



Comparative Effects of Curcumin Nano-Niosomes and Free Curcumin on Apoptosis, Intracellular ROS, and STAT3/NF- κ B Signaling Pathway in A549 Lung Cancer Cells

Gholamhossein Tondro¹, Mohammad Hasan Darvishi², Sajad Sahab-Negah³, Ghadir Rajabzadeh⁴, Ali Mohammadi⁵, Zabihollah Khaksar⁶, Hamid Reza Moradi⁶

¹ Department of Microbiology, Faculty of Medicine, AJA University of Medical Sciences, Tehran, Iran

² Nanobiotechnology Research Center, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran

³ Department of Neuroscience, Faculty of Medicine, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran

⁴ Department of Food Nanotechnology, Research Institute of Food Science and Technology, Mashhad, Iran

⁵ Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Shiraz University, Shiraz, Iran

⁶ Department of Basic Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Shiraz University, Shiraz, Iran

Received: 20 April 2024, Accepted: 22 June 2024

doi [10.22059/jvr.2024.372977.3421](https://doi.org/10.22059/jvr.2024.372977.3421)

Abstract

BACKGROUND: Niosomes are biodegradable and biocompatible carriers that have a hydrophilic head and a lipophilic tail and can encapsulate both hydrophobic and hydrophilic drugs. By nanotechnology and curcumin-loaded nanoniosomes, it is possible to exploit the diverse anticancer properties of curcumin via targeted delivery to the desired tissue.

OBJECTIVES: The present study aims to evaluate the effects of curcumin-loaded niosome nanoparticles (CM-NP) and free curcumin (CM) on apoptosis, intracellular reactive oxygen species (ROS), and STAT3/NF- κ B signaling pathway in A549 lung cancer cell line.

METHODS: The A549 cells were first exposed to CM-NP and CM. Then, the apoptosis, intracellular ROS, and STAT3/NF- κ B signaling pathways were evaluated using commercial kits.

RESULTS: Exposure to CM-NP significantly increased the early and late apoptotic A549 cells compared to CM ($P < 0.001$). Based on the half-maximal inhibitory concentration values, the CM-NP caused a significant increase in ROS production compared to CM ($P < 0.001$). In addition, exposure to CM and CM-NP led to a significant decrease in the expression levels of STAT3 and NF- κ B compared to non-exposed cells ($P < 0.001$). The expression levels of NF- κ B and STAT3 in A549 cells exposed to CM-NP were significantly lower than those in the CM group ($P < 0.05$).

CONCLUSIONS: The curcumin nano-niosomes induces apoptosis in A549 lung cancer cells more than the free form of curcumin, in an oxidative stress-dependent manner and by increasing intracellular ROS and by STAT3/NF- κ B signaling pathways. These results demonstrate the potential of the curcumin nano-niosomes as a promising method for lung cancer treatment.

Keywords: Apoptosis, A549 Cell Line, Curcumin nano-niosomes, Lung cancer, Nanocarriers

Copyright © Journal of Veterinary Research: Open Access; Copying, distribution and publication are free for full use with attribution. ©The Author(s).

Publisher: University of Tehran

Conflict of interest: The authors declared no conflict of interest.

Corresponding author: Hamid Reza Moradi, Tel/Fax: +9871-36138652



How to cite this article:

Tondro G, Darvishi MH, Sahab-Negah S, Rajabzadeh G, Mohammadi A, Khaksar Z, Moradi HR. Comparative Effects of Curcumin Nano-Niosomes and Free Curcumin on Apoptosis, Intracellular ROS, and STAT3/NF- κ B Signaling Pathway in A549 Lung Cancer Cells. *J Vet Res*, 2024; 79(3): 157-165.
doi: [10.22059/jvr.2024.372977.3421](https://doi.org/10.22059/jvr.2024.372977.3421)

Figure Legends and Table Captions

Table 1. Summary of primers for gene expression.

Figure 1. Effects of CM-NP and CM on apoptosis in A549 cancer cells.

Figure 2. Effects of CM-NP and CM on intracellular ROS.

Figure 3. Effects of CM-NP and CM on the expression of STAT3 and NF- κ B.



دوره ۷۹، شماره ۳، ۱۴۰۳، ۱۶۵-۱۵۷

اثرات مقایسه‌ای نانونیوزوم کورکومین و کورکومین آزاد بر روی آپوپتوز، ROS درون سلولی و مسیر سیگنالینگ STAT3/NF-kB در رده سلولی سرطانی ریه A549

غلامحسین تندرو^۱، محمدحسن درویشی^۲، سجاد سبحانگه^۳، قدیر رجب‌زاده^۴، علی محمدی^۵،

ذبیح‌اله خاکسار^۶، حمیدرضا مرادی^۶

^۱ گروه میکروبیولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی آجا، تهران، ایران

^۲ مرکز تحقیقات نانوبیوتکنولوژی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه‌الله، تهران، ایران

^۳ مرکز تحقیقات علوم اعصاب، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران

^۴ گروه نانوفناوری مواد غذایی، موسسه پژوهشی علوم و صنایع غذایی، مشهد، ایران

^۵ گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شیراز، شیراز، ایران

^۶ گروه علوم پایه، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شیراز، شیراز، ایران

تاریخ دریافت: ۱ اردیبهشت ماه ۱۴۰۳، تاریخ پذیرش: ۲ تیر ماه ۱۴۰۳

doi: [10.22059/jvr.2024.372977.3421](https://doi.org/10.22059/jvr.2024.372977.3421)

چکیده

زمینه مطالعه: نیوزوم‌ها حامل‌های زیست‌تخریب‌پذیر و زیست‌سازگار از سرهای آب‌دوست و دم‌های چربی‌دوست تشکیل شده‌اند که قابلیت حمل عوامل درمانی آگریز و آب‌دوست را دارند. با استفاده از نانوتکنولوژی و بارگذاری کورکومین در نانونیوزوم‌ها، می‌توان از خواص متنوع ضدسرطانی کورکومین از طریق تحویل هدفمند آن به بافت موردنظر بهره برد.

هدف: ارزیابی اثرات نانوذرات نیوزومی بارگذاری‌شده با کورکومین (CM-NP) و کورکومین آزاد (CM) بر روی آپوپتوز، ROS درون سلولی و مسیر سیگنالینگ STAT3/NF-kB در رده سلولی سرطانی ریه A549.

روش کار: سلول‌های A549 در مواجهه با CM-NP و CM قرار گرفتند و آپوپتوز، ROS درون سلولی و مسیر سیگنالینگ STAT3/NF-kB توسط کیت‌های تجاری ارزیابی شدند.

نتایج: مواجهه با CM-NP در مقایسه با CM به‌طور معنی‌داری موجب افزایش درصد سلول‌های A549 آپوپتوز اولیه و تأخیری شد ($P < 0.001$). داده‌های به‌دست‌آمده از گروه‌های CM و CM-NP در غلظت‌های IC50 نشان داد CM-NP در مقایسه با CM موجب افزایش معنی‌داری در تولید ROS می‌شود ($P < 0.001$). همچنین مواجهه با CM و CM-NP به کاهش معنی‌دار سطح بیان STAT3 و NF-kB در مقایسه با سلول‌های مواجه‌نشده منجر شد ($P < 0.001$). بیان NF-kB و STAT3 در سلول‌های A549 مواجهه‌شده با CM-NP به‌طور معنی‌داری کمتر از گروه CM بود ($P < 0.05$).

نتیجه‌گیری نهایی: نانونیوزوم کورکومین در سطح بالاتری از فرم آزاد کورکومین از طریق وابسته به استرس اکسیداتیو و افزایش ROS درون سلولی و مسیر سیگنالینگ STAT3/NF-kB، آپوپتوز را در سلول‌های سرطانی ریه A549 القا می‌کند. این نتایج پتانسیل نانونیوزوم کورکومین را به‌عنوان یک روش امیدوارکننده برای درمان سرطان ریه نشان می‌دهد.

کلمات کلیدی: آپوپتوز سلولی، رده سلول A549، سرطان ریه، نانوحامل، نانونیوزوم کورکومین

کپی‌رایت © مجله تحقیقات دامپزشکی: دسترسی آزاد؛ کپی‌برداری، توزیع و نشر برای استفاده کامل با ذکر منبع آزاد است، © نویسندگان.

ناشر: مؤسسه انتشارات دانشگاه تهران.



نویسنده مسئول: حمیدرضا مرادی، گروه علوم پایه، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شیراز، شیراز، ایران

مقدمه

مطالعات اخیر بر طراحی انواع مختلف نانوفرمولاسیون‌ها به منظور تحویل هدفمند و غلبه بر حلالیت کم عوامل درمانی در آب، افزایش فراهمی زیستی آن‌ها در بافت موردنظر، کاهش دُز تجویز شده و کاهش عوارض جانبی دارو بر روی سلول‌های سالم تمرکز دارد (۱، ۲). نانوحامل‌های نیوزوم یکی از انواع نانوحامل‌ها با شکل کروی می‌باشند که از یک سورفکتانت غیر یونی دولایه ساخته می‌شوند. نیوزوم‌ها حامل‌های زیست‌تخریب‌پذیر و زیست‌سازگار، از سرهای آب‌دوست و دم‌های چربی‌دوست تشکیل شده‌اند که قابلیت حمل هم‌زمان عوامل درمانی آبرگیز و آب‌دوست را دارند (۳، ۴). کورکومین به‌عنوان یک ترکیب مؤثر گیاهی دارای خواص ضدسرطانی و عوارض جانبی کم نسبت به داروهای سنتی شناخته شده است (۵، ۶). علی‌رغم این خواص دارویی شناخته شده از کورکومین، استفاده درمانی کورکومین به دلایل پاک‌سازی سریع سیستمی، جذب محدود سلولی، حلالیت ضعیف در آب و متابولیسم سریع به‌علت فراهمی زیستی پایین با محدودیت‌هایی مواجه است (۷، ۸). روش عمده مورد استفاده برای درمان موارد تشخیص داده شده سرطان ریه شامل ترکیبی از شیمی‌درمانی، رادیوتراپی یا ایمونوتراپی با جراحی است. در بین روش‌های مختلف درمانی، شیمی‌درمانی به دلیل تأثیر آن در پیشگیری از عود سرطان و متاستاز ارجحیت دارد. با این حال، بیشتر عوامل شیمی‌درمانی ترکیبات آبرگیز می‌باشند که نمی‌توانند به محل موردنظر خود برسند (۹-۱۱). معرفی روش‌های جدیدی که می‌توانند اثربخشی درمان را افزایش دهند، مهم است. در نتیجه، با کمک نانوتکنولوژی و بارگذاری کورکومین در نانونیوزوم می‌توان تا حدی این محدودیت‌ها را به حداقل رساند و از خواص متنوع و ضدسرطان کورکومین از طریق حمل هدفمند به بافت مدنظر به نحو بهتری بهره برد. گزارش شده است نانونیوزوم کورکومین (CM-NP) می‌تواند به‌طور معنی‌داری خواص ضدسرطانی کورکومین را در مقابل سلول‌های سرطانی مانند گلیوبلاستوما ارتقا دهد (۱۲). بنابراین هدف از مطالعه حاضر، ارزیابی بیشتر بالقوه CM-NP به‌عنوان یک سیستم تحویل دارو در مقایسه با کورکومین آزاد بر روی مسیر آپوپتوز، ROS درون سلولی و مسیر سیگنالینگ STAT3/NF-kB در رده سلولی سرطانی ریه A549 بود.

مواد و روش کار

آماده‌سازی نانونیوزوم کورکومین: به‌منظور سنتز فرمول نیوزوم، از توئین-۶۰ و کلسترول با روش هیدراتاسیون فیلم نازک استفاده شد (۱۲). به‌طور خلاصه، اسپن ۶۰، توئین ۶۰ (نسبت ۲:۱ مولار)، کلسترول و دی ستیل فسفات (سیگما، آمریکا) وزن شد و در ۱۰ میلی‌لیتر از مخلوط اتانول-کلروفرم (۲:۱ v/v) حل گردید. سپس، کورکومین (۱۰۰ میکرومولار؛ سیگما، آمریکا) در مخلوط حل شد. پس از تبخیر حلال آلی در یک اواپراتور دوار (BUCHI, Rotavapor® R-114، آلمان) در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد، یک فیلم لایه نازک در فلاسک ته‌گرد تشکیل شد که با بافر فسفات سالین (PBS) با pH=۷/۴ آبرسانی مجدد شد. سپس یک نیوزوم همگن توسط سونیکاسیون نیوزوم هیدراته (Bandelin, Sonopuls HD-3200، آلمان) در دامنه ۹۰ درصد، توان ۱۵۰ وات و فرکانس ۲۰ کیلوهرتز به مدت ۵ دقیقه (۳۰ ثانیه روشن و ۱۰ ثانیه خاموش) به دست آمد. کورکومین نانونیوزوم آماده شده به‌منظور ارزیابی بر روی سلول‌ها در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی نانونیوزوم کورکومین، مانند میانگین اندازه و ضریب پراکندگی، راندمان به دام انداختن و الگوی رهایش دارو در مطالعه Sahab-Negah و همکاران در سال ۲۰۲۰ (۱۲) ارائه شده است. همچنین غلظت‌های IC50 برای CM-NP و CM به ترتیب ۱۰۷/۲ میکروگرم/میلی‌لیتر و ۳۹/۴۸ میکروگرم/میلی‌لیتر به دست آمدند و در ادامه مطالعه استفاده شدند.

کشت سلول A549: سلول‌های A549 از بانک سلولی انستیتو پاستور ایران (تهران، ایران) خریداری شدند. این سلول‌ها در شرایط انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد با ۵ درصد Co2 و محیط کشت DMEM حاوی ۱۰ درصد سرم جنین گاوی (FBS)، ۱ درصد پنی‌سیلین/استرپتومایسین و ۰/۱ درصد آمفوتریسین B کشت داده شدند. سلول‌ها در یک شبانه‌روز انکوبه شدند و با غلظت‌های IC50 از CM-NP (۱۰۷/۲ میکروگرم/میلی‌لیتر) و CM (۳۹/۴۸ میکروگرم/میلی‌لیتر) در مدت‌زمان‌های مختلف برای ارزیابی‌های مدنظر شامل آپوپتوز / نکروز، تولید گونه‌های اکسیژن فعال (ROS) درون سلولی و مسیر سیگنالینگ STAT3/NF-kB مواجهه شدند. سلول‌های A549 در گروه کنترل نیز هیچ‌گونه دارویی دریافت نکردند و تنها حجم برابری از محیط کشت را دریافت کردند.

ارزیابی آپوپتوز / نکروز سلولی با استفاده از رنگ آمیزی انکسین V/PI: آپوپتوز/ نکروز سلولی A549 در مواجهه با CM و CM-NP با استفاده از کیت تشخیص آپوپتوز Annexin V/PI (Mab Tag, آلمان) اندازه گیری شد. سلول های سرطانی A549 (1×10^6) سلول/چاهک) در مواجهه با غلظت $10.7/2$ میکروگرم/ میلی لیتر CM-NP و غلظت $39/48$ میکروگرم/ میلی لیتر از CM در پلیت ۶ خانه به مدت ۲۴ ساعت در شرایط انکوباتور ۳۷ درجه سانتی گراد با ۵ درصد CO_2 کشت داده شدند. سلول ها پس از شست و شو توسط 100 میکرولیتر محیط کشت (IX)، به مدت ۵ دقیقه در دور $400g$ سانتریفیوژ شدند. سلول ها در 90 میکرولیتر از بافر اتصالی Annexin-V (IX) مجدداً محلول شدند و 5 میکرولیتر از Annexin V-FITC کونژوگه و 5 میکرولیتر محلول پروپیدیوم یدید به سلول ها اضافه شدند. سلول ها 20 دقیقه انکوبه و در دمای اتاق و در تاریکی نگهداری شدند. پس از آن، هر چاهک در معرض 400 میکرولیتر بافر اتصالی Annexin-V (IX) قرار گرفت و به مدت ۵ دقیقه در دور $400g$ سانتریفیوژ شد. سلول ها در بافر اتصالی Annexin-V (IX) مجدداً محلول شدند. برای ارزیابی تعداد سلول های آپوپتوز اولیه و دیررس و نیز سلول های نکروز و زنده، از دستگاه فلوسیتومتر BD FACSCALIBUR™ FLOW CYTOMETER استفاده شد. داده ها با استفاده از برنامه FlowJo V10 (FlowJo, آمریکا) تجزیه و تحلیل شدند.

ارزیابی مسیر سیگنالینگ STAT3/NF- κ B توسط Real time PCR کمی: بیان ژن های STAT3 و NF- κ B سلولی A549 در مواجهه با CM و CM-NP با استفاده از کیت RNeasy® mini ارزیابی شدند. به منظور استخراج RNA از سلول های A549، سلول ها با تراکم 7×10^5 سلول/ چاهک در یک پلیت ۶ خانه (100 میکرولیتر محیط کشت DMEM حاوی 10 درصد FBS و 1 درصد آنتی بیوتیک پنی سیلین و استرپتومایسین) کشت شدند و با غلظت های $39/48$ میکروگرم/ میلی لیتر کورکومین و $10.7/2$ میکروگرم/ میلی لیتر نانونیوزوم کورکومین به مدت ۲۴ ساعت انکوباسیون (دمای 37 درجه سانتی گراد و 5 درصد CO_2) گردیدند. یک اسپکتروفتومتر NanoDrop برای تعیین کمیت و کنترل RNA جدا شده با 3 تکرار استفاده شد. RNA با استفاده از RevertAid First Strand cDNA Synthesis رونویسی معکوس شد. RealQ Plus 2X MasterMix Green بدون Rox™ برای انجام ارزیابی های کمی RT-PCR استفاده شد. پرایمرهای اختصاصی برای فاکتور هسته ای کاپا B (NF- κ B) و میبدل سیگنال و فعال کننده رونویسی ۳ (STAT3) برای RT-PCR کمی استفاده شد. CDNA با استفاده از سیستم PCR بلادرنگ Roche Applied Science Light-Cycler 96 تکثیر شد و β -اکتین ۲ برای نرمال سازی داده های بیان ژن استفاده گردید. برای بررسی بیان نسبی ژن های مورد نظر از روش $2^{-\Delta\Delta ct}$ استفاده شد. **جدول ۱**، توالی آغازگر رو به جلو و معکوس بیان ژن ها را نشان می دهد.

ارزیابی ROS درون سلولی: مقدار گونه های اکسیژن فعال (ROS) تولید شده توسط سلول های A549 در مواجهه با CM و CM-NP با استفاده از کیت سنجش فلورومتري ROS (کبازیس، ایران) ارزیابی شد. سلول های A549 ($10^3 \times 25$ سلول/چاهک) در پلیت های ۹۶ خانه تیره کشت و پس از 24 ساعت، سلول ها با بافر IX شست و شو داده شدند و با 100 میکرولیتر (به مدت 45 دقیقه در تاریکی) محلول کشت H2DCFDA (25 مولار) تیمار شدند. پس از شست و شو با PBS، سلول ها به مدت 6 ساعت با CM-NP و CM (غلظت IC_{50}) تیمار گردیدند. میانگین شدت فلورسانس تولید شده توسط اکسیداسیون H2DCFDA با استفاده از پلیت ریدر Victor X5 Multipliable در 485 نانومتر برای برانگیختگی و 535 نانومتر برای انتشار اندازه گیری شد.

تجزیه و تحلیل آماری داده ها: داده های به دست آمده با استفاده از نرم افزار GraphPad Prism software ویرایش ۸، مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفتند. برای مقایسه میانگین ها در گروه های مختلف از آنالیز واریانس یک طرفه (ANOVA) و پس از آن Tukey استفاده شد. نهایتاً، داده ها به صورت میانگین \pm انحراف معیار (SD) با سطح معنی داری $P \leq 0.05$ ارائه شدند.

جدول ۱. خلاصه ای از پرایمرهای بیان ژن ها.

توالی ($5' \leftarrow 3'$)	نوع ژن	علائم اختصاری ژن
Forward: ACTGGAACGGTGAAGGTGAC Reverse: TGTGGACTTGGGAGAGGACT	Beta actin	Bact
Forward: ATGGAGTTGACCTCGGAGTG Reverse: AGTGCCAGATTGCTCAAAG	Signal transducer and activator of transcription3	STAT3
Forward: AAGCACAAAAGGCAGCACT Reverse: TGCCAATGAGATGTTGTCGT	Nuclear factor kappa B	NF- κ B

نتایج

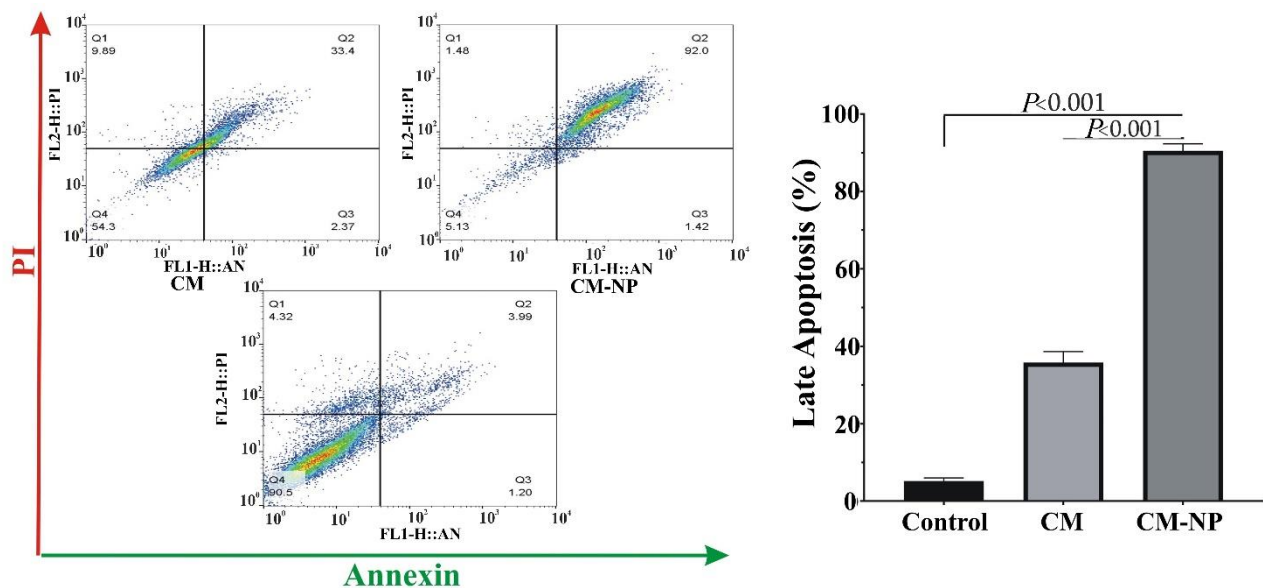
ویژگی‌های نانونیوزوم کورکومین: روش هیدراتاسیون فیلم نازک برای ایجاد نانوذرات نیوزوم بارگذاری شده با کورکومین با هدف ایجاد یک سیستم مؤثر برای تجویز کورکومین استفاده شد. خصوصیات نانونیوزوم کورکومین توسط Sahab-Negah و همکاران در سال ۲۰۲۰ ارائه شده است (۱۲).

القای آپوپتوز و نکروز سلولی A549 توسط نانونیوزوم کورکومین: رنگ‌آمیزی PI و رنگ‌آمیزی Annexin V-FITC افزایش معنی‌دار درصد آپوپتوز و نکروز سلول‌های A549 در مواجهه با CM-NP و CM را نشان داد. سلول‌های آپوپتوز ۴/۷ درصد از تعداد کل سلول‌ها در گروه کنترل را شامل شدند (تصویر ۱). پس از ۲۴ ساعت قرار گرفتن در مواجهه با CM-NP و CM، افزایش معنی‌دار در تعداد سلول‌های Annexin V-FITC مثبت در مقایسه با گروه کنترل مشاهده شد ($P < 0.001$). در مواجهه با CM در غلظت ۳۹/۴۸ میکروگرم بر میلی‌لیتر، ۳۷ درصد سلول‌های A549 در فاز اولیه و دیررس آپوپتوز مشاهده شدند. تعداد سلول‌های نکروز در گروه CM-NP به‌طور معنی‌داری بیشتر از گروه CM بود.

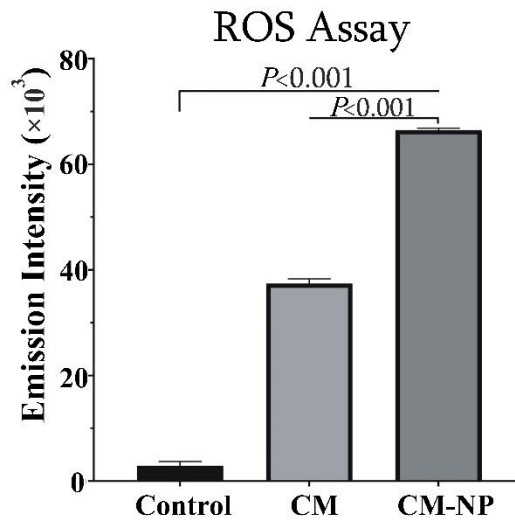
همان‌طور که ارزیابی فلوسایتومتری نشان داد، پس از مواجهه با CM-NP در غلظت ۱۰۷/۲ میکروگرم بر میلی‌لیتر، ۹۲ درصد از سلول‌های A549 در فاز اولیه و دیررس آپوپتوز مشاهده شدند (تصویر ۱). در نتیجه، از لحاظ آماری افزایش تعداد سلول‌های A549 نکروز و آپوپتوز در مواجهه با CM-NP در مقایسه با CM به‌صورت معنی‌دار دیده شد ($P < 0.001$).

افزایش تولید ROS درون سلولی A549 توسط نانونیوزوم کورکومین: همان‌طور که در تصویر ۲ مشاهده می‌شود، CM و CM-NP موجب القای تولید ROS در سلول‌های A549 در طول مدت ۱ ساعت شدند. داده‌های به‌دست‌آمده از گروه‌های CM و CM-NP در غلظت‌های IC50 نشان داد CM-NP در مقایسه با CM موجب افزایش معنی‌داری در تولید ROS می‌شود ($P < 0.001$) (تصویر ۲).

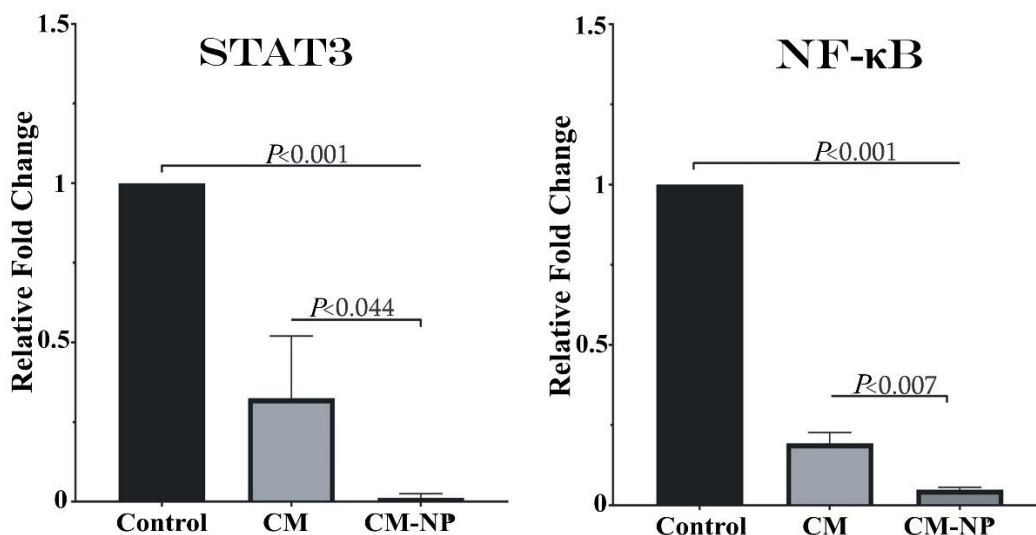
مهار بیان STAT3 و NF-kB در سلول‌های A549 توسط نانونیوزوم کورکومین: مواجهه با CM و CM-NP به کاهش معنی‌دار سطح بیان STAT3 و NF-kB در مقایسه با نمونه‌های مواجه‌نشده منجر شد ($P < 0.001$). همچنین، بیان NF-kB در سلول‌های A549 مواجهه‌شده با CM-NP به‌طور معنی‌داری کمتر از گروه CM بود ($P < 0.01$). علاوه بر این بیان STAT3 در سلول‌های A549 مواجهه‌شده با CM-NP به‌طور معنی‌داری در مقایسه با سلول‌های مواجهه‌شده با CM کاهش نشان داد ($P < 0.05$) (تصویر ۳).



تصویر ۱. تأثیر نانونیوزوم کورکومین (CM-NP) و کورکومین آزاد (CM) بر آپوپتوز در سلول‌های A549. سه گروه برای تعیین درصد آپوپتوز در سلول‌های A549 وجود داشت: گروه کنترل (سلول‌های درمان‌نشده)، CM (۳۹/۴۸ میکروگرم در میلی‌لیتر) و CM-NP (۱۰۷/۲ میکروگرم در میلی‌لیتر). ترتیب سلول‌های نشان داده‌شده در نمودارها به شرح زیر است: سلول‌های نکروز (Q1)، سلول‌های آپوپتوز دیررس (Q2)، سلول‌های آپوپتوز اولیه (Q3) و سلول‌های زنده (Q4). سلول‌های A549 در مواجهه با CM-NP درصد بالاتری از سلول‌های آپوپتوز و نکروز را نشان دادند. داده‌ها به‌صورت میانگین \pm انحراف معیار (SD) ارائه شده‌اند.



تصویر ۲. تأثیر نانونیوزوم کورکومین (CM-NP) و کورکومین (CM) بر روی گونه‌های اکسیژن فعال (ROS). مقدار ROS در سلول‌های A549 در مواجهه با CM و CM-NP پس از ۱ ساعت ارزیابی شد. همان‌طور که مشاهده می‌شود CM-NP به‌طور معنی‌داری موجب افزایش سطح ROS در مقایسه با CM شد. داده‌ها به‌صورت میانگین \pm انحراف معیار (SD) ارائه شده است.



تصویر ۳. تأثیر نانونیوزوم کورکومین (CM-NP) و کورکومین (CM) بر سطح بیان STAT3 و NF-kB. مواجهه با CM و CM-NP منجر به کاهش معنی‌دار سطح بیان STAT3 و NF-kB در مقایسه با سلول‌های مواجه‌نشده شد. همچنین همان‌طور که ملاحظه می‌شود بیان STAT3 و NF-kB در سلول‌های سرطانی A549 مواجهه‌شده با CM-NP به‌طور معنی‌داری کمتر از گروه CM دیده شد. داده‌ها به‌صورت میانگین \pm انحراف معیار (SD) ارائه شده است.

بحث

مطالعه حاضر نشان داد کورکومین پس از بارگذاری با نانوذرات نیوزوم به‌طور قابل توجهی موجب افزایش مهار سلول‌های سرطانی A549 می‌شود. نتایج مطالعه حاضر نشان داد نانونیوزوم کورکومین در مقایسه با کورکومین به افزایش معنی‌دار آپوپتوز و نکروز سلول‌های A549 منجر می‌شود. علاوه‌براین، در مقایسه با کورکومین آزاد، CM-NP به‌طور قابل توجهی از طریق مهار بیان STAT3 و NF-kB و مهار رشد تومور با تولید بالای ROS از تهاجم سلولی A549 جلوگیری کرد. سرطان‌زایی چندمرحله‌ای در سرطان ریه به کاهش سطح ROS نسبت داده می‌شود که به تحریک بقا و تکثیر سلولی و نیز فعال شدن NF-kB منجر می‌شود. افزایش تولید ROS از طریق ارتقای آپوپتوز موجب اعمال اثرات ضدسرطانی می‌شود (۱۳-۱۵) که همسو با نتایج مطالعه حاضر تحت تأثیر CM-NP می‌باشد. استرس اکسیداتیو یک حالت فیزیولوژیکی در بدن است و هنگامی که بدن از انواع تحریکات مضر رنج می‌برد، مولکول‌های بسیار واکنش‌پذیر،

مانند ROS و رادیکال‌های آزاد نیتروژن فعال در مقادیر زیاد تولید می‌شوند و تعادل ردوکس شکسته می‌شود. این تغییرات موجب ایجاد آپوپتوز و حتی آسیب بافتی از طریق مسیر سیگنالینگ میتوکندری، مسیر استرس شبکه آندوپلاسمی و مسیر گیرنده مرگ می‌شود (۱۶). نشان داده شده است نانویوزوم کورکومین از طریق مکانیسم‌های مولکولی متعدد، از جمله القای توقف چرخه سلولی، آپوپتوز و تولید ROS، زنده‌مانی، تکثیر و مهاجرت سلول‌های بنیادی گلیوما را به‌طور مؤثرتری نسبت به کورکومین هدف قرار می‌دهد (۱۲). Akbarzadeh و همکاران در سال ۲۰۲۱ در مطالعه دیگری نشان دادند نانویوزوم کورکومین با سلول‌های سالم پستان زیست‌سازگاری فوق‌العاده‌ای دارد؛ درحالی‌که سمیت سلولی قابل‌توجهی را نسبت به سلول‌های سرطانی پستان (SKBR3 و MD-MB-231) از طریق افزایش بیان ژن‌های مختلف آپوپتوزی و کاهش بیان ژن‌های مختلف ضدآپوپتوزی (Bcl-2, cyclin D, cyclin E, Bax, P53، کاسپاز-۳ و کاسپاز-۹) اعمال می‌کند (۱۷). Tondro و همکاران در سال ۲۰۲۲ گزارش دادند نانویوزوم کورکومین در مقایسه با کورکومین آزاد موجب مهار و کاهش تولید سیتوکاین‌های التهابی اینترلوکین ۶ (IL6) و فاکتور نکروز توموری آلفا (TNF- α) در سلول‌های سرطانی گلیوبلاستوما می‌شود (۱۸). بنابراین تفسیر نتایج بیان ژن در مطالعه حاضر نشان داد کورکومین آزاد و نانویوزوم کورکومین با مهار بیان NF-kB، احتمالاً از طریق کاهش القاکننده‌های NF-kB مانند TNF α و IL-1 β موجب مهار سلول‌های سرطانی ریه A549 می‌شوند. آپوپتوز نقش مهمی در تکثیر، مقاومت دارویی و متاستاز تومورها دارد. نشان داده شده است NF-kB از طریق مسیر آپوپتوز و نکروز به‌شدت به مرگ برنامه‌ریزی‌شده سلولی کمک می‌کند (۱۹، ۲۰). Zhi و همکاران در سال ۲۰۲۲ گزارش کردند که اثرات ضدسرطانی سلولی افزایش‌یافته ناشی از کورکومین از طریق مهار عملکردهای NF-kB و STAT3 حاصل می‌شود (۲۱) که همسو با نتایج مطالعه حاضر ناشی از اثرات بیشتر ضدسرطانی CM-NP نسبت به CM بر روی سلول‌های A549 بود. در مطالعه حاضر، CM-NP به‌طور قابل‌توجهی بیان ژن STAT3 را نسبت به کورکومین آزاد در سلول‌های A549 کاهش داد. واضح است که STAT3 نقش مهمی در فرایندهای سلولی مختلف ایفا می‌کند و تقریباً در تمام رده‌های سلولی سرطان ریه به‌طور قابل‌توجهی بیان می‌شود. همچنین، STAT3 تأثیر قابل‌توجهی بر تهاجم سلولی، رگ‌زایی، تکثیر سلولی، مقاومت به آپوپتوز و سرطان متاستاتیک در طیف گسترده‌ای از تومورها دارد (۲۱). بنابراین می‌توان گفت مهار سلول‌های سرطانی تهاجمی A549 تحت تأثیر نانویوزوم کورکومین احتمالاً با تنظیم مسیر سیگنالینگ STAT3/NF-kB همراه با مسیر القای آپوپتوز/ نکروز و افزایش ROS درون سلولی اعمال می‌شود. سیستم تحویل کورکومین نانویوزومی در تحویل دقیق و هدفمند کورکومین در مقایسه با سیستم آزاد که با فرایند انتشار از غشای سلولی عبور می‌کند، کارآمدتر است. نیوزوم‌ها به‌عنوان نانوحامل‌های دارویی منحصربه‌فرد با تغییر توزیع زیستی داروها، غلظت جمع‌ی دارو را در بافت هدف افزایش می‌دهند و از تجمع دارو در بافت‌های غیرهدف و سالم جلوگیری می‌کنند. بدین ترتیب تأثیر درمانی دارو افزایش می‌یابد و از طرف دیگر سمیت و عوارض جانبی داروی بارگذاری‌شده را در بافت‌های غیرهدف به حداقل می‌رساند (۲۲، ۲۳).

نتایج مطالعه حاضر نشان داد نانویوزوم کورکومین در مقایسه با فرم آزاد کورکومین توسط القای مؤثر آپوپتوز وابسته به دز و زمان، رشد سلول‌های سرطانی A549 را مهار می‌کند. علاوه‌براین، نانویوزوم کورکومین در سطح بالاتری از فرم آزاد کورکومین از طریق وابسته به استرس اکسیداتیو و افزایش ROS درون سلولی و مسیر سیگنالینگ STAT3/NF-kB، آپوپتوز را در سلول‌های A549 القاء می‌کند. این نتایج پتانسیل نانویوزوم کورکومین را به‌عنوان یک روش امیدوارکننده برای درمان سرطان ریه نشان می‌دهد.

نتیجه‌گیری نهایی: نانویوزوم کورکومین در سطح بالاتری از فرم آزاد کورکومین از طریق مسیر وابسته به استرس اکسیداتیو و افزایش ROS درون سلولی و نیز مسیر سیگنالینگ STAT3/NF-kB، آپوپتوز را در سلول‌های سرطانی ریه A549 القاء می‌کند. این نتایج پتانسیل نانویوزوم کورکومین را به‌عنوان یک روش امیدوارکننده برای درمان سرطان ریه نشان داد.

سپاسگزاری

نویسندگان از حمایت مالی شورای پژوهشی دانشگاه شیراز کمال تشکر و قدردانی می‌کنند.

تعارض منافع

بین نویسندگان تعارض در منافع گزارش نشده است.

References

1. Almutairi FM, Abd-Rabou AA, Mohamed MS. Raloxifene-encapsulated hyaluronic acid-decorated chitosan nanoparticles selectively induce apoptosis in lung cancer cells. *Bioorg Med Chem*. 2019;27(8):1629-38. doi: 10.1016/j.bmc.2019.03.004 PMID: 30879864
2. Zhu X, Yu Z, Feng L, Deng L, Fang Z, Liu Z, et al. Chitosan-based nanoparticle co-delivery of docetaxel and curcumin ameliorates anti-tumor chemo immunotherapy in lung cancer. *Carbohydr Polym*. 2021;268:118237. doi: 10.1016/j.carbpol.2021.118237 PMID: 34127219
3. Saraswathi T, Mothilal M, Jaganathan M. Niosomes as an emerging formulation tool for drug delivery-a review. *IJAP*. 2019;11(2):7-15. doi: 10.22159/ijap.2019v11i2.30534
4. Witika BA, Bassey KE, Demana PH, Siwe-Noundou X, Poka MS. Current advances in specialized niosomal drug delivery: Manufacture, characterization and drug delivery applications. *Int J Mol Sci*. 2022;23(17):9668. doi: 10.3390/ijms23179668 PMID: 36077066
5. Azarmi S, Talebkhan Garoussi M, Tajik P, Hosseini Pajoo K, Sasani F, Jahanroshan N. The effect of curcumin on the structure of mouse ovary after treatment with goserelin and cyclophosphamide. *J Vet Res*, 2023;78(2):131-144. doi: 10.22059/jvr.2023.351938.3311
6. Abdollahi M, Mohammadi H, Jebelli-Javan A, Abdollahi M. The effect of oral administration of turmeric (*Curcuma Longa*) aqueous extract on abomasal emptying rate in neonatal lambs. *J Vet Res*, 2020;75(2):185-191. doi: 10.22059/jvr.2018.253109.2768
7. Ahmad MZ, Alkahtani SA, Akhter S, Ahmad FJ, Ahmad J, Akhtar MS, et al. Progress in nanotechnology-based drug carrier in designing of curcumin nanomedicines for cancer therapy: current state-of-the-art. *J Drug Target*. 2016;24(4):273-293. doi: 10.3109/1061186X.2015.1055570 PMID: 26066739
8. Xu YQ, Chen WR, Tsosie JK, Xie X, Li P, Wan JB, et al. Niosome encapsulation of curcumin: characterization and cytotoxic effect on ovarian cancer cells. *J Nanomater*. 2016;2016. doi: 10.1155/2016/6365295
9. Lee R, Choi YJ, Jeong MS, Park YI, Motoyama K, Kim MW, et al. Hyaluronic acid-decorated glycol chitosan nanoparticles for pH-sensitive controlled release of doxorubicin and celecoxib in nonsmall cell lung cancer. *Bioconjugate Chem*. 2020;31(3):923-32. doi: 10.1021/acs.bioconjchem.0c00048
10. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, et al. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin*. 2021;71(3):209-49. doi: 10.3322/caac.21660 PMID: 33538338
11. Zarepour A, Egil AC, Cokol Cakmak M, Esmaeili Rad M, Cetin Y, Aydinlik S, et al. Fabrication of a Dual-drug-loaded smart niosome-g-chitosan polymeric platform for lung cancer treatment. *Polymers (Basel)*. 2023;15(2):298. doi: 10.3390/polym15020298 PMID: 36679179
12. Sahab-Negah S, Ariakia F, Jalili-Nik M, Afshari AR, Salehi S, Samini F, et al. Curcumin loaded in niosomal nanoparticles improved the anti-tumor effects of free curcumin on glioblastoma stem-like cells: an in vitro study. *Mol Neurobiol*. 2020;57:3391-3411. doi: 10.1007/s12035-020-01922-5 PMID: 32430842
13. Bandariyan E, Mogheiseh A, Ahmadi A. Study of Body weight and histomorphometry of uterus in experimentally polycystic ovary syndrome induced by dehydroepiandrosterone in mouse models treated with lutein. *J Vet Res*, 2021;76(2):242-249. doi: 10.22059/jvr.2020.297748.3023
14. Wang C, Song X, Shang M, Zou W, Zhang M, Wei H, et al. Curcumin exerts cytotoxicity dependent on reactive oxygen species accumulation in non-small-cell lung cancer cells. *Future Oncol*. 2019;15(11):1243-1253. doi: 10.2217/fo-2018-0708 PMID: 30843426
15. Yang CL, Ma YG, Xue YX, Liu YY, Xie H, Qiu GR. Curcumin induces small cell lung cancer NCI-H446 cell apoptosis via the reactive oxygen species-mediated mitochondrial pathway and not the cell death receptor pathway. *DNA Cell Biol*. 2012;31(2):139-150. doi: 10.1089/dna.2011.1300 PMID: 21711158
16. Yao Q, Lin M, Wang Y, Lai Y, Hu J, Fu T, et al. Curcumin induces the apoptosis of A549 cells via oxidative stress and MAPK signaling pathways. *Int J Mol Med*. 2015;36(4):1118-1126. doi: 10.3892/ijmm.2015.2327 PMID: 26310655
17. Akbarzadeh I, Shayan M, Bourbour M, Moghtaderi M, Noorbazargan H, Eshrati Yeganeh F, et al. Preparation, optimization and in-vitro evaluation of curcumin-loaded niosome@calcium alginate nanocarrier as a new approach for breast cancer treatment. *Biology*. 2021;10(3):173. doi: 10.3390/biology10030173 PMID: 33652630
18. Tondro G, Rajabzade G, Mohammadi A, Moradi HR, Sahab Negah S. Anti-inflammatory effects of nano- curcumin on a glioblastoma cell line. *Shefaye Khatam*. 2022;10(3):48-56. doi: 10.52547/shefa.10.3.48

19. Dutta J, Fan Y, Gupta N, Fan G, Gelinas C. Current insights into the regulation of programmed cell death by NF- κ B. *Oncogene*. 2006;25(51):6800-6816. doi: [10.1038/sj.onc.1209938](https://doi.org/10.1038/sj.onc.1209938) PMID: [17072329](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17072329/)
20. Fan Y, Dutta J, Gupta N, Fan G, Gélinas C. Regulation of programmed cell death by NF- κ B and its role in tumorigenesis and therapy. *Adv Exp Med Biol*. 2008;2008:223-2250. doi: [10.1007/978-1-4020-6554-5_11](https://doi.org/10.1007/978-1-4020-6554-5_11) PMID: [18437897](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18437897/)
21. Zhi TX, Liu KQ, Cai KY, Zhao YC, Li ZW, Wang X, et al. Anti-lung cancer activities of 1, 2, 3-triazole curcumin derivatives via regulation of the MAPK/NF- κ B/STAT3 signaling pathways. *Chem Med Chem*. 2022;17(3):e202100676. doi: [10.1002/cmdc.202100676](https://doi.org/10.1002/cmdc.202100676) PMID: [34773680](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34773680/)
22. Gharbavi M, Amani J, Kheiri-Manjili H, Danafar H, Sharafi A. Niosome: a promising nanocarrier for natural drug delivery through blood-brain barrier. *Adv Pharmacol Sci*. 2018;2018. doi: [10.1155/2018/6847971](https://doi.org/10.1155/2018/6847971) PMID: [30651728](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30651728/)
23. Heydarian S. Drug nanocarriers as a potential therapeutic strategy in glioblastoma multiforme. *Shefaye Khatam*. 2023;11(3):110-126. doi: [10.61186/shefa.11.3.110](https://doi.org/10.61186/shefa.11.3.110)