

Evaluation of the Effect of Curcumin Analog on Lipid Accumulation and SIRT1 and FAS Genes Expression in HepG2 Cells

Zahra Tahmasvand, Shima Lorestani, Shokoofe Noori*

Department of Clinical Biochemistry, School of Medicine, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

Received: July 20, 2022; Accepted: October 25, 2022

Abstract

Background and Aim: Non- alcoholic fatty liver is a disease that will lead to liver cirrhosis if not treated. Curcumin is the active substance of the rhizome of the turmeric plant, which has antioxidant, anti- inflammatory, antimicrobial, etc. properties. In the present study, the effects of curcumin analog on the expression of SIRT1 and FAS genes and the accumulation of triglycerides in fatty HepG2 cells (fatty liver model) have been investigated.

Methods: In this experimental study, after cultivating HepG2 cells in the right medium and conditions, the MTT test is used to choose the right dose for curcumin and its analog. After oiling the cells and treating them with the desired compounds, RNA was extracted and cDNA was made. Then, in order to investigate the effect of curcumin and its analog on the expression of SIRT1 and FAS genes, Real- Time PCR was used. SIRT1 activity was measured using a fluorometric kit and intracellular triglyceride levels were also measured using a triglyceride detection kit. And finally, the results were analyzed with t- test and one-way Anova statistical methods with p-value < 0.05.

Results: As a result of the treatment of HepG2 fatty cells (fatty liver model) with Cur, the relative expression of SIRT1 gene (1.52 ± 0.8) and its enzyme activity (2.1 ± 0.7) increased significantly compared to the control group (for gene expression: 0.9 ± 1.79 and for enzyme activity: 0.8 ± 1.66). On the other hand, the relative expression of the FAS gene (0.6 ± 1.69) compared to the control group (0.8 ± 2.03), as well as the accumulated triglycerides in these cells, and has decreased significantly. Also, in the group treated with FCur compared to the control group, the level of SIRT1 gene expression (2.76 ± 1.16) and enzyme activity (3.2 ± 1.21) increased significantly, and the level of FAS gene expression (0.2 ± 1.1) decreased significantly compared to the control group. The increase in SIRT1 enzyme activity in the FCur group has increased more compared to Cur, and the decrease in FAS gene expression in the treatment of cells with FCur has been significantly higher compared to Cur. The reduction of intracellular lipid was somewhat higher in the treatment with FCur compared to the treatment with Cur. (In all evaluations, p-value < 0.01 for curcumin and p-value < 0.001 for its derivative).

Conclusion: It seems that curcumin analog (FCur) can be used as a medicinal supplement in the treatment of fatty liver, along with other common treatment methods, due to its wide range of pharmacological activities, including its effects on lipid metabolism in the liver.

Keywords: Non- alcoholic fatty liver; curcumin; SIRT1; FAS; HepG

Please cite this article as: Tahmasvand Z, Lorestani S, Noori S. Evaluation of the Effect of Curcumin Analog on Lipid Accumulation and SIRT1 and FAS Genes Expression in HepG2 Cells. *Pejouhesh dar Pezeshki*. 2023;47(1):1-11.

*Corresponding Author: Shokoofe Noori; Email: shnoori@sbmu.ac.ir

بررسی اثر آنالوگ کورکومین بر تجمع چربی و بیان ژن‌های SIRT1 و FAS در سلول‌های HepG2

زهرا طهماسوند، شیما لرستانی، شکوفه نوری*

گروه بیوشیمی بالینی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران.

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۰۴/۲۹

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۸/۰۳

خلاصه

سابقه و هدف: کبد چرب غیر الکلی بیماری است که در صورت درمان نشدن به سیروز کبد منجر خواهد شد. کورکومین ماده مؤثره ریزوم گیاه زردچوبه است که دارای خواص آنتی‌اکسیدانی ضد التهابی ضد میکروبی و ... است. در مطالعه حاضر اثرات آنالوگ کورکومین (FCur) بر بیان ژن‌های SIRT1 و FAS و تجمع تری‌گلیسیریدها در سلول‌های HepG2 چرب شده (مدل کبد چرب) بررسی شده است.

روش کار: در این مطالعه تجربی، پس از کشت سلول‌های HepG2 در محیط و شرایط مناسب، به منظور انتخاب دوز مناسب برای کورکومین و آنالوگ آن از تست MTT استفاده شد. پس از چرب کردن سلول‌ها و تیمار آن‌ها با ترکیبات مورد نظر RNA استخراج و cDNA ساخته شد. سپس به منظور بررسی اثر کورکومین و آنالوگ آن روی بیان ژن‌های SIRT1 و FAS از Real-Time PCR استفاده شد. فعالیت SIRT1 با استفاده از یک کیت فلوئورومتریک و میزان تری‌گلیسیرید داخل سلولی با استفاده از کیت تشخیص تری‌گلیسیرید نیز اندازه‌گیری شد و در نهایت به دلیل مقایسه بین بیش از دو گروه با یکدیگر نتایج با روش آماری t-Test و one way Anova با $p\text{-value} < 0/05$ آنالیز قرار گرفت.

یافته‌ها: در اثر تیمار سلول‌های چرب شده HepG2 (مدل کبد چرب) با Cur، بیان نسبی ژن SIRT1 ($0/8 \pm 1/52$) و فعالیت آنزیمی آن ($0/7 \pm 2/1$) نسبت به گروه کنترل (برای بیان ژن: $1/79 \pm 0/9$ و برای فعالیت آنزیمی: $1/66 \pm 0/8$) به طور معناداری، افزایش داشته است. در مقابل بیان نسبی ژن FAS ($1/69 \pm 0/6$) نسبت به گروه کنترل ($2/03 \pm 0/8$) و همچنین تری‌گلیسیریدهای تجمع یافته درون این سلول‌ها به طور معناداری کاهش داشته است. همچنین در گروه تیمار شده با FCur در مقایسه با گروه کنترل میزان بیان ژن ($1/16 \pm 2/76$) و فعالیت آنزیمی ($1/21 \pm 3/2$) SIRT1 به طور معناداری افزایش یافته است و میزان بیان ژن FAS ($1/1 \pm 0/2$) در مقایسه با گروه کنترل کاهش معناداری داشته است. فعالیت آنزیمی SIRT1 در گروه FCur نسبت به Cur افزایش بیشتری داشته است، همچنین کاهش بیان ژن FAS در تیمار سلول‌ها با FCur در مقایسه با Cur به طور قابل ملاحظه‌ای بیشتر بوده است. کاهش چربی داخل سلولی در اثر تیمار با FCur در مقایسه با تیمار با Cur، تا حدودی بیشتر بود. (در تمام ارزیابی‌ها، برای کورکومین $p\text{-value} < 0/01$ و برای مشتق آن $p\text{-value} < 0/01$ است).

نتیجه‌گیری: به نظر می‌رسد که آنالوگ کورکومین (FCur) با توجه به دامنه وسیعی از فعالیت‌های فارماکولوژیک آن از جمله آثار آن روی متابولیسم لیپید در کبد، می‌تواند به عنوان یک مکمل دارویی در درمان کبد چرب در کنار سایر روش‌های درمانی رایج بهره‌برد.

واژگان کلیدی: کبد چرب غیر الکلی؛ کورکومین؛ FAS؛ HepG

به این مقاله، به صورت زیر استناد کنید:

Tahmasvand Z, Lorestani S, Noori S. Evaluation of the Effect of Curcumin Analog on Lipid Accumulation and SIRT1 and FAS Genes Expression in HepG2 Cells. *Pejouhesh dar Pezeshki*. 2023;47(1):1-11.

*نویسنده مسئول مکاتبات: شکوفه نوری؛ آدرس پست الکترونیکی: shnoori@sbmu.ac.ir

مقدمه

سندرم متابولیک مجموعه شرایطی در بدن است که به دنبال چاقی، اضافه وزن و مقاومت به انسولین در بدن رخ می‌دهد. مقاومت به انسولین عامل اتیولوژیک مشترک گروهی از بیماری‌هاست که مشتمل بر هیپرانسولینمی، افزایش سطح VLDL، تری‌گلیسیرید، کاهش سطح HDL، پرفشاری خون و بیماری کبد چرب غیرالکلی (NAFLD) است (۱). بیماری کبد چرب به طیف وسیعی از آسیب‌های کبدی، از کبد چرب ساده، استئاتوهپاتیتیس، فیبروز و در نهایت سیروز اشاره دارد. طیف ناهنجاری‌های هیستولوژیکی کبد چرب غیرالکلی (NAFLD) به صورت کبد چرب ساده (کبد چرب بدون آسیب‌های دیگر کبدی) و NASH به صورت فرم شدید آن تعریف می‌شود. در بیماری کبد چرب، تعادل در متابولیسم طبیعی لیپید از بین می‌رود، دریافت و یا سنتز از نو اسیدهای چرب نسبت به اکسیداسیون اسیدهای چرب افزایش می‌یابد که خود تحریک‌کننده افزایش سنتز تری‌گلیسیرید در مقابل افزایش اسیدهای چرب آزاد است. تجمع تری‌گلیسیرید در سلول‌های کبد منجر به کبد چرب خواهد شد (۲).

سیرتوئین‌ها آنزیم‌هایی داستیلازی هستند که نقش تنظیمی مهمی در فرآیندهای گوناگون سلول به ویژه فعال کردن کاتابولیسم لیپیدها و مهار آدیپوژن ایفا کرده و در سال‌های اخیر توجه بسیاری از محققان را به خود معطوف کرده‌اند (۳).

SIRT1 یکی از اعضای خانواده سیرتوئین‌هاست که بیشترین مطالعه روی آن انجام گرفته و دارای نقش‌های متعددی است. SIRT1 وضعیت استیلاسیون بسیاری از هدف‌های غیرهیستونی مثل مولکول‌های انتقال پیام، فاکتورهای نسخه‌برداری و آنزیم‌ها را تنظیم می‌کند. در سال‌های اخیر آثار مثبت SIRT1 در فعالیت‌های متابولیکی مرتبط با پاتوژن بیماری کبد چرب نشان داده شده است. این فعالیت‌ها شامل تنظیم قندخون، هومئوستاز لیپید، ترشح و حساسیت انسولین، پروسه‌های التهابی، استرس‌های اکسیداتیو، فعالیت میتوکندری و بتا اکسیداسیون،

اتوفاجی و آپوپتوز و عملکرد ماهیچه‌های قلبی و اسکلتی است (۴). فرایند لیپوژن توسط شبکه گسترده‌ای از ژن‌ها کنترل می‌شود که از مهم‌ترین آنها می‌توان به آنزیم‌های کلیدی مسیر لیپوژن مانند استیل کوآ کربوکسیلاز (ACC) و اسیدچرب سنتاز (FAS) اشاره کرد. آنزیم‌های FAS و ACC آنزیم‌های مهم سنتز لیپید هستند که نقص تنظیمی آنها در ایجاد و توسعه چاقی دارای اهمیت است (۵). امروزه توجه به استفاده از گیاهان دارویی در درمان بیماری‌ها رو به گسترش است. کورکومین یک ترکیب فیتوشیمیایی است که ماده مؤثره ریزوم گیاه زردچوبه با نام علمی *Curcuma longa* است. کورکومین دامنه وسیعی از فعالیت‌های فارماکولوژیک شامل فعالیت‌های آنتی‌اکسیدانی، ضدالتهابی، ضد میکروبی و خواص ضدسرطانی را از خود نشان می‌دهد (۶). Cur می‌تواند با القای بیان آنزیم‌های متالوپروتئیناز (MMPs) در کبد، به عنوان یک عامل ضدفیروز کبدی قوی شناخته شود (۷). در مجموع، Cur آثار حمایتی روی کبد داشته و می‌تواند از آسیب‌های کبدی جلوگیری کند. همچنین این ترکیب سبب بهبود آسیب‌های کبدی نیز می‌شود (۸، ۹). با این حال به دلیل فراهمی زیستی پایین کورکومین محدودیت‌هایی در استفاده از آن به عنوان ترکیب دارویی وجود دارد. ساخت مشتقات جدید کورکومین از جمله رویکردهایی است که برای رفع محدودیت‌های آن مورد استفاده قرار گرفته است. بنابراین در مطالعه حاضر آثار آنالوگ کورکومین بر بیان ژن‌های SIRT1 و FAS و تجمع تری‌گلیسیریدها در سلول‌های HepG2 چرب شده (مدل کبد چرب) بررسی شده است.

روش کار

در این مطالعه تجربی سلول‌های سرطانی HepG2 در محیط کشت DMEM که با FBS ۱۰ درصد غنی شده کشت داده شدند. آماده سازی استوک و تهیه غلظت‌های مختلف FCur و انجام cur.

از دانشکده شیمی دانشگاه شهید بهشتی تهیه شد و با توجه به فرمول شیمیایی C38H32FN3O7 و وزن ملکولی

g/mol ۶۶۱/۶۹، غلظت‌های (۸۰، ۹۰، ۱۰۰، ۱۱۰، ۱۲۰، ۱۵۰)، میکرومولار از Fcur در DMSO ۲ درصد تهیه شد.

Cur از شرکت مرک آلمان خریداری شد و با توجه به فرمول ملکولی (C₂₁ H₂₀ O₆) Cur و جرم ملکولی ۳۶۸/۳۸ g/mol، غلظت‌های (۸۰، ۹۰، ۱۰۰، ۱۱۰، ۱۲۰، ۱۵۰)، میکرومولار از cur در DMSO ۲ درصد تهیه شد.

ایجاد مدل سلول چرب شده با گلوکز (مدل کبد چرب):

برای ایجاد مدل سلول چرب شده با گلوکز (مدل کبد چرب)، سلول‌های HepG2 در پلیت شش تایی کشت داده شدند. به طوری که در هر چاهک ۳۰۰ هزار سلول قرار گرفت. بعد از ۲۴ ساعت که سلول‌ها به ته چاهک‌ها چسبیدند، به مدت ۴-۲ ساعت محیط بدون FBS به سلول‌ها اضافه شد (Fasting). سپس چاهک‌ها به سه قسمت دوتایی تقسیم شد. به دو چاهک اول غلظت ۵۰ mM گلوکز، به دو چاهک دوم ۱۰۰ mM گلوکز اضافه شد. دو چاهک به عنوان کنترل فقط محیط کامل اضافه شد. بعد از ۴۸ ساعت انکوباسیون محیط رویی خارج و رنگ‌آمیزی red Oil انجام شد. آنالیز OD هر کدام از غلظت‌های گلوکز نشان می‌دهد که بعد از ۴۸ ساعت انکوباسیون، میزان جذب نوری طبق قانون بیر- لامبرت شدت رنگ متناسب با مقدار تری‌گلیسیرید داخل سلولی بوده است.

بررسی سمیت سلولی با روش MTT:

برای بررسی اثر سایتوتوکسیسیته ترکیبات مورد نظر بر رشد و تکثیر سلول‌های سرطانی HepG2 و تعیین IC₅₀ از روش رنگ‌سنجی MTT استفاده شد. در این روش تعداد مناسبی سلول (ترجیحاً ۵۰۰۰ سلول در هر چاهک) در هر یک از چاهک‌ها کشت داده شد و اجازه داده شد تا سلول‌ها به کف پلیت چسبیده و به حالت پایدار خود در آیند. در چاهک‌های کنترل محیط کشت همراه با اتانول ۲۰ درصد اضافه شد و در چاهک‌های تست مقدار مناسبی از ماده Cur و Fcur، (۸۰، ۶۰، ۴۰، ۲۰، ۱۰، ۱۲۰، ۱۰۰، ۵ میکرومولار) اضافه شد و پلیت به مدت ۲۴ ساعت برای تاثیر ماده مورد نظر، انکوبه شد.

پس از اتمام زمان انکوباسیون محیط کشت رویی دور ریخته شد و به هر چاهک ۲۰ میکرولیتر محلول MTT اضافه شد و در داخل فویل آلومینیومی پیچیده شده و به مدت چهار ساعت در انکوباتور CO₂ در ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. در طی زمان انکوباسیون، MTT توسط سیستم سوکسینات دهیدروژناز که یکی از آنزیم‌های چرخه تنفسی میتوکندری‌هاست احیا شد. احیا و شکسته شدن این حلقه سبب تولید کریستال‌های آبی رنگ فورمازان می‌شود که در زیر میکروسکوپ به راحتی قابل تشخیص هستند. میزان رنگ تولید شده با تعداد سلول‌هایی که از نظر متابولیک فعال هستند، رابطه مستقیم دارد. کریستال‌های فورمازان در آب غیر محلول بوده و باید قبل از رنگ‌سنجی توسط ماده حلالی نظیر DMSO به حالت محلول در آیند. به این منظور ۱۰۰ میکرولیتر DMSO اضافه شد و به مدت یک ساعت در داخل انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. در نهایت جذب نوری محلول به دست آمده در طول موج ۵۷۰ نانومتر قرائت شد. تعداد سلول‌ها نیز محاسبه شد. برای رده سلولی ارتباط خطی بین تعداد سلول‌ها و جذب نوری محلول نهایی وجود دارد (۱۰).

استخراج RNA:

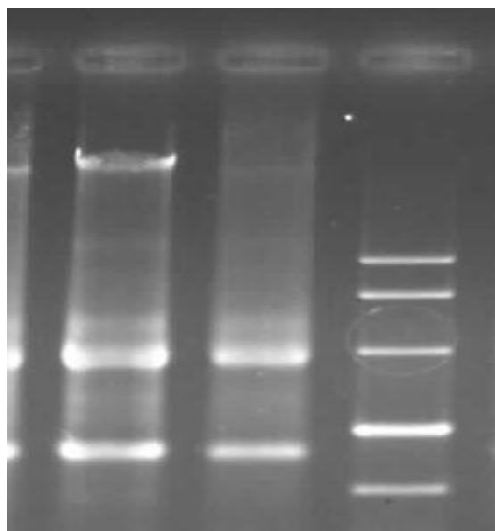
برای استخراج RNA از محلول گوانیدین فنول RNX - Plus (سیناکلون- ایران) استفاده شد که برای استخراج RNA نام از یک نمونه هموژن استفاده می‌شود. در این روش DNA و پروتئین در داخل فنول رسوب کرده و فاز آبی بالایی شامل تمام انواع RNA است.

بررسی کمی RNA استخراج شده:

بعد از استخراج، برای بررسی کمی RNA استخراج شده، محلول حاوی RNA با استفاده از نانودراپ از لحاظ کمی بررسی شد. محصول نهایی باید میزان OD $\frac{260}{280}$ بالاتر از ۱/۹ داشته باشد. اگر این نسبت کمتر از ۱/۹ باشد، نشان‌دهنده آلودگی با پروتئین یا آلودگی با ترکیبات آروماتیک مانند فنول و یا هر ترکیب دیگری که جذب نزدیک به ۲۸۰ نانومتر را داشته باشد است. همچنین آلودگی به DNA نیز این نسبت را کاهش خواهد داد (۱۱).

بررسی کیفی RNA استخراج شده:

برای بررسی کیفی RNA استخراج شده، از الکتروفورز ژل آگاروز استفاده شد. حدود یک تا دو میکرولیتر از نمونه مورد نظر را در درون چاهک ژل آگاروز اضافه و به مدت ۹۰ دقیقه با ولتاژ ۷۰-۹۰ الکتروفورز انجام شد. پس از اتمام الکتروفورز با اتیدیوم بروماید رنگ آمیزی شد و با دستگاه Gel documentation مورد بررسی قرار گرفت. دو باند در موقعیت ۸۰۰ و ۱۵۰۰ جفت باز دیده شد که مربوط به RNA ریبوزومی ۱۸S و ۲۸S بود. وجود این باندها نشان‌دهنده انسجام RNA است.



شکل ۱- الکتروفورز ژل آگارز برای نمونه‌های RNA استخراج شده است. وجود دو باند ۱۸S و ۲۸S روی ژل مشخص‌کننده کیفیت مطلوب RNA است.

سنتز cDNA:

چون مولکول RNA نیمه عمر کوتاهی دارد و سریع تجزیه می‌شود به منظور رفع این مشکل برای بررسی‌های بعدی به سنتز cDNA پرداختیم که رشته مکمل RNA است با این تفاوت که پایدارتر است و به عنوان رشته الگو در PCR استفاده می‌شود. برای این منظور از RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit ساخت شرکت Thermo Scientific استفاده شد.

بررسی بیان ژن با Real time PCR:

طراحی پرایمر:

برای بررسی بیان ژن با Real Time PCR پرایمر ژن‌های هدف طراحی شد. پرایمرهای مرتبط با ژن‌های SIRT1، FAS و B2M با استفاده از سایت NCBI و Oligo Analyzer از لحاظ آمپلیکونی که تکثیر خواهد شد، امکان تکثیر محصولات غیر آمپلیکون موردنظر، اندازه محصول، دمای ذوب و خواص ترمودینامیکی پرایمر بررسی شد. پرایمرها توسط شرکت پیشگام سنتز شدند. پرایمرهای لیوفیلیزه در غلظت ۱۰۰ پیکومول بر میکرولیتر به عنوان استوک تهیه شد و سپس غلظت ۱۰ پیکومول بر میکرولیتر از پرایمرها با مقدار لازم از آب مقطر استریل برای انجام مراحل بعدی آماده شدند و در نهایت پرایمرها برای استفاده بعدی در فریز -۸۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

جدول ۱- توالی پرایمرهای مورد استفاده در مطالعه.

β2M	Forward	5'-AGATGAGTATGCCTGCCGTG-3'
	Reverse	5'-GCCGCATCTTCAAACCTCCA-3'
SIRT1	Forward	5'-TGCGGGAATCCAAAGGATAA-3'
	Reverse	5'-CGAGCAAGATGCTGTTGCA-3'
FAS	Forward	5'-CGGTACGCGACGGCTGCCTG-3'
	Reverse	5'-GCTGCTCCACGAACCTCAAACACCG-3'

فرایند Real Time PCR با آماده سازی مخلوط واکنش طبق پروتکل Master Mix Ampliqon انجام شد. از آنالیز منحنی ذوب برای بررسی وجود محصولات غیر اختصاصی استفاده شد.

به منظور سنجش میزان فعالیت SIRT1 داخل سلول، سلول‌های HepG2 را تیمار کرده و سپس سنجش پروتئین بر روی آنها

اندازه‌گیری میزان فعالیت SIRT1 در رده سلولی HepG2
چرب شده (مدل کبد چرب):

طرفه (One-way ANOVA) تحت تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفتند. در تحلیل‌های آماری که نیاز است میانگین بین چندین گروه مقایسه و آزمون شود از آنالیز واریانس یک طرفه استفاده می‌شود.

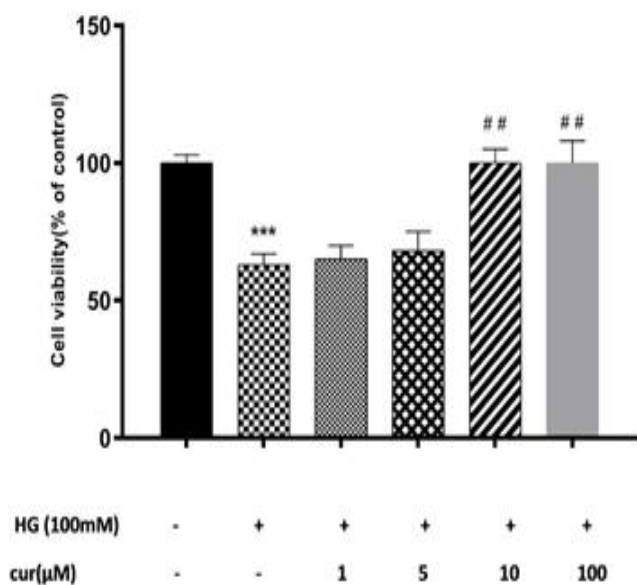
نتایج به صورت Mean + SD گزارش شده‌اند. برای بالا بردن صحت داده‌های به دست آمده آزمایش حداقل سه بار تکرار شد و میانگین به دست آمده برای آنالیز استفاده شد (۱۳). اختلاف‌ها زمانی معنادار تلقی شد که P-value کمتر از ۰/۰۵ است.

یافته‌ها

بررسی آثار Cur و FCur روی رشد رده سلول‌های HepG2 چرب شده (مدل کبد چرب):

بررسی اثر Cur روی رشد رده سلولی HepG2 چرب شده (مدل کبد چرب):

نتایج تیمار سلول‌ها نسبت به چاهک کنترل متناظر خود مقایسه و درصد سلول‌های زنده نسبت به کنترل محاسبه شد. نتایج این سنجش در نمودار ۱ قابل مشاهده است.



نمودار ۱- اثر غلظت‌های مختلف Cur روی رده سلول‌های

HepG2 پس از چرب شدن با گلوکز ۱۰۰ mM. این نتایج بر

اساس MEAN + SD در مقایسه با کنترل به صورت $P < 0/05$

معنادار است. داده‌های مشاهده شده حاصل میانگین حداقل

سه بار تکرار آزمایش است.

انجام شد. پس از تهیه یک میکس از بافر SIRT1، سوبسترای حاوی fluorophore، NAD، quencher و پروتئاز، نمونه پروتئین به آن اضافه و فلورسانس منتشر شده در طول موج تحریکی ۳۶۰ nm و طول موج تابشی ۴۶۰ nm اندازه‌گیری شد.

اندازه‌گیری توتال پروتئین لیزات سلولی:

برای سنجش پروتئین پس از تهیه لیزات سلولی اندازه‌گیری میزان پروتئین تام به روش BCA انجام گرفت. اساس این روش ترکیب کردن روش احیا کردن یون Cu^{++} به Cu^{+} توسط پروتئین در محیط قلیایی (روش بیوره) با روش حساس و اختصاصی شناسایی Cu^{+} به روش جذب سنجی، در حضور BCA است. در این روش، از شلاته کردن دو مولکول BCA توسط هر یون Cu^{+} ، رنگ بنفش شفافی با جذب در ۵۶۲ نانومتر ایجاد می‌شود. شدت این رنگ، تقریباً به صورت خطی، با غلظت پروتئین متناسب است (۱۲). برای انجام این کار از کیت BCA شرکت Thermo Fisher scientific استفاده شد.

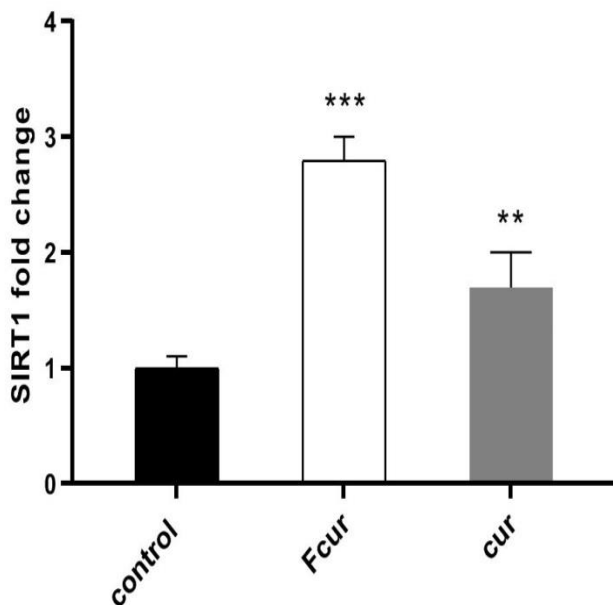
اندازه‌گیری تری‌گلیسیرید داخل سلولی در تیمار با گلوکز ۱۰۰ mM:

برای اندازه‌گیری تری‌گلیسیرید داخل سلولی در تیمار با گلوکز ۱۰۰ میلی مولار از کیت تشخیص تری‌گلیسیرید شرکت پارس آزمون استفاده شد. در این روش تری‌گلیسیرید داخل سلولی در لیزات سلولی اندازه‌گیری می‌شود. به این صورت که گلیسرول آزاد شده از اسیدهای چرب طی واکنش آنزیمی تولید پراکسید هیدروژن می‌کند، که این پراکسید هیدروژن توسط واکنش آنزیمی پراکسیداز تولید کینونیمین می‌کند که این ترکیب به صورت فتومتریک قابل اندازه‌گیری است و با تری‌گلیسیرید رابطه مستقیم دارد. برای تعیین دقیق مقدار چربی سلولی هر تیمار نسبت به کنترل میزان پروتئین در هر تیمار نیز سنجش شده و مقدار چربی بر حسب مقدار پروتئین قابل اندازه‌گیری است.

آنالیز آماری:

در نهایت تمامی داده‌های به دست آمده توسط نرم‌افزار GraphPad prism، spss16 و با استفاده از آزمون واریانس یک

سلول‌های HepG2 بیان ژن SIRT1 در گروه تیمار شده با Cur در مدت ۲۴ ساعت در مقایسه با گروه کنترل به طور معناداری افزایش یافته است. همچنین در گروه تیمار شده با FCur در مقایسه با گروه کنترل میزان بیان ژن SIRT1 به طور معناداری افزایش یافته است (نمودار ۳).



نمودار ۳- بیان نسبی ژن SIRT1 در رده سلولی HepG2 چرب شده، در تیمار با Cur و FCur نسبت به Untreated Control. اختلاف معنادار $p\text{-value} < 0.005$ با *، $p\text{-value} < 0.01$ با **، $p\text{-value} < 0.001$ با *** نشان داده شده است. داده‌های مشاهده شده حاصل میانگین حداقل سه بار تکرار آزمایش است.

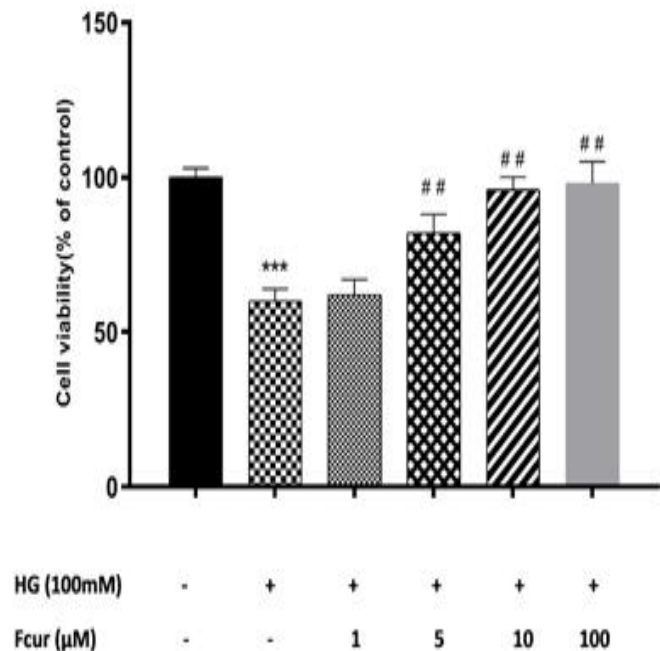
اثر Cur و FCur بر بیان نسبی ژن FAS در رده سلولی HepG2 چرب شده (مدل کبد چرب):

پس از انجام Real-time PCR برای نمونه‌های کنترل و تیمار، میزان تغییرات بیان ژن‌های FAS با استفاده از (مقادیر Ct) و بر اساس روش $2^{-\Delta\Delta Ct}$ میزان تغییرات بیان ژن FAS در هر گروه نسبت به کنترل محاسبه شد. نتایج به دست آمده با استفاده از آزمون آماری one way ANOVA تجزیه و تحلیل شد.

طبق نمودار زیر در سلول‌های HepG2 بیان ژن FAS در گروه تیمار شده با Cur در مدت ۲۴ ساعت در مقایسه با گروه کنترل

بررسی اثر FCur روی رشد رده سلولی HepG2 چرب شده (مدل کبد چرب):

نتایج تیمار سلول‌ها نسبت به چاهک کنترل متناظر خود مقایسه و درصد سلول‌های زنده نسبت به کنترل محاسبه شد. نتایج این سنجش در نمودار ۲ قابل مشاهده است.



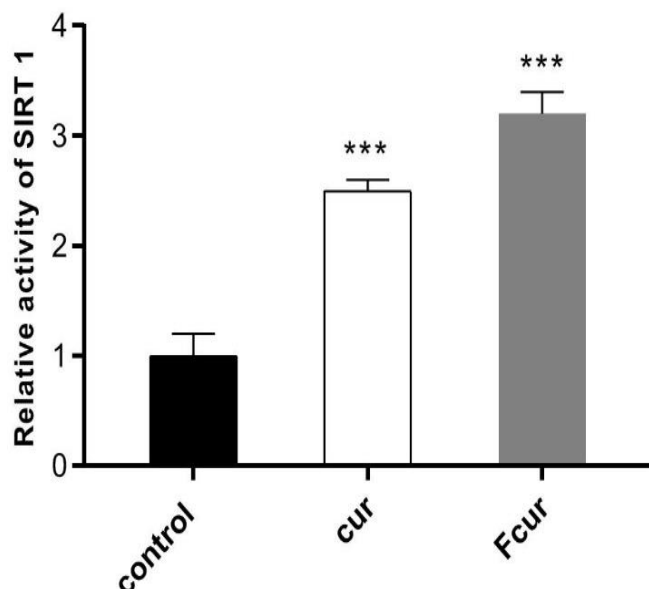
نمودار ۲- اثر غلظت‌های مختلف FCur روی رده سلول‌های HepG2 پس از چرب شدن با گلوکز ۱۰۰ mM. این نتایج بر اساس MEAN + SD در مقایسه با کنترل به صورت $P < 0.05$ معنادار است. داده‌های مشاهده شده حاصل میانگین حداقل سه بار تکرار آزمایش است.

بررسی اثر Cur و FCur بر بیان ژن‌های FAS و SIRT1 در سلول‌های HEPG2 چرب شده:

اثر Cur و FCur بر بیان نسبی ژن SIRT1 در رده سلولی HepG2 چرب شده (مدل کبد چرب):

پس از انجام Real-time PCR برای نمونه‌های کنترل و تیمار، میزان تغییرات بیان ژن SIRT1 با استفاده از (مقادیر Ct) و بر اساس روش $2^{-\Delta\Delta Ct}$ میزان تغییرات بیان ژن SIRT1 در هر گروه نسبت به کنترل محاسبه شد. نتایج به دست آمده با استفاده از آزمون آماری one way ANOVA تجزیه و تحلیل شد. در

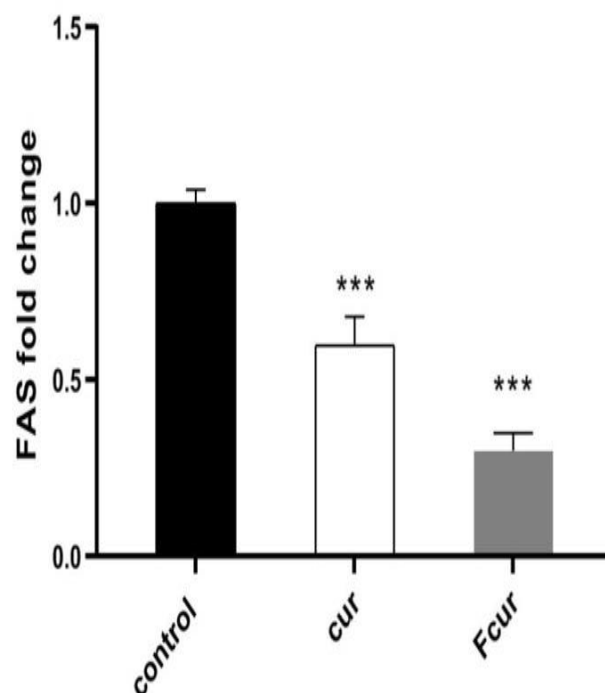
افزایش فعالیت در اثر تیمار با FCur در مقایسه با Cur کمی بیشتر بود ($p\text{-value} < 0/01$)، (نمودار ۵).



نمودار ۵- تغییرات فعالیت SIRT1 در رده سلول HepG2. تغییرات فعالیت SIRT1 در رده سلول HepG2 در تیمارهای مختلف نسبت به کنترل تیمار نشده. اختلاف معنادار $p\text{-value} < 0/005$ با *، $p\text{-value} < 0/01$ با **، $p\text{-value} < 0/001$ با *** نشان داده شده است. داده‌های مشاهده شده حاصل میانگین حداقل سه بار تکرار آزمایش است.

اثر Cur و FCur بر میزان چربی داخل سلولی در رده سلولی HepG2 چرب شده (مدل کبد چرب): نتایج نشان داد که میزان چربی داخل سلولی در سلول‌های HepG2 چرب شده تیمار شده با Cur و FCur در مقایسه با کنترل کاهش یافته است و این کاهش از نظر آماری معنادار بود ($p\text{-value} < 0/001$). همچنین کاهش چربی داخل سلولی در اثر تیمار با FCur در مقایسه با تیمار با Cur، تا حدودی بیشتر بود (نمودار ۶).

به طور معناداری کاهش یافته است. همچنین در گروه تیمار شده با FCur در مقایسه با گروه کنترل میزان بیان ژن FAS به طور معناداری کاهش یافته است. همچنین میزان کاهش بیان ژن FAS در تیمار سلول‌ها با FCur در مقایسه با Cur به طور قابل ملاحظه‌ای بیشتر است (نمودار ۴).

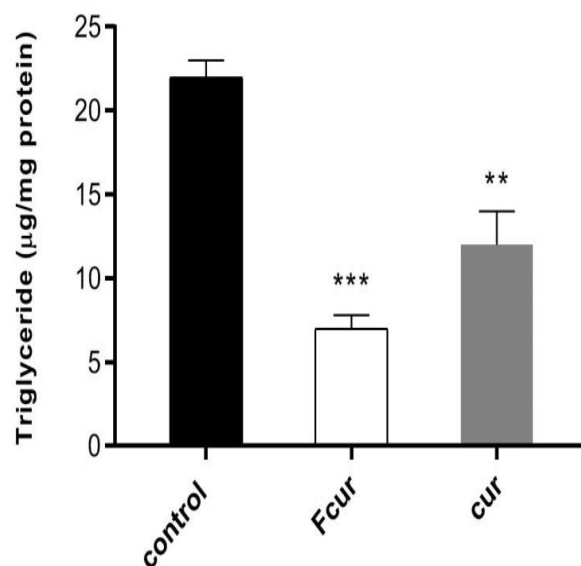


نمودار ۴- بیان نسبی ژن FAS در رده سلولی HepG2 چرب شده، در تیمار با Cur و FCur نسبت به Untreated Control. اختلاف معنادار $p\text{-value} < 0/005$ با *، $p\text{-value} < 0/01$ با **، $p\text{-value} < 0/001$ با *** نشان داده شده است. داده‌های مشاهده شده حاصل میانگین حداقل سه بار تکرار آزمایش است.

بیان نسبی ژن FAS:

اثر Cur و FCur بر میزان فعالیت SIRT1 در رده سلولی HepG2 چرب شده (مدل کبد چرب): نتایج نشان داد که فعالیت SIRT1 در سلول‌های HepG2 تیمار شده با Cur و FCur در مقایسه با کنترل تیمار نشده افزایش یافته است و این افزایش از نظر آماری معنادار بود. همچنین

SIRT1 مسیر کاتابولیسم لیپید را در کبد، از طریق تاثیر بر AMPK و مهار FAS، کنترل می‌کند. مسیر سیگنالینگ SIRT1/AMPK در لیپوژنز و جلوگیری از ایجاد کبد چرب نقش بسزایی دارد. فعالیت زیاد SIRT1 سبب کاهش در تجمع چربی در سلول‌های چربی و سلول‌های کبد می‌شود (۱۷). در مطالعه‌ای مشخص شد SIRT1 با داستیل‌کردن برخی فاکتورهای رونویسی که در چرب شدن کبد تاثیر می‌گذارند، متابولیسم لیپید و استرس اکسیداتیو کبدی را کنترل می‌کند. مطالعات نشان می‌دهند که در کبد چرب الکلی نسبت به کبد سالم فعالیت SIRT1 کاهش می‌یابد (۱۸)؛ بنابراین تنظیم این مسیر سیگنالینگ می‌تواند هدف درمانی مطلوبی در درمان کبد چرب باشد. مطالعات ما نشان داد در اثر تیمار سلول‌های چرب شده HepG2 (مدل کبد چرب) با Cur بیان نسبی ژن SIRT1 به طور معناداری، نسبت به گروه کنترل افزایش می‌یابد. در مطالعات دیگر گزارش شده است که Cur از طریق فعال کردن SIRT1 سبب تحریک فسفوریلاسیون AMPK می‌شود. در نتیجه متابولیسم چربی را افزایش می‌دهد (۱۹). بنابراین نتایج ما با نتایج حاصل از مطالعات قبلی در این زمینه مطابقت دارد. در مطالعه حاضر برای نخستین بار از FCur برای سنجش بیان نسبی ژن SIRT1 در سلول‌های چرب شده HepG2 (مدل کبد چرب) استفاده شد. نتایج نشان می‌دهند FCur بیان نسبی ژن SIRT1 در سلول‌های چرب شده HepG2 (مدل کبد چرب) را به طور معناداری نسبت به گروه کنترل افزایش می‌دهد. مقایسه تاثیر Cur و FCur در بیان نسبی ژن SIRT1 در سلول‌های چرب شده HepG2 (مدل کبد چرب)، نشان می‌دهد، FCur بیان نسبی SIRT1 را نسبت به Cur به مقدار بیشتری افزایش می‌دهد. در مطالعات پیشین نشان داده شده است که فعالیت آنزیمی SIRT1 می‌تواند تحت تاثیر کورکومین افزایش یابد (۱۹). مطالعه حاضر نشان می‌دهد Cur سبب افزایش معنادار فعالیت آنزیمی SIRT1 در سلول‌های چرب شده HepG2 (مدل کبد چرب) نسبت به سلول‌های کنترل، می‌شود. همچنین در این مطالعه برای نخستین بار نشان داده شد، FCur فعالیت آنزیمی SIRT1 در سلول‌های چرب شده HepG2 (مدل کبد چرب) را نسبت به کنترل، به طور معناداری افزایش



نمودار ۶- تغییرات میزان چربی داخل سلولی در رده سلولی HepG2. تغییرات میزان چربی داخل سلولی در رده سلولی HepG2 در تیمارهای مختلف نسبت به کنترل تیمار نشده. اختلاف معنادار با $p\text{-value} < 0/005$ ، $p\text{-value} < 0/01$ با **، $p\text{-value} < 0/001$ با ***، نشان داده شده است. داده‌های مشاهده شده حاصل میانگین حداقل سه بار تکرار آزمایش است.

بحث

تحقیق نشان داد که کورکومین تغییراتی در بیان ژن‌های دخیل در متابولیسم چربی ایجاد کرد و می‌تواند منجر به کاهش تجمع تری‌گلیسیرید و در نهایت بهبود کبد چرب شود. در مطالعه Majeed و همکاران نیز همین یافته به دست آمد (۱۴). کورکومین از طریق چندین مکانیسم مولکولی سبب بهبود NAFLD می‌شود، این مکانیسم‌ها شامل مهار آنزیم HMG-CoA ردوکتاز و کاهش سنتز تری‌گلیسیرید از طریق مهار آنزیم‌های کلیدی این مسیر است. همچنین از طریق کاهش جذب کلسترول از روده و فعال کردن آنزیم ۷-آلفا هیدروکسیلاز به کاهش سطح LDL و در نتیجه کاهش بیماری‌های قلبی عروقی نیز کمک می‌کند (۱۵). کورکومین نیز می‌تواند از طریق فعال کردن SIRT1 بر متابولیسم لیپید تاثیر گذارد (۱۶).

کند. همچنین مطالعه ما نشان داد که این تاثیر توسط FCur به طور معناداری نسبت به کورکومین بیشتر است و FCur در مقایسه با Cur تجمع تری‌گلیسیریدها داخل سلول‌های چرب شده HepG2 را بیشتر سرکوب می‌کند و در نتیجه این ترکیب در مهار کبد چرب مؤثرتر از Cur است.

ملاحظات اخلاقی

این مطالعه در دانشکده پزشکی شهید بهشتی بررسی و با کد اخلاق IR.SBMU.MSP.REC.1398.415 ثبت شده است.

تعارض منافع

نویسندگان، تعارض منافع را گزارش نکرده‌اند.

می‌دهد. مقایسه تاثیر Cur و FCur در افزایش فعالیت آنزیمی SIRT1 در سلول‌های چرب شده HepG2 (مدل کبد چرب)، نشان می‌دهد، FCur فعالیت آنزیمی SIRT1 را نسبت به Cur به مقدار بیشتری افزایش می‌دهد. همان طور که گفته شد SIRT1 در مسیر متابولیسم لیپید فاکتورهای پایین دست از جمله FAS را تحت تاثیر قرار می‌دهد. مقایسه تاثیر Cur و FCur بر میزان بیان نسبی ژن FAS در سلول‌های چرب شده HepG2 (مدل کبد چرب)، نشان می‌دهد FCur بیان نسبی ژن FAS را نسبت به Cur به مقدار بیشتری کاهش می‌دهد. در نتیجه تاثیر FCur در متابولیسم لیپید در سلول‌های کبدی نسبت به Cur، بیشتر است. کاهش بیان FAS در نهایت به کاهش تجمع تری‌گلیسیریدها درون سلول‌های چرب شده HepG2 (مدل کبد چرب) می‌انجامد.

در مطالعه‌ای نشان داده شد که در موش‌هایی با کبد چرب که با کورکومین تغذیه شدند، چربی سلول‌های کبدی به طور معناداری کاهش یافت که این کاهش توسط افزایش بیان ژن SIRT1 و در نتیجه کاهش بیان ژن FAS توجیه شد (۲۰). همچنین در مطالعات انجام شده روی تاثیر Cur بر میزان تری‌گلیسیرید و تجمع چربی داخل سلول‌های کبد، مشخص شد Cur در کاهش میزان چربی کبد مؤثر است (۲۱). مطالعه حاضر نشان می‌دهد که Cur سبب کاهش معنادار تری‌گلیسیرید در سلول‌های چرب شده HepG2 (مدل کبد چرب) نسبت به گروه کنترل می‌شود. همچنین پس از تیمار سلول‌های چرب شده HepG2 (مدل کبد چرب) با FCur نیز میزان تری‌گلیسیریدهای درون سلولی به طور معناداری نسبت به گروه کنترل کاهش می‌یابد. بنابراین نتایج ما با نتایج حاصل از مطالعات پیشین در این زمینه مطابقت دارد. با توجه به اینکه این مطالعه در شرایط *in vitro* انجام شده است لازم است برای تایید بیشتر نتایج حاصله در شرایط *in vivo* نیز انجام شود.

نتیجه‌گیری

مطالعه حاضر در کنار مطالعات پیشین نشان می‌دهد که کورکومین با تحت تاثیر قرار دادن متابولیسم چربی می‌تواند به کاهش تجمع چربی در کبد و در نتیجه بهبود کبد چرب کمک

References

1. Penninx BW, Lange SM. Metabolic syndrome in psychiatric patients: overview, mechanisms, and implications. *Dialogues in clinical neuroscience*. 2022.
2. Bence KK, Birnbaum MJ. Metabolic drivers of non-alcoholic fatty liver disease. *Molecular Metabolism*. 2021;1143 50:10.
3. Aggarwal S, Trehanpati N, Nagarajan P, Ramakrishna G. The Clock-NAD⁺-Sirtuin connection in nonalcoholic fatty liver disease. *Journal of Cellular Physiology*. 2022;237(8):3164-80.
4. Hashim HME, Ismail AM, Hassan HAA. Sirtuin 1 Gene Expression in Non-alcoholic Fatty Liver Disease and Its Correlation with Biochemical and Clinical Features. *The Egyptian Journal of Hospital Medicine*. 2022;88(1):2606-12.
5. Kaur K, Allahbadia G, Singh MD. Novo lipogenesis inhibitors: as the other innovative agents for therapy of metabolic diseases (obesity, NAFLD/NASH, CVD). *Adv Obes Weight Manag Control*. 2022;12(3):78-93.
6. Oglah MK, Mustafa YF, Bashir MK, Jasim MH, Mustafa YF. Curcumin and its derivatives: A review of their biological activities. *Syst Rev Pharm*. 2020;11(3):472.
7. Nan Y, Su H, Lian X, Wu J, Liu S, Chen P, et al. Pathogenesis of Liver Fibrosis and Its TCM Therapeutic Perspectives. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. 2022;2022.
8. Ghafouri-Fard S, Shoorei H, Bahroudi Z, Hussien BM, Talebi SF, Taheri M, et al. Nrf2-Related Therapeutic Effects of Curcumin in Different Disorders. *Biomolecules*. 2022;12(1):82.
9. Salahshoor M, Mohamadian S, Kakabaraei S, Roshankhah S, Jalili C. Curcumin improves liver damage in male mice exposed to nicotine. *Journal of traditional and complementary medicine*. 2016;6(2):176-83.
10. Tolosa L, Donato MT, Gómez-Lechón MJ. General cytotoxicity assessment by means of the MTT assay. *Protocols in in vitro hepatocyte research: Springer*; 2015. p. 333-48.
11. Dastgheib S, Irajie C, Assaei R, Koohpeima F, Mokarram P. Optimization of RNA extraction from rat pancreatic tissue. *Iranian journal of medical sciences*. 2014;39(3):282.
12. Chang SK, Zhang Y. Protein analysis. *Food analysis: Springer*; 2017. p. 315-31.
13. Wang J, Yu P, Xie X, Wu L, Zhou M, Huan F, et al. Bisphenol F induces nonalcoholic fatty liver disease-like changes: Involvement of lysosome disorder in lipid droplet deposition. *Environmental Pollution*. 2021;271:116304.
14. Majeed Y, Halabi N, Madani AY, Engelke R, Bhagwat AM, Abdesselem H, et al. SIRT1 promotes lipid metabolism and mitochondrial biogenesis in adipocytes and coordinates adipogenesis by targeting key enzymatic pathways. *Sci Rep*. 2021;11(1):1-19.
15. Jalali M, Mahmoodi M, Mosallanezhad Z, Jalali R, Imanieh MH, Moosavian SP. The effects of curcumin supplementation on liver function, metabolic profile and body composition in patients with non-alcoholic fatty liver disease: A systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Complementary therapies in medicine*. 2020;48:102283.
16. Iside C, Scafuro M, Nebbioso A, Altucci L. SIRT1 activation by natural phytochemicals: an overview. *Frontiers in pharmacology*. 2020;11:1225.
17. Jiang Z, Wang H, Yang Y, Yao Y, Ma H. Genistein Activated Sirt1-Ampk Signaling Mediated by Erβ-Foxo1-Nampt Pathway to Suppresses Fat Accumulation in Chicken Hepatocytes.
18. Cheng J, Liu C, Hu K, Greenberg A, Wu D, Ausman LM, et al. Ablation of systemic SIRT1 activity promotes nonalcoholic fatty liver disease by affecting liver-mesenteric adipose tissue fatty acid mobilization. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*. 2017;1863(11):2783-90.
19. Vafaeipour Z, Razavi BM, Hosseinzadeh H. Effects of turmeric (curcuma longa) and its constituent (curcumin) on the metabolic syndrome: An updated review. *Journal of Integrative Medicine*. 2022;20(3):193-203.
20. Lee DE, Lee SJ, Kim SJ, Lee H-S, Kwon O-S. Curcumin ameliorates nonalcoholic fatty liver disease through inhibition of O-GlcNAcylation. *Nutrients*. 2019;11(11):2702.
21. Shan D, Wang J, Di Q, Jiang Q, Xu Q. Steatosis induced by nonylphenol in HepG2 cells and the intervention effect of curcumin. *Food & Function*. 2022;13(1):327-43.