

بررسی تاثیر نانوکورکومین دندروزومی بر بیان ترانسکرپت غیر کدکننده HOTAIR در رده سلولی توموری MCF-7 پستان

مریم مهربانی^۱، سارا آل محمد^۲، رضا دشت بزرگ^۳، مریم طهماسبی بیرگانی^{۴*}،
محمد رضا حجاری^۵، جواد محمدی اصل^۴

مقاله پژوهشی

مقدمه: سرطان پستان یکی از شایع‌ترین بدخیمی‌ها در زنان است. داروهای گیاهی به دلیل عوارض جانبی کم، مورد توجه پژوهشگران هستند. کورکومین پلی‌فنلی مستخرج از زردچوبه با خواص ضد سرطانی است. کورکومین در آب نامحلول و متابولیسم سریع دارد. انتقال دارو توسط حامل‌ها با ابعاد نانو از راهکارهای پیشنهادی غلبه بر این مشکلات است. هدف از این مطالعه بررسی تاثیر نانوکورکومین دندروزومی بر بیان ترانسکرپت غیر کدکننده HOTAIR در رده سلولی توموری MCF-7 پستان می باشد.

روش بررسی: تحقیق حاضر یک مطالعه بنیادی - کاربردی با هدف سنجش اثر فورمولاسیون دندروزومی کورکومین بر سلول‌های توموری پستان است. در ابتدا کورکومین در دندروزوم بارگیری و ورود کورکومین به سلول توسط میکروسکوپ فلورسانت بررسی شد. مرگ سلولی توسط سنجش MTT و کیت تشخیص آپوپتوز انجام گرفت. بیان ژن HOTAIR توسط Real-time PCR انجام گرفت. افزایش بیان این ژن در بسیاری از سرطان‌های انسانی گزارش شده است. داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار آماری GraphPad PrismV9.5 و با به‌کارگیری آنالیز آماری NOVA one-way و Student t-test تفسیر و نتایج به صورت انحراف معیار \pm میانگین گزارش شد.

نتایج: دندروزوم قدرت انحلال کورکومین را افزایش می‌دهد. غلظت موثر کورکومین - دندروزومی پس از ۲۴ و ۴۸ ساعت تیمار به ترتیب ۲۵ و ۲۰ میکرومولار به دست آمد. درصد سلول‌ها با آپوپتوز زودرس به ترتیب $22/97 \pm 0/03$ و $56/22 \pm 0/05$ بود که نسبت به سلول‌های کنترل معنی‌دار بود. تیمار ۲۴ و ۴۸ ساعت سلول‌ها با غلظت ۲۰ میکرومولار کورکومین - دندروزومی موجب کاهش معنی‌دار بیان ژن HOTAIR شد ($P = 0/001$).

نتیجه‌گیری: این یافته‌ها نشان داد که کورکومین دندروزومی می‌تواند با مهار بیان ژن HOTAIR، سلول‌های توموری پستان را به سمت آپوپتوز هدایت کند.

واژه‌های کلیدی: کورکومین، دندروزوم، سرطان پستان، HOTAIR، Long noncoding RNA

ارجاع: مهربانی مریم، آل محمد سارا، دشت بزرگ رضا، طهماسبی بیرگانی مریم، حجاری محمد رضا، محمدی اصل جواد. بررسی تاثیر نانوکورکومین دندروزومی بر بیان ترانسکرپت غیر کدکننده HOTAIR در رده سلولی توموری MCF-7 پستان. مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد ۱۴۰۲؛ ۳۱ (۶): ۳۱-۶۷۱۸.

۱- کمیته تحقیقات دانشجویی، دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز، اهواز، ایران.

۲- گروه ژنتیک، دانشکده علوم و فناوری‌های نوین، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم پزشکی تهران، تهران، ایران.

۳- گروه تخصصی ژنتیک، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم تحقیقات، تهران، ایران.

۴- گروه ژنتیک پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز، اهواز، ایران.

۵- گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران.

* (نویسنده مسئول): تلفن: ۰۹۱۶۶۱۴۹۹۸۵، پست الکترونیکی: tahmasebi.birgani62@gmail.com، صندوق پستی: ۱۵۷۹۴-۶۱۳۵۷

تنظیم طیف وسیعی از عملکردهای حیاتی سلول نظیر پاسخ به استرس‌های سلولی، رشد و نمو، تنظیم بیان ژن، پردازش RNA، تنظیم چرخه سلولی، تنظیم ساختار کروماتین، جابجایی درون سلولی و حافظه اپی ژنتیک دخالت دارند. توالی‌های غیرکدکننده با طول بلند بیان اختصاصی در یک سلول یا بافت دارند. این ترانسکرپت‌ها عمدتاً توسط RNA Polymerase II نسخه‌برداری می‌شوند بنابراین دم پلی A و کلاهک به ترتیب در انتهای 3' و 5' آن‌ها مشاهده می‌شود (۱۰). ترانسکرپت *HOTAIR* یکی از انواع ترانسکرپت‌های طولی است که نقش انکوژنی آن در طیف وسیعی از سرطان‌های انسانی نظیر معده، کولون و پستان به اثبات رسیده است (۱۱) و به نظر می‌رسد مهار بیان این ژن با توقف رشد سلول‌های سرطانی همراه است (۱۲). افزایش بیان ترانسکرپت *HOTAIR* در سلول‌های سرطانی پستان با گیرنده استروژن مشاهده شده است و قدرت متاستاز این سلول‌ها را افزایش می‌دهد (۱۳). مطالعه حاضر بر این هدف پایه‌گذاری شده است که تاثیر نانوفورمولاسیون دندروزومی کورکومین بر بیان ژن *HOTAIR* را در رده سلولی توموری پستان MCF-7 به عنوان رده سلولی توموری پستان دارای گیرنده استروژن مورد مطالعه قرار گیرد.

روش بررسی

آماده سازی کورکومین در فرمول دندروزومی OA400: دندروزوم‌ها میسل‌های پلی‌اتیل‌گلیکول (Polyethylene glycol) دار شده مشتق از واحدهای اسید چرب اولئیک اسید از طرف گروه تحقیقاتی دکتر مجید صادقی‌زاده در دانشگاه تربیت مدرس اهدا و به عنوان نانوحامل‌های پلیمری جهت افزایش حلالیت کورکومین در این تحقیق مورد استفاده قرار گرفتند. نانوکورکومین دندروزومی OA400 مطابق دستورالعمل بهینه شده توسط طهماسبی بیرگانی و همکاران (۳) تهیه گردید. اطلاعات مربوط به ساختار، میکروسکوپ الکترونی، بار سطحی، بازدهی انکپسولاسیون کورکومین در دندروزوم و پایداری فیزیکی- شیمیائی دارو در مطالعه پیشین نویسنده گزارش شده است. (۳) نانوکورکومین دندروزومی OA400 با غلظت استوک ۲۷۰۰ میکرومولار تهیه و در شرایط دور از نور در ۴ درجه

سرطان پستان یکی از شایع‌ترین انواع بدخیمی در زنان کلیه دنیاست و بیشترین نرخ مرگ و میر ناشی از سرطان‌ها در زنان را به خود اختصاص می‌دهد. نوع درمان در بیماران مبتلا به سرطان پستان با توجه به شرایط پاتولوژیک بیماران متفاوت است اما تمامی روش‌ها در داشتن عوارض جانبی ناخواسته برای بیمار مشابه هستند (۱). در دهه‌های اخیر استفاده از ترکیبات دارویی با منشا گیاهی مورد توجه پزشکان قرار گرفته است که این توجه ویژه به دلیل اثرات جانبی کم و عدم سمیت که ناشی از سازگاری این ترکیبات با بدن انسان می‌باشد (۲). یکی از نکات قابل‌تامل ترکیبات گیاهی توانائی چند هدفه بودن این ترکیبات است بدین معنی که قادرند چندین مسیر انتقال پیام سلولی را شناسائی کنند. از طرف دیگر میزان نفوذشان به سلول‌های سرطانی در قیاس با سلول‌های نرمال بیشتر است (۳). کورکومین یک پلی‌فنل مستخرج از ریشه گیاه زردچوبه با ویژگی‌های ضد توموری اثبات شده است. کورکومین در سیستم‌های آبی نامحلول بوده، جذب و توزیع بافتی پائین و متابولیسم سریع دارد که مانع شده کورکومین به فاز دارویی وارد شود (۴،۵). طراحی مهارکننده‌های متابولیسمی و سنتز ناقلین میسل- لیپوزوم راهکارهایی هستند که در جهت رفع مشکلات ترکیباتی نظیر کورکومین پیشنهاد شده است (۶). در سال ۲۰۰۰ میلادی، دندروزوم‌ها به عنوان نسل جدیدی از نانوحامل‌های زیست تخریب‌پذیر و کارآمد انتقال ژن معرفی شدند (۷). مطالعات به چاپ رسیده گروه تحقیقاتی ما نشان می‌دهد که دندروزوم‌ها قادرند کورکومین را با بازدهی ۸۰٪ در خود بارگیری و میسل‌هایی کروی با اندازه ۱۴۷ نانومتر ایجاد کنند که به‌طور قابل‌توجهی از نظر شیمیائی و فیزیکی پایدارند (۳) کورکومین با فورمولاسیون دندروزومی به‌طور کارآمدی رشد سلول‌های سرطانی پستان، مغز، کولون، فیبروسارکوما و کبد را مهار می‌کند (۸،۹). بخش عمده‌ای از توالی‌های ژنوم انسانی غیرکد کننده هستند و لذا تولید پروتئین از این مناطق وجود ندارد. اگرچه این توالی‌ها بیشتر به عنوان زباله‌های ژنومی در نظر گرفته می‌شدند، بررسی‌ها نشان می‌دهد این توالی‌ها در

کشت داده شدند و پس از اینکه سلول‌ها به بستر چسبیدند و به مورفولوژی رسیدند، تحت تیمار با غلظت‌های مختلف کورکومین دندروزومی در دو بازه زمانی ۲۴ و ۴۸ ساعت قرار گرفتند. سلول‌ها با دندروزوم تنها نیز تیمار شدند و به عنوان گروه کنترل قرار گرفتند. پس از طی بازه‌های زمانی مورد نظر، محیط کشت حاوی دارو حذف و سلول‌ها با بافر نمکی فسفات (PBS) شستشو داده شدند و پیش ماده MTT با غلظت 5 mg/ml در بافر نمکی فسفات تهیه، فیلتر و در حجم ۲۰ میکرولیتر به هر چاهک اضافه شد و به پلیت مربوطه مدت ۴ ساعت در انکوباتور C^{37} نگهداری شد. دوپست میکرولیتر دی.ام.اس.او جهت حل کردن رسوب فورمازان اضافه شد و شدت رنگ با استفاده از دستگاه الیزا در طول موج ۵۷۰ نانومتر برآورد شد. نسبت جذب در سلول‌های گروه تیمار به گروه کنترل (غلظت صفر از دارو) میزان بقاء سلول‌ها در هر غلظت را نشان خواهد داد. غلظتی که در آن ۵۰٪ از سلول‌ها توسط دارو کشته شدند تحت عنوان غلظت کشنده (LD50) در نظر گرفته شد. داده‌های حاصل از ۳ آزمایش مجزا به صورت $Mean \pm SD$ ارائه شدند.

میکروسکوپی فلورسانت: ورود کورکومین به سلول‌های MCF-7 سرطان پستان بر اساس خاصیت فلورسانت ذاتی این مولکول انجام گرفت. سلول‌ها به مدت ۴ ساعت با غلظت ۲۰ میکرومولار کورکومین تیمار شدند. سپس محیط کشت حاوی دارو خارج و بعد از شستشوی سلول‌ها با بافر نمکی فسفات، عکسبرداری با میکروسکوپ فلورسانت انجام گرفت.

سنجش مرگ آپوپتوزی: در سلول‌های سالم، فسفاتیدیل سرین (PS) فقط در لایه داخلی غشای لیپیدی سلول عرضه می‌شود. در مرحله اولیه آپوپتوز، فسفاتیدیل سرین از داخل غشای لیپیدی به خارج غشای لیپیدی منتقل می‌شود. انکسین V، یک بایندینگ پروتئین وابسته به Ca^{2+} با وزن مولکولی ۳۵-۳۶ کیلو دالتون است که میل بالایی به فسفاتیدیل سرین دارد و می‌توان از آن برای تشخیص جهت شناسایی خارجی بودن فسفاتیدیل سرین استفاده کرد. انکسین V به عنوان یکی از شاخص‌های حساس آپوپتوز زودرس شناخته

سانتی‌گراد نگهداری شد. پیش از استفاده در هر تکنیک، رقیق‌سازی دارو با استفاده از محیط کشت کامل (حاوی ۱۰٪ سرم جنین گاوی) انجام گرفت.

کشت رده سلولی توموری MCF-7: رده سلولی MCF-7

سرطان پستان از بانک سلولی انستیتو پاستور ایران خریداری شد. سلول‌ها در محیط کشت RPMI1640 حاوی ۱۰٪ FBS و ۱٪ آنتی بیوتیک پنیسیلین-استرپتومایسین رشد داده شدند. کشت سلول در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد و CO_2 ۵٪ نگهداری شدند. سلول‌ها پس از گذشت ۳ روز با استفاده از تریپسین ۰/۲۵٪ - ای.دی.تی. ۰/۰۲٪ پاساز داده شدند.

بررسی بقای سلولی با استفاده از تکنیک MTT: حساسیت

سلول‌های MCF-7 سرطان پستان به کورکومین دندروزومی و دوز موثر دارو بر آن‌ها، توسط تکنیک MTT انجام شد. روش MTT، یکی از پرکاربردترین و مهم‌ترین تکنیک‌های بررسی و ارزیابی تکثیر و بقای سلولی در آزمایشگاه‌های سلولی محسوب می‌شود. تکنیک MTT از حساسیت و تکرارپذیری قابل قبولی برخوردار است. این روش اولین بار در سال ۱۹۸۳ توسط Mossman معرفی گردید و نیازمند کمی سازی دقیق تعداد سلول‌های زنده در محیط کشت سلولی است (۱۴،۱۵). سنجش به روش MTT بازدهی بالایی برای اندازه‌گیری تکثیر، بقاء و مرگ و میر سلولی دارد و روش اجرای آن نیازی به مراحل وقت‌گیر شستشو و انتقال از یک پلیت به پلیت دیگر را ندارد. نمونه‌های مورد بررسی در این روش عبارتند از سلول‌های چسبیده یا معلق و سلول‌های تکثیر شونده یا غیر تکثیر شونده. در این روش سوپسترای زرد رنگ MTT به واسطه آنزیم‌های اکسیدوردوکتاز میتوکندریایی وابسته به NAD(P)H در سلول‌های زنده به رسوب بنفش رنگ فورمازان احیا می‌گردد. در واقع سلول‌های زنده قادر به احیای رنگ تترازولیوم برامید به رسوب بنفش رنگ فورمازان هستند. رسوب فورمازان در حلال آلی دی متیل سولفوکسید (DMSO) حل و شدت رنگ تولید شده با استفاده از اسپکتروفوتومتری قابل سنجش است. شدت جذب رابطه مستقیمی با تعداد سلول‌های زنده دارد. در این مطالعه، ۲۰ هزار سلول در هر چاهک از پلیت‌های ۹۶ خانه

شدند. سنتز cDNA توسط کیت PrimScript™ RT reagent (Takara, Japan) kit و بر اساس پروتکل کیت انجام گرفت. بررسی بیان ژن *HOTAIR* با استفاده از تکنیک **Real-time PCR**: واکنش پلیمرز زنجیره‌ای کمی با استفاده از SYBR Premix Ex Taq™ II (TAKARA, Japan) و پرایمرهای اختصاصی ژن‌های *HOTAIR* و *GAPDH* (ژن کنترل داخلی) انجام گرفت. نام و توالی پرایمرهای مورد استفاده در جدول ۱ خلاصه شده است. در این راستا، توالی ترانسکرپت ژن مربوطه از پایگاه اینترنتی NCBI با آدرس اینترنتی ذکر شده در منبع شماره (۱۷) دریافت و آغازگرهای الیگونوکلئوتیدی مستقیم و معکوس توسط نرم‌افزار ۳ Primer express، طراحی گردید. مخلوط واکنشی Real-time PCR مطابق دستورالعمل کیت مذکور تهیه شد. کارائی تکثیر ژن‌های مورد مطالعه پس از انجام هر واکنش توسط نرم‌افزار Linreg-PCR تعیین و تخمین تغییر بیان ژن‌ها با استفاده روش $2^{-\Delta\Delta Ct}$ انجام شد. میانگین کارائی عملکرد آغازگرهای *HOTAIR* و *GAPDH* به ترتیب برابر ۸۸، ۸۷٪ به دست آمد.

تجزیه و تحلیل آماری

برای هر آزمایش سه تکرار مستقل مدنظر قرار گرفت. نتایج حاصل با استفاده از نرم‌افزار آماری GraphPad Prism V9.5 و با بکارگیری آنالیز آماری NOVA one-way و Student t-test انجام گردید. نتایج به صورت میانگین \pm انحراف معیار (Mean \pm SD) گزارش شد. ارزش آماری کمتر از ۰/۰۵ به عنوان سطح معنی‌داری در نظر گرفته شد.

ملاحظات اخلاقی

تحقیق حاضر یک مطالعه بنیادی است که در کمیته تحقیقات دانشجویی دانشگاه علوم پزشکی جندی‌شاپور اهواز و با کد اخلاق IR.AJUMS.REC.1395.160 تصویب کمیته‌های پژوهشی و اخلاق دانشگاه رسیده است. مراحل اجرائی تحقیق حاصل در مرکز تحقیقات سلولی مولکولی دانشگاه علوم پزشکی جندی‌شاپور اهواز صورت گرفته است.

می‌شود. آپوپتوز را می‌توان با میکروسکوپ فلورسانس یا فلوسایتمتری با استفاده از پروب انکسین V کونژوگه شده با FITC) یک فلورسنت سبز) تشخیص داد (۱۶). به منظور بررسی نوع مرگ القا شده در سلول‌های توموری پستان (مرگ آپوپتوز یا نکروز)، تست انکسین- پروپیدیوم دیدید و تیمار با نانوکورکومین دندروزیومی و در غلظت ۲۰ و ۲۵ میکرومولار و در بازه‌های زمانی ۲۴ و ۴۸ ساعت) توسط کیت Annexin-PI (Roche company) و با استفاده از پروتکل آن انجام گرفت. در این آزمایش قرارگیری سلول‌ها به سمت راست نمودار بیانگر مرگ سلولی آپوپتوز می‌باشد. به طور کلی در سلول‌های سالم، فسفاتیدیل سرین (PS) در لایه داخلی غشای پلاسمایی قرار گرفته است اما هنگامیکه آپوپتوز در سلولی القا می‌شود فسفاتیدیل سرین به غشاء خارجی سلول انتقال می‌یابد. این جابجائی در نهایت موجب می‌شود ماکروفاژها سلول‌های آپوپتوتیک را شناسائی و فاگوسیتوز کنند. در کیت آپوپتوز مورد استفاده در این مطالعه، دو ترکیب انکسین-V و رنگ حیاتی پروپیدیوم یودید موجود می‌باشد. پروپیدیوم یودید تنها وارد سلول‌هایی می‌شود که ساختار غشاء پلاسمایی آن‌ها از بین رفته باشد و بنابراین این امکان را فراهم می‌سازد که سلول‌هایی را که در مراحل اولیه آپوپتوز Annexin+ PI- هستند از سلول‌هایی که در مراحل نهایی آپوپتوز Annexin- PI+ هستند تمایز دهیم. سلول‌های زنده و سالم- Annexin- PI+ هستند (۳).

استخراج RNA و واکنش نسخه برداری معکوس: RNA سلولی با استفاده از محلول RNX-Plus (سیناکلون، ایران) از سلول‌ها استخراج گردید. بررسی کیفی RNA توسط الکتروفورز افقی روی ژل آگارز ۱٪ انجام گرفت. حضور باندهای ۱۸s و ۲۸s مرتبط با RNA ریبوزومی به عنوان شاخص کیفیت RNA استخراج شده در نظر گرفته می‌شود. غلظت و خلوص نمونه RNA با استفاده از دستگاه نانودراپ با اندازه‌گیری جذب نوری نمونه‌ها در طول موج‌های ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر صورت گرفت. نمونه‌های حاوی RNA در فریزر ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری

جدول ۱: پرایمرهای مورد استفاده در واکنش Realtime PCR

نام پرایمر	توالی	اندازه محصول تکثیر یافته (جفت باز)
<i>HOTAIR</i>	پرایمر مستقیم: ۵'AGGCCCTGCCTTCTGCCT پرایمر معکوس: ۵'TGCTCTCTTACCCCCACGGA	۱۴۷
<i>GAPDH</i>	پرایمر مستقیم: ۵'TGAACCATGAGAAGTATGACAAC پرایمر معکوس: ۵'CATGAGTCCTTCCACGATACC	۱۲۳

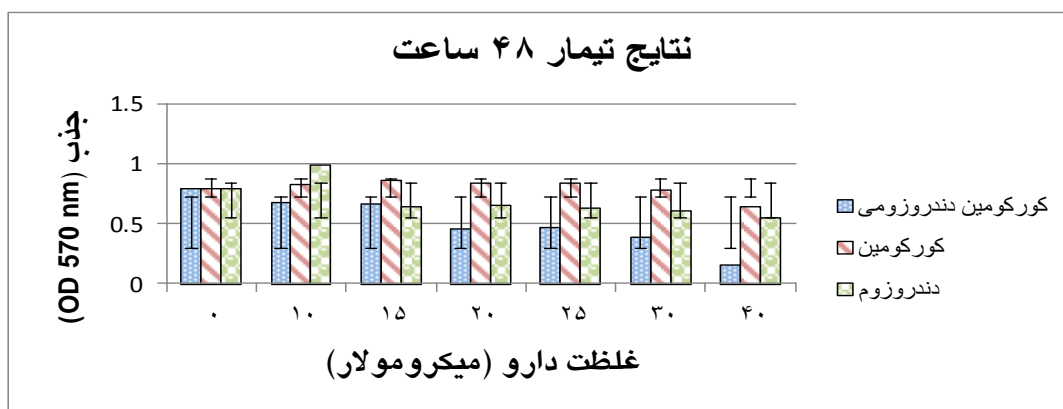
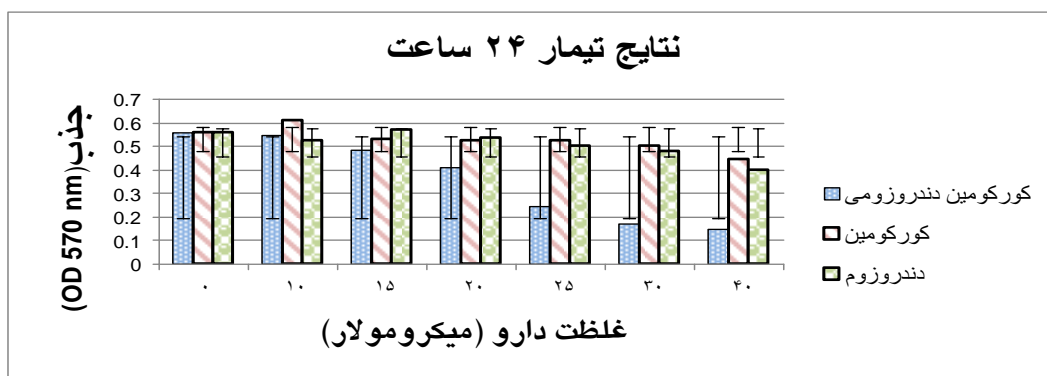
نتایج

نانوکورکومین دندروزومی به شکل وابسته به غلظت و زمان رشد سلول‌های توموری MCF-7 سرطان پستان را مهار می‌کند. همان طور که در شکل ۱ و جدول ۲ مشاهده می‌شود، پس ۲۴ ساعت تیمار دارویی با نانوکورکومین دندروزومی با بازه غلظتی ۰ تا ۴۰ میکرومولار، در غلظت ۲۵ میکرومولار دارو، بیش از نیمی از سلول‌ها از بین رفتند که به عنوان دوز موثر دارو (LD_{50}) در این بازه زمانی در نظر گرفته می‌شود ($P < 0.001$). به طور مشابه پس از تیمار ۴۸ ساعت با غلظت‌های ۰ تا ۴۰ میکرومولار کورکومین دندروزومی، در غلظت ۲۰ میکرومولار دارو، بیش از نیمی از سلول‌ها از بین رفتند که به عنوان دوز موثر دارو (LD_{50}) در این بازه زمانی در نظر گرفته می‌شود ($P = 0.001$). در هر دو بازه زمانی ۲۴ و ۴۸ ساعت، کورکومین آزاد و دندروزوم به تنهایی و حتی تا غلظت ۴۰ میکرومولار تأثیر کشندگی معنی‌داری بر سلول‌ها نشان ندادند (شکل ۱ و جدول ۲). این یافته‌ها نشان می‌دهد که حاملین دندروزومی خاصیت سیتوتوکسیک ندارند و صرفاً تأثیر ضد سرطانی کورکومین را به واسطه افزایش قدرت انحلال آن افزایش می‌دهند. در شکل ۲ قسمت A و B تصویر میکروسکوپ نوری سلول‌های MCF-7 پس از تیمار ۲۴ ساعته سلول‌ها با کورکومین دندروزومی را نشان می‌دهد که اثر مهاری

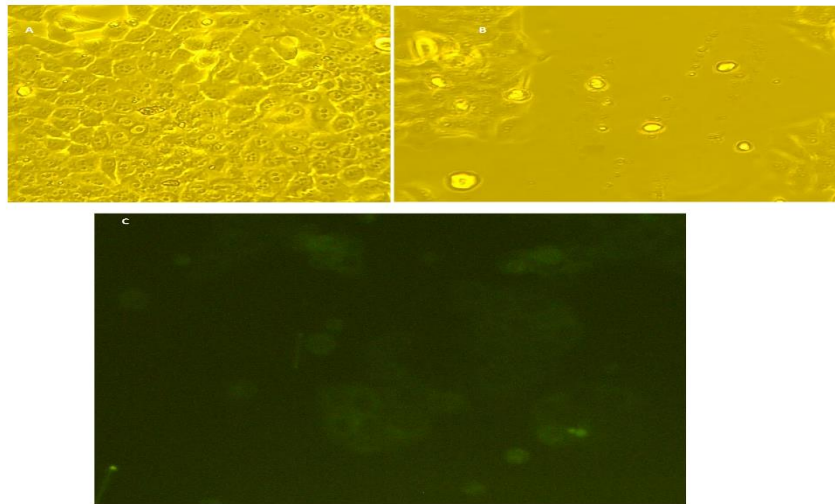
دارو بر رشد این سلول‌ها به وضوح قابل رویت است. همچنین در شکل ۲، قسمت C، سلول‌های دریافت‌کننده کورکومین به رنگ سبز قابل رویت هستند که نشان می‌دهد دندروزوم ورود کورکومین به سلول را تسهیل کرده است. شکل ۳ و جدول ۳ نشان می‌دهد، نانوکورکومین دندروزومی به صورت وابسته به غلظت و زمان مرگ آپوپتوز را در رده سلولی MCF-7 پستان القا می‌کند درصد سلول‌هایی که پس از ۲۴ ساعت تیمار با نانوکورکومین دندروزومی با غلظت ۲۰ و ۲۵ میکرومولار، دچار مرگ سلولی آپوپتوز اولیه و زودرس شده‌اند به ترتیب $(22/97 \pm 0/03)$ ، $(22/75 \pm 0/01)$ از سلول‌هاست که در مقایسه با سلول‌های تیمار نشده با دارو (کنترل) $(16/61 \pm 0/01)$ معنی‌دار بود. همچنین تیمار با غلظت ۲۰ میکرومولار کورکومین دندروزومی به مدت ۴۸ ساعت موجب افزایش درصد سلول‌های دچار شده با مرگ سلولی آپوپتوز اولیه و زودرس به میزان $56/22 \pm 0/05$ شد ($P < 0.05$). در تیمار ۴۸ ساعت با غلظت ۲۵ میکرومولار کورکومین دندروزومی درصد سلول‌های دچار مرگ سلولی آپوپتوز اولیه و زودرس شده‌اند، $19/27 \pm 0/04$ به دست آمد و درصد بیشتری از سلول‌ها $(33/04 \pm 0/03)$ دچار مرگ سلولی آپوپتوز دیررس شده بودند که در مقایسه با سلول‌های تیمار نشده با دارو (کنترل) $(16/61 \pm 0/01)$ معنی‌دار بودند ($P < 0.05$).

جدول ۲: بررسی تاثیر کورکومین دندروزومی، کورکومین آزاد و دندروزوم بر تکثیر سلول‌های توموری MCF-7 سرطان پستان بعد از ۲۴ و ۴۸ ساعت تیمار با غلظت‌های مختلف برای هر ترکیب. داده‌ها به صورت انحراف معیار \pm میانگین بیان شده‌اند.

غلظت‌های استفاده شده در فرایند								
۴۰ μ M	۳۰ μ M	۲۵ μ M	۲۰ μ M	۱۵ μ M	۱۰ μ M	۰		
۰/۱۵۱ \pm ۰/۰۰۷	۰/۱۷۳ \pm ۰/۰۰۲	۰/۲۴۸ \pm ۰/۰۱۵	۰/۴۰۹ \pm ۰/۰۰۹	۰/۴۸۷ \pm ۰/۰۱۳	۰/۵۴۷ \pm ۰/۰۴۸	۰/۵۶۱ \pm ۰/۰۱۵	تیمار ۲۴ ساعت	کورکومین
۰/۱۵ \pm ۰/۰۱	۰/۳۸ \pm ۰/۰۳	۰/۴۴ \pm ۰/۰۸	۰/۴۲ \pm ۰/۰۵	۰/۶۶ \pm ۰/۰۴	۰/۶۷ \pm ۰/۱۴	۰/۸ \pm ۰	تیمار ۴۸ ساعته	دندروزومی
۰/۴۴۶ \pm ۰/۰۳۶	۰/۵۰۵ \pm ۰/۰۱۷	۰/۵۲۷ \pm ۰/۰۰۵	۰/۵۲۸ \pm ۰/۰۳۲	۰/۵۳۲ \pm ۰/۰۲۹	۰/۶۱۳ \pm ۰/۰۲۳	۰/۵۶۱ \pm ۰/۰۱۵	تیمار ۲۴ ساعت	کورکومین
۰/۶۴ \pm ۰/۱۹	۰/۷۸ \pm ۰/۰۸	۰/۸۴ \pm ۰/۰۵	۰/۸۴ \pm ۰/۰۳	۰/۸۶ \pm ۰/۰۷	۰/۸۲ \pm ۰/۱۶	۰/۸ \pm ۰	تیمار ۴۸ ساعته	کورکومین
۰/۴ \pm ۰/۰۰۲	۰/۴۸۴ \pm ۰/۰۶۸	۰/۵۲۶ \pm ۰/۰۷۲	۰/۵۴۲ \pm ۰/۱۵۷	۰/۵۷۷ \pm ۰/۲۰۸	۰/۵۲۹ \pm ۰/۱۴۶	۰/۵۶۱ \pm ۰/۰۱۵	تیمار ۲۴ ساعت	دندروزوم
۰/۵۵ \pm ۰	۰/۶ \pm ۰/۰۲	۰/۶۳ \pm ۰/۰۱	۰/۶۵ \pm ۰/۰۵	۰/۶۴ \pm ۰/۰۷	۰/۹۸ \pm ۰/۱۴	۰/۸ \pm ۰	تیمار ۴۸ ساعته	دندروزوم



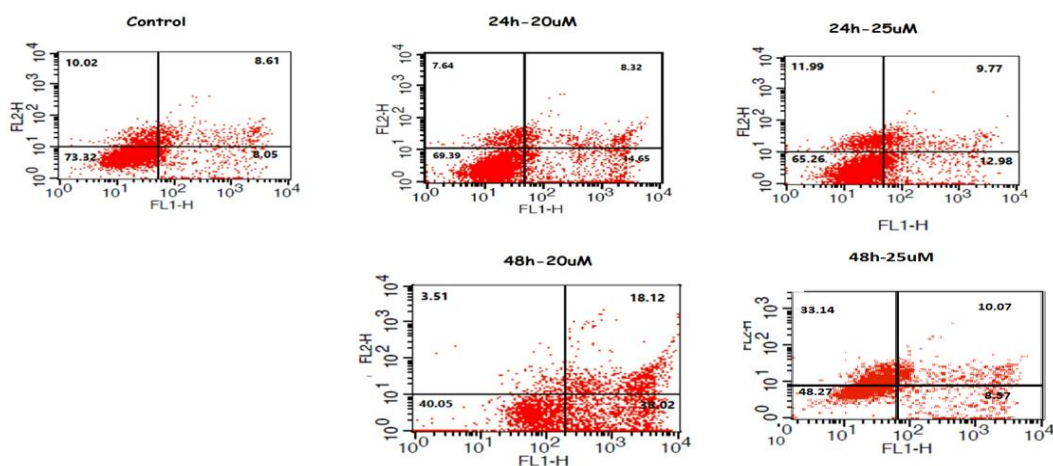
شکل ۱: بررسی تاثیر کورکومین دندروزومی، کورکومین آزاد و دندروزوم بر سلول‌های توموری MCF-7 سرطان پستان بعد از ۲۴ و ۴۸ ساعت تیمار با غلظت‌های مختلف برای هر ترکیب. محور عمودی نمودار بیانگر میزان جذب نمونه‌ها در طول موج ۵۷۰ nm و محور افقی نمودار بیانگر مقدار غلظت استفاده شده از دارو است. داده‌ها به صورت میانگین \pm انحراف معیار بیان شده‌اند. سطح معناداری بر اساس قیاس با داده‌های به دست آمده با سلول‌های بدون تیمار دارویی محاسبه شده است.



شکل ۲: تصویر میکروسکوپ نوری سلول‌های MCF-7 قبل (A) و بعد (B) از ۲۴ ساعت تیمار سلولی با غلظت ۲۰ میکرومولار کورکومین دندروزومی. شکل C، عکس‌برداری میکروسکوپ فلورسانس جهت بررسی ورود کورکومین دندروزومی به سلول‌های توموری MCF-7 پس از ۴ ساعت تیمار با دارو. عکس‌ها با بزرگنمایی ۴۰۰ گرفته شده است.

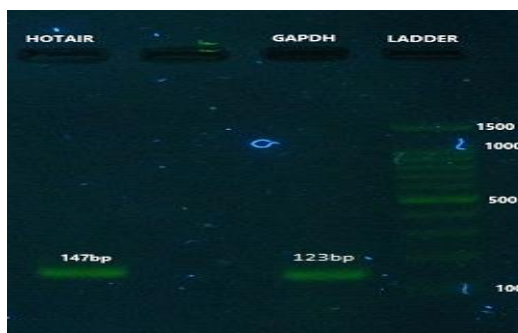
جدول ۳: نتایج حاصل از سنجش میزان آپوپتوز القا شده توسط نانوکورکومین دندروزومی پس از ۲۴ و ۴۸ ساعت تیمار با غلظت ۲۰ میکرومولار از دارو. داده‌های به صورت انحراف معیار \pm میانگین بیان شده‌اند.

	درصد سلول‌ها با آپوپتوز زودرس		
	کنترل	۲۰ μ M	۲۵ μ M
تیمار ۲۴ ساعت با کورکومین دندروزومی	۱۶/۶۱ \pm ۰/۰۱	۲۲/۹۷ \pm ۰/۰۳	۲۲/۷۵ \pm ۰/۰۱
تیمار ۴۸ ساعت با کورکومین دندروزومی	۱۶/۶۱ \pm ۰/۰۱	۵۶/۲۲ \pm ۰/۰۵	۱۹/۲۷ \pm ۰/۰۴



شکل ۳: بررسی مرگ سلولی آپوپتوز پس از تیمار ۲۴ و ۴۸ ساعت با غلظت‌های ۲۰ و ۲۵ میکرومولار از کورکومین دندروزومی.

نمودار افقی (FL1-H) آنالیز فلوسیتومتری بیانگر سلول‌های رنگ آمیزی شده با آنکسین V و نمودار عمودی (FL2-H) آنالیز فلوسیتومتری بیانگر سلول‌های رنگ آمیزی شده با PI می‌باشد.

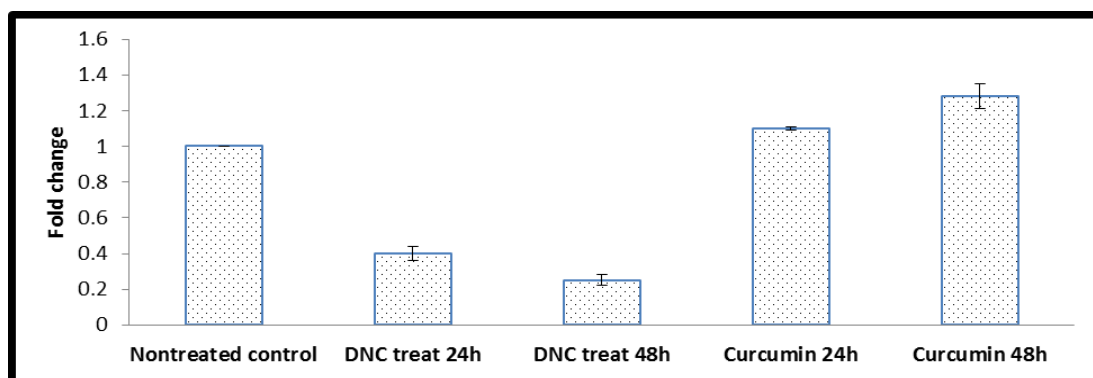


شکل ۴: نتایج حاصل از الکتروفورز محصولات حاصل از Real time-PCR دو ژن *HOTAIR* با طول ۱۴۷ باز و *GAPDH* با طول ۱۲۳ باز

معنی‌دار این ترانسکریپت همراه بود. میزان تغییر بیان ژن محاسبه شده در بازه زمانی ۲۴ ساعت 0.40 ± 0.04 به دست آمد ($P=0.006$). میزان تغییر بیان ژن محاسبه شده در بازه زمانی ۴۸ ساعت 0.30 ± 0.25 به دست آمد ($P=0.01$). همچنین مشاهده شد کورکومین در حالت آزاد و بدون فورمولاسیون دندروزومی قادر به مهار این ژن نیست. پس از تیمار با کورکومین در حالت آزاد، میزان تغییر بیان ژن محاسبه شده در بازه زمانی ۲۴ ساعت 0.10 ± 0.11 به دست آمد ($P=0.05$). میزان تغییر بیان ژن محاسبه شده در بازه زمانی ۴۸ ساعت 0.70 ± 0.28 به دست آمد ($P>0.05$). (شکل ۵).

نانوکورکومین دندروزومی موجب کاهش معنی‌دار بیان ژن *HOTAIR* می‌شود. داده‌های حاصل از Real-time نشان داد که ژن *HOTAIR* با اندازه ۱۴۷ جفت باز و کنترل داخلی *GAPDH* با طول ۱۲۳ جفت باز تکثیر شده‌اند. شکل ۴ نتایج حاصل از الکتروفورز محصولات حاصل از Real-time این دو ژن را نشان می‌دهد.

نتایج نشان داد که ژن *HOTAIR* در سلول‌های سرطانی MCF-7 بیان نسبتاً بالایی دارد. تیمار با دوز موثر مربوط به هر بازه زمانی (غلظت ۲۰ و ۲۵ میکرومولار دارو) نانوکورکومین دندروزومی در دو بازه زمانی ۲۴ و ۴۸ ساعت به ترتیب با مهار



شکل ۵: بررسی تاثیر کورکومین دندروزومی بر بیان ژن *HOTAIR* پس از ۲۴ و ۴۸ ساعت تیمار با غلظت ۲۰ میکرومولار دارو. نمودار عمودی نسبت بیان ژن هدف به ژن مرجع می‌باشد. نتایج به صورت انحراف معیار \pm میانگین بیان شده‌اند.

دندروزومها توانسته‌اند که کورکومین نامحلول را به درون سلول‌های توموری MCF-7 پستان وارد کنند. نتایج این بررسی نشان داد که نانوکورکومین دندروزومی وابسته به زمان و غلظت اثر مهاری کورکومین بر سلول‌های توموری پستان را افزایش می‌دهد و این درحالیست که دندروزومها هیچگونه تاثیر

بحث

مطالعه اخیر، ترکیب دارویی کورکومین که در سیستم‌های آبی نامحلول است در ساختارهای میسلی با عنوان دندروزوم فورموله و بارگیری شد و مشاهده شد که حلالیت این ترکیب افزایش یافت. بررسی میکروسکوپی فلورسانت نیز نشان داد که

کشندگی بر سلول‌های MCF-7 نشان ندادند و در غلظت‌های بالا نظیر ۴۰ میکرومولار و پس از تیماری ۴۸ ساعته تنها درصد کمی از سلول‌ها دچار مرگ شدند. اثر سمیت داروی نانوکورکومین دندروزومی در مطالعات پیشین گروه تحقیقاتی نویسنده به انجام رسیده است. در سال ۲۰۱۴، طهماسبی و همکاران نشان دادند که اگرچه کورکومین دندروزومی موجب کاهش رشد سلول‌های سرطانی بدخیم گلیوبلاستوما می‌شود، بر سلول‌های نرمال بنیادی و تمایز یافته فیبروبلاست اثر مهاری ندارد. هم‌چنین در غلظت موثر نانو دارو بر سلول‌های سرطانی، هیچ سمیتی مرتبط با حامل دندروزومی بر سلول‌های سرطانی، بنیادی نرمال و نرمال تمایز یافته مشاهده نشد (۳). پیشتر نیز سربلوی و همکاران، دندروزوم را ترکیبی امن و زیست تخریب پذیر معرفی کرده بودند (۷). در سال ۲۰۱۵، فرهنگی و همکاران در گروه تحقیقاتی نویسنده، نشان دادند که نانوکورکومین دندروزومی موجب کاهش ابعاد توموری در مدل‌های موشی متاستاتیک سرطان سینه شد و دندروزوم به تنهایی فاقد اثر سمیت گزارش شد (۱۸). هم‌چنین عزیزاده و همکاران در ۲۰۱۵ از گروه تحقیقاتی ما نشان دادند که نانوکورکومین دندروزومی تا غلظت ۳۱/۲۵ mg/kg ایمن می‌باشد و در غلظت‌های بالاتر درجات خفیفی از سمیت کبدی در نتایج پاراکلینیکی و هیستوپاتولوژیکی مشاهده شد (۱۹). هم‌چنین مطالعات بر پایه میکروسکوپ فلورسانت نشان داده است که جذب سلولی کورکومین در سلول‌های سرطانی بیشتر است و به عبارتی ورود ترجیحی به سلول‌های توموری دارد. به نظر می‌رسد که این تمایل ترجیحی به تفاوت محتوای غشائی سلول‌های نرمال و سرطانی مرتبط است (۲۰). القای مرگ آپوپتوز یکی از روش‌های پیشنهادی در درمان سرطان‌های انسانی است زیرا درمان را محدود به توده سرطانی و از توزیع اثرات سمی دارو به بافت‌های سالم مجاور جلوگیری می‌کند (۲۱). یافته‌های حاصل از این پژوهش نشان داد که مرگ سلولی القا شده در سلول‌های توموری مورد مطالعه به فرم آپوپتوزیس (و نه نکروز) می‌باشد که برخلاف مرگ‌های نکروتیک محدود به سلول‌هایی می‌شود که دارو را دریافت

کرده‌اند که می‌تواند این ترکیب را نسبت به داروهایی با پیامدهای نکروتیک ارجحیت بخشد. در مرگ، نکروز به علت تخریب کامل غشای سلول و آزاد شدن محتوای آنزیمی سلول، سلول‌های مجاور نیز آسیب و التهاب و بافت مردگی ایجاد می‌شود (۲۲). نقش کورکومین در القای مرگ آپوپتوزی به کرات در مطالعات پیشین تأثیر این ترکیب گیاهی بر سلول‌های سرطانی تأیید شده است (۲۳، ۲۴). در مطالعه نور ایسنیدا و همکارانش نیز در سال ۲۰۱۹ نشان داده شده است که کورکومین توانایی القای آپوپتوز در سلول‌های سرطان کولورکتال را دارد و شواهدی نشان می‌دهد آپوپتوز امکان دارد توسط مسیری مستقل از میتوکندری و ناشی از استرس شبکه آندوپلاسمی (ER) باشد القا شود (۲۵). هم‌چنین در مطالعه انتونی گیوردانو و همکارش که در سال ۲۰۱۹ منتشر شد بیان شد که در تکثیر سلول‌های سرطان سینه، NF-kB فاکتور رونویسی پیش التهابی نقش کلیدی ایفا می‌کند. NF-kB بیش از ۵۰۰ ژن مختلف را تنظیم می‌کند و بیان پروتئین‌های دخیل در مسیرهای پیام رسانی سلولی را کنترل می‌کند و در نتیجه باعث ایجاد سرطان و التهاب می‌شود. ترکیباتی که قادر به تعامل با NF-kB هستند، می‌توانند مورد نظر محققان قرار گیرند و جهت مبارزه با سرطان استفاده شوند. کورکومین با کاهش ژن‌های القاکننده NF-kB، توانایی کاهش و تأثیرگذاری بر تکثیر و تهاجم سلول‌های سرطان سینه را نشان داد (۲۸-۲۶). در مطالعه اخیر ژن غیرکدکننده HOTAIR به عنوان هدف مولکولی کورکومین دندروزومی در نظر گرفته شد. این ژن ترانسکریپتی طویل ایجاد می‌کند که در طیف وسیعی از فرآیندهای حیاتی سلول نظیر تنظیم تکثیر، رشد، مرگ سلولی و تمایز دخالت دارد (۲۹). مطالعات پیشین نشان می‌دهد که بیان ژن مذکور در سلول‌های توموری پستان افزایش یافته است و لذا آن را به عنوان یک هدف درمانی معرفی کردند (۳۰). یافته‌های به دست آمده نشان داد که کورکومین دندروزومی موجب مهار ژن HOTAIR می‌شود و این درحالیست که کورکومین به تنهایی قادر به مهار این ژن نبود که با توجه به عدم حلالیت آن در سیستم‌های آبی جهت ورود به سلول، دور

مطالعه در سطح مدل سلولی توموری است و برای تعمیم نتایج استفاده از مدل‌های موشی آزمایشگاهی بسیار سودمند است.

نتیجه‌گیری

در مجموع، مطالعه اخیر نشان می‌دهد که بارگیری کوروکومین در نانو حامل‌های غیرسمی نظیر دندروزوم‌ها می‌تواند حلالیت، رسانش و توزیع بافتی چنین ترکیبات دارویی ارزشمندی را افزایش و در نهایت موجب شود که بتوانیم از قدرت درمانی این ترکیبات در حوزه داروسازی و پزشکی بهره جست.

سپاس‌گزاری

این مقاله برگرفته از نتایج یک طرح پژوهشی مصوب در کمیته تحقیقات دانشجویی دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز است. نویسندگان این مقاله به طور ویژه از جناب آقای پروفیسور مجید صادقی‌زاده، عضو هیئت علمی گروه ژنتیک دانشگاه تربیت مدرس تهران جهت اهداء سخاوتمندانه نانوحامل‌های دندروزوم کمال تشکر و قدردانی را می‌نمایند. هم‌چنین از زحمات تمامی همکاران در معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور، کمیته تحقیقات دانشجویی و مرکز تحقیقات سلولی مولکولی که گروه تحقیقاتی ما را در به ثمر رساندن این تحقیق یاری رساندند تشکر و قدردانی می‌نمایند.

حامی مالی: کمیته تحقیقات دانشجویی دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز
تعارض در منافع: وجود ندارد.

از انتظار نبود. پیشتر نیز به نقش مهاری فورمولاسیون دندروزومی کوروکومین بر بیان RNAهای طویل غیرکدکننده نظیر GAS5 در سلول‌های توموری سینه اشاره شده است (۳۱). مطالعات پیشین نشان داده است که خاموش‌سازی ژن *HOTAIR* با القای مرگ آپوپتوز در سلول‌های سرطانی پستان (۳۲،۳۳)، ریه (۳۴)، استئوسارکوما (۳۵) و خون (۳۶) می‌شود. در سال ۲۰۲۱، دشت بزرگ و همکاران نشان دادند که خاموش‌سازی ژن *HOTAIR* موجب کاهش بیان ژن *Bcl2* و افزایش بیان ژن *Bax* در سلول‌های سرطانی کولورکتال می‌گردد (۳۷). در سال ۲۰۲۲، آل محمد و همکاران نیز نشان دادند که خاموش‌سازی ژن *HOTAIR* موجب مهار مسیر EMT بواسطه کاهش بیان دو ژن فیبرونکتین-۱ و کودلین-۴ در سلول‌های سرطان معده می‌گردد (۳۸). در سال ۲۰۲۱، باباپور و همکاران نیز نتایج مشابهی در زمینه نقش مهار *HOTAIR* در توقف مسیر EMT در سلول‌های سرطانی معده به‌دست آوردند لذا این احتمال وجود دارد که القای آپوپتوز در رده سلولی توموری مورد مطالعه نیز به‌واسطه کاهش بیان ژن *HOTAIR* توسط کوروکومین دندروزومی باشد (۳۹). با این‌حال این سوالی است که در مطالعات بعدی باید به آن پاسخ داده شود. در پایان اشاره به این نکته حائز اهمیت است که اگرچه نتایج بسیار ارزشمندی در ارتباط با داروی نانوکوروکومین دندروزومی در این تحقیق به‌دست آمده است با این حال تحقیق حاضر دارای محدودیت‌هایی نیز می‌باشد که مهم‌ترین آن‌ها انجام این

References:

- 1- Moo TA, Sanford R, Dang C, Morrow M. *Overview of Breast Cancer Therapy*. PET Clin 2018; 13(3): 339-54.
- 2- Parle M, Bansal N. *Herbal Medicines: Are They Safe?* Natural Product Radiance 2006; 5: 6-14.
- 3- Tahmasebi Mirgani M, Isacchi B, Sadeghizadeh M, Marra F, Bilia AR, Mowla SJ, et al. *Dendrosomal Curcumin Nanoformulation Downregulates Pluripotency Genes via miR-145 Activation in U87MG Glioblastoma Cells*. Int J Nanomedicine 2014; 9: 403-17.
- 4- Burgos- Morón E, Calderón- Montaña JM, Salvador J, Robles A, López- Lázaro M. *The Dark Side of Curcumin*. Int J Cancer 2010;126(7): 1771-5.
- 5- Anand P, Kunnumakkara AB, Newman RA, Aggarwal BB. *Bioavailability of Curcumin: Problems and Promises*. Mol Pharm 2007; 4(6): 807-18.
- 6- Prasad S, Tyagi AK, Aggarwal BB. *Recent Developments in Delivery, Bioavailability, Absorption and Metabolism of Curcumin: The Golden Pigment from Golden Spice*. Cancer Res Treat 2014; 46(1): 2-18.
- 7- Sarbolouki MN, Sadeghizadeh M, Yaghoobi MM, Karami A, Lohrasbi T. *Dendrosomes: A Novel Family of Vehicles for Transfection and Therapy*. J Chem Technol Biotechnol 2000; 75: 919-22.
- 8- Tahmasebi Birgani M, Erfani-Moghadam V, Babaei E, Najafi F, Zamani M, Shariati M, et al. *Dendrosomal Nano-Curcumin; The Novel Formulation to Improve the Anticancer Properties of Curcumin*. Progress in Biological Sciences 2015; 5(2): 143-58.
- 9- Migliore C, Giordano S. *Molecular Cancer Therapy: Can Our Expectation be MET?*. Eur J Cancer 2008; 44(5): 641-51.
- 10- Moran VA, Perera RJ, Khalil AM. *Emerging Functional and Mechanistic Paradigms of Mammalian Long Non-Coding Rnas*. Nucleic Acids Res 2012; 40(14): 6391-400.
- 11- Hajjari M, Salavaty A. *HOTAIR: An Oncogenic Long Non-Coding RNA in Different Cancers*. Cancer Biol Med 2015; 12(1): 1-9.
- 12- Xu ZY, Yu QM, Du YA, Yang LT, Dong RZ, Huang L, et al. *Knockdown of Long Non-Coding RNA HOTAIR Suppresses Tumor Invasion and Reverses Epithelial-Mesenchymal Transition in Gastric Cancer*. Int J Biol Sci 2013; 9(6): 587-97.
- 13- Sørensen KP, Thomassen M, Tan Q, Bak M, Cold S, Burton M, et al. *Long Non-Coding RNA HOTAIR is an Independent Prognostic Marker of Metastasis in Estrogen Receptor-Positive Primary Breast Cancer*. Breast Cancer Res Treat 2013; 142(3): 529-36.
- 14- Kumar P, Nagarajan A, Uchil PD. *Analysis of Cell Viability by the MTT Assay*. Cold Spring Harb Protoc 2018; 2018(6).
- 15- *Measuring Cell Proliferation and Survival by MTT Method*. 2018. Available at: <http://padginteb.com/maghaalaat/59/mtt%D8%>

- B3%D9%86%D8%AC%D8%B4%D9%90-%D8%AA%DA%A9%D8%AB%DB%8C%D8%B1-%D9%88-%D8%A8%D9%82%D8%A7%DB%8C-%D8%B3%D9%84%D9%88%D9%84%DB%8C-%D8%A8%D9%87-%D8%B1%D9%88%D8%B4.html .Accessed December 10, 2022.
- 16-Annexin FITC-V Apoptosis Kit. 2020. Available at: <https://atmed.com/product/fitc-v-anoxin-apoptosis-kit/>. Accessed December 10, 2022.
- 17-National Center for Biotechnology Information. 2020. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>. Accessed December 10, 2022.
- 18- Farhangi B, Alizadeh AM, Khodayari H, Khodayari S, Dehghan MJ, Khori V, et al. *Protective Effects of Dendrosomal Curcumin on an Animal Metastatic Breast Tumor*. Eur j pharmacol 2015; 758: 188-96.
- 19-Alizadeh AM, Sadeghizadeh M, Najafi F, Ardestani SK, Erfani-Moghadam V, Khaniki M, et al. *Encapsulation of Curcumin in Diblock Copolymer Micelles for Cancer Therapy*. Biomed Res Int 2015; 2015: 824746.
- 20-Kunwar A, Barik A, Mishra B, Rathinasamy K, Pandey R, Priyadarsini Kl. *Quantitative Cellular Uptake, Localization and Cytotoxicity of Curcumin in Normal and Tumor Cells*. Biochim Biophys Acta 2008; 1780(4): 673-9.
- 21-Fisher DE. *Apoptosis in Cancer Therapy: Crossing the Threshold*. Cell 1994; 78(4): 539-42.
- 22-Zong WX, Thompson CB. *Necrotic Death as a Cell Fate*. Genes Dev 2006; 20(1):1-15.
- 23- Khan AQ, Ahmed EI, Elareer N, Fathima H, Prabhu KS, Siveen KS, et al. *Curcumin-Mediated Apoptotic Cell Death in Papillary Thyroid Cancer and Cancer Stem-Like Cells through Targeting of The JAK/STAT3 Signaling Pathway*. Int J Mol Sci 2020; 21(2): 438.
- 24-Endo H, Inoue I, Masunaka K, Tanaka M, Yano M. *Curcumin Induces Apoptosis in Lung Cancer Cells by 14-3-3 Protein-Mediated Activation of Bad*. Biosci Biotechnol Biochem 2020; 84(12): 2440-7.
- 25- Ismail NI, Othman I, Abas F, H Lajis N, Naidu R. *Mechanism of Apoptosis Induced by Curcumin in Colorectal Cancer*. Int J Mol Sci 2019; 20(10): 2454.
- 26-Giordano A, Tommonaro G. *Curcumin and Cancer*. Nutrients 2019; 11(10): 2376.
- 27-Liu Q, Loo WT, Sze S, Tong Y. *Curcumin Inhibits Cell Proliferation of MDA-MB-231 and BT-483 Breast Cancer Cells Mediated by Down-Regulation of Nfkb, Cyclind and MMP-1 Transcription*. Phytomedicine 2009; 16(10): 916-22.
- 28-Kim JM, Noh EM, Kwon KB, Kim JS, You YO, Hwang JK, et al. *Curcumin Suppresses the TPA-Induced Invasion through Inhibition of Pkca-Dependent MMP-Expression in MCF-7 Human Breast Cancer Cells*. Phytomedicine 2012; 19(12): 1085-92.
- 29- Yuan C, Ning Y, Pan Y. *Emerging Roles of HOTAIR in Human Cancer*. J Cell Biochem 2020; 121(5-6): 3235-47.

- 30-Cantile M, Di Bonito M, Cerrone M, Collina F, De Laurentiis M, Botti G. **Long Non-Coding RNA HOTAIR in Breast Cancer Therapy**. *Cancers* (Basel) 2020; 12(5): 1197.
- 31-Esmatabadi MJD, Motamedrad M, Sadeghizadeh M. **Down-Regulation of LncRNA, GAS5 Decreases Chemotherapeutic Effect of Dendrosomal Curcumin (DNC) in Breast Cancer Cells**. *Phytomedicine* 2018; 42: 56-65.
- 32-Chen T, Liu Z, Zeng W, Huang T. **Down-Regulation of Long Non-Coding RNA HOTAIR Sensitizes Breast Cancer to Trastuzumab**. *Sci Rep* 2019;9:19881.
- 33-Li Z, Qian J, Li J, Zhu C. **Knockdown of LncRNA - HOTAIR Downregulates the Drug -Resistance of Breast Cancer Cells to Doxorubicin via the PI3K/AKT/mTOR Signaling Pathway**. *Exp Ther Med* 2019; 18(1): 435-42.
- 34-Yang Y, Jiang C, Yang Y, Guo L, Huang J, Liu X, et al. **Silencing of LncRNA-HOTAIR Decreases Drug Resistance of Non-Small Cell Lung Cancer Cells by Inactivating Autophagy via Suppressing the Phosphorylation of ULK1**. *Biochem Biophys Res Commun* 2018; 497(4): 1003-10.
- 35-Zheng H, Min J. **Role of Long Noncoding RNA HOTAIR in the Growth and Apoptosis of Osteosarcoma Cell MG-63**. *Biomed Res Int* 2016; 2016: 5757641.
- 36-Wang SL, Huang Y, Su R, Yu YY. **Silencing Long Non-Coding RNA HOTAIR Exerts Anti-Oncogenic Effect on Human Acute Myeloid Leukemia via Demethylation of HOXA5 by Inhibiting Dnmt3b**. *Cancer Cell Int* 2019; 19: 114.
- 37-Dashtbozorgi R, Tahmasebi-Birgani M, Hajjari MR, Emami Razavi A. **Silencing of HOTAIR Induced Apoptosis in Human Colorectal Cancer Cells through Up-Regulation of Bax and Down-Regulation of Bcl2**. *Jentashapir J Cell Mol Biol* 2021; 12(4): e116108.
- 38-Alemohammad S, Tahmasebi Birgani M, Fahimi H, Hajjari MR. **Silencing the Long Non-Coding RNA HOTAIR Inhibits Epithelial-Mesenchymal Transition in MKN45 Gastric Cancer Cell Line by Downregulation of Fibronectin-1 and Claudin-4**. *Jentashapir J Cell Mole Biol* 2022;13(4): e131286.
- 39-Babapour P, Tahmasebi-Birgani M, Hashemi M, Hajjari MR. **Silencing of Long Non-Coding RNA HOTAIR Suppresses Reverses Epithelial-Mesenchymal Transition in AGS Gastric Cancer Cell Line by Downregulation of Fibronectin 1 And Claudin-4**. *Jentashapir J Cell Mol Biol* 2021;12(3): e116396.

Evaluate the Effect of Dendrosomal Curcumin on Expression Level of *HOTAIR* Long Noncoding RNA in MCF-7 Breast Cancer Cell Line

Maryam Mehrabi¹, Sara Alemohammad², Reza Dashtbozorgi³, Maryam Tahmasebi Birgani^{*4},
Mohammad Reza Hajjari⁵, Javad Mohammadi-Asl⁴

Original Article

Introduction: Breast cancer is one of the most common malignancies in women. Treatment with herbal drugs has been considered by researchers due to the lower side effects. Curcumin is a polyphenol extracted from turmeric with confirmed anti-cancer properties. Curcumin is water-insoluble with rapid metabolism. Drug delivery using nano-carriers is suggested to overcome such limitations. The aim of this study was based on evaluating the effect of Dendrosomes curcumin on expression level of *HOTAIR* long noncoding RNA in MCF-7 breast cancer cell line.

Methods: This study was an applied basic research. Firstly, curcumin was loaded in dendrosomes and the entry of dendrosomal curcumin into cells was studied using fluorescent microscopy. Cell death was investigated using MTT assay and apoptosis detection kit. The expression of *HOTAIR* gene was measured using real-time PCR. Increased expression of this gene was reported in a wide range of tumors. The data were analyzed using GraphPad Prism V9.5 statistical software, using NOVA one-way statistical analysis and Student t-test; the results were reported as mean \pm standard deviation.

Results: Dendrosomes increased the solubility of curcumin. The effective inhibitory doses of dendrosomal curcumin after 24 and 48h treatment were 25 and 20 micromolar, respectively. The percent of cells undergoing early apoptosis were 22.97 ± 0.03 and 56.22 ± 0.05 , respectively, which was statistically significant in comparison with non-treated control cells. Following 24 and 48h treatment with 20 micromolar of dendrosomal curcumin, the *HOTAIR* gene expression was significantly decreased ($P=0.001$).

Conclusion: These findings suggest that dendrosomal curcumin may promote breast tumor cells toward programmed cell death by reducing *HOTAIR* gene expression.

Keywords: Curcumin, Dendrosome, Breast cancer, Long noncoding RNA, *HOTAIR*

Citation: Mehrabi M, Alemohammad S, Dashtbozorgi R, Tahmasebi Birgani M, Hajjari M.R, Mohammadi-Asl J. Evaluate the Effect of Dendrosomal Curcumin on Expression Level of *HOTAIR* Long Noncoding RNA in MCF-7 Breast Cancer Cell Line J Shahid Sadoughi Uni Med Sci 2023; 31(6): 6718-31.

¹Student Research Committee, Ahvaz Jundishapur University of Medical Sciences, Ahvaz, Iran.

²Department of Genetics, Faculty of Advanced Science and Technology, Tehran Medical Sciences, Islamic Azad University, Tehran, Iran.

³Department of Genetics, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.

⁴Department of Genetics, School of Medicine, Ahvaz Jundishapur University of Medical Sciences, Ahvaz, Iran.

⁵Department of Biology, Faculty of Sciences, Shahid Chamran University of Ahva, Ahvaz, Iran.

*Corresponding author: Tel: 09166149985, email: hadidarvishi87@gmail.com