مقاله پژوهشی

اثر مهاری کورکومین بر فسفریلاسیون NFκB-p65 القاشده توسط هیدروژن پراکسید در سلول‌های اندوتلیال آئورت گاوی

نرگس شریفات[۱]، فریده جعفری هفشجانی[۲]، پریسا دایتی[۱]، پرستو لرستان پور[۲]، علی پایدار[۳]، حسین بابا احمدی رضایی[۴*]

۱- کمیته تحقیقات دانشجویی، گروه بیوشیمی بالینی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی جندی‌شاپور اهواز، اهواز، ایران
۲- گروه بیوشیمی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد فلاورجان، اصفهان، ایران
۳- کمیته تحقیقات دانشجویی، دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی جندی‌شاپور اهواز، اهواز، ایران
۴- مرکز تحقیقات هایپر لیپیدمی، گروه بیوشیمی بالینی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی جندی‌شاپور اهواز، اهواز، ایران

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۵/۰۶/۰۳ تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۵/۱۰/۰۵

چکیده

زمینه و هدف: NFκB یک فاکتور هسته‌ای دایمر و دارای چندین زیرواحد است. p65 یکی از زیرواحدهای NFκB است که فسفریلاسیون آن در اثر استرس اکسیداتیو به فعال شدن NFκB منجر می‌گردد. عدم تعادل میان استرس اکسیداتیو و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی در پاتوژنز بسیاری بیماری‌ها مشارکت می‌کند. استفاده از ترکیبات آنتی‌اکسیدانی می‌تواند به‌عنوان استراتژی پیشگیری بیماری‌های التهابی موردتوجه قرار گیرد. از میان ترکیبات آنتی‌اکسیدانی کورکومین یک ترکیب طبیعی پلی فنول بوده که از زردچوبه استخراج و خنثی‌کننده‌ی رادیکال‌های آزاد است که بدن را از استرس اکسیداتیو محافظت می‌کند.

مواد و روش‌ها: سلول‌های اندوتلیال آئورت گاو با غلظت‌های متفاوت H_2O_2 (۲۰۰ μM، ۸۰، ۲۰، ۱۰) تیمار گردیدند و در غلظت ۲۰۰μM افزایش فسفریلاسیون p65 مشاهده شد. سپس جهت بررسی اثر مهاری کورکومین بر فسفریلاسیون القاشده توسط H_2O_2 سلول‌ها با غلظت‌های ۵μM، ۱۰ کورکومین انکوبه گردیدند. غلظت پروتئین با روش برادفورد اندازه‌گیری و میزان فسفریلاسیون p65 با روش وسترن بلات ارزیابی شد.

نتایج: یافته‌های ما نشان می‌دهد که میزان فسفریلاسیون p65 به دنبال تیمار با H_2O_2 در غلظت ۲۰۰μM در مقایسه با کنترل به میزان حدود ۲ برابر افزایش نشان داد و این اثر افزاینده H_2O_2 پس از ۳۰ دقیقه (P: ۰/۰۳) و ۲ ساعت (P:۰/۰۱۵) تیمار در غلظت ۱۰μM کورکومین کاهش یافت.

نتیجه‌گیری: نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که یکی از مکانیسم‌های ضدالتهابی کورکومین از طریق مهار فسفریلاسیون زیر واحد p65 و مسیر NFκB است.

کلمات کلیدی: کورکومین، هیدروژن پراکسید، فاکتور رونویسی کاپا B، سلول‌های اندوتلیال آئورت گاوی، فسفریلاسیون p65

مقدمه

فاکتور هسته‌ای کاپا B (NFκB) یک تنظیم کننده مهم در بسیاری از فرآیندهای سلولی شامل کنترل پاسخ‌های التهابی، رشد و تمایز سلولی است (۱). این فاکتور توسط عوامل بسیاری ازجمله سایتوکاین‌های التهابی (اینترلوکین ۱، فاکتور نکروزدهنده‌ی تومور)، استرس اکسیداتیو (H_2O_2) و ترکیبات میتوژن فعال شده و بیان بسیاری از ژن‌ها شامل سایتوکاین‌های التهابی گوناگون، مولکول‌های چسبنده و پروتئین‌های Rel را القا می‌کند (۲). در شرایط استراحت سلولی، NFκB به صورت یک کمپلکس متصل شده به مهارکننده‌یBκ (IκB) درون سیتوپلاسم است که انواع محرک‌های سلولی، مسیرهای سیگنالی درون‌سلولی را فعال و این امر منجر به فعال کردن IκB کیناز (IKK) می‌گردد (۳).

IKK فعال شده با فسفریلاسیون و یوبی کوئیناسیون مهارکننده‌یBκ، به تخریب مهارکننده منجر می‌گردد به دنبال این امر NFκB برای انتقال به درون‌هسته رها گردیده و بیان ژن‌های وابسته به NFκB را تنظیم می‌کند (۴). NFκB پروتئین همودایمر و هترودایمری است که از زیرواحدهای p65، p50، p52، RelB و c-Rel تشکیل شده است (۵). در این میان بیشتر به صورت کمپلکس هترودیمر p65/p50 است (۶). زیرواحد p65

* **نویسنده مسئول: حسین باباحمدی رضایی**، مرکز تحقیقات هایپر لیپیدمی، گروه بیوشیمی بالینی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی جندی‌شاپور اهواز، اهواز، ایران
Email: Babaahmadi-h@ajums.ac.ir

[Downloaded from journal.fums.ac.ir on 2024-03-29]
[DOR: 20.1001.1.22285105.2017.7.2.6.7]

نقش مهمی در شرایط التهابی و تولید سایتوکاین ها دارا است(۷). فسفریلاسیون زیر واحد p65 منجر به کاهش اتصال NFκB و مهارکننده‌ی Bκ و درنتیجه فعال شدن NFκB می‌گردد (۸). به نظر می‌رسد فسفریلاسیون زیر واحد p65 جهت تنظیم شدن ژن ها توسط NFκB مؤثر است این فسفریلاسیون توانایی اتصال NFκB به DNA را تغییر می‌دهد (۹). یکی از فاکتورهای مهم در فسفریلاسیون p65 و به دنبال آن فعال کردن مسیر NFκB استرس اکسیداتیو است (۱۰). اثرات زیان‌بار و آسیب‌های بیولوژیکی توسط گونه‌های فعال اکسیژن به‌عنوان استرس اکسیداتیو معرفی می‌گردد (۱۱). گونه‌های فعال اکسیژن (Ros) مثل آنیون سوپراکسید و هیدروژن پراکسید (H_2O_2) در بسیاری از فرآیندهای سلولی مهم شامل فعال شدن فاکتورهای رونویسی، تمایز سلولی و آپوپتوز شرکت می‌کنند (۳). H_2O_2 به‌عنوان یک مولکول نسبتاً پایدار و کوچک است که بیان ژن را تنظیم کرده و به‌عنوان یک پیامبر ثانویه عمل می‌کند، مطالعات پیشین نشان می‌دهد که H_2O_2 یک القاکننده‌ی مؤثر در فعال شدن مسیر NFκB است (۱۲). در شرایط طبیعی، میان‌کنش گونه‌های فعال اکسیژن و تولیدات حاصل از واکنش آن ها با بیومولکول های گوناگون توسط سیستم آنتی‌اکسیدانی طبیعی تبدیل به مولکول‌های کم‌خطر می‌گردند (۱۳). شرایط استرس اکسیداتیو نتیجه‌ی عدم تعادل میان تولید گونه های فعال اکسیژن و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی بدن است (۱۴). به‌منظور مقابله با اثر ترکیبات اکسیدان بر سلول‌ها و بافت‌ها، انواع متفاوتی از آنتی‌اکسیدان‌ها و سیستم‌های ترمیمی عمل خواهند کرد (۱۵). امروزه بسیاری از مولکول‌های فعال زیستی طبیعی مانند کورکومین به‌عنوان آنتی‌اکسیدان معرفی می شوند (۱۶). کورکومین (دی فرولوئیل متان) بخش فعال زردچوبه و عامل رنگ زرد آن، مدت طولانی است که زردچوبه در طب گیاهی استفاده می‌شود و چندین کشور جنوب شرقی آسیا مصرف‌کننده‌ی این ترکیب به صورت ادویه‌ی غذایی هستند (۱۷). این ترکیب دارای فعالیت‌های بیولوژیکی مختلفی شامل ویژگی‌های ضدالتهابی، ضدتوموری بوده و می‌تواند بسیاری از اعضای بدن را از شرایط اکسیدانی القاکننده‌ی بیماری محافظت کند (۱۸). کورکومین یک ترکیب طبیعی است که به‌عنوان مکمل درمانی در بیماری‌های مختلف از سرطان تا سیستیک فیبروزیس موردتوجه قرار گرفته است (۱۹).

با توجه به اینکه گونه‌های فعال اکسیژن نقش مهمی در فرآیندهای پاتوژنیک همانند پیری، فشارخون، آترواسکلروز، سرطان و سایر بیماری‌ها ایفا می‌کنند در این مطالعه به بررسی اثر استرس اکسیداتیو بر فسفریلاسیون NFκB-p65 در سلول‌های اندوتلیال و نقش کورکومین بر میزان این فسفریلاسیون پرداخته می‌شود.

مواد و روش‌ها

مواد:

محیط کشت DMEM low glucose (1g/l) از شرکت biosera، آنتی‌بیوتیک پنی‌سیلین ۱۰۰۰۰u/ml، آنتی‌بیوتیک استرپتومایسین ۱۰۰۰۰µg/ml، FBS از شرکت Gibco، آنتی‌بادی پلی کلونال ضد p65 فسفریله (anti- NFkB-pp65) از شرکت سانتاکروز، آنتی‌بادی ضد گلیسرآلدئید ۳-فسفات دهیدروژناز (anti-GAPDH) از شرکت Abcam انگلیس، کورکومین از شرکت Bio Basic کانادا، آنتی‌بادی ثانویه از شرکت سیگما، غشا PVDF از Roche آلمان، تریپسین از شرکت ایده زیست، کیت ECL از شرکت BioRad، هیدروژن پراکسید از شرکت مرک آلمان.

کشت سلول:

سلول‌های اندوتلیال عروق آئورت گاو در محیط (1g/l) DMEM low glucose دارای FBS ۱۰٪ و آنتی‌بیوتیک پنی‌سیلین/ استرپتومایسین ۱٪ رشد کردند. سپس برای انجام آزمایش‌ها، سلول‌ها به درون پلیت‌های ۶۰ میلی‌متری منتقل گردیدند و تا زمانی که هشتاد درصد سطح پلیت‌ها توسط سلول‌ها پر شوند باقی ماندند. سپس ۱۶ ساعت پیش از تیمار سلول‌ها با فاکتورهای موردنظر محیط سلول‌ها با محیط DMEM دارای FBS ۱٪ تعویض گردید و سپس به‌منظور بررسی اثر H_2O_2 بر میزان فسفریلاسیون NFκB-p65 سلول‌ها با غلظت ۲۰۰ µM، ۸۰، ۲۰، ۱۰ در مدت‌زمان ۱ ساعت تیمار شدند. نتایج حاصل از این مرحله نشان داد بیشترین میزان فسفریلاسیون در غلظت ۲۰۰µM صورت گرفته است. سپس به‌منظور بررسی اثر کورکومین بر فسفریلاسیون القاء شده در اثر استرس اکسیداتیو (H_2O_2) ابتدا غلظت کورکومین (۵ mM) در DMSO تهیه گردید و پس‌ازآن بر اساس مطالعات پیشین غلظت کورکومین (۵ µM، ۱۰) انتخاب و از غلظت ۵ mM تهیه شد (۲۰، ۲۱). سلول‌ها ابتدا در غلظت ۱۰µM و ۵ کورکومین هرکدام

[Downloaded from journal.fums.ac.ir on 2024-03-29]
[DOR: 20.1001.1.22285105.2017.7.2.6.7]

به مدت ۳۰ و ۱۲۰ دقیقه انکوبه گردیدند و سپس به مدت ۱ ساعت سلول‌ها تحت تیمار با غلظت H_2O_2 ۲۰۰Mμ قرار گرفتند.

وسترن بلاتینگ:

پس از به پایان رسیدن مدت‌زمان تیمار سلول‌های اندوتلیال به‌منظور جمع‌آوری سلول‌ها محیط کشت رویی سلول‌ها جمع‌آوری و سپس سطح پتری دیش‌ها دو بار با PBS سرد شسته شده و پس‌ازآن به هر پتری دیش ۱۰۰μl بافر لیز کننده که دارای (۲/۲۵ میلی‌لیتر بافر ripa، ۵۰ میکرولیتر مهارکننده‌ی پروتئاز، ۵۰ میکرولیتر اورتووانادات، ۲۵۰ میکرولیتر سدیم فلوئورید) افزوده گردید و با کمک اسکراپر سلول‌ها جمع‌آوری و به درون میکروتیوب منتقل شدند. با کمک یک سرنگ انسولین مایع حاوی سلول درون میکروتیوب حدود ۳۰ بار پیپتاژ شد تا توده‌ی سلولی باقی نماند و دیواره سلولی با فشار مکانیکی ایجاد شده توسط سرنگ انسولین تخریب گردد و سپس ورتکس میکروتیوب‌ها جهت تخریب بیشتر دیواره‌ی سلولی انجام و با سانتریفیوژ به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد و دور ۱۶۰۰۰ rpm محتویات درون‌سلولی استخراج و سوسپانسیون سلولی (مایع رویی) جمع‌آوری گردید. غلظت پروتئین‌های سلولی با کمک کیت BCA (پارس طوس) تعیین گردیده و جهت انجام الکتروفورز حجمی معادل غلظت ۵۰ میکروگرم پروتئین روی ژل SDS-PAGE ۱۰٪ پروتئین موردنظر جدا گردید، سپس پروتئین‌ها بر روی غشا PVDF منتقل شدند. با کمک بافر پوشاننده ۳٪ که از پودر شیر خشک بدون چربی در بافر TBST تشکیل می‌گردد در دمای اتاق برای مدت ۱ ساعت جایگاه‌های غیراختصاصی موجود روی غشا PVDF مسدود گردید. پس از شستشو، غشا با آنتی‌بادی اولیه پلی کلونال ضد pp65 با غلظت ۱:۱۰۰ و آنتی‌بادی پلی کلونال ضد گلیسرآلدئید ۳- فسفات دهیدروژناز (GAPDH) با غلظت ۱:۵۰۰۰ به مدت یک‌شب در دمای ۴°C انکوبه گردید. سپس غشا به مدت یک ساعت در معرض آنتی‌بادی ثانویه با غلظت ۱:۱۰۰۰۰ قرار گرفته و درنهایت با کیت (ECL BioRad) پروتئین‌ها شناسایی و با نرم‌افزار imag j آنالیز صورت گرفت.

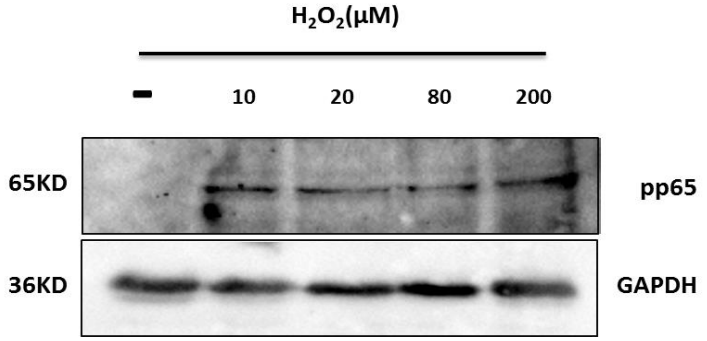
آنالیز آماری:

تجزیه‌وتحلیل داده‌ها با نرم‌افزار SPSS 21 و آزمون‌های آماری توصیفی (میانگین، انحراف معیار) و بر اساس روش one-way Anova انجام شد. نتایج با $P < ۰/۰۵$ معنی‌دار در نظر گرفته شد و نتایج حاصل از سه بار تکرار آزمایش‌ها به‌صورت میانگین ± خطای استاندارد میانگین گزارش گردیدند.

نتایج

در این مطالعه این سؤال مطرح گردید که آیا شرایط استرس اکسیداتیو در سلول‌های اندوتلیال آئورت گاوی می‌تواند باعث فسفریلاسیون NFκB-p65 گردد و در صورت فسفریلاسیون آیا این اثر توسط کورکومین مهار می‌گردد؟ بدین منظور سلول‌های اندوتلیال آئورت تحت تیمار با H_2O_2 قرار گرفته و میزان فسفریلاسیون p65 مورد ارزیابی قرار گرفت. سلول‌های اندوتلیال در ابتدا با غلظت‌های مختلف تحت تیمار با H_2O_2 قرار گرفتند نتایج حاصل از تیمار نشان دادند که میزان فسفریلاسیون p65 در غلظت‌های ۲۰۰μM و ۸۰،۲۰،۱۰ نسبت به گروه کنترل افزایش یافته و بیشترین میزان فسفریلاسیون در غلظت۲۰۰ μM از H_2O_2 مشاهده گردید (شکل۱).

فسفریلاسیون p65 در گروه تیمار شده با H_2O_2 در غلظت ۲۰۰ μM نسبت به گروه کنترل به میزان ۲/۳۵ برابر افزایش



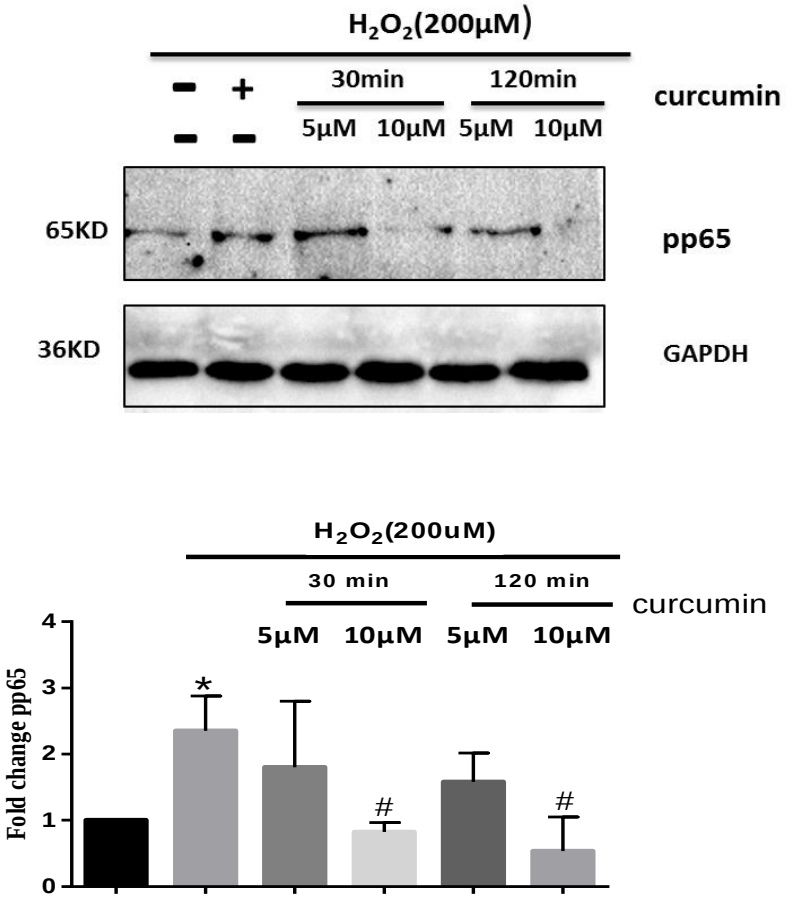
شکل۱. فسفریلاسیون p65 در سلول‌های اندوتلیال آئورت گاوی تیمار شده با H_2O_2 در غلظت‌های ۱۰ μM، ۲۰، ۸۰، ۲۰۰ پس از ۱ ساعت انکوباسیون. بیشترین میزان فسفریلاسیون p65 در نمونه تیمار شده با H_2O_2 در غلظت ۲۰۰μM نسبت به نمونه کنترل صورت گرفت.

[Downloaded from journal.fums.ac.ir on 2024-03-29]
[DOR: 20.1001.1.22285105.2017.7.2.6.7]

داشته است (اختلاف معنادار است و P value: 0.046). در نمونه‌های انکوبه شده با کورکومین در غلظت ۱۰ µM در مدت‌زمان ۳۰ دقیقه در مقایسه با گروه تیمار شده با H_2O_2 فسفریلاسیون p65 کاهش معناداری نشان داد (P value: 0.03) درحالی‌که نمونه‌هایی که با کورکومین در غلظت ۵Mµ به مدت ۳۰ دقیقه در حضور H_2O_2 انکوبه گردیده بودند نسبت به گروه تیمار شده با H_2O_2 تفاوت معناداری نداشتند (P value: 0.34). در گروه تیمار شده با کورکومین در غلظت ۱۰Mµ پس از ۱۲۰ دقیقه انکوباسیون کاهش معنادار نسبت به گروه تیمار شده با H_2O_2 نشان داده شد (P value: 0.015) درحالی‌که در گروه تیمار شده با کورکومین در غلظت ۵ µM در حضور H_2O_2 اختلاف معناداری نسبت به گروه تیمار شده با H_2O_2 صورت نگرفت (P value: 0.2) (شکل ۲).

بحث و نتیجه گیری

اطلاعات به‌دست‌آمده در بخش‌های تحقیقاتی و درمانی عنوان می‌کنند که استرس اکسیداتیو نقش بسیار مهمی در پاتوژنز بیماری‌ها ایفا می‌کند (۲۲). افزایش غیرطبیعی سطح رادیکال‌های آزاد و کاهش مکانیسم‌های دفاع آنتی‌اکسیدانی منجر به آسیب به ارگانل‌های سلولی، آنزیم‌ها، پراکسیداسیون لیپیدها و مقاومت به انسولین می‌گردد، بنابراین استرس اکسیداتیو به‌عنوان نقطه‌ی عطف مشترک بیماری‌های مزمن مانند سرطان، دیابت و بیماری‌های قلبی- عروقی به‌ویژه آترواسکلروز معرفی می‌گردد (۲۳، ۲۴). مطالعه‌ی صورت گرفته در سال ۲۰۰۴ توسط kratsovnik و همکاران بر روی سلول‌های نورونی استخراج شده از رت نشان داد که هنگامی‌که سلول‌ها در معرض شرایط ایسکمی و پرفیوژن مجدد قرار می‌گیرند به علت



شکل۲. سنجش میزان فسفریلاسیون p65 در حضور غلظت ۲۰۰µM از H_2O_2 و غلظت‌های کورکومین (۵ µM، ۱۰) در زمان‌های ۳۰ و ۱۲۰ دقیقه. اختلاف معنادار با P value<۰/۰۵ با * برای گروه تیمار شده با H_2O_2 نسبت به گروه کنترل و اختلاف معنادار میان گروه‌های تیمارشده با کورکومین در مقایسه با گروه‌های تیمار شده با H_2O_2 با P value< ۰/۰۵ با # نشان داده شده است.

[Downloaded from journal.fums.ac.ir on 2024-03-29]
[DOR: 20.1001.1.22285105.2017.7.2.6.7]

افزایش تولید رادیکال‌های آزاد در شرایط پرفیوژن فعالیت NFκB در این سلول‌ها افزایش می‌یابد (۲۵). بررسی‌های انجام‌شده در سال ۲۰۱۳ توسط Narayanan و همکاران بر روی سلول‌های کبدی (HepG2) نشان داد که در سلول‌های آلوده به ویروس گونه‌های فعال اکسیژن افزایش پیدا کرده و منجر به فعال کردن مسیر NFκB در مراحل ابتدایی بیماری شده بود (۲۶). در مطالعه‌ی حاضر سلول‌های اندوتلیال در معرض استرس اکسیداتیو القاء شده توسط غلظت‌های متفاوت H_2O_2 (۱۰ µM، ۲۰، ۸۰، ۲۰۰) قرار گرفته‌اند. نتایج به‌دست‌آمده نشان داد که میزان فسفریلاسیون NFκB-p65 در غلظت ۲۰۰µM نسبت به گروه کنترل افزایش یافت. این نتایج مشابه یافته‌هایی است که در سال ۲۰۰۰ توسط Foncea و همکاران ارائه گردید، این گروه عنوان کرده بودند افزایش گونه‌های فعال اکسیژن باعث افزایش فعالیت NFκB در سلول‌های اندوتلیال می‌گردد (۲۷). سلول‌های اندوتلیال به‌عنوان سلول‌های پوشاننده‌ی لایه‌ی اندوتلیوم عروق با رها کردن تنظیم‌کننده‌ها میزان استرس اکسیداتیو را کاهش می‌دهد (۲۸). لایه‌ی اندوتلیوم که داخلی‌ترین لایه‌ی عروق و در تماس با جریان خون و رادیکال‌های آزاد و گونه‌های فعال اکسیژن است تنظیم‌کننده‌ی اصلی هموستاز دیواره‌ی عروق است (۲۹). شرایط استرس اکسیداتیو باعث افزایش آسیب به سلول‌های اندوتلیال و اختلال در عملکرد آن‌ها و درنتیجه گسترش بیماری‌های قلبی- عروقی می‌گردد (۳۰). با توجه به اثرات زیان‌بار اکسیدان‌ها، امروزه بسیاری از ترکیبات طبیعی که دارای عملکرد آنتی‌اکسیدانی و ضدالتهابی می‌باشند به‌عنوان ترکیبات ضدالتهابی و محافظت‌کننده‌ی سیستم قلبی- عروقی مورد بررسی قرار می‌گیرند (۱۸). در میان ترکیبات طبیعی، کورکومین با خواص ضدالتهابی و اثرات آنتی‌اکسیدانی دارای اثرات بیولوژیکی مهمی است (۳۱). مطالعات اخیر نشان می‌دهد که یکی از مکانیسم‌های اثرات ضدالتهابی و ضد توموری کورکومین به علت کاهش فعالیت NFκB است، بااین‌حال مکانیسم عملکردی کورکومین به‌طور کامل مورد شناسایی قرار نگرفته است (۲۱). بنابراین با توجه به نتیجه مرحله‌ی قبل در مطالعه‌ی حاضر، عملکرد کورکومین بر فسفریلاسیون NFκB-p65 در حضور شرایط استرس اکسیداتیو القاشده توسط H_2O_2 مورد ارزیابی قرار گرفت و نتایج نشان دادند که سطح فسفریلاسیون p65 ایجادشده توسط H_2O_2 در غلظت ۲۰۰µM در حضور غلظت ۱۰µM کورکومین با حداکثر میزان مهارکنندگی کاهش پیدا کرد اما در غلظت ۵ µM تفاوت معناداری نسبت به گروه تیمار شده با H_2O_2 مشاهده نشد. این نتایج نشان داد کورکومین احتمالاً با مهار استرس اکسیداتیو باعث کاهش عملکرد NFκB و پاسخ‌های سلولی مربوط به آن می‌گردد. در مطالعه‌ای که در سال ۲۰۰۵ توسط Dikshit و همکاران انجام گرفته بود نشان داده شد که کورکومین باعث مهار فعالیت پروتئازوم و درنتیجه ممانعت از تخریب پروتئین مهارکننده‌ی NFκB (IκB) می‌گردد که این امر از انتقال NFκB به درون‌هسته و فعالیت این فاکتور جلوگیری می‌کند (۲۱). Samuhasaneeto و همکاران در سال ۲۰۰۹ در رت‌ها به بررسی اثر کورکومین در بهبود آسیب‌های کبدی ناشی از مصرف الکل پرداختند که نتایج نشان داد استرس اکسیداتیو با افزایش بیان NFκB و پراکسیداسیون لیپیدها همراه است و کورکومین با مهار فعالیت NFκB باعث کاهش آسیب‌ها می‌گردد (۳۲). تحقیقات پیش‌ازاین نشان داده بودند که کورکومین فعالیت NFκB، پروتئین‌های فعال‌کننده-۱ و مسیرهای سیگنالی مربوط به JAK-STAT القا شده توسط استرس اکسیداتیو را مهار می‌کند (۲۰). وجود گروه‌های فنولی، کتونی و متوکسی در کورکومین باعث عملکرد خنثی‌کنندگی رادیکال‌های آزاد توسط این ترکیب می‌گردد (۱۷). مطالعات پیشین نشان می‌دهد که کورکومین به‌طور قوی آغاز و پیشرفت تومورهای حاصل از ترکیبات شیمیایی سرطان‌زا را نیز کاهش می‌دهد (۳۳). با توجه به اثر مهارکنندگی کورکومین بر روی NFκB فعال‌شده توسط H_2O_2 در این مطالعه، استفاده از این ترکیب را می‌توان جهت کاهش اختلال در عملکرد سلول‌های اندوتلیال عروق پیشنهاد داد، اگرچه استفاده‌ی کاربردی و درمانی از این ترکیب نیازمند پژوهش‌های بیشتر است.

تشکر و قدردانی

کلیه‌ی کارهای تکنیکی مربوط به این مقاله در گروه بیوشیمی دانشگاه علوم پزشکی جندی‌شاپور اهواز انجام شده است بدین‌وسیله از حمایت‌های اساتید محترم گروه بیوشیمی تشکر به عمل می‌آید.

تعارض منافع

نویسندگان هیچ گونه تعارض منافعی را اعلام نکرده اند.

[Downloaded from journal.fums.ac.ir on 2024-03-29]
[DOR: 20.1001.1.22285105.2017.7.2.6.7]

References

1. Li Q, Verma IM. NF-κB regulation in the immune system. Nat Rev Immunol. 2002;2(10):725-34.
2. Tripathi P, Aggarwal A. NF-kB transcription factor: a key player in the generation of immune response. Curr Sci. 2006;90(4):519.
3. DangLi R, HeKong W, JiQin L, MingHua Z, WenCheng Z. ROS-induced ZNF580 expression: a key role for H2O2/NF-κB signaling pathway in vascular endothelial inflammation. Mol Cell Biochem. 2012;359(1-2):183-91.
4. Sintara K, Thong-Ngam D, Patumraj S, Klaikeaw N, Chatsuwan T. Curcumin suppresses gastric NF-kappaB activation and macromolecular leakage in Helicobacter pylori-infected rats. World J Gastroenterol. 2010;16(32):4039-46.
5. Zhang J, Johnston G, Stebler B, Keller ET. Hydrogen Peroxide Activates NF κ B and the Interleukin-6 Promoter Through NF κ B-Inducing Kinase. Antioxid Redox Signal. 2001;3(3):493-504.
6. Liu J, Yoshida Y, Yamashita U. Suppressive effect of reactive oxygen species on CD40-induced B cell activation. FEBS Lett. 2007;581(26):5043-9.
7. Peng Y, Gallagher SF, Landmann R, Haines K, Murr MM. The role of p65 NF-kB/RelA in pancreatitis-induced kupffer cell apoptosis. J Gastrointest Surg. 2006;10(6):837-47.
8. Bohuslav J, Chen Lf, Kwon H, Mu Y ,Greene WC. p53 induces NF-κB activation by an IκB kinase-independent mechanism involving phosphorylation of p65 by ribosomal S6 kinase 1. J Biol Chem. 2004;279(25):26115-25.
9. Kefaloyianni E, Gaitanaki C, Beis I. ERK1/2 and p38-MAPK signalling pathways, through MSK1, are involved in NF-κB transactivation during oxidative stress in skeletal myoblasts. Cell Signal. 2006;18(12):2238-51.
10. Takada Y, Mukhopadhyay A, Kundu GC, Mahabeleshwar GH, Singh S, Aggarwal BB. Hydrogen peroxide activates NF-κB through tyrosine phosphorylation of IκBα and serine phosphorylation of p65 evidence for the involvement of IκBα kinase and Syk protein-tyrosine kinase. J Biol Chem. 2003;278(26):24233-41.
11. Khansari N, Shakiba Y ,Mahmoudi M. Chronic inflammation and oxidative stress as a major cause of age-related diseases and cancer. Recent Pat Inflamm Allergy Drug Discov. 2009;3(1):73-80.
12. Rojkind M, Dominguez Rosales JA, Nieto N, Greenwel P. Role of hydrogen peroxide and oxidative stress in healing responses. Cell Mol Life Sci. 2002;59(11):1872-91.
13. Vaziri ND. Causal link between oxidative stress, inflammation, and hypertension. Iran J Kidney Dis. 2008;2(1):1-10.
14. Reuter S, Gupta SC, Chaturvedi MM, Aggarwal BB. Oxidative stress, inflammation, and cancer: how are they linked? Free Radic Biol Med. 2010;49(11):1603-16.
15. Ott M, Gogvadze V, Orrenius S, Zhivotovsky B. Mitochondria, oxidative stress and cell death . Apoptosis. 2007;12(5):913-22.
16. Ghosh S, Banerjee S, Sil PC. The beneficial role of curcumin on inflammation, diabetes and neurodegenerative disease: A recent update. Food Chem Toxicol. 2015;83:111-24.
17.Esatbeyoglu T, Huebbe P, Ernst I, Chin D, Wagner AE, Rimbach G. Curcumin—from molecule to biological function. Angew Chem Int Ed. 2012;51(22):5308-32.
18. Strimpakos AS, Sharma RA. Curcumin: preventive and therapeutic properties in laboratory studies and clinical trials. Antioxid Redox Signal. 2008;10(3):511-46.
19. Ak T, Gülçin İ. Antioxidant and radical scavenging properties of curcumin. Chem Biol Interact. 2008;174(1):27-37.
20. Yang X, Thomas DP, Zhang X, Culver BW, Alexander BM, Murdoch WJ, et al. Curcumin Inhibits Platelet-Derived Growth Factor–Stimulated Vascular Smooth Muscle Cell Function and Injury-Induced Neointima Formation. Arterioscle Thromb Vasc Biol. 2006;26(1):85-90.
21. Dikshit P, Goswami A, Mishra A, Catterjee M, Jana NR. Curcumin induces stress response, neurite outgrowth and prevent NF-κB activation by inhibiting the proteasome function. Neurotox Res. 2006;9(1):29-37.
22. Ceriello A. New insights on oxidative stress and diabetic complications may lead to a “causal” antioxidant therapy. Diabetes care. 2003;26(5):1589-96.
23. Balasubramanyam M, Koteswari AA, Kumar RS, Monickaraj SF, Maheswari JU, Mohan V. Curcumin-induced inhibition of cellular reactive oxygen species generation: novel therapeutic implications. J Biosci. 2003;28(6):715-21.
24. Madamanchi NR, Vendrov A, Runge MS. Oxidative stress and vascular disease. Arterioscle Thromb Vasc Biol. 2005;25(1):29-38.
25. Kratsovnik E, Bromberg Y, Sperling O, Zoref-Shani E. Oxidative stress activates transcription factor NF-κB-mediated protective signaling in primary rat neuronal cultures. J Mol Neurosci. 2005;26(1):27-32.
26. Narayanan A, Amaya M, Voss K, Chung M, Benedict A, Sampey G, et al. Reactive oxygen species activate NFκB (p65) and p53 and induce apoptosis in RVFV infected liver cells. Virology. 2014;449(1):270-86.

[Downloaded from journal.fums.ac.ir on 2024-03-29]
[DOR: 20.1001.1.22285105.2017.7.2.6.7]

27.FONCEA R, Carvajal C, Almarza C, Leighton F. Endothelial cell oxidative stress and signal transduction. Biol Res. 2000;33(2):86-96.
28. Suvorava T, Kojda G. Reactive oxygen species as cardiovascular mediators: lessons from endothelial-specific protein overexpression mouse models. Biochim Biophys Acta. 2009;1787(7):802-10.
29. Sitia S, Tomasoni L, Atzeni F, Ambrosio G, Cordiano C, Catapano A, et al. From endothelial dysfunction to atherosclerosis. Autoimmun Rev. 2010;9(12):830-4.
30.Heitzer T, Schlinzig T, Krohn K, Meinertz T, Münzel T. Endothelial dysfunction, oxidative stress, and risk of cardiovascular events in patients with coronary artery disease. Circulation. 2001;104(22):2673-8.
31. Motterlini R, Foresti R, Bassi R, Green CJ. Curcumin, an antioxidant and anti-inflammatory agent, induces heme oxygenase-1 and protects endothelial cells against oxidative stress. Free Radic Biol Med. 2000;28(8):1303-12.
32. Samuhasaneeto S, Thong-Ngam D, Kulaputana O, Suyasunanont D, Klaikeaw N. Curcumin Decreased Oxidative Stress, Inhibited NF. BioMed Res Int. 2009;20(1).
33. Kim GY, Kim KH, Lee SH, Yoon MS, Lee HJ, Moon DO, et al. Curcumin inhibits immunostimulatory function of dendritic cells: MAPKs and translocation of NF-κB as potential targets. J Immunol. 2005;174(12):8116-24.

[Downloaded from journal.fums.ac.ir on 2024-03-29]
[DOR: 20.1001.1.22285105.2017.7.2.6.7]

Original Article

Inhibitory Effect of Curcumin on Phosphorylation NFκB-p65 Induced by Hydrogen Peroxide in Bovine Endothelial Cells

Sharifat N[1], Jafari Hafshejani F[2], Dayati P[1], lorestan pour P[2], paydar A[3], Babaahmadi Rezaei H[4]*

1. Student Research Committee, Department of Clinical Biochemistry, Faculty of Medicine, Ahvaz Jundishapur University of Medical Sciences, Ahvaz, Iran
2. Department of Biochemistry, Falavarjan branch, Islamic Azad University, Isfahan, Iran
3. Student Research Committee, Faculty of Paramedical, Ahvaz Jundishapur University of Medical Sciences, Ahvaz, Iran
4. Hyper lipidemia Research Center, Department of Clinical Biochemistry, Faculty of Medicine, Ahvaz Jundishapur University of Medical Sciences, Ahvaz, Iran

Received: 24 Aug 2016 Accepted: 25 Dec 2016

Abstract

Background & Objective: NFκB is a dimeric transcription factor with multiple subunits. Phosphorylation of p65 (one of NFκB subunits) by oxidative stress leads to the activation of NFκB. Imbalance between oxidative stress and cellular antioxidant capacity is the pathogenesis of many diseases. Consuming antioxidants in daily meal can be considered as a preventive strategy for inflammatory diseases. Among antioxidant components, curcumin is a natural polyphenol which is extracted from Tumeric. Curcumin can protect the human body from oxidative stress by neutralizing the free radicals.

Material & Methods: Bovine Endothelial Cells (BECs) were treated with different concentration of H_2O_2 (10, 20, 80, 200 μM). To investigate the inhibitory effect of curcumin on H_2O_2 mediated phosphorylation of p65, BECs were incubated with 5 and 10μM concentration of curcumin. Protein concentration was measured by Bradford method and phosphorylation of p65 was assessed by western blotting.

Results: Our finding indicated that p65 phosphorylation was increased two fold in presence of H_2O_2 (200 μM) in comparison with control. The enhancing effect of H_2O_2 on p65 phosphorylation decreased at 30 min (P: 0.03) and 2 hours (P:0.015) after treatment with 10 μM dose of curcumin.

Conclusion: The result of this study indicates that one of anti-inflammatory mechanisms of curcumin is through NFκB pathway by inhibition of p65 subunit phosphorylation.

Key words: Curcumin, hydrogen peroxide, transcription factor κB, bovine aortic endothelial cells, phosphorylation p5

***Corresponding author: Hossein Babaahmadi Rezaei,** Hyper lipidemia Research Center, Department of Clinical Biochemistry, Faculty of Medicine, Ahvaz Jundishapur University of Medical Sciences, Ahvaz, Iran
Email: Babaahmadi-h@ajums.ac.ir

[Downloaded from journal.fums.ac.ir on 2024-03-29]

[DOR: 20.1001.1.22285105.2017.7.2.6.7]