



اثر کورکومین بر آنژیوژنز در مدل حلقه آئورت موش صحرایی

جواد بهار آرا^{۱*}، مرضیه موسوی^۲، طیبه رضانی^۳

- ۱- دانشیار گروه زیست شناسی، مرکز تحقیقات تکوین جانوری، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد مشهد، مشهد، ایران
 ۲- کارشناس ارشد زیست شناسی سلولی تکوینی جانوری، باشگاه پژوهشگران جوان و نخبگان، مرکز تحقیقات تکوین جانوری، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد مشهد، مشهد، ایران
 ۳- دانشجوی دکترای تخصصی تکوین جانوری، دانشگاه خوارزمی، تهران، ایران

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۳/۳/۸

تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۱۰/۳

چکیده

مقدمه: زردچوبه گیاهی با کاربردهای غذایی و دارویی است و کورکومین مشتق از آن واجد اثرات فارماکولوژیک متعدد می باشد. آنژیوژنز، فرایندی دینامیک از تکثیر سلول های اندوتلیال به منظور رشد رگ های خونی جدید از رگ های قبلی در طیف گسترده ای از فرایندهای فیزیولوژیک و پاتولوژیک نظیر رشد و گسترش تومورها است. در پژوهش حاضر اثرات آنتی آنژیوژنیک کورکومین در حلقه آئورت موش صحرایی نژاد ویستار بررسی شد.

روش بررسی: در این مطالعه تجربی آزمایشگاهی آئورت به قطعات ۱ میلی متری برش و در ماتریکس کلاژن کشت داده شد، در روز سوم پس از مشاهده اولین جوانه ها و رگ زایی از حلقه آئورت، تیمار با کورکومین در غلظت های ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر انجام و توسط میکروسکوپ اینورت بررسی و عکسبرداری گردید. تعداد و طول انشعابات رگی توسط نرم افزار Image J تعیین و داده ها با استفاده از نرم افزار آماری SPSS و آزمون های آماری ANOVA و Turkey تجربه و تحلیل شدند.

نتایج: مقایسه میانگین تعداد و طول انشعابات عروقی در نمونه های شاهد با تعداد و طول انشعابات در نمونه شاهد آزمایشگاهی اختلاف معنی داری نداشت ($p < 0.05$). میانگین طول و تعداد عروق خونی در گروه تجربی ۱ نسبت به گروه شاهد تغییرات معنی داری نشان نداد ($p < 0.05$)، اما طول در گروه های تجربی ۲ (میلی متر $79/45 \pm 3/2$) و ۳ (میلی متر $38/93 \pm 1/1$) و تعداد در این دو گروه تجربی ($12 \pm 1/3$) و ($8 \pm 1/1$) کاهش معنی داری وجود داشت ($p < 0.05$).

نتیجه گیری: کورکومین دارای اثر مهاري وابسته به دوز بر رگ زایی در حلقه آئورت موش صحرایی است و می تواند به عنوان یک کاندیدای مناسب جهت مطالعات رگ زایی و بیماری های مرتبط معرفی شود.

واژه های کلیدی: آنژیوژنز، کورکومین، آئورت، موش صحرایی

مقدمه

سرطان به عنوان دومین عامل مرگ و میر در کشورهای توسعه یافته است که به واسطه تکثیر مستقل و نامحدود، عدم حساسیت به سیگنال‌های مهارکننده رشد، آنژیوژنز و تهاجم بافتی و متاستاز شناخته می‌شود (۱). آنژیوژنز یا تشکیل رگ‌های خونی جدید از عروق موجود که برای بسیاری از وقایع فیزیولوژیکی نظیر سیکل جنسی زنان، بارداری و تکوین جنین مورد نیاز است در بسیاری شرایط پاتولوژیک نظیر ترمیم زخم، رتینوپاتی دیابتیک، پزوریازیس، آرتريت روماتوئید و رشد تومورها نیز ضروری است (۲). تشکیل رگ‌های فعال مستلزم برهم کنش‌های هماهنگ بین سلول‌های اندوتلیال و ماتریکس خارج سلولی و سلول‌های احاطه‌کننده می‌باشد (۳). در چند دهه اخیر طراحی و تکوین ترکیباتی که رشد تومور را به وسیله بلوکه کردن توانایی تشکیل رگ‌های تغذیه‌کننده و یا هدف‌گیری رگ‌های موجود مهار کند گسترش پیدا کرده است (۴).

زردچوبه از خانواده زنجبیل (Zingiberaceae) با نام علمی *Curcuma longa*، گیاهی پایا با ریزومی متورم، بومی مناطق گرمسیر استوکوکومین یا دی متیل فرولولیل متان (Diferuloylmethan) ۲ تا ۵ درصد ماده مؤثره ریزوم گیاه زردچوبه با فرمول شیمیایی $C_{12}H_{20}O_6$ ، ملکولی فلورسنت و هیدوفوب است (۵).

تحقیقات متعدد *In vivo* و *In vitro* نشان داده‌اند که این گیاه واجد اثرات فارماکولوژیک متعددی همچون اثرات ضدالتهابی، محافظت از آسیب‌های کبدی و اختلالات گوارشی، کاهش آلازیم و بهبود وضعیت ایمنی بدن است (۶-۱۰). کورکومین همچنین واجد خواص آنتی‌اکسیدانی، ضدسرطانی، ضدالتهابی و آپوپتوزی دارای مکانیسم چندگانه بوده و قادر است هر سه مرحله سرطان یعنی القاء، شروع و پیشرفت آن را تحت تأثیر قرار دهد (۱۱).

در بین مدل‌های بررسی آنژیوژنز در شرایط *In vivo* و *In vitro* چندین مدل به علت تکرارپذیری، اثربخشی بالا و کم هزینه بودن نظیر پرده کوریوآلانتوئیک جوجه

(CAM: Chick Chorio Alantoic Membrane) کشت پیوندهای اکسیپلانت عروقی (روش مورد استفاده برای جداسازی سلول‌ها از یک قطعه بافت موجود زنده و کشت آنها در شرایط کشت آزمایشگاهی) بیشتر مورد توجه قرار گرفته‌اند. در این روش کشت، حلقه آئورت در ماتریکس ژله‌ای شده و سلول‌های آندوتلیال در ژل کلاژن به یک شبکه مویرگی تبدیل می‌شوند و به عنوان یک مدل سه بعدی مناسب استفاده می‌شود که موجب ارائه یک تصویر کامل‌تر از فرایندهای رگزایی در مقایسه با سنجش‌های سنتی مبتنی بر سلول است. از مزایای دیگر این روش امکان مطالعه عوامل رگزایی و ضد رگزایی بر عوامل ماتریکسی می‌باشد (۱۲). این روش پیشتر نیز توسط محققان برای بررسی روند رگزایی مورد بررسی قرار گرفته بود (۱۳). Moshtagh و همکاران اثر آنتی‌آنژیوژنیک عصاره آبی زعفران در حلقه آئورت موش صحرایی نژاد ویستار را مورد مطالعه قرار دادند (۱۴). همچنین پژوهشگران در سال ۲۰۱۴ میلادی اثرات ضد رگزایی نانوذرات نقره را در مدل حلقه آئورت رت نشان داده‌اند (۱۵). از این مدل بررسی آنژیوژنز برای سنجش اثر آنتی‌آنژیوژنیک زهر زنبور عسل نیز استفاده شده است (۱۶). در مطالعه حاضر با توجه به کمبود مطالعات بر روی ویژگی‌های آنتی‌آنژیوژنیک کورکومین در مدل *Ex vivo* به بررسی اثر کورکومین بر آنژیوژنز در مدل حلقه آئورت موش صحرایی نژاد ویستار پرداخته شده است.

روش بررسی

این پژوهش تجربی از نوع مطالعه موردی - شاهدی است که در مرکز تحقیقات تکوین جانوری دانشگاه آزاد اسلامی مشهد در سال ۱۳۹۲-۱۳۹۳ انجام شد

کلاژن با غلظت ۴ میلی‌گرم در میلی‌لیتر از دم موش صحرایی نژاد ویستار استخراج گردید (برای تعیین غلظت از روش بردفورد استفاده شد) تا برای تهیه داربست از آن استفاده شود. در این روش رشته‌های تاندونی دم جدا شده و پس از جداسازی چربی‌های اضافه و ۳ بار شستشو با PBS، در الک ۷۰ درصد به مدت ۱ ساعت نگهداری شد. به منظور حل کردن

تاندون از ۷۵ میلی‌لیتر آب مقطر دو بار تقطیر (distilled water) با $\text{pH}=4$ استفاده شد که ۴۸ ساعت در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد روی استریل بود استفاده شد در مرحله آخر به مدت ۶۰ دقیقه با ۱۶۰۰۰ دور سانتریفیوژ شد (۱۷،۱۸).

موش‌های صحرایی نژاد ویستار با محدوده سنی ۶ تا ۸ هفته از پژوهشکده بوعلی مشهد خریداری و در اتاق حیوانات در شرایط طبیعی از نظر نور و دما و نیز دسترسی آسان به آب و مواد غذایی نگهداری شدند. ابتدا موش‌ها با استفاده از کلروفورم بیهوش و محل حفره شکمی با استفاده از الکل ۷۰ درصد استریل شد. حفره شکمی توسط وسایل جراحی باز و پس از پیدا کردن آنورت قطعه‌ای با طول مناسب جدا گردید و بلافاصله به بافر استریل که حاوی آنتی‌بیوتیک بود منتقل و در شرایط استریل و زیر هود لامینار کشت سلولی، بافت زاید چربی پاک گردید. در نهایت با استفاده از تیغ جراحی، آنورت به قطعات ۱ میلی‌متری قطعه قطعه شد. در کلیه مراحل کار، قوانین اخلاقی کار با حیوان مطابق پروتکل‌های مربوطه رعایت گردید.

جهت تهیه داربست، کلاژن استخراجی از دم موش صحرایی، بیکربنات سدیم (NaHCO_3)، محیط کشت (DMEM: Dubelco's Modified Essential Medium) (سیگما-فرانسه) را به نسبت ۸، ۱، ۱ مخلوط کرده، پس از تشکیل داربست حلقه‌های آنورت را درون داربست قرارداده و در انکوباتور به مدت ۱۵ دقیقه قرار داده تا محلول کلاژن به ژل تبدیل شود. سپس پلیت در انکوباتور خارج نموده و زیر هود محیط کشت DMEM حاوی ۳۰٪ (FBS: Fetal Bovine Serum) (Gibco, USA) و ۱۰۰ U/ml پنی‌سیلین و ۱۰۰ µg/ml استرپتومایسین (Gibco- USA) به آن اضافه شد تا سطح رویی آن را بگیرد. سپس پلیت در انکوباتور با دمای ۳۷/۵ درجه سانتی‌گراد و رطوبت ۹۵٪ و در فشار CO_2 ۵٪ قرار گرفت.

پس از ۳ روز از زمان کشت و پیدایش اولین جوانه‌های عروقی از حلقه آنورت، کورکومین (سیگما-فرانسه) در غلظت‌های ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر اضافه گردید. پودر کورکومین ابتدا با DMSO مطابق پروتکل رقیق شد و

غلظت‌های مورد نظر از استوک اولیه تهیه شد. به منظور بررسی عدم تأثیر حلال کورکومین در رگزایی، گروه شاهد آزمایشگاهی که تیمار با DMSO (حلال کورکومین) در آن انجام شد، تعریف گردید. سه چاهک هم به عنوان شاهد (بدون تیمار) در نظر گرفته شد. سپس پلیت به انکوباتور منتقل و ۲۴ ساعت پس از تیمار، نتایج با استفاده از دوربین دیجیتال (DEL photonics) متصل به میکروسکوپ معکوس (Biomed- Korea) عکسبرداری شد. کلیه تجربیات ۳ بار تکرار گردید.

طول و تعداد انشعابات عروقی توسط نرم‌افزار Image J در مربع‌هایی با ابعاد 10×10 شمارش شد و در نمونه از تعداد و طول انشعابات عروقی به طور جداگانه میانگین گرفته شد. داده‌های جمع‌آوری شده با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه ۱۶ و آزمون آماری ANOVA و تست تعقیبی Tukey مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. سطح معنی‌داری کمتر از ۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

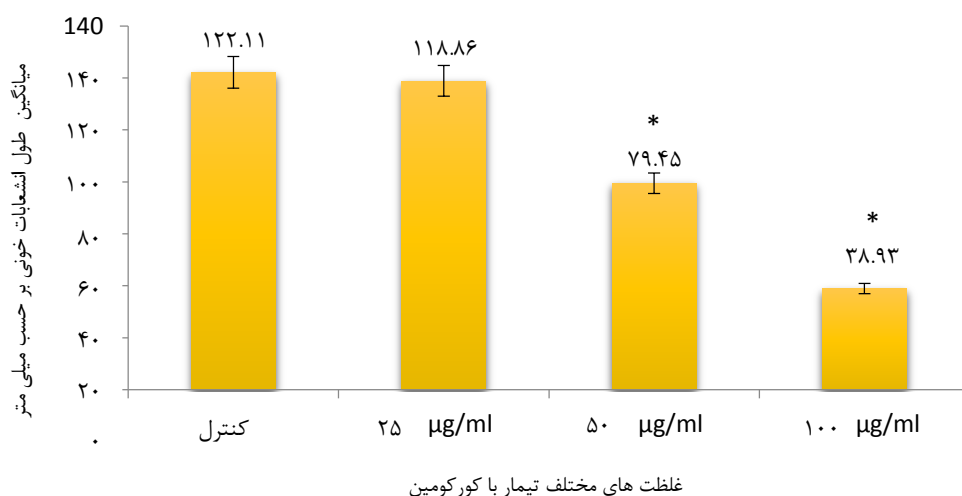
نتایج

مقایسه میانگین تعداد ($17 \pm 2/5$) و طول انشعابات عروقی ($122/11 \pm 1/2 \text{ mm}$) در نمونه‌های شاهد با تعداد ($16 \pm 2/2$) و طول انشعابات ($123 \pm 2/7 \text{ mm}$) در نمونه شاهد آزمایشگاهی اختلاف معنی‌دار نشان نداد ($p > 0/05$) لذا نمونه‌های تجربی با شاهد مقایسه شدند.

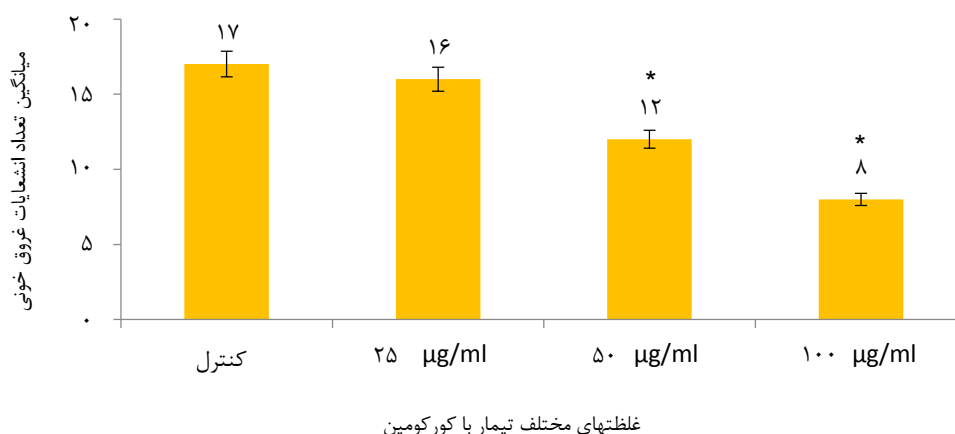
میانگین طول عروق خونی در گروه تجربی ۱ با غلظت ۲۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر کورکومین ($118/86 \pm 2/1 \text{ mm}$) نسبت به گروه شاهد تغییر معنی‌داری نداشت ($p > 0/05$) در حالی که در گروه‌های تجربی ۲ با غلظت ۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر ($79/45 \pm 3/2 \text{ mm}$) و گروه تجربی ۳ با غلظت ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر کورکومین ($38/93 \pm 1/1 \text{ mm}$) کاهش معنی‌دار در سطح $p < 0/05$ مشاهده شد (نمودار ۱).

میانگین تعداد عروق خونی در گروه تجربی ۱ که با کورکومین با غلظت ۲۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر تیمار شده بود ($16 \pm 1/2$) نسبت به گروه شاهد تغییرات معنی‌دار نشان نداد ($p > 0/05$) در حالی که مقایسه تعداد عروق در گروه شاهد با تعداد عروق خونی گروه تجربی ۲ ($12 \pm 1/3$) و گروه تجربی

۳ (۸±۱/۱۵) کاهش معنی‌دار در سطح $p < 0.05$ نشان داد (نمودار ۲). داده‌های کمی در جدول ۱ نشان داده شده است.



نمودار ۱: میانگین طول انشعابات خونی در نمونه‌های تحت تیمار با کورکومین در مقایسه با نمونه‌های شاهد. $* p < 0.05$



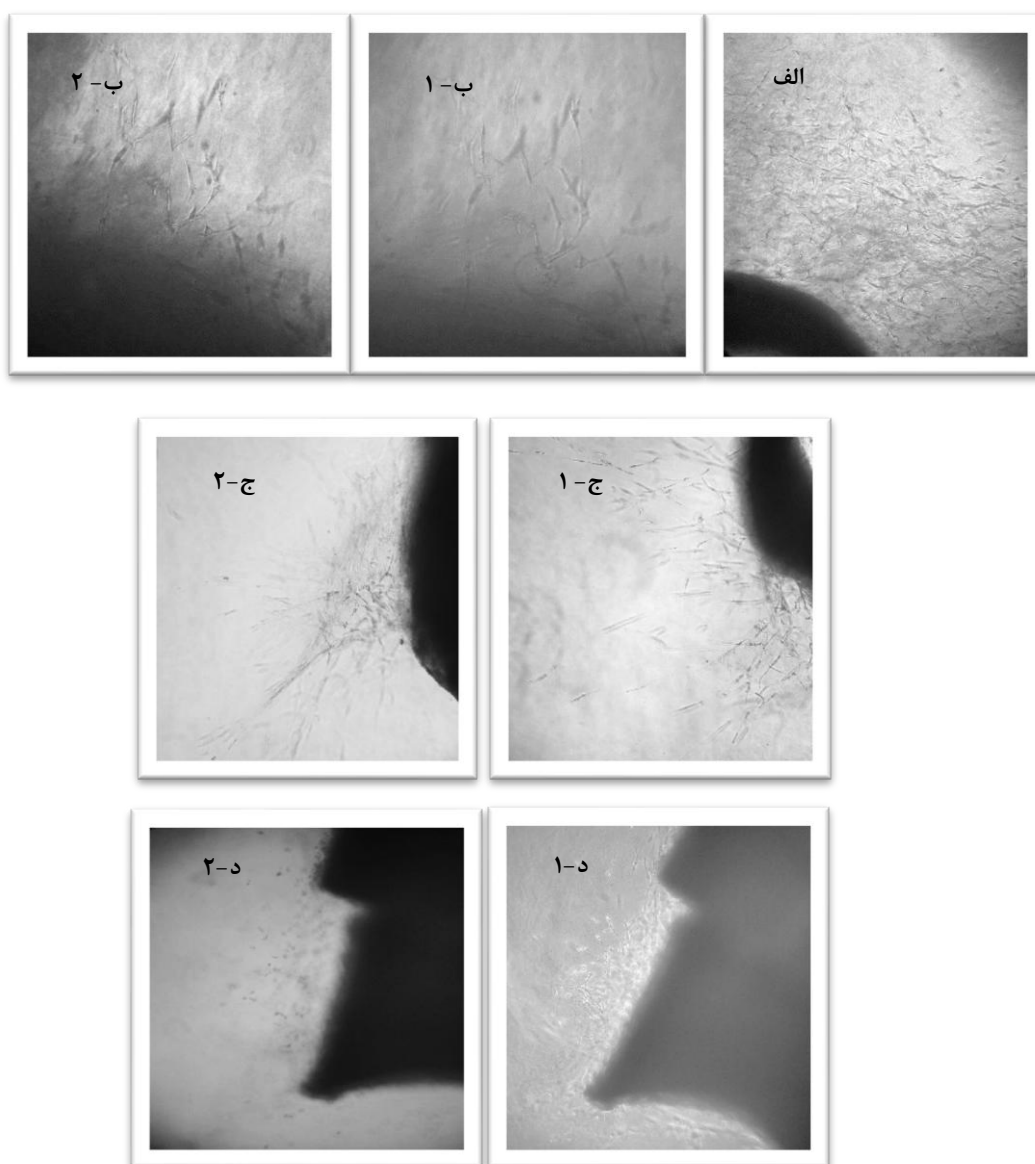
نمودار ۲: میانگین تعداد انشعابات عروق خونی در نمونه‌های تحت تیمار با کورکومین در مقایسه با نمونه‌های شاهد. $* p < 0.05$

جدول ۱: وضعیت طول و تعداد انشعابات عروقی در گروه‌های مورد مطالعه

گروه	طول انشعابات عروقی (میانگین ± انحراف معیار)	P-Value	تعداد انشعابات عروقی (میانگین ± انحراف معیار)	P-Value
کنترل	122/11 ± 1/2 mm	-	17 ± 2/5	-
25 µg/ml	118/86 ± 2/1 mm	0/05	16 ± 1/2	0/05
50 µg/ml	79/45 ± 3/2 mm	0/05	12 ± 1/3	0/05
100 µg/ml	38/93 ± 1/1 mm	0/05	8 ± 1/15	0/05

پس از تیمار کشیدگی خود را از دست داده و گسترش شبکه عروقی در مقایسه با نمونه‌های شاهد متوقف گردید. سازماندهی سلول‌های اندوتلیال عروق در دوز پایین کمتر مورد تهاجم قرار گرفت. (تصاویر شکل یک).

از سوی دیگر نتایج بررسی‌های مورفولوژیک اثر کورکومین بر انشعابات عروق نشان داد که اولین و واضح‌ترین تغییرات پس از تیمار مربوط به غلظت ۵۰ و ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر کورکومین است به نحوی که سلول‌های اندوتلیال سازنده عروق،



شکل ۱: اثر مهارکنندگی بر روی رگ‌زایی توسط کورکومین با استفاده از مدل حلقه آنورت

تصاویر با استفاده از میکروسکوپ نوری معکوس گرفته شده است (بزرگنمایی ۱۰۰). از راست به چپ پدیدار شدن زواید شبکه رگی از حلقه آنورت کشت شده در ماتریکس کلاژن در روز سوم در گروه شاهد آزمایشگاهی تیمار با DMSO (الف). گسترش جوانه‌های عروقی در روز پنجم با غلظت ۲۵ میکروگرم در میلی‌لیتر که قادر به مهار رگ‌زایی نبود، تصویر قبل از تیمار (ب-۱) و پس از تیمار (ب-۲). اثر ضد رگ‌زایی کورکومین با غلظت ۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر با اثر مهاری ضعیف، تصویر قبل از تیمار (ج-۱) و پس از تیمار (ج-۲). غلظت ۱۰۰ میکروگرم کورکومین با اثر مهاری قوی قابل مشاهده است، تصویر قبل از تیمار (د-۱) و پس از تیمار (د-۲).

بحث

سرطان یکی از مهم‌ترین چالش‌های علم پزشکی در سال‌های اخیر محسوب می‌شود که سالانه جان تعداد زیادی از افراد را در سراسر جهان می‌گیرد (۱۹). دستیابی به روش‌های پیشگیری‌کننده و درمانی سرطان‌ها و نیز شناسایی مکانیسم‌های دخیل در روند پیشرفت آنها با توجه به گسترش این دسته از بیماری‌ها در سال‌های اخیر توسعه چشمگیری یافته است. نتایج تحقیقات مختلف نشان می‌دهد بازگشت مجدد به فراورده‌های طبیعی همچون گیاهان دارویی، محصولات دریایی و فراورده‌های حاصل از متابولیسم میکروارگانیسم‌ها در کنار استفاده از داروهای سنتتیک می‌تواند رویکرد مثبتی در خصوص کنترل و درمان طیف گسترده‌ای از بیماری‌ها از جمله سرطان‌ها باشد (۲۰).

مطالعات نشان می‌دهد که مصرف برخی غذاها به ویژه با منشأ طبیعی و افزودنی‌های غذایی گیاهی پتانسیل پیشگیری‌کننده از سرطان داشته و رژیم غذایی گیاهی از گسترش و پیشرفت بیماری‌های مزمن و تومورهای بدخیم و گسترش آنها که با رگزایی مرتبط است، ممانعت به عمل می‌آورد (۲۱).

از آنجا که استفاده از زردچوبه و ترکیبات مؤثره آن شامل کورکومین به عنوان یک گیاه دارویی پرمصرف و افزودنی غذایی معمول با ویژگی‌های ضدسرطانی به اثبات رسیده است، در این پژوهش اثرات آنتی‌آنژیوژنیک کورکومین در مدل *Ex vivo* حلقه آئورت بررسی شده است. نتایج به دست آمده در تحقیق حاضر نشان داد که استفاده از کورکومین در دوزهای یاد شده منجر به کاهش رگزایی در نمونه‌های تیمار شده نسبت به نمونه شاهد می‌شود. گرچه این کاهش در غلظت ۲۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر نسبت به گروه شاهد معنی‌دار نبود ($p > 0.05$) ولی در غلظت‌های ۵۰ و ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر کاهش معنی‌داری دیده شد ($p < 0.05$).

آنژیوژنز، فرایند پیچیده‌ای است که در آن سلول‌های آندوتلیال، سلول‌های ماهیچه صاف، پری‌سیت‌ها، فیبروبلاست، ماتریکس خارج سلولی و انواعی از عوامل رشد نقش دارند و از

آنجا که این پدیده در تومورها به سلول‌های سرطانی اجازه رشد و متاستاز به سایر ارگان‌ها را می‌دهد، لذا استراتژی‌های مهارکننده آنژیوژنز می‌توانند به عنوان روش‌های نوید بخش برای درمان سرطان‌ها مطرح شود که روش‌های متنوع و متعدد درون تنی (*In vivo*) و برون تنی (*In vitro*) برای سنجش و ارزیابی عوامل مهارکننده و فعال‌کننده آنژیوژنز همچون مدل بررسی پرده کوریوآلانتوئیک جنین جوجه، قرنیه خرگوش، حلقه آئورت و پیوند ماتری ژل ارائه شده است (۲۲).

اساس مدل‌های سه بعدی آنژیوژنز بر پایه ظرفیت سلول‌های آندوتلیال فعال شده و تهاجم به محیط‌های سه بعدی (ماتریکس فیبرینی یا کلاژنی و یا مخلوطی از پروتئین‌ها به همراه عوامل رشد) بنا نهاده شده است، به طور کلی مدل‌های سه بعدی نسبت به دو بعدی دارای ویژگی‌ها و شرایط نزدیکتر به محیط درون بدن هستند و در حقیقت بسته به ترکیب محیط کشت (درصد سرم، اضافه کردن فاکتورهای رشد و سایتوکاین‌ها)، در این نوع مدل‌ها، سلول‌ها را می‌توان برای جوانه زدن یا ایجاد انشعاب، تکثیر و مهاجرت و یا تمایز سه بعدی تحریک کرد (۲۳). همچنین این مدل مطالعه پژوهشگر را قادر می‌سازد تا علاوه به مطالعه اثرات ماده مورد نظر بر رگزایی به مطالعه ماتریکس نیز بپردازد.

کشت پیوندهای اکسپلانت عروقی (روش مورد استفاده برای جداسازی سلول‌ها از یک قطعه بافت و کشت در شرایط آزمایشگاهی) همچون حلقه آئورت در ماتریکس ژله‌ای شده کلاژن و سپس بررسی سلول‌های آندوتلیال مشتق شده به عنوان یک مدل سه بعدی مناسب بررسی فرایند رگزایی نخستین بار توسط نیکوزیا ارائه شد و هنوز به شکل گسترده‌ای مورد استفاده است که قادر است شکاف بین مدل‌های *In vivo* و *In vitro* را پر کرده و می‌تواند اثرات رگزایی و ضد رگزایی و همچنین عوامل مختلف با این روش را ارزیابی نماید (۲۴).

در خصوص استفاده از ماتریکس کلاژنی به عنوان یکی از مدل‌های کشت در بررسی آنژیوژنز مطالعات بسیاری صورت پذیرفته است. Mohammadi Motlagh و همکاران با استفاده از

داربست کلاژنی به عنوان مدل، اثر رگزایی عصاره گیاه موسیر را مورد سنجش قرار داده‌اند (۱۳). قبلاً نیز از مدل حلقه آئورت موش صحرایی برای سنجش آنژیوژنز توسط زعفران استفاده شده است (۱۴). در سال‌های اخیر نیز با توجه به گسترش علوم نانوفناوری و نانوتکنولوژی از مدل کشت حلقه آئورت در ماتریکس کلاژنی به عنوان روش مطالعاتی *Ex vivo* برای ارزیابی ویژگی‌های آنژیوژنیک نانوذرات نقره استفاده شده است (۱۵).

در این پژوهش کورکومین موجود در گیاه دارویی زردچوبه که واجد اثرات آنتی‌اکسیدانی، ضد سمیت، ضدالتهابی و ضدسرطانی است به منظور مطالعه ویژگی‌های ضد رگزایی مورد بررسی قرار گرفت. در مطالعات پیشین نشان داده شده است که زردچوبه به عنوان یک افزودنی غذایی متداول قادر است به طور مستقیم موجب مهار تشکیل عروق خونی شود و به طور غیرمستقیم با مهار تولید عوامل محرک در تشکیل عروق جدید، هورمون‌های رشد فیبروبلاست و رشد اپیدرم از تشکیل سلول سرطانی ممانعت به عمل آورد (۲۵). اثرات ضدسرطانی کورکومین در مدل‌های مطالعه *In vitro* روی بسیاری از رده‌های سلولی همچون سلول‌های پانکراس، رحم و کلیه نیز مورد بررسی قرار گرفته است (۲۶).

از آنجا که کورکومین به عنوان یک ملکول آب گریز قادر است به راحتی از غشای پلاسمایی عبور کند. به نظر می‌رسد بخشی از اثرات آنتی‌آنژیوژنیک آن مربوط به همین ویژگی هیدروفوبیک است (۴). مطالعات اپیدمیولوژیک نشان داده است که کورکومین می‌تواند مانع بروز سرطان شود و با آن را به تأخیر انداخته و این کار را از طریق تأثیر بر بقا و تکثیر سلولی و نیز آنژیوژنز و متاستاز سلول‌های سرطانی از طریق مسیرهای انتقال پیام داخل سلولی مختلفی همچون P53 و COX-2 و MAPK مهار کند (۲۷، ۲۸). همچنین کورکومین قادر است با فاکتور نسخه‌برداری NF-KB که در اکثر سرطان‌ها فعال می‌شود و تکثیر سلولی را تحت تأثیر قرار می‌دهد میانکنش دهد و فعال‌سازی این فاکتور را مهار نماید و منجر به مهار گسترش تومور و روند متاستاز و آنژیوژنز شود (۲۹). به نظر

می‌رسد بخشی از اثرات آنتی‌آنژیوژنیک کورکومین مشاهده شده در مدل حلقه آئورت، از طریق تداخل در روند چرخه سلولی، مهار رشد و تکثیر سلول‌های اندوتلیال عروق خونی و نهایتاً مهار آنژیوژنز باشد (۳۰). نتایج در محدوده مطالعه انجام شده نشان داد که تکثیر و گسترش سلول‌های اندوتلیال عروق خونی پس از تیمار با کورکومین در غلظت‌های ۵۰ و ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر به طرز چشمگیری مهار شد. یافته‌های حاصل از بررسی اثر توأم میدان الکترومغناطیسی و عصاره زعفران در آنژیوژنز در مدل حلقه آئورت موش صحرایی ویژگی ضد رگزایی عصاره فوق‌الذکر را در این مدل به خوبی نشان داد که با داده‌های حاصل از بررسی در مدل پرده کوریوآلانتوئیک به عنوان یک مدل مطالعه *In vivo* و سنجش بیان بیومارکرهای آنژیوژنزی در سلول‌های کارسینومای پستان به عنوان مطالعه *In vitro* کاملاً مطابقت داشت (۳۱، ۳۲).

از سویی، دیگر مطالعات بیانگر تأثیر کاهش دهنده کورکومین بر بیان پروتئین‌های Bcl2 و Egr1 و متعاقباً مهار بیان گیرنده عامل رشد اپیدرمی و مهار رشد سلول‌های سرطانی هستند، همچنین کورکومین قابلیت حیات را در سلول‌های سرطانی از طریق افزایش نفوذپذیری غشای میتوکندری‌ها، مهار کیناز C، مهار رشد سلولی و اختلال در مسیر پروتئازوم القای آپوپتوز کاهش می‌دهد (۳۳). این نتایج با یافته‌های پژوهش حاضر همسو بوده و حداقل بخشی از اثرات آنتی‌آنژیوژنیک مشاهده شده در این روش بررسی پس از تیمار با کورکومین در غلظت‌های بالا از خلال تداخل در مسیرهای القای مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی می‌باشد.

مطالعات پژوهشگران همچنین نشان می‌دهد که کورکومین سیکلوکسیژناز ۲ و لیپوکسیژناز مهار می‌کند که نقش مهمی در گسترش بسیاری از سرطان‌ها دارد و دارای اثرات التهابی، آنژیوژنیک و آنتی‌آپوپتوتیک است (۳۴). علاوه براین بیان لیگاند‌های آنژیوژنیک به ویژه VEGF و گیرنده Flk-1 تحت تأثیر کورکومین کاهش یافته (۳۵) و عامل رشد اندوتلیال عروق مهار می‌گردد (۳۶) به نحوی که گسترش عروق خونی دچار اختلال می‌شود. به نظر می‌رسد بخشی از اثرات مهارکننده

رگزایی مشاهده شده در مدل حلقه آئورت نیز از طریق کاهش بیان ژن‌های دخیل در فرایند آنژیوژنز و به دنبال آن اختلال در عملکرد سلول‌های اندوتلیال عروق به منظور گسترش رگ‌های خونی عملکردی باشد (۳۷). این مطالعه می‌تواند انتخاب مناسبی برای مطالعات بیشتر بر روی اثرات ماتریکس خارج سلولی، نقش آنزیم‌های خارج سلولی کلیدی در مسیر رگزایی نظیر ماتریکس متالوپروتئینازها باشد.

نتیجه‌گیری

نتایج مطالعه حاضر نشان داد کورکومین دارای اثر مهار

قوی بر روی رگزایی در مدل حلقه آئورت موش صحرایی است. همچنین کورکومین می‌تواند به عنوان یک کاندید دارویی مؤثر و نویدبخش در حالت پاتولوژیک وابسته به رگزایی نیز مدنظر قرار گیرد. بدیهی است که مطالعات بیشتر در این زمینه ضروری می‌باشد.

سپاسگزاری

از همکاران محترم مرکز تحقیقات بیولوژی کاربردی تکوین جانوری دانشگاه آزاد اسلامی مشهد که در اجرای این طرح صمیمانه همکاری داشته‌اند سپاسگزاری می‌نماییم.

References:

- 1- Al-Aridi R, El Sibai K, Fu P, Khan M, Selman WR, Arafah BM. *Clinical and biochemical characteristic features of metastatic cancer to the sella turcica: an analytical review*. Pituitary 2013.
- 2- Vermeulen PB, van Golen KL, Dirix LY. *Angiogenesis, lymphangiogenesis, growth pattern, and tumor emboli in inflammatory breast cancer: a review of the current knowledge*. Cancer 2010; 116(11 Suppl): 2748-54.
- 3- Quesada AR, Munoz-Chapuli R, Medina MA. *Antiangiogenic drugs: from bench to clinical trials*. Med Res Rev 2006; 26(4): 483-530.
- 4- Noonan DM, Benelli R, Albini A. *Angiogenesis and cancer prevention: a vision*. Recent Results Cancer Res 2007; 174: 219-24.
- 5- 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.
- 6- Sandur SK, Ichikawa H, Pondy MK, Kunnumakkara AB, Sung B, Sethi G, et al. *Role of pro-oxidants and antioxidants in the anti-inflammatory and apoptotic effects of curcumin (diferuloylmethane)*. Free Radic Biol Med 2007; 43 (4): 568-80.
- 7- Bruck R, Ashkenazi M, Weiss S, Goldiner I, Shapiro H, Aeed H, et al. *Prevention of liver cirrhosis in rats by curcumin*. Liver Int 2007; 27 (3): 373-83.
- 8- Hanai H, Iida T, Takeuchi K, Watanabe F, Maruyama Y, Andoh A, et al. *Curcumin maintenance therapy for ulcerative colitis: randomized, multicenter, double-blind, placebo- controlled trial*. Clin Gastroenterol Hepatol 2006; 4(12): 1502-6.
- 9- Ringman JM, Frautschy SA, Cole GM, Masterman DL, Cummings JL. *A potential role of the curry spice curcumin in Alzheimer's disease*. Curr Alzheimer Res 2005; 2(2): 131-6.
- 10- Gautam SC, Gao X, Dulchavsky S. *Immunomodulation by curcumin*. Adv Exp Med Biol 2007; 595: 321-41.

- 11- Varalakshmi Ch, Ali AM, Pardhasaradhi BV, Srivastava RM, Singh S, Khar A. *Immunomodulatory effects of curcumin: in-vivo*. Int Immunopharmacol 2008; 8 (5): 688-700.
- 12- Mostafaie A, Mohammadi Motlagh H, Mansori K. *Angiogenesis and the models to study angiogenesis*. Yakhteh Med J 2009; 11 (4): 381-79. [Persian]
- 13- Mohammadi Motlagh HR, Mansouri K, Shakiba Y, Keshavarz M, Khodarahimi R, Siami A, et al. *Anti-angiogenic effect of aqueous extract of shallot (allium ascalonicum) bulbs in rat aorta ring model*. Yakhteh Med J 2009; 11 (2): 190-95. [Persian]
- 14- Moshtagh S, Baharara J, Zafar-balanejad S, Ramezani T. *Effects of saffron aqueous extract and low frequency electromagnetic field on angiogenesis in a Wistar rat aortic ring model*. Koomesh 2014; 15 (4): 522-29. [Persian]
- 15- Baharara J, Namvar F, Ramezani T, Hosseini N, Mohamad R. *Green synthesis of silver nanoparticles using achillea biebersteinii flower Extract and its anti-angiogenic properties in the rat aortic ring model*. Molecules 2014; 19(4): 4624-34.
- 16- Baharara J, Hosseini N, Ramezani N, *Bee venom inhibits angiogenesis in a rat aortic model*. J Rafsanjan Univ Med Sci (In Press). [Persian]
- 17- Schutte SC, Chen Z, Brockbank KG, Nerem RM. *Tissue engineering of a collagen-based vascular media: Demonstration of functionality*. Organogenesis 2010; 6(4): 204-11.
- 18- Techatanawata S, Surarit R, Suddhasthira T, Piboonniyom Khovidhunkit S. *Type I collagen Extracted from rat-tail and bovine achilles tendon for dental application: a comparative study*. Asian Biomedicine 2011; 5(6): 787-98.
- 19- Japp A, Gielen GH, Becker AJ. *Recent aspects of classification and epidemiology of epilepsy-associated tumors*. Epilepsia 2013; 54 (Suppl 9): 5-11.
- 20- Kaefer CM, Milner JA. *The role of herbs and spices in cancer prevention*. J Nutr Biochem 2008; 19(6): 347-61.
- 21- Wilken R, Veena MS, Wang MB, Srivatsan ES. *Curcumin: a review of anti-cancer properties and therapeutic activity in head and neck squamous cell carcinoma*. Mol Cancer 2011; 10: 12.
- 22- Gao P, Yang JL, Wang H, Wu XD, Jiao SC. *A two-dimensional model for studying tumor angiogenesis inhibitors*. Cancer Invest 2013; 31(5): 346-58.
- 23- De Rossi G, Scotland R, Whiteford J. *Critical factors in measuring angiogenesis using the aortic ring model*. J Genet Syndr Gene Ther 2013; 4(5): .
- 24- Nicosia RF, Ottinetti A. *Modulation of microvascular growth and morphogenesis by reconstituted basement membrane gel in three-dimensional cultures of rat aorta: a comparative study of angiogenesis in matrigel, collagen, fibrin, and plasma clot*. In Vitro Cell Dev Biol 1990; 26(2): 119-28.

- 25- Fan X, Zhang C, Liu DB, Yan J, Liang HP. *The clinical applications of curcumin: current state and the future*. Curr Pharm Des 2013; 19(11): 2011-31.
- 26- Nagaraju GP, Aliya S, Zafar SF, Basha R, Diaz R, El-Rayes BF. *The impact of curcumin on breast cancer*. Integr Biol (Camb) 2012; 4(9): 996-1007.
- 27- Wang JB, Qi LL, Zheng SD, Wu TX. *Curcumin induces apoptosis through the mitochondria-mediated apoptotic pathway in HT-29 cells*. J Zhejiang Univ Sci B 2009; 10(2): 93-102.
- 28- Du WZ, Feng Y, Wang XF, Piao XY, Cui YA, Chen LC, et al. *Curcumin Suppresses Malignant Glioma Cells Growth and Induces Apoptosis by Inhibition of SHH/GLI1 Signaling Pathway in Vitro and Vivo*. CNS Neurosci Ther 2013; 19(12): 926-36.
- 29- Jhnson S, Gulhati P, Arrieta 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.
- 30- 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.
- 31- Mousavi M, Baharara J, Zafar-Balanezhad S, Shaheokh-Abadi K. *Effect of Saffron aqua Extract on angiogenesis in chick chorioalantoic membrane*. Zahedan J Res Med Sci 2014; 16(3): 55-58. [Persian]
- 32- Mousavi M, Baharara J. *Effect of Crocus sativus L. on Expression of VEGF A and VEGFR2 genes (angiogenic biomarkers) in MCF7 cell line*. Zahedan J Res Med Sci 2014; 16(12): 8-14.
- 33- Hu P, Huang P, Chen MW. *Curcumin attenuates cyclooxygenase-2 Expression via inhibition of the NF- κ B pathway in lipopolysaccharide-stimulated human gingival fibroblasts*. Cell Biol Int 2013; 37 (5):443-8.
- 34- Shan B, Schaaf C, Schmidt A, Lucia K, Buchfelder M, Losa M, et al. *Curcumin suppresses HIF1A synthesis and VEGFA release in pituitary adenomas*. J Endocrinol 2012; 214(3):389-98.
- 35- Huang CZ, Huang WZ, Zhang G, Tang DL. *In vivo study on the effects of curcumin on the Expression profiles of anti-tumour genes (VEGF, CyclinD1 and CDK4) in liver of rats injected with DEN*. Mol Biol Rep 2013; 40 (10):5825-31.
- 36- Zhang Y, Cao H, Hu YY, Wang H, Zhang CJ. *Inhibitory effect of curcumin on angiogenesis in ectopic endometrium of rats with Experimental endometriosis*. Int J Mol Med 2011; 27(1): 87-94.
- 37- Jonson JJ, Mukhtar H. *Curcumin for chemoprevention of colon cancer*. Cancer Lett 2007; 255(2): 170-81.

Effect of Curcumin on Angiogenesis in Aortic Ring Model of the Wistar Rat

Baharara J(PhD)¹, Mousavi M(MSc)², Ramezani T(PhD Student)³

¹*Department of Biology, Research Center for Animal Developmental Applied Biology, Islamic Azad University, Mashhad Branch, Mashhad, Iran.*

²*Department of Biology, Young Researchers and Elite Club, Research Center for Animal Developmental Applied Biology, Islamic Azad University, Mashhad Branch, Mashhad, Iran.*

³*Department of Biology, Kharazmi University, Tehran, Iran.*

Received: 24 Dec 2013

Accepted: 29 May 2014

Abstract

Introduction: Tumeric is a plant with both food and medical properties by which Curcumin is derived from. It has various pharmacological effects. Angiogenesis, a dynamic process of endothelial cells proliferation in order to develop new blood vessels from the previous ones, affects a wide range of physiological and pathological processes such as tumor growth and metastasis. In this study, anti angiogenic effects of Cucumin were investigated in aortic ring of Wistar rats.

Methods: In this experimental study, Aortic ring was cut up in to 1 mm pieces and cultured in collagen matrix. After three days, sprouting angiogenesis were observed, and then aortic rings were treated with Curcumin at concentration of 25, 50 and 100 µg/ml. Effects of treatment in all cases were photographed and then investigated by invert microscope. Lengths of vessels were measured by Image J software. Moreover, the study data were analyzed using SPSS in significant level of $P<0.05$.

Result: Data analysis revealed that no significant difference was observed in regard with average of length and number of blood vessels in the control group compared with sham-exposed group ($P>0.05$). In fact, average length and number of blood vessels in experimental group 1 demonstrated no significant difference compared with control group, though in the experimental group 2 ($79.45\pm3.2\text{mm}$), (12 ± 1.3) and 3 ($38.93\pm1.1\text{mm}$), (8 ± 1.1) significant differences were observed ($P<0.05$).

Conclusion: The results proposed that the Curcumin had dose-dependent inhibitory effects on angiogenesis in rat aortic ring. Therefore, it can be introduced as an appropriate candidate in order to study angiogenesis and related diseases.

Keywords: Angiogenesis; Aorta; Curcumin; Rat

This paper should be cited as:

Baharara J, Mousavi M, Ramezani T. *Effect of curcumin on angiogenesis in aortic ring model of the wistar rat.* J Shahid Sadoughi Univ Med Sci 2014; 22(3): 1226-36.

***Corresponding author: Tel: +98 511 8437092, Email: baharara@yahoo.com**