Curcumin effect on mouse hepatocytes genes MMP-17 & MMP-24

Sahar Farzaneh[1], Masoud Salehipour[2*], Farzaneh Tafvizi[3], Vahid Naseh[4]

[1] PhD Candidate in Development Biology, Islamic Azad University of Parand Branch, Parand, Iran. Email: Sahar.farzaneh@gmail.com . https://orcid.org/0000-0003-2313-0636
[2*] Assistant Professor, Department of Biology, Islamic Azad university of Parand Branch, Parand, Iran. Email: m.salehypur@gmail.com . https://orcid.org/0000-0001-8829-7715
[3] Associat Professor, Department of Biology, Islamic Azad university of Parand Branch, Parand, Iran. Email: farzanehtafvizi54@gmail.com . https://orcid.org/0000-0002-3595-5021
[4] Assistant Professor, Department of Biology, Islamic Azad university of Parand Branch, Parand, Iran. Email: Vahid55vet@yahoo.com ,

Abstract

Introduction: Hepatocellular carcinoma is the most primitive form of liver cancer, which is related to chemo carcinogens such as Thioacetamide (TAA) and molecules of tissue structure changing such as MMPs. Antioxidants such as Curcumin (Cur) can inhibiting these factors. In this research, we will investigate the effect of curcumin on the expression of two MMP-17 and MMP-24 involved in the carcinogenesis of mice after chronic exposure to thioacetamide.
Materials and Methods: In this study, 30 mice were studied in 6 groups of 5, during 4 months. First group: control, second: curcumin, third: TAA, fourth: TAA and curcumin simultaneously. The fifth group: first received TAA for two months and then curcumin for 2 months, finally the sixth group: first curcumin for two months and then TAA. Then mice were then euthanized and their liver tissue were transferred to the laboratory. The results were statistically analyzed by Allel ID (V6) and ANOVA test.
Results: The average has been calculated by SigmaPlot software, showing that MMP17 and MMP24 genes expression were significantly increased by thioacetamide (****p<0001) compared to the control group. Whereas the average level of expression of these genes in other experimental groups which were treated by curcumin simultaneously, or before and after of thioacetamide, showed a significant decrease.
Conclusion: Disruption in arrangement of genes expression due to chemical agents causes tissues to become cancerous. Identifying these factors enables early diagnosis and treatment of the disease. It seems that antioxidants such as curcumin can be used to prevent the harmful effects of toxins. Also, MMPs can be used as prognostic markers in cancer.

Key words: Hepatocarcinoma/ Curcumin / Thioacetamide / MMP17 / MMP24

اثر کورکومین بر بیان ژن‌های MMP-17 و MMP-24 هپاتوسیت‌های موشی

سحر فرزانه[1]، مسعود صالحی پور[2*]، فرزانه تفویضی[3]، وحید ناصح[4]

[1] دانشجوی دکتری تکوین، دانشگاه آزاد اسلامی واحد پرند، پرند، ایران. ایمیل: sahar.farzaneh@gmail.com
[2*] استادیار گروه زیست شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد پرند، پرند، ایران. ایمیل: m.salehypur@gmail.com
[3] دانشیار گروه زیست، دانشگاه آزاد اسلامی واحد پرند، پرند، ایران. ایمیل: farzanehtafvizi54@gmail.com
[4] استادیار گروه زیست شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد پرند، پرند، ایران. ایمیل: Vahid55vet@yahoo.com

چکیده

مقدمه: هپاتوسلولارکارسینوما ابتدایی‌ترین شکل سرطان کبد است که در ارتباط با کارسینوژن‌هایی همچون تیواستامید و مولکول-های تغییر ساختار بافتی مانند MMPها می‌باشد. از سوی دیگر آنتی اکسیدان‌ها مانند کورکومین می‌توانند در مهار این عوامل تاثیر داشته باشند. در این پژوهش اثر کورکومین بر بیان دو ژن MMP-17 و MMP-24 دخیل در سرطان‌زایی موش‌ها پس از مواجهه‌ی مزمن با تیواستامید را بررسی خواهیم نمود.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه تعداد ۳۰ موش سوری در ۶ گروه ۵ تایی به مدت ۴ ماه آزمایش شدند. گروه اول: کنترل، دوم: کورکومین، سوم: تیواستامید، چهارم: تیواستامید و کورکومین به طور همزمان. گروه پنجم ابتدا به مدت دو ماه تیواستامید و سپس ۲ ماه کورکومین، و گروه ششم: ابتدا ۲ ماه کورکومین و سپس ۲ ماه تیواستامید دریافت کردند. پس از یوتانایز موش‌ها؛ بافت کبدشان به آزمایشگاه منتقل و نتایج مورد آنالیز آماری قرار گرفتند.

نتایج: تیواستامید سبب افزایش معنی‌دار ژن‌های MMP17 و MMP24 (****p<0001) نسبت به گروه کنترل شده. این درحالیست که میانگین میزان بیان این ژن‌ها در گروه‌های آزمایشی دیگر که با کورکومین به‌طور همزمان، یا قبل و بعد از القا توسط تیواستامید تیمار شدند، به صورت چشمگیری کاهش نشان داد.

بحث و نتیجه‌گیری: برهم‌خوردن نظم طبیعی بیان ژن‌ها در اثر عوامل شیمیایی موجب سرطانی شدن بافت‌ها می‌گردد. شناسایی این ژن‌ها و عوامل ما را قادر به تشخیص زودهنگام و درمان به موقع بیماری می‌سازد. به نظر می‌رسد می‌توان از مواد آنتی اکسیدانی همچون کورکومین که به طور موثر سبب جلوگیری از واکنش‌های مخرب سموم می‌گردد استفاده نمود. از طرف دیگر مارکرهایی همچون MMPها می‌توانند به عنوان فاکتورهای پیش آگهی دهنده در تشخیص سرطان‌ها مورد استفاده قرار بگیرند.

کلمات کلیدی: هپاتوسلولارکارسینوما، کورکومین، تیواستامید، MMP17، MMP24

۱ مقدمه

هپاتوسلولارکارسینوما (HCC) شایع‌ترین نوع سرطان کبد است که در آن سلول‌های کبدی (هپاتوسیت‌ها) پس از قرار گرفتن طولانی مدت در معرض عوامل گوناگون همچون فاکتورهای زیست محیطی مانند مواد شیمیایی، اشعه‌ها، الکل و ویروس‌ها یا فاکتورهای وراثتی شامل فعال سازی غیرطبیعی مسیرهای سیگنالینگ و برهم خوردن تعادل میان فعال‌سازی و غیرفعال‌سازی پروتوانکوژن‌ها و آنتی‌انکوژن‌ها به سمت سرطانی شدن پیش می‌روند[1,2].

از عوامل مهمی که در روند تغییر سرطانی شدن بافت‌ها نقش اساسی دارند MMPها (Matrix metalloproteinases) می‌باشند. MMPها گروه بزرگی از پروتئازها بوده که نقش مهمی در تجزیه ماتریکس خارج سلولی، انواع کلاژن‌ها و ژلاتین‌ها، بر هم خوردن ساختار میکروآناتومی و بافتی بدن و بازسازی بافت‌ها (Remodeling) دارد و فعالیت آن‌ها در شرایط پاتولوژیکی مانند انواع بیماری‌ها یا پس از قرار گرفتن در معرض محرک‌های فیزیکی و مکانیکی به واسطه ترشح سیتوکین‌های پیش التهابی افزایش می‌یابد. MMPها از انواع بافت همبند و سلول‌های پیش التهابی مانند فیبروبلاست‌ها، استئوبلاست‌ها، سلول‌های اندوتلیال، ماکروفاژها، نوتروفیل‌ها و لنفوسیت‌ها ترشح می‌شوند[3,4]. MMP17 و MMP24 در گروه MMPهای غشایی قرار می‌گیرند که به ترتیب تحت عنوان MT4-MMP و MT5-MMP نیز شناخته می‌شوند [5,6,9]. به نظر می‌رسدMMP17 در روند تومورزایی، متاستاز و بیماری‌هایی همچون آرتریت دخالت دارد[7,8]. MMP24 نیز عمدتا در مغز، کلیه، لوزالمعده و ریه بیان می‌شود و دارای فعالیت پروتئولیتیکی پروژلاتینازA است که موجب ایجاد فرم فعال این آنزیم و پیشرفت تومورژنز می‌گردد [9]. بنابراین انتظار می‌رود که بیان هر دو MMP17 و MMP24 در سرطان کبد، همچون بسیاری از سرطان‌ها افزایش یابد.

تیواستامید (Thioacetamide) نوعی سم کبدی کارسینوژن است که در صنعت کاربرد زیادی دارد و می‌تواند از روش‌های مختلف منجر به سرطانی شدن هپاتوسیت‌ها شود. این ترکیب از طریق تخریب یا آسیب مسیرهای القای ساختار سلولی، افزایش ریسک خطاهای ژنتیکی و تحریک تکامل سلول منجر به نئوپلازی بدخیم به وسیله اثر بر مکانیسم‌های تکثیر، تمایز و آپوپتوز است [10,11]. قرار گیری طولانی مدت در معرض تیواستامید می‌تواند سبب دیسپلازی صفراوی و کلانژوکارسینوما شود[12].

از سوی دیگر آنتی اکسیدان‌ها مانند کورکومین (Curcumin) می‌توانند از طریق آنزیمی تاثیر بسزایی در حذف مواد شیمیایی داشته باشند. کورکومین، پلی فنول فعال مشتق از (*Curcuma longa*) بوده و می‌تواند به عنوان یک مکمل غذایی جهت درمان اختلالات کبدی، قلبی عروقی، دیابت، ناباروری و انواع سرطان‌ها استفاده شود. مطالعات بسیاری پرده از اثرات مولکولی مثبت این ماده در بهبود روند سرطان‌ها برداشته اند[13-15].

بنایراین با توجه به پیشرفت مطالعات صورت گرفته در تاثیر بیان ژن‌ها، مقدار پروتئین و فعالیت آنزیم‌های متالوپروتئیناز طی پیشرفت سرطان کبد و نظر به تاثیر مخرب تیواستامید و نقش مفید غذایی کورکومین بر بیماری‌ها و همچنین نقش بسیار مهم MMP ها در شروع و گسترش پدیده‌ی سرطان کبد، در این مطالعه اثر کورکومین را بر بیان ژن‌های MMP 17 و MMP 24 در موش‌های مورد مطالعه پس از مواجهه مزمن با تیواستامید مورد بررسی قرار خواهد گرفت.

۲ مواد و روش‌ها

۲-۱ مدل‌سازی حیوانی

در این مطالعه تعداد ۳۰ راس موش سوری نر نژاد NMRI ۶-۸ هفته‌ای از موسسه رازی تهیه شدند و در حیوانخانه دانشگاه آزاد واحد پرند تحت شرایط کنترل شده درجه حرارت ۲۲۱c±، رطوبت حدود ۱۰±۶۰٪ و با دوره‌ی روشنایی- تاریکی ۱۲ ساعته نگه‌داری

شدند. تمامی آزمایش‌ها طبق موازین اخلاقی و دستورالعمل‌های استفاده از حیوانات انجام گرفت. موش‌ها در ۶ گروه ۵ تایی دسته بندی شدند. گروه اول (کنترل): موش‌های طبیعی که به روش نرمال پرورش داده شدند و به آن‌ها فقط غذا داده شد. گروه دوم: گروهی که توسط غذای حاوی کورکومین (Sigma, Germany) تغذیه شدند. گروه سوم: گروهی که توسط دوز تعیین شده تیواستامید (Sigma, Germany))تیمار شدند. گروه چهارم: گروهی که به طور همزمان تیواستامید و کورکومین دریافت نمودند. گروه پنجم ابتدا به مدت دو ماه تیواستامید و سپس ۲ ماه کورکومین دریافت کردند و گروه ششم: ابتدا ۲ ماه کورکومین و سپس ۲ ماه تیواستامید دریافت کردند.

در این پژوهش میزان 200 mg/L تیواستامید به مدت ۱۴ هفته (هر موش با میانگین وزن ۵ ± ۴۰ گرم به میزان TAA 33 mg/l روزانه) جهت ایجاد سرطان کبد در موش‌ها به صورت محلول در آب آشامیدنی خورانده شد. همچنین کورکومین به میزان 0.4 تا 0.28 گرم (10-20 mg/5ml/Kg) وزن بدن به صورت دهانی (هر موش0.5 mg روزانه) به موش‌ها گاواژ گردید. پس از ۱۴ هفته موش‌ها توسط کتامین و زایلازین (BREMER, Germany) بیهوش شدند و بافت کبدشان در میکروتیوب جهت برسی بیان ژن به آزمایشگاه منتقل گردید.

Real Time PCR ۲-۲

RNA بافت کبد توسط ترایزول (Invitrogen, USA) جدا شده و کیفیت آن به وسیله الکتروفورز ژل آگارز (razitajhiz, Iran) بررسی شد. برای تعیین غلظت RNA تام (OD= Optic Density) آن در طول موج‌های 280nm/ 260nm توسط دستگاه نانودراپ (Biotek, USA) اندازه‌گیری شد. از آنجایی که mRNA ترکیبی به شدت ناپایدار است، توسط کیت خریداری شده از شرکت Takara به DNA مکمل یا cDNA تبدیل گردید. بررسی کمی بیان ژن‌ها روش Real Time PCR توسط کیت SYBER Green (Takara ,Japan) و دستگاه روتورژن (Corbett, Australia) انجام شد. شاخص‌های عمل PCR به صورت (95˚C به مدت 10 دقیقه، 40 سیکل 95˚C به مدت 15 ثانیه، 60˚C به مدت 60 ثانیه) و پرایمرهای اختصاصی (Takapou zist, Iran) هر یک ژن‌ها به ترتیب: MMP17: F (CACCCACTTTGATGACGATG), R (CCCTGGTAGTACGGTTGCAT) و MMP24: F (TATCATGGCTCCCTTCTACCAATA), R (CTGCGGACCGGGAGTGT) توسط نرم‌افزار Allel ID (V6) طراحی شدند. نتایج واکنش با استفاده از روش Delta Delta CT توسط نرم افزار LinReg محاسبه گردید و از ژن GAPDH به عنوان ژن خانه‌دار استفاده شد.

آنالیز داده‌ها

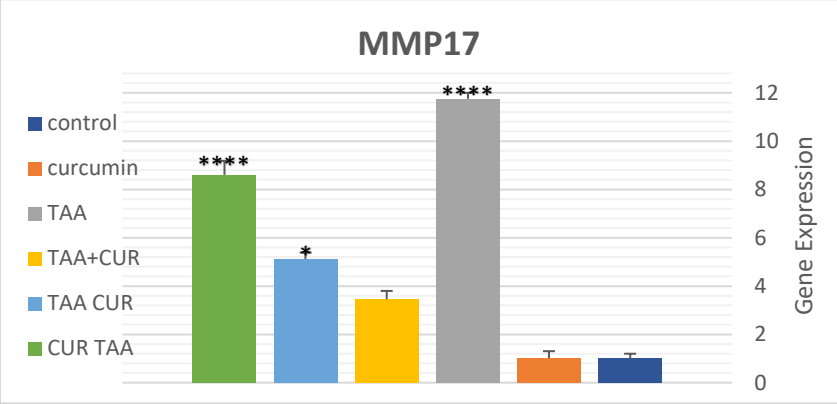
نتایج به صورت میانگین ± انحراف از معیار (±SD) ارائه می شود و تفاوت میان گروه ها توسط تست ANOVA و روش one-way در نرم افزار Sigmaplot مشخص می‌گردد. سطح معنی دار بودن در $P\leq0.05$ در نظر گرفته می‌شود.

۳ نتایج

اثر کورکومین و تیواستامید بر بیان ژن MMP17 MMP24 در گروه‌های آزمایشی

بیان mRNA ژن MMP17 در موش‌های سوری گروه‌های در معرض تیواستامید نسبت به گروه کنترل و همچنین گروه‌هایی که ابتدا توسط تیواستامید و سپس توسط کورکومین تیمار شدند (ستون سبز رنگ) به طور معنی‌داری افزایش پیدا نموده

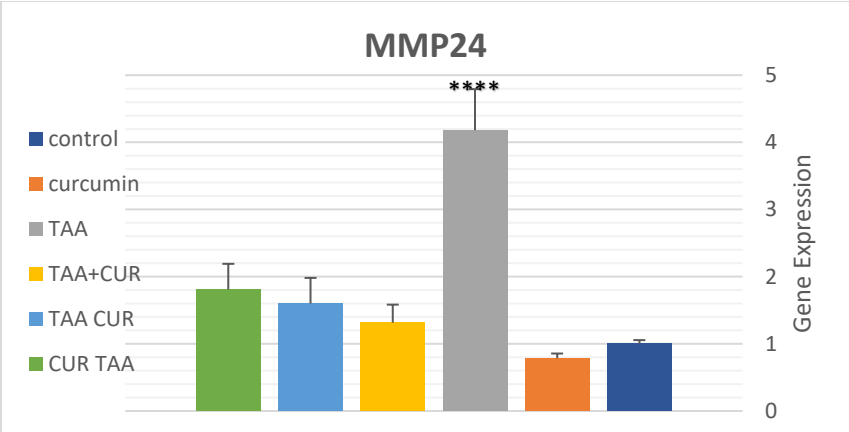
(****P=0.0001). میزان MMP17 در گروهی که ابتدا توسط کورکومین و سپس تیواستامید تیمار شدند(آبی کمرنگ) (*P=0.05). همچنین گروهی که به طور همزمان توسط تیواستامید و کورکومین تیمار شدند نیز میزان MMP17 افزایش معنی‌داری نشان نداده و مقدار آن برابر (P=09571) می‌باشد.(شکل ۱)



شکل ۱. میزان بیان ژن MMP17 در گروه‌های مختلف نسبت به گروه کنترل. (*P≤0.05). همان‌طور که مشاهده می‌شود میزان بیان MMP17 در گروه دریافت کننده تیواستامید برابر ****P=0.0001 ، در سایر گروه‌های دریافت کننده تیواستامید مانند گروهی که ابتدا ۲ماه کورکومین و ۲ ماه تیواستامید نیز به طور معنی‌داری میزان بیان ژن MMP17 تغییر نشان داد. این مقدار برابر ****P=0.0001 می‌باشد. در گروهی که ابتدا ۲ ماه تیواستامید و سپس ۲ ماه کورکومین دریافت نموده بودند برابر *P=0.05 می‌باشد. همچنین در گروهی که به طور همزمان توسط کورکومین و تیواستامید تیمار شده بودند میزان این ژن افزایش نشان داد اما معنی دار نبود. سطوح mRNA توسط روش سایبرگرین آنالیز شده‌اند. نتایج نسبت به بیان ژن GAPDH نرمالایز شده‌اند. داده‌های بدست آمده به صورت میانگین ± انحراف استاندارد (Mean ± SD) ارائه شده و Ct ارتباط معکوسی با بیان ژن دارد.

اثر کورکومین و تیواستامید بر بیان ژن MMP24 در گروه‌های مورد مطالعه

بیان mRNA ژن MMP24 در موش‌های سوری گروهی توسط تیواستامید تیمار شده بودند نسبت به دیگر گروه‌ها اثر معنی‌داری داشته و سبب افزایش سطح بیان این ژن شده است(****P<0.0001) (نمودار طوسی رنگ). در گروه‌های دیگر همچون گروهی که ابتدا به مدت ۲ ماه توسط تیواستامید و سپس ۲ ماه توسط کورکومین تیمار شدند نیز افزایش بیان ژن مشاهده می‌شود که میزان آن برابر (P=0.5217) بوده اما معنی‌دار نمی‌باشد(نمودار آبی کمرنگ). در گروهی که به طور همزمان توسط تیواستامید و کورکومین دریافت نمودند میزان بیان ژن MMP24 برابر (P=0.3674) می‌باشد که علی‌رقم افزایش اندک معنی‌دار نمی‌باشد (شکل ۲).



شکل ۲. میزان بیان ژن MMP24 در گروه‌های مختلف نسبت به گروه کنترل. ($P\leq0.05$*). همان‌طور که مشاهده می‌شود میزان بیان این ژن در گروهی که به مدت ۴ ماه توسط تیواستامید تیمار شدند به طور معنی‌داری افزایش نشان داد ($P<0.0001$****). این در حالیست در گروه دریافت کننده کورکومین میزان ژن MMP24 نسبت به گروه کنترل نیز کمتر بیان شده است. در گروه‌های دیگر نیز به میزان کمی بیان افزایش داشته اما معنی‌دار نمی‌باشد. سطوح mRNA توسط روش سایبرگرین آنالیز شده‌اند. نتایج نسبت به بیان ژن GAPDH نرمالایز شده‌اند. داده‌های بدست آمده به صورت میانگین ± انحراف استاندارد (Mean ± SD) ارائه شده و Ct ارتباط معکوسی با بیان ژن دارد.

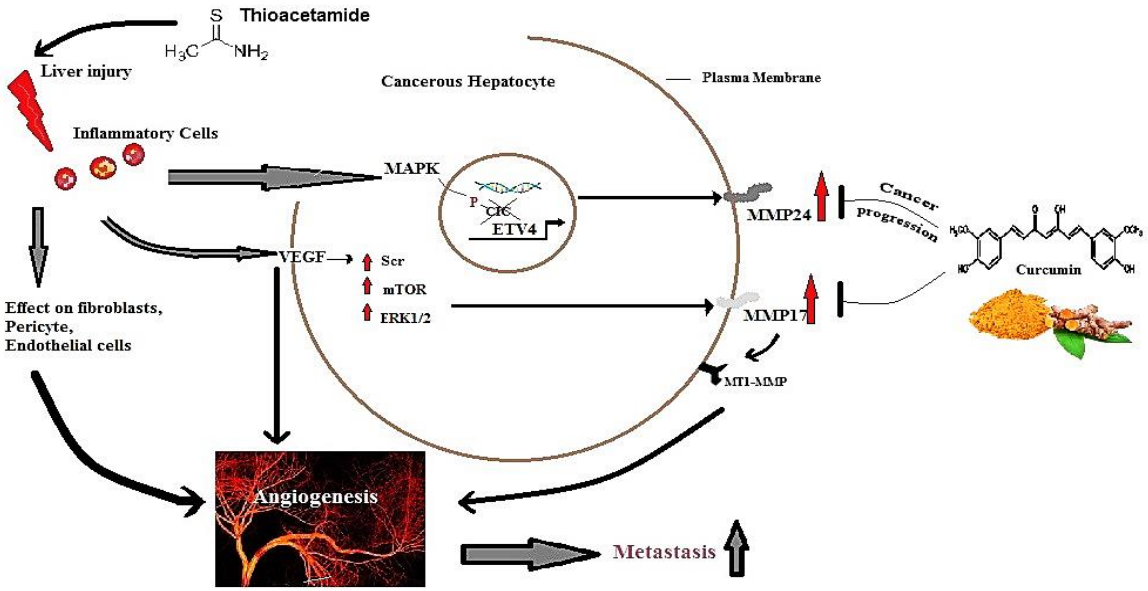
بحث و نتیجه گیری

سرطان کبد پنجمین بیماری شایع در دنیا بوده و حدود ۸۳ درصد از بیماری‌های کبد را تشکیل می‌دهد. سرطان کبد که یکی از اندام‌های حیاتی بدن در تنظیم پروسه‌های فیزیولوژیک و متابولیسم است، می‌تواند ناشی از ورود ویروس‌ها، الکل، سموم قارچی و مواد شیمیایی باشد. بیش از ۲۰۰۰ ماده شیمیایی متفاوت که توسط انسان ساخته شده‌اند در محیط زیست بشر وجود دارند که در بدن متابولیزه می‌گردند و کبد عضو اصلی شرکت کننده در این فرآیند است [16]. یکی از این ترکیبات سمی تیواستامید می‌باشد که در صنعت کاربرد زیادی دارد. در این مطالعه تیواستامید به عنوان القاکننده سرطان بکار رفته است. طبق آزمایشات تغییر معنی‌داری در بیان ژن‌های MMP17 و MMP24 در گروه‌های آزمایشی مشاهده شد. در اینجا میزان بیان mRNA ژن MMP17 و MMP24 در موش‌های سوری گروهی که به مدت ۴ ماه تمام در معرض تیواستامید قرار گرفته بودند به طور چشمگیری افزایش یافت. همچنین در گروه‌های دیگر همچون گروهی که ابتدا توسط کورکومین و سپس تیواستامید تیمار شدند علی رقم استفاده از کورکومینوئید سبب افزایش بیان MMP17 گردید که دلیل آن می‌تواند کاهش توان دفاعی سلول‌های کبدی بر اثر کاهش گلوتاتیون داخل سلولی و تغییر پتانسیل ردوکس آن‌ها می‌باشد. در این حالت میزان تولید اکسیدان‌ها بیش از جمع‌آوری آنهاست و میتوکندری سلول‌ها قادر به کنترل و حفظ تعادل سیستم‌های متعادل‌کننده پتانسل غشایی نیستند و منجر به تغییر نفوذپذیری سلول‌ها و آسیب آن‌ها می‌شود. در بررسی‌های مشابه محققان بر روی مسیرهای سیگنالینگ ایجاد فیبروز در کبد به واسطه فعال شدن مسیر TGF-B1/SMAd سلول‌های ستاره‌ای کبد و ایجاد التهاب در آن‌ها توسط تیواستامید پرداخته بود، دریافتند که

مولکول فوق می‌تواند سبب افزایش بیان microRNA ها همچون miRNA-17 شود که در تعدیل بیان ژن‌های پیش سرطانی نقش بالقوه‌ای دارند[17]. آن‌ها دریافتند پس از ۶ هفته تزریق تیواستامید با غلظت 150mg/Kg i.p به موش‌های مورد آزمایش، به طور معنی‌داری میزان ALT (۱/۷ برابر) و میزان AST (۲/۴ برابر) در مقایسه با گروه کنترل افزایش یافتند و بیان ژن‌های دخیل در فیبروژنز سلول‌های کبدی همچون α-SMA به شدت افزایش یافت [18]. همچنین در مطالعات دیگری نیز از تیواستامید به عنوان سم القا کننده آسیب کبدی استفاده گردید و علاوه بر فاکتورهای خونی آسیب کبد، همچون آلبومین، GSH و IL-6، ژن‌های دخیل در ایجاد فیبروز همچون TIMP-1 و MMP-2 ، سایکلین D ، و فاکتورهای التهابی همچون TNF-a نیز تغییر کردند[19].
امروزه با گسترش تحقیقات پیرامون اثرات حفاظتی آنتی اکسیدان‌های مختلف در برابر بیماری‌هایی نظیر سرطان‌ها و بیماری‌های کبدی، امکان بررسی بیشتر مکانیسم‌های مولکولی که به واسطه آن، آنتی‌اکسیدان‌ها اثرات خود را القا می‌کنند فراهم شده است. اما خاصیت این ترکیبات اغلب به دلیل جلوگیری از آسیب‌های ناشی از رادیکال‌های آزاد ایجاد شده است. مطالعات نشان داد که کورکومین با تنظیم بیان پروتئین‌های آپوپتوتیک همچون P53 و RNA پیام رسان Bax و کاهش بیان Bcl2 سبب کاهش حساسیت سلول‌های کبدی به سمیت سلولی ناشی از تیواستامید می‌شود. همچنین سلول‌های آسیب دیده را مجبور به آپوپتوز می‌کند که مکانیسم دفاعی در پاسخ به التهاب و فیبروز کبدی است[20]. طبق جدیدترین تحقیقاتی که بر روی آنالوگ نیمه ساختاری کورکومین Dehydrozingerone (DHZ) در نمونه‌های انسانی و موشی انجام گرفته‌است، مشخص شده که این ماده با افزایش فعالیت آنزیمی کاتالاز سبب کاهش موثر استرس اکسیداتیو ناشی از TAA و تعدیل مسیر MAPK و کاهش فیبروز در بافت کبد می‌شود[21].
محققین نتایج گوناگونی از نقش MMP17 در پروسه سرطان‌زایی بدست آورده‌اند، به عنوان مثال Chabottaux V و همکارانش نشان دادند که میزان بیان ژن و پروتئینMT4-MMP در سرطان پستان به شدت افزایش و سبب رشد عروق خونی و متاستاز می‌شود [22]. در حالی که Nuttall RK و همکارانش در سال ۲۰۰۳ دریافتند که میزان بیان MT4-MMP mRNA در درجات بالای تومور کاهش می‌یابد و چنین ثابت نمودند که تنظیم GPI-MT-MMPها در سرطان مغز به گونه‌ای متفاوت تنظیم می‌شود [23]. حال آن‌که بیشتر مطالعات حاکی از افزایش میزان بیان MMP17 در مراحل پیشرفته سرطان به ویژه سرطان گوارش می‌باشد[24] . مشخص شده است که MMP17 در سرطان پستان می‌تواند با اثر بر مسیرهای سیگنالینگ سلولی دخیل در آنژیوژنز نقش تنظیمی در پیشرفت آن ایفا کند. با توجه به اینکه یکی از مهم‌ترین فرآیندها در روند تومورزایی، آنژیوژنز است، بنابراین به سلول‌های سرطانی سالید(جامد) کمک می‌کند تا با تشکیل رگ بتوانند تغذیه و اکسیژن‌رسانی شوند و تکثیرشان ادامه یابد[25]. یافته‌های مولکولی و پاتولوژیک ما نیز حاکی از افزایش میزان بیان ژن MMP17 می‌باشد. با بیان MT4-MMP سلول‌های متمایز نشده پریسیت القا می‌شوند و از طریق مولکول‌های سیگنالینگ مانند فاکتورهای رشد، گیرنده‌ها، ECM (ماتریکس خارج سلولی) و مولکول‌های چسبندگی با دیگر MMPها همچون MT1-MMP یا MMP14 ارتباط برقرار می‌کنند. MT1-MMP در سلول-های سرطانی بیش از حد بیان شده و باعث تنظیم بالایVEGF و تحریک آنژیوژنز از طریق تنظیم فعالیت مسیر سیگنالینگ Src (پروتوانکوژن تیروزین کیناز سارک)، Akt (Protein kinase B (PKB), also known as Akt پروتئین کیناز B)، mTOR (Mammalian target of rapamycin راپامایسین هدف پستانداران) می‌شود[25].
MMP-24 نیز از جمله MMPهایی است که طی روند التهاب و سرطانی شدن هپاتوسیت‌ها فعال می‌شود. تحقیقات نشان داده که فعالیت متاستازی MMP-24 با فقدان گیرنده‌های کاپیکوآ (CIC) یا افزایش بیان افکتور آن (ETV4) همراه است که با فسفریله شدن و تغییر کانفورماسیون گیرنده‌های MAPK و فعال شدنشان در پاسخ به استرس سلول سبب دژنره شدن CIC و شروع روند سرطانی شدن سلول‌ها می‌شود(شکل ۶) [26]. مطالعات Benson و همکارانش در سال ۲۰۱۳ نشان داد که بیان

MMP24 mRNA سلول‌های سرطانی پستان در مقایسه با سلول‌های نرمال به طور قابل توجهی بالا می‌رود [27]. که مطابق یافته‌های مولکولی ما هنگامی که بافت کبد طولانی مدت در معرض ماده‌ی شیمیایی سمی قرار گرفت به شدت میزان بیان ژن MMP24 افزایش پیدا نمود.

به طور کلی به دنبال آسیب کبد گروهی از پاسخ‌های التهابی ایجاد می‌شود و گیرنده‌های کنترل کننده التهاب مانند TREM-1 که خود القاکننده التهاب نیز هستند فعال می‌شوند که با توجه به وجود دامین‌های خارج سلولی V شکل در سطح سلول‌های کوپفر (سلول‌های ماکروفاژی کبد) به گیرنده‌های اختصاصی‌شان روی این سلول‌ها متصل شده و متعاقب آن منجر به آزادسازی سایتوکاین‌ها مانند IL-1β، TNF-α و کموکاین‌های التهابی مانند CXCL2 می‌شوند که خود عامل تشدید التهاب اند. کموکاین‌ها سبب فراخواندن TREM بیشتر و افزایش سلول‌های التهابی می‌شوند (شکل ۶). از سوی دیگر، سلول‌های کوپفر که اکنون فعال شده‌اند سبب افزایش فاکتورهای رشد مانند TGF-β، OSM و مسیر JAG1 می‌شود که سلول‌های بنیادی خاموش کبد یعنی Stella را فعال می‌کند و سبب تمایزشان به هپاتوسیت‌ها می‌شود. طی این روند بیان کلاژن‌ها، α-SMA ، TIMP-1 و MMPها افزایش پیدا نموده [16] و پیش زمینه سرطانی شدن سلول‌ها فراهم گردد.



شکل ۶ مدل شماتیک بیان MMP17 و MMP24 طی آسیب به کبد. تیواستامید می‌تواند سبب ایجاد آسیب در کبد و فعال‌سازی سلول‌های التهابی در هپاتوسیت‌ها گردد و از چند طریق منجر به ایجاد سرطان و پیشرفت تومور به واسطه افزایش ژن‌های دخیل در آنژیوژنز همچون VEGF در بافت گردد. در حالی که تیواستامید می‌تواند با القا مسیرهای سیگنالینگ مانند MAPK و افزایش بیان ژن‌ها و پروتئین‌های دخیل در هپاتوکارسینوژنز همچون MMPها، TIMPها و گیرنده‌های سرکوب رونویسی ژن‌های متاستاتیک همچون CIC و ETV4 موجب ایجاد پاسخ‌های التهابی و اثر بر سلول‌های فیبروبلاست، پریسیت‌ها و اندوتلیال موجود در بافت کبد شود، کورکومین با اثرات چندگانه‌ی خود به ویژه اثرات آنتی اکسیدانی قوی، موجب مهار اثرات سایتوتوکسیک این ماده بر سلول‌های کبدی و توقف روند هپاتوکارسینوژنز می‌گردد.

با اینکه مکانیسم عمل MMPها در سرطان‌ها به خوبی مشخص نشده است، اما مطالعه حاضر نشان داد که بیان ژن‌های MMP-17 و MMP-24 در کبد موش‌های در معرض سم هپاتوکارسینوژن تیواستامید به شدت افزایش می‌یابد، در حالی که این میزان در گروه‌هایی که به طور همزمان، یا قبل و بعد از القا تیواستامید توسط کورکومین تیمار شدند بسیار کمتر بیان شده یا تا حدودی مهار شده است. با توجه به نقش MMPها در تجزیه و بازآرایی ماتریکس سلول‌ها و غشا پایه طی سرطانی شدن بافت‌ها و استفاده فزاینده از مواد شیمیایی ایجاد کننده سرطان همچون تیواستامید، لزوم استفاده از آنتی‌اکسیدان‌ها همچون کورکومین بیش از پیش احساس می‌شود و شواهد فارماکولوژیک آن را به عنوان افزودنی خوراکی غیرسمی دارای فواید سرشار تایید نموده‌اند.

پیشنهاد می‌شود که بیان دیگر MMPها در نمونه‌های انسانی و کشت رده‌های مختلف سلولی ارزیابی شود. همچنین برای درک دقیق اثر کورکومین بر هموستاز تیواستامید در سلول‌های کبدی علاوه بر بیان ژن‌های MMP17 و MMP24 ، ژن‌ها و فاکتورهای موثر بر آن‌ها همچون ETV4، Scr و ... به طور همزمان مورد بررسی قرار گیرند. اندازه‌گیری سطوح خونی دیگر مارکرها مانند تومورمارکرها مانند CEA (Carcino Embryonic Antigen) وAFP (Alpha Feto protein) ، تست تشخیص آسیب کبدی مانند GGT (Gamma glutamyltransferase) و روش‌های کم تهاجم‌تر همچون سی‌تی‌اسکن و سونوگرافی طی آزمایش نیز می‌تواند به درک دقیق اثر کورکومین موثر باشد.

سپاسگزاری

بدینوسیله از تمامی کسانی که در جمع آوری نتایج ما را یاری نمودند مراتب سپاسگزاری خود را اعلام نموده. این تحقیق در مرکز حیوانخانه دانشگاه آزاد اسلامی واحد پرند انجام شده و نتایج آن حاصل از پایان نامه دکترای تخصصی به شناسه IR.IAU.VARAMIN.REC.1399.003 می‌باشد.

References

1- King RJB (2000) Cancer Biology, 2nd edn. Printice Hall, Edinburgh.
2- Chen C, Wang G. Mechanisms of hepatocellular carcinoma and challenges and opportunities for molecular targeted therapy. World J Hepatol. 2015; 7(15): 1964-1970.
3- Cui N, Hu M, Khalil RA. Biochemical and Biological Attributes of Matrix Metalloproteinases. Prog Mol Biol Transl Sci. 2017; 147: 1–73.
4- Hua H, Li M, Luo T, Yin Y, Jiang Y. Matrix metalloproteinases in tumorigenesis: an evolving paradigm. Cell Mol Life Sci. 2011 Dec; 68(23):3853-68.
5- N. Johansson, M. Ahonen and V.-M. Ka¨ha¨ri. Matrix metalloproteinases in tumor invasion. CMLS, Cell. Mol. Life Sci. 57 (2000) 5–15.
6- Itoh Y, Kajita M, Kinoh H, Mori H, Okada A, Seiki M. Membrane type 4 matrix metalloproteinase (MT4-MMP, MMP-17) is a glycosylphosphatidylinositol-anchored proteinase. J Biol Chem. 1999; 274(48): 34260-6.
7- Itoh Y, Kajita M, Kinoh H, Mori H, Okada A, Seiki M. Membrane type 4 matrix metalloproteinase (MT4-MMP, MMP-17) is a glycosylphosphatidylinositol-anchored proteinase. J Biol Chem. 1999; 274(48): 34260-6.
8- Cassandre Yip, Pierre Foidart, Agnès Noël and nor Eddine Sounni. MT4-MMP: The GPI-Anchored Membrane-Type Matrix Metalloprotease with Multiple Functions in Diseases. Int. J. Mol. Sci. 2019, 20, 354;
9- Elena Llano, Alberto M. Pendás, José P. Freije, Atsuhisa Nakano, Vera Knäuper, Gillian Murphy and Carlos López-Otin. Identification and Characterization of Human MT5-MMP, a New Membrane-bound Activator of Progelatinase A Overexpressed in Brain Tumors. Advances in Brief Cancer Res. 1990; (50): (18) 5709.
10- Kabiri N, Ahangar Darabi M. Hepatoprotective Effects of Kombucha Tea and Silymarin Against Thioacetamide Induced Liver Toxicity in Rats. Medical Journal of Tabriz University of Medical Sciences and Health Services. 2014; 36(5): 80-87.
11- Santos NP, Colaço AA, Oliveira PA. Animal models as a tool in hepatocellular carcinoma research: A Review. Tumour Biol. 2017; 39(3):1010428317695923.
12- Hui Emma Zhang, James M. Henderson, Mark D. Gorrell, Animal models for hepatocellular carcinoma. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease. 2018; 1865(5): 993-10.
13- Sharma RA, Gescher AJ, Steward WP. Curcumin: the story so far. Eur J Cancer. 2005.41(13):1955-68.
14- Campbell FC and Collett GP: Chemopreventive properties of curcumin. Future Oncol.2005; 1: 405-414.
15- Cao F, Liu T, Xu Y, Xu D, Feng S. Curcumin inhibits cell proliferation and promotes apoptosis in human osteoclastoma cell through MMP-9, NF-κB and JNK signaling pathways. Int J Clin Exp Pathol. 2015; 8(6):6037–6045.
16- Nguyen-Lefebvre AT, Ajith A, Portik-Dobos V, Horuzsko DD, Arbab AS, Dzutsev A, Sadek R, Trinchieri G, Horuzsko A. The innate immune receptor TREM-1 promotes liver injury and fibrosis. J Clin Invest. 2018; 128(11):4870-4883.

17- Abdelhamid AM, Selim A and Zaafan MA (2021) The Hepatoprotective Effect of Piperine Against Thioacetamide-Induced Liver Fibrosis in Mice: The Involvement of miR-17 and TGF-β/Smads Pathways. Front. Mol. Biosci. 8:754098.
18- M.C. Wallace, K. Hamesch, M. Lunova, Y. Kim, R. Weiskirchen, P. Strnad, S.L. Friedman, Standard operating procedures in experimental liver research: Thioacetamide model in mice and rats, Lab. Anim., 49 Suppl 1 (2015) 21-29.
19- Towbin H, S.T., and Gordon J, Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. : Proc Natl Acad Sci 1979. 76: 4350-4354.
20- Lee TY, Chang HH, Wen CK, Huang TH, Chang YS. Modulation of thioacetamide-induced hepatic inflammations, angiogenesis and fibrosis by andrographolide in mice. J Ethnopharmacol. 2014 Dec 2; 158 Pt A: 423-30.
21- Meis, J., Khanna, A. RNA amplification and cDNA synthesis for qRT-PCR directly from a single cell. Nat Methods 6, i–ii (2009).
22- Chabottaux V, Sounni NE, Pennington CJ, English WR, van den Brûle F, Blacher S, Gilles C, Munaut C, Maquoi E, Lopez-Otin C, Murphy G, Edwards DR, Foidart JM, Noël A. Membrane-type 4 matrix metalloproteinase promotes breast cancer growth and metastases. Cancer Res. 2006; 66(10):5165-72.
23- Nuttall RK, Pennington CJ, Taplin J, Wheal A, Yong VW, Forsyth PA, et al. Elevated membrane-type matrix metalloproteinases in gliomas revealed by profiling proteases and inhibitors in human cancer cells. Molecular Cancer Research. 2003; 1:333–345.
24- Wang Y, Yu SJ, Li YX, Luo HS. Expression and clinical significance of matrix metalloproteinase-17 and -25 in gastric cancer. Oncol Lett. 2015; 9(2):671–676.
25- Sounni NE, Paye A, Host L, Noël A. MT-MMPS as Regulators of Vessel Stability Associated with Angiogenesis. Front Pharmacol. 2011; 2: 111.
26- Okimoto RA, Breitenbuecher F, Olivas VR, et al. Inactivation of Capicua drives cancer metastasis. Nat Genet. 2017; 49(1):87–96.
27- Benson CS, Babu SD, Radhakrishna S, Selvamurugan N, Ravi Sankar B. Expression of matrix metalloproteinases in human breast cancer tissues. Dis Markers. 2013; 34(6):395-405.