

تأثیر کورکومین بر وضعیت استرس اکسیداتیو در رده سلولی HepG2 سرطان کبد انسان

محدثه پوریانی^۱، فاطمه زهرا قوامی فر^۱، نسرين ضيامجیدی^۲، مریم صالح زاده^۳، رقيه عباسعلی پورکبیر^۲، مهدی بهمنی^{۲*}

^۱ کمیته تحقیقات و فناوری دانشجویی، دانشگاه علوم پزشکی همدان، همدان، ایران، ^۲ گروه بیوشیمی بالینی، دانشگاه علوم پزشکی همدان، همدان، ایران، ^۳ گروه ارتودنسی دانشکده دندان پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی همدان، همدان، ایران

تاریخ وصول: ۱۴۰۴/۰۴/۱۶ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۴/۰۷/۱۲

چکیده

زمینه و هدف: در سال‌های اخیر استفاده از ترکیبات طبیعی به عنوان یک حوزه تحقیقاتی برجسته در پیشگیری از سرطان شناخته شده است. این ترکیبات شامل طیف گسترده‌ای از اجزای فعال بیولوژیکی است که در میان آن‌ها، پتانسیل آنتی‌اکسیدانی کورکومین گزارش شده است. علی‌رغم مزایای بالقوه این ترکیب، نیاز به بررسی بیشتر در زمینه تأثیر آن بر استرس اکسیداتیو احساس می‌شود، بنابراین هدف از انجام این مطالعه تعیین و تأثیر کورکومین بر وضعیت استرس اکسیداتیو در رده سلولی HepG2 سرطان کبد انسان بود.

روش بررسی: در این مطالعه تجربی که در سال ۱۴۰۳-۱۴۰۴ انجام شد، ابتدا میزان زنده ماندن رده سلولی HepG2 پس از ۲۴ و ۴۸ ساعت انکوباسیون، تحت اثر غلظت‌های مختلف کورکومین (۱۰۰۰، ۵۰۰، ۲۵۰، ۱۲۵، ۶۲/۵، ۳۱/۲۵، ۱۵/۶، ۷/۸، ۳/۹ و صفر میکرومولار) به وسیله روش MTT ارزیابی شد. به منظور بررسی وضعیت استرس اکسیداتیو در رده سلولی مذکور، سطح ظرفیت آنتی‌اکسیدانی تام (TAC)، وضعیت‌اکسیدانی تام (TOS) و میزان مالون‌دی‌آلدهید (MDA) و همچنین فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی از جمله سوپراکسید دیسموتاز (SOD) و کاتالاز (CAT) به وسیله کیت‌های تجاری مبتنی بر رنگ سنجی تعیین شدند. داده‌های جمع‌آوری شده با استفاده از آزمون‌های آماری تحلیل واریانس، آزمون تعقیبی توکی و شاپیرو ویلک تجزیه و تحلیل شدند.

یافته‌ها: نتایج MTT نشان داد که کورکومین می‌تواند بقای سلول‌های HepG2 را به‌طور قابل توجهی کاهش دهد و IC50 برای این ترکیب غلظت ۳۱/۲۵ میکرومولار و زمان ۴۸ ساعت تعیین شد و دو غلظت کمتر و بیشتر از آن جهت انجام آزمایشات بعدی انتخاب شد. علاوه بر این، سطوح TOS در سلول‌های تیمار شده نسبت به سلول‌های کنترل کاهش ($p < 0/01$) و برای غلظت ۱۵/۶ و $p < 0/001$ برای غلظت‌های ۳۱/۲۵ و ۶۲/۵ میکرومولار و در مقابل، سطوح TAC به‌طور معنی‌دار افزایش یافت ($p < 0/05$) برای غلظت برای ۱۵/۶ میکرومولار و $p < 0/001$ برای دو غلظت بالاتر. سطوح MDA نیز معنی‌دار کاهش یافت (در گروه ۱۵/۶ میکرومولار با $p < 0/01$ و در گروه‌های ۳۱/۲۵ و ۶۲/۵ میکرومولار با $p < 0/001$). فعالیت آنزیم‌های SOD ($p < 0/001$) برای غلظت ۱۵/۶ میکرومولار و $p < 0/001$ برای غلظت‌های ۳۱/۲۵ و ۶۲/۵ میکرومولار و CAT ($p < 0/001$) برای غلظت ۱۵/۶ میکرومولار و $p < 0/001$ برای دو گروه دیگر نیز در گروه‌های تیمار شده در مقایسه با سلول‌های تیمار نشده افزایش یافتند.

نتیجه‌گیری: با توجه به نتایج حاصل، اثرات آنتی‌اکسیدانی این ترکیب با کاهش TOS و MDA و افزایش TAC و افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی در رده سلولی HepG2 سرطان کبد مشخص شد.

واژه‌های کلیدی: کورکومین، TAC، TOS، MDA، SOD، CAT، رده سلولی HepG2

*نویسنده مسئول: مهدی بهمنی، همدان، دانشگاه علوم پزشکی همدان، گروه بیوشیمی بالینی

Email: bahmani.m64@gmail.com

"نشریه علمی پژوهشی ارمغان دانش وابسته به دانشگاه علوم پزشکی یاسوج، یک نشریه با دسترسی آزاد است و تمامی مقالات منتشر شده در این نشریه به صورت دسترسی آزاد منتشر می‌شوند."

مقدمه

اثر بخشی مناسبی برای مراحل پیشرفته بیماری ندارند. این روش‌ها برای تعداد کمی از بیماران مناسب است و اغلب دارای عوارض بعد از عمل است، در نتیجه تنها گزینه درمانی رایج دارو می‌باشد (۸). از این رو اکثر بیماران سرطانی در طول پروتکل درمانی خود، شیمی درمانی انجام می‌دهند. علی‌رغم نقش مهم شیمی درمانی، اثر بخشی آن به دلایل گوناگون نظیر؛ محدودیت دوز، عوارض جانبی شدید و مقاومت چند دارویی محدود است (۹).^۱

بررسی‌های گسترده سلولی، مولکولی و ژنتیکی بینش امیدوار کننده‌ای را در مورد توسعه استراتژی مختلف جهت مبارزه با سرطان با حداقل عوارض جانبی ارائه کرده است. یکی از این استراتژی‌ها، مدیریت درمان سرطان با استفاده از ترکیبات طبیعی می‌باشد (۹). لازم به ذکر است که یک عامل ضد سرطان فیتوشیمیایی، در مقایسه با شیمی درمانی سیستمیک، مزایای قابل توجهی در غیر سمی بودن برای سلول‌های طبیعی دارد (۹). ترکیبات طبیعی از جمله؛ میوه‌ها، سبزیجات و ادویه‌ها به دلیل توانایی اثبات شده خود در سرکوب سرطان توجه جامعه علمی را به خود جلب کرده است. ترپنوئیدها دسته متنوعی از فیتوکمیکال‌های فعال دارویی، نقش کلیدی در داروهای گیاهی سنتی دارند. در میان مهم‌ترین آن‌ها، کورکومینوئیدها شامل؛ کورکومین، فنول‌های

سرطان یک بیماری چندعاملی است که در آن یک‌سری تغییرات مولکولی باعث رشد و تکثیر غیرعادی سلول‌ها و افزایش سریع توده بافتی در قسمت‌های آسیب دیده بدن می‌شود. علی‌رغم تلاش‌های بسیار و راهکارهای درمانی مورد استفاده برای آن از جمله شیمی درمانی، پرتو درمانی و جراحی، نرخ مرگ و میر ناشی از این بیماری همچنان رو به افزایش است به طوری که پس از بیماری‌های قلبی - عروقی، دومین عامل مرگ و میر در سراسر جهان است. در میان انواع سرطان‌ها، سرطان کبد سومین عامل مرگ و میر ناشی از سرطان در جهان می‌باشد (۱-۴).

سرطان کبد یک تومور بدخیم است که از بافت کبد منشأ می‌گیرد (۵). سرطان اولیه کبد در خود سلول‌های کبدی آغاز می‌شود و هپاتوسلولار کارسینوما (HCC)^(۱) شایع‌ترین بدخیمی اولیه کبد است (۶). از عوامل خطر این بیماری می‌توان به آفلاتوکسین، عفونت مزمن ناشی از ویروس هپاتیت B و C، کبد چرب غیر الکلی (NAFLD)^(۲)، مصرف الکل و بیماری‌های متابولیک اشاره کرد (۷). انتخاب گزینه درمانی برای آن بستگی به مرحله و درجه بدخیمی دارد. علی‌رغم اثر درمانی که جراحی، برداشتن بخشی از کبد با فرکانس رادیویی (RFA)^(۳)، تزریق اتانول از راه پوست (PEI)^(۴) و کموآمبولیزاسیون میان شریانی (TACE)^(۵) ممکن است در بیماران HCC در مراحل اولیه داشته باشند، اما این روش‌های درمانی

-
- 1-Hepatocellular Carcinoma
 - 2-Non-Alcoholic Fatty Liver Disease
 - 3-Radiofrequency Ablation
 - 4-Percutaneous Ethanol Injection
 - 5-Trans-Arterial Chemo Embolisation

طبیعی زرد رنگی هستند که عمدتاً در زردچوبه یافت می‌شوند. بررسی‌های اخیر به نقش ضدسرطانی آن نیز اشاره کرده است (۱۱ و ۱۰).

یکی از عوامل کلیدی در ایجاد سرطان کبد، *استرس اکسیداتیو* است. استرس اکسیداتیو، اصطلاحی عمومی می‌باشد که به عدم تعادل اکسیدان‌ها و آنتی اکسیدان‌ها گفته می‌شود، که در آن میزان اکسیدان‌ها بیش از حد است. این عدم تعادل زمینه‌ساز تغییرات شیمیایی مخرب در مولکول‌های زیستی مانند چربی‌ها، اسیدهای نوکلئیک و پروتئین‌ها می‌باشد. نتایج برخی از پژوهش‌ها موجود نشان می‌دهد که مصرف مکمل‌های آنتی اکسیدان ممکن است به جبران کمبود دفاع آنتی اکسیدانی کمک کند (۱۳ و ۱۲). از آنجایی که القای بیش از حد *استرس اکسیداتیو* در سرطان منجر به آسیب به سلول‌های سالم می‌شود، نیاز به کاهش آن در بیماری دیده می‌شود. آنتی اکسیدان‌ها اولین خط دفاعی انتخابی برای مقابله با استرس اکسیداتیو هستند. بدن انسان مکانیسم‌های مختلفی جهت مقابله با استرس اکسیداتیو با تولید آنتی اکسیدان‌ها دارد که یا به طور طبیعی به صورت *درون‌زا* (EnAO)^(۱) و *ولید*؛ یا از طریق غذا و یا مکمل‌ها به صورت *اگزوژن* تأمین می‌شوند. از جمله آنتی اکسیدانی *درون‌زا* می‌توان به *سوپراکسید دیسموتاز* (SOD) و *کاتالاز* (CAT) اشاره داشت (۱۶-۱۴). پژوهش‌های اخیر نقش کورکومین را به عنوان آنتی اکسیدان برجسته کرده است (۱۱ و ۱۰). با وجود برخی نتایج اثرات آنتی اکسیدانی کورکومین در

پژوهش‌های گذشته، همچنان نیاز به بررسی بیشتر در این زمینه احساس می‌شود.

از آنجایی که هدف ارزیابی اثرات آنتی اکسیدانی کورکومین در بیماری سرطان کبد است، از رده سلولی HepG2 استفاده شد. HepG2 یک رده سلولی سرطان کبد انسان است که در سال ۱۹۷۵ از بافت کبدی یک پسر ۱۵ ساله مبتلا به کارسینوم سلول کبدی، جدا شد. *سلول‌های HepG2* به طور مکرر در پژوهش‌های متابولیسم دارو، سمیت مواد بر روی کبد و سرطان‌زایی مورد استفاده قرار می‌گیرند. این سلول‌ها به دلیل شباهت به *سلول‌های HCC*، کم‌هزینه بودن و سهولت استفاده، انقلابی در پژوهش‌های علمی ایجاد کرده‌اند. علاوه بر این، استفاده از آن‌ها در پژوهش‌ها از مشکلات اخلاقی مرتبط با استفاده از بافت‌های حیوانی و انسانی جلوگیری می‌کند (۱۸ و ۱۷).^۲

با توجه به این که ما نیاز به اثبات بیشتر اثر کورکومین بر بیماری سرطان کبد داریم، اثر این ترکیب را بر این سلول‌ها بدون دخالت ترکیب دیگری ارزیابی کردیم. بر این اساس که بررسی‌های زیادی از اثرات آنتی اکسیدانی آن در کنار ترکیبات الفاکندره استرس اکسیداتیو در همین رده سلولی صحبت به میان آورده است، با این فرض که در غلبه بر استرس ناشی از خود بیماری نیز می‌تواند کارآمد باشد، مطالعه صورت گرفت. بنابراین مطالعه حاضر با این پیش فرض انجام شد که بتوان در مورد اثر

1-Endogenous Antioxidants

آنتی اکسیدانی کورکومین در سرطان کبد با قطعیت بیشتری صحبت به میان آورد تا شاید بتوان از این ترکیب به تنهایی یا در جهت کاهش عوارض جانبی در کنار سایر داروهای شیمیایی استفاده کرد.

با در نظر گرفتن به موارد مذکور، هدف از این مطالعه بررسی اثر کورکومین بر وضعیت/استرس اکسیداتیو در رده سلولی HepG2 کبد می باشد. بدین منظور جهت ارزیابی میزان بقای سلولی تست MTT انجام شد. وضعیت/استرس اکسیداتیو سلول ها نیز با سنجش وضعیت اکسیدانی تام (TOS)^(۱)، ظرفیت آنتی اکسیدانی تام (TAC)^(۲)، مالون دی آلدئید (MDA)^(۳)، آنزیم های سوپراکسید دیسموتاز (SOD) و کاتالاز (CAT) مورد مطالعه قرار گرفت. بنابراین هدف از انجام این مطالعه تعیین و تأثیر کورکومین بر وضعیت/استرس اکسیداتیو در رده سلولی HepG2 سرطان کبد انسان بود.

روش بررسی

در این مطالعه تجربی که در سال ۱۴۰۳-۱۴۰۴ انجام شد، تمامی مراحل مطالعه حاضر به وسیله کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی همدان مورد تصویب قرار گرفت. پودر کورکومین خالص از شرکت سیگما تهیه شد. رده سلولی HepG2 نیز از مرکز ملی ذخایر ژنتیکی و زیستی ایران به صورت فلاسک T25 خریداری شد. سلول ها در محیط

Bio-IDEA) Dulbecco's Modified Eagle Medium; DMEM

FBS درصد ۱۰ (ایران) با high glucose

(Biosera, France) و استرپتومایسین - پنی سیلین ۱ درصد (Bio-IDEA, ایران) کشت داده شدند و در انکوباسیون ۳۷ درجه سانتی گراد در معرض CO₂ ۵ درصد نگه داری شدند. قبل از شروع آزمایشات سلول ها تحت پاساژ سلولی قرار می گرفتند.^۳

پودر کورکومین (Sigma Aldrich, USA) خریداری و در DMSO ۱ درصد حل شد. ۱۵×۱۰^۲ سلول HepG2 در هر چاهک از پلیت ۹۶ خانه استریل کشت داده شدند. پس از ۴۸ ساعت و رسیدن به تراکم تقریبی ۷۰ تا ۸۰ درصد با غلظت های مختلف (۱۰۰۰، ۲۵۰، ۵۰۰، ۱۲۵، ۶۲/۵، ۳۱/۲۵، ۱۵/۶، ۷/۸، ۳/۹ و صفر میکرومولار) کورکومین تیمار شدند. سلول های کنترل نیز با محیط کشت تیمار شدند. غلظت ها به وسیله رقت سازی سریالی تهیه شدند. پس از گذشت ۲۴ و ۴۸ ساعت، ۱۰۰ میکرولیتر از محلول MTT به هر چاهک پلیت اضافه شد و پس از سه ساعت قرار دادن پلیت در انکوباتور و دور ریختن محیط رویی هر چاهک، ۵۰ میکرولیتر DMSO به هر چاهک اضافه شد. در ادامه جذب نوری ایجاد شده در طول موج ۵۷۰ نانومتر با استفاده از دستگاه الیزا ریدر اندازه گیری و میزان بقای سلول طبق فرمول زیر محاسبه شد:

$$100 \times \frac{\text{میانگین جذب نمونه های تیمار شده}}{\text{میانگین جذب نمونه های کنترل}}$$

برای هر غلظت سه بار تکرار صورت گرفت و در نهایت بر اساس این غلظت ها نمودار استاندارد

1- Total Oxidant Status
2-Total Antioxidant Capacity
3-Malondialdehyde

ترسیم و مقدار IC_{50} برای سلول‌های HepG2 تعیین شد. غلظت IC_{50} ، یک غلظت بالاتر و یک غلظت پایین‌تر از آن جهت تیمار و انجام آزمایشات بعدی انتخاب شد.

در نتیجه گروه‌بندی پژوهش به صورت زیر می‌باشد؛ سلول‌های تیمار نشده (گروه کنترل)، سلول‌های تیمار شده با غلظت IC_{50} کورکومین، سلول‌های تیمار شده با یک غلظت پایین‌تر از IC_{50} کورکومین، سلول‌های تیمار شده با یک غلظت بالاتر از IC_{50} کورکومین و گروه کنترل به منظور مقایسه تغییرات احتمالی سلول‌های تیمار شده نسبت به سطوح پایه در نظر گرفته شد.

پس از آن که سلول‌های کاشته شده در چاهک‌ها به درجه اشباع مورد نظر رسیدند، با غلظت‌های بیان شده از کورکومین تیمار شدند. پس از ۴۸ ساعت انکوباسیون، مایع رویی چاهک‌ها در یک فالکون ریخته شد و سلول‌های کف پلیت با PBS شست و شو داده شدند. پس از تریپسینه کردن سلول‌ها، سلول‌های کنده شده با تریپسین به آن مایع رویی اضافه شد و پس از سانتریفیوژ، محلول رویی دور ریخته شد. سپس به منظور تخلیه کامل تریپسین، به پلت سلولی بافر PBS سرد که حاوی کوکتل مهارکننده پروتئاز بود، اضافه شد و سه بار فریز در دفریز صورت گرفت. در ادامه هر دفریز کردن به منظور لیز شدن کامل، سلول‌ها به شدت پیپتاژ شدند. در مرحله آخر ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ با ۱۲۰۰ دور در دقیقه در دمای چهار درجه سانتی‌گراد انجام و سوپرناتانت جدا و تقسیم گردید. جهت تهیه

لیزات برای تست‌های TAC، TOS و MDA از آنتی‌پروتئاز به دلیل وجود مواد شلاته کننده آهن استفاده نشد.

غلظت‌های مشخصی در دامنه غلظتی ۱۰۰۰ - ۱۵/۶ میکرومولار با روش رقت سریالی به عنوان استاندارد تهیه گردید. به هفت میکروتیوب دیگر هرکدام یک میلی‌لیتر معرف بردفورد اضافه کرده و ۱۰۰ میکرولیتر از هر استاندارد به هر میکروتیوب اضافه شد. از هر یک از این میکروتیوب‌ها ۲۰۰ میکرولیتر در چاهک‌های مربوط به استاندارد ریخته شد. ۱۰ میکرولیتر از نمونه بدون رقیق‌سازی به یک پلیت ۹۶ خانه منتقل و ۱۹۰ میکرولیتر معرف به هر چاهک اضافه گردید. به چاهک بلانک نیز فقط آب مقطر اضافه گردید. در نهایت پس از پنج دقیقه انکوباسیون، در نهایت جذب نوری پلیت در طول موج ۵۹۵ نانومتر اندازه‌گیری شد.

برای سنجش ظرفیت آنتی‌اکسیدان توتال (TAC) از کیت (کیازیست، ایران) و بر اساس دستورالعمل شرکت سازنده استفاده شد. در این آزمایش کوپریک (Cu^{+2}) در حضور آنتی‌اکسیدان‌ها به کوپرو (Cu^{+1}) احیا می‌شود و در حضور کروموژن رنگی تولید می‌کند که در طول موج ۴۵۰ نانومتر جذب دارد. به منظور نرمالایز کردن، غلظت‌های به دست آمده به غلظت پروتئین هر نمونه تقسیم شد و در نهایت سطح TAC به صورت نانومول بر میلی گرم پروتئین گزارش شد.

برای سنجش وضعیت اکسیدان توتال (TOS) از کیت (کیازیست، ایران) و براساس دستورالعمل شرکت سازنده استفاده شد. در این آزمایش فرس (Fe^{+2}) در حضور اکسیدان‌ها به فریک (Fe^{+3}) اکسید می‌شود و در حضور کروموژن رنگی تولید می‌کند که در طول موج ۵۶۰ نانومتر دارای جذب است. عدد به دست آمده برای هر نمونه به منظور نرمالایز کردن بر غلظت پروتئین آن نمونه تقسیم و در نتیجه سطح TOS به صورت نانومول بر میلی‌گرم پروتئین گزارش شد.

برای سنجش مالون دی‌آلدهید از کیت (کیازیست، ایران) بر اساس روش‌های کالریمتریک استفاده شد. در این آزمایش مالون دی‌آلدهید با تیوباربیتوریک اسید کمپلکس تشکیل داده و در طول موج نوری ۵۶۰ نانومتر جذب دارد. در نهایت مقدار میانگین جذب بلانک از میانگین هر نمونه و استاندارد تفریق و غلظت به دست آمده با میزان پروتئین نرمال سازی شد.

برای سنجش فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز (SOD) از کیت (کیازیست، ایران) به روش کالریمتریک استفاده شد. اندازه‌گیری فعالیت آنزیم طبق پروتکل کیت انجام و جذب در طول موج ۵۲۰ نانومتر خوانش شد. در نهایت فعالیت آنزیم بر اساس درصد مهار بیان شد و برای هر نمونه، مطابق با فرمول زیر جداگانه محاسبه گردید:

$$\text{درصد مهار} = \frac{(\text{جذب کنترل نمونه} - \text{جذب نمونه}) - (\text{جذب بلانک دو} - \text{جذب بلانک یک})}{(\text{جذب بلانک دو} - \text{جذب بلانک یک})} \times 100$$

مهار ۵۰ درصد = یک واحد فعالیت آنزیمی

جهت افزایش صحت نتایج، غلظت پروتئین هر نمونه اندازه‌گیری و نرمال‌سازی مقادیر بر اساس واحد میلی واحد بر میلی‌گرم پروتئین (mU/mg of protein) انجام شد.

برای سنجش فعالیت آنزیم کاتالاز (CAT) از کیت (کیازیست، ایران) و مطابق با پروتکل آن اندازه‌گیری شد. در این آزمایش کاتالاز در حضور متانول فعالیت پراکسیدازی دارد و سپس در حضور مهارکننده خود، متوقف شده و فرمالدهید تولیدی از آن با Purpald واکنش داده و رنگ بنفش تولید می‌کند، این رنگ در طول موج ۵۶۰ نانومتر جذب دارد. بعد از رسم نمودار استاندارد غلظت نمونه‌ها بر اساس آن محاسبه شد و با قرار دادن در فرمول زیر، فعالیت آنزیم محاسبه می‌گردد.

$$\text{CAT Activity} = (\mu\text{M OF Sample}) / 20 \times 0.24 / 0.02 \times \text{ضرب رقت نمونه}$$

پس از نرمال سازی داده‌ها برحسب سنجش میزان پروتئین، فعالیت آنزیم به صورت میلی واحد بر میلی‌گرم پروتئین گزارش شد.

داده‌های جمع‌آوری شده با استفاده از نرم‌افزارهای SPSS و GraphPad Prism و آزمون‌های آماری شاپیرو ویلک، تحلیل واریانس و تعقیبی تجزیه و تحلیل شدند.

یافته‌ها

با استفاده از آزمایش MTT اثر غلظت‌های مختلف کورکومین (۱۰۰۰-۰ میکرومولار) بر میزان زنده‌مانی سلول‌های HepG2 در مقایسه با سلول‌های

تیمار نشده (زنده مانی ۱۰۰ درصد) در زمان‌های ۲۴ و ۴۸ ساعت بررسی گردید.

همان‌طور که در شکل ۱ مشاهده می‌شود، زنده مانی سلول‌های HepG2 با تمامی غلظت‌ها به جز غلظت‌های ۳/۹ و ۷/۸ میکرومولار از کورکومین در مقایسه با سلول‌های تیمار نشده، در زمان ۲۴ ساعت کاهش معنی‌داری پیدا کرده بود ($p < 0.001$). این کاهش به میزان کمتری برای غلظت ۱۵/۶ میکرومولار نسبت به سایر غلظت‌ها رخ داد ($p < 0.05$). هرچند که غلظت‌های بالای کورکومین در زمان ۲۴ ساعت موجب مرگ سلولی شد، ولی به IC50 نرسید.

غلظت مهاری ۵۰ درصد (IC50) کورکومین در زمان ۴۸ ساعت با استفاده از روش رگرسیون غیر خطی در نرم‌افزار GraphPad Prism نسخه ۶، ۳۱/۲۵ میکرومولار تعیین شد. همچنین غلظت‌های ۱۵/۶ و ۶۲/۵ میکرومولار به ترتیب به عنوان دو غلظت کمتر از IC50 و بزرگتر از آن جهت انجام آزمایشات بعدی انتخاب شدند.

در کل، نتایج MTT حاکی از کاهش زنده مانی سلول‌های HepG2 در حضور کورکومین است به طوری که با افزایش زمان و غلظت انکوباسیون مرگ سلولی افزایش پیدا کرد.

نتایج شاخص‌های استرس اکسیداتیو شامل: TOS، TAC و MDA در سلول‌های تیمار شده با کورکومین در زمان ۴۸ ساعت در مقایسه با گروه کنترل، حاصل سه بار تکرار و به صورت میانگین $\pm$ SD در شکل ۲ نشان داده شده‌اند.

سطح TOS در گروه ۱۵/۶ میکرومولار ($p < 0.001$)، ۳۱/۲۵ و ۶۲/۵ میکرومولار ($p < 0.001$) نسبت به گروه کنترل کاهش معنی‌داری نشان داد (شکل ۲-الف).

از طرف دیگر، سطح TAC در تمامی گروه‌ها نسبت به گروه کنترل افزایش معنی‌داری پیدا کرده است ($p < 0.05$ برای ۱۵/۶، $p < 0.001$ برای ۳۱/۲۵ و ۶۲/۵ میکرومولار) (شکل ۲-ب).

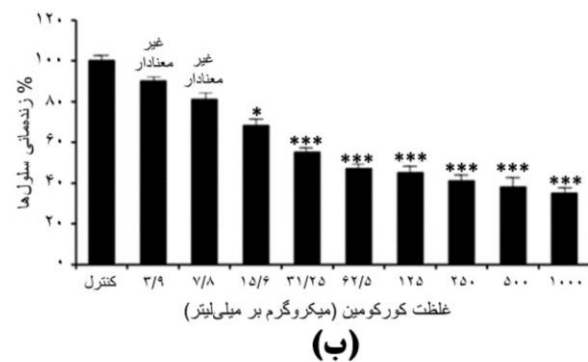
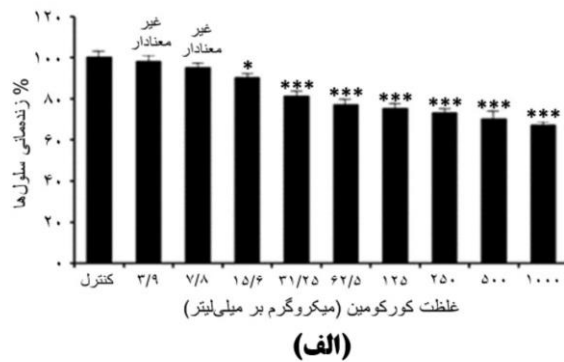
سطح MDA نیز در هر سه غلظت با نسبت به گروه کنترل کاهش معنی‌داری را داشت (در گروه ۱۵/۶ میکرومولار با $p < 0.01$ و در گروه‌های ۳۱/۲۵ و ۶۲/۵ میکرومولار با $p < 0.001$) (شکل ۲-ج).

در کل، نتایج حاکی از آن است که در گروه‌های تیمار شده فعالیت آنتی‌اکسیدانی مشاهده شد.

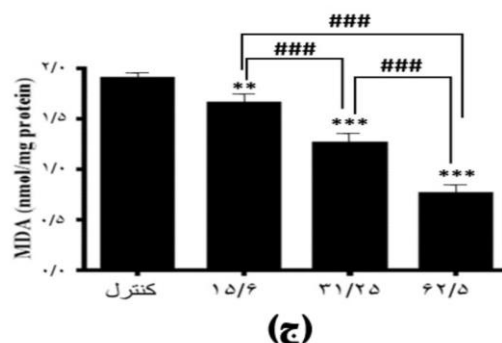
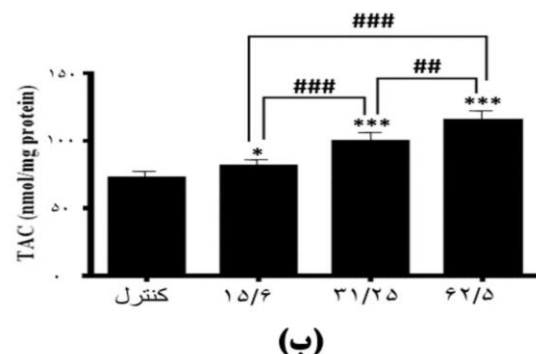
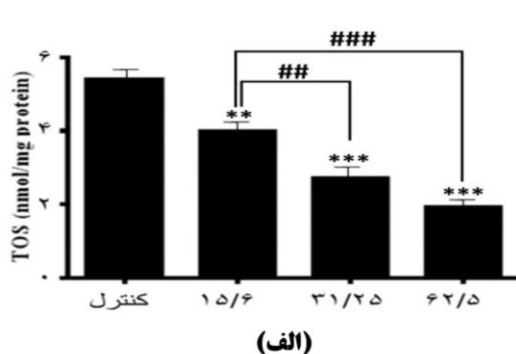
نتایج مربوط به اندازه‌گیری فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی شامل CAT و SOD در گروه‌های مورد مطالعه، حاصل سه بار تکرار و به صورت میانگین $\pm$ انحراف معیار در شکل سه نشان داده شده‌اند. میزان فعالیت آنزیم SOD که به صورت میلی واحد بر میلی گرم پروتئین (mU/mg of protein) نشان داده شده، در سلول‌های تیمار شده با سه غلظت نسبت به گروه کنترل به گونه‌ای افزایش یافت که از نظر آماری معنی‌داری بود ($p < 0.001$ برای غلظت ۱۵/۶ میکرومولار و $p < 0.001$ برای غلظت‌های ۳۱/۲۵ و ۶۲/۵ میکرومولار) (شکل ۳-الف). فعالیت آنزیم CAT در گروه‌های تیمار شده با هر سه غلظت نسبت به گروه کنترل به صورت معنی‌داری افزایش پیدا

آنتی اکسیدانی حاکی از افزایش ظرفیت سیستم دفاع آنتی اکسیدانی در سلول های HepG2 به وسیله کورکومین پس از ۴۸ ساعت می باشد.

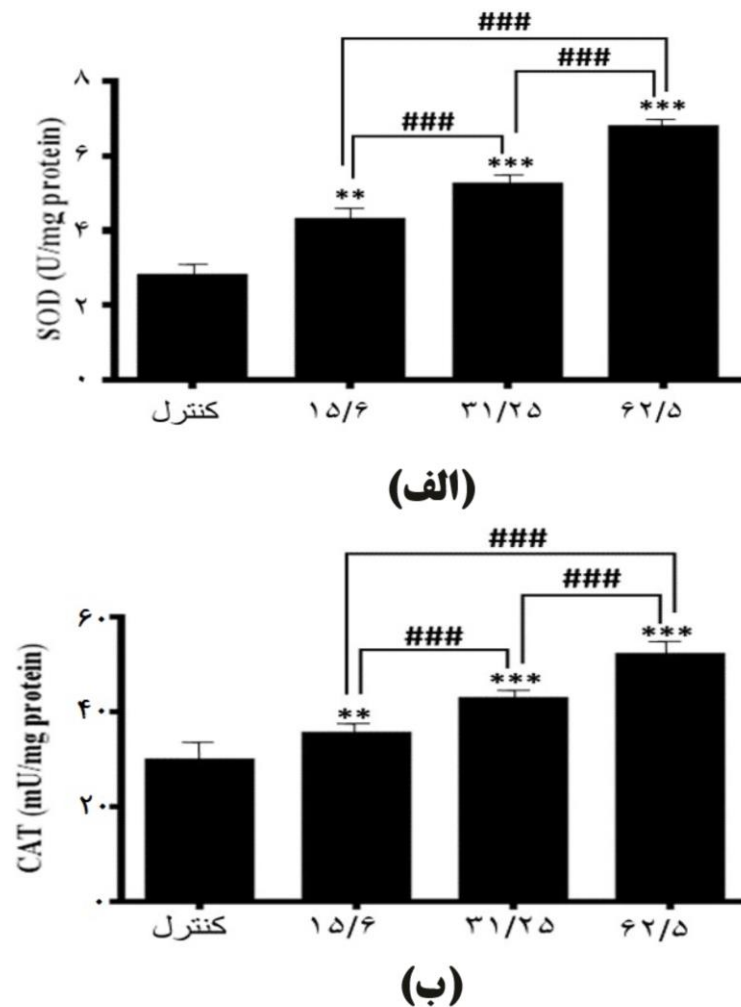
کرد ($p < 0.01$) برای غلظت ۱۵/۶ میکرومولار و ($p < 0.001$) برای دو غلظت دیگر (شکل ۳-ب). در مطالعه حاضر نتایج حاصل از اندازه گیری فعالیت آنزیم های -



شکل ۱: اثر کورکومین بر زنده ماندن سلول های HepG2 با استفاده از آزمایش MTT در زمان الف) ۲۴ ساعت ب) ۴۸ ساعت
ns: $p > 0.05$, * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$ در مقایسه با گروه کنترل



شکل ۲: تأثیر گروه های مورد مطالعه بر الف) وضعیت اکسیدانی تام (TOS)، ب) ظرفیت آنتی اکسیدانی تام (TAC)، ج) مالون دی آلدئید (MDA)
*** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$ در مقایسه با گروه کنترل (تعداد=۳)، ### $p < 0.001$, ## $p < 0.01$, # $p < 0.05$ در مقایسه با گروه های دیگر



شکل ۳: نتیجه تأثیر گروه‌های مورد مطالعه بر آنزیم‌های الف) سوپراکسید دیسموتاز (SOD) و ب) کاتالاز (CAT)
 $p < 0.001$ در مقایسه با گروه کنترل (تعداد=۸)، $###p < 0.001$ ، $##p < 0.01$ ، $#p < 0.05$ در مقایسه با گروه‌های دیگر

بحث

طوری که در نهایت به یافتن رویکردهای درمانی جدید برای مبارزه با سرطان نیاز است. یکی از این رویکردها استفاده از ترکیبات طبیعی است که ممکن است حتی عوارض جانبی ناشی از شیمی‌درمانی را کاهش دهد. فیتوکمیکال‌ها شامل طیف گسترده‌ای از ترکیبات فعال بیولوژیکی هستند که برای تعداد زیادی از آن‌ها خواص ضد توموری گزارش شده است. در این میان، پتانسیل درمانی کورکومین، برای درمان

علی‌رغم تلاش‌های بسیار و راهکارهای درمانی مورد استفاده برای سرطان، از جمله شیمی درمانی، پرتودرمانی و جراحی، نرخ مرگ و میر ناشی از این بیماری همچنان رو به افزایش است. درمان‌های متداول تا حدودی برای درمان سرطان موفقیت‌آمیز هستند، اما این درمان‌ها اثرات نامطلوبی نیز به دنبال دارند که استفاده از آن‌ها را محدود می‌سازد، به

سرطان گزارش شده است (۱۹-۲۶). لذا هدف از انجام این مطالعه تعیین و تأثیر کورکومین بر وضعیت استرس اکسیداتیو در رده سلولی HepG2 سرطان کبد انسان بود.

با وجود این که در نتایج برخی از پژوهش‌های پیشین، اثرات آنتی اکسیدانی کورکومین گزارش شده است، اما همچنان نیاز به بررسی بیشتر در این زمینه احساس می‌شود. پس بنابراین مطالعه حاضر با این پیش‌فرض انجام خواهد شد که بتوان در مورد اثرات آنتی اکسیدانی کورکومین با قاطعیت بیشتری صحبت کرد.

عدم تعادل بین اکسیدان‌ها و آنتی اکسیدان‌ها که این عمل به نفع اکسیدان‌ها هست، به‌طور بالقوه منجر به "استرس اکسیداتیو" می‌شود. سلول‌ها دارای مکانیسم‌های بیوشیمیایی و ژنتیکی پیچیده‌ای برای حفظ چنین تعادلی هستند و واضح است که اختلال در این مکانیسم می‌تواند عواقب پاتوفیزیولوژیکی عمیقی داشته باشد. بررسی استرس اکسیداتیو از نظر پزشکی شاخص مهمی است، زیرا این فرآیند با طیف وسیعی از بیماری‌های انسانی از جمله سرطان ارتباط دارد. در شرایط طبیعی فیزیولوژیکی، سلول با استفاده از سیستم آنتی اکسیدانی سطح اکسیدان‌ها را تحت کنترل دارد، اما طی شرایطی اکسیدان‌ها بیش از حد تولید می‌شوند و این افزایش به سرطان‌زایی کمک می‌کند (۲۷-۳۰).

از مهم‌ترین سیستم دفاع آنتی اکسیدانی می‌توان به آنزیم‌های سوپر اکسید دیسموتاز و کاتالاز

اشاره داشت. سوپر اکسید دیسموتاز O_2^- را به H_2O_2 تبدیل می‌کند و کاتالاز به نوبه خود این H_2O_2 را به آب تبدیل می‌کند. پس می‌توان گفت که فعالیت هر دو در کنار هم سبب ویژگی آنتی اکسیدانی می‌شود. آنتی اکسیدان‌ها نقش مهمی را در برابر آسیب‌های اکسیدانی ایفا می‌کنند. اکسیدان‌ها بسیار واکنش‌پذیر بوده و به بیومولکول‌های مختلف نظیر DNA، پروتئین و لیپیدهایی مانند اسیدهای چرب غیراشباع چندگانه (PUFAs) حمله می‌کنند. هنگامی که به لیپیدها حمله می‌کنند، لیپیدها اکسید می‌شوند، مثلاً اسید آراشیدونیک پراکسید شده تا در نهایت MDA و ۴-هیدروکسی-۲-نئونال (HNE) و سایر محصولات واکنش مانند F_2 -isoprostanes را تشکیل دهد (۳۱-۳۳).

در مطالعه حاضر رده سلولی HepG2 به وسیله کورکومین به مدت ۴۸ ساعت با غلظت‌های ۱۵/۶، ۳۱/۲۵ و ۶۲/۵ میکرومولار تیمار شد و تأثیر آن بر فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدانی و وضعیت استرس اکسیداتیو در سلول‌ها مورد ارزیابی قرار گرفت که مشاهده شد که تیمار سلول‌ها با کورکومین موجب کاهش استرس اکسیداتیو می‌شود. علاوه بر این، نتیجه این مطالعه حاکی از افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدان بود.

در پژوهش‌های دیگری هم‌راستا با نتایج مطالعه حاضر، به این موضوع اشاره شده است که کورکومین می‌تواند از طریق افزایش سطح آنتی اکسیدان‌های آنزیمی اثرات خود را بر وضعیت استرس اکسیداتیو القا کند. برای مثال در سال ۲۰۱۲

مطالعه کیم و همکاران نشان داد که درمان با کورکومین به صورت وابسته به دز استرس اکسیداتیو ناشی از AAPH را در سلول‌های HepG2 از طریق افزایش بیان آنزیم سم‌زدایی مانند HO-1 معکوس می‌کند (۳۴).

لازم به ذکر است که فعالیت آنتی‌اکسیدانی فیتوکمیکال‌ها به تنظیم و القای آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی بستگی دارد. پیام‌رسانی فاکتور مرتبط با فاکتور هسته‌ای ایریتروئیدی- Nrf2 (۱) - پروتئین مرتبط با ECH شبیه Keap1 (۲) - عنصر پاسخ آنتی‌اکسیدانی (ARE) (۳) برجسته‌ترین مسیری است که به تنظیم مثبت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی کمک می‌کند. Nrf2 یک فاکتور رونویسی است که به طور معمول در سیتوپلاسم وجود دارد، جایی که به Keap1 متصل می‌شود و از طریق یوبیکوئیتین لیگاز Cul3-Rbx E3 مرتبط با Keap1 تحت تخریب پروتئازومی قرار می‌گیرد. با این حال، در پاسخ به الکتروفیل، Keap1 از طریق اکسیداسیون-احیا، آلکیلاسیون و یا تبادل تیول‌دی سولفید تغییر ساختاری می‌دهد و با جدا شدن از Nrf2 منجر به جا به جایی Nrf2 به هسته می‌شود. Keap1 حاوی حداقل ۲۵ تیول واکنشی است و به عنوان یک حسگر بسیار حساس الکتروفیل عمل می‌کند. در هسته، Nrf2 به پروتئین‌های کوچک Maf متصل می‌شود و سپس یک ARE بر روی DNA می‌نشیند که منجر به رونویسی ژن‌های هدف می‌شود. مواد شیمیایی گیاهی با فعالیت‌های آنتی‌اکسیدانی می‌توانند تیول‌های فعال Keap1 را تغییر دهند و در

نتیجه انتقال Nrf2 به هسته را تقویت کنند. بسیاری از مواد شیمیایی گیاهی می‌توانند تیول‌های Keap1 را به عنوان گیرنده مایکل آلکیل‌کننده که به عنوان ترکیبات استیلن کونژوگه به یک گروه الکترون‌خواه تعریف می‌شوند و می‌توانند واکنش‌های آلکیل‌کننده برگشت‌پذیر را با تیول‌های حسگر Keap1 ایجاد کنند. در این میان، ترکیبی نظیر کورکومین اکسید می‌شود که می‌تواند با تیول‌های Keap1 برای القای فعال‌سازی Nrf2 تعامل داشته باشد. بسیاری از پروتئین‌هایی که به عملکرد آنتی‌اکسیدانی سلولی و سم‌زدایی کمک می‌کنند به وسیله مسیر Nrf2/Keap1/ARE تنظیم می‌شوند. ژن‌های هدف Nrf2 عبارتند از: سوپراکسید دیسموتاز، کاتالاز، هم اکسیژناز-۱، گلوکاتینون پراکسیداز، تیوردوکسین ردوکتاز، کینون- NAD(P)H اکسیدوردوکتاز یک (NQO1) (۴) و گلوکاتینون- S ترانسفرازها (۳۵).^۴

علاوه بر نتایج پژوهش‌های فوق، نتیجه مطالعه داروش و همکاران نیز بیانگر افزایش بیان ژن SOD تحت تأثیر تیمار با کورکومین در سلول‌های HepG2 بود (۹). بنابراین شاید بتوان گفت که کورکومین اثرات آنتی‌اکسیدانی خود را از طریق سطوح مولکولی نیز القا می‌کند.

علاوه بر همه این‌ها، گونه واکنش‌گر سوپراکسید با گرفتن یک الکترون و دو عدد H^+ به

1-Nuclear Erythroid 2-Related Factor
2-Kelch-like ECH associated protein 1
3-Antioxidant Response Element
4-NAD(P)H quinone oxidoreductase 1

پراکسید هیدروژن تبدیل می‌شود و آن نیز با گرفتن یک الکترون و یک H^+ به آب تبدیل می‌شود. به نظر می‌رسد که کورکومین با داشتن گروه عاملی هیدروکسیل فنولی، به عنوان دهنده الکترون و H^+ عمل کرده و احتمالاً از این طریق خاصیت آنتی‌اکسیدانی خود را اعمال می‌کنند (۳۶-۴۰ و ۳۶).

با این که سعی بر این بود که این مطالعه به گستردگی در راستای هدف پژوهش بپردازد، اما به دلیل محدودیت‌هایی نظیر محدودیت بودجه و امکانات در دسترس، امکان اندازه‌گیری متغیرهای دیگر دخیل در استرس اکسیداتیو فراهم نشد. هرچند که سایر محققین می‌توانند ادامه دهنده مسیر این مطالعه باشند. همچنین تحقیقات بیشتر برای بررسی مسیرهای مرتبط با *استرس/اکسیداتیو* در جزئیات بیشتر نیاز است تا نتایج قابل اعتماد تری را به همراه داشته باشند. علاوه بر این، مکانیسم‌های زیربنایی جهت تعیین دقیق مسیر فعال شدن دفاع آنتی‌اکسیدانی نیز می‌تواند در ادامه راه پیشنهاد مناسبی برای پژوهشگران دیگر باشد.

نتیجه‌گیری

نتایج به دست آمده از این مطالعه نشان می‌دهند که کورکومین می‌تواند بقای سلول‌های HepG2 سرطان کبد را کاهش دهد. همچنین مشاهده شد که توانایی افزایش ظرفیت آنتی‌اکسیدانی و کاهش *استرس/اکسیداتیو* را در سلول‌ها دارد. پس شاید در

درمان سرطان کبد مفید باشد. همچنین شاید بتواند از آسیب به سلول‌های سالم در اثر استرس ناشی از این بیماری جلوگیری کند.

تقدیر و تشکر

پژوهشگران این مطالعه بر خود لازم دانستند از معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی یاسوج و همچنین از تمامی شرکت‌کنندگان در مطالعه نهایت قدردانی و تشکر به عمل آورند.

تعارض منافع

نویسندگان اعلام می‌دارند که هیچ‌گونه تعارض منفعی در خصوص این مقاله وجود ندارد.

حمایت مالی

این تحقیق با حمایت مالی معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی همدان به انجام رسیده است.

ملاحظات اخلاقی

این مقاله برگرفته از طرح تحقیقاتی با کد طرح ۱۴۰۳۱۲۱۴۱۱۱۷۳ و کد اخلاق با کد اخلاق IR.UMSHA.REC.1403.923 از دانشگاه علوم پزشکی همدان می‌باشد.

مشارکت نویسندگان

نویسندگان این مقاله در تمامی مراحل همکاری و مشارکت داشته‌اند. محدثه پوریانی، فاطمه زهرا قوامی فر و مریم صالح زاده: روش شناسی، تجزیه و تحلیل داده ها و نگارش پیش نویس مقاله. رقیه عباسعلی پورکبیر و نسرین ضیامجیدی: روش شناسی، ایده پردازی، اعتبارسنجی. مهدی بهمنی: روش شناسی، تحلیل رسمی، نگارش، بازبینی و ویرایش.

REFERENCES

1. Anand U, Dey A, Chandel AKS, Sanyal R, Mishra A, Pandey DK, et al. Cancer chemotherapy and beyond: Current status, drug candidates, associated risks and progress in targeted therapeutics. *Genes & Diseases* 2023; 10(4): 1367-401.
2. Bisoyi P. A brief tour guide to cancer disease. *Understanding cancer*: Elsevier; 2022; 1-20.
3. Amini M, Loocha MA, Zarean E, Pourhoseingholi MA. Global pattern of trends in incidence, mortality, and mortality-to-incidence ratio rates related to liver cancer, 1990–2019: a longitudinal analysis based on the global burden of disease study. *BMC Public Health* 2022; 22(1): 604.
4. Rumgay H, Arnold M, Ferlay J, Lesi O, Cabasag CJ, Vignat J, et al. Global burden of primary liver cancer in 2020 and predictions to 2040. *J Hepatol* 2022; 77(6): 1598-606.
5. Wu MY, Yiang GT, Cheng PW, Chu PY, Li CJ. Molecular targets in hepatocarcinogenesis and implications for therapy. *Journal of Clinical Medicine* 2018; 7(8): 213.
6. Farhood B, Raei B, Malekzadeh R, Shirvani M, Najafi M, Mortezaazadeh T. A review of incidence and mortality of colorectal, lung, liver, thyroid, and bladder cancers in Iran and compared to other countries. *Contemporary Oncology/Współczesna Onkologia* 2019; 23(1): 7-15.
7. Jafari N, Dolatkah R. Molecular epidemiology of liver cancer: Liver cancer incidence and mortality pattern worldwide. *International Journal of Life Science Research Archive* 2021; 1: 018-23.
8. Sun EJ, Wankell M, Palamuthusingam P, McFarlane C, Hebbard L. Targeting the PI3K/Akt/mTOR pathway in hepatocellular carcinoma. *Biomedicines* 2021; 9(11): 1639.
9. Darwesh R, Elbialy NS. Iron oxide nanoparticles conjugated curcumin to promote high therapeutic efficacy of curcumin against hepatocellular carcinoma. *Inorganic Chemistry Communications* 2021; 126: 108482.
10. Abdel-Lateef E, Mahmoud F, Hammam O, El-Ahwany E, El-Wakil E, Kandil S, et al. Bioactive chemical constituents of *Curcuma longa* L. rhizomes extract inhibit the growth of human hepatoma cell line (HepG2). *Acta Pharmaceutica* 2016; 66(3): 387-98.
11. Lee SC, Jee SC, Kim M, Kim S, Shin MK, Kim Y, et al. Curcumin suppresses the lipid accumulation and oxidative stress induced by benzo [a] pyrene toxicity in HepG2 cells. *Antioxidants* 2021; 10(8): 1314.
12. Thomas DD. Oxidative Stress. In: Roberts GCK(editor). *Encyclopedia of biophysics*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2013;1813-8.
13. Klisic A, Ahmad R, Haddad D, Bonomini F, Sindhu S. The role of oxidative stress in metabolic and inflammatory diseases. *Frontiers Media SA*; 2024; 1374584.
14. Rahal A, Kumar A, Singh V, Yadav B, Tiwari R, Chakraborty S, et al. Oxidative stress, prooxidants, and antioxidants: the interplay. *BioMed Research International* 2014; 2014(1): 761264.
15. Gupta RK, Patel AK, Shah N, Choudhary AK, Jha UK, Yadav UC, et al. Oxidative stress and antioxidants in disease and cancer: a review. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention* 2014; 15(11): 4405-9.
16. Fuloria S, Subramaniyan V, Karupiah S, Kumari U, Sathasivam K, Meenakshi DU, et al. Comprehensive review of methodology to detect reactive oxygen species(ROS) in mammalian species and establish its relationship with antioxidants and cancer. *Antioxidants* 2021; 10(1): 128.
17. Arzumanian VA, Kiseleva OI, Poverennaya EV. The curious case of the hepg2 cell line: 40 years of expertise. *International Journal of Molecular Sciences* 2021; 22(23): 13135.
18. SAIED I, MSHAMSUDDIN A. In HepG2 human liver cancer cell line. *Anticancer Research* 1998; 18: 4083-90.
19. Anand U, Dey A, Chandel AKS, Sanyal R, Mishra A, Pandey DK, et al. Cancer chemotherapy and beyond: Current status, drug candidates, associated risks and progress in targeted therapeutics. *Genes & Diseases* 2023; 10(4): 1367-401.
20. Bisoyi P. A brief tour guide to cancer disease. *Understanding cancer*: Elsevier; 2022; 1-20.
21. Amini M, Loocha MA, Zarean E, Pourhoseingholi MA. Global pattern of trends in incidence, mortality, and mortality-to-incidence ratio rates related to liver cancer, 1990–2019: a longitudinal analysis based on the global burden of disease study. *BMC Public Health* 2022; 22(1): 604.
22. Rumgay H, Arnold M, Ferlay J, Lesi O, Cabasag CJ, Vignat J, et al. Global burden of primary liver cancer in 2020 and predictions to 2040. *Journal of Hepatology* 2022; 77(6): 1598-606.

- 23.Hamida RS, Albasher G, Bin-Meferij MM. Oxidative stress and apoptotic responses elicited by nostoc-synthesized silver nanoparticles against different cancer cell lines. *Cancers* 2020; 12(8): 2099.
- 24.El-Naggar SA, Germoush MO, Abdel-Farid IB, Elgebaly HA, Alkhazendar AA. Phytochemical analysis and anticancer screening of some indigenous plants grown in Saudi Arabia. *Egyptian Journal of Cancer and Biomedical Research* 2018; 2(3): 15-23.
- 25.Abdelhameid FA, Samra YA, El-Shishtawy MM. Anti-cancer activity of hesperidin against hepatocellular carcinoma-induced in rats through upregulation of RIPK1 expression. *Medical Journal of Viral Hepatitis* 2022; 7(1): 15-20.
- 26.Del Follo-Martinez A, Banerjee N, Li X, Safe S, Mertens-Talcott S. Resveratrol and quercetin in combination have anticancer activity in colon cancer cells and repress oncogenic microRNA-27a. *Nutr Cancer* 2013; 65: 494-504.
- 27.Sies H. Oxidative stress: oxidants and antioxidants. *Experimental Physiology: Translation and Integration* 1997; 82(2): 291-5.
- 28.Reczek CR, Birsoy K, Kong H, Martínez-Reyes I, Wang T, Gao P, et al. A CRISPR screen identifies a pathway required for paraquat-induced cell death. *Nature Chemical Biology* 2017; 13(12): 1274-9.
- 29.Sosa V, Moliné T, Somoza R, Paciucci R, Kondoh H, LLeonart ME. Oxidative stress and cancer: an overview. *Ageing Research Reviews* 2013; 12(1): 376-90.
- 30.Irani K, Xia Y, Zweier JL, Sollott SJ, Der CJ, Fearon ER, et al. Mitogenic signaling mediated by oxidants in Ras-transformed fibroblasts. *Science* 1997; 275(5306): 1649-52.
- 31.Moloney JN, Cotter TG. ROS signalling in the biology of cancer. *Semin Cell Dev Biol* 2018; 80: 50-64.
- 32.Panaretakis T, Shabalina IG, Grandér D, Shoshan MC, DePierre JW. Reactive oxygen species and mitochondria mediate the induction of apoptosis in human hepatoma HepG2 cells by the rodent peroxisome proliferator and hepatocarcinogen, perfluorooctanoic acid. *Toxicology and Applied Pharmacology* 2001; 173(1): 56-64.
- 33.Tsikas D. Assessment of lipid peroxidation by measuring malondialdehyde(MDA) and relatives in biological samples: Analytical and biological challenges. *Analytical Biochemistry* 2017; 524: 13-30.
- 34.Kim GN, Lee YJ, Song JH, Jang HD. Curcumin ameliorates AAPH-induced oxidative stress in HepG2 cells by activating Nrf2. *Food Science and Biotechnology* 2013; 22: 241-7.
- 35.Aniya Y. Development of bioresources in Okinawa: understanding the multiple targeted actions of antioxidant phytochemicals. *Journal of Toxicologic Pathology* 2018; 31(4): 241-53.
- 36.Xu XY, Meng X, Li S, Gan RY, Li Y, Li HB. Bioactivity, Health Benefits, and Related Molecular Mechanisms of Curcumin: Current Progress, Challenges, and Perspectives. *Nutrients* 2018; 10(10):1553
- 37.Shah PM, Priya VV, Gayathri R. Quercetin-a flavonoid: a systematic review. *Journal of Pharmaceutical Sciences and Research* 2016; 8(8): 878.
- 38.Aghababaei F, Hadidi M. Recent advances in potential health benefits of quercetin. *Pharmaceuticals* 2023; 16(7): 1020.
- 39.Carrillo-Martinez EJ, Flores-Hernández FY, Salazar-Montes AM, Nario-Chaidez HF, Hernández-Ortega LD. Quercetin, a flavonoid with great pharmacological capacity. *Molecules* 2024; 29(5): 1000.
40. Jeon JS, Kwon S, Ban K, Kwon Hong Y, Ahn C, Sung JS, et al. Regulation of the intracellular ROS level is critical for the antiproliferative effect of quercetin in the hepatocellular carcinoma cell line HepG2. *Nutrition and Cancer* 2019; 71(5): 861-9.

Curcumin Attenuates Oxidative Stress in Human Hepatocellular Carcinoma (HepG2) Cells: A Study on Viability and Antioxidant Enzyme Activity

Pouryani M^{1,2}, Ghavamifar F^{1,2}, Ziamajidi N², Sahlehzadeh M³, Abbasalipourkabir R², Bahmani M^{2*}

¹Student Research Committee, Hamadan University of Medical Sciences, Hamadan, Iran, ²Department of Clinical Biochemistry, Hamadan University of Medical Sciences, Hamadan, Iran, ³Department of Orthodontics, Hamadan University of Medical Sciences, Hamadan, Iran

Received Date: 07 Jul 2025 Accepted Date: 04 Oct 2025

Abstract

Background & aim: Natural compounds, particularly curcumin, have emerged as promising agents in cancer prevention due to their potent antioxidant properties. Despite evidence supporting its bioactivity, further investigation into the specific effects of curcumin on oxidative stress markers in cancer cells is warranted. This study aimed to evaluate the impact of curcumin on oxidative stress status in the human hepatocellular carcinoma (HepG2) cell line.

Methods: This experimental study was conducted from 2024 to 2025. The viability of HepG2 cells after 24 and 48 hours of treatment with varying concentrations of curcumin (0, 3.9, 7.8, 15.6, 31.25, 62.5, 125, 250, 500, and 1000 μ M) was assessed using the MTT assay. To evaluate oxidative stress, total antioxidant capacity (TAC), total oxidant status (TOS), and malondialdehyde (MDA) levels, as well as the activities of antioxidant enzymes including superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT), were measured using commercial colorimetric kits. Data were analyzed using ANOVA, followed by Tukey's post-hoc test, after confirming normality via the Shapiro-Wilk test.

Results: MTT assay results demonstrated that curcumin significantly reduced HepG2 cell viability. The IC₅₀ value was determined to be 31.25 μ M at 48 hours. Two concentrations (one lower and one higher than IC₅₀) were selected for subsequent oxidative stress assays. Compared to the control group, treated cells exhibited significantly reduced TOS levels ($p < 0.01$ for 15.6 μ M; $p < 0.001$ for 31.25 and 62.5 μ M) and MDA levels ($p < 0.01$ for 15.6 μ M; $p < 0.001$ for 31.25 and 62.5 μ M). Conversely, TAC levels ($p < 0.05$ for 15.6 μ M; $p < 0.001$ for higher concentrations) and the activities of SOD and CAT enzymes were significantly elevated in curcumin-treated groups ($p < 0.01$ for 15.6 μ M; $p < 0.001$ for 31.25 and 62.5 μ M).

Conclusion: Curcumin exhibits significant antioxidant effects in HepG2 cells, characterized by a reduction in oxidative markers (TOS and MDA) and an enhancement of antioxidant defenses (TAC and enzyme activity). These findings suggest that curcumin may mitigate oxidative stress in hepatocellular carcinoma, supporting its potential as an adjunctive therapeutic agent.

Keywords: Curcumin, Oxidative stress, HepG2 cells, Antioxidant capacity, Malondialdehyde, Superoxide dismutase, Catalase.

*Corresponding author: Bahmani M, Department of Clinical Biochemistry, Hamadan University of Medical Sciences, Hamadan, Iran

Email: kh.moonikh@cfu.ac.ir

Please cite this article as follows: Pouryani M, Ghavamifar F, Ziamajidi N, Sahlehzadeh M, Abbasalipourkabir R, Bahmani M. Curcumin Attenuates Oxidative Stress in Human Hepatocellular Carcinoma (HepG2) Cells: A Study on Viability and Antioxidant Enzyme Activity. Armaghane-danesh 2025; 30(6): 835-850.

The scientific research journal Armaghan Danesh, affiliated with Yasuj University of Medical Sciences, is an open-access publication. All articles published in this journal