

Effect of Curcumin on AQP5 gene expression in HT-29 human colorectal cancer cells

Nabiuni M^{1*}, Kouchesfahani H², Azari S², Delfan B³, Gholami S², Yarahmadi A²

1- Department of Cell and Molecular Biology, Faculty of Biological Sciences, Kharazmi University, Tehran, I. R. Iran.

2- Department of Animal Biology, Faculty of Biological Sciences, Kharazmi University, Tehran, I. R. Iran.

3- Department of Pharmacology, Faculty of Medicine, Lorestan University of Medical Sciences, Khoramabad, I. R. Iran.

Received June 2012; Accepted October 4, 2012

Abstract:

Background: Colorectal carcinoma is the third most common type of cancer and the second most common cause of cancer-related mortality in the world. The aquaporins (AQPs) are water channel proteins that play a major role in water movements through epithelial and endothelial tissues. Expression of AQP5 was induced in the early stages of colon cancer. An induction of AQP5 expression in colon cancer suggests a probable driving force roles for AQP5 in colon carcinogenesis. Curcumin, as a chemopreventive phytochemical is important to block, retard or reverse the process of carcinogenesis. Several studies have suggested that curcumin may prevent or delay the occurrence of colorectal cancer. This study aimed to examine the effect of curcumin on the inhibition of AQP5.

Materials and Methods: In this experimental study, the HT-29 cell line was cultured in DMEM medium containing 10% FBS and 100 U/ml penicillin and 100 mg/ml streptomycin. The effect of curcumin concentrations on the growth of cells was determined using the MTT [3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide] assay. Immunocytochemistry was performed to examine the effect of curcumin on the expression of AQP5.

Results: Immunocytochemistry showed the decreased amount of AQP5 protein in the curcumin-treated cells.

Conclusion: Curcumin inhibits the expression of AQP5 in human colorectal cancer cell line, HT-29. The inhibition of AQP5 expression may provide a novel therapeutic target for the treatment and prevention of colorectal cancer.

Keywords: Curcumin, Colorectal carcinoma, Aquaporin 5, HT-29 cell line

* Corresponding Author.

Email: Nabiuni@tmu.ac.ir

Tel: 0098 912 660 9337

Fax: 0098 263 451 0005

Conflict of Interests: No

Feyz, Journal of Kashan University of Medical Sciences January, 2013; Vol. 16, No 6, Pages 493-500

Please cite this article as: Nabiuni M, Kouchesfahani H, Azari S, Delfan B, Gholami S, Yarahmadi A. Effect of Curcumin on AQP5 gene expression in HT-29 human colorectal cancer cells. *Feyz* 2013; 16(6): 493-500.

بررسی تاثیر کورکومین بر میزان بیان آکواپورین ۵ در سلول‌های سرطانی روده بزرگ انسان (HT_29)

محمد نبیونی^{*۱}، هما محسنی کوچصفهانی^۲، سکینه آذری^۳، بهرام دلفان^۴، صدیقه غلامی^۳، اعظم یاراحمدی^۳

خلاصه:

سابقه و هدف: سرطان روده بزرگ سومین سرطان شایع و دومین علت مرگ و میر ناشی از سرطان در جهان محسوب می‌شود. آکواپورین‌ها، پروتئین‌های کانال آبی بوده که نقش مهمی در انتقال آب در بافت‌های اندوتلیالی و اپی‌تلیالی بر عهده دارند. بیان AQP5 در مراحل اولیه سرطان روده القاء می‌شود. القای بیان AQP5 این حدس را بر می‌انگیزد که AQP5 یک نیروی به پیش برنده در آغاز سرطان‌زایی روده است. کورکومین از جمله فیتوکمیکال‌هایی است که در استراتژی chemoprevention در راستای جلوگیری از پیش‌روی و یا برگشت فرآیند سرطان‌زایی مهم است. مطالعات نشان داده‌اند که کورکومین می‌تواند مانع بروز سرطان روده شده و یا آنرا به تاخیر بیندازد. در این پژوهش تاثیر کورکومین بر مهار AQP5 بررسی شد.

مواد و روش‌ها: در این پژوهش تجربی رده سلولی HT_29 در محیط کشت DMEM حاوی ۱۰ FBS و ۱۰۰ U/ml پنی-سیلین و ۱۰۰ µg/ml استرپتومایسین کشت داده شد. اثر غلظت‌های مختلف کورکومین بر روی رشد سلول‌های سرطانی HT_29 با روش MTT بررسی شد. آزمون ایمونوسیتوشیمی به منظور بررسی اثر کورکومین بر بیان AQP5 انجام گردید.

نتایج: نتایج حاصل از ایمونوسیتوشیمی نشان داد که میزان پروتئین AQP5 در سلول‌های تیمار شده توسط کورکومین کاهش می‌یابد. **نتیجه‌گیری:** مطالعه حاضر نشان داد که کورکومین بیان AQP5 را در سلول‌های سرطانی روده HT-29 مهار می‌کند. مهار AQP5 ممکن است یک راه درمانی جدید در پیش‌گیری و درمان سرطان روده باشد.

واژگان کلیدی: کورکومین، سرطان کولورکتال، آکواپورین ۵، رده سلولی HT_29

دو ماه‌نامه علمی-پژوهشی فیض، دوره شانزدهم، شماره ۶، بهمن و اسفند ۱۳۹۱، صفحات ۴۹۳-۵۰۰

مقدمه

سرطان روده بزرگ جزو بیماری‌های خطرناک بوده و از نظر شیوع سومین سرطان شایع و دومین علت مرگ و میر ناشی از سرطان در جهان (پس از سرطان ریه) محسوب می‌شود. در ایران نیز همین آمار برقرار است، اما متأسفانه سن شیوع بیماری پایین‌تر از استاندارد جهانی می‌باشد. سرطان روده بزرگ، پس از سرطان مری و معده سومین سرطان شایع گوارشی در مردان و زنان ایرانی می‌باشد. در ایجاد یک توده سرطانی از بافت طبیعی اپی‌تلیال روده حداقل باید ۶-۸ جهش در بافت طبیعی ایجاد شود. با ایجاد این جهش‌ها در بافت روده، مسیرهای انتقال پیام سرطان‌زا در سلول‌ها فعال می‌شوند که برخی از آنها نقش مهم‌تری در ایجاد سرطان دارند [۴-۲]. علل و عوامل مختلفی می‌توانند به‌عنوان عامل سرطان‌های مختلف هم‌چون سرطان روده بزرگ در نظر گرفته شوند؛ از جمله عوامل ژنتیکی، محیطی و رژیم غذایی. عوامل سرطان‌زای متفاوت موجود در رژیم غذایی، جهش‌های نقطه‌ای K-ras را القاء می‌کنند [۵، ۶]. مشخص شده است که جهش سوماتیک APC و Kras در تغییر مخاط طبیعی به کارسینوما در سرطان روده نقش دارند [۷]. نوع رژیم غذایی یکی از مهمترین فاکتورهای خارجی موثر بر سرطان روده است. مطالعات تخمین می‌زنند که توسط رژیم غذایی صحیح از ۷۰ درصد سرطان‌های روده می‌توان پیش‌گیری کرد [۸]. شیمی درمانی، جراحی و پرتو درمانی روش-

سرطان به‌عنوان یک مشکل جهانی و دومین عامل مرگ و میر انسانی در کشورهای توسعه‌یافته است. خود کفا بودن در تکثیر سلولی، عدم حساسیت به سیگنال‌های مهار کننده رشد، عدم محدودیت در توانایی تکثیر، وقوع آنژیوژنز، تهاجم بافتی و متاستاز از جمله تغییرات فیزیولوژیکی می‌باشند که تقریباً در تمامی انواع تومورهای انسانی یافت می‌شوند. تفاوت‌های ژنتیکی بی‌شمار و تغییرات اپی‌ژنتیکی که در سرطان رخ می‌دهند، توضیحی از طبیعت ناهمگن سرطان و پیچیده بودن درمان آن می‌باشد [۱]. سالانه ۵۰۰۰۰ مورد تازه سرطان در ایران تشخیص داده می‌شود که سرطان‌های گوارشی تعداد قابل توجهی از این آمار را به‌خود اختصاص می‌دهند.

^۱استادیار، گروه زیست‌شناسی سلولی مولکولی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه خوارزمی

^۲دانشیار، گروه زیست‌شناسی علوم جانوری، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه خوارزمی

^۳دانشجو کارشناسی ارشد، گروه زیست‌شناسی علوم جانوری، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه خوارزمی

^۴دانشیار، گروه فارماکولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی لرستان

* نشانی نویسنده مسئول:

تهران، دانشگاه خوارزمی، دانشکده علوم زیستی، گروه آموزشی زیست‌شناسی

تلفن: ۰۹۱۲۶۶۰۹۳۳۷، دورنویس: ۰۲۶۳۴۵۱۰۰۵

پست الکترونیک: Nabiyuni@tmu.ac.ir

تاریخ دریافت: ۹۱/۳/۱۷، تاریخ پذیرش نهایی: ۹۱/۷/۱۳

مواد و روش‌ها

در این پژوهش تجربی رده سلولی HT₂₉ از انستیتو پاستور ایران تهیه شد و در محیط کشت DMEM (Gibco, USA) حاوی ۱۰٪ FBS (Gibco, UK) و ۱۰۰ U/ml پنی-سیلین و ۱۰۰ µg/ml استرپتومایسین در فشار ۵ درصد CO₂ و دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در فلاسک ۲۵ cm³ کشت داده شد. سپس به تعداد ۱۰^۵×۱/۵ سلول بر میلی‌لیتر در پلیت‌های کشت ۲۴ خانه کشت داده شد. شمارش سلولی با استفاده از لام هموسایتو-متری صورت گرفت؛ بدین صورت که سلول‌های ۴ خانه بزرگ شمارش شده و میانگین اعداد به‌دست آمده در ۱۰^۴ ضرب شد و تعداد سلول‌ها در هر میلی‌لیتر به‌دست آمد. محلول غلیظ کورکو-مین با غلظت اولیه ۵ میلی‌مولار در اتانول ۹۶ درصد تهیه شده و به دور از نور در دمای ۴۰°C- نگهداری شد. جهت رقیق نمودن و اضافه نمودن کورکومین به محیط کشت از معادله $N_1V_1 = N_2V_2$ استفاده شد. به‌عنوان مثال برای ایجاد غلظت ۰/۵ میلی‌مولار، ۱۰۰ میکرولیتر از غلظت ۵ میلی‌مولار با ۹۰۰ میکرولیتر محیط کشت کامل مخلوط شد. جهت رقیق نمودن تمامی محلول‌های غلیظ از محیط کشت استفاده شد تا اثر اتانول قابل چشم‌پوشی باشد. جهت تعیین درصد بقا (viability) سلول‌ها از روش MTT استفاده شد (Sigma, UK). پودر MTT با غلظت ۵ میلی گرم بر میلی‌لیتر در سرم فیزیولوژیکی حل شد و دور از نور در دمای ۲۰°C- نگهداری گردید. اساس روش MTT بر پایه عملکرد آنزیمی در سلول‌های زنده می‌باشد؛ بدین صورت که سلول‌های زنده دارای آنزیم‌های فعال بوده و قادر به احیاء ماده MTT می‌باشند و در اثر این احیاء، رنگدانه‌های تیره رنگ در داخل سلول‌های زنده تشکیل می‌گردد، اما در داخل سلول‌های مرده اثری از این رنگدانه‌ها دیده نمی‌شود. جهت روش MTT، ابتدا ۱۰^۵×۱/۵ سلول بر میلی‌لیتر در هر خانه از پلیت کشت ۲۴ خانه ریخته شده و غلظت ماده مورد نظر تنظیم گردید. پس از اتمام بازه‌های زمانی (۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت)، ۱۰۰ میکرولیتر از محلول MTT به هر خانه اضافه شد و ۴ ساعت انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد دور از نور انجام گرفت. پس از اتمام انکوباسیون محیط کشت رویی تخلیه شد، سپس ۱۰۰۰ میکرولیتر ایزوپروپانول اسیدی (Merck, Germany) به-منظور حل شدن کامل بلورهای فورمازان به هر چاهک اضافه شد تا رنگدانه‌های داخل سلول‌های زنده بیرون ریخته شوند. اسید در ایزوپروپانول باعث می‌شود غشا سلول لیز شده و ایزوپروپانول وارد سلول شده، بلورهای نامحلول فورمازان را به حالت محلول در آورد. میزان حداکثر جذب نوری (OD) در طول موج ۵۷۰ نانومتر اندازه گرفته شد و طبق معادله زیر، درصد سلول‌های زنده

های رایج درمان سرطان می‌باشند. داروهای شیمیایی علاوه بر سلول‌های سرطانی، سلول‌های سالم و عوامل مفید مانند آنزیم‌ها و سوپراتراهای مربوط به همانندسازی و ساخت DNA را نیز مورد حمله قرار می‌دهند [۹]. پیشگیری از سرطان، استفاده از مواد شیمیایی طبیعی، مصنوعی یا بیولوژیکی در جهت مهار، برگشت یا جلوگیری از تکوین سرطان است [۱۰]. اغلب روش‌های کاربردی برای کاهش شیوع مرگ و میر ناشی از سرطان، تاخیر فرآیند سرطان‌زایی از طریق عوامل پیشگیری کننده از سرطان است. ترکیباتی که می‌توانند مسیرهای درون سلولی درگیر در عملکرد سلول غیرطبیعی را مورد هدف قرار دهند، توانایی دست‌کاری این مسیرها را دارند و به این طریق فرایند سرطان‌زایی را به تاخیر می-اندازند [۱۱]. آکواپورین‌ها، کانال‌های آبی با نفوذپذیری بالا، می-باشند که در بسیاری از موجودات از جمله انسان شناسایی شده‌اند [۱۲، ۱۳]. آکواپورین‌ها در تکوین سرطان نقش بسیار مهمی دارند. مطالعات گوناگون نشان داده‌اند که بیان آکواپورین‌های گوناگون در تومورها افزایش یافته است. نتایج مطالعات مختلف در مورد بیان افزایش یافته AQP3 در سلول‌های سرطانی کلیه و کارسینومای پوست [۱۴]، AQP5 در سرطان پانکراس و تخمدان [۱۵، ۱۶]، نقش AQP1 در کنترل چرخه سلولی و تومورزایی [۱۷، ۱۸]، القای بیان AQP1,3,5 در طی فعالیت لنفوسیت‌ها [۱۹]، بیان‌گر اهمیت و نقش آکواپورین‌ها در سرطان می‌باشند. مهار بیان آکواپورین‌ها تکثیر سلول‌های سرطانی، مهاجرت، متاستاز و آنژیو-ژنز را تحت تأثیر قرار داده است [۲۰]. مهار AQP5 می‌تواند یک راه درمانی جدید علیه سرطان روده باشد. کورکومین یا دی-فرولویل متان (Diferuloylmethan) که ۵-۲ درصد مواد موجود در زردچوبه را تشکیل می‌دهد، از ریزوم گیاه *Curcumin longa* متعلق به خانواده *Zingiberaceae* جدا شده است و دارای خواص آنتی‌اکسیدانی، ضدسرطانی، ضد التهابی و آپوپتوز سلولی است [۲۱، ۲۲]. کورکومین یک رده متمایز از عوامل پیشگیری از سرطان است که دارای مکانیسم عمل چندگانه بوده و قادر است هر سه مرحله سرطان‌زایی القاء، شروع و پیشرفت را تحت تأثیر قرار دهد. اثر پیشگیری‌کننده از سرطان کورکومین تقریباً در همه مراحل سرطان‌زایی به‌خاطر ماهیت غیر سمی آن می-باشد [۴]. کورکومین بیان لیگاند‌های آنژیوژنیک و گیرنده‌های آنها را کاهش می‌دهد، همچنین قادر است سلول‌های سرطانی را به شیمی درمانی و پرتو درمانی حساس کند [۲۳-۲۵]. در این تحقیق توانایی کورکومین در مهار AQP5 در راستای مهار سرطان‌زایی روده مورد بررسی قرار گرفته است.

محاسبه گردید. $OD \times 100$ کنترل/OD تست. تمامی تجربیات حداقل سه بار تکرار شدند. جهت آنالیز داده‌ها از نرم افزار Instate 3، از روش one-way ANOVA استفاده شد و P کمتر از ۰/۰۵ معنی‌دار تلقی شد. در این پژوهش تمامی غلظت‌ها با گروه کنترل مقایسه شده و viability آنها نسبت به گروه کنترل سنجیده شده است. ایمونوسیتوشیمی: سلول‌های HT₂₉ توسط تریپسین ۰/۲۵ درصد از کف فلاسک جدا شده و در پلیت‌های کشت سلول ۲۴ خانه کشت داده شدند. ۲۴ ساعت بعد سلول‌ها توسط غلظت ۵۰ μM کورکومین به مدت ۴۸ ساعت تیمار شدند. سپس سلول‌ها توسط PBS شسته شده و در دمای ۴°C به مدت ۱۵ دقیقه توسط فرمالین ۴ درصد تثبیت شدند. در ادامه توسط آلبومین سرم گاوی (BSA) ۱ درصد در دمای اتاق به مدت ۴۵ دقیقه بلوکه شده و سپس با آنتی‌بادی اولیه (Rabbit anti aquaporin5 ab92320)، که از شرکت Gibco انگلستان خریداری شده بود، با رقت ۱۰۰/۱ در ۰/۲ درصد PBST/BSA به مدت یک شبانه روز انکوبه گشتند. پس از شستشو با ۰/۱PBST درصد (PBS- Tween)، سلول‌ها با آنتی‌بادی ثانویه مناسب، کوئوگه با FITC (شرکت رازی- بیوتک) با رقت ۱۶/۱ در ۰/۲ PBST/BSA درصد به مدت ۶۰ دقیقه در دمای ۳۷°C انکوبه شدند. به منظور رنگ‌آمیزی هسته، سلول‌ها توسط رنگ DAPI (4',6-Diamidino-2-Phenylindole 1 $\mu g/ml$) به مدت ۱ دقیقه رنگ‌آمیزی شدند. پس از شستشو با PBS، نتیجه توسط میکروسکوپ فلئورسنت بررسی شد.

نتایج

سلول‌ها در غیاب و حضور غلظت‌های متفاوت کورکو-مین (۱۰-۸۰ μM) به مدت ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت کشت داده شدند. درصد بقای سلول‌ها توسط آزمون MTT سنجیده شد. نمودار و جدول شماره ۱ تاثیر سیتوتوکسیک کورکومین بر سلول‌های HT-29 را نشان می‌دهد.

اثر کورکومین بر مورفولوژی سلول‌های HT₂₉

سلول‌های HT₂₉ تحت تاثیر تیمار با کورکومین دچار تغییراتی در مورفولوژی شدند که این تغییرات در شکل شماره ۱ مشهود می‌باشد. این تغییرات شامل سست شدن اتصال سلول‌ها به

کف چاهک‌های پلیت و از دست دادن قدرت چسبندگی بود. هم-چنین، قدرت سلول‌ها در تشکیل کلونی و باقی ماندن در کنار هم کم می‌شد. بنابراین با سست شدن اتصال سلولی به کف پلیت شکل سلول از حالت چند وجهی به گرد تغییر می‌یافت. نتایج حاصل از MTT نشان داد، کورکومین در غلظت‌های بالای ۸۰ ماکرومولار دارای اثر کشندگی بسیار شدیدی است. با افزایش غلظت کورکومین لیز شدگی شدید سلول‌ها مشاهده شد و درصد بیشتری از سلول‌ها دچار مرگ شدند. در دوزهای (۱۰-۸۰ μM) به صورت وابسته به زمان و غلظت، باعث کاهش بقاء سلولی گردید و بعد از طی ۷۲ ساعت واکوئله شدن شدید سلول‌ها و کاهش معنی‌داری در میزان سلول‌های زنده نسبت به نمونه کنترل گردید و بقایای سلول‌های مرده در محیط تفاوتی با نمونه کنترل نداشت و مهار تکثیر نسبت به نمونه کنترل در سطح $P < 0/01$ معنی‌دار بود. در غلظت ۵۰ μM کورکومین پس از طی ۲۴ ساعت تیمار، بقاء سلولی ۵۳ درصد محاسبه شد (IC₅₀) و بقاء سلولی پس از طی ۷۲ ساعت تیمار با غلظت ۸۰ μM کورکومین به ۵ درصد کاهش یافت ($P < 0/01$).

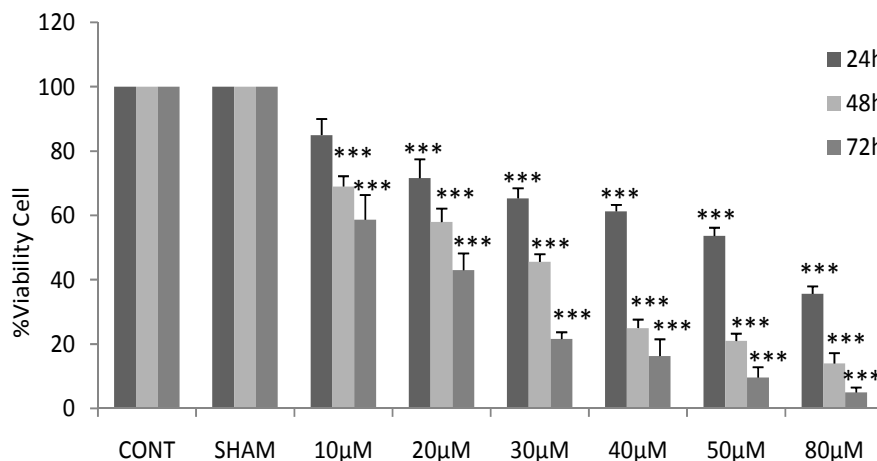
اثر کورکومین بر بیان پروتئین AQP5 در سلول‌های سرطانی HT-29 سلول‌های HT₂₉ با غلظت‌های ۵۰ μM کورکومین به-مدت ۴۸ ساعت تیمار شدند. به منظور تاثیر کورکومین بر بیان AQP5 آزمون ایمونوسیتوشیمی انجام گردید و مشخص شد که کورکومین بیان AQP5 را در این سلول‌ها کاهش می‌دهد. شکل شماره ۲ نتایج حاصل از این آزمون را نشان می‌دهد.

جدول شماره ۱- درصد سلول‌های زنده HT-29 در حضور غلظت-های مختلف کورکومین در مقایسه با کنترل در مدت ۲۴، ۴۸ و ۷۲

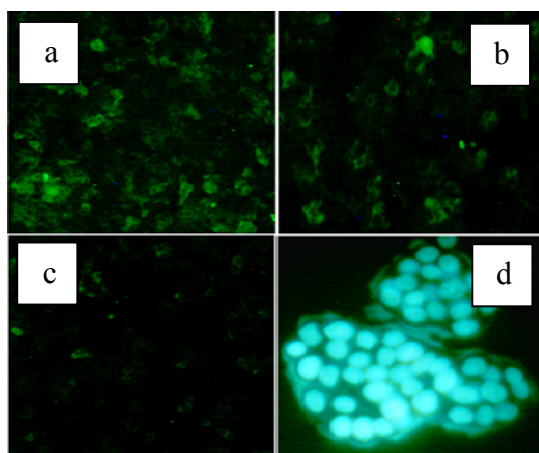
ساعت با روش MTT			
	۷۲ ساعت	۴۸ ساعت	۲۴ ساعت
Control	۱۰۰±۰	۱۰۰±۰	۱۰۰±۰
۱۰ μM	۵۸/۶۶±۷/۶۸***	۶۹±۳/۲۱***	۸۵±۵/۰۳
۲۰ μM	۴۳±۵/۲۹***	۵۸±۴/۱۶***	۷۱/۶۶±۵/۸۴ ***
۳۰ μM	۲۱/۶۶±۲/۰۲***	۴۵/۶۶±۲/۳۳***	۶۵/۳۳±۳/۱۸***
۴۰ μM	۱۶/۳۳±۵/۲۰***	۲۵±۲/۶۴***	۶۱/۳۳±۲/۲۰***
۵۰ μM	۹/۶۶±۳/۱۸***	۲۱±۲/۳۰***	۵۳/۶۶±۲/۶۰***
۸۰ μM	۵±۱/۵۵***	۱۴±۳/۲۱***	۳۵/۶۶±۲/۳۳***

$\bar{X} \pm SEM$ ** $P < 0/01$ *** $P < 0/001$

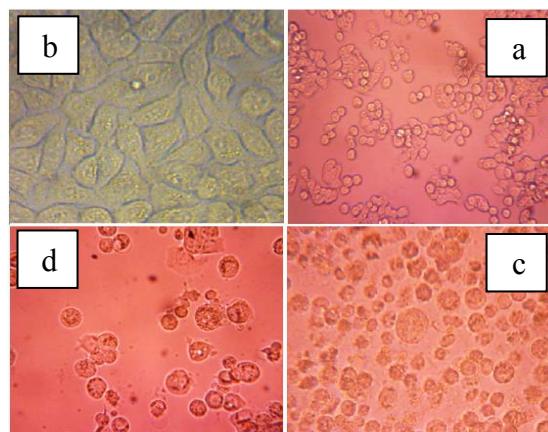
تعداد اولیه سلول‌ها ۱۰۵×۱/۵ در هر میلی لیتر محیط کشت بود.



نمودار شماره ۱- اثر غلظت‌های مختلف کورکومین بر تکثیر سلول‌های HT_29 پس از طی ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت با استفاده از روش MTT
 $\bar{X} \pm \text{SEM}$ *** $P < 0.001$, ** $P < 0.01$



شکل شماره ۲- نتایج حاصل از ایمونوسیتوشیمی سلول‌های گروه کنترل که توسط کورکومین تیمار نشده‌اند (a)، سلول‌های تیمار شده با غلظت ۳۰ μM کورکومین طی ۴۸ ساعت (b)، سلول‌های تیمار شده با غلظت ۵۰ μM کورکومین طی ۴۸ ساعت (c)، هسته سلول‌های گروه کنترل که با رنگ DAPI آمیزی شدند (d).



شکل شماره ۱- مورفولوژی سلول‌های HT_29 در اثر القاء آپوپتوز سلول‌های گروه کنترل که توسط کورکومین تیمار نشده‌اند (a)، در شکل (b و c) که با غلظت ۵۰ μM کورکومین در ۲۴ و ۴۸ ساعت تیمار شده‌اند، می‌توان درج‌ات مختلف القاء آپوپتوز سلولی شامل واکنش شدن سیتوپلاسم و چروک خوردن سلول را مشاهده نمود. در شکل (d) که با غلظت ۵۰ μM کورکومین در ۷۲ ساعت تیمار شده است، تلاشی شدن اجزاء سلول و لیز شدگی سلولی در اثر غلظت‌های سیتوکسیک کورکومین مشاهده می‌شود. بزرگ‌نمایی × ۴۰۰.

بحث

کورکومین یک مولکول آب‌گریز است که به راحتی از غشاء پلاسمایی به داخل سیتوزول عبور می‌کند [۲۶]. مطالعات اپیدمیولوژیک نشان داده است که کورکومین می‌تواند مانع بروز سرطان راست روده شده و یا آن را به تأخیر بیندازد. این ماده که تاریخچه طولانی در درمان سنتی هند دارد، بقاء، تکثیر، آنژیوژنز و متاستاز سلول‌های سرطانی روده بزرگ را از طریق مسیرهای انتقال پیام داخل سلولی گوناگون مثل P53، EGFR، COX_2، و MAPK مهار می‌کند [۲۷، ۲۸]. با مروری بر عملکردهای کورکو-

مین تا حدودی می‌توان مسیرهای مولکولی که کورکومین اثر خود را بر آنها اعمال می‌کند را شناسایی نمود. در این بین فعالیت NF_KB اهمیت خاصی دارد. NF_KB یکی از فاکتورهای نسخه برداری مشتق شده از خانواده پروتئین‌های REL است که در اکثر سرطان‌ها فعال می‌شود و در تکثیر سلول‌های سرطانی نقش دارد [۲۹]. این فاکتور از جمله عوامل مهاری است که در تکثیر سلول‌های سرطانی روده از جمله سلول‌های HT-29 نقش داشته و رونویسی بسیاری از ژن‌های دخیل در سرطان، التهاب، آپوپتوز و تکثیر سلولی را تنظیم می‌نماید. افزایش بیان این فاکتور در بسیاری

را هم در محیط‌های برون و درون‌تنی القا می‌کند [۳۸]. با آنکه AQP3 تنها آکوپورینی است که در بافت اپی‌تلیوم روده‌ای طبیعی بیان می‌شود، بیان آکوپورین‌های متفاوت در سلول‌های توموری به صورت هم‌زمان گزارش شده است. AQP1 و AQP3 در سلول‌های سرطان روده بزرگ بیان شده و بیان آنها با مراحل اولیه تکوین سرطان روده بزرگ وابسته است و به‌علاوه تا مراحل انتهایی تکوین سرطان حفظ می‌شود. بیان AQP5 در ۶۲ درصد بافت‌های سرطانی روده بزرگ مشاهده شده است. این مشاهدات این احتمال را بر می‌انگیزد که بیان AQP یک فرایند آغازکننده و هم‌چنین پیش‌برنده در سرطان‌زایی روده است [۳۹]. AQP5 از طریق فسفوریلاسیون در محل پروتئین کیناز A، واقع در لوپ سیتوپلاسمیک D، قادر است مسیر RAS را مورد هدف قرار دهد. مطالعات Kang و همکارانش نشان داد که AQP5 فسفوریلاسیون ERK (Extracellular signal regulated kinase) را افزایش می‌دهد. AQP1 و AQP3 هیچ تاثیری بر افزایش فسفوریلاسیون ERK ندارند، لذا در انتقال سیگنال دخالتی ندارند [۴۰]. در این مطالعه تاثیر کورکومین بر بیان AQP5 بررسی شد. نتایج بیان‌گر آن است که کورکومین قادر به کاهش این بیان است. مهم آن که بی‌خطر بودن کورکومین تاکنون ثابت شده و مطالعات نشان داده‌اند که حتی دوز ۱۲ میلی‌گرم در روز این ماده به راحتی قابل تحمل است [۴۱].

نتیجه‌گیری

کورکومین قادر است بیان AQP5 را در سلول‌های سرطانی روده HT-29 کاهش دهد و لذا ممکن است به‌عنوان یک مهارکننده AQP5 روند سرطان‌زایی در بافت روده را به تعویق بیاورد.

تشکر و قدردانی

این پژوهش در قالب پایان‌نامه کارشناسی ارشد، در آزمایشگاه زیست‌شناسی سلولی - تکوینی دانشکده علوم زیستی دانشگاه خوارزمی صورت گرفته است. نویسندگان مقاله از مدیریت محترم دانشکده، اساتید محترم و تمام کسانی که در اجرای این پروژه مساعدت نموده‌اند، سپاسگزاری می‌نمایند.

References:

[1] Hanahan D, Weinberg RA. The hall marks of cancer. *Cell* 2000; 100(1): 57-70.

از سلول‌های سرطان روده دیده می‌شود و منجر به مقاوم شدن این سلول‌ها در برابر عوامل متوقف‌کننده تکثیر و یا القاء‌کننده آپوپتوز می‌گردد. مطالعات بسیاری نشان داده موادی که موجب مهار فعالیت این فاکتور رونویسی می‌گردند، باعث آپوپتوز و یا مهار تکثیر سلول‌های سرطانی می‌شوند. کورکومین فعال‌سازی این فاکتورها را مهار کرده و در نتیجه رشد سرطان را مهار نموده و از پیشرفت روند متاستاز جلوگیری می‌کند [۱۱]. Jeong و همکارانش تنظیم NF- κ B را با استفاده از کورکومین در سلول‌های سرطانی روده HT-29 تشخیص داده‌اند [۲۷]. Plummer و همکارانش نیز توانایی کورکومین در کاهش فعالیت فاکتور هسته-ای کاپا را گزارش کرده‌اند [۳۰]. مطالعات بعدی نشان دادند که کورکومین باعث کاهش بیان سایکلین D₁ و E در سلول‌های سرطانی روده شده و شکستگی مولکول بتاکاتنین و در نتیجه کاهش فعالیت کمپلکس بتاکاتنین/TCF را در سلول‌های سرطانی روده hct116 القا می‌کند [۳۲، ۳۱]. بتاکاتنین، فاکتوری کلیدی در آغاز سرطان-زایی روده است [۳۳]. هم‌چنین، این ماده قادر است بیان پروتئین Bcl2 و Egr1 را در سلول‌های hct116 کاهش داده و با مهار بیان گیرنده فاکتور رشد اپیدرمی و تنظیم مسیر انتقال پیام AKT/MTOR از رشد آنها جلوگیری می‌کند [۳۵، ۳۴]. بررسی‌های مختلف نشان داده که سیکلواکسیژناز ۲ نقش مهمی در تکامل سرطان راست روده دارد و دارای اثرهای آنتی‌آپتوتیکی و آنژیوژناست [۱۹]. Zhang و همکارانش نشان دادند کورکومین سیکلواکسیژناز ۲ را هم‌چون لیپواکسیژناز که هر دو آنزیم‌هایی هستند که در روند التهاب درگیرند، را مهار می‌کند [۳۶]. کورکومین قادر است آپوپتوز را در سلول‌های سرطانی از طریق تمام مسیرهای اصلی آپوپتوز (Extrinsic & ER stress pathway) القا کند [۳۷]. کورکومین قابلیت حیات (viability) را در سلول‌های کارسینومای HT-29 با القاء آپوپتوز کاهش می‌دهد [۲۶]. تحقیق حاضر نشان می‌دهد که کورکومین در یک الگوی وابسته به دوز و زمان، رشد سلول‌های سرطانی HT-29 را مهار می‌کند. AQP5 در سرطان‌زایی روده نقش بسیار مهمی دارد و توانایی کورکومین در مهار بیان آن، مدرکی مهم در جهت اثبات قدرت پیش‌گیری‌کننده این ماده در سرطان روده است. Woo و همکارانش گزارش کردند که بیان ناهنجار AQP5 انسانی تغییرات ظاهری بافتی بسیاری و به‌طور مشخص تغییر شکل سلولی

[2] Teimoori L, Azadmanesh K, Amanzadeh A, Zeinali S. Selective Suicide Gene Thrapy of Colon

- Cancer Exploring The urokinase Plasm inogen activator Receptor. *BioDrugs* 2010; 24(2): 131-46.
- [3] Malekzadeh R, Bishehsari F, Mahdavinia M, Ansari R. Epidemiology and Molecular Genetics of Colorectal Cancer in Iran. *Arch Iranian Med* 2009; 12(2): 161-9.
- [4] Wang JB, Qi LL, Zheng SD, Wu TX. Curcumin induces apoptosis through the mitochondria mediated apoptotic pathway in HT₂₉ cells. *J Zhejiang Univ Sci B* 2009; 10(2): 93-102.
- [5] Slattery ML, Curtin K, Anderson K, Ma KN, Edwards S, Leppert M, et al. Associations between dietary intake and K-ras mutations in colon tumors: a population-based study. *Cancer Res* 2000; 60(24): 6935-41.
- [6] Brink M, Weijenberg MP, De Goeij AF, Schouten LJ, Koedijk FD, Roemen GM, et al. Fat and K-ras mutations in sporadic colorectal cancer in The Netherlands Cohort Study. *Carcinogenesis* 2004; 25(9): 1619-28.
- [7] Fearon ER, Vogelstein B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* 1990; 61(5): 759-67.
- [8] Stewart BW, Kleihus P, editors. World Cancer Report. Lyon: IARC Press; 2003.
- [9] Wisniewiki MZ, Wietrzyk J, Opplski A. Targeted delivery of drugs for treatment of parasitic infections. *Arch Immune Therap Exper* 2000; 48: 51-5.
- [10] Duvoix A, Blasius R, Delhalle S, Schnekenburger M, Morceau F, Henry E, et al. Chemopreventive and therapeutic effects of curcumin. *Cancer Lett* 2005; 223(2): 181-90.
- [11] Thangapazham RL, Sharma A, Maheshwari R K. Multiple molecular target in cancer chemoprevention by curcumin. *AAPS J* 2006; 8(3): 443-9.
- [12] Verkman AS. More than just water channels: unexpected cellular roles of aquaporins. *J Cell Sci* 2005; 118(Pt 15): 3225-32.
- [13] Park JH, Saier MH Jr. Phylogenetic characterization of the MIP family of transmembrane channel proteins. *J Membr Biol* 1996; 153(3): 171-80.
- [14] Kageyama Y, Sasaki S, Yamamura Y, Oshima H, Ikawa Y. Water channel protein subtype suggests the origin of renal cell carcinoma. *J Urol* 1996; 156(1): 291-5.
- [15] Burghardt B, Elkaer ML, Kwon TH, Rácz GZ, Varga G, Steward MC, et al. Distribution of aquaporin water channels AQP1 and AQP5 in the ductal system of the human pancreas. *Gut* 2003; 52(7): 1008-16.
- [16] Yang JH, Shi YF, Cheng Q, Deng L. Expression and localization of aquaporin-5 in the epithelial ovarian tumors. *Gynecologic Oncol* 2006; 100(2): 294-9.
- [17] Hoque MO, Soria JC, Woo J, Lee T, Lee J, Jang SJ, et al. Aquaporin 1 is overexpressed in lung cancer and stimulates NIH-3T3 cell proliferation and anchorage-independent growth. *Am J Pathol* 2006; 168(4): 1345-53.
- [18] Moon C, Williams JB, Preston GM, Copeland NG, Gilbert DJ, Nathans D, et al. The mouse aquaporin-1 gene. *Genomics* 1995; 30(2): 354-7.
- [19] Moon C, Rousseau R, Soria JC, Hoque MO, Lee J, Jang SJ, et al. Aquaporin expression in human lymphocytes and dendritic cells. *Am J Hematol* 2004; 75(3): 128-33.
- [20] Monzani E, Shtil AA, La Porta CA. The water channels, new druggable targets to combat cancer cell survival, invasiveness and metastasis. *Curr Drug Targets* 2007; 8(10): 1132-7.
- [21] Sandur SK, Ichikawa H, Pandey MK, Kunnumakkara AB, Sung B, Sethi G, et al. Role of pro-oxidants and antioxidants in the anti-inflammatory and apoptotic effect of curcumin. *Free Radic Biol Med* 2007; 43(4): 568-80.
- [22] Aggarwal BB, Surh YJ, Shishodia Sh. The molecular Targets and Therapeutic Uses of Curcumin in Health and Disease. *Springer Science Business Media* 2007; 587: 197-213.
- [23] Gururaj AE, Belakavadi M, Venkatesh DA, Marme D, Salimath BP. Molecular mechanisms of anti-angiogenic effect of curcumin. *Biochem Biophys Res Commun* 2002; 297(4): 934-42.
- [24] Hatcher H, Cho RP, Torti FM, Torti SV. Curcumin: From ancient medicine to current clinical trial. *Cell Moll Life Sci* 2008; 65: 1631-52.
- [25] Goel A, Aggarwal BB. Curcumin, the golden spice from Indian saffron, is a chemosensitizer and radiosensitizer for tumors and chemoprotector and radioprotector for normal organs. *Nutr Cancer* 2010; 62(7): 919-30.
- [26] Song G, Mao YB, Cai QF, Yao LM, Ouyang GL, Bao SD. Curcumin induces human HT₂₉ colon adenocarcinoma cell apoptosis by activating P53 and regulating apoptosis related protein expression. *Braz J Med Biol Res* 2005; 38(12): 1791-8.
- [27] Jonson JJ, Mukhtar H. Curcumin for chemoprevention of colon cancer. *Cancer Lett* 2007; 255(2): 170-81.
- [28] Johnson S, Gulhati P, Arrleta I, Wang X, Uchida T, Gao T, et al. Evers B.M. Curcumin inhibits proliferation of colorectal carcinoma by modulating AKT/mTOR signaling. *Anticancer Res* 2009; 29(8): 3185-90.
- [29] Kunnumakkara AB, Anand P, Aggarwal BB. Curcumin inhibits proliferation, invasion, angiogenesis and metastasis of different cancers through interaction with multiple cell signaling proteins. *Cancer Lett* 2008; 269(2): 199-225.
- [30] Plummer SM, Holloway KA, Manson MM, Munks RJ, Kaptein A, Farrow S, et al. Inhibition of cyclo-oxygenase 2 expression in colon cells by the chemopreventive agent curcumin involves inhibition of NF-kappaB activation via the NIK/IKK signalling complex. *Oncogene* 1999; 18(44): 6013-20.

- [31] Narayan S. Curcumin, a multi-functional chemopreventive agent, blocks growth of colon cancer cells by targeting beta-catenin-mediated transactivation and cell-cell adhesion pathways. *J Mol Histol* 2004; 35(3): 301–7.
- [32] Jaiswal AS, Marlow BP, Gupta N, Narayan S. Beta-catenin mediated transactivation and cell-cell adhesion pathways are important in curcumin (diferuylmethane)-induced growth arrest and apoptosis in colon cancer cells. *Oncogene* 2002; 21(55): 8414–27.
- [33] Wong NA, Pignatelli M. Beta-catenin—a linchpin in colorectal carcinogenesis? *Am J Pathol* 2002; 160(2): 389–401.
- [34] Chen A, Xu J, Johnson AC. Curcumin inhibits human colon cancer cell growth by suppressing gene expression of epidermal growth factor receptor through reducing the activity of the transcription factor Egr-1. *Oncogene* 2006; 25(2): 278–87.
- [35] Hague A, Moorghen M, Hicks D, Chapman M, Paraskeva C. BCL-2 expression in human colorectal adenomas and carcinomas. *Oncogene* 1994; 9(11): 3367–70.
- [36] Goel A, Boland CR, CHauhan DP. Specific inhibition of cyclooxygenase_2 (COX_2) expression by dietary curcumin in HT_29 human colon cancer cells. *Cancer Lett* 2001; 172(2): 111–8.
- [37] Reuter S, Eifes S, Dicato M, Aggarwal B, Diedrich M. Modulation of anti-apoptotic and survival pathway by curcumin as a strategy to induce apoptosis in cancer cells. *Biochem Pharmacol* 2008; 76(11): 1340–51.
- [38] Woo J, Lee J, Chae YK, Kim MS, Baek JH, Park JC, et al. Overexpression of AQP5, a putative oncogene, promotes cell growth and transformation. *Cancer Lett* 2008; 264(1): 54–62.
- [39] Kang SK, Chae YK, Woo J, Kim MS, Park J C, Jang SJ, et al. Role of human aquaporin 5 in colorectal carcinogenesis. *Am J Pathol* 2008; 173(2): 518–25.
- [40] Kang SK, Chae YK, Woo J, Kim MS, Park JC, Lee J, et al. Role of Human Aquaporin 5 in Colorectal Carcinogenesis. *Am J Pathol* 2008; 173(2): 518–25.
- [41] Anand P, Kunnumakkara AB, Newman RA, Aggarwal BB. Bioavailability of curcumin: problems and promises. *Mol Pharm* 2007; 4(6): 807–18.