

OCT4B1 Dysregulation Is a Key Factor in Different Sensitivity of Normal Cells and Breast Cancer Cells to the Curcumin

Maryam Tahmasebi-Birgani¹, Mohammad Amin Javidi^{2**}, Saeedeh Ghiasvand³, Hamid Zaferani Arani⁴, Majid Sadeghizadeh^{5*}, Seyed Javad Mowla⁵, Farhood Najafi⁶

¹Department of Medical Genetics, School of Medicine, Ahvaz Jundishapur University of Medical Sciences, Ahvaz, Iran

²Department of Integrative Oncology, Breast Cancer Research Center, Motamed Cancer Institute, ACECR, Tehran, Iran

³Department of Biology, Faculty of Science, Malayer University, Malayer, Iran

⁴Young Researchers and Elite Club, Tehran University of Medical Sciences, Islamic Azad University, Tehran, Iran

⁵Department of Genetics, Faculty of Biological Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

⁶Department of Resin and Additives, Institute for Color Science and Technology, Tehran, Iran

Abstract

Introduction: The crucial and vital player in tumor recurrence is the tumor-initiating cells (TICs). *OCT4* is a widely appreciated non-cell surface for TICs, dedicating detrimental properties to these cells, including self-renewal, epithelial-mesenchymal capacity, and drug resistance. *OCT4* and its partners *Sox2* and *Nanog* are up-regulated in stem cells; on the other hand, normal stem cells are more resistant to various herbal remedies like curcumin. Based on these facts, the main objective of the present study was to investigate the alteration of the mentioned genes expression after curcumin treatment in breast cancer cell, human bone marrow mesenchymal stem cells (hBM-MSCs), and non-tumor fibroblast cells (HSFPI3).

Materials and Methods: MTT assay and AnnexinV/PI were performed to calculate the effective concentration of curcumin. To assess the expression level of *OCT4* and *Nanog*, real-time PCR was performed to quantify the alteration of the mRNA expression of the mentioned genes after treatment in MDA-MB231, hBM-MSCs, and HSFPI3.

Results: Curcumin could not induce significant apoptosis in hBM-MSCs and HSFPI3 even after 24 and 36 hours after treatment in a toxic concentration for cancer cells. After 36-hour treatment with DNC, the mRNA expression of *Oct4-B1* in both normal cells enhanced significantly compared to untreated samples. Furthermore, in HSFPI3 cells, the *Nanog* mRNA expression increased after this treatment. The expression of both genes decreased in the MDA-MB231 after treatment with DNC.

Conclusion: Non-tumor cells are more resistant to the curcumin treatment compared to cancer cells. The reason is at least partially due to the different expression pattern results in these cells after treatment with this reagent. Pluripotent markers, including *Oct4-B1* and *Nanog* are proposed to play a vital role in these non-tumor cells resistant to curcumin.

Keywords

Cancer Stem Cells, Pluripotent Markers, Cancer Cells, Non-Tumor Cells, Nanog

Received: 2023/01/08

Accepted: 2023/03/27

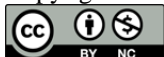
*Corresponding Author:
sadeghma@modares.ac.ir

**Co-Corresponding Author:
Javidi@acecr.ac.ir

Ethics Approval:
Not applicable

Original Article

Copyright © 2023 Tahmasebi et al. Published by Breast Cancer Research Center, ACECR



This work is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>) Non-commercial uses of the work are permitted, provided the original work is properly cited.

Introduction

The cancer stem cells (CSCs) theory is controversial yet and it is still developing since the time of being put forth. In this theory, it is proposed that some crucial characteristics of tumors are related to the specific subpopulation of CSCs in the tumor, which are renamed differently. In some reports, they are called CSCs because of their ability to renew and produce differentiated progenies. In the other reports, they are called tumor-initiating cells (TICs) due to their ability to produce new tumors after transplantation [1, 2]. Oct4 belongs to the POU (Pit-Oct-Unc) transcription factor family, which regulates the expression of their target genes by binding to the octameric conserved DNA sequence AGTCAAAT. It is not transparently demonstrated what signals are responsible for the oligomerization and the subsequent function of the Oct4; however, it is approved that this gene expression confers main properties to the TICs, including the self-renewal, epithelial to mesenchymal transition (EMT), and drug resistance. Together with the Oct4, Sox2 and Nanog are other stem cell markers which are essential in pluripotency maintaining in stem cells [3].

Curcumin is a polyphenol extracted from the rhizome of the plant *Curcuma longa* with approved anticancer properties. Its preferential uptake into the cancer cells besides the pleiotropic feature of curcumin to target multiple signaling pathways considered it a potent anticancer agent. Although there is still very little data to explain why curcumin exerts cytotoxic effects, especially in cancer cells, it seems different membrane protein composition between cancer and non-tumor cells plays an essential role in this media. The glutathione (GSH) content of the cells is also another parameter affecting the sensitivity of the cells to curcumin [4].

Materials and Methods

Dendrosomal nano-curcumin (DNC) preparation

Dendrosomal nano-curcumin was synthesized in our lab based on an optimized protocol [5, 6] and stored at 4°C in a light-protected condition until utilization. For in vitro experiments, the drug was diluted in a complete culture medium.

Cells treatment with DNC

We previously examined the sensitivity of cancer cells and mesenchymal cells to DNC using an MTT assay. We found that at a concentration of 17.5µM cancer cells were affected while no harmful effect was connected to non-tumor cells[10]. Considering available data and regarding the aim of the study, we treated the hBMSC cells with anticancer concentration (17.5µM) for 36h before the genetic analysis (trypan blue staining and counting was performed to confirm that the above DNC dose does not significantly induce cell death in non-tumor cells) (Unloaded nano used in the control groups).

Real-time polymerase chain reaction (Real-time PCR)

Real-time PCR was performed using the SYBR® Premix Ex Taq™ II (Takara) using specific primers[10] for *Oct4-B1* and *Nanog* (Table1). Relative gene expression was calculated as $2^{-\Delta\Delta Ct}$ after normalization with *GAPDH*. The real-time PCR process program was performed as follow: Holding Stage: 95 °C/30 s; Cycling Stage: denaturing step: 95°C/5 s, followed by annealing/extension step 60 °C/35 s (Number of Cycles: 40). 3- Melt curve analysis stage.

Results

Apoptosis induction in non-tumor cells by DNC

To determine whether DNC induces apoptosis in non-tumor cells, both hBMSC and HSFPI3 cells were treated with DNC for 24 and 36h. As illustrated in Figures 1 and 2, no significant change in cell death was observed after DNC treatment in hBMSC or HSFPI3 ($P>0.05$) compared to untreated cells. In hBMSC, the percentage of apoptosis after 24 and 36h post-treatment with 17.5µM DNC was 4.39% and 7.19%, respectively. Treatment of HSFPI3 cells with 17.5µM of the DNC induced about

10.41% apoptosis after 24h and 11.03% apoptosis after 36h (Figure 1).

Alteration in the OCT4B1 and Nanog mRNA expression level after DNC treatment

Real-time PCR results revealed that the treatment of hBMSCs with 17.5µM DNC induced OCT4B1 mRNA up-regulation. Following 36h after treatment with DNC, OCT4B1 was upregulated 2.19-fold in comparison to untreated cells. On the other hand, after this treatment, the Nanog mRNA

level did not alter statistically compared to the untreated/control group. Similar to hBMSC, OCT4B1 upregulated in HSFPI3 cells after treatment with DNC; however, in contrast to hBMSC, after treatment with DNC, the mRNA expression level of Nanog increased in HSFPI3. As shown in Figure 5, OCT4B1 and Nanog were up-regulated approximately 7.73 and 5.2-fold, respectively after 36h treatment (Figure 2).

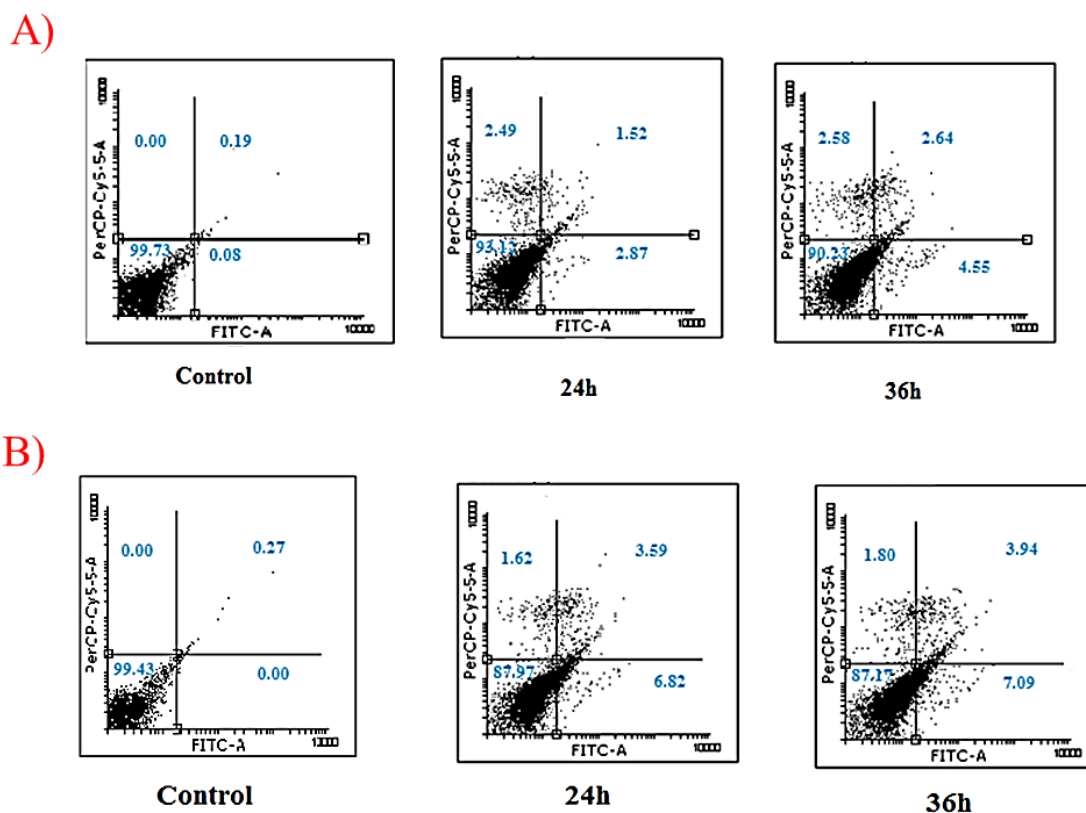


Figure 1: Annexin-V-FLUOS/propidium iodide staining to assess apoptosis induction in hBM-MSCs (A) and HSFPI3 (B) after 24 and 36h post-treatment with DNC. Viable cells (Annexin-V-/PI-), early apoptotic cells (Annexin-V+/PI-), late apoptotic cells (Annexin-V-/PI+), and necrotic cells (Annexin-V+/PI+) are located in the lower left, lower right, upper right, and upper left quadrants, respectively. Numbers in each quadrant represent the percentage of cells.

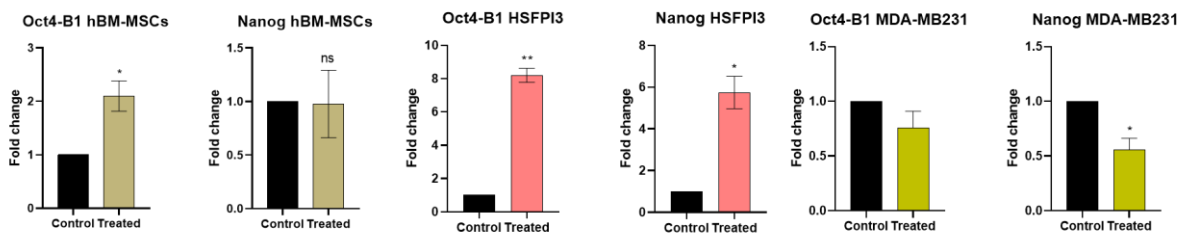


Figure 2: The real-time PCR results revealed that, the expression level of OCT4-B1 and Nanog increased after treatment of hBM-MSCs and HSFPI3 cells with DNC. However, this treatment induced downregulation of the mentioned mRNA genes in the MDA-MB231 cells.

Discussion

In addition to OCT4B1, in fibroblast cells, the stem cell marker, Nanog, was significantly up-regulated at the effective concentration of DNC. This finding maybe supports the involvement of Nanog in stress responses. There is little evidence showing the anti-apoptotic role of Nanog. Suppression of this gene promotes apoptosis in mouse migrating primordial germ cells [7]. Up-regulation of Nanog seems to play a role in hypoxia stress, and knockdown of Nanog in hypoxic tumor cells decreases tumor resistance to CTL-dependent killing .

In a study performed by Igor Matic et al., they revealed that the expression level of the OCT4 and Sox2 is much higher in cancerous cells like A1235 (a glioblastoma cell line) and HepG2 (liver cancer cell line) [8].

Here for the first time, we showed that after treatment of non-tumor cells with curcumin, the mRNA expression level of the *OCT4-B1* and/or *Nanog* increased in these cells. As discussed above, these genes play an essential role in physiological processes, including stemness and self-renewal in tumor cells as well as non-tumor cells.

Conclusion

1. Kreso, A. and J.E. Dick, Evolution of the cancer stem cell model. *Cell Stem Cell*. 2014;14(3): 275-91.
2. Cabezas- Wallscheid N, Eichwald V, de Graaf J, Löwer M, Lehr HA, Kreft A, et al., Instruction of haematopoietic lineage choices, evolution of transcriptional landscapes and cancer stem cell hierarchies derived from an AML1-ETO mouse model. *EMBO Mol Med*. 2013; 5(12): 1804-20.
3. Amini S, Fathi F, Mobalegi J, Sofimajidpour H, Ghadimi T. The expressions of stem cell markers: Oct4,

Nanog, Sox2, nucleostemin, Bmi, Zfx, Tcl1, Tbx3, Dppa4, and Esrrb in bladder, colon, and prostate cancer, and certain cancer cell lines. *Anat Cell Biol*. 2014; 47(1):1-11.

4. Syng-Ai C, Kumari AL, Khar A., Effect of curcumin on normal and tumor cells: role of glutathione and bcl-2. *Molecular Cancer Therapeutics*. 2004;3(9): p.1101-8.
5. Tahmasebi Mirgani M, Isacchi B, Sadeghizadeh M, Marra F, Bilia AR, Mowla SJ, et al., Dendrosomal curcumin nanoformulation downregulates pluripotency genes via miR-145 activation in U87MG glioblastoma cells. *International journal of nanomedicine*. 2014;9:403-17.
6. Babaei E, Sadeghizadeh M, Hassan ZM, Feizi MA, Najafi F, Hashemi SM. Dendrosomal curcumin significantly suppresses cancer cell proliferation in vitro and in vivo. *International immunopharmacology*. 2012;12(1):226-34.
7. Yamaguchi S, Kurimoto K, Yabuta Y, Sasaki H, Nakatsuji N, Saitou M, et al., Conditional knockdown of Nanog induces apoptotic cell death in mouse migrating primordial germ cells. *Development*. 2009; 136(23):4011-20.
8. Matic, I., et al., Expression of OCT-4 and SOX-2 in Bone Marrow-Derived Human Mesenchymal Stem Cells during Osteogenic Differentiation. *Open Access Maced J Med Sci*, 2016. 4(1): p. 9-16.

بررسی تنظیم میزان بیان *OCT4B1* به عنوان یک فاکتور کلیدی در تعیین حساسیت متفاوت سلول‌های نرمال و سلول‌های سرطانی پستان به کورکومین

مریم طهماسبی بیرگانی^۱، محمد امین جاویدی^{۲*}، سعیده قیاسوند^۳، حمید زعفرانی ارانی^۴، مجید صادقی‌زاده^{۵*}، سید جواد مولی^۶، فرهود نجفی^۶

^۱ گروه ژنتیک پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز، اهواز، ایران

^۲ گروه پژوهشی طب فراگیر در سرطان، مرکز تحقیقات سرطان پستان، پژوهشکده سرطان معتمد جهاد دانشگاهی، تهران، ایران

^۳ گروه زیست‌شناسی-ژنتیک مولکولی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه ملایر، ملایر، ایران

^۴ باشگاه پژوهشگران جوان و نخبگان، علوم پزشکی تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

^۵ گروه ژنتیک، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

^۶ گروه پژوهشی رزین و افزودنی‌ها، موسسه پژوهشی علوم و فناوری رنگ و پوشش، تهران، ایران

چکیده

زمینه و هدف: نقش مهم و حیاتی در عود مجدد تومور، سلول‌های آغازگر تومور (TICs) هستند. *OCT4* ژنی است که محصول آن می‌تواند خواص مضر از جمله خود نوسازی، ظرفیت مزانشیمی اپیتلیال و مقاومت دارویی را به TICs اختصاص می‌دهد. *OCT4*، *Sox2* و *Nanog* نیز دو ژن اساسی هستند که علاوه بر *OCT4* در سلول‌های بنیادی تنظیم می‌شوند. از سوی دیگر، سلول‌های بنیادی طبیعی در برابر داروهای گیاهی مختلف مانند کورکومین مقاومت بیشتری دارند. بر این اساس هدف اصلی ما در این مطالعه بررسی تغییر بیان ژن‌های مذکور پس از درمان با کورکومین در سلول‌های سرطانی پستان، سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان انسان (hBM-MSCs) و سلول‌های فیبروبلاست غیر توموری (HSFPI3) است.

روش بررسی: تست MTT و AnnexinV/PI برای محاسبه غلظت موثر کورکومین انجام شد. برای ارزیابی سطح بیان *OCT4* و *Nanog*، روش real-time PCR مورد استفاده قرار گرفت؛ از این تست برای تعیین میزان تغییر بیان mRNA ژن‌های مذکور در سلول‌های MDA-MB231، hBM-MSCs و HSFPI3 پس از تیمار با کورکومین استفاده شد.

یافته‌ها: نانوکورکومین در غلظت $17/5 \mu\text{M}$ باعث القای ۵۰ درصد مرگ در سلول‌های سرطانی MDA-MB231 پس از ۲۴ و ۳۶ ساعت شد. تیمار سلول‌های نرمال hBM-MSC با این غلظت و در زمان‌های گفته شده به طور میانگین به ترتیب ۴/۳۹٪ و ۷/۱۹٪ و در HSFPI3 به‌طور میانگین ۱۰/۴۱٪ و ۱۱/۰۳٪ گزارش شد. پس از ۳۶ ساعت تیمار با DNC، بیان mRNA *Oct4-B1* در هر دو سلول طبیعی در مقایسه با نمونه‌های تیمار نشده به‌طور قابل توجهی افزایش یافت. در سلول‌های HSFPI3 بیان mRNA نانوکورکومین پس از این تیمار افزایش یافت. پس از تیمار سلول‌های MDA-MB231 با DNC، میزان بیان ژن‌های *Oct4-B1* و *Nanog* به ترتیب به‌طور میانگین ۰/۷ و ۰/۵۴ کاهش یافت.

نتیجه‌گیری: سلول‌های غیر توموری در مقایسه با سلول‌های سرطانی به درمان کورکومین مقاوم تر هستند. این حداقل تا حدی به دلیل الگوی بیان متفاوت ژن‌ها در این سلول‌هاست. به نظر می‌رسد نشانگرهای پرتوانی شامل *Oct4-B1* و *Nanog* نقش مهمی در مقاومت این سلول‌های غیر توموری به کورکومین دارند.

واژه‌های کلیدی: سلول‌های بنیادی سرطانی، نشانگرهای پرتوانی، سلول‌های نرمال، *Nanog*

تاریخ ارسال: ۱۴۰۱/۱۰/۰۸

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۱/۰۷

* نویسنده مسئول:

sadeghma@modares.ac.ir

** نویسنده مسئول دوم:

Javidi@acecr.ac.ir

مقدمه

نظریه سلول‌های بنیادی سرطانی (CSCs) همچنان بحث برانگیز بوده و از زمان ارائه آن تاکنون در حال توسعه است (۳-۱). در این تئوری، پیشنهاد می‌شود که برخی از ویژگی‌های مهم تومورها مربوط به زیرجمعیت‌های خاص CSCها در تومور است که نام‌های متفاوتی دارند. به دلیل توانایی آنها در خودنوسازی و در عین حال تولید رده‌های سلولی تمایز یافته، به آنها سلول‌های شروع کننده تومور (TICs) می‌گویند؛ به علاوه این سلول‌ها توانایی ایجاد تومورهای جدید پس از پیوند را نیز دارند و در عود مجدد تومور نقش اساسی ایفا می‌کنند (۴، ۵).

گزارشات بسیاری وجود دارد که حاکی از آن است که عود تومورها و مقاومت دارویی قابل توجهی که پس از درمان مشاهده می‌شود، ممکن است ناشی از TICها باشد. مکانیسم‌های مختلفی برای این مقاومت دارویی پیشنهاد شده است، از جمله بیان بیش از حد ژن‌های MDR (ژن‌های ایجاد کننده مقاومت به چند دارو) در این سلول‌ها. علاوه بر ژن‌های MDR، مکانیسم‌های دیگری نیز برای این امر پیشنهاد شده اند که از مهمترین آنها می‌توان به الگوی خاص بیان ژن در این سلول‌ها، به ویژه نشانگر غیر سطحی *Oct4* در TICها (۶، ۷) اشاره کرد. *Oct4* متعلق به خانواده فاکتورهای رونویسی POU (Pit-Oct-Unc) است که بیان ژن‌های هدف خود را با اتصال به توالی DNA حفظ شده اکتامری AGTCAAAT تنظیم می‌کند. تاکنون به روشنی نشان داده نشده است که چه سیگنال‌هایی مسئول الیگومریزاسیون و عملکرد بعدی *Oct4* هستند. با این حال، مشخص شده است که بیان این ژن ویژگی‌های اصلی از جمله خود نوسازی، تبدیل اپیتلیال به مزانشیمی (EMT) و مقاومت دارویی را به TICها می‌دهد. همراه با *Oct4*، *Sox2* و *Nanog* دیگر نشانگرهای سلول‌های بنیادی هستند که در حفظ پرتوانی در سلول‌های بنیادی اهمیت به سزایی دارند (۸).

همانطور که می‌دانیم سرطان‌ها به عنوان تکثیر کنترل نشده تعریف می‌شوند، به همین خاطر هدف قرار دادن

مسیرهای تکثیر اخیراً به عنوان یک رویکرد جدید برای مبارزه با سلول‌های بدخیم پیشنهاد شده است (۹). با این حال، مسیرهای تکثیر طبیعی باید از این اثرات درمانی دور بماند. در دهه‌های گذشته، دانشمندان توجه ویژه‌ای به عصاره‌های گیاهی برای تیمار سلول‌های سرطانی داشته اند، یکی از دلایل این امر جذب ترجیحی این عصاره‌ها توسط سلول‌های سرطانی نسبت به سلول‌های غیرتوموری است (۱۰-۱۴). کورکومین، یک پلی فنول استخراج شده از ریزوم گیاه *Curcuma longa* با خواص ضدسرطانی تأیید شده است (۱۲، ۱۵-۱۷). جذب ترجیحی آن به سلول‌های سرطانی در کنار ویژگی پلیوتروپیک کورکومین برای هدف قرار دادن مسیرهای سیگنال دهی متعدد، آن را به عنوان یک عامل ضد سرطانی قوی معرفی کرده است (۱۸، ۱۹). اگرچه، هنوز داده‌های بسیار کمی برای توضیح اینکه چرا کورکومین اثر سیتوتوکسیک به ویژه در سلول‌های سرطانی اعمال می‌کند وجود دارد (۲۰، ۲۱)، به نظر می‌رسد ترکیب پروتئین غشایی متفاوت بین سلول‌های سرطانی و غیر توموری نقش مهمی در این مورد ایفا می‌کند (۲۰). محتوای گلوتاتیون (GSH) سلول‌ها نیز پارامتر دیگری است که بر حساسیت سلول‌ها به کورکومین تأثیر می‌گذارد (۲۱). در میان انواع مختلف واریانت‌های *Oct4*، *Oct4-B1* به عنوان گونه جدیدی پیشنهاد شده است که ممکن است نقش مهمی در خواص بنیادی برخی از انواع سلول‌های سرطانی داشته باشد (۲۲). از آنجایی که ژن‌های *Oct4*، *Sox2* و *Nanog* به طور معمول در سلول‌های بنیادی بیان می‌شوند، ما فرض کردیم ممکن است این پاسخ‌های متفاوت بین سلول‌های مختلف ناشی از الگوی بیان متفاوت ژن‌های مذکور، پس از تیمار با کورکومین باشد. بنابراین، هدف اصلی مطالعه حاضر ارزیابی بیان ژن‌های *Oct4-B1* و *Nanog* در سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از مغز استخوان، رده سلولی فیروبلاست و سلول سرطانی سه‌گانه منفی MDA-MB231 پس از تیمار با نانوکورکومین دندروزومی (DNC) است.

مواد و روش‌ها

تهیه نانو کورکومین دندروزومی (DNC)

نانو کورکومین دندروزومی در آزمایشگاه ما بر اساس پروتکل بهینه شده (۲۴، ۲۵، ۲۶) سنتز شد و تا زمان استفاده در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد و به دور از نور قرار داده شد. برای انجام تست‌های مختلف آزمایشگاهی، این ترکیب در محیط کشت کامل رقیق شد.

لاین‌های سلولی و شرایط کشت

سلول‌های بنیادی مشتق شده از مغز استخوان انسان (hBMSC) و سلول‌های فیبروبلاست انسانی غیر توموری (HFSF-PI3) و سلول‌های سرطانی MDA-MB231 از بانک سلول ملی انستیتو پاستور، تهران، ایران خریداری شدند. این سلول‌ها در محیط کشت کامل شامل محیط کشت DMEM غنی شده با ۱۰٪ سرم جنین گاو (FBS)، و ۱٪ آنتی بیوتیک‌ها (پنی‌سیلین و استرپتومایسین) (تمامی مواد ذکر شده از شرکت (Life Technologies, CA, USA) تهیه شدند) کشت داده شدند. تمام سلول‌ها در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد ۵ درصد CO₂ رشد داده شدند. پس از آنکه میزان تراکم سلول‌ها به ۸۰٪ رسید، سلول‌ها پاساژ داده می‌شدند. محیط کشت رویی سلول‌ها هر ۳ روز یکبار با محیط کشت کامل تازه جایگزین می‌شد. کلیه تست‌های انجام شده با رعایت اصول اخلاقی و حرفه‌ای کار با سلول‌های سرطانی و لاین‌های سلولی و زیر نظر آزمایشگاه سلولی و مولکولی دانشگاه تربیت مدرس و پژوهشکده سرطان معتمد به انجام رسیده‌اند.

تیمار سلول‌ها با DNC

در مطالعات گذشته حساسیت سلول‌های سرطانی و سلول‌های مزانشیمی به DNC را با استفاده از روش MTT مورد بررسی قرار دادیم. نتایج کسب شده نشان دادند در غلظت ۱۷٫۵ میکرومولار از DNC، مرگ قابل توجهی در سلول‌های سرطانی رخ داد در حالی که هیچ اثر این غلظت تأثیر مضر به سلول‌های غیرتوموری مرتبط نداشت (۲۵). با توجه به این داده‌ها و با توجه به هدف مطالعه،

سلول‌های hBMSC و HFSF-PI3 را با غلظت ضد سرطانی (۱۷/۵ میکرومولار) به مدت ۲۴ و ۳۶ ساعت مورد تیمار با DNC قرار گرفتند. پس از انجام تست‌های مربوط به آپوپتوز، سلول‌های تیمار شده با این غلظت در زمان ۳۶ ساعت جهت بررسی میزان تغییر در بیان ژن‌ها مورد بررسی قرار گرفتند. قبل از آنالیز ژنتیکی تحت درمان قرار دادیم (در این مطالعه برای تأیید بیشتر اینکه در دوز ذکر شده، DNC به طور قابل توجهی باعث مرگ سلولی در این سلول‌ها نمی‌شود، رنگ‌آمیزی تریپان بلو و شمارش سلولی نیز انجام شد) (نانوی بدون بار در گروه‌های کنترل استفاده شد).

سنجش آپوپتوز

تشخیص آپوپتوز توسط کیت رنگ آمیزی Annexin-V-FLUOS و PI (Roche Applied Science، آلمان) طبق دستورالعمل شرکت سازنده انجام شد. به طور خلاصه، 1.5×10^6 سلول در هر چاهک از پلیت‌های شش خانه قرار داده شدند؛ پس از یک روز با ۱۷/۵ میکرومولار DNC به مدت ۲۴ و ۳۶ ساعت تیمار شدند. سلول‌ها تریپسین شدند و به مدت ۵ دقیقه در ۱۲۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شدند. این سلول‌ها (حداقل 2×10^6 سلول) دقیقاً به همان روشی که در دستورالعمل کیت ذکر شده تهیه شده و سپس توسط فلوسایتومتر FACSCalibur مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند.

واکنش Real-time polymerase chain reaction

(Real-time PCR)

RNA تام سلول توسط TRIZol (Life Technologies) پس از ۳۶ ساعت تیمار با ۱۷/۵ μM از DNC استخراج شد. سپس این RNA تام قبل از سنتز cDNA با استفاده از DNase I (Thermo Fisher Scientific USA) تیمار شد. DNA مکمل با کمک کیت PrimeScript™ RT (Takara Bio Inc، ژاپن) و با استفاده از ۱ میکروگرم RNA از هر نمونه سنتز شد.

برای انجام واکنش Real-time PCR از کیت SYBR®

تحلیل آماری

تمام آزمایش‌ها حداقل در سه تکرار انجام شد. برای تجزیه و تحلیل آماری نرم‌افزار 8 GraphPad Prism[®] و آزمون t-test مورد استفاده قرار گرفت. در صورتی که تفاوت بین گروه‌ها دارای $p\text{ value} < 0.05$ بود، این تفاوت از نظر آماری معنی‌دار گزارش شده است.

یافته‌ها

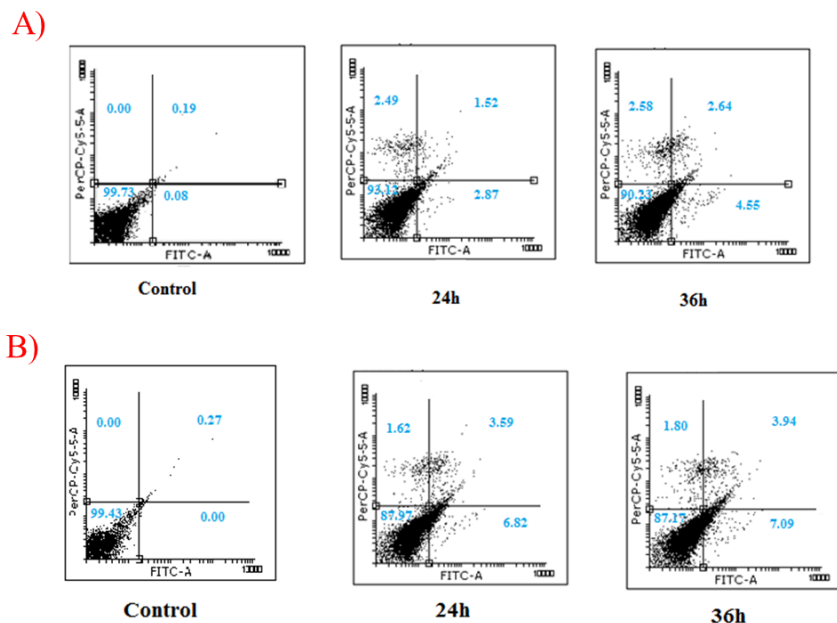
القای آپوپتوز و مرگ سلولی در سلول‌های غیرتوموری توسط DNC

برای تعیین اینکه آیا DNC باعث القای آپوپتوز در سلول‌های غیرتوموری می‌شود، هر دو سلول hBMSC و HSFPI3 به مدت ۲۴ و ۳۶ ساعت با DNC تیمار شدند. همانطور که در شکل ۱ نشان داده شده است، در مقایسه با سلول‌های تیمار نشده، هیچ تغییر قابل توجهی در مرگ سلولی پس از تیمار با DNC در hBMSC یا HSFPI3 مشاهده نشد ($p\text{ value} > 0.05$). در hBMSC، درصد آپوپتوز

Premix Ex Taq[™] II (Takara) و پرایمرهای اختصاصی برای *Nanog* و *Oct4-B1* استفاده شد (جدول ۱). میزان بیان نسبی با استفاده از فرمول $2^{-\Delta\Delta Ct}$ محاسبه شد و از *GAPDH* به عنوان کنترل داخلی استفاده شد. واکنش real-time PCR با کمک برنامه زیر انجام شد: Holding Stage: 95 °C/30s; Cycling Stage: denaturing step: 95°C/5s, followed by annealing/extension step 60 °C/35s (Number of Cycles: 40). Melt curve analysis stage.

جدول ۱: توالی پرایمرهای اختصاصی مورد استفاده برای انجام واکنش real-time PCR (*GAPDH*) به عنوان کنترل داخلی مورد استفاده قرار گرفت).

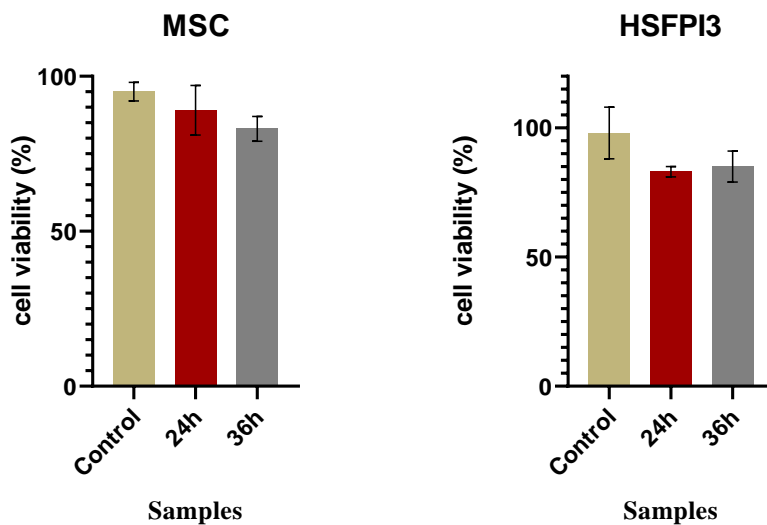
Gene	Sequences
<i>OCT4-B1</i>	F: GGTTCTATTTGGTGGGTTCC R: TTCTCCCTCTCCCTACTCCTC
<i>Nanog</i>	F: AATACCTCAGCCTCCAGCAGATG R: TCGGTCACACCATTGCTATTCTTC
<i>Gapdh</i>	F: GTGAACCATGAGAAGTATGACAAC R: CATGAGTCCTTCCACGATACC



شکل ۱- تست Annexin-V-FLUOS/propidium iodide جهت ارزیابی میزان القای آپوپتوز در hBM-MSCs پس از ۲۴ و ۳۶ ساعت تیمار با DNC. سلول‌های زنده (Annexin-V-/PI-)، آپوپتوز زود هنگام (Annexin-V+/PI-)، آپوپتوز دیر هنگام (Annexin-V+/PI+)، و نکروز (Annexin-V-/PI+) اعداد هر چارک نشان دهنده درصد سلول‌های آن هستند. (A) نتایج مربوط به این تست در سلول‌های hBM-MSCs، نشان داد که پس از تیمار این سلول‌ها با DNC به مدت ۲۴ و ۳۶ ساعت به طور میانگین به ترتیب ۴۹٪ و ۱۹٪ آپوپتوز در این سلول‌ها القا شد. (B) نتایج مربوط به تست در سلول‌های HSFPI3 نشان دادند میزان القای آپوپتوز در این سلول‌ها پس از ۲۴ و ۳۶ ساعت تیمار با DNC به ترتیب ۴۱٪ و ۱۱٪ محاسبه شد.

پس از ۲۴ ساعت، مرگ سلولی قابل توجهی در سلول‌های تیمار شده رخ نمی‌دهد. در این سلول‌ها حدود ۱۰ درصد مرگ سلولی (حدود ۹۰ درصد سلول‌های زنده) رخ داد که از نظر آماری این اختلاف در مقایسه با سلول‌های تیمار نشده معنی‌دار نبود. تیمار این سلول‌ها با غلظت ذکر شده DNC پس از ۳۶ ساعت منجر به مرگ سلولی حدود ۱۵٪ (~۸۵٪ سلول‌های زنده) شد (شکل ۲).

پس از ۲۴ و ۳۶ ساعت پس از تیمار با $17/5 \mu\text{M}$ از DNC به ترتیب ۴۹٪/۷ و ۱۹٪/۷ بود. تیمار سلول‌های HSFPI3 با همان غلظت DNC، حدود ۴۱٪/۱۰ درصد پس از ۲۴ ساعت و ۳٪/۱۱ درصد پس از ۳۶ ساعت القا شد (شکل ۱). همانطور که در شکل ۲ می‌بینیم، نتایج تریپان بلو نشان داد که پس از تیمار hBMSC با $17/5 \mu\text{M}$ میکرومولار DNC

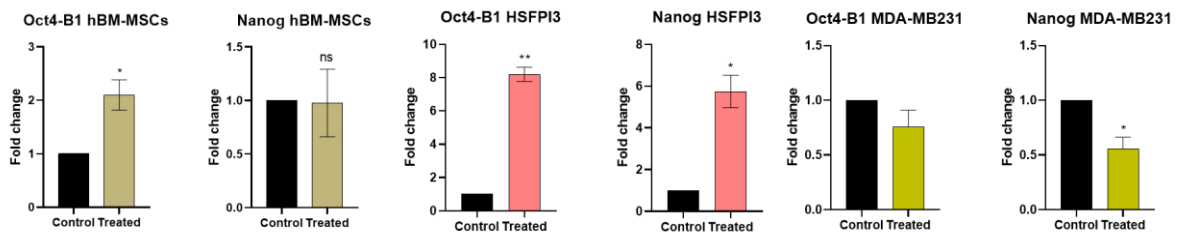


شکل ۲- نتایج تست تریپان بلو. تیمار سلول‌های hM-MSCs با غلظت $17/5 \mu\text{M}$ میکرومولار از DNC پس از ۲۴ و ۳۶ ساعت به ترتیب ۱۰٪ و ۱۵٪ مرگ سلولی در این سلول‌ها القا کرد؛ در صورتی که، تفاوت آن با سلول‌های کنترل تیمار نشده معنی‌دار نبود (سمت چپ). نتایج تست تریپان بلو برای تیمار سلول‌های HSFPI3 با غلظت $17/5 \mu\text{M}$ میکرومولار از DNC نیز تفاوت معنی‌داری در القای مرگ نسبت به گروه کنترل در زمان‌های ۲۴ و ۳۶ ساعت ایجاد نکرد (میزان مرگ سلولی القا شده در این سلول‌ها به ترتیب ۱۷٪ و ۱۵٪ محاسبه شد).

OCT4B1 می‌شود. پس از ۳۶ ساعت پس از تیمار با DNC، *OCT4B1* در مقایسه با سلول‌های نرمال تیمار نشده ۱۹٪ برابر افزایش یافت. از سوی دیگر، پس از این تیمار، سطح mRNA نانوغ در مقایسه با گروه تیمار نشده/کنترل از نظر آماری معنی‌دار نبود (شکل ۳). مشابه hBMSC، *OCT4B1* در سلول‌های HSFPI3 پس از تیمار با DNC افزایش بیان پیدا کرد. با این حال، بر خلاف hBMSC، پس از این تیمار در HSFPI3 سطح بیان mRNA نانوغ افزایش یافت. همان‌طور که در شکل ۵ نشان داده شده است، *OCT4B1* و *Nanog* به ترتیب تقریباً ۷۳٪ و ۵۲٪ برابر پس از درمان ۳۶ ساعت افزایش یافتند (شکل ۳).

برای سلول‌های HSFPI3 نیز سنجش تریپان بلو در ۲۴ ساعت و ۳۶ ساعت پس از تیمار با $17/5 \mu\text{M}$ میکرومولار DNC انجام شد. در این سلول‌ها پس از ۲۴ ساعت تیمار، حدود ۱۷ درصد مرگ سلولی و پس از ۳۶ ساعت درمان، حدود ۱۵ درصد مرگ سلولی رخ داد (به ترتیب ۸۳ درصد و ۸۵ درصد سلول‌های زنده) (شکل ۲).

تیمار با DNC، *OCT4B1* و *Nanog* را در hBMSC، HSFPI3 و MDA-MB231 تنظیم می‌کند
 نتایج real-time PCR آشکار کرد که تیمار hBMSCs با $17/5 \mu\text{M}$ از DNC باعث افزایش بیان mRNA



شکل ۳- نتایج تست *real-time PCR* جهت بررسی میزان بیان *mRNA* ژنهای *Oct4-B1* و *Nanog* در *hBM-MSCs*، *HSFPI3* و *MDA-MB231*. پس از ۳۶ ساعت تیمار با DNC، میزان بیان *mRNA* *Oct4-B1* در سلول‌های *hBM-MSCs* و *HSFPI3* افزایش یافت؛ در حالی که، پس از این تیمار میزان بیان *mRNA* *Nanog* در سلول‌های *hBM-MSCs* تفاوت معنی‌داری نسبت به گروه کنترل پیدا نکرد ($p \text{ value} = 0.9274$). پس از ۳۶ ساعت تیمار سلول‌های *HSFPI3* با DNC، میزان بیان *Nanog* افزایش بیان معنی‌داری نسبت به گروه کنترل پیدا کرد. در مورد سلول‌های *MDA-MB231* پس از تیمار سلول‌ها با DNC، میزان بیان *mRNA* هر دو ژن کاهش پیدا کرد (کاهش *Oct4-B1* در مقایسه کنترل معنی‌دار نبود؛ در صورتی که، کاهش *Nanog* از لحاظ آماری معنی‌دار بود ($p \text{ value} = 0.026$)).

وجود دارد که توسط آن سلول‌های غیرتوموری چنین مقاومتی در برابر کورکومین به دست می‌آورند.

طهماسبی و همکاران نشان داد که کورکومین با فعال کردن miR-145 میزان بیان *OCT4B1*، *SOX-2* و *Nanog* را (۲۵) در سلول‌های سرطانی کاهش می‌دهد. از آنجایی که نقش این ژن‌ها به عنوان عوامل ضد آپوپتوز قبلاً بررسی شده است (۲۳، ۳۰، ۳۱)، در مطالعه حاضر نیز این امر در سلول‌های سرطانی *MDA-MB231* مجدداً مورد بررسی قرار گرفت که نتایج به دست آمده با مطالعات قبلی همخوانی داشت. ما این ژن‌ها را به عنوان عوامل احتمالی این تعارض در نظر گرفتیم. برای پاسخ به این سوال، سلول‌های بنیادی طبیعی با غلظت ضدسرطانی کورکومین دندروزومی تحت تیمار قرار گرفتند و چگونگی تغییر بیان برخی از ژن‌های پرتوانی را بررسی کردند. از سوی دیگر، ما فرض کردیم که کورکومین دندروزومی ممکن است به عنوان یک استرس برای سلول‌های غیرتوموری احساس شود. استرس‌ها معمولاً آپوپتوز را در سلول‌ها القا می‌کنند. بنابراین، ما میزان آپوپتوز ناشی از کورکومین را در سلول‌های غیرتوموری در غلظتی موثر برای سلول‌های سرطانی ارزیابی کردیم. در یک سنجش وابسته به زمان، مشخص شد که القای آپوپتوز در سلول‌های بنیادی مزانشیمی *hBM-MSC* و *HSFPI3*

تیمار سلول‌های سرطانی *MDA-MB231* با غلظت ۱۷/۵ میکرومولار از DNC باعث کاهش بیان *mRNA* مربوط به ژن‌های *OCT4B1* و *Nanog* شد. به‌طور میانگین این کاهش بیان به ترتیب ۰/۷ و ۰/۵۴ به دست آمد (شکل ۳).

بحث

کورکومین دندروزومی یک نانوفرمولاسیون جدید کورکومین برای بهبود اثر ضد سرطانی آن است (۲۴). کورکومین در چنین آماده سازی به طور موثر سلول‌های سرطانی گلیوبلاستوما (۲۵)، کولون (۲۷)، پستان (۲۸) و فیبروسارکوم (۲۶) را سرکوب می‌کند. علیزاده و همکاران (۲۹) نشان داد که دندروزوم به تنهایی حتی با دوز ۳۱ میلی‌گرم بر کیلوگرم در موش بی‌خطر است. تحقیقات ما نشان دادند که کورکومین در غلظت موثر برای سلول‌های سرطانی، هیچ اثر مضر بر سلول‌های غیرتوموری ندارد و مرگ سلولی فقط در غلظت‌های بالاتر رخ می‌دهد (در سلول غیرتوموری میزان LD50 به طور میانگین ۳۰ میکرومولار بود در حالی که برای سلول‌های سرطانی، این مقدار بسیار کمتر است) (۲۴، ۲۵). علاوه بر این، داده‌های میکروسکوپ فلورسنت نشان داد که کورکومین مانند سلول‌های سرطانی می‌تواند وارد سلول‌های غیرتوموری شود. این نشان می‌دهد که شاید یک مکانیسم مولکولی

سلول‌های زایای اولیه مهاجر موش می‌شود (۳۸). زو و همکاران نشان دادند که کاهش *OCT4* و *Nanog* از پرتوانی سلول‌های سرطانی پانکراس جلوگیری می‌کند (۳۹). علاوه بر این، Hjelmeland و همکاران (۴۰) نشان داد که استرس اسیدی بیان mRNAهای *Nanog* و *OCT4* را در سلول‌های بنیادی سرطان گلیوما افزایش می‌دهد. به نظر می‌رسد که افزایش *Nanog* در استرس هیپوکسی نقش دارد و از بین بردن *Nanog* در سلول‌های تومور هیپوکسیک مقاومت تومور را در برابر کشتن وابسته به CTL کاهش می‌دهد (۴۱).

در مطالعه‌ای که توسط Igor Matic و همکاران انجام شد، آنها نشان دادند که سطح بیان *OCT4* و *Sox2* در سلول‌های سرطانی مانند A1235 (یک رده سلولی گلیوبلاستوما) و HepG2 (رده سلولی سرطان کبد) بسیار بالاتر است (۴۲). در اینجا برای اولین بار نشان دادیم که پس از درمان سلول‌های غیر توموری با کورکومین، سطح بیان mRNA *OCT4-B1* و *Nanog* در این سلول‌ها افزایش می‌یابد. همان‌طور که در بالا توضیح داده شد، این ژن‌ها در فرآیندهای فیزیولوژیکی از جمله پرتوانی و خودنوسازی در سرطان و همچنین سلول‌های غیر توموری نقش مهمی ایفا می‌کنند. در این مطالعه تغییر بیان دو ژن اساسی مربوط به پرتوانی و خونوسازی مورد بررسی قرار گرفته‌اند، می‌توان سایر ژن‌های اساسی مربوط به این مسیرها را نیز مورد بررسی قرار داد. جهت تأیید نتایج به دست آمده، می‌توان مطالعه حاضر با ناک داون یا ناک اوت ژن‌های ذکر شده نیز مورد ارزیابی قرار داد.

نتیجه‌گیری

نتایج مطالعه حاضر نشان می‌دهد که پس از تیمار hBM- MSCs (به عنوان یک سلول بنیادی طبیعی) با غلظت سمی کورکومین برای سلول‌های سرطانی، باعث افزایش بیان ژن‌های *OCT4-B1* و *Nanog* می‌شود. با توجه به این افزایش بیان، همراه با خواص ضد توموری مفید

حتی ۳۶ ساعت پس از تیمار با ۱۷/۵ میکرومولار کورکومین بسیار کم است، در حالی که مطالعه قبلی ما نشان داد که سلول‌های سرطانی به‌طور قابل‌توجهی دچار مرگ برنامه‌ریزی‌شده سلولی در این زمان و غلظت می‌شدند (۱۲، ۱۷، ۲۴).

جالب توجه است، برخلاف سلول‌های سرطانی، میزان بیان mRNA *OCT4B1* در پاسخ به تیمار با ۱۷/۵ میکرومولار کورکومین به میزان قابل‌توجهی در سلول‌های فیبروبلاست و سلول‌های بنیادی افزایش یافت. این مشاهدات نشان می‌دهد که *OCT4B1* ممکن است در این پاسخ مقاومت نقش داشته باشد. فراشاهی و همکاران تأیید کرده‌اند که *OCT4B1* در پاسخ حرارتی و استرس ژنوتوکسیک و مقاومت در برابر آپوپتوز نقش دارد. میزان افزایش آپوپتوز نیز در سلول‌های سرطانی AGS تحت درمان با *OCT4B1*-siRNA مشاهده شده است؛ این امر نشان دهنده تأثیر آن در تنظیم آپوپتوز در سرطان معده است (۳۲). وانگ و همکاران نشان دادند که بیان *OCT4B-190* (ایزوفرم دیگری از پروتئین این ژن) در طول شوک حرارتی و استرس اکسیداتیو در یک ترجمه با واسطه (IRES) internal ribosome entry site توالی‌هایی در RNA هستند که در ترجمه مستقل از کلاهدک نقش دارند) بسیار تنظیم می‌شود (۳۳، ۳۴). علی‌رغم ترجمه متعارف کلاهدک، IRESها معمولاً در طول تکوین، استرس یا بیماری در برخی از ژن‌های یوکاریوتی از جمله *c-myc*، *Bip* یا *VEGF* استفاده می‌شوند (۳۵، ۳۶). به طور مشابه، گزارش شده است که *OCT4B-265* در ES و EC در طول شرایط ژنوتوکسیک تنظیم شده است و P53 به طور فعال در این پاسخ دخالت دارد (۳۷).

علاوه بر *OCT4B1*، در سلول‌های فیبروبلاست، نشانگر سلول‌های بنیادی *Nanog* نیز به‌طور قابل‌توجهی در غلظت موثر DNC تنظیم شد. این یافته ممکن است از دخالت *Nanog* در پاسخ‌های استرس پشتیبانی کند. شواهد کمی وجود دارد که نقش ضد آپوپتوزی *Nanog* را نشان می‌دهد. سرکوب این ژن باعث افزایش آپوپتوز در

opinion in cell biology. 2004;16(6):708-712.

10. Gamasae NA, Radmansouri M, Ghiasvand S, Shahriari F, Marzouni HZ, Aryan H, et al., Hypericin Induces Apoptosis in MDA-MB-175-VII Cells in Lower Dose Compared to MDA-MB-231. Arch Iran Med. 2018;21(9):387-92.
11. Hosseini MM, Karimi A, Behroozaghdam M, Javidi MA, Ghiasvand S, Bereimipour A, et al., Cytotoxic and Apoptogenic Effects of Cyanidin-3-Glucoside on the Glioblastoma Cell Line. World Neurosurg. 2017;108: 94-100.
12. Javidi MA, Kaeidi A, Farsani SS, Babashah S, Sadeghizadeh M. Investigating curcumin potential for diabetes cell therapy, in vitro and in vivo study. Life Sci. 2019;239: p. 116908.
13. Mirmalek SA, Azizi MA, Jangholi E, Yadollah-Damavandi S, Javidi MA, Parsa Y, et al., Cytotoxic and apoptogenic effect of hypericin, the bioactive component of Hypericum perforatum on the MCF-7 human breast cancer cell line. Cancer Cell Int. 2015; 16: p. 3.
14. Mirmalek SA, Jangholi E, Jafari M, Yadollah-Damavandi S, Javidi MA, Parsa Y, et al., Comparison of in Vitro Cytotoxicity and Apoptogenic Activity of Magnesium Chloride and Cisplatin as Conventional Chemotherapeutic Agents in the MCF-7 Cell Line. Asian Pac J Cancer Prev. 2016;17(S3):131-4.
15. Goel A, Kunnumakkara AB, Aggarwal BB. Curcumin as "Curecumin": from kitchen to clinic. *Biochem Pharmacol.* 2008;75(4): 787-809.
16. Anand P, Sundaram C, Jhurani S, Kunnumakkara AB, Aggarwal BB. Curcumin and cancer: an "old-age" disease with an "age-old" solution. Cancer letters. 2008;267(1):133-64.
17. 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.
18. Kunwar A, Barik A, Mishra B, Rathinasamy K, Pandey R, Priyadarsini KI. Quantitative cellular uptake, localization and cytotoxicity of curcumin in normal and tumor cells. *Biochimica et Biophysica Acta*

کورکومین، پتانسیل احتمالی آن در کنار توسعه TICها
نباید نادیده گرفته شود.

تعارض منافع

هیچگونه تعارض منافی در پژوهش حاضر وجود ندارند.

References

1. Hung KF, Yang T, Kao SY. Cancer stem cell theory: Are we moving past the mist? J Chin Med Assoc. 2019; 82(11):814-8.
2. Niculescu, V.F. The reproductive life cycle of cancer: Hypotheses of cell of origin, TP53 drivers and stem cell conversions in the light of the atavistic cancer cell theory. Med Hypotheses. 2019;123:19-23.
3. Biava PM, Burigana F, Germano R, Kurian P, Verze gnassi C, Vitiello G. Stem Cell Differentiation Stage Factors and their Role in Triggering Symmetry Breaking Processes during Cancer Development: A Quantum Field Theory Model for Reprogramming Cancer Cells to Healthy Phenotypes. Curr Med Chem. 2019;26(6): 988-1001.
4. Kreso, A. and J.E. Dick, Evolution of the cancer stem cell model. Cell Stem Cell. 2014;14(3): 275-91.
5. Cabezas-Wallscheid N, Eichwald V, de Graaf J, Löwer M, Lehr HA, Kreft A, et al., Instruction of haematopoietic lineage choices, evolution of transcriptional landscapes and cancer stem cell hierarchies derived from an AML1-ETO mouse model. EMBO Mol Med. 2013; 5(12): 1804-20.
6. Liu, A., X. Yu, and S. Liu, Pluripotency transcription factors and cancer stem cells: small genes make a big difference. Chin J Cancer. 2013; 32(9): 483-7.
7. Prud'homme, G.J., Cancer stem cells and novel targets for antitumor strategies. Curr Pharm Des. 2012; 18(19): 2838-49.
8. Amini S, Fathi F, Mobalegi J, Sofimajidpour H, Ghadimi T. The expressions of stem cell markers: Oct4, Nanog, Sox2, nucleostemin, Bmi, Zfx, Tcl1, Tbx3, Dppa4, and Esrrb in bladder, colon, and prostate cancer, and certain cancer cell lines. Anat Cell Biol. 2014; 47(1):1-11.
9. Jordan, C.T., Cancer stem cell biology: from leukemia to solid tumors. Current

- Dendrosomal Nano curcumin on 4T1 Metastatic Model of Breast Cancer. 2014.
29. Alizadeh AM, Sadeghizadeh M, Najafi F, Ardestani SK, Erfani-Moghadam V, Khaniki M, Encapsulation of curcumin in diblock copolymer micelles for cancer therapy. *Biomed Res Int*. 2015;824746.
 30. Jia X, Li X, Xu Y, Zhang S, Mou W, Liu Y, et al., SOX2 promotes tumorigenesis and increases the anti-apoptotic property of human prostate cancer cell. *Journal of molecular cell biology*. 2011;3(4):230-8.
 31. Atlasi Y, Mowla SJ, Ziaee SA, Gokhale PJ, Andrews PW. OCT4 spliced variants are differentially expressed in human pluripotent and nonpluripotent cells. *Stem Cells*. 2008;26(12):3068-74.
 32. Farashahi Yazd E, Rafiee MR, Soleimani M, Tavallaei M, Salmani MK, Mowla SJ. OCT4B1, a novel spliced variant of OCT4, generates a stable truncated protein with a potential role in stress response. *Cancer Lett*. 2011;309(2):170-5.
 33. Wang X, Zhao Y, Xiao Z, Chen B, Wei Z, Wang B, et al., Alternative translation of OCT4 by an internal ribosome entry site and its novel function in stress response. *Stem Cells*. 2009; 27(6):1265-75.
 34. Gao Y, Wang X, Han J, Xiao Z, Chen B, Su G, Dai J. The novel OCT4 spliced variant OCT4B1 can generate three protein isoforms by alternative splicing into OCT4B. *Journal of Genetics and Genomics*. 2010;37(7):461-5.
 35. Fitzgerald, K.D. and B.L. Semler, Bridging IRES elements in mRNAs to the eukaryotic translation apparatus. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Regulatory Mechanisms*. 2009;1789(9):518-28.
 36. Hellen CU, Sarnow P. Internal ribosome entry sites in eukaryotic mRNA molecules. *Genes & development*. 2001;15(13):1593-1612.
 37. Gao Y, Wei J, Han J, Wang X, Su G, Zhao Y, et al., The Novel Function of OCT4B Isoform-265 in Genotoxic Stress. *Stem Cells*. 2012;30(4):665-72.
 38. Yamaguchi S, Kurimoto K, Yabuta Y, Sasaki H, Nakatsuji N, Saitou M, et al., Conditional knockdown of Nanog induces apoptotic cell death in mouse migrating primordial germ cells. *Development*. 2009; 136(23):4011-20.
 39. Lu Y, Zhu H, Shan H, Lu J, Chang X, Li X, et al., Knockdown of Oct4 and Nanog (BBA)-General Subjects. 2008; 1780(4): 673-9.
 19. Thangapazham RL, Sharma A, Maheshwari RK. Multiple molecular targets in cancer chemoprevention by curcumin. *AAPS J*. 2006;8(3):E443-E449.
 20. Khafif A, Schantz SP, Chou TC, Edelstein D, Sacks PG. Quantitation of chemopreventive synergism between (-)-epigallocatechin-3-gallate and curcumin in normal, premalignant and malignant human oral epithelial cells. *Carcinogenesis*. 1998; 19(3): 419-24.
 21. Syng-Ai C, Kumari AL, Khar A., Effect of curcumin on normal and tumor cells: role of glutathione and bcl-2. *Molecular Cancer Therapeutics*. 2004;3(9): p.1101-8.
 22. Hongbao M, Young M. The octamer-binding transcription factor 4 (OCT4) and cancer literatures. *Cancer Biology*. 2014;4(3): 56-65.
 23. Asadi MH, Mowla SJ, Fathi F, Aleyasin A, Asadzadeh J, Atlasi Y. OCT4B1, a novel spliced variant of OCT4, is highly expressed in gastric cancer and acts as an antiapoptotic factor. *International journal of cancer*. 2011; 128(11): 2645-52.
 24. Tahmasebi BM, Erfani MV, Babaei E, Najafi F, Zamani M, Shariati M, et al., Dendrosomal nano-curcumin; The novel formulation to improve the anticancer properties of curcumin. *Progress in Biological Sciences*. 2015;5(2):143-58.
 25. Tahmasebi Mirgani M, Isacchi B, Sadeghizadeh M, Marra F, Bilia AR, Mowla SJ, et al., Dendrosomal curcumin nanoformulation downregulates pluripotency genes via miR-145 activation in U87MG glioblastoma cells. *International journal of nanomedicine*. 2014;9:403-17.
 26. Babaei E, Sadeghizadeh M, Hassan ZM, Feizi MA, Najafi F, Hashemi SM. Dendrosomal curcumin significantly suppresses cancer cell proliferation in vitro and in vivo. *International immunopharmacology*. 2012; 12(1):226-34.
 27. Alizadeh AM, Khaniki M, Azizian S, Mohagheghi MA, Sadeghizadeh M, Najafi F. Chemoprevention of azoxymethane-initiated colon cancer in rat by using a novel polymeric nanocarrier-curcumin. *European journal of pharmacology*. 2012; 689(1): 226-32.
 28. Farhangi B, Esmat Abadi MJ, Soleimani N, Salehi Z. The Survey of Cytotoxic Effect of

- expression inhibits the stemness of pancreatic cancer cells. *Cancer letters*, 2013. 340(1): 113-23.
40. Hjelmeland AB, Wu Q, Heddleston JM, Choudhary GS, MacSwords J, Lathia JD, et al., Acidic stress promotes a glioma stem cell phenotype. *Cell Death & Differentiation*. 2011;18(5): 829-40.
41. Hasmim M, Noman MZ, Lauriol J, Benlalam H, Mallavialle A, Rosselli F, et al., Hypoxia-dependent inhibition of tumor cell susceptibility to CTL-mediated lysis involves NANOG induction in target cells. *The Journal of Immunology*, 2011. 187(8): 4031-39.
42. Matic I, Antunovic M, Brkic S, Josipovic P, Mihalic KC, Karlak I, et al., Expression of OCT-4 and SOX-2 in Bone Marrow-Derived Human Mesenchymal Stem Cells during Osteogenic Differentiation. *Open Access Maced J Med Sci*. 2016;4(1):9-16.