

اثر کورکومین و سورافنیب بر بیان ژن AKT در رده‌های سلولی KG1 و U937

راضیه پازهر^۱، مهناز محمدی کیان^۲، الهه علی عسگری^۳، سعید محمدی^۴، شهربانو رستمی^۵، بهرام چهاردولی^۶،
داوود باباخانی^۷، محسن نیکبخت^۷

چکیده

سابقه و هدف

کورکومین، ماده‌ای است که اثرات ضد سرطانی آن در بسیاری از سرطان‌ها اثبات شده است. سورافنیب به عنوان مهارکننده رگرایی مانع افزایش حیات در سلول‌ها می‌شود. یکی از مسیرهای مؤثر و کلیدی در بقای سلول‌های سرطانی، فعالیت ژن AKT است. هدف این مطالعه، بررسی اثر ترکیبی کورکومین و سورافنیب بر بیان ژن AKT بود.

مواد و روش‌ها

در مطالعه تجربی حاضر، از آزمایش MTT جهت بررسی تکثیر دو رده سلولی U937 و KG-1 با کورکومین و سورافنیب به صورت تک و ترکیبی در دوزها و بازه‌های زمانی مختلف استفاده گردید. میزان آپوپتوز با آزمایش فلوسایتومتری ارزیابی شد. در نهایت میزان بیان ژن AKT توسط Real Time PCR سنجیده شد. از آزمون آماری Mann-Whitney U test و Graphpad Prism5 برای تجزیه و تحلیل اطلاعات استفاده شد.

یافته‌ها

IC50 برای داروی سورافنیب در رده سلولی KG-1 برابر با ۷ μM و در رده سلولی U937، ۵ μM و برای کورکومین در هر دو رده ۴۰ μM در بازه زمانی ۲۴ ساعته به دست آمد. ترکیب داروها اثرکندگی بیشتری در هر دو رده سلولی نشان داد. بیان ژن AKT به دنبال تیمار با ترکیب کورکومین و سورافنیب در رده KG1 به مقدار ۳۰٪ و در رده U937 به میزان ۵۰٪ کاهش معناداری داشت (p < ۰/۰۰۱ ***).

نتیجه‌گیری

این مطالعه نشان داد که ترکیب دو داروی مذکور، منجر به افزایش آپوپتوز و همچنین کاهش تکثیر سلولی در رده‌های سلولی KG-1 و U937 شده است و این کاهش تکثیر ممکن است با کاهش بیان AKT در ارتباط باشد. برای تایید این نتایج، بررسی بیشتر در سطح پروتئین لازم است.

کلمات کلیدی: لوسمی میلوئیدی حاد، کورکومین، سورافنیب

تاریخ دریافت: ۹۸/۵/۲۲

تاریخ پذیرش: ۹۸/۱۰/۱۱

- ۱- کارشناس ارشد ژنتیک - مرکز تحقیقات هماتولوژی، انکولوژی و پیوند سلول‌های بنیادی دانشگاه علوم پزشکی تهران - تهران - ایران
- ۲- کارشناس ارشد ژنتیک پزشکی - مرکز تحقیقات هماتولوژی، انکولوژی و پیوند سلول‌های بنیادی دانشگاه علوم پزشکی تهران - تهران - ایران
- ۳- دکترای تخصصی زیست‌شناسی - استادیار دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شرق - تهران - ایران
- ۴- دکترای تخصصی هماتولوژی - استادیار مرکز تحقیقات هماتولوژی، انکولوژی و پیوند سلول‌های بنیادی دانشگاه علوم پزشکی تهران - تهران - ایران
- ۵- دکترای تخصصی هماتولوژی - دانشیار مرکز تحقیقات هماتولوژی، انکولوژی و پیوند سلول‌های بنیادی دانشگاه علوم پزشکی تهران - تهران - ایران
- ۶- فوق تخصص خون و انکولوژی - استادیار مرکز تحقیقات هماتولوژی، انکولوژی و پیوند سلول‌های بنیادی دانشگاه علوم پزشکی تهران - تهران - ایران
- ۷- مؤلف مسئول: دکترای تخصصی بیوتکنولوژی پزشکی - دانشیار مرکز تحقیقات هماتولوژی، انکولوژی و پیوند سلول‌های بنیادی دانشگاه علوم پزشکی تهران - تهران - خیابان کارگر شمالی - بیمارستان شریعتی - ایران - کدپستی: ۱۴۱۱۷۱۳۱۳۱

مقدمه

AML (لوسمی میلوئیدی حاد)، یک اختلال کلونال بدخیم سلول‌های نابالغ در سیستم خونساز است. این لوسمی در سلول‌های تمایز نیافته که فاقد عملکرد طبیعی هستند رخ می‌دهد (۱). این بیماری، دومین سرطان خون شایع با میزان ۱۸/۵٪ و سومین سرطان خون کشنده در ایران به شمار می‌آید (۲). علی‌رغم شیمی درمانی با دوز بالا، عود پس از درمان رایج، شایع است. مطالعه‌های اخیر نشان می‌دهد که جمعیت مبتلا به لوسمی بسیار ناهمگون است و بیماری به دنبال افزایش زیر جمعیتی از سلول‌های لوکمیک به نام Leukemic Stem Cell (LSC) روی می‌دهد (۳). در این راستا طراحی درمان‌های هدفمند علیه مسیرهای اختصاصی حفظ و بقای LSC، می‌توانند مفید واقع شوند (۴، ۵). از جمله مسیرها و مکانیسم‌هایی که به بقای LSC ها کمک می‌کنند می‌توان به فعالیت یا مهار پروتئین‌های مرتبط با مسیر فسفواپتوزایتید-۳ کیناز (PI3K) مانند AKT اشاره کرد (۶، ۷). مسیر سیگنالی PI3K/AKT، کلید تنظیمی بقا در طی استرس سلولی است (۸).

فعالسازی مسیر AKT منجر به افزایش رشد و بقای سلولی در سلول‌های سالم و بدخیم و در نهایت منجر به تکثیر در سلول‌های سرطانی، آنژیوژنز و مقاومت به درمان و آپوپتوز می‌شود. بنابراین، این مسیر پیچیده به عنوان یکی از جذاب‌ترین اهداف برای توسعه عوامل دارویی مورد توجه قرار گرفته است (۹، ۱۰). سورافنیب از جمله داروهای جدیدی است که اخیراً وارد بازار دارویی جهان شده است. این ترکیب به دلیل داشتن مکانیسم عمل چند آنزیمی، پیشرفت‌های بسیاری را در درمان سرطان به همراه داشته است. سورافنیب به عنوان یک داروی هدفمند عمل می‌کند به طوری که از مهم‌ترین مهارکننده‌های اصلی تیروزین کینازی ضد رگ‌زایی است که گرایش بالایی به اتصال به کینازهای رگ‌زایی داشته و اخیراً برای درمان بیماران مبتلا به سرطان‌های پیشرفته استفاده می‌شود. این دارو از طریق القای آپوپتوز در سلول‌های سرطانی و پیشگیری از آنژیوژنز عمل می‌کند (۱۱). اخیراً در این بیماری، سورافنیب بازدارنده مولتی کیناز موضعی،

قادر به القای بهبود قابل توجهی در افزایش طول عمر و بقای بیماران است (۱۲). برای کاهش دوز داروی سورافنیب و به منظور دستیابی به ارتقای اثرات شیمی درمانی، باید روش‌های درمانی جدید با به کارگیری ترکیبی داروها با روند تاثیرگذاری مشابه مثل ممانعت از تکثیر سلول‌های سرطانی و یا القای مرگ در آن‌ها، طراحی شود تا هم باعث افزایش روند بهبودی و هم باعث کاهش اثرات مضر شیمی درمانی گردند (۱۳، ۱۴).

کورکومین یک ماده طبیعی است که در گیاه Curcuma longa که عضوی از خانواده زنجبیل است وجود داشته و به طور شایع تحت عنوان زردچوبه شناخته می‌شود. با توجه به این که عوارض جانبی و سمی خاصی از این فرآورده طبیعی گزارش نشده است، مصرف این فرآورده به عنوان یک عامل ترکیبی مشهور و مکمل دارویی در رژیم‌های درمانی در بیماران سرطانی مورد توجه است.

این فرآورده که با مکانیسم‌های ناشناخته موجب سرکوب تکثیر سلولی و القای آپوپتوز در طیف وسیعی از سلول‌های تومورال می‌شود، فعالیت ضد سرطانی و دارویی خود را تا حد زیادی با مهار مسیرهای سیگنال‌رسانی دفاعی NF- κ B، PPAR- γ ، Cyclin-D1 و PI3/AKT انجام می‌دهد. البته مسیرهای دیگری هم در این روند دخالت دارند (۱۵). دو رده سلولی KG-1 و U937 به عنوان دو مدل مقاوم و حساس به درمان در مطالعه‌های تحقیقاتی به عنوان مدل LSCs (Leukemia Stem Cell) مشتق شده از AML استفاده شدند (۱۶).

هدف از مطالعه حاضر، بررسی اثر ترکیبی سورافنیب و کورکومین به عنوان یک استراتژی جدید با خواص ضد سرطانی منحصر به فرد در بیان ژن AKT و القای آپوپتوز در محیط آزمایشگاهی بر روی رده‌های سلولی سرطانی KG-1 و U937 در بیماران مبتلا به AML نسبت به داروهای شیمی درمانی متداول و ناکارآمد می‌باشد.

مواد و روش‌ها

کشت سلولی:

در مطالعه تجربی حاضر، رده‌های سلولی انسانی U937 و KG-1 (لوسمی میلوئیدی حاد) از بانک سلولی

به رنگ تریپان بلو دارند، بی‌رنگ و سلول‌های مرده که هیچ انتخابی برای ورود رنگ ندارند و رنگ وارد سیتوپلاسم آن‌ها می‌شود به رنگ آبی مایل به بنفش دیده می‌شوند. برای شمارش سلول‌های زنده، میزان ۱۵-۱۰ μL سلول را با مقدار مشابه تریپان بلو حل کرده و ۱۰ μL از این محلول برداشته شده و زیر لامل ریخته می‌شود.

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

آزمایش ارزیابی آپوپتوز با روش فلوسیتومتری با رنگ‌آمیزی دوگانه Annexin/PI:

به منظور ارزیابی اثر القایی داروها به تنهایی یا در ترکیب با هم بر فعالیت کشندگی و مشخص شدن این که این اثر با واسطه آپوپتوز و یا با واسطه نکروز سلولی است، رنگ‌آمیزی Annexin/PI (ژوش، آلمان) انجام شد و درصد سلول‌های آپوپتوتیک تعیین گردید. بعد از گذشت ۲۴ و ۴۸ ساعت پس از تیمار نمودن رده‌های سلولی KG-1 و U937 توسط کورکومین و نیز ترکیب کورکومین با سورافنیب در پلیت‌های ۲۴ خانه کشت داده شده، ابتدا سلول‌هایی که با دارو تیمار شده بودند جمع‌آوری شده و با دور ۶۰۰ g به مدت ۵ دقیقه در دمای اتاق سانتریفوژ شدند. سپس سلول‌ها یک بار توسط PBS 1X شسته شدند. به هر کدام از لوله‌هایی که از قبل، ۱ μL از رنگ Annexin با غلظت استوک ۰/۵ mg/mL و ۱ μL از PI با غلظت استوک ۰/۱ mg/mL ریخته شده بود، ۱۰۰ μL از Binding buffer 1X اضافه و لوله‌ها به آرامی مخلوط شدند. سپس لوله‌ها به مدت ۱۵-۱۰ دقیقه دور از تابش نور خورشید و در دمای اتاق گذاشته و سپس جهت تجزیه و تحلیل و بررسی به دستگاه فلوسیتومتری داده شدند. نتایج فلوسیتومتری توسط نرم‌افزار FlowJO با ورژن (7.6.1) مورد بررسی و تجزیه و تحلیل قرار گرفتند.

استخراج RNA، ساخت cDNA و ارزیابی میزان تغییرات بیان ژن با روش کمی Real-Time PCR:
RNA سلول با استفاده از محلول TriPure (ژوش، آلمان) طبق دستورالعمل کیت استخراج شد. غلظت RNA

ایران (انستیتو پاستور) تهیه شدند. این رده‌های سلولی در محیط RPMI-1640 همراه با ۱۰٪ و ۲۰٪ سرم گاوی (FBS) غیر فعال شده با گرما به ترتیب برای رده سلولی U937 و KG-1 همراه با ۱۰۰ U/mL پنی‌سیلین و ۱۰۰ $\mu\text{g/mL}$ استرپتومایسین نگهداری شد. تمام سلول‌ها در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و فشار ۵٪ CO_2 کشت داده شدند.

اندازه‌گیری تکثیر سلولی با آزمون MTT (4,5-) 3-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide:

برای بررسی اثر مهارى سورافنیب (سانتاکروز، آمریکا) و کورکومین (سیگما، آمریکا) بر روی فعالیت متابولیکی سلول‌های KG-1 و U937 به روش MTT در ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت، از پودر MTT (مشق شده از نمک تiazول) (سیگما، آمریکا) و محلول DMSO (دی متیل سولفواکساید) استفاده و جذب نوری با دستگاه الایزا ریدر در طول موج ۵۷۸ nm خوانده شد. سلول‌هایی که در فاز لگاریتمی رشد بودند، در پلیت‌های ۹۶ خانه به مقدار ۵۰۰۰ سلول در ۱۰۰ μL /well کشت داده شدند. بعد از انکوباسیون و ریختن سلول‌ها در هر خانه، ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت در محیط کشت سرم‌دار ساخته شده و انکوبه شده تا سلول‌ها به کف هر خانه متصل شوند، سپس سلول‌ها با غلظت‌های سورافنیب (۱۲-۲ μmol) و کورکومین (۱۰۰-۰ μM) به مدت ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت تیمار شدند. محلول MTT (۵ mg/mL) به مقدار ۱۰ میکرولیتر به سلول‌ها اضافه شد و سلول‌ها به مدت چهار ساعت در ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند تا این محلول را متابولیزه کنند. رسوب فرمازان تشکیل شده با ۱۰۰ میکرولیتر DMSO حل شده و محلول بنفش رنگی ایجاد و جذب پلیت در طول موج ۵۷۰ نانومتر خوانده شد.

آزمایش تعیین درصد سلول‌های زنده با روش تریپان بلو:
در این روش، برای شمارش سلولی از لام نئوبار و رنگ تریپان بلو استفاده شد. اساس رنگ‌آمیزی به این صورت است که سلول‌های زنده که غشای ناتراوا نسبت

جدول ۱: توالی آغازگرهای به کار گرفته شده در روش Real-Time quantitative PCR

ژن	Accession number	آغازگر رفت (5'-3')	آغازگر معکوس (3'-5')	سایز (bp)	منابع
HPRT	۰۰۰۱۹۴	AATTACTTTTATGTCCCCTGTTGACTGG	GCTATAAATTCCTTTGCTGACCTGCTG	۱۴۰	(۱۷)
AKT	۰۰۱۰۱۴۳۱	CTTAATGTGCCCGTCCTTGT	TCTATGGCGCTGAGATTGTG	۱۱۳	(۱۸)

test و Graphpad Prism 5 استفاده شد. تفاوت آماری معناداری در مقایسه با گروه کنترل به صورت $P < ۰/۰۵$ ، $P < ۰/۰۰۱$ و $P < ۰/۰۰۱$ ارزیابی گردید (نمودارهای ۱ و ۲).

یافته‌ها

بررسی تکثیر سلولی با استفاده از آزمون MTT:

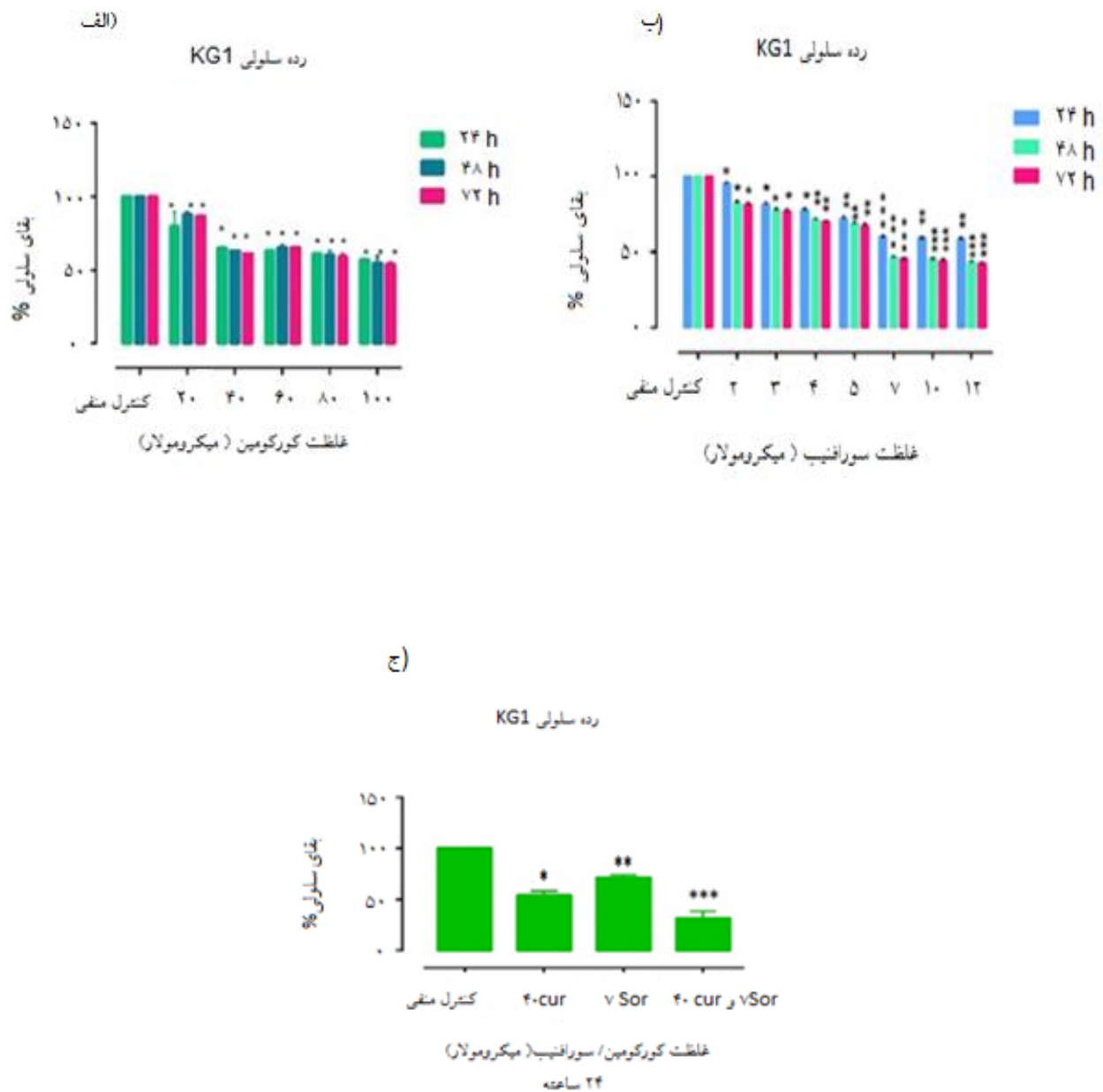
مهار تکثیر سلولی در رده‌های KG-1 و U937 با غلظت‌های مختلف (۱۰۰-۲۰ μM) کورکومین و (۱۲-۱ μM) سورافنیب، هم چنین اثر ترکیبی داروها با استفاده از روش MTT در بازه‌های زمانی ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت بررسی شد و بین ۴۸ و ۷۲ ساعت تفاوت معناداری مشاهده نشد (نمودارهای ۱ و ۲). نتایج نشان داد که در رده سلولی KG1، اثر کورکومین در دوزهای ۴۰ تا ۱۰۰ میکرومولار و سورافنیب در دوزهای ۷ تا ۱۲ میکرومولار و در رده سلولی U937 اثر کورکومین در دوزهای ۴۰ تا ۱۰۰ میکرومولار و اثر سورافنیب در دوزهای ۱۲-۵ میکرومولار قابل توجه بوده است (۳) (نمودارهای ۱ و ۲). IC_{50} برای داروی کورکومین با دوز ۴۰ μM برای هر دو رده سلولی و IC_{50} برای داروی سورافنیب ۵ و ۷ میکرومول به ترتیب برای رده سلولی KG1 و U937 انتخاب شد. هم‌چنین با تیمارسازی ترکیبی در دوز ۴۰ μM ، کورکومین برای رده سلولی KG1 و دوز ۵ و ۷ میکرومول سورافنیب برای U937، کشندگی سلولی و کاهش تکثیر سلولی بیشتری را نشان می‌دهد و با ترکیب کورکومین و سورافنیب، درصد بقای سلول‌های تیمار شده نسبت به گروه کنترل به طور چشمگیر کاهش می‌یابد ($P < ۰/۰۰۱$ ***). طبق نمودارهای فوق، درصد بقای سلول‌های تیمار شده با سورافنیب و کورکومین در یک روند وابسته به دوز و زمان نسبت به گروه کنترل کاهش می‌یابد.

نمونه‌ها با استفاده از دستگاه نانودراپ (آلمان) اندازه‌گیری شد. ساخت cDNA با استفاده از کیت cDNA سنتتاز (تاکارا، ژاپن) انجام شد و میزان بیان ژن در سطح mRNA با دستگاه light cycler (رئوش، آلمان) و با روش Real-Time PCR مورد بررسی قرار گرفت. مواد لازم برای انجام Real-time PCR در حجم ۲۰ میکرولیتر شامل μL ۱۰ از رنگ SYBR Green master mix (تاکارا، ژاپن) و μL ۲ از cDNA و از آغازگر (ژن فن‌آوران، ایران) μL ۱ (۱۰ pmol) و μL ۶ آب استریل با هم مخلوط گردید. برنامه دمایی و زمانی دستگاه Real-time PCR برای فعال کردن اولیه شامل ۳۰ ثانیه زمان در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد بود. در ادامه ۴۰ چرخه برای مرحله واسرشتگی که در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ ثانیه و برای مرحله آنیلینگ/اکستنشن که در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد ۲۰ ثانیه خواهد بود، می‌باشد.

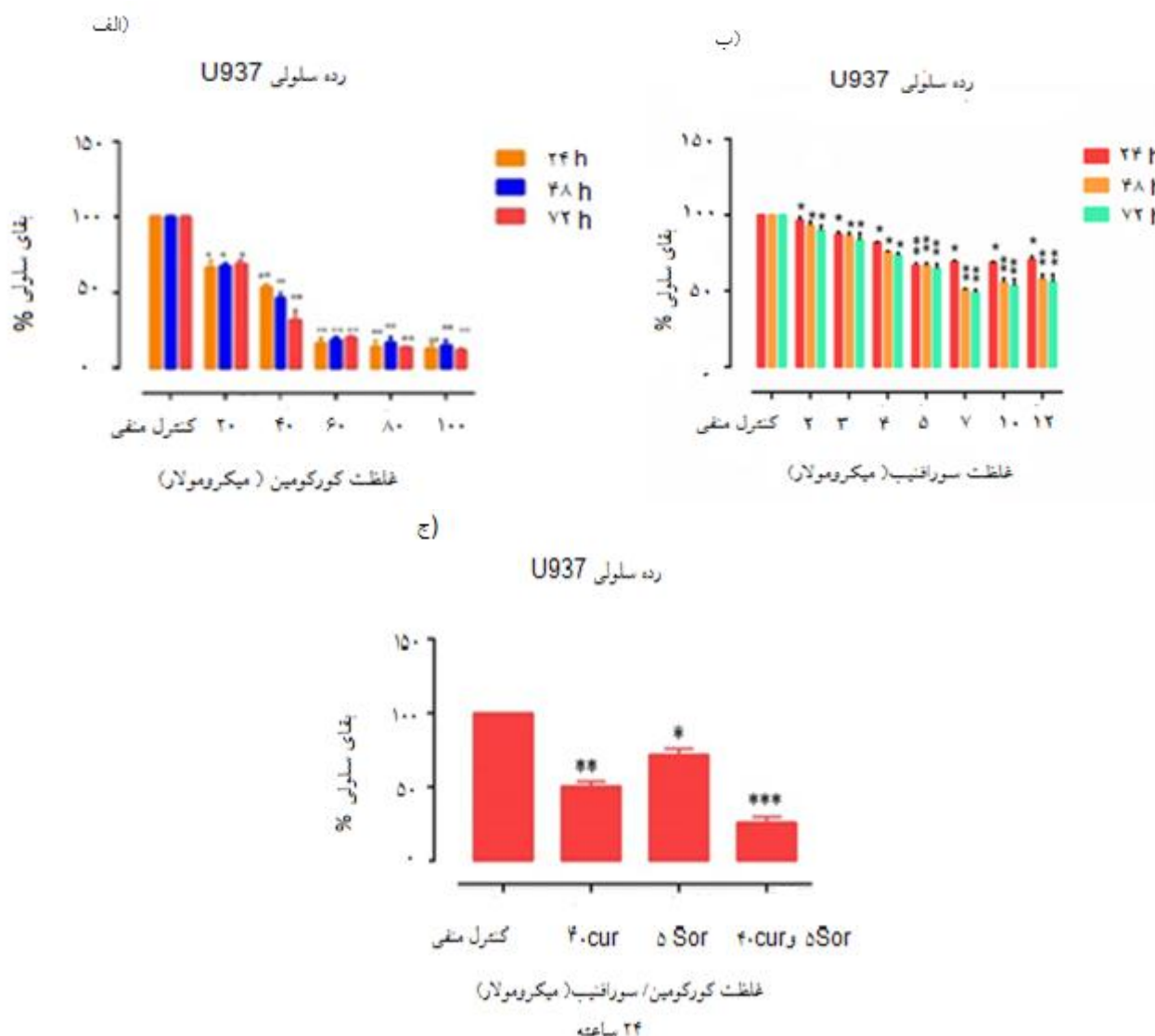
برای تکثیر ژن مورد نظر، دو عدد آغازگر اختصاصی برای ژن انتخاب گردید که شامل آغازگر پیش برنده و معکوس بود. اختصاصیت تمامی آغازگرها با نرم‌افزار آنالیز Primer-BLAST (وب سایت NCBI) بررسی و تأیید شد. هم‌چنین برای بررسی اختصاصی بودن محصول PCR شده، از منحنی ذوب استفاده شد. میزان تغییرات بیان ژن در شرایط سلول‌های تیمار شده با داروها با توجه به ژن داخلی HPRT، بر طبق روش $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ محاسبه شد و نتایج به دست آمده در قالب نمودار ستونی با یکدیگر مقایسه شدند (جدول ۱).

روش تجزیه و تحلیل اطلاعات و آزمون آماری:

تمام آزمایش‌ها به شکل سه آزمون مستقل انجام و مقادیر گزارش شده به شکل $\text{Mean} \pm \text{SE}$ قید شده‌اند. هم‌چنین برای محاسبات آماری از روش Mann-Whitney U



نمودار ۱: الف) نمودارستونی اثر مهارى کورکومین با غلظت‌های مختلف ($20-100 \mu M$) بر رشد و بقا ب) نمودار ستونی اثر مهارى سورافنیب در غلظت‌های مختلف ($2-12 \mu M$) بر رشد و بقا ج) نمودار ستونی اثر مهارى ترکیب کورکومین و سورافنیب در رده سلولی KG1 با استفاده از آزمون MTT در بازه‌های زمانی ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت. نتایج در نمودار با سه بار تکرار به صورت $SE \pm mean$ نمایش داده شده و نتایج از نظر آماری در مقایسه با نمونه کنترل به صورت $P < 0.05$ ، $P < 0.01$ و $P < 0.001$ ، معنادار می‌باشد.



نمودار ۲: الف) نمودار ستونی اثر مهارى کورکومین با غلظت‌های مختلف (۱۰۰-۲۰ μM) بر رشد و بقا ب) نمودار ستونی اثر مهارى سورافنیب در غلظت‌های مختلف (۱۲-۲ μM) بر رشد و بقا ج) نمودار ستونی اثر مهارى ترکیب کورکومین و سورافنیب در رده سلولی U937 با استفاده از آزمون MTT در بازه‌های زمانی ۲۴ و ۴۸ و ۷۲ ساعته. نتایج در نمودار با سه بار تکرار به صورت $SE \pm mean$ نمایش داده شده و نتایج از نظر آماری در مقایسه با نمونه کنترل به صورت $p < 0.05$ ، $p < 0.01$ و $p < 0.001$ ، معنادار می‌باشد.

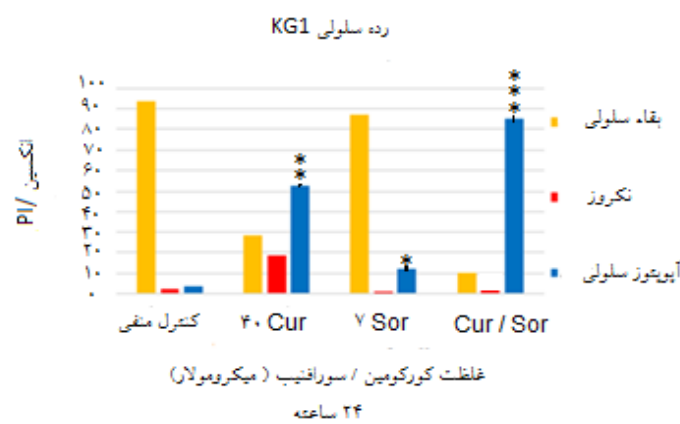
پذیرفت و با استفاده از روش فلوسیتومتری، درصد سلول‌های آپوپتوز شده مشخص گردید. در آزمایش به عمل آمده تنها جمعیت‌هایی که Annexin آن‌ها مثبت و یا Annexin و PI آن‌ها مثبت باشند دارای اهمیت بوده و جمعیت‌های PI مثبت به تنهایی نشان از نکروز سلولی بوده که روندی پاتولوژیک و ناخوشایند و فاقد اهمیت می‌باشد.

بررسی آپوپتوز به روش فلوسیتومتری با استفاده از روش رنگ‌آمیزی Annexin/PI:

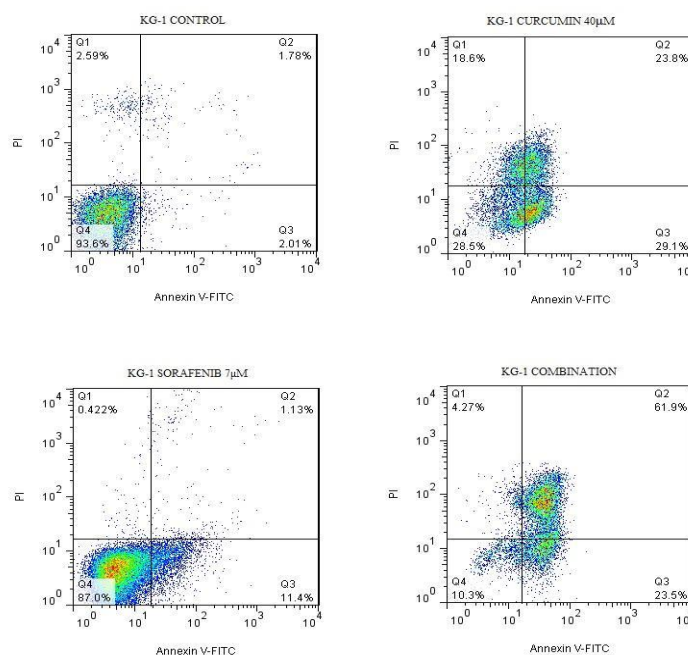
در ادامه کار برای تایید نتایج به دست آمده از روش MTT و به منظور بررسی اثر القائی داروی کورکومین به تنهایی یا در ترکیب با سورافنیب روی مرگ سلول‌ها، مهار تکثیر سلولی و تعیین این که این مرگ از طریق آپوپتوز انجام گرفته و یا با نکروز، رنگ‌آمیزی Annexin/PI انجام

تنهایی، نشان می‌دهد (نمودارهای ۳ و ۴). هم‌چنین ترکیب داروهای کورکومین و سورافنیب با یکدیگر در سلول‌های KG1 و U937 در مقایسه با گروه کنترل، بیشترین میزان آپوپتوز القا شده تا مرحله Late یا آپوپتوز کامل و حداقل میزان نکروز را در هر دو رده KG-1 و U937 در مقایسه با نمونه کنترل باعث می‌شوند (شکل‌های ۱ و ۲).

نتایج تجزیه و تحلیل از رنگ‌آمیزی Annexin/PI با دستگاه فلوسیتومتری، اثرات القای آپوپتوزی با داروها را نشان می‌دهد. طبق نمودارها، سلول‌های KG1 و U937 تیمار شده با دوزهای ترکیبی کورکومین و سورافنیب نسبت به گروه کنترل، یک افزایش آپوپتوتیک قابل توجهی را نسبت به دوزهای کورکومین و سورافنیب به



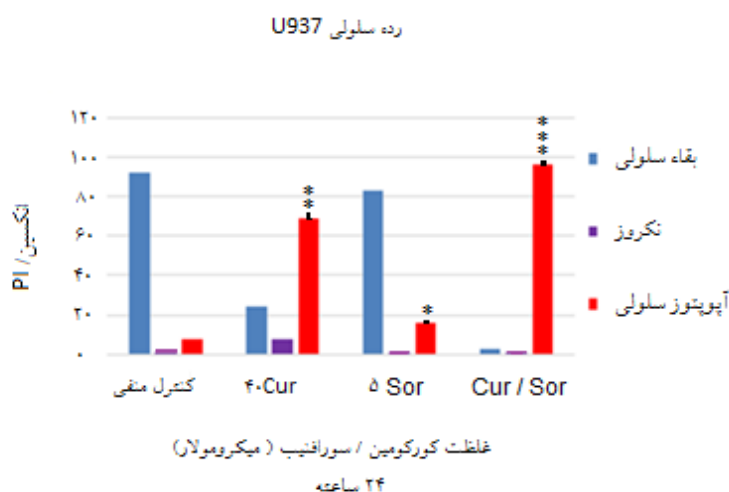
نمودار ۳: نتایج بررسی تیمارسازی با داروی کورکومین، سورافنیب و ترکیب آن دو با یکدیگر در القای آپوپتوز سلولی با رنگ‌آمیزی Annexin/PI در رده سلولی KG-1 در بازه زمانی ۲۴ ساعته.



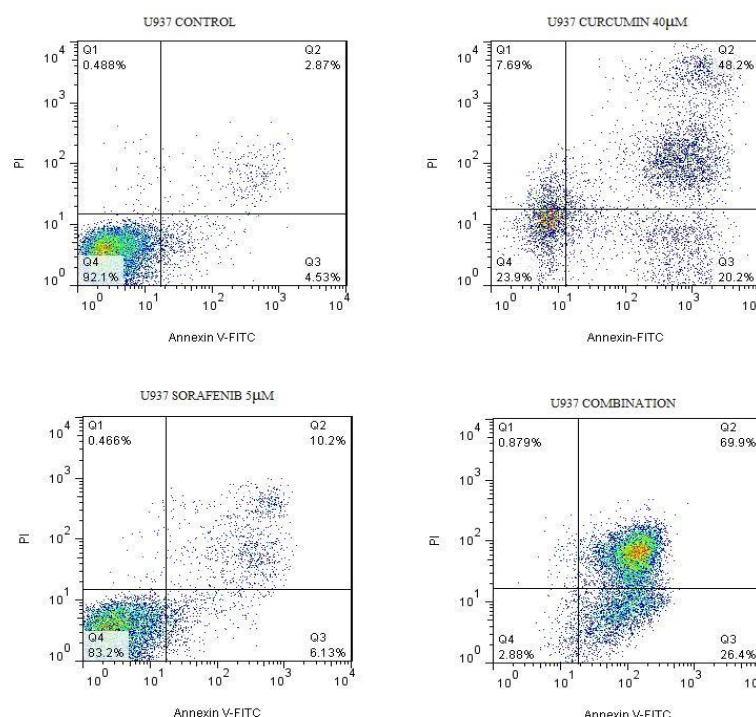
شکل ۱: بررسی پراکنش فلوسایتمتری حاصل از آزمایش Annexin/PI برای بررسی آپوپتوز در سلول‌های KG1 پس از تیمار با غلظت‌های ۴۰ μM کورکومین و غلظت ۷ μM سورافنیب و مقادیر ترکیبی آن‌ها در بازه زمانی ۲۴ ساعته

می‌شوند. دوز تک کورکومین ($40 \mu\text{M}$) به میزان ۲۹/۱٪ تا مرحله اولیه (early) و دوز تک سورافنیب ($7 \mu\text{M}$) به میزان ۱۱/۴٪ تا مرحله early از آپوپتوز را نشان می‌دهد.

طبق نمودار ترکیب داروهای کورکومین و سورافنیب با یکدیگر در سلول‌های KG1 در مقایسه با گروه کنترل به میزان ۶۱/۹٪ بیشترین میزان آپوپتوز القا شده تا مرحله تأخیری (Late) یا آپوپتوز کامل (بخش Q2) را باعث

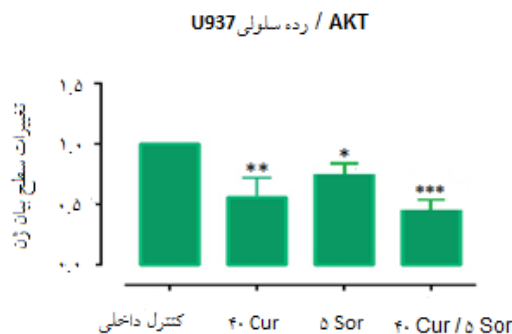


نمودار ۴: نتایج بررسی آپوپتوز سلولی حاصل از رنگ‌آمیزی Annexin/PI درده سلولی U937 در بازه زمانی ۲۴ ساعته بدنال تیمار سازی با غلظت های $40 \mu\text{M}$ کورکومین و $5 \mu\text{M}$ سورافنیب و ترکیب آن دو با یکدیگر



شکل ۲: نمودار پراکنش فلوسایتومتری حاصل از تست Annexin/PI برای بررسی آپوپتوز در سلول‌های U937 پس از تیمار با غلظت های $40 \mu\text{M}$ کورکومین و $5 \mu\text{M}$ سورافنیب و مقادیر ترکیبی آنها در بازه زمانی ۲۴ ساعته

۰/۰۵ < P* و در ترکیب دو دارو به صورت ۰/۰۰۱ < P*** در مقایسه با گروه کنترل کاهش می‌یابد. در دوز ترکیبی دو دارو، کاهش چشمگیر و قابل قبولی در بیان ژن AKT دیده می‌شود (نمودار ۶).



نمودار ۶: نتایج بررسی تیمار سلول U937 با داروی کورکومین و سورافنیب و ترکیب آن دو با یکدیگر بر روی بیان ژن AKT به روش Real time PCR در بازه زمانی ۲۴ ساعته. نتایج با سه بار آزمایش مستقل و به صورت $\pm$ mean نشان داده شده‌اند و نتایج از نظر آماری در مقایسه با نمونه کنترل به صورت $p < 0.05$ ، $p < 0.01$ و $p < 0.001$ معنادار می‌باشد.

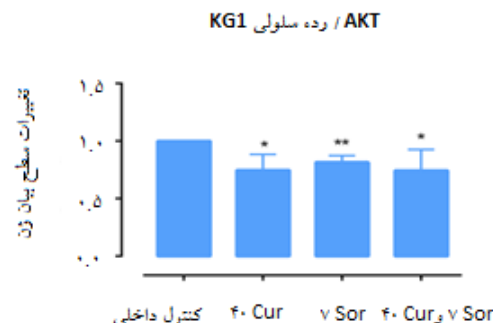
بحث

لوسمی میلوئیدی حاد یک اختلال شایع هماتولوژیکی بوده که در آن اکثر بیماران به دلیل ناکارآمد بودن داروهای رایج امروزی، شانس زندگی طولانی مدت در آن‌ها پایین می‌باشد. مطالعه‌ها در سال‌های اخیر نشان می‌دهد که جمعیت‌های لوکمیک بسیار هتروژن می‌باشند و ایجاد بیماری، به دنبال افزایش زیر جمعیتی از سلول‌های لوکمیک به نام LSC روی می‌دهد. به عنوان یکی از مسیرهای مؤثر در بقای LSC ها، می‌توان به فعالیت یا مهار پروتئین‌های مرتبط مانند AKT اشاره کرد. از یک سو آبشارهای ERK / MEK / Raf / Ras و PI3K / PTEN / AKT / mTOR اغلب با تغییرات ژنتیکی در مولکول‌های سیگنالینگ بالادست مانند گیرنده‌های تیروزین کیناز (RTK) فعال می‌شوند (۱۹). ترکیباتی که توانایی از بین بردن LSC ها را دارند و به طور خاص مسیر VEGF و Ras/ Raf/ MEK/ ERK, PI3K/AKT/mTOR را هدف قرار می‌دهند شامل کورکومین و سورافنیب هستند.

طبق نمودار ترکیب داروهای کورکومین و سورافنیب با یکدیگر در سلول‌های U937 در مقایسه با گروه کنترل به میزان ۶۹/۹٪ بیشترین میزان آپوپتوز القا شده را باعث می‌شوند.

نتایج ارزیابی اثر کورکومین و سورافنیب بر بیان ژن AKT در سطح mRNA در رده سلولی KG1:

طبق نمودار فوق نتایج نشان می‌دهد بیان ژن AKT در سلول KG1 تیمار شده در غلظت ۴۰ μM کورکومین به صورت $p < 0.05$ و ۷ μM سورافنیب به صورت $p < 0.01$ و با ترکیب این دو دارو به صورت $p < 0.05$ در مقایسه با گروه کنترل کاهش می‌یابد. در ترکیب دو دارو نتایج به صورت جزئی، چشمگیر بوده و این احتمالاً به دلیل مکانیسم‌های مقاومتی در رده سلولی KG1 می‌باشد (نمودار ۵).



نمودار ۵: نتایج بررسی تیمار سلول KG1 با داروی کورکومین و سورافنیب و ترکیب آن دو با یکدیگر بر بیان ژن AKT به روش Real time PCR در بازه زمانی ۲۴ ساعته. نتایج با سه بار آزمایش مستقل و به صورت $\pm$ mean نشان داده شده‌اند و نتایج از نظر آماری در مقایسه با نمونه کنترل به صورت $p < 0.05$ ، $p < 0.01$ و $p < 0.001$ معنادار می‌باشد.

نتایج ارزیابی اثر کورکومین و سورافنیب بر بیان ژن AKT در سطح mRNA در رده سلولی U937:

طبق نمودار نتایج نشان می‌دهد بیان ژن AKT در سلول U937 تیمار شده با غلظت تک ۴۰ μM کورکومین به صورت $p < 0.01$ و ۵ μM سورافنیب به صورت

در این مطالعه، ارزیابی اولیه توسط آزمایش MTT نشان می‌دهد که کورکومین و سورافنیب در هر دو رده سلولی، اثرات معناداری بر مهار رشد سلول‌ها داشته‌اند و این در حالی است که ترکیب داروها دارای کشندگی سلولی بیشتر در مقایسه کورکومین و سورافنیب به تنهایی می‌باشد و هم‌چنین نتایج آزمایش آپوپتوز نیز نشان می‌دهد که میزان چشمگیری از درصد کشندگی سلولی که در آزمایش MTT مشاهده شد، آپوپتوز یا مرگ برنامه‌ریزی سلولی بوده و این میزان بالاتر از آپوپتوز در مقایسه با هر یک از داروها به تنهایی بوده است. بنابراین این مطالعه علاوه بر نشان دادن تاثیر چشمگیر کورکومین و سورافنیب در از بین بردن بقا و رشد سلول‌های سرطان خون AML، نشان می‌دهد که احتمالاً به واسطه ترکیب این دو دارو می‌توان به نتایج بهتری برای درمان دست یافت. هم‌چنین تیمار رده سلولی U937 و KG-1 لوکمی AML، توسط کورکومین و سورافنیب و ترکیب آن‌ها باعث مرگ سلولی چشمگیر و القاء آپوپتوز می‌شود. سپس به جهت یافتن علت آپوپتوز به سراغ بررسی میزان بیان ژن AKT رفتیم زیرا در مطالعه‌ها و تحقیقات، کاهش بیان AKT را علت القاء آپوپتوز می‌دانند. بنابراین برای اولین بار اثر دوزهای انتخابی داروها و ترکیب آن‌ها را بر میزان بیان ژن AKT به وسیله آزمایش Real time PCR اندازه‌گیری کردیم، نتایج نشان می‌دهد در سلول‌های KG1 و U937 در تمامی دوزها نسبت به نمونه کنترل، شاهد کاهش بیان ژن AKT بوده‌ایم، احتمالاً می‌توان مسئول آپوپتوز را در این رده‌های سلولی، کاهش بیان ژن AKT دانست زیرا آبخار به راه افتاده پس از فعال‌سازی این ژن، باعث بقای بیشتر سلول‌ها می‌شود. در رده سلولی KG-1 در دوز ترکیبی دو دارو، شاهد کاهش بیان ژن AKT بوده‌ایم ولی اثرش خیلی چشمگیر نمی‌باشد که احتمالاً به دلیل مکانیسم‌های مقاومتی سلولی می‌باشد. در رده سلولی U937 دوز ترکیبی دو دارو نسبت به دوز تک سورافنیب ($5 \mu\text{M}$) باعث کاهش بیان بیشتر ژن AKT شده است.

در مطالعه‌های گذشته بر روی بیماران AML نشان داده شده که بلوک کردن مسیر پیام‌رسانی AKT، منجر به

افزایش فعالیت P53 می‌شود. این مسأله نشان می‌دهد که در مبتلایان به بیماری AML، ژن P53 از طریق این مسیر پیام‌رسانی تنظیم می‌شود و این مسیر با افزایش فسفریلاسیون Mdm2، کاهش بیان ژن P53 و القای فعالیت ضد آپوپتوزی، می‌تواند باعث افزایش مقاومت دارویی باشد.

هم‌چنین در مطالعه‌ها نشان دادند که فعالیت محور ERK/MEK1/MEK2 مرتبط با فعالیت AKT در سلول‌های KG1 و U937 بوده و نقش مهمی در بقای سلول‌های بنیادین AML در مقابل کورکومین و یا ترکیب با سورافنیب بازی می‌کنند و همبستگی قابل توجهی بین بیان ژن‌های RAF/MEK با ژن‌های AKT/mTOR/PTEN/β-Catenin در این سلول‌ها بعد از درمان دیده شد. در سایر مطالعه‌ها اثر کورکومین بر روی AKT در سطح پروتئین اندازه‌گیری شده است و این مطالعه‌ها نشان‌دهنده افزایش آپوپتوز سلولی، توقف چرخه سلولی و یا کاهش میزان بیان ژن AKT به دنبال درمان با کورکومین در سلول‌های U937 لوکمی بوده است. مطالعه حاضر نشان می‌دهد کورکومین باعث مهار تزیاد سلولی و هم‌چنین القای آپوپتوز در سلول‌های لوکمیک AML می‌شود و نیز باعث کاهش بیان ژن AKT (که به عنوان یک عامل پیش‌برنده سرطان شناخته می‌شود) در این سلول‌ها می‌گردد. هم‌چنین بر اساس مطالعه‌های گذشته، داروی سورافنیب که در ابتدا به عنوان مهار کننده C-Raf و B-Raf شناخته شد، می‌تواند بر روی تیروزین کینازهای دیگر که در پیشرفت سرطان بسیار حائز اهمیت هستند نیز نقش داشته باشد (۲۱، ۲۰). از آن جایی که کورکومین یک ترکیب گیاهی می‌باشد، در مقایسه با شکل تک داروهای رایج، به صورت ترکیبی احتمالاً می‌تواند با اثرگذاری بهتر و کارآمدتر و عوارض جانبی و سمیت کمتری در بیماران مبتلا به AML مورد استفاده قرار گیرد.

ژانگ و همکارانش در سال ۲۰۱۵ نشان دادند که ترکیب دو داروی سورافنیب و کورکومین دارای اثرات ضد سرطانی در بیماران مبتلا به سرطان تیروئید می‌باشد. هم‌چنین آن‌ها بیان داشتند که ترکیب دو دارو به طور قابل توجهی باعث القای آپوپتوز و کاهش سطح

نشان داده است. در تحقیق حاضر نیز دوز سورافنیب موجب کاهش قابل قبول بیان ژن *AKT* در رده سلولی KG1 شد که با تحقیق صفائیان مطابقت دارد (۲۷).

با توجه به محدودیت‌های این تحقیق که مهار دارویی بر روی یک مسیر پیام‌رسانی و در سطح *in vitro* انجام شد، به نظر می‌رسد در صورت طراحی مهارکننده‌های انتخابی و اختصاصی مسیر *AKT* و با ساختارهای نانو که در سطح *in vivo* باشد، می‌توان به نتایج مؤثرتری برای درمان سرطان خون دست یافت.

نتیجه‌گیری

با توجه به یافته‌های این تحقیق و نقش اثر ترکیبی کورکومین و سورافنیب که دارای اثر سینرژیک در مهار تکثیر سلولی، القای آپوپتوز و کاهش بیان ژن *AKT* می‌باشد، ترکیب دو داروی فوق با در نظر گرفتن نتایج موجود و نتایج سایر مطالعه‌ها، می‌تواند در درمان سرطان خون مؤثر باشد.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله از مرکز تحقیقات هماتولوژی، انکولوژی و پیوند سلول‌های بنیادی بیمارستان شریعتی به جهت تأمین بودجه طرح، تشکر و قدردانی می‌گردد.

پروتئین‌های *AKT* و *ERK* در رده سلول‌های سرطانی FTC133 در مقایسه با درمان تک دارویی می‌شود (۲۲).

کائو و همکارانش در سال ۲۰۱۵ نشان دادند که انتقال هم‌زمان دو داروی سورافنیب و کورکومین به وسیله هدفمند کردن ذرات نانو، اثرات درمانی را در کارسینومای کبدی افزایش می‌دهد (۲۳).

رؤا و همکاران در سال ۲۰۱۱ در بخشی از مطالعه خود نشان دادند که کورکومین باعث مهار تزیاد سلولی و القای آپوپتوز در سلول‌های U937 و KG-1 لوکمی میلوئیدی حاد AML می‌شود (۲۴).

هابر و همکارانش در سال ۲۰۱۱ نشان دادند که سورافنیب می‌تواند منجر به توقف چرخه سلولی، کاهش مقاومت دارویی و همچنین افزایش آپوپتوز در بیماران با سرطان خون مزمن هم از طریق مهار مسیر *VEGF* و هم از مسیرهای دیگر شود (۲۵).

چن و همکارانش در سال ۲۰۱۱ نشان دادند که فعالسازی مسیر پیام‌رسانی *PI3K/AKT* در کارسینومای کبدی به واسطه مقاومت به سورافنیب به دست آمده است (۲۶).

صفائیان و همکارانش در مطالعه‌ای بالینی، در سال ۲۰۰۹ نشان دادند که سورافنیب بر بیماران *AML* دارای جهش *FLT-3*، خاصیت ضد سرطانی بالقوه‌ای را

References:

- Hoffbrand AV, Higgs DR, Keeling DM, Mehta AB. Postgraduate Haematology. USA: John Wiley & Sons; 2016. p. 152.
- Zand AM, Imani S, Saadati M, Borna H, Ziaei R, Honari H. Effect of age, gender and blood group on blood cancer types. Kowsar Medical J 2010; 15(2): 111-4. [Article in Farsi]
- Salemi M, Mohammadi S, Ghavamzadeh A, Nikbakht M. Anti-vascular endothelial growth factor targeting by curcumin and thalidomide in acute myeloid leukemia cells. Asian Pac J Cancer Prev 2017; 18(11): 3055-61.
- Chomel JC, Turhan AG. Chronic myeloid leukemia stem cells in the era of targeted therapies: resistance, persistence and long-term dormancy. Oncotarget 2011; 2(9): 713-27.
- Hope KJ, Jin L, Dick JE. Acute myeloid leukemia originates from a hierarchy of leukemic stem cell classes that differ in self-renewal capacity. Nat Immunol 2004; 5(7): 738-43.
- Gilliland DG, Jordan CT, Felix CA. The molecular basis of leukemia. Hematology Am Soc Hematol Educ Program 2004; 80-97.
- Martelli AM, Evangelisti C, Follo MY, Ramazzotti G, Fini M, Giardino R, et al. Targeting the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt/mammalian target of rapamycin signaling network in cancer stem cells. Curr Med Chem 2011; 18(18): 2715-26.
- Osaki M, Oshimura Ma, Ito H. PI3K-Akt pathway: its functions and alterations in human cancer. Apoptosis 2004; 9(6): 667-76.
- Hennessy BT, Smith DL, Ram PT, Lu Y, Mills GB. Exploiting the PI3K/AKT pathway for cancer drug discovery. Nat Rev Drug Discov 2005; 4(12): 988-1004.
- Chen YL, Law PY, Loh HH. Inhibition of PI3K/Akt signaling: an emerging paradigm for targeted cancer therapy. Curr Med Chem Anticancer Agents 2005; 5(6): 575-89.
- Zhang W, Konopleva M, Ruvo V, McQueen T,

- Evans R, Bornmann W, *et al.* Sorafenib induces apoptosis of AML cells via Bim-mediated activation of the intrinsic apoptotic pathway. *Leukemia* 2008; 22(4): 808-18.
- 12- Sacco R, Bargellini I, Gianluigi G, Bertini M, Bozzi E, Altomare E, *et al.* Complete response for advanced liver cancer during sorafenib therapy: case report. *BMC Gastroenterol* 2011; 11(1): 4.
 - 13- Kian MM, Mohammadi S, Tavallaei M, Chahardouli B, Rostami S, Zahedpanah M, *et al.* Inhibitory effects of arsenic trioxide and thalidomide on angiogenesis and vascular endothelial growth factor expression in leukemia cells. *Asian Pac J Cancer Prev* 2018; 19(4): 1127-34.
 - 14- Haghi A, Mohammadi S, Heshmati M, Ghavamzadeh A, Nikbakht M. Anti-vascular endothelial growth factor effects of sorafenib and arsenic trioxide in acute myeloid leukemia cell lines. *Asian Pac J Cancer Prev* 2017; 18(6): 1655-61.
 - 15- Aggarwal BB, Banerjee S, Bharadwaj U, Sung B, Shishodia S, Sethi G. Curcumin induces the degradation of cyclin E expression through ubiquitin-dependent pathway and up-regulates cyclin-dependent kinase inhibitors p21 and p27 in multiple human tumor cell lines. *Biochem Pharmacol* 2007; 73(7): 1024-32.
 - 16- Rao J, Xu DR, Zheng FM, Long ZJ, Huang SS, Wu X, *et al.* Curcumin reduces expression of Bcl-2, leading to apoptosis in daunorubicin-insensitive CD34+ acute myeloid leukemia cell lines and primary sorted CD34+ acute myeloid leukemia cells. *J Transl Med* 2011; 9(1): 71.
 - 17- Johnson CM, Yang S, Sellins KS, Frank GR. Selection of HPRT primers as controls for determination of mRNA expression in dogs by RT-PCR. *Vet Immunol Immunopathol* 2004; 99(1-2): 47-51.
 - 18- Fabi F, Grenier K, Parent S, Adam P, Tardif L, Leblanc V, *et al.* Regulation of the PI3K/Akt pathway during decidualization of endometrial stromal cells. *PLoS One* 2017; 12(5): e0177387.
 - 19- Chappell WH, Steelman LS, Long JM, Kempf RC, Abrams SL, Franklin RA, *et al.* Ras/Raf/MEK/ERK and PI3K/PTEN/Akt/mTOR inhibitors: rationale and importance to inhibiting these pathways in human health. *Oncotarget* 2011; 2(3): 135-64.
 - 20- Scartozzi M, Faloppi L, Svegliati Baroni G, Loretelli C, Piscaglia F, Iavarone M, *et al.* VEGF and VEGFR genotyping in the prediction of clinical outcome for HCC patients receiving sorafenib: The ALICE-1 study. *Int J Cancer* 2014; 135(5): 1247-56.
 - 21- Patel TV, Morgan JA, Demetri GD, George S, Maki RG, Quigley M, *et al.* A preeclampsia-like syndrome characterized by reversible hypertension and proteinuria induced by the multitargeted kinase inhibitors sunitinib and sorafenib. *J Natl Cancer Inst* 2008; 100(4): 282-4.
 - 22- Zhang J, Yu J, Xie R, Chen W, Lv Y. Combinatorial anticancer effects of curcumin and sorafenib towards thyroid cancer cells via PI3K/Akt and ERK pathways. *Nat Prod Res* 2016; 30(16): 1858-61.
 - 23- Cao H, Wang Y, He X, Zhang Z, Yin Q, Chen Y, *et al.* Codelivery of sorafenib and curcumin by directed self-assembled nanoparticles enhances therapeutic effect on hepatocellular carcinoma. *Mol Pharm* 2015; 12(3): 922-31.
 - 24- Rao J, Xu DR, Zheng FM, Long ZJ, Huang SS, Wu X, *et al.* Curcumin reduces expression of Bcl-2, leading to apoptosis in daunorubicin-insensitive CD34+ acute myeloid leukemia cell lines and primary sorted CD34+ acute myeloid leukemia cells. *J Transl Med* 2011; 9(1): 71.
 - 25- Huber S, Oelsner M, Decker T, zum Büschenfelde CM, Wagner M, Lutzny G, *et al.* Sorafenib induces cell death in chronic lymphocytic leukemia by translational downregulation of Mcl-1. *Leukemia* 2011; 25(5): 838-47.
 - 26- Chen KF, Chen HL, Tai WT, Feng WC, Hsu CH, Chen PJ, *et al.* Activation of phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling pathway mediates acquired resistance to sorafenib in hepatocellular carcinoma cells. *J Pharmacol Exp Ther* 2011; 337(1): 155-61.
 - 27- Safaian N, Czibere A, Bruns I, Fenk R, Reinecke P, Dienst A, *et al.* Sorafenib (Nexavar®) (induces molecular remission and regression of extramedullary disease in a patient with FLT3-ITD+ acute myeloid leukemia. *Leuk Res* 2009; 33(2): 348-50.

Original Article

Effect of curcumin and sorafenib on AKT gene expression in KG1 and U937 cell lines

**Pazahr R.¹, Mohammadikian M.¹, Ali Asgari E.², Mohammadi S.¹, Rostami Sh.¹,
Chahardolii B.¹, Babakhani D.¹, Nikbakht M.¹**

¹Hematology, Oncology and Stem Cell Transplantation Research Center, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

²Islamic Azad University South Tehran Branch, Tehran, Iran

Abstract

Background and Objectives

Acute myeloid leukemia is a heterozygous hematologic malignancy that is manifested by the accumulation of hematopoietic stem cells in peripheral blood and bone marrow. Anticancer effects and cytotoxic activity of curcumin have been proven frequently in many cancers. Sorafenib is known as an inhibitor of angiogenesis which prevents cells' survival. In the present study, the effects of curcumin and sorafenib and their combination were evaluated on AML cells.

Materials and Methods

In this experimental study, U937 and KG-1 cells were treated with different concentrations of curcumin and sorafenib and their combination. MTT assay was applied to assess the viability of cells. Percentage of apoptotic cells was evaluated by annexin PI staining. Also Real Time PCR was performed to investigate the level of AKT mRNA expression.

Results

Our data showed that the percentage of apoptotic cells significantly increased in response to treatment with curcumin (40 μM in KG-1 and U937 cell lines), sorafenib (5 μM and 7 μM in U937 and KG-1, respectively) and their combination. Moreover, the mRNA level of AKT gene was downregulated in KG-1 and U937 cells.

Conclusions

Our results suggest that combination of curcumin and sorafenib could lead to promote apoptosis. Furthermore, downregulation of AKT gene shows that these agents can be considered as effective agents on AML cells.

Key words: Acute Myeloid Leukemia, Curcumin, Sorafenib

Received: 13 Aug 2019

Accepted: 1 Jan 2020

Correspondence: Nikbakht M., PhD in Medical Biotechnology. Associated Professor of Hematology, Oncology and Stem Cell Transplantation Research Center, Tehran University of Medical Sciences, Shariati Hospital. Postal Code: 1411713131, Tehran, Iran. Tel: (+9821) 84902635; Fax: (+9821) 84902635
E-mail: m-nikbakht@sina.tums.ac.ir