای تاثیر کورکومین مشاهده کردند (Siddique et al., 2010). در سال ۲۰۰۱ نشان دادند که کورکومین بیان مکانیسم‌های بقای سلولی در رده‌های سلولی سرطان پروستات را کاهش می‌دهند (Mukhopadhyay et al., 2001).

طبق نتایج مطالعه حاضر، کورکومین به‌عنوان یک القاکننده مسیر آپوپتوز در سلول‌های Calu-6 نه تنها می‌تواند همتراز با داروی سیس‌پلاتین نقش ایفا کند بلکه حتی می‌تواند در القای این اثر، موثرتر نیز باشد. همسو با این نتایج دیگر محققین نشان دادند که تیمار سلول‌های NSCLC سرطان ریه، NCI- H460، با کورکومین باعث القای آپوپتوز در این رده از سلول‌ها می‌گردد (Hui-Y et al., 2010). در سال ۲۰۰۵ نشان دادند که کورکومین فعالیت nf-Kb را مهار و آرایش G1/S، سرکوب تکثیر را القا و آپوپتوز را در سلول‌های لنفومای جبه‌ای فعال می‌کند (Shishodia, 2005). همچنین در سال ۲۰۱۵ با بررسی اثر کورکومین بر سلول‌های رده SCCHN ریه، با استفاده از آنکسین V مشاهده کردند که کورکومین باعث افزایش آپوپتوز در سلول‌های SCCHN می‌شود (Haque et al., 2015). همچنین در سال ۲۰۱۳ نیز بر سلول‌های GBC-SD، تاثیر کورکومین بر آپوپتوز را به‌وسیله annexin V بررسی شد و کورکومین به‌طور قابل توجهی باعث افزایش پاسخ‌های هم آپوپتوز اولیه و هم آپوپتوز با تاخیر در سلول‌های GBC-SD کبدی شد (Liu et al., 2013). در سال ۲۰۱۶ با بررسی سلول‌های KCL22 علاوه بر روند وابسته به دوز و زمان کورکومین، مشاهده کردند که با افزایش دوز کورکومین تغییرات مورفولوژیکی به سمت آپوپتوزی شدن نیز بیشتر می‌شود. اثر ضد تکثیری کورکومین توسط روش MTT بررسی شد که کاهش بقای سلولی را پس از تیمار با کورکومین نشان داد. همچنین در این مطالعه میزان آنکسین V را نیز توسط فلوسایتومتری بررسی کردند و نشان دادند با افزایش دوز کورکومین و حتی زمان تیمار تعداد سلول‌هایی که به سمت آپوپتوزی شدن میل می‌کنند بیشتر می‌شود (Iqbal et al., 2016).

در نهایت تاثیر کورکومین بر بیان ژن Cdc42، کاهش بیان ژن را نشان داد که همسو با نتایج این مطالعه در سال ۲۰۰۷ با بررسی اثر کورکومین بر بیان ژن Cyclin E در سلول‌های MCF-7 و LNCaP از تکنیک Real Time PCR استفاده شد و نشان دادند که اثر کورکومین بر بیان ژن Cyclin E می‌تواند به صورت وابسته به زمان و دوز تغییر کند و به‌طور کلی باعث کاهش بیان ژن Cyclin E شود (Aggarwal et al., 2007). همچنین اثر کورکومین بر بیان ژن Cdc42 در سلول‌های D801، با روش Semiquantitative RT PCR بررسی و

مشاهده کردند کورکومین با روندی وابسته به دوز بیان ژن را مهار می‌کند (Chen et al., 2012). مطالعات نشان می‌دهد مهار کردن Cdc42 توسط کورکومین می‌تواند دلیل توقف چرخه سلولی، تقسیم و تکثیر در سلول‌ها باشد که این همسو با مطالعات گذشته که نشان دادند کورکومین باعث القای تجزیه EGFR، فعال سازی MAPK ها و در نهایت القای آپوپتوز در سلول‌های توموری می‌شود، است (Aggarwal et al., 2007; Jen-Yi et al., 2011; Xiuzhen et al., 2012).

همراستا با نتایج حاصل از هم افزایی کورکومین و سیس پلاتین در مطالعه جاری، در سال ۲۰۱۶ گزارش شد که کورکومین اثر مهارکنندگی سیس‌پلاتین را در تحریک آپوپتوز در سلول‌های A549 و H2170 در سرطان ریه افزایش می‌دهد (Puteri et al., 2016). بنابراین می‌توان استنباط کرد که استفاده کورکومین در کنار داروهای شیمی‌درمانی می‌تواند به اندازه داروی شیمیایی اثر داشته باشد و اثرات جانبی که داروهای شیمی‌درمانی ایجاد می‌کنند را به دنبال نخواهد داشت بعلاوه کورکومین ماده‌ای طبیعی است که در مقایسه با داروهای شیمی‌درمانی در دسترس‌تر و ارزان‌تر است.

نتیجه‌گیری

به‌طور کلی نتایج به‌دست آمده نشان می‌دهند که بیان ژن Cdc42 در سلول‌های سرطان ریه افزایش داشته و مهار آن توسط کورکومین و ترکیب کورکومین با داروی سیس‌پلاتین می‌تواند باعث کاهش و یا مهار رشد و تکثیر در سلول‌های سرطان ریه شود. کورکومین نیز می‌تواند Cdc42 را مهار و همچنین موجب القای آپوپتوز شود. این نتایج نشان می‌دهند که اگر کورکومین با داروهای دیگری مانند سیس‌پلاتین که در شیمی‌درمانی سرطان‌ها کاربرد دارند، مورد استفاده قرار گیرد می‌تواند اثرات به مراتب بیشتری در القای سلول‌ها به سمت آپوپتوزی شدن داشته باشد. از طرفی نیز مشخص شد بیان ژن Cdc42 در فرایندهای زیادی از جمله سرطانی شدن دخیلند، در سلول‌هایی از سرطان ریه که با سیس‌پلاتین، کورکومین و یا هر دو با هم تیمار شده‌اند کاهش معنی داری دارد که همه این‌ها می‌تواند نوید بخش آینده‌ای روشن و امیدوار کننده برای یافتن درمان قطعی سرطان از ترکیبات طبیعی باشد.

سپاسگزاری

نویسندگان مقاله از دانشکده علوم زیستی دانشگاه خوارزمی کمال تشکر را اعلام می‌دارند.

REFERENCES

- Adams, A., Johnson, D., Longnecker, R., Sloat, B. & Pringle, J. 1990. Cdc42 and Cdc43, Two additional genes involved in budding and the establishment of cell polarity in the yeast *saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Cell Biology* 111: 131-142.
- Aggarwal, B., Banerjee, S., Bharadwaj, U. & Sung, B. 2007. Curcumin induces the degradation of cyclin E expression. *Biochemical Pharmacology* 73: 1024-1032.
- Aggarwal, S., Takada, Y., Singh, S., Myers, J. & Aggarwal, B. 2004. Inhibition of growth and survival of human head and neck squamous cell carcinoma cells by curcumin via modulation of nuclear factor-Kb signaling. *International Journal of Cancer* 111: 679-692.
- Amin, A., Haque, A., Rahman, M., Chen, Z., Khuri, F. & Moon Shin, D. 2015. Curcumin induces apoptosis of upper aerodigestive tract cancer cells by targeting multiple pathways. *Plos One* 10: e0124218.
- Baghi, N., Javidi, M.A., Babashah, S. & Sadegizadeh, M. 2014. Curcumin enhances the cisplatin-induced cytotoxicity in breast cancer stem-like cells. *Nutrition and Food Sciences Research* 1: 86-87.
- Baharuddin, P., Satar, N., Fakiruddin, K. & Zakaria, N. 2016. Curcumin improves the efficacy of cisplatin by targeting cancer stem-like cells through P21 and Cyclin D1-mediated tumour cell. *Oncology Reports* 35: 13-25.
- Bao, W., Thullberg, M., Zhang, H., Onischenko, A. & Stromblad, S. 2002. Cell attachment to the extracellular matrix induces proteasomal degradation of P21 (Cip1) via Cdc42/Rac1 Signaling. *Molecular and Cellular Biology* 22: 4587-4597.
- Chattopadhyay, I., Biswas, K., Bandyopadhyay, U. & Banerjee, R. 2004. Turmeric and curcumin biological actions and medicinal applications. *Current Science* 87: 50-87.
- Chen, P., Li, J., Jiang, H. & Lan, T. 2014. Curcumin reverses cisplatin resistance in cisplatin-resistant lung. *Tumor Biology* 36: 3591-3599.
- Chen, Q., Jiao, D., Yao, Q., Yan, J., Song, J., Chen, F., Lu, G. & Zhou, J. 2012. Expression analysis of cdc42 in lung cancer and modulation. *International Journal of Oncology* 40: 1561-1568.
- Ferlay, J., Steliarova-Foucher, E., Lortet-Tieulent, J., Rosso, S., Coebergh, J., Comber, H., Forman, D. & Bray, F. 2013. Cancer incidence and mortality patterns in Europe: Estimates for 40 countries in 2012. *European Journal of Cancer* 49: 1374-1403.
- Groot, P., Wu, C., Carter, B. & Munden, R. 2018. The epidemiology of lung cancer. *Translational Lung Cancer Research* 7: 220-233.
- Hirsch, D., Shen, Y. & Wu, W. 2006. Growth and motility inhibition of breast cancer cells by epidermal growth factor receptor degradation is correlated with inactivation of Cdc42. *Cancer Research* 66: 3523-3530.
- Hui, Y., Jo-Hua, C., Chi-Cheng, L., Jiun-Long, Y., Tung-Yuan, L., Yang-Ching, K. & Jing-Gung, C. 2010. Curcumin induces apoptosis in human non-small cell lung cancer NCI-H460 cells through ER stress a caspase cascade and mitochondria-dependent pathways. *Anticancer Research* 30: 2125-2134.
- Iqbal, B., Ghildiyal, A., Sahabjada, S., Arshad, M., Mahdi, A. & Tiwari, S. 2016. Antiproliferative and apoptotic effect of curcumin and TRAIL (TNF related apoptosis inducing ligand) in chronic myeloid leukaemic cells. *Journal of Clinical and Diagnostic Research* 10: 1-5.
- Jen-Yi, L., Yee-Ming, L., Gee-Chen, C., Sung-Liang, Y., Wan-Yu, H., Jeremy, J., Huei-Wen, C. & Pan-Chyr, Y. 2011. Curcumin induces EGFR degradation in lung adenocarcinoma and modulates P38 activation in Intestine: The versatile adjuvant for gefitinib therapy. *Plos One* 6(8): e23756.
- Jia, Y., Li, J., Qin, Z. & Liang, Z. 2009. Autophagic and apoptotic mechanisms of curcumin-induced death in K562 cells. *Asian Natural Products Research* 11: 918-928.
- Karin, Z., Trevor, L., Patrick, R., Dietmar, A. & Seyedhossein, A. 2013. A Rac1/Cdc42 GTPase-specific small molecule inhibitor suppresses growth of primary human prostate cancer xenografts and prolongs survival in mice. *Plos One* 8: e74924.
- Khar, A., Ali, A.M., Pardhasaradhi, B.V., Begum, Z. & Anjum, R. 1999. Antitumor activity of curcumin is mediated through the induction of apoptosis in AK-5 tumor cells. *Febs Letters* 445: 165-168.
- Kuo, M., Huang, T. & Lin, J. 1996. Curcumin, an antioxidant and anti-tumor promoter, induces apoptosis in human leukemia cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease* 1317: 95-100.
- Langer, C., Besse, B., Gualberto, A., Brambilla, E. & Soria, J. 2010. The evolving role of histology in the management of advanced non-small cell lung cancer. *Journal for Clinical Oncology* 28: 5311-5320.
- Leu, T. & Maa, M. 2002. The molecular mechanisms for the antitumorigenic effect of curcumin. *Current Medicinal Chemistry- Anti-Cancer Agents* 2: 357-70.
- Liu, T., Tan, Z., Jiang, L., Gu, J., Wu, X., Cao, Y., Li, M., Wu, K. & Liu, Y. 2013. Curcumin induces apoptosis in gallbladder carcinoma cell Line GBC-SD cells. *Cancer Cell International* 13: 13-64.
- Liu, Y., Wang, Y., Zhang, Y. & et al. 2009. Abnormal expression of P120- catenin, E-cadherin, and small gtpases is significantly associated with malignant phenotype of human lung cancer. *Lung Cancer* 63: 375-382.
- Mukhopadhyay, A., Bueso-Ramos, C., Chatterjee, D., Pantazis, P. & Aggarwal, B. 2001. Curcumin downregulates cell survival mechanisms in human cancer cell lines. *Oncogene* 20: 7597-7609.
- Notarbartoloa, M., Pomaa, P., Perria, D. & Dusanocheta, L. 2005. Antitumor effects of curcumin, alone or in combination with. *Cancer Letters* 224: 53-65.
- Oda, Y. 1995. Inhibitory effect of curcumin on SOS functions induced by UV irradiation. *Mutation Research Letters*, 348: 67-73.
- Pal, S., Choudhuri, T., Chattopadhyay, S., Bhattacharya, A., Datta, G., Das, T. & Sa, G. 2001. Mechanisms of curcumin-induced apoptosis of

- Ehrlich's ascites carcinoma cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 288: 658-665.
- Park, B.H., Eun Lim, J., Gyun Jeon, H., Seo, S. & Moo, H.** 2016. Curcumin potentiates antitumor activity of cisplatin in bladder. *Oncotarget* 7: 63870-63886.
- Qadir, M., Parveen, A. & Ali, M.** 2015. Cdc42: Role in cancer management. *Chemical Biology & Drug Design* 86: 432-439.
- Ray, M. & Jablons, D.** 2009. Lung cancer metastasis novel biological mechanisms and impact on clinical practice. *Hallmarks of Metastasis*. Pp.29-46.
- Sahai, E. & Marshall, C.** 2002. Rho-GTPases and Cancer. *Nature Reviews Cancer* 2: 133-142.
- Shishodia, S.** 2005. Curcumin inhibits constitutive NF- κ B Activation, Induces G1/S arrest, suppresses proliferation, and induces apoptosis in mantle cell lymphoma. *Biochemical Pharmacology* 70: 700-713.
- Siddique, Ym., Aram G., Begm T., Gupta, J., & Afzal, M.** 2009. Assessment of cell viability, lipid peroxidation and quantification of DNA fragmentation after the treatment of anticancerous drug mitomycin C and curcumin in cultured human blood lymphocytes. *Experimental and Toxicologic Pathology* 62: 503-508.
- Siegel, R., Miller, K. & Jemal, A.** 2019. Cancer statistics. *CA: A Cancer Journal for Clinicians* 69: 7-34.
- Siwak, D., Shishodia, S., Aggarwal, B. & Kurzrock, R.** 2005. Curcumin-induced antiproliferative and proapoptotic effects in melanoma cells are associated with suppression of I κ B kinase and nuclear factor κ B activity and are independent of the B-Raf/mitogen-activated/extracellular signal-regulated protein kinase pathway and the Akt pathway. *Cancer* 104: 879-890.
- Vanhoefer, U., Harstrick, A., Wilke, H., Schleucher, N., Walles, H., Schriider, J. & Seeber, S.** 1995. Schedule-dependent antagonism of paclitaxel and cisplatin in human gastric and ovarian carcinoma cell lines in Vi&O. *European Journal of Cancer* 31: 92-97.
- Wiltshaw, E.** 1979. Cisplatin in the treatment of cancer. *Platinum Metals Review* 23: 90-98.
- Wu, Q., Chen, Y. & Li, X.** 2005. Effect of curcumin on caspase 8- and caspase 9-induced apoptosis of lymphoma raji cell. *Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi* 13: 624-627.
- Wu, S., Hang, L., Yang, J., Chen, H., Lin, H., Chiang, J., Lu, C., Yang, J., Lai, T., Ko, Y. & Chung, J.** 2010. Curcumin induces apoptosis in human non-small cell lung cancer NCI-H460 cells through er stress and caspase cascade- and mitochondria-dependent pathways. *Anticancer Research* 30: 2125-2133.
- Xiaolan, Z., Yuefeng, L., Huiling, S., Hao, L., Lulu, L., Lulu, H. & Wenlin, X.** 2013. Mir-137 Inhibits the proliferation of lung cancer cells. *Febs Letters* 587: 73-81.
- Xiuzhen, H., Baoshan, X., Christopher, S., Yoshinobu, O., Long, C., Lei, L. & Yan, L.** 2012. Curcumin inhibits protein phosphatases 2a and 5, leading to activation of mitogen-activated protein kinases and death in tumor cells. *Carcinogenesis* 33: 868-875.
- Yang, L., Wang, L. & Zheng, Y.** 2006. Gene targeting of Cdc42 and Cdc42 gap affirms the critical involvement of cdc42 in filopodia induction, directed migration, and proliferation in primary mouse embryonic fibroblasts. *Molecular Biology of the Cell* 17: 4675-4685.
- Yuefeng, L., Xiaolan, Z., Wenlin, X., Dongqing, W. & Jinchuan, Y.** 2013. Mir-330 regulates the proliferation of colorectal cancer cells by targeting Cdc42. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 431: 560-565.
- Zugasti, O., Rul, W. & Roux, P.** 2001. Raf-Mek-Erk cascade in anoikis is controlled by Rac1 and Cdc42 via Akt. *Molecular and Cellular Biology* 21: 6706-6717.

How to cite this article:

Motaharinia, M. & Nabiuni, M. 2022. Study of synergic effects of Curcumin and Cisplatin on Cdc42 gene expression in human Calu-6 lung carcinoma cell line. *Nova Biologica Reperta* 8: 253-264. (In Persian).

مطهری نیا، م. و نبیونی، م. ۱۴۰۰. بررسی اثرات هم افزایی کورکومین با داروی سیس‌پلاتین بر بیان ژن Cdc42 در سلول‌های رده Calu-6 کارسینومای ریه در انسان. یافته‌های نوین در علوم زیستی ۸: ۲۶۴-۲۵۳.