مجله دانشکده پزشکی اصفهان
سال سی و یکم/شماره ۲۲۸/هفته دوم اردیبهشت ماه ۱۳۹۲

تاریخ دریافت: ۱۳۹۱/۱۰/۲۴
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۲/۱/۹

بررسی اثر کورکومین و دو متوکسی استرادیول در مهار کمپلکس پیش‌برنده‌ی آنافازی در رده‌ی سلولی سرطانی Hela

حمزه رحیمی[۱]، دکتر علیرضا فرومدی[۲]، دکتر محمد علی شکرگزار[۳]، دکتر رضا مهدیان[۴]، دکتر آرمین مددکار سبحانی[۵]، دکتر مرتضی کریمی‌پور[۴]

مقاله پژوهشی

چکیده

مقدمه: کمپلکس پیش‌برنده‌ی آنافازی نقش مؤثری در بیماری‌زایی سرطان دارد. این کمپلکس آنزیمی در تعیین فرایندهای تقسیم سلولی و خروج میتوزی نقش دارد. به دلیل منحصر به‌فرد بودن، این کمپلکس به عنوان یکی از اهداف دارویی مطرح می‌باشد. هدف این مطالعه، ارزیابی اثر کورکومین و دو میتوکسی استرادیول بر روی عملکرد کمپلکس پیش‌برنده‌ی آنافازی و چرخه‌ی سلولی در رده‌ی سلولی Hela بود.

روش‌ها: جهت انجام کار، غلظت‌های مختلفی از ترکیبات کورکومین و دو متوکسی استرادیول بر روی سلول‌های سرطانی Hela اثر داده شد. پس از گذشت ۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت از تیمار، میزان سمیت ترکیبات به کمک روش MTT مورد بررسی قرار گرفت. سطح سوبستراهای کمپلکس آنزیمی (سکورین و سیکلین B) با استفاده از روش Western blot بررسی شد. در نهایت، چرخه‌ی سلولی با رنگ آمیزی Draq5 و فلوسیتومتری مورد مطالعه قرار گرفت.

یافته‌ها: کورکومین و دو متوکسی استرادیول پس از ۲۴ ساعت به ترتیب باعث ۲۰ و ۳۰ درصد مرگ سلولی شدند. همچنین، سطح پروتئینی سکورین و سیکلین B ۴۸ ساعت بعد از تیمار افزایش یافت. نتایج فلوسایتومتری نشان داد که این ترکیبات سلول‌ها را در مرحله‌ی G2 از چرخه‌ی سلولی توقف می‌کند. اثر دو میتوکسی استرادیول در مهار این کمپلکس آنزیمی به شکل معنی‌داری بیشتر از کورکومین بود (P = ۰/۰۲).

نتیجه‌گیری: مهار کمپلکس پیش‌برنده‌ی آنافازی می‌تواند به عنوان یک هدف دارویی در درمان سرطان استفاده مورد استفاده قرار گیرد و دو ترکیب کورکومین و دو متوکسی استرادیول می‌توانند بر روی فعالیت این کمپلکس تأثیر بگذارند.

واژگان کلیدی: کمپلکس پیش‌برنده‌ی آنافازی، چرخه‌ی سلولی، مرگ سلولی، سرطان

ارجاع: رحیمی حمزه، فرومدی علیرضا، شکرگزار محمد علی، مهدیان رضا، مددکار سبحانی آرمین، کریمی‌پور مرتضی. **بررسی اثر کورکومین و دو متوکسی استرادیول در مهار کمپلکس پیش‌برنده‌ی آنافازی در رده‌ی سلولی سرطانی Hela.** مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۳۹۲؛ ۳۱ (۲۲۸): ۲۶۴-۲۵۵

۱- دانشجوی دکتری، بخش پزشکی مولکولی، مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، انیستیتو پاستور ایران، تهران، ایران
۲- استاد، گروه شیمی دارویی، دانشکده‌ی داروسازی و مرکز تحقیقات علوم دارویی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران
۳- دانشیار، گروه بیوتکنولوژی، بانک سلولی ایران، انیستیتو پاستور ایران، تهران، ایران
۴- استادیار، گروه پزشکی مولکولی، مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، انیستیتو پاستور ایران، تهران، ایران
۵- استادیار، گروه علوم زیستی، مرکز محاسبات پیشرفته‌ی بارسلونا، بارسلونا، اسپانیا
نویسنده‌ی مسؤول: دکتر مرتضی کریمی‌پور
Email: mortezakarimi@yahoo.com

مقدمه

سرطان یکی از مهم‌ترین چالش‌های علم پزشکی در سال‌های اخیر محسوب می‌شود که سالیانه بیش از چند میلیون نفر قربانی این بیماری مهلک می‌شوند؛ به نحوی که، در سال ۲۰۱۱ بیش از نیم میلیون نفر در آمریکا به سرطان مبتلا شده‌اند (۱). در ایران نیز پس از بیماری‌های قلبی- عروقی و سوانح و حوادث، سرطان سومین عامل مرگ و میر محسوب می‌شود (۲). سرطان شامل رشد افسار گسیخته‌ی سلول‌ها می‌باشد که به دلیل عدم تنظیم چرخه‌ی سلولی رخ می‌دهد. پروتئین‌های زیادی در تنظیم چرخه‌ی سلولی نقش دارند که سیکلین‌ها (CDKs یا Cyclin-dependant kinase)، p53 و p27 از آن جمله است (۴-۳).

در چرخه‌ی سلولی دو مرحله‌ی بازرسی (Checkpoint) وجود دارد که هر دو جزء Ubiquitin proteasome system (UPS) می‌باشند؛ یکی از این کمپلکس‌ها به نام (APC) Anaphse promoting complex از مرحله‌ی آنافاز تا آخر مرحله‌ی G1 فعال است و ورود و خروج سلول از میتوز را کنترل می‌کند؛ کمپلکس دیگر نیز SKP1–CUL1–F-boxprotein (SCF) می‌باشد (۶-۵). کمپلکس APC بزرگ‌ترین آنزیم لیگاز E3 است که در اعمال حیاتی سلول مانند کنترل چرخه‌ی سلولی (۷)، تکثیر سلولی (۸)، انتقال سیگنال، تنظیم نسخه برداری، کنترل همانندسازی DNA و تمایز سلولی (۹) نقش دارد. از لحاظ ساختاری، کمپلکس APC انسانی از ۱۵ زیرواحد پروتئینی تشکیل شده است که شامل زیرواحدهای Apc1، Apc2، Apc3، Apc4، Apc5، Apc6، Apc7، Apc8، Apc10، Doc1، Apc13، Cdc20، Cdc26 و Cdh1 می‌باشد و وزن مولکولی آن ۱/۷ مگادالتون است (۱۰).

APC در پاتولوژی بعضی از بیماری‌های عصبی و سرطان نقش دارد (۱۱). نتایج بررسی ۱۶۰۰ نمونه‌ی بافت افراد مبتلا به سرطان با استفاده از تکنیک Tissue microarray نشان داده است که بیان فرم فعال این کمپلکس در انواع مختلف سرطان‌ها افزایش می‌یابد (۱۲)؛ همچنین، نقش زیرواحد Cdc20 در پایداری ژنومی نشان داده شده است (۱۳). نقش APC در فرایند بیماری‌زایی سرطان‌های سینه، پروستات، تخمدان و ریه نیز به اثبات رسیده است (۱۶-۱۴). در افراد مبتلا به سرطان سینه با پیش‌آگهی بد و علایم پیش‌رونده‌ی کلینیکی نیز اختلال در مسیر Cdh1-Skp2 وجود دارد (۱۶). موتاسیون‌های نقطه‌ای در زیرواحدهای Apc4، Apc6 و Apc8 در سرطان کولون گزارش شده و حتی، یک مورد حذف بزرگ در جایگاه ۷۱۵ زیرواحد APC8 در افراد مبتلا به سرطان کولون مشاهده شده است (۱۷). بیان بیش از حد فرم فعال APC/Cdc20 نیز در افراد مبتلا به سرطان دستگاه گوارش وجود داشته است (۱۸). بنابراین، می‌توان استباط کرد که APC در بیماری‌زایی سرطان‌های مختلف نقش دارد و می‌تواند به عنوان یک هدف دارویی در درمان سرطان مورد استفاده قرار گیرد.

به دلیل عوارض بالای ترکیبات مهار کننده‌ی میتوز (آنتی‌میتوتیک) مانند تاکسون‌ها و وینکا الکالوئیدها، که به عنوان خط اول شیمی درمانی قلمداد می‌شوند، تمایل زیادی به پیدا کردن اهداف جدید دارویی وجود دارد (۲۱-۱۹). مطالعات نشان داده است که دلیل اصلی این عوارض و مقاومت دارویی در این گروه از ترکیبات، فرایند لغزش

میتوزی (Mitotic slippage) می‌باشد که در این فرایند، با تخریب سیکلین ب، سلول وادار به تقسیم سلولی می‌شود (۲۴-۲۲). از مهم‌ترین اهداف دارویی جدید می‌توان به AuroraA، AuroraB و APC اشاره کرد (۲۵، ۲۰).

کورکومین با نام شیمیایی دی‌فلوریل متان، به عنوان یک ترکیب ضد سرطان در فاز یک کارآزمایی بالینی است (۲۷-۲۶)؛ مکانیسم‌های پیشنهادی برای این ترکیب شامل مهار مسیر NF-kB، مهار پروتئین کیناز C و اختلال در مسیر پروتئازوم ۲۰ می‌باشد (۲۸). به تازگی پیشنهاد شده است که کورکومین به زیرواحد APC3 کمپلکس پیش‌برنده‌ی آنافازی متصل می‌شود و عملکرد آن را در رده‌ی سلولی DOYA مختل می‌کند (۲۹)؛ ولی اثر طولانی مدت (۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت) آن بر روی رده‌ی سلولی Hela بررسی نشده است.

یکی دیگر از ترکیباتی که بر روی چرخه‌ی سلولی تأثیر می‌گذارد، ماده‌ی دو متوکسی استرادیول (2-ME یا 2-Methoxyestradiol) می‌باشد که مکانیسم عمل آن بر روی چرخه‌ی سلولی به خوبی مشخص نشده است. اگرچه در بررسی اثر 2-ME بر روی رده‌ی سلولی MDA-MB-435 مشخص شده است که باعث مهار APC می‌شود، ولی به دلایل زیر نمی‌توان این اثر را قبول کرد؛ اول این که، مکانیسم بیان APC در این رده‌ی سلولی وابسته به استرادیول است و این ترکیب به عنوان یک متابولیت استرادیول عمل می‌کند؛ دیگر این که، 2-ME در این رده‌ی سلولی میزان بیان و تولید پروتئین را مختل می‌نماید. بنابراین، نمی‌توان استنباط کرد که به طور مستقیم APC را مهار کرده باشد (۳۰).

هدف از انجام این مطالعه، بررسی اثر مستقیم دو ترکیب کورکومین و 2-ME بر روی عملکرد کمپلکس APC، به عنوان یک هدف دارویی جهت درمان سرطان بود. عملکرد APC شامل افزودن مولکول‌های Ubiquitin به گستره‌ی وسیعی از پروتئین‌های تنظیم کننده در چرخه سلولی می‌باشد؛ این افزودن Ubiquitin و تخریب دو پروتئین سیکلین ب و سیکورین برای شروع آنافاز و خروج میتوزی ضروری است (۳۰). در این مطالعه، سطح این دو پروتئین با استفاده از تکنیک Western blot مورد مطالعه قرار گرفت.

روش‌ها

در این پژوهش تجربی، رده‌ی سلولی Hela از بانک سلولی پاستور ایران (تهران- ایران) تهیه و در محیط کشت RPMI (Roswell Park Memorial Institute) (Gibco, USA) حاوی ۱۰ درصد FBS (Foetal Bovine Serum) (Gibco, UK) و ۱ درصد Penstrep به مدت ۲ روز در فشار ۵ درصد گاز CO_2 و دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد در فلاسک ۲۵ کشت داده شد.

برای ارزیابی اثر سمیت بر روی رده‌ی سلول سرطانی Hela، آزمون MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromid] استفاده شد. به این ترتیب که، تعداد 10^6 سلول در پلیت‌های کشت ۶ خانه کشت داده شد و سپس، با غلظت‌های ۵، ۱۰ و ۱۵ میکرومولار کورکومین و غلظت‌های ۲ و ۲۰ میکرومولار از 2-ME در بازه‌های زمانی ۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعته تحت تیمار قرار گرفت. شمارش سلولی با استفاده از

لام هموسایتومتری صورت گرفت. پس از تیمار در بازه‌های زمانی مختلف و اتمام انکوباسیون، محیط کشت رویی تخلیه و ۱۰۰ میکرولیتر از محلول MTT به هر خانه اضافه شد؛ سپس، به مدت ۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد به دور از نور انکوبه گردید. پس از اتمام انکوباسیون، محیط کشت رویی تخلیه شد؛ سپس، ۱۰۰ میکرولیتر ایزوپروپانول (Merk, Germany) جهت حل شدن کامل بلورهای فورمازان به هر چاهک اضافه شد تا رنگدانه‌های داخل سلول‌های زنده بیرون ریخته شود. در پایان، میزان حداکثر جذب نوری (OD) در طول موج ۵۹۵ نانومتر اندازه گرفته و طبق معادله زیر، درصد سلول‌های زنده محاسبه شد:

۱۰۰ × (جذب نوری شاهد تقسیم بر جذب نوری تست) = درصد سلول زنده

Western blot

ابتدا، تعداد ۲×۱۰^{۶} سلول در پلیت‌های ۶ خانه‌ای کشت داده شد و سپس تحت تیمار قرار گرفت. سپس، محیط کشت رویی خالی و سلول‌ها با استفاده از Scraper جمع آوری شد، سلول‌ها به محلول لیز NP (Octyl phenoxypolyethoxylethanol یا Nonidet P) منتقل گردید و به مدت ۱۰ دقیقه بر روی یخ انکوبه شد. پس از ۲ دقیقه سانتریفوژ با سرعت ۱۴۰۰۰ rpm، سوپ رویی جدا و میزان پروتئین با روش Bradford اندازه‌گیری شد.

برای انجام Western blot، ۷۰ میکروگرم از هر یک از نمونه‌ها بر روی ژل SDS-page (Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis) ۱۰ درصد به مدت یک ساعت قرار گرفت. پس از انتقال پروتئین به غشای PVDF (Polyvinylidene fluoride)، با استفاده از جوهر هندی پروتئین‌ها رنگ‌آمیزی شد و پس از شستشو با PBST (Phosphate-Buffered Saline/Tween)، روی غشا با شیر خشک (Skim milk) Block گردید؛ آن گاه، آنتی‌بادی اولیه‌ی ضد سیکلین ب (Abcom, USA) با رقت ۱/۱۰۰۰ و آنتی‌بادی اولیه‌ی ضد سکورین (Abcom, USA) با غلظت ۱/۱۵۰۰ اضافه و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۴ درجه‌ی سانتی‌گراد Shack شد. در پایانف غشا با آنتی‌بادی ثانویه‌ی موشی کونژوگه به آنزیم HRP (Horseradish peroxidase) (Abcom, USA) به مدت ۹۰ دقیقه در دمای اتاق Shack گردید. ظاهر سازی با اضافه کردن محلول‌های ۱ و ۲ کیت ESL (GE Healthcare, USA) (Anti-OATP2 antibody) در اتاق تاریک انجام شد.

فلوسیتومتری

ابتدا $۱۰^{۶}$ سلول در فلاسک ۲۵ سی‌سی کشت داده شد و پس از ۲۴ ساعت، سلول‌ها با رشد در غلظت بالای تیمیدین کشت داده شدند تا هم‌زمان (Synchronize) شوند؛ سپس، محیط رویی تمیار جمع آوری شد. پس از ترپسینه کردن، سلول‌ها همراه با محیط رویی جمع آوری شده، با سرعت ۱۵۰۰۰ rpm به مدت ۲ دقیقه سانتریفوژ شد و رسوب سلولی دو بار با محلول PBS شستشو گردید؛ محلول حاصل به مدت ۲۴ ساعت در یخچال نگه‌داری شدند. بعد از سانتریفوژ، تمام سلول‌ها در ۱ سی‌سی از محلول PBS حل و ۲ میکرولیتر از رنگ DRAQ5 (Cell signaling, USA) به آن افزوده شد و با دستگاه فلوسیتومتری مورد بررسی قرار گرفت. این رنگ به DNA متصل می‌شود؛ سلول در چه مرحله‌ای از چرخه‌ی سلولی قرار گرفته باشد میزان

متفاوتی از DNA را دارا خواهد بود. همچنین، با استفاده از این روش می‌توان، میزان آپوپتوز را بر اساس مقادیر تخریب شده‌ی DNA (DNA fragmentation) بررسی کرد. تمام ازمایشات سه بار تکرار شد.

آنالیز آماری: با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه‌ی ۱۶ (version 16, SPSS Inc., Chicago, IL) تجزیه و تحلیل آماری به انجام رسید.

یافته‌ها

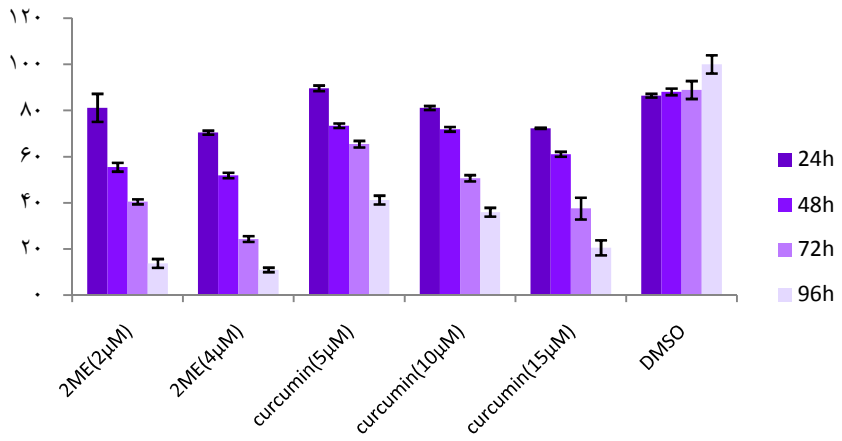
سلول‌ها در غیاب و حضور غلظت‌های متفاوت از کورکومین و 2-ME به مدت ۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت کشت داده شدند. درصد بقای سلول‌ها توسط آزمون MTT سنجیده شد. نتایج حاصل از MTT نشان داد که با افزایش غلظت، میزان مرگ سلولی افزایش می‌یابد. در زمان ۲۴ ساعت، میزان اثر این دو ترکیب مشابه بود ولی با افزایش زمان انکوباسیون، اثر کشندگی دومتوکسی استرادیول به طور معنی‌داری افزایش یافت (شکل ۱). همچنین، نشان داده شد که اثر ماده‌ی 2-ME وابسته به غلظت نمی‌باشد؛ چرا که، افزایش غلظت تأثیر محسوسی در مرگ سلولی نشان نداد.

اثر بر روی عملکرد APC

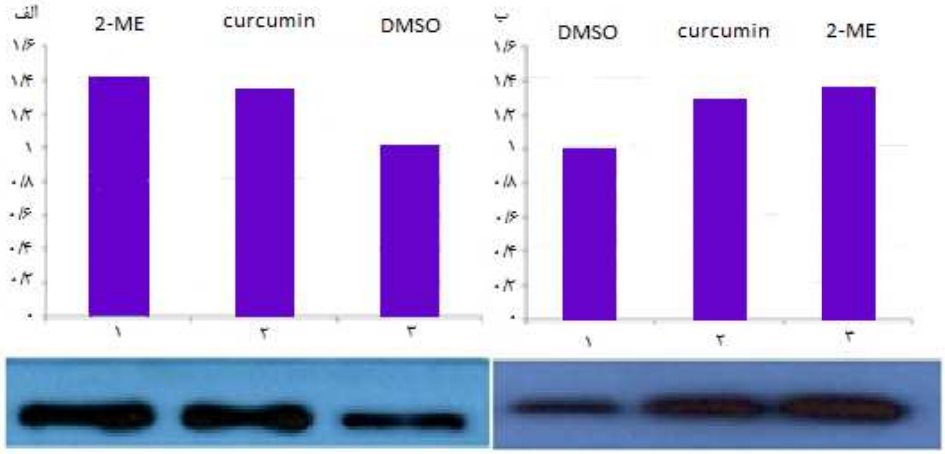
بررسی سطح دو پروتئین سیکلین ب و سیکورین در غلظت ۱۵ و ۲ میکرومولار برای کورکومین و 2-ME نشان داد که میزان این دو پروتئین بعد از تیمار سلولی افزایش پیدا کرد (شکل ۲). آنالیز کمی نتایج Western blot با نرم‌افزار ImageJ نشان داد که کورکومین باعث افزایش ۲۷ درصدی سیکیلین ب و ۳۴ درصدی سکورین می‌شود. در مورد دو متوکسی استرادیول، میزان افزایش سطح سوبستراها ۳۲ و ۴۱ درصد بود (P = ۰/۰۱).

اثر بر روی چرخه‌ی سلولی

نتایج بررسی با رنگ آمیزی DRAQ5 در شکل ۳ نشان داده شده است؛ ترکیبات مورد بررسی باعث توقف چرخه‌ی سلولی در مرحله‌ی G2/M شدند. در مورد کورکومین، ۱۰ درصد سلول‌ها نسبت به حالات غیر تیمار در این مرحله متوقف شدند ولی در مورد 2-ME، بیش از ۵۰ درصد سلول‌ها در این مرحله توقف کردند؛ همچنین، یک جهش در ناحیه‌ی اول نمودار مربوط به 2-ME مشاهده



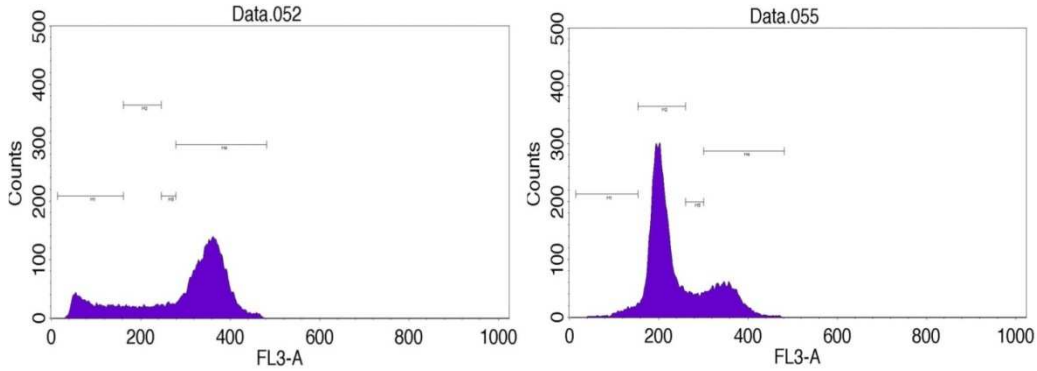
شکل ۱. میزان مرگ سلولی پس از اثر با کورکومین و دو متوکسی استرادیول



شکل ۲. بررسی سطح سوبستراهای Anaphse promoting complex (APC) پس از ۴۸ ساعت تیمار سلول Hela با کورکومین و دو متوکسی استرادیول (2-ME)

الف) سطح پروتئین سیکورین بعد از تیمار با کورکومین ۱۵ میکرومولار و 2-ME با غلظت ۲ میکرومولار که نشان از افزایش سطح سیکورین بعد از تیمار دارد.

ب) سطح پروتئین سیکلین ب بعد از تیمار با غلظت ۱۵ میکرومولار کورکومین و ۲ میکرومولار 2-ME نشان داد که 2-ME در مقایسه با کورکومین، اثر مهاری بیشتری بر روی عملکرد APC دارد.



شکل ۳. آنالیز چرخه‌ی سلولی به دنبال مصرف کورکومین (سمت چپ) و دو متوکسی استرادیول (2-ME) (سمت راست)

می‌شود که نشانگر قطعات تخریب شده‌ی DNA است. قطعه قطعه شدن DNA در فرایند آپوپتوز رخ می‌دهد؛ بنابراین می‌توان استدلال کرد که این ترکیب، از طریق آپوپتوز عمل می‌کند.

ماده دو متوکسی استرادیول بعد از ۲۴ ساعت باعث توقف ۶۰ درصد سلول‌ها در مرحله G2/M گردید و همچنین، میزان مرگ بالایی در سلول‌های تیمار شده را باعث گردید.

بحث

یکی از عوامل اصلی در درمان سرطان، پیدا کردن اهداف دارویی مناسب می‌باشد. یکی از مهم‌ترین گروه‌های دارویی در درمان سرطان شامل ترکیبات مهار کننده‌ی میتوز (آنتی‌میتوتیک) مانند تاکسون‌ها [دوکس‌تاکسول (Docetaxel) یا پاکلی‌تاکسول (Paclitaxel)] و وینکا الکالوئیدها (وین‌بلاستین و وین‌کریستین) می‌باشد که به عنوان خط اول شیمی

درمانی قلمداد می‌شوند ولی دارای عوارض زیادی هستند (۲۱-۱۹). دلیل اصلی عوارض و مقاومت دارویی در این ترکیبات، فرایند لغزش میتوزی است که طی آن، سلول‌ها با تخریب سیکلین ب وادار به تقسیم سلولی می‌شوند (۲۴-۲۲). بنابراین، با مهار APC، به طور کامل می‌توان بر این مشکل غلبه کرد. در این مطالعه، اثر مستقیم دو ترکیب مهار کننده‌ی چرخه‌ی سلولی بر روی عملکرد APC مورد بررسی قرار گرفت.

کورکومین به عنوان یک ماده‌ی طبیعی دارای خاصیت ضد سرطانی مطرح می‌باشد. مکانیسم دقیق عمل آن در مهار رشد سلولی و القای آپوپتوز مشخص نشده است. در مطالعات قبلی نشان داده شده است که کورکومین با تخریب زیرواحد سوم کمپلکس APC در رده‌ی سلولی DAYO عمل می‌کند؛ ولی بعد از ۴ ساعت تیمار سلولی، تأثیر معنی‌داری در سطح سوبستراها مشاهده نشد ه است (۲۹). در این مطالعه، اثر کورکومین بر روی رده‌ی سلولی Hela، که به عنوان یک رده‌ی سلولی شاخص در مطالعات سرطان استفاده می‌شود، در بازه‌های زمانی ۲۴ تا ۹۶ ساعت مورد بررسی قرار گرفت. غلظت‌های مورد استفاده بر اساس مطالعات قبلی (۲۹) انتخاب شد. نتایج مطالعه‌ی حاضر نشان داد که کورکومین در غلظت ۱۵ میکرومولار در طی ۷۲ ساعت، ۵۰ درصد سلول‌ها را می‌کشد. در مطالعه‌ی Zhao و همکاران، غلظت ۱۰ میکرومولار کورکومین بعد از ۷۲ ساعت، باعث مرگ ۱۱ تا ۴۵ درصد سلول‌های رده‌ی Hela شد اما، اثر کورکومین بر روی چرخه‌ی سلولی و APC مورد بررسی قرار نگرفت (۳۱).

در بررسی حاضر مشخص شد که دو متوکسی استرادیول میزان بالایی از مرگ سلولی را باعث می‌شود. Salama و همکاران مشاهده کردند که دو متوکسی استرادیول از طریق مکانیسم‌های مختلف باعث مرگ سلولی می‌شود؛ مهم‌ترین مکانیسم‌ها شامل مختل کردن دینامیک میکروتوبول‌ها، مهار سنتز کلاژن و مهار رگ‌زایی است (۳۲). همچنین، این ماده بر روی بیان تعداد زیادی از ژن‌های دخیل در کنترل سلولی مانند اینترفرون (۳۳)، VEGF (Vascular endothelial growth factor) و FGF-2 (Fibroblast growth factor-2) (۳۴) تأثیر می‌گذارد؛ ولی تا به حال مکانیسم دقیق عمل 2-ME مشخص نشده است (۳۵). در این مطالعه، نشان داده شد که این ترکیب از طریق مهار APC می‌تواند سلولظها را در مرحلهظی G2 متوقف کند. با توجه به مشاهده‌ی جهش در ناحیه‌ی مربوط به قطعات تخریب شده‌ی DNA می‌توان استدلال کرد که این ترکیب، از طریق آپوپتوز عمل می‌کند. مشاهده‌ی هم‌زمان توقف سلول در مرحله‌ی G2 و آپوپتوز نشانگر این است که پس از مهار APC، سلول‌ها در مرحله‌ی G2 به مدت طولانی متوقف شده‌اند و این توقف طولانی منجر به فعال شدن سیستم آپوپتوز گردیده است.

مقایسه‌ی نتایج سه آزمون MTT، Western blot و فلوسیتومتری نشان داد که ماده‌ی 2-ME نسبت به کورکومین توانایی بیشتری د ر مهار APC و توقف چرخه‌ی سلولی دارا می‌باشد.

نتیجه‌گیری

این مطالعه نشان داد که مهار APC با ترکیبات

کورکومین و 2-ME می‌تواند به توقف چرخه‌ی سلولی و فعال شدن مسیر آپوپتوز منجر گردد. بنابراین، سنتز ترکیباتی که به طور اختصاصی APC را مهار کند، می‌تواند به عنوان امید جدیدی در درمان سرطان قلمداد شود.

تشکر و قدردانی

مقاله‌ی حاضر گزارشی است از پایان‌نامه مقطع دکتری زیست فناوری پزشکی، که در انیستیتو پاستور ایران انجام شده و هزینه‌ی آن به واسطه‌ی پایان‌نامه تأمین شده است.

References

1. Siegel R, Ward E, Brawley O, Jemal A. Cancer statistics, 2011: the impact of eliminating socioeconomic and racial disparities on premature cancer deaths. CA Cancer J Clin 2011; 61(4): 212-36.
2. Ministry of Health and Medical Education, Department of Health. Iranian annual cancer registration report 2003. Tehran, Iran: Kelke-Dirin; 2005. [In Persian].
3. Tessema M, Lehmann U, Kreipe H. Cell cycle and no end. Virchows Arch 2004; 444(4): 313-23.
4. Ingolia N. Cell cycle: bistability is needed for robust cycling. Curr Biol 2005; 15(23): R961-R963.
5. Nakayama KI, Nakayama K. Ubiquitin ligases: cell-cycle control and cancer. Nat Rev Cancer 2006; 6(5): 369-81.
6. Deshaies RJ. SCF and Cullin/Ring H2-based ubiquitin ligases. Annu Rev Cell Dev Biol 1999; 15: 435-67.
7. Irniger S, Nasmyth K. The anaphase-promoting complex is required in G1 arrested yeast cells to inhibit B-type cyclin accumulation and to prevent uncontrolled entry into S-phase. J Cell Sci 1997; 110 (Pt 13): 1523-31.
8. Narbonne-Reveau K, Senger S, Pal M, Herr A, Richardson HE, Asano M, et al. APC/CFzr/Cdh1 promotes cell cycle progression during the Drosophila endocycle. Development 2008; 135(8): 1451-61.
9. Turnell AS, Stewart GS, Grand RJ, Rookes SM, Martin A, Yamano H, et al. The APC/C and CBP/p300 cooperate to regulate transcription and cell-cycle progression. Nature 2005; 438(7068): 690-5.
10. Herzog F, Primorac I, Dube P, Lenart P, Sander B, Mechtler K, et al. Structure of the anaphase-promoting complex/cyclosome interacting with a mitotic checkpoint complex. Science 2009; 323(5920): 1477-81.
11. Wickliffe K, Williamson A, Jin L, Rape M. The multiple layers of ubiquitin-dependent cell cycle control. Chem Rev 2009; 109(4): 1537-48.
12. Lehman NL, Tibshirani R, Hsu JY, Natkunam Y, Harris BT, West RB, et al. Oncogenic regulators and substrates of the anaphase promoting complex/cyclosome are frequently overexpressed in malignant tumors. Am J Pathol 2007; 170(5): 1793-805.
13. Mondal G, Sengupta S, Panda CK, Gollin SM, Saunders WS, Roychoudhury S. Overexpression of Cdc20 leads to impairment of the spindle assembly checkpoint and aneuploidization in oral cancer. Carcinogenesis 2007; 28(1): 81-92.
14. Gutgemann I, Lehman NL, Jackson PK, Longacre TA. Emi1 protein accumulation implicates misregulation of the anaphase promoting complex/cyclosome pathway in ovarian clear cell carcinoma. Mod Pathol 2008; 21(4): 445-54.
15. Kang Y, Kim JH, Lee TH, Kim TS, Jung WH, Chung HC, et al. Expression of anaphase-promoting complex7 in fibroadenomas and phyllodes tumors of breast. Hum Pathol 2009; 40(1): 98-107.
16. Fujita T, Liu W, Doihara H, Date H, Wan Y. Dissection of the APCCdh1-Skp2 cascade in breast cancer. Clin Cancer Res 2008; 14(7): 1966-75.
17. Wang Q, Moyret-Lalle C, Couzon F, Surbiguet-Clippe C, Saurin JC, Lorca T, et al. Alterations of anaphase-promoting complex genes in human colon cancer cells. Oncogene 2003; 22(10): 1486-90.
18. Kim JM, Sohn HY, Yoon SY, Oh JH, Yang JO, Kim JH, et al. Identification of gastric cancer-related genes using a cDNA microarray containing novel expressed sequence tags expressed in gastric cancer cells. Clin Cancer Res 2005; 11(2 Pt 1): 473-82.
19. Montero A, Fossella F, Hortobagyi G, Valero V. Docetaxel for treatment of solid tumours: a systematic review of clinical data. Lancet Oncol 2005; 6(4): 229-39.
20. Manchado E, Guillamot M, Malumbres M. Killing cells by targeting mitosis. Cell Death Differ 2012; 19(3): 369-77.
21. Jordan MA, Wilson L. Microtubules as a target

for anticancer drugs. Nat Rev Cancer 2004; 4(4): 253-65.
22. Mena AL, Lam EW, Chatterjee S. Sustained spindle-assembly checkpoint response requires de novo transcription and translation of cyclin B1. PLoS One 2010; 5(9).
23. Perez EA. Microtubule inhibitors: Differentiating tubulin-inhibiting agents based on mechanisms of action, clinical activity, and resistance. Mol Cancer Ther 2009; 8(8): 2086-95.
24. Gottesman MM. Mechanisms of cancer drug resistance. Annu Rev Med 2002; 53: 615-27.
25. Zeng X, King RW. An APC/C inhibitor stabilizes cyclin B1 by prematurely terminating ubiquitination. Nat Chem Biol 2012; 8(4): 383-92.
26. Hatcher H, Planalp R, Cho J, Torti FM, Torti SV. Curcumin: from ancient medicine to current clinical trials. Cell Mol Life Sci 2008; 65(11): 1631-52.
27. Goel A, Kunnumakkara AB, Aggarwal BB. Curcumin as "Curecumin": from kitchen to clinic. Biochem Pharmacol 2008; 75(4): 787-809.
28. Sa G, Das T. Anti cancer effects of curcumin: cycle of life and death. Cell Div 2008; 3: 14.
29. Lee SJ, Langhans SA. Anaphase-promoting complex/cyclosome protein Cdc27 is a target for curcumin-induced cell cycle arrest and apoptosis. BMC Cancer 2012; 12: 44.
30. Bhati R, Gokmen-Polar Y, Sledge GW, Jr., Fan C, Nakshatri H, Ketelsen D, et al. 2-methoxyestradiol inhibits the anaphase-promoting complex and protein translation in human breast cancer cells. Cancer Res 2007; 67(2): 702-8.
31. Zhao J, Zhao Y, Zhang Y, Chen W. Anti-tumor effect of curcumin on human cervical carcinoma HeLa cells in vitro and in vivo. Chin J Cancer Res 2007; 19(1): 32-6.
32. Salama SA, Kamel MW, Botting S, Salih SM, Borahay MA, Hamed AA, et al. Catechol-o-methyltransferase expression and 2-methoxyestradiol affect microtubule dynamics and modify steroid receptor signaling in leiomyoma cells. PLoS One 2009; 4(10): e7356.
33. Wimbauer F, Yang C, Shogren KL, Zhang M, Goyal R, Riester SM, et al. Regulation of interferon pathway in 2-methoxyestradiol-treated osteosarcoma cells. BMC Cancer 2012; 12: 93.
34. Plum SM, Park EJ, Strawn SJ, Moore EG, Sidor CF, Fogler WE. Disease modifying and antiangiogenic activity of 2-methoxyestradiol in a murine model of rheumatoid arthritis. BMC Musculoskelet Disord 2009; 10: 46.
35. Xia G, Chen B, Ding J, Gao C, Lu H, Shao Z, et al. Effect of magnetic Fe3O4 nanoparticles with 2-methoxyestradiol on the cell-cycle progression and apoptosis of myelodysplastic syndrome cells. Int J Nanomedicine 2011; 6: 1921-7.

Journal of Isfahan Medical School
Received: 13.01.2013
Vol. 31, No. 228, 2nd Week, May 2013
Accepted: 29.03.2013

Inhibitory Effects of Curcumin and 2-Methoxyestradiaul on Anaphase Promoting Complex in Hela Cancer Cells

Hamzeh Rahimi MSc[1], Alireza Foroumadi PhD[2], Mohammad Ali Shokrgozar PhD[3], Reza Mahdian PhD[4], Armin Madadkar-Sobhani PharmD[5], Morteza Karimipoor PhD[4]

Original Article

Abstract

Background: Anaphase promoting complex (APC) plays a critical role in cell division and mitotic exit. This protein complex may have a pivotal role in the cell cycle control affecting pathological conditions such as cancer. APC is recommended as the target of many anti-cancer agents due to its importance in cancer pathogenesis. This study aimed to evaluate the inhibitory effects of curcumin and 2-methoxyestradiaul on APC.

Methods: Hela cells were treated with various concentrations of curcumin and 2-methoxyestradiaul, and their cytotoxic effects were investigated after 24, 48, 72 and 96 hours by MTT assay. Expression of securin, cyclin B and the APC substrates were investigated using immune-blotting. Finally, cell cycle analysis was performed using DRAQ5 staining and flow cytometry.

Findings: Respectively, 20 and 30 percent of cell-death after 24-hour treatment with curcumin and 2-methoxyestradiaul was seen. Also, securin and cyclin levels were raised after 24 hours of treatment. Furthermore, the levels of the substrates (securin and cyclin B) increased 48 hours after treatment. Results of fluorescence-activated cell sorting (FACS) analysis showed that treated cells were arrested in G2 phase of cell cycle which revealed cell arrest in G2 phase of cell cycle. 2-methoxyestradiaul showed a better APC inhibition effect than curcumin (P = 0.02).

Conclusion: Our results revealed that APC is a suitable target for cancer treatment and curcumin and 2-methoxyestradiaul have inhibitory effects on the activity of this complex.

Keywords: Anaphase promoting complex, Cell cycle, Cell death, Cancer

Citation: Rahimi H, Foroumadi A, Shokrgozar MA, Mahdian R, Madadkar-Sobhani A, Karimipoor M. **Inhibitory Effects of Curcumin and 2-Methoxyestradiaul on Anaphase Promoting Complex in Hela Cancer Cells.** J Isfahan Med Sch 2013; 31(228): 255-64

1- PhD Student, Department of Molecular Medicine, Biotechnology Research Center, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran
2- Professor, Department of Pharmaceutics, School of Pharmacy AND Pharmaceutical Science Research Center, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran
3- Associate Professor, Department of Biotechnology, National Cell Bank of Iran, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran
4- Assistant Professor, Department of Molecular Medicine, Biotechnology Research Center, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran
5- Assistant Professor, Department of Life Sciences, Barcelona Supercomputing Center (BSC), Barcelona, Spain
Corresponding Author: Morteza Karimipoor PhD, Email: mortezakarimi@yahoo.com