

Original Article

Monitoring the Nanocurcumin Effect on Lead Exposure in the Huh7-1x-ARE-luc Cell Line

Saeedeh Kavooosi¹, Hadi Shirzad^{2*}, Nazanin Rahimi rad¹, Shirin Jalili²,
Majid Sadeghizadeh³

1- M.Sc. Student, Department of Genetics, Faculty of Biological Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

2- Assistant Professor, Research Institute of Police Science and Social Studies, Tehran, Iran

3- Professor, Department of Genetics, Faculty of Biological Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

*Corresponding Address: Postal Code: 6516-19395, Research Institute of Police Science and Social Studies, Tehran, Iran
Email: hadi_shirzad@yahoo.com

Received: 14/Nov/2016, Accepted: 02/Jan/2017

Abstract

Objective: The human genome consists of protective genes, which contain a sequence known as the antioxidant responsive element (ARE) located in their promoter regions. ARE is specific to the transcription factor NF-E2 related factor2 (*Nrf2*). This signaling pathway is the major defense mechanism against oxidative stress that comprises the chemoprotective response. The cell line that expresses the ARE reporter is sensitive for the detection of ARE activating compounds. It can help to identify toxicity risk and antioxidant activity of chemicals and drugs.

Methods: We used a stable Huh7 ARE-reporter cell line in this study. Metabolic activity of these cells in different concentrations of lead (0 to 80 micromole) was evaluated by the MTT test. We assessed the effects of oxidative stress. We exposed the Huh7 ARE-reporter cell line to different concentrations of lead, an oxidative stress inducer, and nanocurcumin, an antioxidant compound, after which we investigated luciferase activity. Real-time PCR was used to detect *ARE/KEAP1* pathway gene expression.

Result: Lead, at 30 μ M, suppressed 50% of the cells' metabolic activity. Cells treated with both lead (30 μ M) and nanocurcumin at 4 μ M and 8 μ M had decreased luciferase activity compared to those treated with only lead. This activity increased when we increased the nanocurcumin concentration to 16 μ M. Real-time PCR analysis showed decreased *NQO1* and *NRF2* expressions in cells treated with both lead (30 μ M) and nanocurcumin (4 μ M and 8 μ M) compared to just lead treated cells. However, *NQO1* and *NRF2* had increased expressions in cells treated with both lead (30 μ M) and nanocurcumin (16 μ M) compared to just lead treated cells.

Conclusion: Nano curcumin, as an antioxidant, significantly reduced the toxic effects of lead toxic. This effect probably occurred through the *ARE/KEAP1* pathway. Hence, nanocurcumin could be used as an antioxidant to reduce oxidative stress.

Keywords: *Nrf2*, Antioxidant responsive element (ARE), Oxidative stress, Reporter cell line, Nanocurcumin

Pathobiology Research, Vol. 19 (2016-2017), No.3, Pages: 73-88

پایش اثر نانوکورکومین روی سمیت سرب در رده سلولی Huh7-1x-ARE-luc

سعیده کاوسی^۱، هادی شیرزاد^{۲*}، نازنین رحیمی راد^۱، شیرین جلیلی^۲، مجید صادقی زاده^۳

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه ژنتیک، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

۲- استادیار، پژوهشگاه علوم انتظامی و مطالعات اجتماعی، تهران، ایران

۳- استاد، گروه ژنتیک، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

*آدرس نویسنده مسئول: ایران، تهران، کدپستی: ۱۹۳۹۵-۶۵۱۶، پژوهشگاه علوم انتظامی و مطالعات اجتماعی

Email: hadi_shirzad@yahoo.com

پذیرش مقاله: ۹۵/۱۰/۱۳

دریافت مقاله: ۹۵/۰۸/۲۴

چکیده

هدف: ژنوم انسان حاوی ژن‌های محافظت کننده است که دارای توالی عوامل پاسخ‌گو به آنتی اکسیدان‌ها در پروموتشان است که بیان آن‌ها به‌طور خاص تحت تاثیر عامل رونویسی *Nrf2* قرار می‌گیرد. این مسیر پیام‌رسانی (ARE\KEAP1) عمده‌ترین مکانیسم دفاعی در برابر استرس اکسیداتیو است. رده سلولی حاوی عوامل پاسخ‌گو به آنتی اکسیدان‌ها (ARE)، سلول‌های گزارشگر حساسی هستند که برای تشخیص عوامل فعال‌کننده پاسخ‌گو به آنتی اکسیدان‌ها به‌کار می‌روند و می‌توانند در شناسایی مواد اکسیداتیو همچون سرب کمک کننده باشند.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه از رده سلولی پایدار Huh7-1x-ARE-luc تولید شده، استفاده شد. مهار فعالیت متابولیکی سلول‌های Huh7 در غلظت‌های مختلف سرب (۰ تا ۸۰ میکرومولار) توسط آزمون MTT سنجیده شد. در ادامه رده سلولی Huh7-1x-ARE-luc برای بررسی آثار استرس اکسیداتیو با سرب به‌عنوان یک ترکیب القاکننده استرس اکسیداتیو و نانوکورکومین به‌عنوان یک آنتی اکسیدان در غلظت‌های متفاوتی از این ترکیبات تیمار شد و سپس میزان فعالیت لوسیفرازای زیست‌حسگر بررسی شد. همچنین میزان بیان ژن‌های مسیر ARE\KEAP1 توسط Real time PCR تعیین شد.

نتایج: نتایج نشان می‌دهد که غلظت ۳۰ میکرومولار سرب باعث مهار متابولیکی ۵۰ درصدی سلول‌های Huh7 می‌شود. فعالیت لوسیفرازای سلول‌های تیمار شده با غلظت‌های ۴ و ۸ میکرومولار از نانوکورکومین و غلظت ۳۰ میکرومولار از سرب نسبت به کنترل (۳۰ میکرومولار سرب) کاهش یافته است و با افزایش غلظت نانوکورکومین به ۱۶ میکرومولار این فعالیت افزایش می‌یابد. نتایج تحلیل داده‌های حاصل از Real time-PCR نشان می‌دهد که بیان تمامی ژن‌های مورد بررسی شامل *Nrf2* و *NQO1* در رده سلولی Huh7-1x-ARE-luc تیمار شده با سرب ۳۰ میکرومولار و نانوکورکومین ۴ و ۸ میکرومولار نسبت به تیمار همان ژن‌ها با سرب ۳۰ میکرومولار کاهش یافته است. از سوی دیگر؛ بیان این ژن‌ها در سلول‌های تیمار شده با سرب ۳۰ میکرومولار و نانوکورکومین ۱۶ میکرومولار نسبت به تیمار همان ژن‌ها با سرب ۳۰ میکرومولار افزایش داشته است.

نتیجه‌گیری: نانوکورکومین به‌عنوان یک آنتی‌اکسیدان توانسته اثر سمیت سرب را احتمالاً از طریق مسیر ARE\KEAP1 به‌طور معنی‌داری کاهش دهد؛ در نتیجه می‌تواند به‌عنوان یک آنتی‌اکسیدان در کاهش استرس اکسیداتیو استفاده شود.

کلیدواژگان: *Nrf2*، عوامل پاسخ‌گو به آنتی اکسیدان‌ها، استرس اکسیداتیو، رده سلولی گزارشگر، نانوکورکومین

پژوهش‌های آسیب‌شناسی زیستی، دوره ۱۹، شماره ۳، پاییز ۱۳۹۵، صفحات: ۷۴-۸۸

پایش اثر نانوکورکومین بر روی سمیت سرب

دیرباز، تأثیر این ترکیب گیاهی در بهبود آلرژی، زخم‌های پوستی، تسکین معده درد، درمان یرقان، اسهال خونی، بیماری‌های مزمن چون سرطان‌ها، ناراحتی‌های عصبی، قلبی-عروقی و مشکلات روانی مورد توجه طب سنتی بوده است. این در حالی است که تأثیر جانبی قابل ملاحظه‌ای حتی در دوزهای بالا نشان نداده است. داشتن چنین آثار مفید و متنوعی از طرف یک ماده چه در محیط آزمایشگاهی (in vitro) و چه در محیط درون بدنی (in vivo)، بیانگر آن است که این ترکیب ارزشمند گیاهی دارای اهداف مولکولی مختلفی بوده است و می‌تواند چندین مسیر بیوشیمیایی را در سلول تحت تأثیر قرار دهد [۲، ۳] بررسی‌هایی که در سه دهه اخیر در زمینه قدرت جذب، توزیع، متابولیسم و دفع کورکومین صورت گرفته است، نشان دهنده جذب ضعیف و متابولیسم سریع این ترکیب دارویی و در نتیجه محدودیت استفاده از آن به دلیل زیست‌ماندگاری ضعیف کورکومین است [۴، ۵]. به‌منظور حل نمودن مشکل فوق و استفاده مؤثر از کورکومین در صنایع دارویی، تاکنون راه‌کارهای مختلفی از جمله استفاده از ادجوانت‌ها (Adjuvant)، میسل‌ها (Missile)، فسفولیپیدها، لیپوزوم‌ها و همچنین به‌کارگیری ذرات نانو (Nano particles) استفاده شده است [۶، ۷]. در پژوهش‌های اخیر، نسل جدیدی از نانوحامل‌های پلیمری با عنوان دندروزوم (Dendrosome)، به‌منظور افزایش حلالیت کورکومین استفاده شده است؛ دندروزوم‌ها خانواده جدیدی از ناقلین کویلیمری با ساختار کروی، فراداندانه و خود مجتمع است. در مقایسه با سایر ناقلین ذکر شده از قبیل میسل‌ها، لیپوزوم‌ها، فسفولیپیدها و غیره، دندروزوم‌ها از مزایای متعددی از قبیل تهیه آسان، پایداری، عدم سمیت، هزینه اندک تولید، زیست تخریب‌پذیری، خنثی بودن از لحاظ بار الکتریکی، ساختار کروی و سهولت کاربرد برخوردار است [۸]. کارایی نانوکورکومین دندروزومی، برای اولین بار در مدل‌های موشی مبتلا به فیروسارکوما (Fibrosarcoma) تأیید شد. همچنین نشان داده شد که دندروزوم‌ها به تنهایی

مقدمه

امروزه با توجه به گسترش تکنولوژی و پیشرفت صنعتی جوامع بشری در دهه‌های گذشته ورود آلاینده‌ها با منشأ انسانی مانند فلزات سنگین به داخل محیط زیست به مقدار زیادی افزایش یافته است که به‌عنوان یک خطر جدی برای سلامت انسان و تمام موجودات و اکوسیستم‌ها به‌شمار می‌آید. میزان ورود این فلزات سنگین به داخل محیط زیست، بیش از میزانی است که توسط فرآیندهای طبیعی برداشت می‌شود؛ بنابراین تجمع فلزات سنگین در محیط زیست بسیار مورد توجه است. به‌خصوص تأثیری که این فلزات سنگین بر مسیر استرس اکسیداتیو (Oxidative stress) دارد باعث شده که موضوع مهمی برای تحقیقات در زمینه‌های مختلف باشد. از جمله یافتن راه‌های جدیدی که بتوان وجود این آلاینده‌ها را در کمترین زمان و با دقت بالا شناسایی کرد. همچنین یافتن ترکیباتی که بتوانند آثار مضر این آلاینده را به حداقل برساند بسیار اهمیت دارد. در این خصوص زیست‌حسگرهای فلزات سنگین به‌عنوان یک شناساگر دقیق مطرح است. این زیست‌حسگرها که حاوی یک ژن گزارشگر تحت کنترل پروموتور حساس به حضور انواع یون‌های سنگین است، در حضور این آلاینده‌ها پیامی ایجاد می‌کند که قابل شناسایی و اندازه‌گیری است؛ در نتیجه استفاده از آن‌ها در سنجش آلودگی فلزات سنگین علاوه بر سنجش غلظت در دسترس زیستی این عناصر، دارای مزایای دیگری نظیر صرف زمان و هزینه کمتر و سهولت استفاده از آن‌ها است [۱]. همان‌طور که گفته شد بررسی ترکیباتی که بتواند اثر این آلاینده‌ها را کاهش دهد زمینه دیگری از تحقیقات در خصوص فلزات سنگین را باز کرده است. یکی از این ترکیبات که از اهمیت خاصی در کاهش استرس اکسیداتیو فلزات سنگین دارد، کورکومین (Curcumin) است.

کورکومین از سالیان دور در مناطق جنوب شرقی آسیا نه تنها در قالب افزودنی به غذا بلکه برای ترمیم زخم‌ها، تسکین دردها و درمان بسیاری از بیماری‌ها استفاده شده است. از

Transferase) به دنبال ورود مواد اکسیداتیو به بدن افزایش می‌یابد [۱۸]. به‌طور کلی اثبات شده است که افزایش بیان ژن‌های وابسته به *Nrf2* منجر به سم‌زدایی آلاینده‌ها از جمله فلزات سنگین درون سلول‌ها و تسکین آسیب ناشی از استرس اکسیداتیو درون ارگانسیم‌ها می‌شود [۱۹-۲۱]. مطالعات پیشین نشان داده که کورکومین اثر سوء فلزات سنگین بر کبد مانند کاهش تولید نیترژن اکسید شده، کاتالیز پراکسیداسیون اسیدهای چرب اشباع و القای تولید هیدروکسیل رادیکال‌ها را کاهش می‌دهد. در واقع کورکومین توسط سیستم رونویسی (*Nrf2/keap1/ARE*) روی mRNA ژن‌های *GSTYα* و *NQO1* تأثیر گذاشته و باعث افزایش بیان این ژن‌ها می‌شود [۲۲].

به‌نظر می‌رسد که نقش کورکومین در کاهش استرس اکسیداتیو از طریق جلوگیری از تخلیه GSH، توقف پراکسیداسیون لیپیدها، پایدار کردن فعالیت *CAT* و *GSTs* و *NQO1* (Superoxide dismutase) و *Catalase* و *GPX* (Glutathione peroxidase 1) است. به علاوه این ترکیب با ممانعت از برهم خوردن تعادل کلسیم در سلول و اختلال در فسفریلاسیون اکسیداتیو باعث کاهش آثار سمی فلزاتی همچون سرب بر کبد می‌شود [۲۳-۲۶]. در این مطالعه سعی شده است از طریق زیست‌حسگر لوسیفراز رده سلولی Huh7-1x-ARE-luc اثر غلظت‌های مختلف نانوکورکومین در سمیت‌زدایی سرب در غلظت‌های بالای آن را نشان داده شود.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه از زیست‌حسگر لوسیفراز رده سلولی Huh7-1x-ARE-luc تولید شده در آزمایشگاه پروفیسور مجید صادقی‌زاده، استفاده شده است [۲۷]. موادشیمیایی مورد استفاده در این تحقیق همگی از شرکت Merck (آلمان) یا Sigma (آمریکا) تهیه شده است. کیت‌های تخلیص پلاسמיד و تخلیص DNA از شرکت Bioneer (آمریکا) تهیه شدند. در این مطالعه

فاقد سمیت است. طی مطالعه‌ای دیگر نقش ضد سرطانی نانوکورکومین دندروزی در مدل‌های موشی مبتلا به سرطان کولون، موفقیت‌آمیز گزارش شد [۹]. دندروزوم‌ها، میسل‌های پگیله شده (Polyethylene glycol: PEG) مشتق از واحدهای اسید چرب اولئیک اسید هستند و برای اولین بار در ایران و در گروه تحقیقاتی پروفیسور مجید صادقی‌زاده در دانشگاه تربیت مدرس، طراحی و سنتز شده است.

اخیراً تأثیر مثبت کورکومین بر بسیاری از بیماری‌ها همچون ایدز (Acquired immune deficiency syndrome: AIDS)، آرتریت روماتوئید (Rheumatoid arthritis)، چاقی، دیابت، کولیت، بیماری‌های التهابی و انواع بیماری‌های پوستی مانند پسوریازیس (Psoriasis)، اگزما (Eczema) و ... مشخص شده است. به علاوه خاصیت ضد رگ‌زایی آن در انواع سرطان‌ها بررسی و تأیید شده است و به‌همین دلیل سرعت پیشروی بیماری و میزان التهاب حاصل از بیماری را در افراد مبتلا در اثر مصرف این ترکیب کاهش پیدا خواهد کرد [۹-۱۵].

پاسخ بدن به فلزات سنگین توسط مکانیسم استرس اکسیداتیو به کمک دو گروه آنزیمی انجام می‌شود. دسته اول مربوط به خانواده آنزیمی سیتوکروم P450 (CYPs) که اکثر فرآیندهای سم‌زدایی توسط این خانواده آنزیمی صورت می‌گیرد [۱۶]. دسته دوم روی محصولات گروه اول عمل می‌کند و باعث افزایش حلالیت این ترکیبات و همچنین کاهش سمیت آن‌ها با مکانیسم‌های مختلف می‌شود. اکثر آنزیم‌های این گروه دارای توالی عوامل پاسخ‌گو به آنتی‌اکسیدان‌ها (Antioxidant Responsive Elements: AREs) در پروموتور خود هستند و بیان آن‌ها تحت تأثیر عامل رونویسی *Nrf2* افزایش می‌یابد [۱۷].

میزان بیان تعداد زیادی از ژن‌ها از جمله *NQO1*]NAD(P)H: Spontaneous 1 [quinone oxidoreductase *GSH*، (*HMOX-1* (Glutathione Oxygenase-1)، (*GST*، (*Heme* UDP-Glucuronyl *UGT*) و (*Glutathione S-Transferase*)

پایش اثر نانوکورکومین بر روی سمیت سرب

دامنه غلظتی ۰-۸۰ میکرومولار از سرب آزمایش شد.

سنجش میزان بیان پایه لوسیفراز در سلول‌های ترانسفکت شده با دستگاه لومینومتر

از رده سلولی Huh7 که قبلاً ترانسفکشن موفق سازه pGL4.26/ARE به صورت پایدار در آن‌ها صورت گرفته بود برای سنجش میزان بیان لوسیفراز استفاده شد. برای این منظور بعد از کشت این سلول‌ها، لیز آن‌ها انجام شد به این روش که بعد از تخلیه محیط کشت و شستشو سلول‌ها با PBS (Phosphate buffered saline) به هر چاهک ۷۰ میکرولیتر بافر لیز اضافه و پلیت به مدت ۱۵-۲۰ دقیقه بر روی ظرف یخ تکان داده شد. عصاره سلولی جمع‌آوری شده به مدت ۱-۲ دقیقه ورتکس (Vortex) شدید شد. ترکیبات بافر لیز سلولی مورد استفاده طبق جدول ۱ می‌باشد.

نیز از نانوحامل پلیمری (دندروزوم) سنتز شده در همین آزمایشگاه برای رسانش کورکومین به سلول استفاده شد. حامل‌های دندروزومی OA-400 طی واکنش استریفیکاسیون (Esterification) اولئیل کلرید (۰/۳ گرم) و PEG ۴۰۰ (۴ گرم)، در حضور تری اتیل آمین (۱/۲ گرم) و کلروفرم به عنوان حلال، ساخته شد. در نهایت، حاملین دندروزومی OA-400 پس از جداسازی نمک تری اتیل آمین هیدروکلرید از فاز آلی و تبخیر کلروفرم در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد و در شرایط خلأ به مدت ۴ ساعت، به دست آمد [۹].

سنجش حساسیت سلول‌های Huh7 به سرب

به منظور بررسی قابلیت متابولیکی سلول‌های Huh7، واکنش MTT [3-(4,5-Dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-] [diphenyl-2H-tetrazolium bromide] این سلول‌ها در

جدول ۱ ترکیبات بافر لیز سلولی

مواد	NaCl	Tris-Cl	مهار کننده پروتئاز PMSF	EDTA	Triton X100
غلظت	۱۵۰ میلی مولار	۱۵۰ میلی مولار	یک میلی مولار	یک میلی مولار	یک درصد

۵۶۰ نانومتر تنظیم شده بود منتقل شد. سپس نور تولید شده توسط دستگاه لومینومتر بر حسب فعالیت لوسیفراز بر حسب ثانیه (RLU/Sec) خوانده شد. میزان فعالیت لوسیفراز بر حسب ثانیه نشان دهنده میزان فعالیت آنزیم لوسیفراز بیان شده در سلول‌ها بعد از انجام موفقیت‌آمیز ترانسفکشن است. مقدار مواد و بافرهای مورد استفاده برای سنجش میزان نور ساطع شده طبق جدول ۲ می‌باشد.

این بافر در pH نهایی ۷/۴ تهیه شد. همچنین پودر PMSF (Phenylmethane sulfonyl fluoride) در DMSO (Dimethyl sulfoxide) حل و در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد و دقیقاً قبل از شروع کار به بافر لیز سلول اضافه شد. ۵ میکرولیتر از محصول لیز شده حسگر زیستی با ۵ میکرولیتر کمپلکس سنجش در داخل لوله‌های مخصوص لومینومتر مخلوط و به دستگاه لومینومتر که روی طول موج

جدول ۲ مواد و بتفرهای مورد استفاده در واکنش سنجش نور ساطع شده

مواد	لوسیفرین	MgSo4	ATP	بافر تریس	تریتون X-100	گلیسرول	دی تیوتریتول	تریس فسفات	بافر لیز CCLR
غلظت	۲ میلی مولار	۱۰ میلی مولار	۴ میلی مولار	۵۰ میلی مولار	۱۰ درصد	۱۰ درصد	۲ میلی مولار	۲۵ میلی مولار	۱ X

سلول‌ها لیز سلولی آن‌ها انجام شد و بعد از مخلوط نمودن با کمپلکس سنجش میزان فعالیت لوسیفرازی سلول‌های تحت تیمار با دستگاه لومینومتر خوانده شد.

استخراج RNA و سنتز DNA مکمل (cDNA)

از تمامی سلول‌های که تحت تیمارهای مختلف از غلظت‌های سرب و نانوکورکومین گرفته بودند، برای بررسی میزان بیان ژن‌های مورد نظر، استخراج RNA انجام شد. بعد از استخراج RNA طبق دستورالعمل کیت استخراج RNA، کیفیت و کمیت RNA استخراج شده به ترتیب توسط الکتروفورز روی ژل و دستگاه نانودراپ (Thermo Fisher Scientific Inc، آمریکا) سنجش شد. سپس ساخت DNA مکمل توسط کیت سنتز cDNA (complementary DNA) محصول شرکت Fermentase آلمان (Revert AID TM First St SLEnd cDNA Synthesis Fermentase) انجام شد.

آماده‌سازی آغازگرها برای انجام RT-PCR

طراحی آغازگرها توسط ابزار طراحی آغازگر سایت NCBI، به آدرس اینترنتی <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/index.cgi?LINK=BlastHome> انجام گرفت. برای جلوگیری از تکثیر DNA ژنومی، آغازگرها طوری طراحی شد که اتصالات اگزونی را تکثیر نمایند. بدین ترتیب واکنش به نفع قطعه کوچک حاصل از الگوی cDNA و نه DNA ژنومی حاوی توالی اینترونی پیش رفت. در این پروژه از ژن Gapdh به‌عنوان کنترل داخلی استفاده شد. توالی و مشخصات آغازگرهای به کار رفته به شرح زیر بود (جدول ۳).

سنجش حساسیت سلول‌های ترانسفکت شده

به سرب

برای بررسی میزان فعالیت لوسیفرازی رده سلولی Huh7-1x-ARE-luc در حضور ماده اکسیداتیو (سرب)، تیمار این سلول‌ها با غلظت‌های مختلف سرب (۰-۸۰ میکرومولار) صورت گرفت. سپس طبق روش ذکر شده در بالا میزان فعالیت لوسیفرازی آن با دستگاه لومینومتر سنجیده شد.

سنجش فعالیت لوسیفرازی زیست‌حسگر در

حضور غلظت‌های متفاوت نانوکورکومین

به این منظور زیست‌حسگر لوسیفراز تحت تیمار با غلظت‌های ۴، ۸ و ۱۶ میکرومولار نانوکورکومین قرار گرفت. سپس لیز سلولی سلول‌های تیمار شده با نانوکورکومین طبق روش ذکر شده در بالا انجام شد و پس از مخلوط با کمپلکس سنجش، میزان فعالیت لوسیفرازی آن با دستگاه لومینومتر سنجیده شد.

سنجش فعالیت لوسیفرازی سلول‌های تحت

تیمار همزمان غلظت‌های نانوکورکومین و

سرب

به‌منظور بررسی آثار غلظت‌های متفاوت نانوکورکومین بر خاصیت اکسیدانی سرب سلول‌های حاوی زیست‌حسگر لوسیفرازی تحت تیمار همزمان غلظت ۳۰ میکرومولار از سرب و غلظت‌های ۴، ۸، ۱۶ و ۲۰ میکرومولار از نانوکورکومین قرار گرفتند. بعد از گذشت زمان تیمار این

پایش اثر نانوکورکومین بر روی سمیت سرب

جدول ۳ نام و مشخصات آغازگرهای مورد استفاده در واکنش‌های RT-PCR و Real-time PCR

ژن	توالی (5'-3')	اندازه (باز)	دمای اتصال
NRF2	F5'-ATCCATTCTGAGTTACAGTGTCT - 3'	۲۰۳	۶۰
	R5'-TGGAGAGGATGCTGCTGAAG -3'		
NQO1	F5'-CCAATTCAGAGTGGCATTCTGC -3'	۱۹۰	۶۰
	R5'-GGAAGTTTAGGTCAAAGAGGCTG - 3'		

مورد استفاده به غیر از آغازگر و cDNA ساخته شد. واکنش PCR در حجم ۲۰ میکرولیتر در دستگاه ترموسایکلر انجام شد. مراحل انجام واکنش به صورت زیر بود (جدول ۴).

بررسی بیان ژن‌ها به روش RT-PCR

برای اطمینان از یکسان بودن ترکیبات در همه تیوب‌های PCR، یک محلول اصلی (Master mix) از کلیه ترکیبات

جدول ۴ برنامه دمایی و زمانی واکنش RT-PCR

دما و زمان واسرشت اولیه (Denaturation)	۳۰-۳۵ چرخه		
	دما و زمان واسرشت	دما و زمان اتصال (Annealing)	دما و زمان طویل شدن نهایی
۱۰ دقیقه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد	۲۰ ثانیه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد	۳۰ ثانیه - مطابق	۷ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد

ΔCt و با استفاده از نرم‌افزار graphpad prism 6 انجام شد.

Quantitative Real-time PCR

بعد از الکتروفورز محصولات RT-PCR واکنش Real-time PCR انجام شد. تعیین کمیت ژن‌های مورد نظر بر اساس روش مقایسه‌ای (Comparative quantification) انجام گرفت. برای این منظور از SYBR Green، آغازگرهای اختصاصی برای ژن‌های هدف و Gapdh به عنوان ژن کنترل داخلی استفاده شد. این واکنش روی دستگاه Step One (ABI، آمریکا) در حجم ۱۰ میکرولیتر و طبق برنامه توصیه شده توسط شرکت ارائه کننده کیت برای ۴۰ چرخه انجام شد. میزان بیان ژن با استفاده از $2^{-\Delta\Delta Ct}$ و نرم‌افزار Graph pad محاسبه و بین گروه‌ها مقایسه شد.

نتایج

در این تحقیق از رده سلولی پایداری که حاصل ترانسفکشن سازه نوترکیب pGL4.26/ARE (یک سازه است که حاوی ژن گزارشگر تحت کنترل پرموتر پاسخگو به اکسیدان‌ها است و برای شناسایی مواد اکسیداتیو طراحی شده است) به رده سلولی Huh7 است و نتایج آن در مقاله مطهری [۲۷] ذکر شده، برای بررسی سمیت سرب و تأثیر نانوکورکومین بر سمیت سرب استفاده شده است.

نتایج حاصل از تعیین حساسیت سلول‌های

Huh7 به سرب

نتایج حاصل از بررسی قابلیت متابولیسم سلول‌های تیمار

تحلیل‌های آماری

کلیه تحلیل‌های آماری این مطالعه با استفاده از روش

با غلظت‌های ۴ و ۸ میکرومولار از نانوکورکومین که در آن استرس اکسیداتیو ایجاد نمی‌شود به‌طور تقریبی فاقد فعالیت لوسیفراز است. اما در غلظت ۱۶ میکرومولار نانوکورکومین تشدید فعالیت لوسیفراز به‌طور معنی‌داری ($p=0/0075$) به علت افزایش تحریک ARE اتفاق می‌افتد که بیانگر این مطلب است که نانوکورکومین در این غلظت القاکننده استرس اکسیداتیو است.

نتایج حاصل از بررسی تیمار همزمان سرب و غلظت‌های مختلف نانوکورکومین بر فعالیت لوسیفراز

نانوکورکومین در غلظت‌های مختلف آثار دو سویه اکسیدانی و آنتی اکسیدانی را اعمال می‌کند. به منظور بررسی تأثیر نانوکورکومین بر آثار اکسیداتیوی سرب از تیمار همزمان غلظت‌های متفاوتی از نانوکورکومین و سرب (غلظت ۳۰ میکرومولار از سرب و غلظت‌های ۴، ۸ و ۱۶ میکرومولار از نانوکورکومین) روی زیست‌حسگر لوسیفراز آزمایش شد. نتایج نشان می‌دهد که در نمونه‌های تیمار شده با غلظت ۳۰ میکرومولار از سرب و غلظت‌های ۴ و ۸ میکرومولار از نانوکورکومین، میزان بیان لوسیفراز نسبت به نمونه‌های تیماری تنها با غلظت ۳۰ میکرومولار از سرب، به علت خاصیت آنتی اکسیدانی نانوکورکومین در این غلظت کاهش یافته است. از سوی دیگر، در نمونه‌های تیمار شده با غلظت ۳۰ میکرومولار از سرب و غلظت ۱۶ از نانوکورکومین به علت خاصیت اکسیدانی نانوکورکومین، میزان بیان لوسیفراز نسبت به نمونه‌های تیماری تنها با غلظت ۳۰ میکرومولار از سرب افزایش یافته است. در سلول‌های تیمار شده با سرب ۳۰ میکرومولار نسبت به نمونه‌های تیمار نشده کنترل منفی نیز افزایش نور به علت خاصیت اکسیدانی سرب مشاهده شد (شکل ۴).

شده Huh7 با حضور غلظت‌های مختلف ۰-۸۰ میکرومولار سرب، در مدت ۴۸ ساعت در شکل ۱ نشان داده شده است. MTT این سلول‌های تحت تیمار بعد از گذشت ۴۸ ساعت انجام شد که همان‌طور که در شکل مشخص است، نتایج نشان می‌دهد که در غلظت ۳۵ میکرومولار از سرب متابولیسم نیمی از سلول‌ها مهار می‌شود.

نتایج حاصل از سنجش فعالیت زیست‌حسگر لوسیفراز رده سلولی Huh7-1x-ARE-luc در حضور سرب

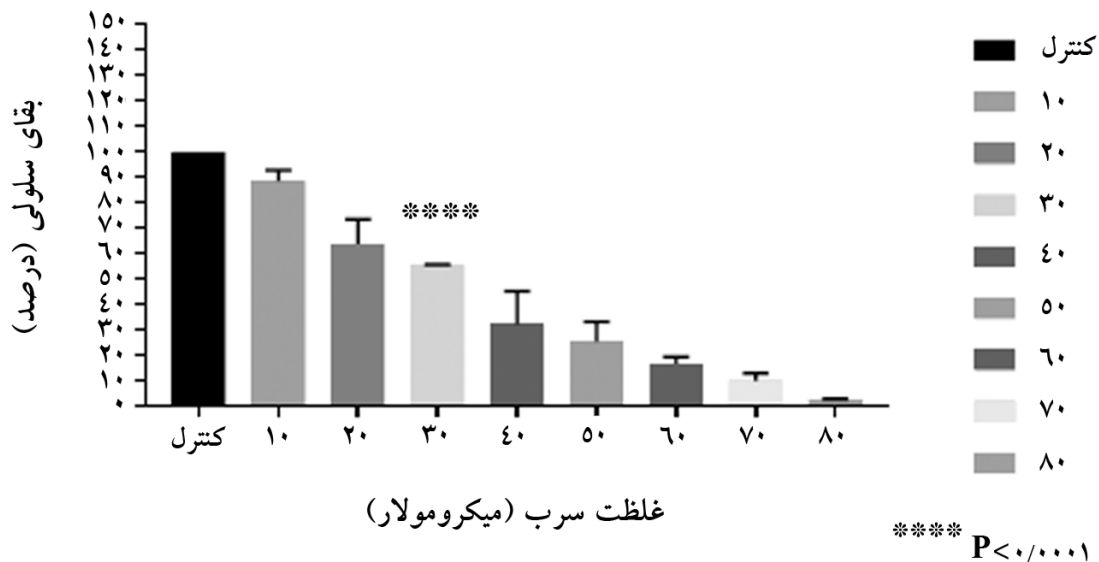
برای پایش سمیت سرب توسط زیست‌حسگر لوسیفراز، سلول‌های مورد نظر تحت تیمار با غلظت‌های مختلفی از سرب قرار گرفتند. نتایج آن در شکل ۲ نشان داده شده است. نتایج حاصل از این سنجش نشان می‌دهد که زیست‌حسگر لوسیفراز مورد نظر در غلظت ۳۰ میکرومولار از سرب به صورت معنی‌داری ($p=0/0005$) بیشترین فعالیت لوسیفراز را از خود بروز می‌دهد.

نتایج حاصل از پایش آثار نانوکورکومین بر استرس اکسیداتیو توسط زیست‌حسگر لوسیفراز رده سلولی Huh7-1x-ARE-luc

به این منظور زیست‌حسگر تحت تیمار با غلظت‌های متفاوتی از نانوکورکومین قرار گرفت. مطالعات مختلف نشان داده‌اند که کورکومین در غلظت‌های پایین دارای خاصیت آنتی اکسیدانی و در غلظت‌های بالاتر دارای خاصیت پرواکسیدانی و القای مرگ سلولی برنامه‌ریزی شده (Apoptosis) است. به همین دلیل غلظت‌های ۴ و ۸ و ۱۶ میکرومولار از نانوکورکومین برای تیمار انتخاب شدند. همان‌طور که در شکل ۳ مشخص است نمونه‌های تیمار شده

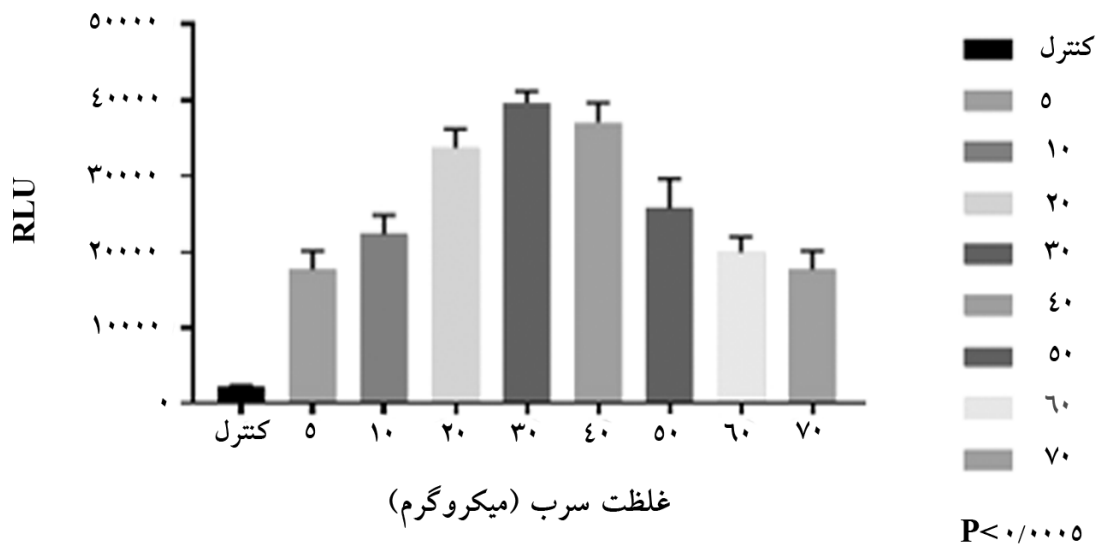
پایش اثر نانوکورکومین بر روی سمیت سرب

آزمون MTT

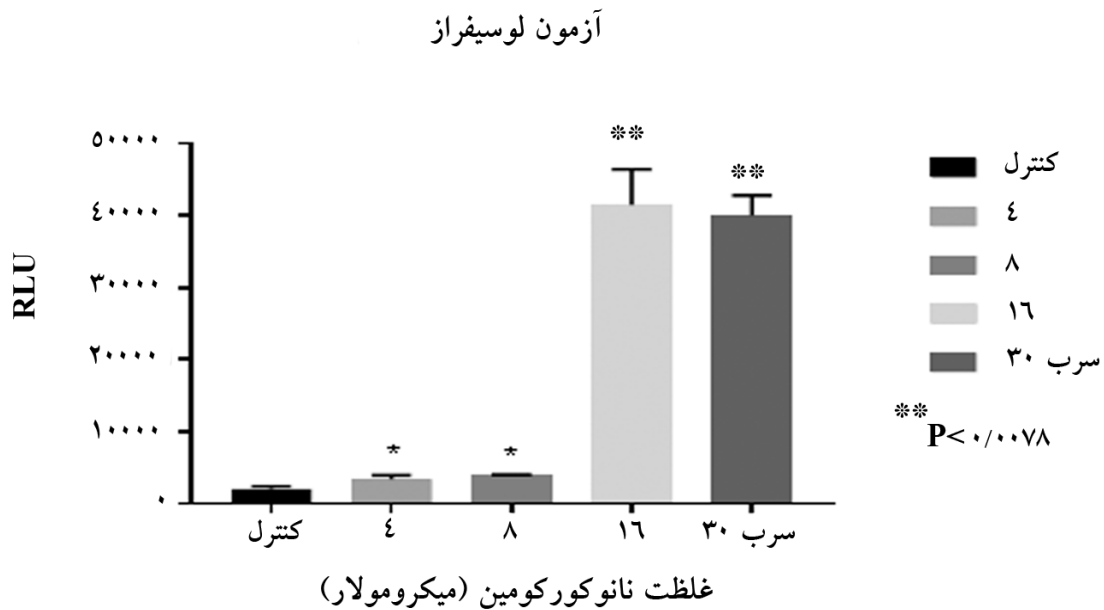


شکل ۱ اثر سمیت سرب بر سلول‌های Huh7 با آزمون MTT؛ سلول‌ها با غلظت ۰-۸۰ میکرومولار از سرب تیمار شدند.

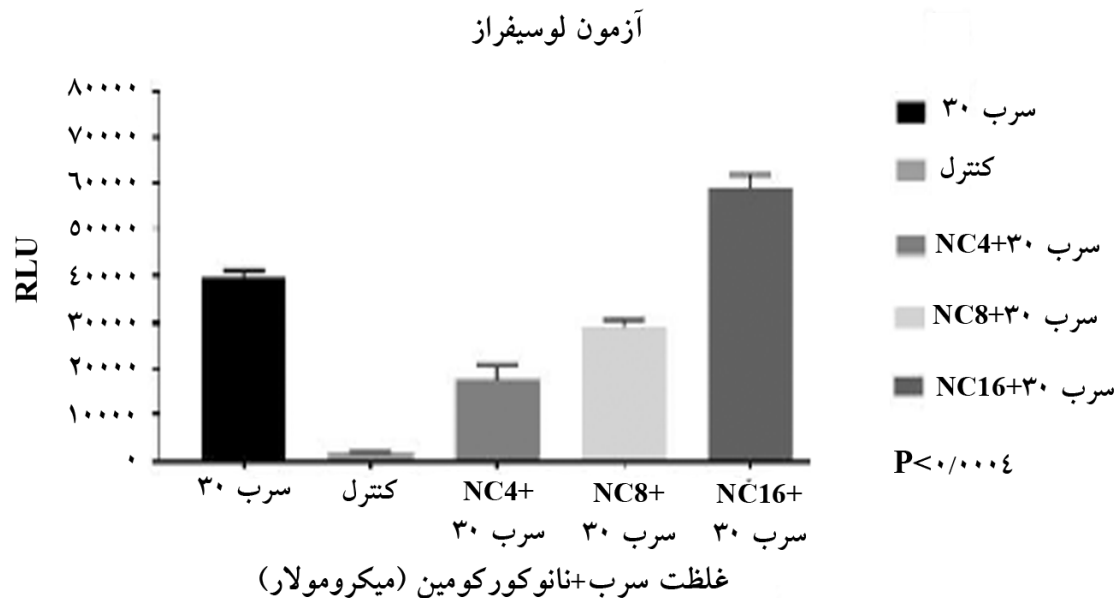
آزمون لوسیفراز



شکل ۲ سنجش فعالیت زیست‌حسگر لوسیفراز در سلولی Huh7-1x-ARE-luc در حضور غلظت‌های متفاوتی از سرب

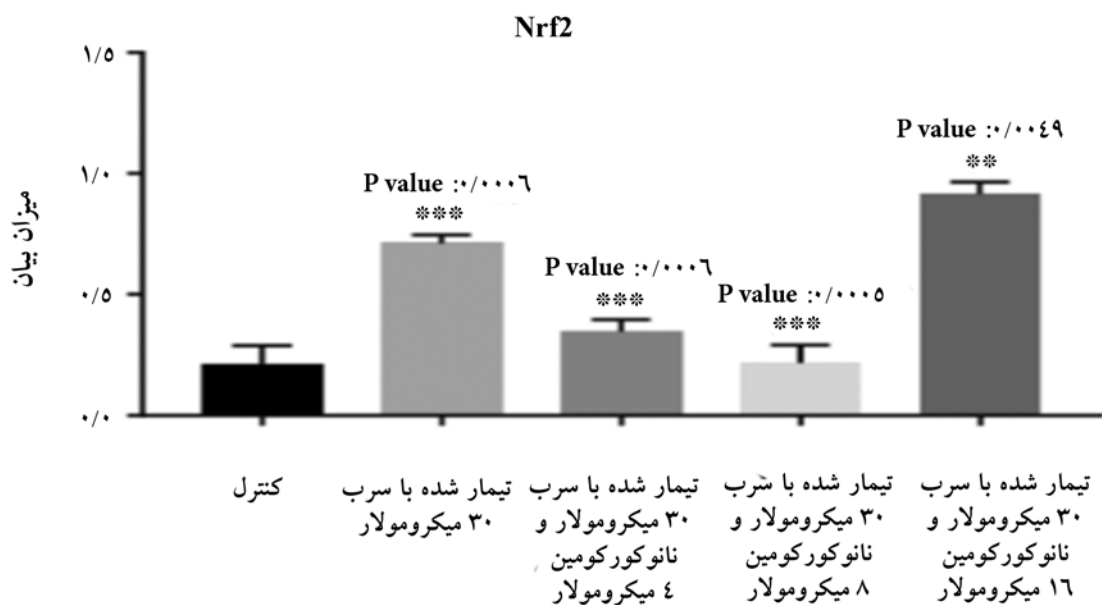
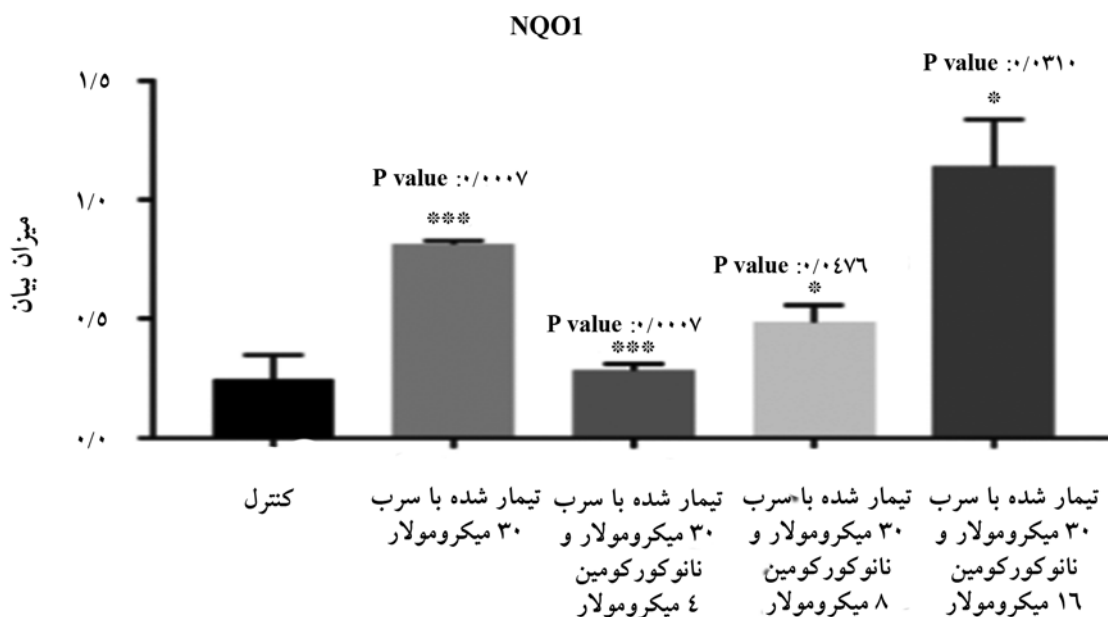


شکل ۳ تعیین اختصاصیت زیست حسگر لوسیفراز رده سلولی Huh7-1x-ARE-luc. غلظت ۱۶ میکرومولار از نانوکورکومین که القا کننده استرس اکسیداتیو و در نتیجه ARE است، مانند غلظت ۳۰ میکرومولار از سرب (ماده اکسیداتیو)، فعالیت لوسیفراز را افزایش می دهد؛ اما غلظت های پایین تر که در آن استرس اکسیداتیو اتفاق نمی افتد (غلظت های ۴ و ۸ میکرومولار) همچون کنترل منفی تغییری در بیان لوسیفراز ایجاد نمی کند.



شکل ۴ تیمار همزمان غلظت های مختلف نانوکورکومین با سرب؛ غلظت ۱۶ میکرومولار از نانوکورکومین که القا کننده استرس اکسیداتیو و در نتیجه ARE است فعالیت لوسیفراز را افزایش می دهد؛ اما غلظت های پایین تر که در آن استرس اکسیداتیو اتفاق نمی افتد. غلظت های ۴ و ۸ میکرومولار نانوکورکومین فعالیت لوسیفراز را کاهش داده است.

پایش اثر نانوکورکومین بر روی سمیت سرب



شکل ۵ افزایش بیان ژنهای آنتی اکسیدانی *NQO1* و *Nrf2* در نمونه‌های تیمار شده با سرب ۳۰ میکرومولار نسبت به کنترل؛ همچنین کاهش بیان ژنهای مذکور در نمونه‌های تیمار شده با نانوکورکومین ۴ و ۸ میکرومولار و سرب ۳۰ میکرومولار در مقایسه با نمونه‌هایی که تنها با سرب ۳۰ میکرومولار تیمار شده‌اند و افزایش بیان ژنهای *NQO1* و *Nrf2* در نمونه‌های تیمار شده با نانوکورکومین ۱۶ میکرومولار نسبت به نمونه‌های تیمار شده با سرب ۳۰ میکرومولار مشاهده می‌شود.

نتایج تحلیل داده‌های Real time-PCR

بحث

پس از ساخت cDNA، بیان ژن *Nrf2* و *NQO1* که ژن‌های اصلی در مسیر پیام‌رسانی ARE/KEAP1 هستند، بین نمونه‌های تیمار شده با غلظت‌های ۴، ۸ و ۱۶ میکرومولار از نانوکورکومین همراه با سرب ۳۰ میکرومولار و نمونه‌های تیماری با سرب به تنهایی و نمونه کنترل تیمار نشده مقایسه شد.

طبق نتایج به‌دست آمده از بررسی Real-time PCR، بیان ژن *Nrf2* در نمونه‌های تیمار شده با سرب ۳۰ میکرومولار نسبت به نمونه‌های کنترل افزایش یافته است که از نظر آماری نیز معنی‌دار بود. در نمونه‌های تیمار شده با نانوکورکومین ۴ و ۸ میکرومولار به همراه سرب ۳۰ میکرومولار نسبت به نمونه‌هایی که تنها با سرب ۳۰ میکرومولار تیمار شده‌اند، میزان بیان این ژن کاهش یافته است که طبق انتظار محققان حاضر بود؛ زیرا نانوکورکومین در غلظت‌های پایین خاصیت آنتی‌اکسیدانی دارد. در نمونه‌های تیمار شده با نانوکورکومین ۱۶ میکرومولار به همراه سرب ۳۰ میکرومولار نسبت به نمونه‌های که تنها با سرب ۳۰ میکرومولار تیمار شده‌اند میزان بیان این ژن به علت خاصیت اکسیدانی نانوکورکومین در غلظت‌های بالا افزایش داشته است.

در خصوص میزان بیان ژن *NQO1* در نمونه‌های تیمار شده با سرب ۳۰ میکرومولار نسبت به نمونه‌های کنترل افزایش بیان این ژن مشاهده می‌شود که این افزایش از نظر آماری نیز معنی‌دار بود. در نمونه‌های تیمار شده با نانوکورکومین ۴ و ۸ میکرومولار به همراه سرب ۳۰ میکرومولار نسبت به نمونه‌های که تنها با سرب ۳۰ میکرومولار تیمار شده‌اند، میزان بیان این ژن کاهش یافته است و در نمونه‌های که با نانوکورکومین ۱۶ میکرومولار به همراه سرب ۳۰ میکرومولار تیمار شده بودند، نسبت به نمونه‌هایی که تنها با سرب ۳۰ میکرومولار تیمار شده‌اند، افزایش میزان بیان این ژن مشاهده شد (شکل ۵).

رادیکال‌های آزاد و از سوی دیگر عوامل محیطی اکسیداتیو مثل فلزات سنگین، قابلیت آسیب رساندن به اسیدهای نوکلئیک و پروتئین‌ها و ایجاد اختلال در عملکرد این ماکرومولکول‌ها را دارند. در مطالعات اخیر استرس اکسیداتیو یکی از کشنده‌ترین مکانیسم‌های مؤثر سمیت فلزات سنگینی همچون سرب مطرح شده است. بدن انسان مکانیسم‌های متعددی را برای مواجهه با این استرس‌های اکسیداتیو در پیش می‌گیرد که مهم‌ترین آن‌ها تولید آنتی‌اکسیدان‌ها است. در صورت برهم خوردن تعادل بین این ترکیبات و آنتی‌اکسیدان‌ها شرایطی ایجاد می‌شود که استرس اکسیداتیو خوانده می‌شود [۲۸]. در نتیجه فعال شدن مسیر استرس اکسیداتیو در سلول در اثر مواجهه با ترکیبات اکسیدان از جمله فلزات سنگینی چون سرب میزان بیان ژن‌های مسئول این مسیر که حاوی توالی ARE در پروموتورشان هستند افزایش می‌یابد و در اثر کاهش عامل استرس اکسیداتیو بیان این ژن‌ها نیز کاهش می‌یابد. عوامل متعددی که اکثراً جز آنتی‌اکسیدان‌ها هستند، می‌توانند در کاهش استرس اکسیداتیو مؤثر باشند و در نهایت باعث کاهش بیان ژن‌های مربوط به این مسیر شوند [۲۹]. یکی از این ترکیبات کورکومین است. نتیجه پژوهش‌هایی که تا به امروز روی کورکومین صورت گرفته نشان می‌دهد که این ماده با تأثیر بر مسیرهای متابولیک سلولی، خاصیت شل‌کننده و افزایش بیان ژن‌های مربوط به آنزیم‌های دتوکسی‌کننده از طریق مسیر (*Nrf2/keap1/ARE*) دارد و باعث کاهش سمیت فلزات سنگین همچون سرب می‌شود. مکانیسم اثر آن بدین ترتیب است که کورکومین با تغییر باقی مانده سیستمین در عامل *Keap1* باعث تغییر صورت‌بندی (شکل) کمپلکس *Nrf2/keap1* شده و در نتیجه آن عامل *Nrf2* آزاد شده و به هسته مهاجرت کرده و به صورت هتروداایمر به پروموتور ARE اتصال می‌یابد. به عبارت دیگر، کورکومین باعث افزایش بیان ژن‌های حاوی پروموتور ARE شده و در نتیجه افزایش بیان این دسته از ژن‌ها مسیر استرس اکسیداتیو که وابسته به این ژن‌هاست فعال شده و

پایش اثر نانوکورکومین بر روی سمیت سرب

غلظت ۳۵ میکرومولار از سرب متابولیسیم ۵۰ درصد سلول‌ها را مهار می‌کند.

بررسی منحنی بیان ژن لوسیفراز در محدوده ۴ تا ۱۶ میکرومولار از نانوکورکومین نشان می‌دهد که در غلظت‌های ۴ و ۸ میکرومولار از نانوکورکومین که استرس اکسیداتیو القا نمی‌شود بیان ژن لوسیفراز بسیار کم است و در واقع می‌توان اظهار کرد که بیان ژن لوسیفراز مانند کنترل منفی که نمونه بدون تیمار است وجود ندارد یا بسیار کم است و با افزایش غلظت آن به ۱۶ میکرومولار بیان ژن گزارشگر نیز افزایش می‌یابد.

برای بررسی بیان ژن‌های *NQOI* و *Nrf2* در سطح *mRNA* و تأیید نتایج حاصل از آزمایش لوسیفراز، آزمایش *Real time PCR* نیز انجام شد. نتایج تحلیل داده‌های حاصل از *Real time-PCR* نشان می‌دهد که بیان تمامی ژن‌های مورد بررسی شامل *NQOI* و *Nrf2* در سلول‌های *Huh7* تیمار شده با سرب ۳۰ میکرومولار و نانوکورکومین ۴ و ۸ میکرومولار نسبت به تیمار همان ژن‌ها با سرب ۳۰ میکرومولار کاهش یافته است. از سوی دیگر، بیان ژن‌های *NQOI* و *Nrf2* در سلول‌های *Huh7* تیمار شده با سرب ۳۰ میکرومولار و نانوکورکومین ۱۶ میکرومولار نسبت به تیمار همان ژن‌ها با سرب ۳۰ میکرومولار افزایش یافته است و در نتیجه همان‌طور که انتظار می‌رفت در سلول‌های تیمار شده با سرب ۳۰ میکرومولار نسبت به نمونه‌های تیمار نشده کنترل، بیان ژن‌های مسیر آنتی اکسیدانی از جمله *NQOI* و *Nrf2* به علت خاصیت اکسیدانی سرب افزایش یافته است. در نهایت می‌توان اظهار کرد که غلظت‌های مختلف نانوکورکومین احتمالاً این قابلیت را دارد که عوامل مهم مسیر *ARE/KEAP1* همچون *Nrf2* و *NQOI* را هم به‌عنوان اکسیدان و هم آنتی اکسیدان تحت تأثیر قرار بدهد. در این مطالعه غلظت‌های ۴ و ۸ میکرومولار نانوکورکومین احتمالاً با اثر گذاشتن روی عوامل مسیر *ARE/KEAP1* باعث سمیت زدایی مواد اکسیداتیوی چون سرب شد که می‌تواند در سم‌زدایی افرادی که غلظت سرب پلاسمای خون آن‌ها از حد

می‌تواند سمیتی که در اثر فلزات سنگینی همچون سرب ایجاد می‌شود را کاهش دهد [۲۲]. مطالعات مختلف نشان داده که کورکومین در غلظت‌های پایین‌تر از ۱۰ میکرومولار دارای خاصیت آنتی‌اکسیدانی و در غلظت‌های بالاتر از آن دارای خاصیت القای مرگ سلولی برنامه‌ریزی شده و استرس اکسیداتیو است [۳۰].

در زیست‌حسگر لوسیفراز که در این تحقیق از آن استفاده شده است، فلز سرب به‌عنوان یک اکسیدان باعث افزایش بیان ژن‌های در بردارنده توالی *ARE* در پروموتران (*NQOI*) می‌شود و این امر احتمالاً توسط رهایی و افزایش عامل *Nrf2* صورت می‌پذیرد و به دنبال آن بیان ژن لوسیفراز هم افزایش خواهد یافت. نانوکورکومین در غلظت‌های بالا مانند یک اکسیدان عمل کرده و به نظر می‌رسد باعث افزایش بیان ژن *NQOI* و افزایش بیان لوسیفراز خواهد شد. اما نانوکورکومین در غلظت‌های کمتر از ۱۰ میکرومولار دارای خاصیت آنتی‌اکسیدانی بوده و در این حالت بیان ژن *NQOI* به دلیل یوبیکوئیتیناسیون (*Nrf2* Ubiquitination) و عدم افزایش رونویسی از توالی *ARE*، کاهش خواهد یافت.

انتظار می‌رود تیمار هم‌زمان سلول‌ها با سرب و غلظت‌های پایین نانوکورکومین باعث کاهش بیان ژن‌های در بردارنده توالی *ARE* در پروموتران همچون *NQOI* و باعث کاهش سمیت سرب شده و این امر با کاهش بیان لوسیفراز قابل ردیابی است.

نتایج بررسی‌های محققان حاضر نشان داد که زیست‌حسگر سلولی ساخته شده (*pGL4.26-ARE*) قادر به ردیابی مواد القاء کننده مسیر *Nrf2-ARE* است. در این آزمایش بیان ژن لوسیفراز در غلظت‌های ۰ تا ۸۰ میکرومولار سرب بررسی شد که نشان می‌داد میزان بیان ژن گزارشگر همراه با افزایش مقدار ماده اکسیداتیو افزایش می‌یابد و کاهش بیان ژن گزارشگر بعد از غلظت ۳۰ میکرومولار برای سرب به دلیل اثر مهارکنندگی آن روی متابولیسیم سلول‌ها اتفاق می‌افتد. همان‌طور که نتایج آزمون *MTT* مشخص است

مجاز عبور کرده است مؤثر باشد.

ژنتیک دانشگاه تربیت مدرس و جناب آقای دکتر هادی شیرزاد ریاست محترم پژوهشگاه علوم انتظامی که حمایت مالی این پروژه را بر عهده داشته‌اند؛ قدردانی و تشکر می‌شود.

تشکر و قدردانی

بدین‌وسیله از جناب پروفسور مجید صادقی‌زاده در گروه

منابع

- [1] Inoue F, Ahituv N. Decoding enhancers using massively parallel reporter assays. *Genomics* 2015; 106(3): 159-64.
- [2] Misawa M, Takahashi J. Generation of reactive oxygen species induced by gold nanoparticles under x-ray and UV Irradiations. *Nanomedicine* 2011; 7(5): 604-14.
- [3] Brandes RP, Weissmann N, Schröder K. Nox family NADPH oxidases: Molecular mechanisms of activation. *Free Radic Biol Med* 2014; 76: 208-26.
- [4] Pan MH, Huang TM, Lin JK. Biotransformation of curcumin through reduction and glucuronidation in mice. *Drug Metab Dispos* 1999; 27(4): 486-94.
- [5] Wahlström B, Blennow G. A study on the fate of curcumin in the rat. *Acta Pharmacol Toxicol (Copenh)* 1978; 43(2): 86-92.
- [6] Maiti K, Mukherjee K, Gantait A, Saha BP, Mukherjee PK. Curcumin-phospholipid complex: Preparation, therapeutic evaluation and pharmacokinetic study in rats. *Int J Pharm* 2007; 330(1-2): 155-63.
- [7] Tahmasebi Birgani M, Erfani-Moghadam V, Babaei E, Najafi F, Zamani M, Shariati M, Nazem S, Farhangi B, Motahari P, Sadeghizadeh M. Dendrosomal nano-curcumin; The novel formulation to improve the anticancer properties of curcumin. *Progress in Biological Sciences* 2015; 5(2): 143-58.
- [8] Balenga NA, Zahedifard F, Weiss R, Sarbolouki MN, Thalhamer J, Rafati S. Protective efficiency of dendrosomes as novel nano-sized adjuvants for DNA vaccination against birch pollen allergy. *J Biotechnol* 2006; 124(3): 602-14.
- [9] Tahmasebi Mirgani M, Sadeghizadeh M, Najafi F, Mowla SJ. Dendrosomal curcumin induced apoptosis by suppression of pluripotency genes in 5637 bladder cancer cells. *Modares Journal of Medical Sciences (Pathobiology)* 2013; 16(1): 23-39.
- [10] Aggarwal BB, Harikumar KB. Potential therapeutic effects of curcumin, the anti-inflammatory agent, against neurodegenerative, cardiovascular, pulmonary, metabolic, autoimmune and neoplastic diseases. *Int J Biochem Cell Biol* 2009; 41(1): 40-59.
- [11] Bisht S, Feldmann G, Soni S, Ravi R, Karikar C, Maitra A, Maitra A. Polymeric nanoparticle-encapsulated curcumin ("nanocurcumin"): a novel strategy for human cancer therapy. *J Nanobiotechnology* 2007; 5: 3.
- [12] Li L, Braithe FS, Kurzrock R. Liposome-encapsulated curcumin: in vitro and in vivo

پایش اثر نانوکورکومین بر روی سمیت سرب

- effects on proliferation, apoptosis, signaling, and angiogenesis. *Cancer* 2005; 104(6): 1322-31.
- [13] Tahmasebi Mirgani M, Isacchi B, Sadeghizadeh M, Marra F, Bilia AR, Mowla SJ, Najafi F, Babaei E. Dendrosomal curcumin nanoformulation downregulates pluripotency genes via miR-145 activation in U87MG glioblastoma cells. *Int J Nanomedicine* 2014; 9: 403-17.
- [14] Panahi A, Nakhai Sistani R, Sadeghizadeh M. Evaluation of Apoptosis Induction on Gastric cancer AGS Cells Made by Polymer Nano Curcumin. *Police Medicine* 2012; 1(3): 200-7.
- [15] Aggarwal BB, Sung B. Pharmacological basis for the role of curcumin in chronic diseases: an age-old spice with modern targets. *Trends Pharmacol Sci* 2009; 30(2): 85-94.
- [16] Zhu H, Jia Z, Strobl JS, Ehrich M, Misra HP, Li Y. Potent induction of total cellular and mitochondrial antioxidants and phase 2 enzymes by cruciferous sulforaphane in rat aortic smooth muscle cells: cytoprotection against oxidative and electrophilic stress. *Cardiovasc Toxicol* 2008; 8(3): 115-25.
- [17] Chan JY, Cheung MC, Moi P, Chan K, Kan YW. Chromosomal localization of the human NF-E2 family of bZIP transcription factors by fluorescence in situ hybridization. *Hum Genet* 1995; 95(3): 265-9.
- [18] Zhang Y, Gordon GB. A strategy for cancer prevention: stimulation of the Nrf2-ARE signaling pathway. *Mol Cancer Ther* 2004; 3(7): 885-93.
- [19] Li Y, Jaiswal AK. Regulation of human NAD(P)H: quinone oxidoreductase gene. Role of AP1 binding site contained within human antioxidant response element. *J Biol Chem* 1992; 267(21): 15097-104.
- [20] Finkel T. Signal transduction by reactive oxygen species. *J Cell Biol* 2011; 194(1): 7-15.
- [21] Holzerová E, Prokisch H. Mitochondria: Much ado about nothing? How dangerous is reactive oxygen species production? *Int J Biochem Cell Biol* 2015; 63: 16-20.
- [22] González-Reyes S, Guzmán-Beltrán S, Medina-Campos ON, Pedraza-Chaverri J. Curcumin pretreatment induces Nrf2 and an antioxidant response and prevents hemin-induced toxicity in primary cultures of cerebellar granule neurons of rats. *Oxid Med Cell Longev* 2013; 2013: 801418.
- [23] Epstein J, Sanderson IR, Macdonald TT. Curcumin as a therapeutic agent: the evidence from in vitro, animal and human studies. *Br J Nutr* 2010; 103(11): 1545-57.
- [24] Trujillo J, Chirino YI, Molina-Jijón E, Andérica-Romero AC, Tapia E, Pedraza-Chaverri J. Renoprotective effect of the antioxidant curcumin: Recent findings. *Redox Biology* 2013; 1(1): 448-56.
- [25] Barzegar A, Moosavi-Movahedi AA. Intracellular ROS protection efficiency and free radical-scavenging activity of curcumin. *PLoS One* 2011; 6(10): e26012.
- [26] Reyes-Fermín LM, González-Reyes S, Tarco-Álvarez NG, Hernández-Nava M, Orozco-Ibarra M, Pedraza-Chaverri J. Neuroprotective effect of α -mangostin and curcumin against iodoacetate-induced cell death. *Nutr Neurosci* 2012; 15(5): 34-41.
- [27] Motahari P, Sadeghizadeh M, Behmanesh

- M, Sabri S, Zolghadr F. Generation of stable ARE- driven reporter system for monitoring oxidative stress. *Daru* 2015; 23: 38.
- [28] Dorn JG, Frye RJ, Maier RM. Effect of temperature, pH, and initial cell number on luxCDABE and nah gene expression during naphthalene and salicylate catabolism in the bioreporter organism *Pseudomonas putida* RB1353. *Appl Environ Microbiol* 2003; 69(4): 2209-16.
- [29] Simmons SO, Fan CY, Yeoman K, Wakefield J, Ramabhadran R. NRF2 Oxidative Stress Induced by Heavy Metals is Cell Type Dependent. *Curr Chem Genomics* 2011; 5: 1-12.
- [30] Javidi MA, Zolghadr F, Babashah S, Sadeghizadeh M. Introducing Dendrosomal Nanocurcumin as a Compound Capable of in vitro Eliminating Undifferentiated Stem Cells in Cell Therapy Practices. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 2015; 123(10): 632-6.