

# القاء آپوتوز و افزایش بیان ژن‌های *P53* و *PARP* در سلول‌های کارسینومای آناپلاستیک تیروئید انسان (SW-1736) به وسیله کورکومین (Curcumin)

خلیل خاشعی ورنامخواستی<sup>۱</sup>، لیلا روحی<sup>۲\*</sup>، سمیه رئیسی<sup>۳</sup>

## مقاله پژوهشی

**مقدمه:** کارسینومای آناپلاستیک تیروئید (ATC)، یکی از انواع بدخیمی‌های غده تیروئید است که در نتیجه درگیری سلول‌های آناپلاستیک این غده ایجاد می‌گردد. این نوع بدخیمی به شدت تهاجمی بوده و مبتلایان دارای پاسخ به درمان ضعیفی هستند. در این مطالعه اثر کورکومین بر میزان آپوتوز و بیان ژن‌های *P53* و *PARP* در رده سلولی کارسینومای آناپلاستیک تیروئید انسان (SW-1736) مورد بررسی قرار گرفت. کورکومین جزء اصلی و فعال موجود در ریزوم گیاه زرد چوبه (*Curcuma longa*) است که دارای اثرات آنتی‌اکسیدانی، ضد التهابی، ضد تکثیر و پروآپتوزی می‌باشد.

**روش بررسی:** مطالعه به صورت تجربی در مهر ماه ۱۳۹۵ در مرکز تحقیقات سلولی-تکوینی دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد انجام شد. سلول‌های رده SW-1736 با غلظت‌های مختلف کورکومین شامل ۰، ۲/۵، ۵، ۷/۵ و ۱۰ میکرومولار برای بررسی آپوتوز و غلظت‌های ۲/۵، ۵ و ۱۰ میکرومولار برای بررسی بیان ژن‌های *P53* و *PARP* ظرف مدت ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت انکوبه شدند. سپس میزان وقوع آپوتوز با استفاده از دستگاه فلوسیتومتری و کیت آنکسین- پروپیدیوم یدید (Annexin-PI)، میزان بیان ژن‌های *P53* و *PARP* از طریق آنالیز داده‌های Real Time-PCR و آنالیز آماری با استفاده از آزمون ANOVA از طریق نرم افزار SPSS و هم چنین برنامه Excel مورد بررسی قرار گرفت.

**نتایج:** نتایج حاصل از این تحقیق حاکی از آن است که میزان القاء آپوتوز در رده سلولی (SW-1736) با افزایش غلظت کورکومین به صورت وابسته به دوز و زمان افزایش می‌یابد. هم چنین تیمار با کورکومین سبب افزایش معنی داری در بیان ژن‌های *P53* و *PARP* در برخی از گروه‌های آزمایشی نسبت به گروه کنترل گردید. ( $P=0.032$ )

**نتیجه‌گیری:** کورکومین از طریق القاء بیان ژن‌های دخیل در مسیر آپوتوز اثر مهار بر رشد، تکثیر و تهاجم سلول‌های سرطانی آناپلاستیک تیروئید دارد. لذا به نظر می‌رسد زمینه تحقیقاتی مناسبی برای بهره برداری از گیاه زردچوبه در کنترل و درمان کارسینومای آناپلاستیک تیروئید انسان وجود داشته باشد.

**واژه‌های کلیدی:** کورکومین، آپوتوز، *PARP*، SW-1736، *P53*

**ارجاع:** خاشعی ورنامخواستی خلیل، روحی لیلا، رئیسی سمیه. القاء آپوتوز و افزایش بیان ژن‌های *P53* و *PARP* در سلول‌های کارسینومای آناپلاستیک تیروئید انسان (SW-1736) به وسیله کورکومین (Curcumin). مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد ۱۳۹۶؛ ۲۶ (۹): ۶۹-۷۵۹.

۱- گروه ژنتیک، دانشکده علوم پایه، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران

۲- گروه فیزیولوژی، دانشکده علوم پایه، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران

۳- گروه ژنتیک، دانشکده علوم پایه، دانشگاه دولتی واحد شهرکرد شهرکرد، ایران

\* (نویسنده مسئول): تلفن: ۰۹۱۲۶۰۴۳۳۰۵، پست الکترونیکی: lrouhi59@gmail.com؛ کدپستی: ۸۸۱۳۷۳۳۳۹۵



## مقدمه

کارسینومای آناپلاستیک تیروئید (ATC)، به عنوان یک بیماری متهاجم با سرعت رشد بالا شناخته می‌شود که قادر است به بافت‌های محلی اطراف هجوم برد و یا این که به بافت‌های دوردست (ریه و استخوان) متاستاز دهد. آن چه که از لحاظ بالینی مشاهده می‌گردد؛ یک توده در حال رشد در ناحیه قدامی گردن همراه با دیسفاژی و تغییر در صدا می‌باشد. به علاوه مبتلایان علائم سیستماتیک نظیر بی‌اشتهایی، کاهش وزن و کاهش تنفس را دارا هستند (۱). اگر چه اکثر بدخیمی‌های تیروئیدی به راحتی تشخیص داده می‌شوند و پیش‌آگهی مطلوبی دارند، اما تشخیص کارسینومای آناپلاستیک تیروئید حتی با وجود روش‌های تشخیصی مختلف بسیار ملالت‌انگیز بوده و پیش‌آگهی مطلوبی برای آن وجود ندارد. بدخیمی آناپلاستیک تنها ۲ درصد از بدخیمی‌های مربوط به غده تیروئید را شامل می‌شود، اما به خودی خود عامل ۱۴-۳۹ درصد مرگ‌های حاصل از درگیری غده تیروئید می‌باشد (۲،۳). نسبت ابتلای زنان به مردان به چنین بدخیمی ۵ به ۱ بوده و اوج بروز آن در دهه ششم و هفتم زندگی می‌باشد (۱). عوامل مسبب ATC تاکنون به خوبی شناخته نشده‌اند. ممکن است ATC به دنبال وقوع بیماری گواتر در شخص در مناطقی که گواتر اندمیک است حاصل شود و یا این که حتی در افرادی که فاقد هرگونه پیشینه بالنی برای بیماری‌های مربوط به غده تیروئید هستند بروز کند (۴). جراحی، پرتودرمانی خارجی، شیمی‌درمانی و برداشت غده تیروئید از جمله گزینه‌های درمانی موجود برای ATC می‌باشند، که تنها توانسته‌اند مبتلایان را از مرگ ناشی از انسداد مجاری هوایی نجات دهد و قدرت بقاء را تا اندکی افزایش دهند. لذا بررسی ترکیبات جدید با منشاء طبیعی و خواص درمانی اجتناب‌ناپذیر می‌باشد (۵،۶). کورکومین ترکیب زرد رنگی است که از گیاه زرد چوبه با نام علمی *Curcuma longa* به دست می‌آید. این ماده از خانواده کورکومینوئیدها بوده و قرن‌ها است که در طب سنتی مورد استفاده قرار می‌گیرد و تاکنون اثر سمیتی از آن گزارش نشده

است (۷). گروه‌های حلقوی موجود در ساختار کورکومین، محیطی آبریز ایجاد می‌کنند. ساختار تاتومری آن نیز بر روی آبریزی و قطبیت مولکول کورکومین تاثیر گذار است. این عوامل باعث می‌شود کورکومین قادر باشد با انواع زیادی از بیو ماکرو مولکول‌ها واکنش دهد (۸).

نوع خاص ساختار کورکومین باعث شده است تا کورکومین از لحاظ عملکردی دارای پتانسیل چندگانه برای تعدیل فعالیت‌های بیولوژیکی و ملکولی باشد. این موضوع بیانگر آن است که کورکومین دارای توانایی بل‌قوه‌ای برای درمان بیماری‌هایی است که اساس مولکولی آن‌ها، مرتبط به از بین رفتن تعادل و تنظیمات ملکول‌های پیام‌رسان است. از جمله این بیماری‌ها می‌توان به سرطان اشاره نمود (۹). نتایج بسیاری از تحقیقات حاکی از آن می‌باشد که کورکومین تنظیم رشد سلول‌های سرطانی و مهار آن‌ها را با تنظیم مسیرهای پیام‌رسان حیاتی سلول نظیر؛ تاثیر روی آنزیم‌های سلولی، فعالیت آنتی‌اکسیدانی، تاثیر روی نسخه برداری ژن‌های القاء کننده مرگ برنامه ریزی شده سلول نظیر *p53* و *PARP* انجام می‌دهد (۱۰،۱۱). پروتئین *PARP* توسط ژن *PARP1* واقع بر روی کروموزوم شماره یک رمزگذاری می‌شود. این پروتئین به DNA تک رشته وصل می‌شود و در ترمیم آن نقش دارد *PARP*، سوسترای پروتئین‌های کاسپازی خاصی از جمله کاسپازهای ۳ و ۷ بوده و خاصیت سرکوب‌گری خود را از طریق وساطت در مسیر آپوپتوز اعمال می‌کند. کاسپازها به طور پیوسته در تمام سلول‌ها به صورت پروآنزیم ساخته می‌شوند و در پاسخ به محرک پروآپوپتوتیک (*PARP*) فعال می‌گردند. کاسپازهای فعال شده ترکیبات کلیدی سلول نظیر؛ پروتئین‌های ساختاری در اسکلت سلولی و پروتئین‌های هسته‌ای مثل آنزیم‌های ترمیم‌کننده DNA را تخریب می‌کنند و از این طریق مرگ سلولی را باعث می‌شوند (۱۲،۱۳). پروتئین *p53* توسط ژن سرکوب‌گر *p53* واقع بر روی کروموزوم شماره ۱۷ رمزگذاری می‌شود. این پروتئین دارای نیمه عمر کوتاهی است و در سلول به طور طبیعی انباشته نمی‌شود، اما به محض وقوع آسیب به DNA، سطح آن

مختلف استفاده گردید. سلول ها را پس از شستشو با PBS و آنزیم تریپسین (Gibco، آمریکا) از پلیت جدا نموده و سانتریفوژ شدند. رنگ های Annexin-V متصل به FITC (BD-Pharmingen) و (BD PI Propidium iodide; BD Pharmingen) به میزان ۵ میکرولیتر به مدت ۱۵ دقیقه در دمای اتاق و محیط تاریک انکوبه شدند و آماده شمارش توسط دستگاه فلوسایتومتری (FACS Calibur، آمریکا) شمارش سلولی در واحد  $10^4$  صورت گرفت، شدند.

به منظور بررسی میزان بیان ژن های *p53* و *PARP*، تعداد  $3 \times 10^5$  سلول در پلیت های ۶ خانه کشت داده شد، و سپس، با غلظت های ۲/۵، ۵ و ۱۰ میکرومولار کورکومین در بازه های زمانی ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت تیمار و انکوبه شدند. پس از گذشت زمان های سه گانه ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت، سلول ها در سه گروه تست (شامل سه غلظت مختلف) و گروه کنترل، برداشت و پس از شستشو با بافر PBS، Total RNA سلولی با استفاده از معرف بایوزول (Biozol Total RNA Extraction reagent)، با شماره محصول (BSC51M1)، (BioFlux, China)، جدا گردید. به منظور انجام مرحله Heat block، نمونه های حاصل از مرحله قبل در دستگاه ترموسایکلر با دمای ۶۰ درجه سانتی گراد به مدت ۲۰ دقیقه قرار داده شدند. در ادامه تمام توالی های RNA با استفاده از کیت سنتز cDNA (RevertAID First Standard cDNA Syn kit)، (Termo Scientific, Lithuania)، به cDNA تبدیل و به فریزر -۲۰ درجه سانتی گراد منتقل شدند. سنجش میزان بیان ژن های *p53* و *PARP* با استفاده از دستگاه Real Time PCR مدل Rotor gene 3000 (Rotor gene corbett, Australia) مورد ارزیابی قرار گرفت. برای انجام واکنش، مخلوط واکنشی متشکل از cDNA، به مقدار ۱/۵ میکرولیتر، پرایمر رفت و برگشت هر کدام به مقدار ۰/۳ میکرولیتر و RNase-free water، به مقدار ۵/۴ میکرولیتر تهیه گردید. توالی پرایمرهای پیشرو (Forward) و پسرو (Reverse) ژن های *GAPDH*، *p53* و *PARP* با استفاده از نرم افزار Oligo6 طراحی و سپس با Blast نمودن آن ها در NCBI از صحیح بودن آن ها اطمینان حاصل شد و نهایتاً توسط شرکت MacroGen سنتز شدند (جدول ۱). از ژن *GAPDH*، به عنوان کنترل داخلی استفاده شد هم چنین از رنگ سایبرگرین

به منظور ترمیم DNA یا القاء آپوپتوز افزایش می یابد. در این زمان پروتئین p53 از طریق اتصال به DNA باعث تحریک ژن *WAF1* می شود که این ژن سازنده پروتئین P21 است. پروتئین P21 به پروتئین CDK2 می چسبد و اجازه ورود سلول به مرحله بعد را نمی دهد و سیکل سلولی را به منظور انجام ترمیم متوقف می کند. در صورت عدم ترمیم، پروتئین p53 از طریق افزایش بیان پروتئین پروآپوپتوزی BAX آپوپتوز را القاء می کند و سلول کارسینوژنیک را حذف می نماید (۱۴، ۱۵). لذا به نظر می رسد به توان از کورکومین در پیشگیری از سرطان و یا با مصرف هم زمان آن با داروهای شیمی درمانی جهت بهبود سریع تر سرطان استفاده نمود.

### روش بررسی

این مطالعه به صورت تجربی از آبان ۱۳۹۵ تا بهمن ۱۳۹۵ در مرکز تحقیقات سلولی-تکوینی دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد انجام شد. رده سلولی SW-1736 از مرکز ملی ذخایر ژنتیکی و زیستی خریداری شد. در محیط کشت RPMI (Roswell Park Memorial Institute) (Gibco, USA) حاوی ۱۰ درصد FBS (Foetal Bovine Serum) (Gibco, USA) و یک درصد Penstrep (Penicillin-Streptomycin) (Gibco, USA) در انکوباتور (Memmert, Germany) با فشار ۵ درصد گاز CO<sub>2</sub>، رطوبت ۹۰ درصد و دمای ۳۷ درجه سانتی گراد، در فلاسک ۷۵ کشت داده شد. محیط کشت هفته ای سه بار تعویض و برای برداشت کردن سلول ها از محلول تریپسین/EDTA استفاده شد. القاء آپوپتوز در رده سلولی SW-1736، از طریق تست Annexin V-FITC/PI، با استفاده از کیت FITC Annexin V Apoptosis Detection kit (BD Pharmingen, USA)، با شماره محصول (۵۵۶۵۴۷)، مورد ارزیابی قرار گرفت. از غلظت های ۲/۵، ۵، ۷/۵ و ۱۰ میکرومولار کورکومین در بازه های زمانی ۲۴، ۴۸ و ۷۲ جهت بررسی آپوپتوز استفاده شد. کورکومین از شرکت SIGMA-ALDRICH با نام تجاری Curcumin-from curcuma longa (Turmeric) powder، شماره محصول (۱۳۸۶ C) تهیه گردید، و از اتانول به عنوان حلال برای تهیه غلظت های

## تجزیه و تحلیل آماری

نهایتاً بررسی آماری با استفاده از آزمون ANOVA از طریق نرم افزار SPSS ۱۶ و هم چنین برنامه Excel انجام شد. حدود اطمینان برای همه آزمایشات ۹۵٪ در نظر گرفته شد و  $P < ۰.۰۵$  معنی دار محسوب گردید.

## ملاحظات اخلاقی

پروپوزال این تحقیق توسط دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد تایید شده است (کد اخلاق: IR.IAU.SHK.REC.1397.028)

(Takara, Japan)، که به صورت اختصاصی به DNA دو رشته متصل می‌گردد، به عنوان گزارش گر، به مقدار ۷/۵ میکرولیتر در ساخت مخلوط واکنش استفاده شد. سپس مخلوط واکنش آماده شده بر روی یخ با حجم نهایی ۱۵ میکرولیتر طی مراحل مختلف واکنش تحت تاثیر برنامه دمایی-زمانی به شرح زیر قرار گرفتند: مرحله Initial denaturation: مدت زمان ۱۰ دقیقه، دمای  $۹۵^{\circ}\text{C}$ ، ۱ سیکل. مرحله Denaturation: مدت زمان ۱۵ ثانیه، دمای  $۹۵^{\circ}\text{C}$ ، ۴۰ سیکل. مرحله Annealing: مدت زمان ۶۰ ثانیه برای هر سه ژن، دمای  $۶۱^{\circ}\text{C}$  برای ژن‌های *PARP* و *GAPDH* و دمای  $۶۲^{\circ}\text{C}$  برای ژن *p53*، ۴۰ سیکل.

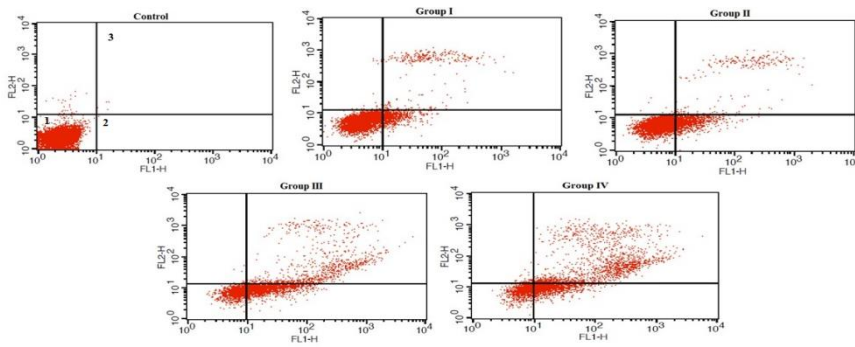
جدول ۱: مشخصات پرایمر های مورد مطالعه

| Official Name (gene) | mRNA accession number | Primers                  | RNA | DNA | Intron-span |
|----------------------|-----------------------|--------------------------|-----|-----|-------------|
| 1 p 53               | NM_00546.5            | F ACATAGTGTGGTGGTGCCCT   | 20  | -   | -           |
|                      |                       | R ACCTCAAAGCTGTTCGGTCC   | 20  |     |             |
| 2 PARP               | NM-001618.            | F GGCTTCAGCCTCCTTGCTAC   | 20  | 116 | 2126        |
|                      |                       | R TTCGCCACTTCATCCACTCC   | 20  |     |             |
| 3 GAPDH              | NM-001256799.2        | F CACATGGCCTCCAAGGAGTAAG | 22  | 286 | 286         |
|                      |                       | R AGGGGAGATTCAGTGTGGTG   | 20  |     |             |

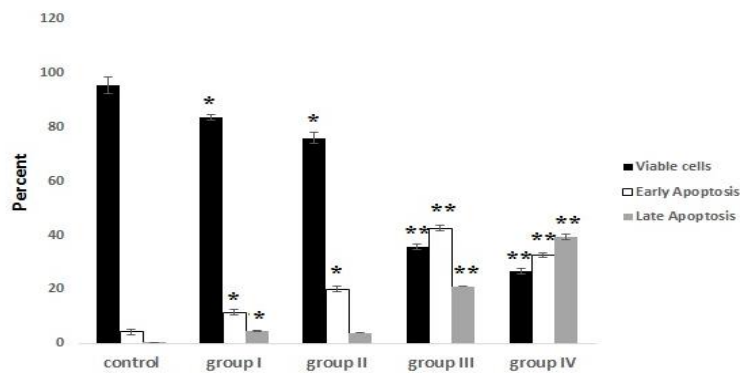
نسبت به گروه کنترل کاهش را نشان می‌دهد که این اختلاف از نظر آماری نسبت به گروه کنترل معنی دار است ( $P=0.032$ ). هم چنین درصد سلول‌هایی که در مرحله ابتدایی و انتهایی آپوپتوز هستند با افزایش غلظت کورکومین و طول زمان انکوباسیون افزایش یافته‌اند، که این افزایش درصد آپوپتوز نیز نسبت به گروه کنترل در هر سه زمان ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت معنی دار می‌باشد (نمودار ۱، ۲ و ۳). تجزیه و تحلیل مقادیر Ct حاصل از دستگاه Real Time PCR با استفاده از فرمول  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ، بیانگر افزایش در میزان بیان هر دو ژن *PARP* و *p53* در مقایسه با ژن مرجع در برخی از غلظت‌های مشخص می‌باشد (نمودار ۴ و ۵).

## نتایج

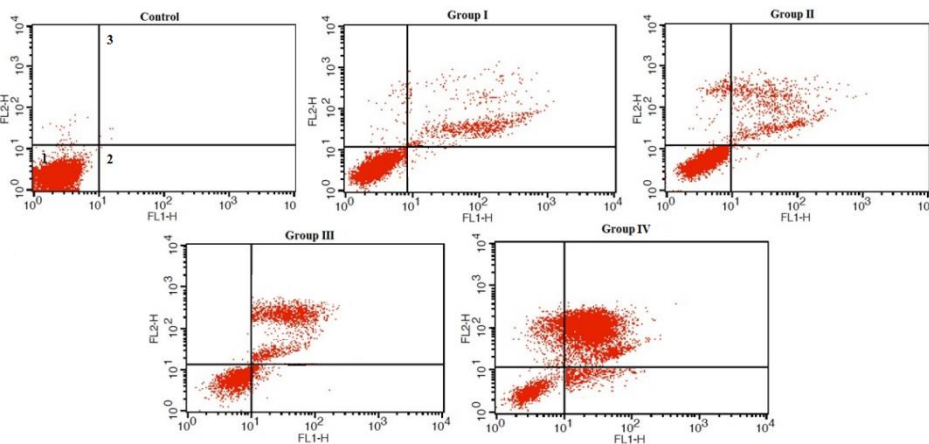
القاء آپوپتوز در رده سلولی SW-1736 تیمار شده با غلظت‌های مختلف کورکومین (۲/۵، ۵، ۷/۵ و ۱۰ میکرومولار)، بعد از گذشت زمان‌های سه گانه انکوباسیون (۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت) با استفاده از تست Annexin V-FITC مورد بررسی قرار گرفت. نتایج حاصل از این تست خبر از افزایش درصد مرگ سلولی در گروه‌های آزمایشی تحت تیمار می‌دهد. به طوری که با افزایش دوز و طول زمان تیمار درصد سلول‌های زنده در گروه‌های تحت تیمار در مقایسه با گروه کنترل کاهش یافته است. همان‌طور که در شکل‌های ۱، ۲ و ۳ دیده می‌شود، درصد سلول‌های زنده در سایر گروه‌ها در هر سه زمان انکوباسیون



شکل ۱: درصد سلول های زنده (۱)، آپوپتوز اولیه (۲) و آپوپتوز انتهایی (۳) در سلول های SW-1736، ظرف مدت ۲۴ ساعت، اختلاف معنی دار  $P < 0.05$ ؛  $P < 0.01$  در مقابل گروه کنترل بر اساس آزمون آماری ANOVA.

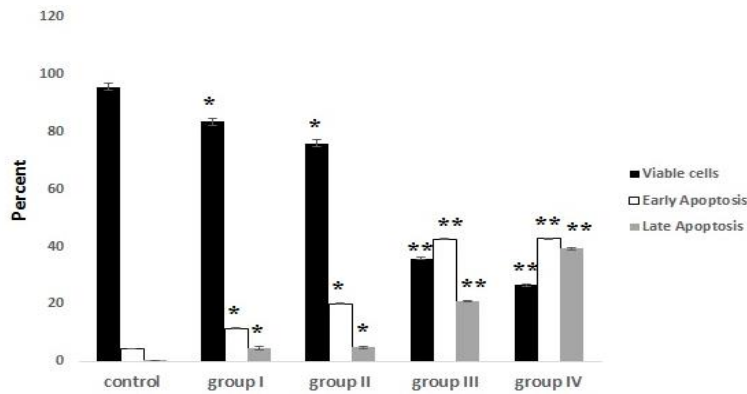


نمودار ۱: درصد سلول های زنده، آپوپتوز اولیه و آپوپتوز انتهایی در سلول های SW-1736 تحت تیمار با غلظت های مختلف کورکومین به مدت ۲۴ ساعت.  $P < 0.05$ ؛  $P < 0.01$  در مقابل گروه کنترل بر اساس آزمون آماری ANOVA.

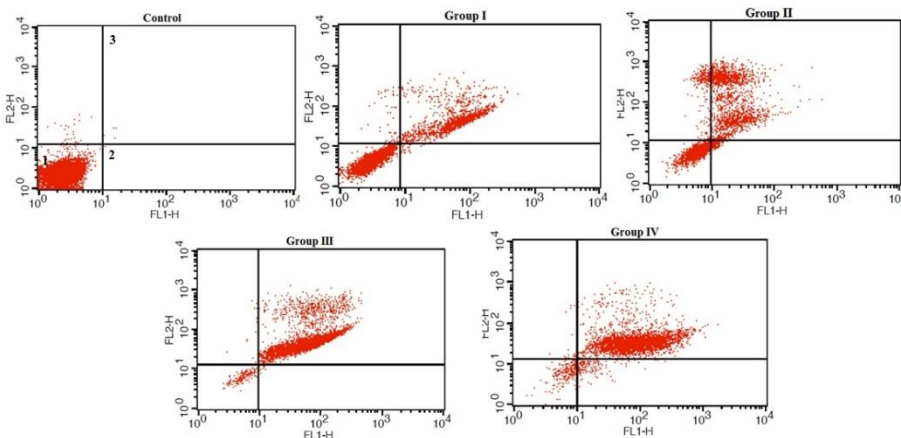


شکل ۲: درصد سلول های زنده (۱)، آپوپتوز اولیه (۲) و آپوپتوز انتهایی (۳) در سلول های SW-1736، ظرف مدت ۴۸ ساعت، اختلاف معنی دار  $P < 0.01$ ؛  $P < 0.001$  در مقابل گروه کنترل بر اساس آزمون آماری ANOVA.

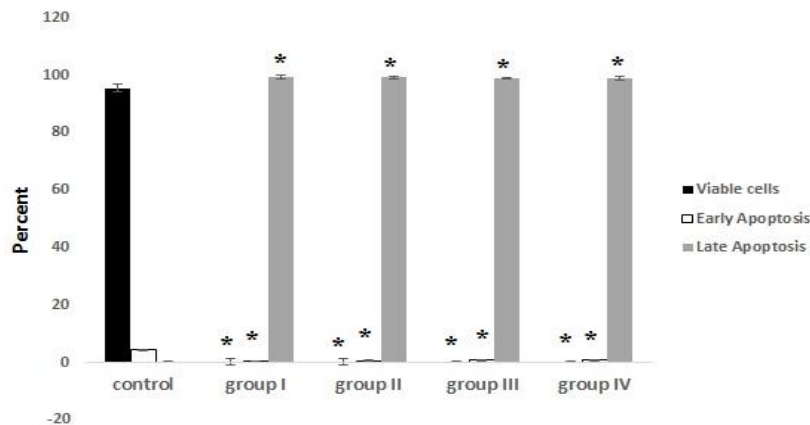
القاه آپوتوز در سلول های کارسینومای آناپلاستیک تیروئید انسان (SW-1736) به وسیله کورکومین (Curcumin)



نمودار ۲: درصد سلول های زنده، آپوتوز اولیه و آپوتوز انتهایی در سلول های SW-1736 تحت تیمار با غلظت های مختلف کورکومین به مدت ۴۸ ساعت.  $P < 0.001$ ؛  $P < 0.01$  در مقابل گروه کنترل بر اساس آزمون آماری ANOVA.

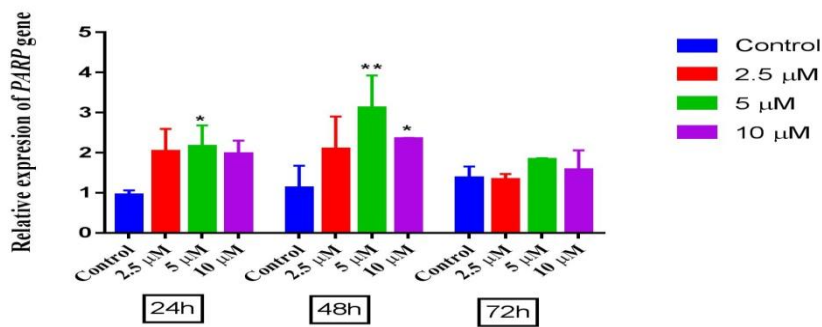


شکل ۳: درصد سلول های زنده (۱)، آپوتوز اولیه (۲) و آپوتوز انتهایی (۳) در سلول های SW-1736، ظرف مدت ۷۲ ساعت، اختلاف معنی دار  $P < 0.001$  در مقابل گروه کنترل بر اساس آزمون آماری ANOVA.

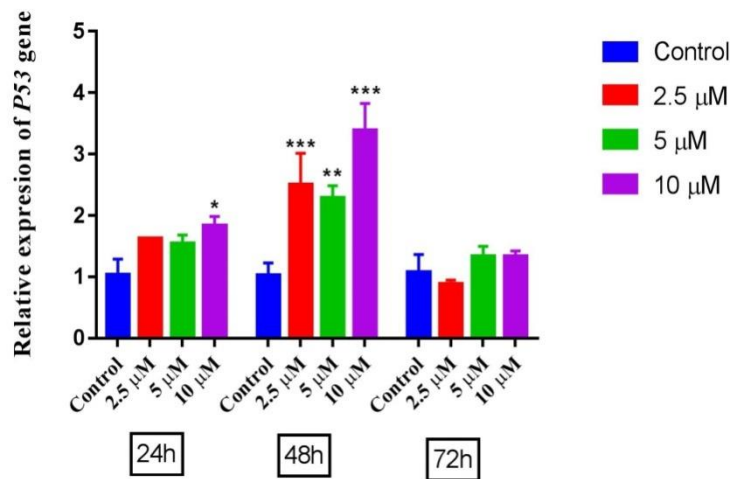


نمودار ۳: درصد سلول های زنده، آپوتوز اولیه و آپوتوز انتهایی در سلول های SW-1736 تحت تیمار با غلظت های مختلف کورکومین به مدت ۷۲ ساعت.  $P < 0.001$  در مقابل گروه کنترل بر اساس آزمون آماری ANOVA.





نمودار ۴: نمودار میزان بیان ژن *PARP* براساس Ct در غلظت‌های (۲/۵، ۵ و ۱۰ میکرومولار) و زمان انکوباسیون ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعته.  $P < 0.5$ ؛  $**P < 0.01$  در مقابل گروه کنترل بر اساس آزمون آماری ANOVA



نمودار ۵: نمودار میزان بیان ژن *p53* براساس Ct در غلظت‌های (۲/۵، ۵ و ۱۰ میکرومولار) و زمان انکوباسیون ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعته.  $**P < 0.01$ ؛  $***P < 0.001$  در مقابل گروه کنترل بر اساس آزمون آماری ANOVA.

نشان داد که درصد مرگ سلولی با افزایش دوز و طول زمان تیمار با کورکومین افزایش یافته است. به طوری که درصد سلول‌های زنده در سایر گروه‌ها نسبت به گروه کنترل که شامل ۹۵/۴۴ درصد سلول زنده بود، کاهش را نشان داد. این اختلاف در افزایش درصد وقوع آپوپتوز از نظر آماری در همه غلظت‌ها نسبت به گروه کنترل معنی‌دار می‌باشد. در همین راستا اسکوردم و همکاری‌اش در سال ۲۰۱۷ اثر کورکومین را بر رده سلول‌های سرطانی مختلف تیروئید از جمله: Tpc- (Papillary)، Ftc-133 (Follicular) و BHT-101 (Anaplastic) مورد بررسی قرار دادند. نتایج حاصل از

## بحث

در تحقیق حاضر توانایی کورکومین در القاء آپوپتوز از طریق بیان ژن‌های رمزکننده پروتئین‌های پروآپوپتوزی دخیل در مسیر مرگ سلولی مورد بررسی قرار گرفت. در این تحقیق وقوع آپوپتوز در رده سلولی SW-1736 تحت تاثیر کورکومین با استفاده از تست Annexin V-FITC بررسی گردید. بدین صورت که سلول‌ها برای مدت زمان‌های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت تحت تاثیر غلظت‌های مختلف کورکومین قرار گرفتند. سپس تاثیر این غلظت‌ها بر القاء آپوپتوز در رده سلولی SW-1736 اندازه‌گیری شد و آنالیز آماری صورت گرفت. نتایج حاصل



سلول‌های سرطانی تیروئید پرداخته شد. نتایج حاصل از بررسی نشان داد که، کورکومین با آزاد سازی سیتوکروم C، تولید گونه‌های فعال اکسیژن و تاثیر روی بیان پروتئین p53 آپوپتوز را در سلول‌های سرطانی تیروئید القاء می‌نماید (۲۰). به علاوه تحقیقات ارائه شده در زیر شواهد محکمی بر اثبات صداقت نتایج حاصل شده از تحقیق حاضر می‌باشند: شفقتی و همکاری‌شان در سال ۲۰۱۴ به بررسی تاثیر کورکومین در پیش‌گیری از بروز سرطان پرداختند. نتایج حاصل از بررسی نشان داد که، کورکومین با مهار رادیکال‌های آزاد و گونه‌های فعال اکسیژن موجب مهار آسیب‌های DNA ناشی از عوامل اکسیداتیو نظیر پرتوهای یونیزان می‌شود و می‌تواند نقش مهمی در شروع سرطان داشته باشد (۲۱).

بلکارو و همکاری‌شان در سال ۲۰۱۴ به بررسی تاثیر کورکومین در کاهش عوارض جانبی ناشی از شیمی‌درمانی و رادیوتراپی در مبتلایان به سرطان‌های کبد، کلیه، معده، ریه و تخمدان پرداختند. نتایج حاصل از بررسی نشان داد که، در مبتلایان تحت تیمار با کورکومین، عوارض جانبی شیمی‌درمانی نظیر تهوع، اسهال، بی‌خوابی، عفونت، کاهش وزن و هم‌چنین عوارض جانبی مربوط به رادیوتراپی از جمله ضایعات پوستی، زخم‌های دهان و حلق، مشکلات بلع و غیره نسبت به مبتلایانی که تحت تیمار نبودند، کمتر مشاهده می‌شود (۲۲).

### نتیجه‌گیری

نتایج حاصل از تست Annexin V-FITC و RT-Real Time PCR صورت گرفته در تحقیق حاضر، بیانگر این مسئله هستند که کورکومین احتمالاً قادر است با تاثیر گذاری بر بیان ژن‌های p53 و PARP و افزایش میزان تولید محصول آن‌ها که در واقع پروتئین‌های پروآپوپتوتیک هستند، آپوپتوز را در سلول‌های کارسینومای آناپلاستیک تیروئید القاء نماید.

### سپاسگزاری

این پژوهش با حمایت مالی معاونت پژوهشی دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد در قالب پایان‌نامه کارشناسی ارشد تحت عنوان «اثر کورکومین (curcumin) بر میزان آپوپتوز و بیان

بررسی این محققان نیز نشان داد که، کورکومین در رده سلول‌های مورد بررسی باعث توقف چرخه سلولی در مرحله G<sub>2</sub>/M، القاء آپوپتوز، مهار مسیر سیگنالی NF-κB و بیان ژن‌های مختلف از جمله: p53, PARP, p21 و غیره می‌شود (۱۶). در سال ۲۰۱۶ در مطالعه دیگری نیز تاثیر کورکومین را بر رده سلولی BCPAP مورد بررسی قرار دادند. نتایج حاصل از بررسی نشان داد که، کورکومین از طریق مهار مسیر سیگنالی TGFβ/Smad<sub>2</sub>/Smad<sub>3</sub>، از وقوع متاستاز در این رده سلولی جلوگیری می‌کند (۱۷).

به علاوه در سال ۲۰۱۶ تاثیر کورکومین بر رده سلولی BCPAP مربوط به کارسینومای پاپیلاری تیروئید مورد بررسی قرار گرفت. نتایج حاصل از بررسی نشان داد که، کورکومین با القاء مسیر سیگنالی ROS باعث توقف چرخه سلولی در مرحله G<sub>2</sub>/M می‌شود و به دنبال آن آپوپتوز را در این رده سلولی القاء می‌نماید (۱۸). در سال ۲۰۱۴ مکانیسم اثر ملکولی کورکومین را بر سلول‌های سرطانی تیروئید در شرایط آزمایشگاهی مورد بررسی قرار دادند. نتایج حاصل از بررسی نشان داد که، کورکومین از طریق مهار مسیر سیگنالی PI3/Akt مانع از تهاجم سلول‌های سرطانی تیروئید می‌شود (۱۹). هم‌چنین تیمار رده سلولی SW-1736 با غلظت‌های مختلف کورکومین (۲/۵، ۵ و ۱۰ میکرومولار) و انکوباسیون آن‌ها برای مدت زمان‌های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت نتایج قابل توجهی را در افزایش میزان بیان ژن‌های مورد هدف تحقیق (p53 و PARP) نشان داد. شایان ذکر است که این افزایش در میزان بیان ژن‌ها در برخی از غلظت‌های کورکومین نسبت به گروه کنترل به طور چشم‌گیرتری مشاهده گردید و بدین ترتیب مرگ سلول‌های سرطانی تحت تیمار را توجیه می‌کند. بیشترین میزان بیان ژن‌ها، مربوط به تیمار با غلظت ۱۰ میکرومولار با مدت زمان انکوباسیون ۴۸ ساعت برای ژن p53 و غلظت ۵ میکرومولار با مدت زمان انکوباسیون ۴۸ ساعت برای ژن PARP بود که در حقیقت نشان‌دهنده اثر گذاری بیشتر کورکومین بر مهار روند رشد سلول‌های سرطانی می‌باشد. در این راستا در سال ۲۰۱۱ اثر مهمی کورکومین بر رشد و تکثیر

تعارض در منافع: هیچ‌گونه تعارض منافع توسط نویسندگان بیان نشده است.

ژن های *p53* و *PARP* در رده سلولی SW-1736 کارسینومای آناپلاستیک تیروئید انسان» در سال ۱۳۹۵ می‌باشد، که بدین وسیله مراتب تشکر و قدردانی را از آنان اعلام می‌داریم.

## References:

- 1-Kebebew E, Greenspan FS, Clark OH, Woeber KA, McMillan A. *Anaplastic thyroid carcinoma. Treatment outcome and prognostic factors*. Cancer 2005; 103(7): 1330-35.
- 2-Hundahl SA, Fleming ID, Fremgen AM, Menck HR. *A National Cancer Data Basereport on 53, 856 cases of thyroid carcinoma treated in the US*. Cancer 1998; 83(12): 2638-48.
- 3-Kitamura Y, Shimizu K, Nagahama M, Sugino K, Ozaki O, Mimura T, et al. *Immediate causes of death in thyroid carcinoma: clinicopathological analysis of 161 fatal cases*. J Clin Endocrinol Metab 1999; 84(11): 4043-49.
- 4-Besic N, Hocevar M, Zgajnar J. *Lower incidence of anaplastic carcinoma after higher iodination of salt in Slovenia*. Thyroid 2010; 20(6): 623-6.
- 5-Nel CJ, vanHeerden J.A, Goellner JR, Gharib H, McConahey WM, Taylor WF, et al. *Anaplastic carcinoma of the thyroid: a clinic pathologic study of 82 cases*. MayoClin.Proc 1985; 60(1): 51-8.
- 6-Miccoli P, Materazzi G, Antonelli A, Panicucci E, Frustaci G, Berti P. *New trends in the treatment of undifferentiated carcinomas of the thyroid*. Langenbecks Arch Surg 2007; 392(4): 397-404.
- 7-Hatcher H, Planalp R, Cho J, Toti FM, Torti SV. *Curcumin: from ancient medicine to current clinical trials*. Cell Mol Life Sci 2008; 65(11): 1631-52.
- 8-Srivastava SH, Mishra S, Surolia A, Panda D. *A highly potent novel curcumin derivative, binds to tubulin, disrupts microtubule network and induces apoptosis*. Bioscience Rep 2016; 36(2): e00323.
- 9-Mullaicharam AR, Maheswaran A. *Pharmacological effects of curcumin*. Int J Nutr Pharmacol Neurol Dis 2012; 2(2): 92-9.
- 10-Ravindran J, Prasad S, Aggarwal BB. *Curcumin and cancer cells: how many ways can curry kill tumor cells selectively?*. AAPS J 2009; 11(3): 495-510.
- 11-Gowda NK, Ledoux DR, Rottinghaus GE, Bermudez AJ, Chen YC. *Efficacy of turmeric (Curcuma longa), containing a known level of curcumin, and a hydrated sodium calcium aluminosilicate to ameliorate the adverse effects of aflatoxin in broiler chicks*. Poult Sci 2008; 87(6): 1125-30.
- 12-Leng RP, Lin Y, Ma W, Wu H, Lemmers B, Chung S, et al. *Pirh2, a p53-induced ubiquitin-protein ligase, promotes p53 degradation*. Cell 2003; 112(6): 779-91.
- 13-Mishra D, Singh S, Narayan G. *Curcumin Induces Apoptosis in Pre-B Acute Lymphoblastic Leukemia Cell Lines via PARP-1 Cleavage*. APJCP 2016; 17(8): 3865-69.

- 14- Dahabreh IJ, Schmid CH, Lau J, Varvarigou V, Murray S, Trikalinos TA. *Genotype misclassification in genetic association studies of the rs1042522 TP53 (Arg72Pro) polymorphism: a systematic review of studies of breast, lung, colorectal, ovarian, and endometrial cancer*. Am J epide 2013; 177(12): 1317-25.
- 15- Xue X, Yu JL, Sun DQ, Kong F, Qu XJ, Zou W, et al. *Curcumin induces apoptosis in SGC-7901 gastric adenocarcinoma cells via regulation of mitochondrial signaling pathways*. APJCP 2013; 15(9): 3987-92.
- 16- Schwertheim S, Wein F, Lennartz K, Worm K, Schmid KW, Sheu-Grabellus SY. *Curcumin induces G2/M arrest, apoptosis, NF-κB inhibition, and expression of differentiation genes in thyroid carcinoma cells*. J Cancer Res Clin Oncol 2017; 143(7): 1143-54.
- 17- Zhang L, Cheng X, Gao Y, Zhang C, Bao J, Guan H, et al. *Curcumin inhibits metastasis in human papillary thyroid carcinoma BCPAP cells via down-regulation of the TGF-β/Smad2/3 signaling pathway*. Exp Cell Res 2016; 341(2): 157-65.
- 18- Zhang L, Cheng X, Gao Y, Bao J, Guan H, Lu R, et al. *Induction of ROS-independent DNA damage by curcumin leads to G2/M cell cycle arrest and apoptosis in human papillary thyroid carcinoma BCPAP cells*. Food & function 2016; 7(1): 315-25.
- 19- Xu X, Qin J, Liu W. *Curcumin inhibits the invasion of thyroid cancer cells via down-regulation of PI3K/Akt signaling pathway*. Gene 2014; 546(2): 226-32.
- 20- Zhou H, Beevers CS, Huang S. *The target of curcumin*. Curr Drug Targets 2011; 12(3): 332-47.
- 21- Shafaghati N, Hedayti N, Hosseinimehr SJ. *Protective effects of curcumin against genotoxicity induced by 131-iodine in human cultured lymphocyte cells*. Pharmacognosy Magazine 2014; 10(38): 106-10. [Persian]
- 22- Belcaro G, Hosoi M, Pellegrini L, Appendino G, Ippolito E, Ricci A, et al. *A controlled study of a lecithinized delivery system of curcumin (meriva(R)) to alleviate the adverse effects of cancer treatment*. Phytother Res 2014; 28(3): 444-50.

**Apoptosis induction and enhanced expression of *p53* and *PARP* genes in the human anaplastic thyroid carcinoma cells line (SW-1736) with Curcumin**Khalil Khashei Varnamkhasti<sup>1</sup>, Leila Rouhi<sup>\*2</sup>, Somayeh Reisi<sup>1,3</sup>

## Original Article

**Introduction:** Anaplastic thyroid carcinoma (ATC) is a type of thyroid gland malignancy that originates from the anaplastic cells of this gland. This kind of malignancy is highly invasive and patients have a poor response to treatment. In this study, the effect of curcumin on apoptosis and *p53* and *PARP* genes expression of the human anaplastic thyroid carcinoma cell line (SW-1736) examined. Curcumin is a major active ingredient in the rhizome of a *Curcuma longa* that has anti-oxidant, anti-inflammatory and pro-apoptosis effects.

**Methods:** The experimental study was carried out in October, 2016 at the Cellular and Developmental Research Center of Islamic Azad University, Shahrekord Branch. SW-1736 cells with different concentrations of curcumin (2.5, 5, 7.5 and 10  $\mu\text{M}$ ) to examine apoptosis and 2.5, 5 and 10  $\mu\text{M}$  concentrations to examine the expression of genes *P53* and *PARP* were incubated for 24, 48 and 72 hours. Then, apoptosis was analyzed by flow- cytometry using an Annexin V-FITC/PI kit and the expression of *p53* and *PARP* genes were analyzed by Real Time PCR.

**Results:** The results of this study indicated that with increasing concentration of curcumin in dose and time dependent manner, induction of apoptosis in this cell line increased. Also, treatment with curcumin increased the expression of *p53* and *PARP* genes in some experimental groups compared to the control group. (P=.032)

**Conclusion:** Curcumin has an inhibitory effect on the growth, proliferation and invasion of anaplastic thyroid cancer cells through induction of genes involved in apoptosis process. Therefore, it seems that there is a good research field for the use of *Curcuma longa* in the control and treatment of human anaplastic thyroid carcinoma.

**Keywords:** Curcumin, Apoptosis, SW-1736, *p53*, *PARP*

**Citation:** Khashei Varnamkhasti kh, Rouhi l, Reisi s. Apoptosis induction and enhanced expression of *p53* and *PARP* genes in the human anaplastic thyroid carcinoma cells line (SW-1736) with Curcumin. J Shahid Sadoughi Uni Med Sci 2019; 26(9): 759-69

<sup>1</sup>Department of Genetic, Shahrekord Branch, University of Islamic Azad, Shahrekord, Iran

<sup>2</sup>Department of Physiology, Shahrekord Branch, University of Islamic Azad, Shahrekord, Iran

<sup>3</sup>Department of Genetic, Shahrekord University, Shahrekord, Iran

\*Corresponding author: Tel: 09126043305, email: lrouhi59@gmail.com