Archive of SID

مقاله پژوهشی

مجله سلول و بافت (علمی - پژوهشی)
جلد ٤، شماره ٤، زمستان ١٣٩٢، ٤٤٣-٤٣٥

بررسی اثر کورکومین بر سلول‌های نوروپروژنیتور کورتکس جنین رت در شرایط *in vitro*

مجید رجبی M.D. [1*]، کاظم پریور Ph.D. [1]، محمد نبیونی Ph.D. [2]، پریچهر یغمایی Ph.D. [1]

١- دانشگاه آزاد واحد علوم وتحقیقات تهران، دانشکده علوم،گروه زیست شناسی،کدپستی ٩٣٨٥٥-١٤٧٧٨
٢- دانشگاه خوارزمی، دانشکده علوم،گروه زیست شناسی، کد پستی : ١٤٩١١-١٥٧١٩
* پست الکترونیک نویسنده مسئول: majidrjb@yahoo.com

تاریخ دریافت: ١٣٩١/٧/٢٥ تاریخ پذیرش: ١٣٩١/١٠/١٢

چکیده

هدف: کورکومین یک رنگیزه زرد است که از زردچوبه به دست می آید. دارای خواص ضد سرطانی وآنتی اکسیدانی می‌باشد و احتمال می‌رود که نقش به سزایی در جلوگیری از بیماری‌های تحلیل برنده مغز ایفا کند. اما تاکنون اثرات آن بر روی سیستم عصبی در دوران جنینی به خوبی مطالعه نشده است. در این مطالعه اثر کورکومین بر سلول‌های پروژنیتور عصبی (NPC) کورتکس جنین رت درشرایط محیط کشت (*in vitro*) بررسی شده است.

مواد و روش‌ها: کورتکس جنین‌های ١٥/٥ روزه رت نژاد ویستار در شرایط استریل جدا شده و به‌روش آنزیمی به سوسپانسیون سلولی تبدیل شدند. سوسپانسیون سلولی در محیط کشت DMEM/F12 و N2 و١ درصد آنتی بیوتیک و میتوژن ها (EGF10ng/ml و20ng/ml FGF-b) کشت داده شد و سلول‌ها با غلظت‌های متفاوت کورکومین (٠/١، ٠/٥، ١ میکرومولار) مورد تیمار قرار گرفتند. بقای سلولی با تست MTT سنجیده شد و بررسی‌های ایمونوسیتوشیمیایی با استفاده از نشانگرآستروسیتی (GFAP) صورت گرفت. داده ها، با روش ANOVA یک طرفه و سنجش Tukey's post hoc مورد بررسی قرار گرفتند.

نتایج: این بررسی نشان داد که تیمار NPC های کورتکس جنین رت با غلظت‌های مختلف کورکومین به‌ویژه غلظت ٠/٥ میکرومولار اثرات معنی داری بر تکثیر و تمایز این سلول به آستروسیت‌ها دارد.

نتیجه گیری: کورکومین اثرات دوگانه بر کشت NPC ها دارد: غلظت‌های پایین آن تکثیر وتمایز NPC ها را تحریک می‌کند در حالی‌که غلظت‌های بالای کورکومین سمی است. NPC در طی تکوین جنینی به نورون‌ها و سلول‌های گلیال تمایز می‌یابند که مهم‌ترین آنها آستروسیت ها هستند.

واژگان کلیدی: آستروسیت، سلول‌های نوروپروژنیتور، کورکومین.

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

سلول‌های پروژنیتور عصبی (Neural Progenitor Cell) که به‌نام سلول‌های بنیادی عصبی (NPC) معروف می‌باشند، منبع اصلی تولید نورون‌ها و سلول‌های گلیال هستند که بخش‌های اصلی مغز را در طی تکوین جنینی به‌وجود می‌آورند (۱). از طرفی تکوین سیستم عصبی مرکزی (Central nervus system, CNS) فرآیند پیچیده‌ای می‌باشد و مکانیسم‌های تنظیم‌کننده ظریفی از لحاظ مکانی و زمانی در این فرآیند دخالت دارند. رفتار سلول‌های پروژنیتور عصبی به‌وسیله مکانیسم‌های درون‌سلولی و برون‌سلولی کنترل می‌گردد و عوامل اپی‌ژنتیک نیز در این امر دخیلند. این عوامل تراکم کروماتین را تغییر داده و به تبع آن بر فعالیت ژن‌ها اثر می‌گذارند (۲).

MicroRNAها به‌عنوان تنظیم‌کننده‌های درونی و پیام‌های انتشار یابنده (diffusible signals)، برهم‌کنش‌های سلول به سلول و برهم‌کنش‌های سلول به ماتریکس خارج سلولی از عوامل برون سلولی می‌باشند که در تنظیم رفتار پروژنیتورهای عصبی دخیل می‌باشند. سیگنال‌های انتشاریابنده درون بافت حالت گرادیانی دارند. بنابراین هر موقعیتی از سیستم عصبی مرکزی در حال تکوین در معرض ترکیب خاصی از سیگنال‌های متعدد می‌باشد. یک گروه عمده از مولکول‌هایی که نقش کلیدی در تنظیم تکثیر سلولی و تمایز سلولی بر عهده دارند، فاکتورهای رشد می‌باشند. ماتریکس خارج سلولی یکی دیگر از عواملی است که نقش اساسی در تنظیم رفتار پروژنیتورهای عصبی برعهده دارد. تغییرات در ترکیبات غشا و خاموش ماندن برخی ژن‌ها باعث ایجاد ناهنجاری‌های قشری و نقص در مهاجرت سلولی می‌گردد (۳). لذا می‌توان با به‌کاربردن ترکیبات اگزوژن، تغییرات رفتار تکوینی سلول‌های پروژنیتور عصبی را مطالعه نمود و در مواردی مانند بیماری‌های تحلیل برنده عصبی، آلزایمر، پارکینسون، ام اس و نقایص مادرزادی رشد و نمو CNS از این نتایج بهره برد (۴ و ۵). از جمله این موارد بیماری‌هایی نظیر ام اس (Multiple Sclerosis, MS) و آلزایمر(Alzheimer disease, AD) است.

ام اس یک بیماری التهابی CNS است که بیش از یک میلیون نفر درگیر آن هستند. تخریب سلول گلیال الیگودندروسیت و غلاف میلینی نورون‌های CNS اثر پاتولوژیک MS است. MS یک بیماری خود ایمنی در CNS است که در اثر هجوم سلول‌های ایمنی (T-cell) ها به غلاف‌های میلینی دارای آنتی‌ژن حساس اتفاق می‌افتد. کورکومین با مهار اینترلوکین -IL 12 و پیام رسانی آن در T-cell ها می‌تواند به درمان MS و سایر بیماری‌های التهابی وابسته کمک کند. التهاب مغز در بیماران آلزایمری به‌واسطه افزایش سایتوکسین‌ها و میکروگلیال‌های فعال شده، مشخص می‌شود. استفاده از داروهای ضد آلزایمری مانند NSAID در دراز مدت کاهش خطرات AD را به‌همراه دارد. اما اثرات جانبی آن مسمومیت گوارشی، کلیوی و کبدی است. یک جایگزین این دارو، کورکومین است (۵ و۶). مشخص شده است که کورکومین باعث کاهش آسیب‌های اکسیداتیو و آمیلوئید در موش آلزایمری می‌شود (۶). دوزهای بالا و پایین کورکومین موجب کاهش پروتئین‌های اکسید شده و IL-12 به‌عنوان یک سایتوکسین پیش التهابی در مغز می‌گردد. در دوزهای کم، کورکومین موجب کاهش فاکتور اسیدی نشانگرهای گلیال استروسیتی شده و کاهش پیش سازهای آمیلوئیدی در لایه‌های عصبی نشان دهنده کارایی کورکومین در پیشگیری از آلزایمر است (۴ و۶). لذا بررسی اثرات کورکومین در افزایش بقا سلول‌های عصبی و همچنین تمایز آنها به سلول‌های گلیال، احتمالا می‌تواند در جلوگیری و بهبود این بیماری‌های عصبی موثر باشد. مطالعات آماری نشان داده است که میزان بیماریهای تحلیل دهنده‌ی عصبی در جوامع هندی، به‌واسطه استفاده سنتی این جوامع از زرد چوبه که ماده اصلی سازنده آن کورکومین می‌باشد، به‌طور فاحشی نسبت به جوامع اروپایی وآمریکایی پایین‌تر می‌باشد (۷ و ۸). از گذشته در مناطقی مانند هند و آسیای جنوب شرقی از زردچوبه به‌عنوان درمان‌گر بیماری‌های مرتبط با جراحات و التهابات استفاده می‌شده است (۲).

کورکومین اولین بار در سال ۱۸۱۵ توسط Vogel خالص و جداسازی شد و در سال ۱۸۷۰ توسط Daube به‌صورت کریستال و پودر درآمد و نام شیمیائی کورکومین "دی فرو لوئیل متان" می‌باشد (۴). منبع اصلی کورکومین ریزوم و ریشه‌های زیر زمینی گیاه *Curcuma longa* (زرد چوبه) می‌باشد. آزمایشات نشان داده است که کورکومین دارای اثرات ضد استرس اکسیداتیو، ضد التهاب و ضد سرطان می‌باشد. این ماده در فرایندهایی مانند تکثیر سلولی، تمایز و مهاجرت سلولی نیز نقش ایفا می‌کند. این طیف گسترده عمل‌کردی کورکومین به‌واسطه بر هم کنش آن با مسیرهای پیام دهی درون سلولی می‌باشد (۶). همچنین توانایی بالای کورکومین در جذب و جمع آوری رادیکال‌های آزاد و مهار التهاب آن را به‌عنوان ماده شیمیایی مهار کننده سرطان و مهار رشد تومور مطرح می سازد (۹). کورکومین

www.SID.ir

Archive of SID

در غلظت‌های بالا رادیکال‌های آزاد را جمع آوری می کند و در غلظت‌های پایین موجب فعال سازی یا مهار یک یا چند مسیر انتقال پیام در سلول می‌شود. در سلول‌های سرطانی، کورکومین می‌تواند مسیرهای پیام رسانی مرتبط با فاکتورهای رشد نظیر کینازهای خارج سلولی و پروتئین کیناز C را مهار کند (۹). همچنین یافته‌های اخیر نشان داده است که کورکومین می تواند آسیب‌های اکسیداتیو و نقایص ذهنی و حافظه‌ای مرتبط با پیری را کاهش دهد و همچنین نورون‌های هیپوکامپ را از محرک‌های سمی و جراحات مکانیکی محافظت نماید (۱۰).

مشاهدات نشان داده است که کورکومین باعث تنظیم بیان انواع کانال‌های پروتئینی انتقال آب (آکوآپورین ها) در اندام‌هایی مانند مغز و کلیه می‌گردد. کانال‌های آکواپورینی، پروتئین‌های عرض غشایی (transmembrane) می‌باشند که به‌عنوان کانال‌های عبور دهنده آب مطرح می‌باشند (۱۱). کانال‌های آکواپورینی واقع بر روی شبکه‌ی کوروئیدی مغز نقش مهمی در تولید و باز جذب مایع مغزی- نخاعی(cerebrospinal fluid- CSF) دارند و بیان این پروتئین‌ها در بیشتر بیماری‌هایی که هومئوستازی (ثبات محیط داخلی) آب میان بافتی و درون بطنی مختل می‌شود، تغییر می‌کند (۱۲) لذا می‌توان نقش کورکومین را در پیشگیری و بهبود بیماری‌های مغزی و یا سکته و ایسکمی که مرتبط با CSF می‌باشد، در نظر گرفت. این طیف وسیع اثرات کورکومین موجب شد تا در تحقیق حاضر اثر کورکومین به‌عنوان ماده موثره گیاه دارویی زردچوبه بر سلول‌های پروژنیتور عصبی کورتکس جنین رت بررسی گردد.

مواد و روش‌ها

کشت سلولی: رت‌های باردار در روز حاملگی ۱۵/۵ با استفاده از تزریق درون صفاقی دوز بالای سدیم پنتوباربیتال کشته شدند. سپس رحم‌ها در شرایط کاملا استریل خارج شده و به پتری‌های حاوی PBS (phosphate buffer saline) سرد منتقل و جنین‌های ۱۵/۵ روزه از رحم خارج شدند. پس از برداشتن ناحیه سر و خارج ساختن مغزها، لایه مننژ برداشته شد و در ادامه اپی‌تلیوم قشر مغز (کورتکس) جنین‌ها جدا و به قطعات کوچک تقسیم و با استفاده از آنزیم تریپسین- EDTA (Invitrogen) به حالت سوسپانسیون سلولی درمی‌آمدند. تهیه سوسپانسیون به همراه چرخاندن آرام محلول در دمای اتاق به‌مدت ۲۰ دقیقه ادامه یافته و در نهایت با افزودن فاکتور مهارکننده تریپسین (۱/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر، Invitrogen) فرایند هضم آنزیمی پایان پذیرفت. سوسپانسیون سلولی در ظرف ۲۴ خانه‌ای (Nunc) حاوی محیط کشت DMEM/ F12 (Dulbecco's modified Eagle's medium) و مکمل N2 (هر دو ازInvitrogen) و یک درصد آنتی‌بیوتیک (Invitrogen) و همچنین فاکتورهای رشد FGF-2، (۲۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر) و EGF (۲۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر) (هر دو Invitrogen)، در شرایط ۵ درصد دی اکسید کربن و ۹۵ درصد هوا و دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد کشت داده شدند. در ادامه، سلول‌ها با غلظت‌های متفاوت کورکومین (۰/۱، ۰/۵، ۱ میکرومولار) مورد تیمار قرار گرفت.

تست MTT: رشد و بقای سلولی با استفاده از روش بیوشیمیایی MTT (Sigma) سنجیده شد. در این روش احیا MTT منجر به تشکیل کریستال‌های فورمازان می‌شود که این امر در نتیجه تاثیر آنزیم‌های دهیدروژناز میتوکندری‌های سلول‌های زنده صورت می‌گیرد. این روش به‌عنوان یک شاخص بقای سلولی مورد استفاده می‌گیرد. کریستال‌های فورمازان ایجاد شده سپس در ایزوپروپانول اسیدی حل و یک محلول بنفش رنگ ایجاد می‌شود. در این مرحله پس از افزودن سوسپانسیون سلولی تهیه شده در ظرف‌های ۲۴ خانه‌ای، سلول‌ها با غلظت‌های متفاوتی از کورکومین (۰/۱، ۰/۵، ۱ میکرومولار) به مدت ۲۴ ساعت تیمار شدند. پس از گذشت این زمان، محیط کشت حاوی کورکومین خارج شده و سلول‌ها دو بار توسط PBS شستشو شدند. سپس به هر خانه محلول PBS حاوی MTT (۰/۵ میلی‌گرم) اضافه و به‌مدت ۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. سپس سلول‌ها در حلال دی متیل سولفوکسید (DMSO) و ایزوپروپانول (نسبت ۱:۱) قرار گرفته و رنگ بنفش فورمازان حاصل گردید. میزان جذب نوری این محلول با استفاده از روش طیف سنجی (اسپکتروفتومتری) سنجیده و جذب در طول موج ۵۷۰ نانومتر خوانده شد.

ایمونوسیتوشیمی: سلول‌های پروژنیتور عصبی تیمار شده با غلظت‌های متفاوت کورکومین به حالت سوسپانسیون سلولی درآورده شدند. سپس سوسپانسیون سلولی به ظرف‌های اندود شده توسط poly-L-lysine (Sigma) منتقل گردیدند. بعد از گذشت ۲۴ ساعت و چسبیدن سلول‌ها به کف ظرف، محیط کشت رویی سلول‌ها خارج شده و بعد از شستشوی سلول‌ها با PBS، با پارافرمالدهید ۴ درصد در pH=۷/۳ فیکس شدند.

www.SID.ir

Archive of SID

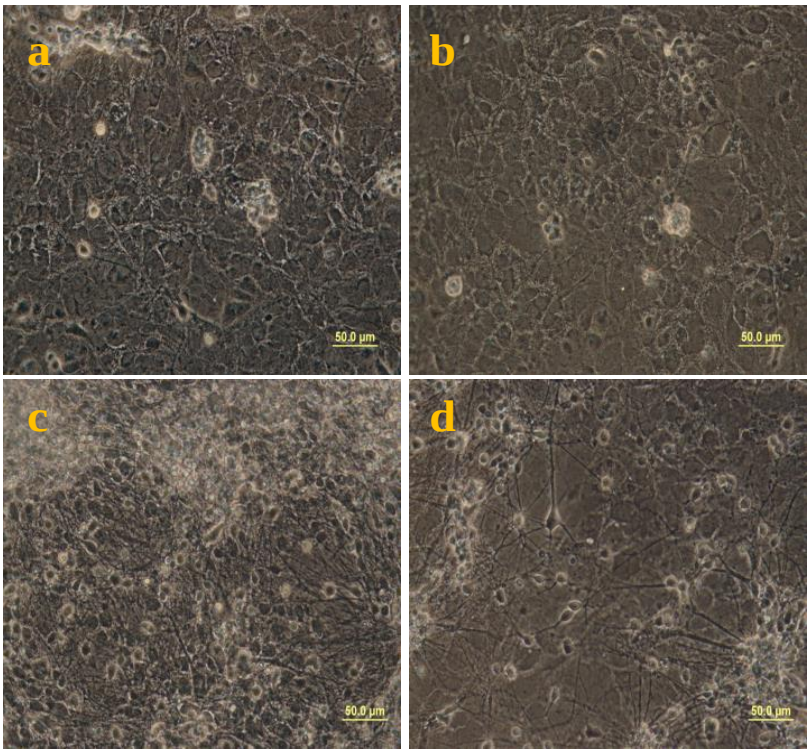
در ادامه سلول‌ها با تریتون X-۱۰۰ (Sigma) نفوذپذیر و با BSA آنتی‌ژن‌های غیراختصاصی بلوکه شدند. در نهایت سلول‌ها با محلول حاوی آنتی‌بادی اولیه GFAP (Abcam) به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد انکوبه گردیدند. سلول‌ها بعد از شستشو با TBS به‌مدت ۱ساعت دردمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، با آنتی‌بادی ثانویه کونژوگه با Cy3 (۱/۳۰۰ Abcam) انکوبه شدند. در نهایت هسته سلول‌ها با PI (Propidium Iodide) (Sigma ۱/۱۵۰۰۰) رنگ‌آمیزی و عکس‌برداری صورت گرفت.

آنالیزهای آماری: نرم‌افزار SPSS برای آنالیزهای آماری مورد استفاده قرار گرفت. آزمون توسط One-way ANOVA و Tukey's Post hoc صورت گرفت. داده‌ها به شکل میانگین mean ± SEM بیان و معنی‌داری تفاوتها با P<0.05، P<0.01 و P<0.001 نشان داده شدند.

نتایج

نتایج آزمایشات نشان داد که در غلظت‌های مختلف کورکومین مورد استفاده، تراکم سلول‌های پروژنیتور عصبی کشت شده متفاوت می‌باشد. بررسی فتومیکروگراف‌های فاز کنتراست تهیه شده از نمونه‌های مختلف نشان داد که تراکم سلولی در میدان‌های دید مختلف در نمونه‌های تیمار شده با کورکومین، با نمونه کنترل از لحاظ کیفی متفاوت می باشد (شکل ۱). در نمونه تیمار شده با کورکومین در غلظت ۰/۱ و ۱ میکرومولار اکثرا آستروسیت‌های پهن کف ظرف را پوشانده و استطاله‌های کمتری در آن‌ها دیده و کلونی‌های کمتری برروی آن‌ها تشکیل شد (شکل۱b, ۱d). در حالی‌که در نمونه های تیمار شده با دوز ۰/۵ میکرو مولار کلونی‌های سلولی همراه با استطاله‌های فراوان بر سطح آن‌ها دیده می شود (شکل ۱c). این موضوع حاکی از آن است که تکثیر سلولی در غلظت ۰/۵ میکرو مولار به‌طور چشمگیری افزایش یافته و لایه بندی سلولی تشکیل شده است که می‌تواند تحت تاثیر کورکومین باشد و در مقایسه با گروه کنترل (شکل ۱a) این تاثیر قابل توجه است.

سلول‌های پروژنیتور عصبی که در حالت تک لایه‌ای کشت شده بودند از لحاظ انعکاس نوری تفاوت داشتند، به‌طوری‌که آستروسیت‌های چسبیده به کف ظرف، تیره و کلونی‌های رویی شفاف دیده می شدند و در فتومیکروگراف‌های فازکنتراست سفید رنگ و دارای استطاله‌های فراوانی بودند (شکل۱).

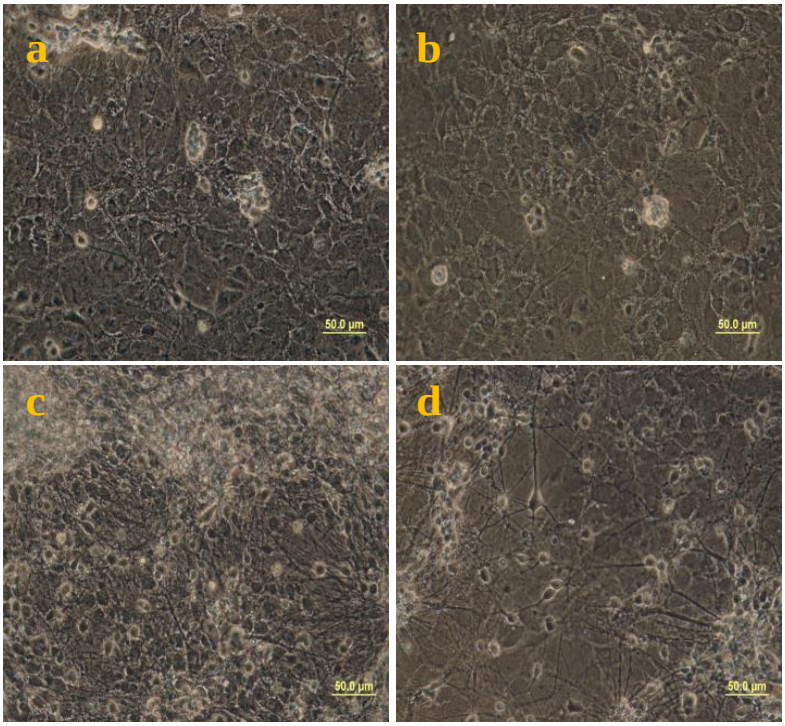


شکل۱: تاثیر غلظت‌های مختلف کورکومین برمورفولوژی پروژنیتورهای عصبی. (a) سلول‌های پروژنیتور عصبی گروه کنترل که تحت تاثیر هیچ تیماری از کورکومین قرار نگرفته‌اند. (b) فتومیکروگراف سلول‌های پروژنیتور عصبی کشت شده که در معرض غلظت ۰/۱ میکرومولار (b)، ۰/۵ میکرومولار (c) و ۱ میکرومولار (d) کورکومین قرار گرفته‌اند.

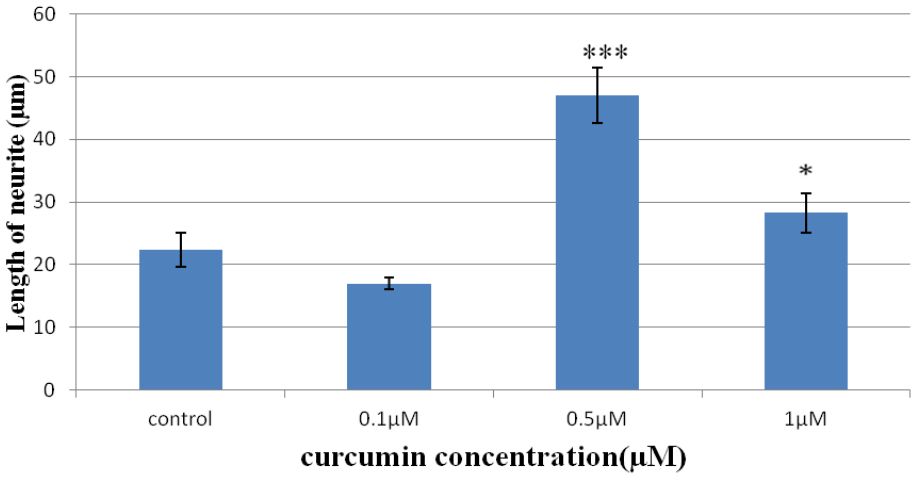
www.SID.ir

Archive of SID

نتایج بدست آمده حاکی از آن است که احتمالا غلظت‌های مختلف کورکومین تاثیرات متفاوتی بر طول استطاله‌ها داشته، به طوری‌که بیشترین طول استطاله‌ها و تراکم آن‌ها در غلظت ۰/۵ میکرو مولار کورکومین دیده می شد (شکل ۲c) که به‌طور معنی‌داری از گروه کنترل و غلظت‌های دیگر کورکومین متفاوت بود. طبق داده‌های به‌دست آمده کوتاه‌ترین استطاله‌ها در غلظت ۰/۱ میکرو مولار کورکومین مشاهده شد (شکل ۲ و نمودار ۱). در این مورد نیز در مقایسه با گروه کنترل (شکل ۲c)، به‌نظر می‌رسد تغییر در طول استطاله ها تحت تاثیر کورکومین است.



شکل۲: تاثیر غلظت‌های مختلف کورکومین برطول استطاله‌های آستروسیت‌های $GFAP^+$ مشتق از سلول‌های پروژنیتور عصبی. (a) آستروسیت‌های $GFAP^+$ گروه کنترل که تحت تاثیر هیچ تیماری از کورکومین قرار نگرفته‌اند. فتومیکروگراف آستروسیت‌های $GFAP^+$ مشتق از سلولهای پروژنیتور عصبی کشت‌داده شده که در معرض غلظت ۰/۱ میکرومولار (b)، ۰/۵ میکرومولار (c) و ۱ میکرومولار (d) کورکومین قرار گرفته‌اند.

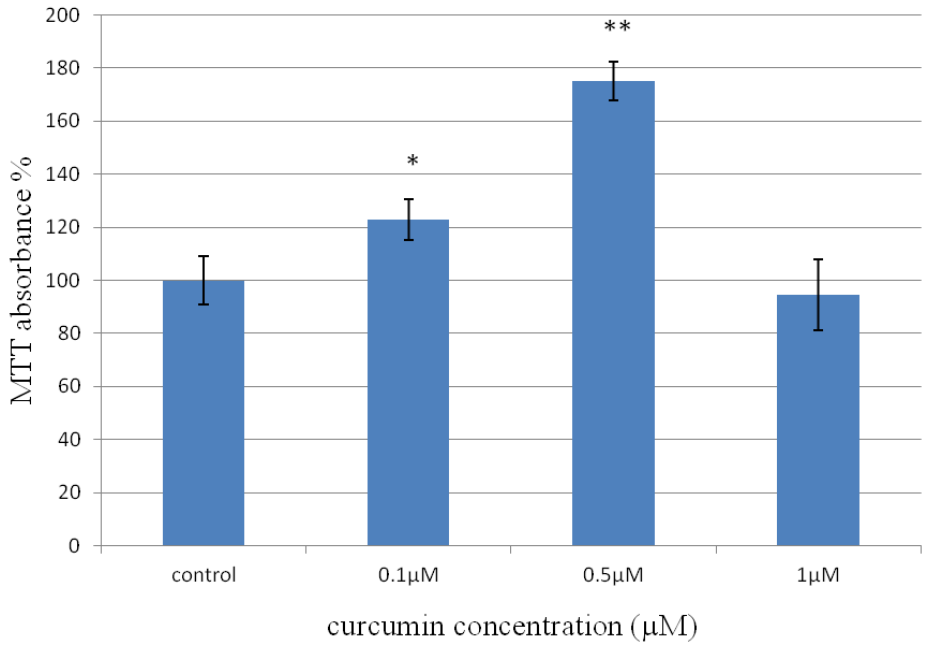


*نمودار۱: تاثیر غلظت‌های متفاوت کورکومین بر طول استطاله‌های آستروسیت‌های $GFAP^+$ مشتق از سلول‌های پروژنیتور عصبی. از لحاظ آماری تفاوت معنی‌داری بین گروه‌های تیمار شده با غلظت‌های ۰/۵ و ۱ میلی‌مولار کورکومین نسبت به گروه کنترل مشاهده می‌شود. داده‌ها به شکل میانگین ±S.E.M نشان داده شده‌اند. $p<0.001$ *** و $p<0.05$ **

www.SID.ir

Archive of SID

نتایج تست بیوشیمیایی MTT بر اساس میزان معنی داری(نمودار ۲) نشان داد که غلظت های مختلف کورکومین بر بقای سلولی نوروپروژنیتورها موثر می باشد. کورکومین در دوز 0.1 میکرو مولار نسبت به گروه کنترل تاثیر معنی داری نداشت در حالیکه کورکومین در غلظت 0.5 میکرو مولار ، موجب رشد و بقای سلولی با معنی داری $p<0.01$ ** نسبت به گروه کنترل گردید. همچنین کورکومین در دوز ۱ میکرو مولار ، رشد و بقای سلولی را با معنی داری $p<0.05$ * نسبت به گروه کنترل کاهش داد (نمودار۲).



*نمودار۲: تاثیر غلظت‌های متفاوت کورکومین بر میزان بقای سلولی با استفاده از سنجش MTT . از لحاظ آماری تفاوت معنی‌داری بین گروه‌های تیمار شده با غلظت‌های ۰/۱ و ۰/۵ میکرومولار کورکومین با گروه کنترل مشاهده می‌شود. داده‌ها به شکل میانگین±S.E.M نشان داده شده‌اند. $p<0.05$ *و $p<0.01$ ** معنی دارند.*

بحث

بر اساس نتایج به‌دست آمده و داده‌های آماری به‌نظر می‌رسد که کورکومین باعث افزایش بقای سلولی و رشد سلول‌های نوروپروژنیتور عصبی می‌گردد و تمایز سلول‌ها را به سمت آستروسیت‌ها پیش می‌برد. با وجود این تاثیرات متفاوت غلظت‌های مختلف کورکومین نیز قابل توجه است، به‌طوری‌که گاهی اثرات دوگانه بر روی رشد و تکثیر و ماندگاری سلول‌های مشتق از سلول‌های نوروپروژنیتور دارد که قابل تفسیر می‌باشد (۹ و ۱۳). در معدود تحقیقات مشابه، اثرات کورکومین وابسته به زمان ذکر شده است به‌طوری‌که با افزایش طول مدت تیمار، تاثیر تکثیری کورکومین نیز بیشتر می‌شود (۱۰)

عقیده بر این است که بیماری‌های التهابی سیستم عصبی مرکزی همراه با گلیوزیز آستروسیتی و میکروگلیایی می‌باشد. در بیماری‌های التهابی نظیر آلزایمر، پلاک‌های آمیلوئیدی توسط گلیوزیزهای آستروسیتی احاطه می گردد که منجر به پیشرفت بیماریهای تحلیل برنده عصبی می گردد (۱۴). لیم و همکاران (۱۴) نیزدرآزمایشی، اثرکورکومین را در بهبود روند ترمیم عصبی و نورون‌زایی(Neurogenesis) درموشهای مبتلا به نقص حافظه و بیماری آلزایمر نشان دادند. مطالعات نشان داده است که تاثیرات مثبت کورکومین در پیشگیری و کاهش اثرات بیماری‌های تحلیل برنده عصبی نیز به‌واسطه مهار تکثیر گلیاها و آستروسیت‌ها می‌باشد. آزمایشات *in vivo* که در موش‌های ترانس ژن آلزایمری صورت گرفته، نشان داده است که کورکومین منجر به کاهش نشانگر آستروسیتی GFAP می گردد (۱۵). نتایج حاکی از آن است که کورکومین اثرات وابسته به دوز بر روی تکثیر آستروسیت‌ها دارد به‌طوری‌که در دوزهای بالا باعث کاهش تکثیر و بقای آستروسیت‌ها می‌شود. کورکومین نیز مانند سایر ترکیبات فیتوشیمیایی، اثرات وابسته به دوز دارد. این اثرات در دوزهای پایین با افزایش تکثیر و بقای سلولی همراه

www.SID.ir

Archive of SID

است و در دوزهای بالا سمی بوده و مهارکننده رشد است (۱۶). نشان داده شده است که کشت سلول‌های NPC تکثیرسلول‌های نروپروژنیتور را تحریک می‌کند. علاوه بر این در شرایط in vitro کورکومین با دوز موثر ۰/۵ میکرومولارموجب افزایش تعداد NPC ها و دوز بالای ۱۰ میکرومولار موجب کاهش تعداد NPC ها شده است. درنتیجه دوزهای پایین کورکومین (۰/۱ و ۰/۵ میکرومولار) محرک تکثیرسلول‌های NPC است وغلظت‌های بالا (۱۰ و۲۰ میکرولار) برای سلول سمی است (۱۶).

همچنین اثرات دوگانه کورکومین بر روی سلول‌های سالم و سلول‌های درگیر در التهاب در سیستم عصبی نیز جالب توجه است. به‌طوری‌که در شرایط سلامت موجب تکثیر و افزایش بقا سلول‌ها می‌شود و از مرگ و میر سلول‌های نورونی وگلیال جلوگیری می‌کند و در بیماری‌های التهابی موجب کاهش سلول‌های درگیر مانند آستروسیت ها می‌شود. لذا به‌منظور جلوگیری از اثرات سمی و نوروتوکسیک غلظت‌های بالای کورکومین، در این مطالعه از غلظت‌های بسیار پایین (کمتر و مساوی ۱ میکرو مولار) استفاده شده است.

نکته جالب توجه این‌که در غلظت‌های پایین نیز برخی اثرات دوزهای بسیار بالا دیده می‌شود (۱۱). در این مطالعه به روشنی نشان داده شده که غلظت بسیار پایین کورکومین (۱ میکرومولار) می‌تواند تکثیر آستروسیت‌های مشتق از سلول‌های پروژنیتور عصبی را کاهش دهد. در نتیجه می‌توان استنباط نمود که کورکومین احتمالا می‌تواند در جلوگیری از آستروگلیوزیز که از نشانه های بیماری‌های التهابی عصبی نظیر آلزایمر است، نقش ایفا کند.

نتیجه گیری

در این مطالعه در دوز (0.5 μM) افزایش تعداد و طول استطاله‌های آستروسیت‌ها دیده می‌شود که نشان دهنده تاثیر مثبت غلظت‌های پایین کورکومین بر افزایش کارآیی سد خونی – مغزی و جلوگیری از التهاب از طریق تغییر در تعداد و مورفولوژی سلول‌های گلیال به‌ویژه آستروسیت‌ها می‌باشد. تکثیر سلول‌های نوروپروژنیتور در اثر تیمار با کورکومین در دوز (0.5 μM) کاملا معنی‌دار و مشهود است. در مطالعات انجام شده نیز کاملا به این موضوع تاکید شده است. احتمالا مسیری که از طریق آن کورکومین موجب افزایش سرعت تکثیر نروپروژنیتورها می‌شود، مسیر ERKs و p38 MAP kinase است (۱۰). کورکومین با فعال کردن و فسفریله کردن کینازهای فوق می‌تواند تکثیر سلول‌های پروژنیتور عصبی را افزایش دهد که این موضوع از طریق مهار کننده‌های ERKs و p38 MAP kinase مشخص شده که نشان می‌دهد عمل‌کرد زیستی کورکومین بر NPCs نیازمند حضور و فعال بودن آنزیم‌های مذکور می باشد (۸و۱۷). همچنین نشان داده شده است که کورکومین در غلظت موثر، ازطریق مسیر پیام‌رسانی MAP کینازهایی نظیر P38 و ERK در سلول‌های NPC، روند تکثیر را افزایش می‌دهد. درنتیجه احتمال می‌رود کورکومین ضمن افزایش سرعت چرخه سلولی و تکثیرسلول‌های پروژنیتورمشتق ازکورتکس جنین، می‌تواند در روند تمایز و افزایش بقای این سلولها نیز تاثیر داشته باشد. همچنین نشان داده شده که کورکومین بر کشت سلول‌های سرطانی اثر مهاری دارد و تکثیر آن‌ها را مهار می‌کند، اما مکانیسم این تاثیر مشخص نشده و احتمالا به‌خاطر نحوه اثر کورکومین در شرایط استرس سلولی می باشد (۱۶و۱۸). بنابراین کورکومین می‌تواند علاوه بر افزایش بقا و تکثیر سلول‌های پیش ساز عصبی و سلول‌های مشتق شده از آن، پاسخ‌های سازشی در شرایط استرس را نیز در سلول‌ها القا نماید.

همچنین در رده‌های سلول‌های سرطانی از جمله رده سلولی گلیوما (C6) رده کارسینومای جنینی (P19) و رده سلولی هپاتومای موش تحت تیمار با دوز ۰/۵ میکرومولار کورکومین اثرتکثیری کورکومین درسلول‌های سرطانی دیده نمی‌شود و فقط مختص سلول‌های NPC است (۱۶).

همان‌طورکه در شکل۱ دیده می‌شود، افزایش طول استطاله‌های سلول‌های گلیال بیانگرتاثیرکورکومین برمورفولوژی و عمل‌کرد NPC ها می‌باشدکه مطابق با مفهوم تمایز است و در مقایسه با گروه کنترل تاثیر مثبت کورکومین مشهود است. همچنین در مورد غلظت ۰/۵ میکرومولار طبق شکل ۱ و نمودار۱ بهترین پاسخ در این غلظت دیده می‌شود.

تشکر و قدردانی

مطالعه حاضر، تحت حمایت دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم وتحقیقات تهران و باهمکاری و امکانات آزمایشگاهی دانشگاه خوارزمی (تربیت معلم) تهران انجام پذیرفته است. بدین‌وسیله از زحمات کلیه همکاران وتکنسین‌های آزمایشگاه بیولوژی تکوینی دانشگاه خوارزمی و به‌ویژه جناب آقای سیامک یاری تقدیر و تشکر می‌گردد.

www.SID.ir

Archive of SID

منابع

1. Bhutani MK, Bishnoi M, Kulkarni SK. Anti-depressant like effect of curcumin and its combination with piperine in unpredictable chronic stress-induced behavioral, biochemical and neurochemical changes. Pharmacol Biochem Behav. 2009; 92:39-43.

2. Bishnoi M, Chopra K, Kulkarni SK. Protective effect of Curcumin, the active principle of turmeric (*Curcuma longa*) in haloperidol-induced orofacial dyskinesia and associated behavioural, biochemical and neurochemical changes in rat brain. Pharmacol Biochem Behav. 2008; 88:511-22.

3. Chen,H. Inhibition of the c-Jun N-terminal kinase(JNK) signaling pathway by curcumin. Oncogene. 1998; 17:173-179.

4. Kim SJ, Son TG, Park HR, Park M, et al. Curcumin stimulates proliferation of embryonic neural progenitor cells and neurogenesis in the adult hippocampus. J Biol Chem. 2008; 283:14497-505.

5. Aggarwal BB, Kumar A, Bharti AC. Anticancer potential of curcumin: preclinical and clinical studies. Anticancer Res. 1991; 23(1A): 363–398.

6. Subramanian M, Sreejayan, Rao MN, Devasagayam TP, et al. Diminution of singlet oxygen-induced DNA damage by curcumin and related antioxidants. Mutat Res. 1994*;* 311:249–255.

7. Kulkami S, Dhir A, Akula KK. Potentials of curcumin as an antidepressant. Scientific World Journal. 2009; 9:1233-41.

8. Aggarwal S, Takada Y, Singh S, Myers JN, et al. Inhibition of growth and survival of human head and neck squamous cell carcinoma cells by curcumin via modulation of nuclear factor-kappaB signaling. Int J Cancer. 2004; 111(5): 679–692.

9. Dhandapani KM, Mahesh VB, Brann DW. Curcumin suppresses growth and chemoresistance of human glioblastoma cells via AP-1 and NFkappaB transcription factors. JNeurochem. 2007; 102(2): 522–538.

10. Thiyagarajan M, Sharma SS. Neuroprotective effect of curcumin in middle cerebral artery occlusion induced focal cerebral ischemia in rats. Life Sci. 2004; 74: 969–985.

11. Cole GM, Teter B, Frautschy SA. Neuroprotective effects of curcumin. Adv Exp Med Biol.2007; 595: 197–212.

12. Jiang J, Wang W, Sun YJ, Hu M, et al. Neuroprotective effect of curcumin on focal cerebral ischemic rats by preventing blood-brain barrier damage. *Eur J* Pharmacol. 2007; 561: 54–62.

13. Holder GM, Plummer JL, Ryan AJ. The metabolism and excretion of curcumin (1,7-bis-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-1,6-heptadiene-3,5-dione) in the rat. Xenobiotica. 1978; 8:761–768.

14. Lin JK. Molecular targets of curcumin: Adv Exp Med Biol. 2007; 595:227-43.

15. Griffin WST, Sheng JG, Royston MC, Gentleman SM, et al. Glial-neuronal interactions in Alzheimer's disease: the potential role of a 'cytokine cycle' in disease progression. Brain Pathol. 1998; 8:65–72.

16. Mattson MP, Son TG, Camandola S.Viewpoint: Mechanisms of action and therapeutic potential of neurohormetic phytochemicals. Dose Response. 2009; 5(3): 174-182.

17. Mattson MP, Cheng A. Neurohormetic phytochemicals: Low dose toxins that induce adaptive neuronal stress responses. Trends Neuroscience. 2006; 29: 632-641.

18. Chen H, Zhang ZS, Zhang YL, Zhou DY. Anticancer Res.1999; 19: 3675–3680.

19. Ambegaokar SS, Wu L, Alamshahi K, et al. Curcumin inhibits dose-dependently and time-dependently neuroglial cell proliferation and growth. Neuro Endocrinol Lett. 2003; 24:469.

20. Shishodia S, Sethi G, Aggarwal BB. Curcumin: getting back to the roots.Ann N Y AcadSci. 2005; 1056: 206–217.

21. Thiyagarajan M, Sharma SS. Neuroprotective effect of curcumin in middle cerebral artery occlusion induced focal cerebral ischemia in rats. Life Sci. 2004; 74: 969–985.

22. Jiang J, Wang W, Sun YJ, Hu M, et al. Neuroprotective effect of curcumin on focal cerebral ischemic rats by preventing blood-brain barrier damage. *Eur J* Pharmacol. 2007; 561: 54–62.

23. Hoffert JD,Wang G, Pisitkun T, Shen RF, et al. An automated platform for analysis of phosphoproteomic datasets: application to kidney collecting duct phosphoproteins. J Proteom Res 6. 2007; :3501–3508.

24. Unnikrishnan MK, Rao MN. Curcumin inhibits nitriteinduced methemoglobin formation. FEBS Lett. 1992; 301: 195–196.

25. Ravindranath V, Chandrasekhara N. Absorption and tissue distribution of curcumin in rats. Toxicology. 1980; 16: 259–265.

26. Lim GP, Chu T, Yang F, Beech W, et al. The curry spice curcumin reduces oxidative damage and amyloid pathology in an Alzheimer transgenic mouse. J Neurosci . 2001; 21(21): 8370–8377.

www.SID.ir

Archive of SID

27. So JK, Tae GS, Hee RP, Mikyung P, et al. Curcumin Stimulates Proliferation of Embryonic Neural Progenitor Cells and Neurogenesis in theAdult Hippocampus. THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY NO. 2008; 283(21): 14497–14505.

28. Ganguli M, Dodge HH, Chen P, Belle S, et al. Ten-year incidence of dementia in a rural elderly UScommunity population: the MoVIES Project. Neurology. 2000; 54:1109–1116.

29. Goel A, Kunnumakkara AB, Aggarwal BB. Biochem. Pharmacol. 2008; 75(4): 787–809.

30. Ammon HPT, Walh MA. Pharmacology of Curcuma longa.Planta Med. 1991; 57: 11-31.

www.SID.ir

Archive of SID

Journal of Cell & Tissue (JCT) *Original Article*
Winter 2014; 4(4): 435- 443

Effect of Curcumin on Rat Embryonic Neuroprogenitor Cells Under *in Vitro* Conditions

Rajabi M, M.D [1*], Parivar K, Ph.D [1], Nabiouni M, Ph.D [2], Yaghmaii P, Ph.D [1]

1. Department of biology, faculty of science, Islamic azad university, science and research branch,Tehan, Iran
2. Department of biology, faculty of science, Kharazmi university, Tehran,Iran

* Email corresponding author: majidrjb@yahoo.com

Received: 16 Oct. 2012 Accepted: 1 Jan. 2013

Abstract

Aim: Curcumin, a yellow pigment obtained from turmeric (*Curcumina longa*). It is a dietary polyphenol that has been reported to possess anticancer, anti-inflammatory, and antioxidant properties. Curcumin is potent radical scavenger and has key role in cell death prevention and because of its antioxidant ability, curcumin has possible role in protection against neurodegenerative diseases. In this study we evaluate the effects of curcumin on rat embryonic neuroprogenitor cells viability and proliferation.

Material and methods: In this study brain cortex of 15.5 day old embryos of Wistar rat dissected out and enzymaticaly dissociated to form single cell suspension. Cell suspension seeded in DMEM/F12 medium supplemented with N2, 1% antibiotic and mitogenes (10 $ng.ml^{-1}$EGF and 20 $ng.ml^{-1}$ b-FGF). Cells were treated with different concentrations of curcumin (0.1, 0.5, and 1μM). Cell viability was evaluated with MTT assay and immunocytochemical analysis was performed to evaluate astrocytic marker (GFAP). The data were analyzed with One-way ANOVA with Tukey's post hoc test.

Results: curcumin (0.5 μM) enhanced astrocytes neurite size ($p<0.001$) and also has significante effects on neuroprogenitor cells differentiation in culture media.

Conclusion: Data suggest that curcumin enhanced neuroprogenitor cells viability, growth and promoted differentiation of these cells in to astrocytes.

Keywords: Astrocytes, Curcumin, Neuroprogenitor cells

www.SID.ir