

Evaluation of cytotoxicity, antioxidant and DNA-Binding properties of turmeric extracts

Samaneh Noori¹,
Maryam Kolahi²,
Ali Reza Kiasat³,
Roya Mirzajani⁴,
Seyyed Mansour Seyyed Nejad⁵

¹ MSc Student in Phytochemistry, Faculty of Sciences, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran

² Assistant Professor, Department of Biology, Faculty of Sciences, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran

³ Professor, Department of Chemistry, Faculty of Sciences, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran

⁴ Associate Professor, Department of Chemistry, Faculty of Sciences, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran

⁵ Professor, Department of Biology, Faculty of Sciences, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran

(Received November 19, 2017 Accepted May 30, 2017)

Abstract

Background and purpose: Turmeric (*Curcuma longa* L.) has received much interest by researchers due to numerous biological properties. The aim of this study was to compare the anticancer and antioxidant properties of turmeric extracts on colon cancer cells Caco-2 and to survey DNA fragmentation by the extracts.

Materials and methods: In order to investigate the cytotoxicity and antioxidant properties and DNA fragmentation, turmeric extracts were prepared by maceration, ultrasonic-assisted extraction (UAE), and soxhlet. The effect of these extracts and curcumin on colon cancer cells Caco-2 was examined by MTT and NBT assay. Then, to study the DNA fragmentation by the extracts DNA-Binding was done.

Results: MTT assay showed that the lowest survival rates were observed for cells treated with the extracts of hexane and ethanol. The results of the NBT showed that the highest amount of percentage of free radicals reduction occurred with maceration extract, ultrasonic extract, and extraction by hexane and ethanol. According to DNA-Binding test, ultrasonic extraction was highly effective in degeneration of DNA.

Conclusion: Investigations show that different extracts of turmeric alone or in combination with chemical anticancer drugs could be used as a new approach in treatment of cancer. Turmeric extract using hexane and ethanol has a great potential in development of modern drugs and can be introduced as a useful source of new leading compounds or pharmacophores.

Keywords: anti-cancer, colon cancer, curcumin, DNA fragmentation, turmeric.

بررسی ویژگی های سمیت سلولی، آنتی اکسیدانی و اتصال به DNA عصاره های زرد چوبه

سمانه نوری^۱
مریم کلاهی^۲
علیرضا کیاست^۳
رویا میرزاجانی^۴
سید منصور سید نژاد^۵

چکیده

سابقه و هدف: زرد چوبه به سبب خواص بیولوژیکی بی شمار، از دیر باز مورد توجه محققان قرار گرفته است. هدف از این پژوهش مقایسه برخی خواص ضد سرطانی و آنتی اکسیدانی عصاره های زرد چوبه بر روی سلول های Caco-2 سرطان روده و بررسی شکست DNA توسط عصاره ها می باشد.

مواد و روش ها: به منظور بررسی خواص سیتوتوکسیسیته، آنتی اکسیدانی و شکست DNA، عصاره های زرد چوبه به سه روش ماسراسیون، اولتراسونیک و سوکسله تهیه گردید. اثر این عصاره ها و کورکومین بر روی سلول های Caco-2 سرطان روده به وسیله آزمون های MTT و NBT مورد بررسی قرار گرفت. سپس به منظور بررسی شکست DNA توسط نمونه کورکومین و عصاره ها، آزمون DNA-Binding انجام گرفت.

یافته ها: نتایج به دست آمده از روش MTT نشان داد که کم ترین بقا سلول های تیمار شده، مربوط به عصاره استخراجی با دو حلال هگزان و اتانول می باشد. بیش ترین میزان کاهش درصد رادیکال های آزاد به روش NBT مربوط به عصاره های ماسراسیون، اولترا سونیک و استخراج با دو حلال هگزان و اتانول است. و نتایج حاصل از بررسی آزمون DNA-Binding نشان داد که عصاره اولتراسونیک بیش ترین تاثیر را بر قطعه قطعه شدن DNA دارد.

استنتاج: بررسی های انجام شده نشان می دهد که عصاره های مختلف در زرد چوبه به تنهایی و یا همراه با داروهای شیمیایی ضد سرطان می تواند راهکاری نوین برای درمان سرطان باشد. عصاره استخراجی با دو حلال هگزان و اتانول زرد چوبه پتانسیل بالایی در توسعه داروهای مدرن دارد و می تواند به عنوان یک منبع مفید از ترکیبات جدید پیشرو یا فارماکوفورها معرفی گردد.

واژه های کلیدی: زرد چوبه، سرطان روده، شکست DNA، ضد سرطانی، کورکومین.

مقدمه

است که از آن چندین ساقه ی هوایی بیرون می آید. برگ های آن سبز روشن، شبیه به برگ موز به درازای نیم تا یک متر می باشد که در قسمت پایین ساقه

زرد چوبه^۱ با نام علمی *Curcuma longa* L گیاهی است متعلق به خانواده زنجبیل^۲، که ارتفاع آن به یک و نیم متر می رسد و دارای ساقه ی زیرزمینی (ریزوم) متورم

^۱ Turmeric
^۲ Zingiberaceae

Email: m.kolahi@scu.ac.ir

مؤلف مسئول: مریم کلاهی - اهواز، دانشگاه شهید چمران اهواز، دانشکده علوم، گروه زیست شناسی

۱. دانشجوی کارشناسی ارشد فیتوشیمی، دانشکده علوم، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران

۲. استادیار، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران

۳. استاد، گروه شیمی، دانشکده علوم، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران

۴. دانشیار، گروه شیمی، دانشکده علوم، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران

۵. استاد، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۹/۲۹ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات: ۱۳۹۵/۹/۲۹ تاریخ تصویب: ۱۳۹۶/۳/۹

بدون دمبرگ و در قسمت بالا، برگ‌های کامل دیده می‌شود. این گیاه بومی نواحی شرقی شبه قاره ی هند و مناطق حاره‌ی جنوبی آسیا بوده و طبیعت آن گرم و خشک می‌باشد. از جمله ترکیبات شیمیایی این گیاه می‌توان به نشاسته، الکل، زینجی برن، کاروون، فلائدرن، آلکالوئید، اسانس روغنی فرار، کورکومون و ماده رنگی کورکومین اشاره نمود که یک ماده بسیار موثر در درمان بسیاری از بیماری‌ها از جمله سرطان می‌باشد (۱، ۲). سرطان بیماری تکثیر بیش از حد سلول‌ها است که در آن سلول‌ها توانایی تقسیم و رشد عادی خود را از دست می‌دهند و این موضوع منجر به تغییر و تحول در متابولیسم سلول، اختلال در نظم آپوپتوز، تهاجم، رگ‌زایی و متاستاز می‌شود. آمارها نشان می‌دهد که بیش از ۱۰۰ نوع سرطان شناسایی شده است و در سراسر جهان بیش از ۷ میلیون مرگ و میر در سال مربوط به بیماری سرطان است، که این آمار از مرگ و میر ناشی از ایدز (HIV)، مالاریا و حتی سل بیش‌تر است (۳). تخمین زده می‌شود که تعداد موارد جدید سرطان به ۱۵ میلیون در سال تا سال ۲۰۲۰ برسد که ۷۰ درصد آن در کشورهای در حال توسعه پیش‌بینی می‌شود (۴). سرطان روده بزرگ، سومین سرطان شایع در زنان و مردان و دومین علت شایع مرگ ناشی از سرطان در ایالات متحده است. در سال ۲۰۰۸، ۱۴۸۸۱۰ مورد جدید سرطان روده تشخیص داده شد که از این بین ۹ درصد از مرگ ناشی از سرطان، در زنان و ۸ درصد در مردان گزارش شد (۵). از روزگاران قدیم محصولات طبیعی گیاهی به عنوان منابع مفید طب سنتی برای درمان بسیاری از بیماری‌ها از جمله عفونت‌ها و بیماری‌های بدخیم مورد استفاده قرار گرفته‌اند (۶). بررسی‌های مختلف نشان می‌دهد که عصاره‌های برخی گیاهان دارویی فعالیت‌های ضدسرطانی را در دو شرایط درون شیشه و درون موجود زنده نشان داده‌اند (۷، ۱۰). تعداد فزاینده‌ای از مطالعات نیز نشان می‌دهد که گیاهان دارویی با روش‌های مختلف از جمله افزایش سیستم

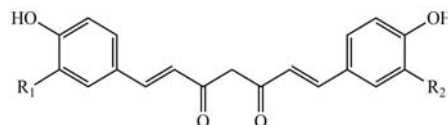
ایمنی بدن، القای تمایز سلول‌ها، مهار فعالیت تلومراز و القاء آپوپتوز سلول‌های سرطانی، اثر ضد سرطانی از خود بروز می‌دهند (۱۴، ۱۱). گیاهان دارویی و مشتقات ترکیبات گیاهی آن‌ها به‌طور فزاینده به عنوان مکملی سودمند برای درمان سرطان شناخته شده‌اند. مطالعات بالینی زیادی نیز اثرات شفا بخش داروهای گیاهی را در ترکیب با داروهای شیمیایی در بقا، مدولاسیون سیستم ایمنی بدن، و کیفیت زندگی (QOL) در بیماران مبتلا به سرطان گزارش کرده‌اند (۱۵). اثرات ضد سرطانی زرد چوبه بدین منظور با اهمیت بوده که مصرف این ماده با دوز بالا، مانع از تکثیر سلول‌های سرطانی شده و به سلول‌های سالم آسیبی وارد نمی‌کند (۱۸، ۱۶). بیشتر درمان‌های ضد سرطانی حاضر، درمان‌های تک هدفی^۳ است که برخی از این نوع درمان‌ها به خاطر ناکارایی، عدم ایمنی و هزینه‌ی بالا، درمان‌های چندان مطمئنی نیستند، بنابراین بسیاری از شرکت‌های داروسازی به گسترش درمان‌های چند هدفی روی آورده‌اند (۱۹). با توجه به پیچیدگی و دخالت مسیرهای سیگنالینگ متعدد در ایجاد و پیشرفت سرطان، باید دارویی طراحی شود که بتواند با مولکول‌های متعددی برهم‌کنش داشته باشد. بسیاری از محصولات گیاهی از جمله کورکومین، به‌طور طبیعی چند هدفی می‌باشد و در مقایسه با داروهای صناعی، ارزان‌تر بوده و کارایی بیش‌تری می‌تواند دارا باشد. چند هدفی^۴ بودن کورکومین، کلید پتانسیل درمانی آن در برابر سرطان و بسیاری از بیماری‌ها است (۲۰).

کورکومین، 1,7-bis(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-1,6-heptadiene-3,5-dione ترکیب پلی‌فنلی با فرمول مولکولی $C_{21}H_{20}O_6$ می‌باشد. از مشتقات آن می‌توان به دمتوکسی کورکومین و بیس دمتوکسی کورکومین اشاره نمود (۲۰) (شکل شماره ۱).

³ Mono- targeted

⁴ Multi- targeted

پس از تهیه ریزوم زرد چوبه هندی از بازار اهواز و شناسایی آن توسط بخش گیاه‌شناسی گروه زیست‌شناسی دانشگاه شهید چمران اهواز، نمونه با استفاده از آسیاب پودر گردید.



$R_1 = R_2 = \text{OCH}_3$: Curcumin
 $R_1 = \text{OCH}_3, R_2 = \text{H}$: Demethoxycurcumin
 $R_1 = R_2 = \text{H}$: Bis-demethoxycurcumin

شکل شماره ۱: ساختار کورکومین و مشتقات آن

عصاره‌گیری از گیاه

عصاره‌های اتانولی گیاه زرد چوبه به سه روش ماسراسیون، اولتراسونیک و سوکسله تهیه گردید.

عصاره‌گیری به روش ماسراسیون: در ابتدا ۱۰ گرم از پودر زرد چوبه وزن گردید. سپس ۱۲۰ mL اتانول ۹۶ درصد به‌عنوان حلال افزوده شد. پودر گیاه به مدت ۴۸ ساعت در تماس با حلال بر روی همزن مغناطیسی قرار گرفت و بعد از مدت تعیین شده، آن را صاف کرده و به منظور تغلیظ کردن آن از دستگاه روتاری استفاده گردید. سپس عصاره به دست آمده به منظور خشک شدن درون آون با دمای 45°C قرار داده شد (۲۴).

عصاره‌گیری به روش اولتراسونیک: به ۱۰ گرم از پودر زرد چوبه ۱۲۰ mL اتانول ۹۶ درصد به‌عنوان حلال به آن افزوده شد و در معرض امواج صوتی با فرکانس ۴۰ KHz به مدت ۶ دقیقه درون حمام اولتراسونیک قرار گرفت. عصاره به دست آمده صاف گردیده و توسط روتاری تحت خلا، حلال آن تبخیر گردید. سپس درون آون با دمای 45°C به مدت ۱ روز نگاه‌داری شد (۲۵).

عصاره‌گیری به روش سوکسله: ۱۰ گرم از پودر زرد چوبه درون انگشتانه دستگاه سوکسله قرار داده شد. سپس ۱۲۰ mL اتانول ۹۶ درصد درون بالن ریخته و بالن درون حمام روغن، تحت شرایط رفلاکس قرار داده شد و عمل عصاره‌گیری به مدت ۴ ساعت ادامه یافت. بعد از اتمام این فرایند، عصاره به دست آمده روتاری شد و در آون با دمای 45°C قرار گرفت (۲۴).

استخراج توسط دو حلال هگزان و اتانول: ۱۱ گرم از پودر زرد چوبه وزن و به آن ۱۲۰ mL هگزان افزوده

پتانسیل ضد سرطانی کورکومین در برابر انواع مختلفی از سرطان‌ها از جمله لوکمی، لیمفوما، سرطان‌های گوارشی، ادراری-تناسلی، سینه، رحم و تومورهای مغزی و ... نشان داده‌است که شواهد بسیار محکمی در تایید اثر ضد توموری کورکومین و عملکرد آن بر روی سلول‌های توموری وجود دارد (۱۶، ۲۱، ۲۲). مکانیسم‌هایی که کورکومین به واسطه‌ی آن‌ها موجب مهار تومور می‌شود شامل ترکیبی از خواص آنتی‌اکسیدانی، ضد التهابی، ضد رگ‌زایی، ضد متاستازی، مهار سیکل سلولی و پروآپتوتیک است که از طریق تنظیم ژن‌ها و مولکول‌های دخیل در این مسیرها، اثرات مهاری خود بر سرطان را القا می‌کند (۲۳). با توجه به اهمیت بالای کورکومین در فرایندهای زیستی و هم‌چنین در درمان بسیاری از بیماری‌ها، در این پژوهش سعی بر آن شد که عصاره‌های زرد چوبه به سه روش ماسراسیون، اولتراسونیک و سوکسله (اتانول طبی ۹۶ درصد به‌عنوان حلال) تهیه گردد. سپس به منظور بررسی خواص سیتوتوکسی‌سیتی و آنتی‌اکسیدانی زرد چوبه، اثر این عصاره‌ها بر روی سلول‌های Caco-2 سرطان روده به وسیله آزمون‌های MTT و NBT مورد بررسی قرار گرفت. در نهایت به منظور بررسی تغییرات ساختار DNA در برهم‌کنش با عصاره‌های مختلف، آزمون DNA-Binding انجام شد.

مواد و روش‌ها

آماده سازی نمونه

شدند. پس از ۲۴-۱۶ ساعت محیط رویی سلول‌ها مجدداً تخلیه شده و سلول‌ها با $150 \mu\text{L}$ از کورکومین استاندارد و انواع عصاره‌های زرد چوبه در چهار غلظت $20 \mu\text{g mL}^{-1}$ و 10 ، 5 ، به مدت ۲۴ ساعت تیمار شدند. پس از تخلیه‌ی محیط کشت سلول‌های حاوی تیمارهای مختلف، $10 \mu\text{L}$ MTT (5 mg mL^{-1})، $0/005$ MTT در $1000 \mu\text{L}$ PBS افزوده و حداقل $3/5$ ساعت در دمای 37°C انکوبه شد. سپس $100 \mu\text{L}$ دی متیل سولفو کسید افزوده و ۱۰ دقیقه در دمای آزمایشگاه انکوبه شدند و جذب در طول موج 560 nm قرائت گردید. نتایج بر اساس مقایسه جذب نمونه‌ها در طول موج 560 nm نسبت به گروه کنترل گزارش گردید. سپس مقادیر IC_{50} برای نمونه استاندارد و عصاره‌های زرد چوبه محاسبه گردید (۲۷).

بررسی اثر تیمار کورکومین و عصاره‌های مختلف زرد چوبه بر میزان^۸ ROS درون سلولی سلول‌های Caco-2 توسط آزمون^۹ NBT

سلول‌های Caco-2 در پلیت‌های ۹۶ خانه‌ای و در هر خانه به تعداد $10^3 \times 4$ سلول در حجم $150 \mu\text{L}$ محیط DMEM حاوی 10% FBS کشت داده شدند. پس از ۲۴ ساعت محیط رویی سلول‌ها مجدداً تخلیه شده و سلول‌ها با $150 \mu\text{L}$ از کورکومین استاندارد و انواع عصاره‌های زرد چوبه در چهار غلظت $20 \mu\text{g mL}^{-1}$ و 10 ، 5 ، به مدت ۲۴ ساعت تیمار شدند. پس از تخلیه‌ی محیط کشت سلول‌ها حاوی تیمارهای مختلف، $100 \mu\text{L}$ NBT ($0/01 \text{ g}$) در 100 mL فسفات بافر سالین) که به نسبت ۱ به ۱۰ با PBS رقیق شده، به آن افزوده و به مدت ۲ ساعت در دمای 37°C انکوبه گردید. سپس به نمونه‌ها $100 \mu\text{L}$ فسفات بافر سالین افزوده و با دور 5000 و به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ انجام شد. پس از جدا سازی مایع رویی، $60 \mu\text{L}$ دی

شد. پودر گیاه به مدت ۲۴ ساعت در تماس با حلال بر روی همزن مغناطیسی قرار گرفت. سپس، آن را صاف کرده و پودر زردچوبه صاف شده به مدت یک ساعت جهت خشک شدن کامل، درون آون با دمای 45°C قرار داده شد. به 10 گرم از پودر حاصله 120 mL اتانول ۹۶ درصد افزوده شد. پودر گیاه به مدت ۴۸ ساعت در تماس با حلال بر روی همزن مغناطیسی قرار گرفت و بعد از مدت تعیین شده، صاف و به منظور تغلیظ کردن آن از دستگاه روتاری استفاده گردید (۲۶). سپس عصاره به دست آمده به منظور خشک شدن درون آون با دمای 45°C قرار داده شد.

بررسی اثر سمیت سلولی

کشت سلولی

رده‌ی سلولی آدنوکارسینوما‌ی اپی تلیال روده‌ی بزرگ انسانی Caco-2، (NCBI code: C139) از انستیتو پاستور ایران خریداری شد. سلول‌ها در محیط کشت^۵ DMEM حاوی 10% سرم گاوی (FBS) در فلاسک کشت سلولی 25 cm^2 (Nunc دانمارک) و در شرایط مناسب در انکوباتور 37°C و $5\% \text{ CO}_2$ کشت داده شدند (۲۷).

بررسی اثر تیمار کورکومین و عصاره‌های مختلف

زرد چوبه بر سلول‌های Caco-2 توسط روش^۶ MTT به منظور بررسی اثر کورکومین استاندارد و عصاره‌های زردچوبه بر رشد و تکثیر سلول‌های سرطانی، از روش رنگ‌سنجی^۶ MTT استفاده شد. این روش بر اساس توانایی سلول‌های زنده در تبدیل نمک تترازولیوم به فورمازان^۷ نامحلول عمل می‌کند. جهت انجام آزمایش، سلول‌های Caco-2 پس از شمارش، تریپسینه و پس از سانتریفیوژ رسوب داده شدند. سپس در پلیت ۹۶ خانه‌ای و در هر خانه به تعداد $10^3 \times 4$ سلول در حجم $150 \mu\text{L}$ محیط DMEM کشت داده

^۸ Reactive oxygen species

^۹ Nitro Blue Tetrazolium

^۵ Dulbecco's Modified Eagle's Medium

^۶ Methyl Thiazolyl Tetrazolium

^۷ Formazan

آنالیز آماری داده ها

آزمون نرمال داده‌های به دست آمده با نرم افزار SPSS انجام گردید، مقایسه میانگین داده‌ها با روش دانکن انجام شد. نمودارهای مقایسه میانگین با نرم افزار Excel (۲۰۱۰) رسم شدند.

یافته ها

نتایج سنجش زیست مانی سلول‌های سرطانی تیمار شده با کورکومین و عصاره‌های مختلف زرد چوبه از مقایسه داده‌های به دست آمده از سنجش درصد زنده‌مانی سلول‌های سرطانی تیمار شده با نمونه استاندارد کورکومین در زمان ۲۴ ساعت در چهار غلظت $20 \mu\text{g mL}^{-1}$ و 15 ، 10 ، 5 مشخص شد که میزان زنده‌مانی در غلظت‌های مختلف با هم اختلاف معنی‌داری دارند و با افزایش غلظت میزان درصد مهار کنندگی افزایش می‌یابد ($p < 0/05$) همان گونه که در شکل شماره ۲-۱ مشاهده می‌گردد بیش‌ترین درصد زنده‌مانی سلول‌ها، در غلظت $5 \mu\text{g mL}^{-1}$ و کم‌ترین درصد زنده‌مانی در غلظت‌های $20 \mu\text{g mL}^{-1}$ و 15 بوده است. داده‌های حاصل از سنجش زنده‌مانی سلول‌ها برای عصاره به روش ماسراسیون نشان داد که بیش‌ترین درصد زنده‌مانی سلول‌ها، در غلظت $5 \mu\text{g mL}^{-1}$ و کم‌ترین درصد زنده‌مانی در غلظت‌های $20 \mu\text{g mL}^{-1}$ و 15 بوده است (شکل شماره ۲-۲). (B)

داده‌های حاصله از زنده‌مانی سلول‌ها در زمان ۲۴ ساعت، برای نمونه سوکسله زردچوبه حاکی از آن است که بیش‌ترین درصد زنده‌مانی سلول‌ها، در غلظت $5 \mu\text{g mL}^{-1}$ و کم‌ترین درصد زنده‌مانی در غلظت $20 \mu\text{g mL}^{-1}$ بوده است (شکل شماره ۲-۳). (D)

نتایج حاصله از زنده‌مانی سلول‌ها برای نمونه استخراج شده با دو حلال هگزان و اتانول نشان داد که بیش‌ترین درصد زنده‌مانی سلول‌ها، در غلظت $5 \mu\text{g mL}^{-1}$ و 10 بوده که با یکدیگر اختلاف معنی‌داری نداشتند. این در حالی است که کم‌ترین درصد زنده‌مانی در غلظت‌های $20 \mu\text{g mL}^{-1}$ و 15 بوده است ($p < 0/05$) (شکل شماره ۲-۴). (E)

متیل سولفو کسید و $60 \mu\text{L}$ پتاسیم هیدروکسید mol L^{-1} به رسوب حاصل از مرحله قبل اضافه و جذب در طول موج 540 nm قرائت گردید. نتایج بر اساس میزان جذب فورمازون تولید شده، گزارش گردید (۲۸).

بررسی ویژگی های DNA- Binding کورکومین و

عصاره‌های مختلف زرد چوبه

بررسی میزان DNA fragmentation با الکتروفورز ژل آگارز: برای تهیه ژل آگارز ۱ درصد، $0/7$ گرم از پودر آگارز وزن شده و در 70 میلی‌لیتر بافر 1×10^4 TAE در یک ارلن کوچک حل گردید و توسط دستگاه ماکروویو به دمای جوش رسید تا آگارز به خوبی حل شود. پس از رسیدن دمای ژل به حدود 50°C ، $2 \mu\text{L}$ سیف‌استین اضافه و ژل در قالب مخصوص ریخته شد.

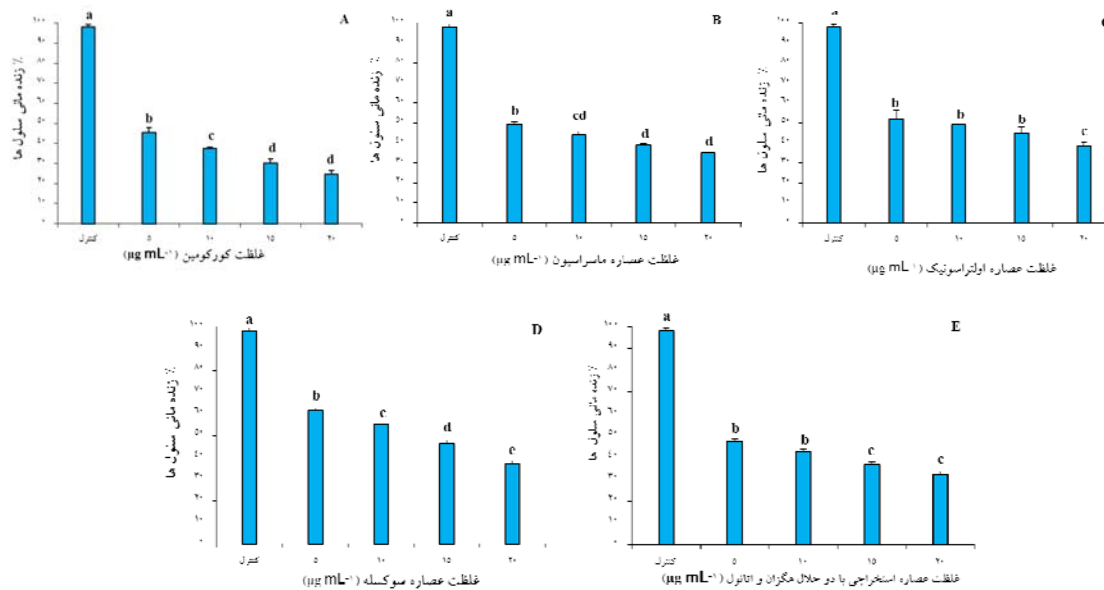
بارگذاری ژل و انجام الکتروفورز: در ابتدا $15 \mu\text{L}$ از نمونه استاندارد و عصاره‌های زردچوبه با غلظت 20 mL^{-1} را با $15 \mu\text{L}$ از DNA خالص مخلوط کرده و به خوبی همزده شد و سپس به مدت ۴ ساعت درون انکوباتور با دمای 37°C قرار داده شدند. پس از تهیه ژل آگارز، $5 \mu\text{L}$ از ترکیب عصاره و DNA با $2 \mu\text{L}$ بافر سنگین کننده^{۱۱} مخلوط و درون ژل، بارگذاری گردید. هم‌چنین جهت اطمینان از صحت طول قطعه تکثیر شده، $3/5 \mu\text{L}$ نشانگر مولکولی^{۱۲} استفاده شد. پس از بارگیری چاهک‌ها جریان برق 100 ولت (میزان ولتاژ مورد استفاده در الکتروفورز ژل آگارز تقریباً 5 ولت به ازاء هر سانتیمتر فاصله بین دو قطب است) در تانک الکتروفورز برقرار گردید. پس از پایان الکتروفورز جهت مشاهده باندهای تفکیک شده، ژل در دستگاه ترانس لومیناتور^{۱۳} قرار داده شد و با تابش نور فرابنفش با طول موج 302 nm بر روی ژل، DNA و میزان قطعه قطعه شدن آن مورد بررسی قرار گرفت (۲۹).

¹⁰ Tris-Acetate-EDTA

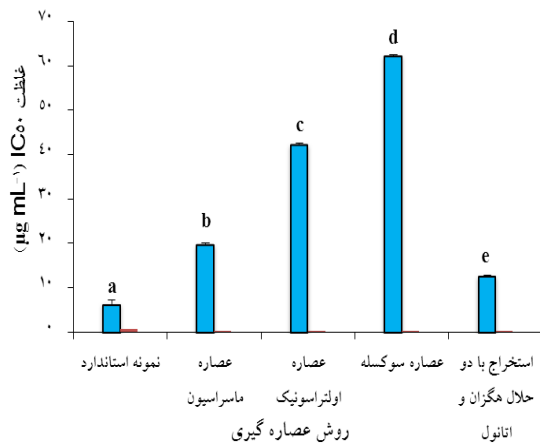
¹¹ Loading dye

¹² Lader

¹³ Transilluminator



شکل شماره ۲: زنده‌مانی سلول‌های سرطان روده تیمار شده با نمونه استاندارد و عصاره‌های زرد چوبه در غلظت‌های مختلف به مدت ۲۴ ساعت: A: نمونه استاندارد کورکومین. B: عصاره ماسراسیون. C: عصاره اولتراسونیک. D: عصاره سوکسله. E: عصاره استخراج شده با دو حلال هگزان و اتانول. حروف مشابه در بالای ستون‌ها معرف عدم تفاوت معنی‌دار بین میانگین‌های مقادیر درصد زنده‌مانی سلول‌ها برای هر نمونه در غلظت‌های متفاوت از عصاره‌های مختلف می‌باشد.



شکل شماره ۳: میزان IC₅₀ نمونه استاندارد و عصاره‌های مختلف زردچوبه بر سلول‌های سرطان روده. مقادیر ذکر شده میانگین سه بار تکرار ± خطای استاندارد می‌باشد. حروف مشابه در بالای ستون‌ها معرف عدم تفاوت معنی‌دار بین میانگین‌های مقادیر IC₅₀ هر نمونه در روش‌های مختلف عصاره‌گیری می‌باشد.

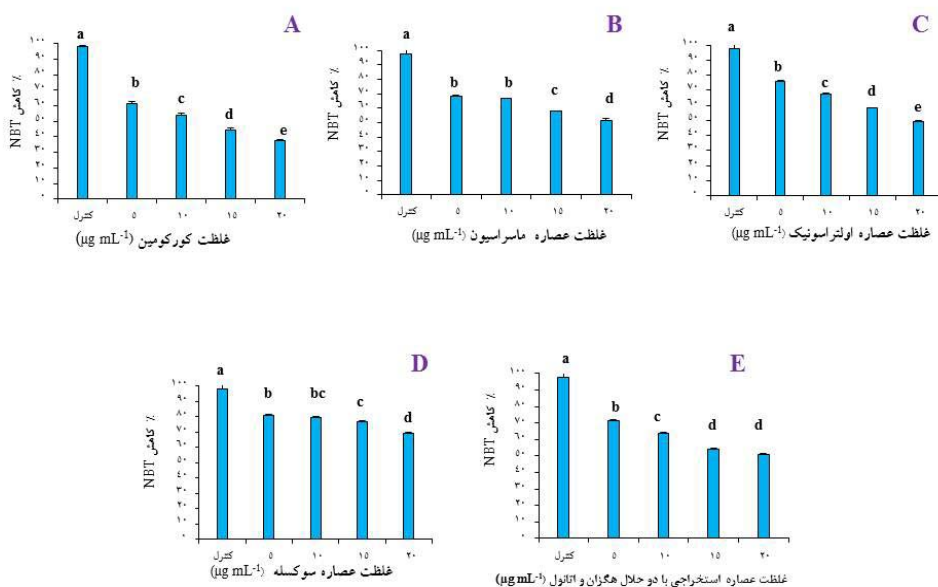
بررسی IC₅₀ به دست آمده از نمونه استاندارد و عصاره‌ها بر روی سلول‌های سرطان روده در زمان ۲۴ ساعت نشان داد که نمونه استاندارد کورکومین با اختلاف معنی‌داری نسبت به عصاره‌ها کم‌ترین IC₅₀ را به خود اختصاص داد. این در حالی است که بعد از نمونه استاندارد کم‌ترین IC₅₀ مربوط به عصاره استخراجی با دو حلال هگزان و اتانول می‌باشد. هم‌چنین عصاره به دست آمده به روش سوکسله با اختلاف معنی‌داری نسبت به نمونه استاندارد و سایر عصاره‌ها بیش‌ترین IC₅₀ را دارا بود ($p < 0.05$) (شکل شماره ۳).

نتایج اندازه گیری کاهش رادیکال های آزاد سلول های سرطانی تیمار شده با کورکومین و عصاره های مختلف زرد چوبه

از مقایسه داده های به دست آمده از میزان درصد رادیکال های آزاد سلول های سرطانی تیمار شده با نمونه استاندارد کورکومین و هم چنین عصاره های ماسراسیون، اولتراسونیک، سوکسله و استخراج با دو حلال هگزان و اتانول زرد چوبه در چهار غلظت 10 ، 15 و $20 \mu\text{g mL}^{-1}$ ، مشخص شد که بیش ترین میزان کاهش NBT در زمان 24 ساعت، در غلظت $5 \mu\text{g mL}^{-1}$ و کم ترین آن در غلظت $20 \mu\text{g mL}^{-1}$ بود و گروه های تیمار شده نسبت به کنترل اختلاف معنی داری نشان دادند (شکل شماره ۴).



شکل شماره ۶: آزمون DNA Binding برای نشان دادن الگوی قطعه قطعه شدن DNA با استفاده از نمونه استاندارد کورکومین و عصاره های زرد چوبه. A: نشانگر مولکولی B عصاره ی ماسراسیون. C: اولتراسونیک. D: سوکسله. E: استخراج با دو حلال هگزان و اتانول زرد چوبه F: DNA خالص. G: نمونه استاندارد کورکومین



شکل شماره ۴: میزان ROS درون سلولی سلول های سرطان روده تیمار شده با نمونه استاندارد کورکومین و عصاره های مختلف زرد چوبه به مدت 24 ساعت. A: نمونه استاندارد کورکومین. B: عصاره ماسراسیون. C: عصاره اولتراسونیک. D: عصاره سوکسله. E: عصاره استخراج شده با دو حلال هگزان و اتانول. حروف مشابه در بالای ستون ها معرف عدم تفاوت معنی دار بین میانگین های مقادیر درصد کاهش NBT برای هر نمونه در غلظت های متفاوت از عصاره های مختلف می باشد.

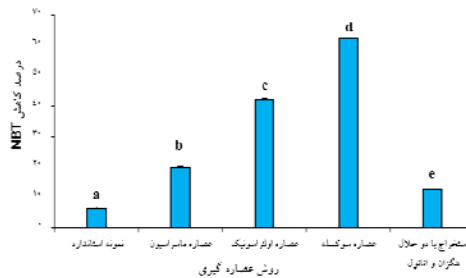
غلظت 20 mg L^{-1} قادر به قطعه قطعه شدن DNA^{۱۴} بوده اند (شکل شماره ۶).

بحث

در سال‌های اخیر، توجه زیادی به شناسایی مواد شیمیایی گیاهی موجود در رژیم غذایی با توان مهارکنندگی فرآیندهای مرتبط با سرطان متمرکز شده است. عصاره گیاهان یا مواد تشکیل دهنده آن‌ها، به عنوان ترکیباتی با اثرات باز دارندگی در مقابل مواد شیمیایی که موجب سرطان می‌شوند، شناخته شده‌اند (۳۰). زردچوبه به عنوان یک ترکیب گیاهی ضد سرطان امید بخش، شناخته شده است. زردچوبه، پودر خشک به دست آمده از ریزوم *Curcuma longa*، برای قرن‌ها در مناطق مختلف جهان استفاده شده و به فعالیت‌های درمان‌های مختلف از جمله فعالیت آنتی‌اکسیدانی، ضد التهابی، ضد سرطانی، ضد رشد، ضد درد مفاصل، ضد افسردگی، ضد پیری، ضد دیابت، ضد میکروبی و فعالیت‌های افزایش دهنده حافظه مرتبط شده است. مهم‌ترین ترکیب موجود در زردچوبه، کورکومین بوده که به طور گسترده با بیش از ۵۶۰۰ استناد مورد مطالعه قرار گرفته است (۳۱).

در این پژوهش به منظور معرفی روش بهینه عصاره‌گیری، خواص سیتوتوکسی‌سیتی و آنتی‌اکسیدانی و شکست DNA به وسیله عصاره‌های مختلف زردچوبه با چهار روش ماسراسیون، اولتراسونیک، سوکسله و استخراج با استفاده از دو حلال هگزان و اتانول مورد بررسی قرار گرفت. بررسی خواص سیتوتوکسی‌سیتی و آنتی‌اکسیدانی این عصاره‌ها بر روی سلول‌های Caco-2 سرطان روده به وسیله آزمون‌های MTT و NBT مورد بررسی قرار گرفت. سپس به منظور بررسی شکست DNA توسط عصاره‌های این گیاه، آزمون DNA-Binding صورت

از مقایسه داده‌های به دست آمده از میزان کاهش درصد رادیکال‌های آزاد سلول‌های سرطانی تیمار شده با عصاره‌های مختلف زرد چوبه در غلظت $20 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ به روش‌های ماسراسیون، اولتراسونیک، سوکسله و استخراج با دو حلال هگزان و اتانول مشخص شد که تفاوت میانگین میزان کاهش NBT در زمان ۲۴ ساعت، در گروه‌های تیمار نسبت به گروه کنترل در سطح $0.05 < p$ معنی‌دار بود. میزان کاهش رادیکال‌های آزاد در گروه‌های تیمار شده با عصاره ماسراسیون، اولتراسونیک و استخراج با دو حلال هگزان و اتانول اختلاف معنی‌داری نداشت. هم‌چنین، میزان کاهش درصد رادیکال‌های آزاد در این سه گروه نسبت به گروه تیمار شده با عصاره سوکسله با اختلاف معنی‌داری بیش‌تر بود. بیش‌ترین میزان کاهش درصد رادیکال‌های آزاد مربوط به گروه تیمار شده با نمونه استاندارد بود (شکل شماره ۵).



شکل شماره ۵: میزان ROS درون سلولی تیمار شده توسط

نمونه استاندارد کورکومین و عصاره‌های مختلف زرد چوبه در غلظت $20 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ حروف مشابه در بالای ستون‌ها معرف عدم تفاوت معنی‌دار بین میانگین‌های مقادیر درصد کاهش NBT هر نمونه در روش‌های مختلف عصاره‌گیری می‌باشد.

نتایج بررسی آزمون DNA-Binding

بررسی ترکیب DNA و عصاره‌های مختلف زردچوبه و هم‌چنین نمونه استاندارد کورکومین تیمار شده بر روی ژل آگاروز حاکی از آن بود که علاوه بر توان کورکومین در قطعه قطعه کردن DNA، به ترتیب عصاره‌های استخراج شده با دو حلال هگزان و اتانول، ماسراسیون، سوکسله و اولتراسونیک زردچوبه در

¹⁴ DNA fragmentation

سلول سرطانی کبد انسان^{۱۵} در شرایط آزمایشگاهی نشان دادند که کورکومین خالص و عصاره اتانولی آن پتانسیل بالقوه‌ای در پیشگیری و درمان سرطان دارد (۳۳). Srivastava و همکارش در سال ۲۰۱۵ نشان دادند که در دوزهای بالایی از کورکومین بر روی سلول‌های سرطانی، آپوپتوز در سلول‌ها ایجاد شده و حداکثر کاهش رشد را نشان داد. هم‌چنین عصاره‌های گیاه زرد چوبه در شرایط آزمایشگاهی در برابر سمیت سلول‌های سرطانی رده Hep2 انتخابگری نشان داده و بسیار موثر عمل کردند (۳۴). بررسی‌های حاصل از NBT بر روی عصاره‌ها بیانگر کاهش درصد رادیکال‌های آزاد سلول‌های سرطانی توسط عصاره‌های مختلف بود. طبق بررسی Ak و همکارش در سال ۲۰۰۸ اثر مهارکنندگی تولید رادیکال‌های سوپر اکسید توسط کورکومین، از α -tocopherol، trolox، BHA^{۱۶} و BHT^{۱۷} (آنتی اکسیدان‌های سنتزی که به‌طور گسترده‌ای در صنایع غذایی، برای جلوگیری از فساد مواد غذایی و اکسید شدن آن‌ها به کار می‌روند کم‌تر می‌باشد) (۳۷، ۳۵). براساس کارهای Iqbal و همکاران در سال ۲۰۰۳، کورکومین از طریق فعال کردن برخی آنزیم‌های متابولیزه‌کننده از جمله گلوکوتایون ترانسفرازها و ردوکتازها، در موش سرطانی موجب خنثی کردن رادیکال‌های آزاد مشتق شده از مواد شیمیایی سرطان‌زا می‌شود (۳۸). غلظت‌های به کار رفته در این مطالعه، بیانگر نقش عصاره‌های مختلف زردچوبه در کاهش میزان رادیکال‌های آزاد بود.

آپوپتوز، مرگ برنامه‌ریزی شده سلول می‌باشد که با یک سری از ویژگی‌ها مشخص می‌شود. یکی از شاخص‌های برجسته و مهم آپوپتوز، قطعه قطعه شدن DNA می‌باشد (۳۹). انجام این آزمون با نمونه استاندارد کورکومین و عصاره‌های مختلف زرد چوبه، شکسته شدن DNA به قطعات مختلف را نشان داد. نتایج حاصل

گرفت. علاوه بر کورکومین استاندارد، همه عصاره‌های مختلف زردچوبه فعالیت ممانعت‌کنندگی رشد سلول‌های سرطانی معنی‌داری نسبت به نمونه‌های شاهد نشان دادند. طبق بررسی‌های صورت گرفته بر روی خواص سیتوتوکسیسیته عصاره‌های زردچوبه بر روی سلول‌های Caco-2 سرطان روده، بعد از نمونه استاندارد کورکومین با $IC_{50} = 6/49 \mu g mL^{-1}$ کم‌ترین IC_{50} مربوط به عصاره استخراجی با دو حلال هگزان و اتانول بود ($IC_{50} = 12/77 \mu g mL^{-1}$). Noori و همکارانش در سال ۲۰۱۶، با استفاده از دستگاه HPLC مقدار کورکومین حاصله از روش‌های مختلف عصاره‌گیری زردچوبه را در مقایسه با کورکومین بررسی نمودند. بررسی آن‌ها نشان داد که بیش‌ترین مقدار کورکومین حاصله از این روش به ترتیب مربوط به عصاره‌گیری به روش ماسراسیون و اولتراسونیک بوده و عصاره سوکسله کم‌ترین مقدار کورکومین را دارا بود. بررسی خواص ضد سرطانی در این گزارش نیز نشان داد که کم‌ترین بقا سلول‌های سرطانی تیمار شده مربوط به عصاره استخراجی با دو حلال هگزان و اتانول بوده که علت آن می‌تواند خروج ترکیبات غیر قطبی با حلال هگزان و استخراج ترکیبات قطبی (از جمله کورکومین) با حلال دوم یعنی اتانول باشد (۳۲). همان‌گونه که در این بررسی مشاهده شد بعد از عصاره استخراجی با دو حلال هگزان و اتانول، کم‌ترین بقا سلول‌های سرطانی تیمار شده مربوط به عصاره‌گیری به روش ماسراسیون و اولتراسونیک بوده و عصاره سوکسله توانایی کم‌تری در از بین بردن سلول‌های سرطانی دارد. از آن‌جا که فعالیت ضد سرطانی کورکومین موجود در زردچوبه به اثبات رسیده است می‌توان گفت نتایج حاصل از این بررسی با نتایج حاصل از تعیین میزان کورکومین در عصاره‌های مختلف زردچوبه توسط Noori و همکارانش هم‌خوانی دارد (۳۲). Naama و همکارانش در سال ۲۰۱۰ طی بررسی اثر کورکومین و عصاره اتانولی زردچوبه در مقایسه با دوکسوروبیسین به عنوان کنترل مثبت، بر روی

¹⁵ Human hepato cellular livercarcinoma

¹⁶ Butylated hydroxyanisole

¹⁷ Butylated hydroxytoluene

از بررسی آزمون DNA-Binding بیانگر آن است که همه عصاره‌ها در جاتی از قطعه قطعه شدن را نشان دادند و توانستند ماده ژنتیکی را استحاله یافته کرده و آن را به قطعات کوچک‌تر تبدیل کنند که مکانیسم برخی از داروهای ضد سرطان برای القای مرگ سلولی می‌باشد (شکل شماره ۶). عمده داروهای مورد استفاده در شیمی‌درمانی می‌توانند در دسته‌های زیر قرار بگیرند که شامل عوامل آلکیل‌کننده، آنتی‌متابولیت‌ها، آنترا سیکلین‌ها، ممانعت‌کننده‌های توپوایزومرازها و عوامل ضد تومور هستند. تمام این داروها بر روی تقسیم سلولی اثر می‌گذارند و یا مانع سنتز شدن DNA می‌گردند (۴۰). درمان پزشکی رایج در از بین بردن سلول‌های سرطانی از طریق فرآیندی به نام نکروز صورت می‌گیرد که شامل مرگ سلول‌های سرطانی با استفاده از روش‌های خارجی همانند شیمی‌درمانی سمی، تشعشع و یا جراحی است. این در حالی است که برخی ترکیبات گیاهی از جمله کورکومین، سلول‌های سرطانی را از طریق فرآیندی به نام آپوپتوز از بین می‌برند که طی یک برنامه‌ریزی منظم چرخه زندگی سلول به پایان می‌رسد و اجازه داده می‌شود که با یک سلول سالم جدید جایگزین شود تا موجب نگه‌داشتن بافت، اندام و سلامت بدن گردد. کورکومین موجب فعال شدن ژن‌های خاصی (ژن P53) شده که موجب توقف عملکرد سلولی می‌شوند (۴۱). کورکومین موجب توقف بخشی از فرآیندی می‌شود که در آن دو رشته DNA سلول بیمار تقسیم می‌شوند. کورکومین با برهم کنش با بسیاری از پیام‌رسان‌های شیمیایی مختلف که در سلول‌های سرطانی منحصر به فرد هستند، از تکثیر انواع خاصی از سلول‌های سرطانی ممانعت کرده اما تکثیر سلول‌های سالم را متوقف نمی‌کند (۴۲). در بررسی‌های Cao و همکاران در سال ۲۰۰۶ بر روی عدم آسیب DNA در دوزهای پایین نشان می‌دهد که سطح پایین کورکومین ($5 \mu\text{g mL}^{-1}$) موجب تحریک آسیب بر DNA نشده و ممکن است نقش آنتی‌اکسیدانی در

بروز سرطان ایفا کند. اما در دوزهای بالا ($1 \mu\text{g mL}^{-1}$) کورکومین باعث تنش اکسیداتیو و آسیب به ساختار DNA سلول سرطانی می‌شود. داده‌های به دست آمده از این پژوهش، فرضیه این که کورکومین نقش دوگانه متضاد در بروز سرطان ایفا می‌کند را تقویت نمود. هم‌چنین، آسیب گسترده DNA میتوکندریایی ممکن است یک رویداد اولیه تحریک مرگ سلولی ناشی از کورکومین باشد (۴۳) که با گزارش داده شده از این بررسی در غلظت $20 \mu\text{g mL}^{-1}$ هم‌خوانی دارد. Link و همکاران در سال ۲۰۱۳ شواهدی برای تغییرات میتلاسیون DNA به واسطه کورکومین نشان دادند و آن را به‌عنوان مکانیسم احتمالی درمان سرطان روده بزرگ ارائه دادند. در مقایسه با ترکیبات متیله‌کننده غیر اختصاصی، کورکومین تغییرات میتلاسیون DNA را فقط در زیر مجموعه ژن‌های متیله‌کننده فراهم می‌کند که دیدگاه‌های جدیدی برای مکانیسم‌های اثر بخشی قوی این ترکیب دارویی در رژیم غذایی را فراهم می‌کند (۴۴). در بررسی انجام شده علاوه بر کورکومین، عصاره مختلف زرد چوبه نیز قادر به برهم کنش قابل ملاحظه با DNA بودند.

بنابراین به نظر می‌رسد عصاره‌های مورد بررسی به دلیل دارا بودن ترکیبات فنلی و خاصیت آنتی‌اکسیدانی ناشی از حضور این ترکیبات بالاخص کورکومین، از طریق کاهش میزان ROS و توانایی قطعه کردن DNA به قطعات کوچک‌تر به ترتیب منجر به درمان یا از بین بردن سلول‌های سرطانی می‌شود. عصاره استخراجی با دو حلال هگزان و اتانول زردچوبه پتانسیل بالایی در توسعه داروهای مدرن دارد و می‌تواند به‌عنوان یک منبع مفید از ترکیبات جدید پیشرو یا فارماکوفورها معرفی گردد.

سیاسگزاری

(پژوهانه‌های شماره ۳۱۵۷۹، ۹۴/۳/۰۲ و شماره ۳۱۵۸۰، ۹۴/۳/۲) در قالب پایان‌نامه کارشناسی ارشد تشکر و قدردانی می‌نمایند.

نگارندگان از معاونت پژوهشی دانشگاه شهید چمران اهواز به لحاظ تامین هزینه‌های این پژوهش

References

- Haji sharifi A. Secrets of medicinal plants. Tehran:Hafeze Novin; 2003.
- Bahrami M, Afshari Z, Ahmadi F, Mohiti MJ, Jalali-Khanabadi BA, Moradi A. Evaluation of phenolic content of turmeric hydroalcoholic extract in iran by singleton method. J Shahid Sadoughi Univ Med Sci. 2013; 21(3): 281-290.
- Vorobiof DA, Abratt R. The cancer burden in Africa. S Afr Med J. 2007; 97(10): 937-939.
- Kuete V, Efferth T. Pharmacogenomics of Cameroonian traditional herbal medicine for cancer therapy. J Ethnopharmacol. 2011;137(1): 752-766.
- Jemal A, Siegel R, Ward E, Hao Y, Xu J, Murray T, et al. Cancer statistics. Cancer J Clin. 2008;58(2):71-96.
- Yin X, Zhou J, Jie C, Xing D, Zhang Y. Anticancer activity and mechanism of Scutellaria barbata extract on human lung cancer cell line A549. Life Sci. 2004; 75(18):2233-2244.
- Rockwell S, Liu Y, Higgins SA. Alteration of the effects of cancer therapy agents on breast cancer cells by the herbal medicine black cohosh. Breast Cancer Res Treat. 2005; 90(3): 233-239.
- Greenwell M, Rahman PKS M. Medicinal Plants: Their Use in Anticancer Treatment. Int J Pharm Sci Res. 2015; 6(10): 4103-4112.
- Pongnikorn S, Fongmoon D, Kasinrerak W, Limtrakul PN. Effect of bitter melon (*Momordica charantia* Linn) on the level and function of natural killer cells in cervical cancer patients with radiotherapy. J Med Assoc Thai. 2003; 86(1): 61-68.
- Lawrence CM, Chiu Ho, Elanine YL, Vincent EC. Ethyl acetate extract of *Patrinia scabiosaefolia* downregulates anti-apoptotic Bcl-2/Bcl-XL expression, and induces apoptosis in human breast carcinoma MCF-7 cells independent of caspase-9 activation. J Ethnopharmacol. 2006; 105(1-2): 263-268.
- Chen X, Hu Z, Yang X X, Huang M, Gao Y, Tang W, et al. Monitoring of immune responses to a herbal immunomodulator in patients with advanced colorectal cancer. Int Immunopharmacol. 2006; 6(3): 499-508.
- Jing Y, Nakajo S, Xia L, Nakaya K, Fang Q, Waxman S, et al. Boswellic acid acetate induces differentiation and apoptosis in leukemia cell lines. Leuk. Res. 1999; 23(1): 43-50.
- Baum M, Ernst E, Lejeune S, Horneber M. Role of complementary and alternative medicine in the care of patients with breast cancer: Report of

- the European Society of Mastology (EUSOMA) Workshop, Florence, Italy, December 2004. *Eur J Cancer*. 2006; 42(12): 1702-1710.
14. Lian Z, Niwa K, Gao J, Tagami K, Mori H, Tamaya H. Association of cellular apoptosis with anti-tumor effects of the Chinese herbal complex in endocrine-resistant cancer cell line. *Cancer Detect Prev*. 2003; 27(2): 147-154.
 15. Yin SY, Wei WC, Jian FY, Yang NS. Therapeutic applications of herbal medicines for cancer patients. *Evid. Based Complement. Alternat Med*. 2013; 2013: 1-15.
 16. Anand P, Sundaram C, Jhurani S, Kunnumakkara AB, Aggarwal BB. Curcumin and cancer: an "old-age" disease with an "ageold" solution. *Cancer Lett*. 2008; 267(1): 133-164.
 17. Boon H, Wong J. Botanical medicine and cancer: a review of the safety and efficacy. *Expert Opin Pharmacother*. 2004; 5(12): 2485-2501.
 18. Wargovich MJ. Nutrition and cancer: the herbal revolution. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*. 1999; 2(5): 421-424.
 19. Sa G, Das T. Anti cancer effects of curcumin: cycle of life and death. *Cell Div*. 2008; 3: 14.
 20. Wakte PS, Sachin BS, Patil AA, Mohato DM, Band TH, Shinde DB. Optimization of microwave, ultra-sonic and supercritical carbon dioxide assisted extraction techniques for curcumin from *Curcuma longa*. *Sep Purif Technol*. 2011; 79(1): 50-55.
 21. Lin JK. Molecular targets of curcumin. *Adv Exp Med Biol*. 2007; 595: 227-243.
 22. Varalakshmi Ch, Ali AM, Pardhasaradhi BV, Srivastava RM, Singh S, Khar A. Immunomodulatory effects of curcumin: In-vivo. *Int Immunopharmacol*. 2008; 8(5): 688-700.
 23. Sarkar FH, Li Y, Wang Z, Padhye S. Lesson learned from nature for the development of novel anti-cancer agents: implication of isoflavone, curcumin, and their synthetic analogs. *Curr Pharm Des*. 2010; 16(16): 1801-1812.
 24. Zetterström S. Isolation and synthesis of curcumin. Bachelor's Thesis, Linköping University Department of Physics, Chemistry and Biology, 2012.
 25. Rouhani S, Alizadeh N, Salimi S, Haji-Ghasemi T. Ultrasonic Assisted Extraction of Natural Pigments from Rhizomes of *Curcuma Longa* L. *Prog Color Colorants Coat*. 2009; 2(2009): 103-113.
 26. Apisariyakul A, Vanittanakom N, Buddhasukh D. Antifungal activity of turmeric oil extracted from *Curcuma longa* (Zingiberaceae). *J Ethnopharmacol*. 1995; 49(3): 163-169.
 27. Vijayarathna S, Sasidharan S. Cytotoxicity of methanol extracts of *Elaeis guineensis* on MCF-7 and Vero cell lines. *Asian Pac J Trop Biomed*. 2012; 2(10): 826-829.
 28. Jeon HJ, Choi HS, Lee OH, Jeon YJ, Lee BY. Inhibition of Reactive Oxygen

- Species (ROS) and Nitric Oxide (NO) by *Gelidium elegans* Using Alternative Drying and Extraction Conditions in 3T3-L1 and RAW 264.7 Cells. *Prev Nutr Food Sci.* 2012; 17(2): 122-128.
29. Samarghandian S, Shabestari MM. DNA fragmentation and apoptosis induced by safranal in human prostate cancer cell line. *Indian J Urol.* 2013; 29(3): 177-183.
 30. Inano H, Onoda M, Inafuku N, Kubota M, Kamada Y, Osawa T, et al. Chemoprevention by curcumin during the promotion stage of tumorigenesis of mammary gland in rats irradiated with γ -rays. *Carcinogenesis.* 1999; 20(6): 1011-1018.
 31. Ahmad R. Anticancer Potential of Medicinal Plants *Withania Somnifera*, *Tinospora Cordifolia* and *Curcuma Longa*: A Review. *World Res J Med Aromat Plant.* 2015;3(1): 2278-9863.
 32. Noori S, Kiasat AR, Kolahi M, Mirzajani R, Seyyed Nejad SM. Survey of different extraction methods for the best method determination of curcumin extraction on different extracts of turmeric and comparison of chemical and antioxidant properties. *Echophotochemistry Medical Plants J.* 2016; 4(3): 1-11.(persian).
 33. Naama JH, Al-Temimi AA, Al-Amiery AAH. A study on the anticancer activities of ethanolic curcumin extract. *Afr J Pure Appl Chem.* 2010; 4(5): 68-73.
 34. Srivastava P, Srivastava A. In vitro anti-cancer activity of ethanolic extract of curcumin longa (turmeric) in HEP-2 cell lines. *Int J Eng Res General Sci.* 2015; 3(5): 495-508.
 35. Ak T, Gülçin İ. Antioxidant and radical scavenging properties of curcumin. *Chem Biol Interact.* 2008; 174(1): 27-37.
 36. Witschi HP. Safety evaluation of butylated hydroxytoluene (BHT) in the liver, lung and gastrointestinal tract. *Food Chem Toxicol.* 1986; 24(10-11): 1127-1130.
 37. Grice HC. Enhanced tumor development by butylated hydroxyanisole (BHA) from the prospective of effect on forestomach and oesophageal squamous epithelium. *Food Chem Toxicol.* 1988; 26(8): 717-723.
 38. Iqbal M, Sharma SD, Okazaki Y, Fujisawa M, Okada S. Dietary supplementation of curcumin enhances antioxidant and phase II metabolizing enzymes in ddY male mice: possible role in protection against chemical carcinogenesis and toxicity. *Pharmacol Toxicol.* 2003;92(1):33-38.
 39. Hashemi M, Ghavami S, Karami Tehrani F. Apoptosis, programmed cell death. *Zahedan J Res Med Sci,* 2003; 5(1): 9-15.(persian).
 40. Cheung-Ong K, Giaever G, Nislow C. DNA-damaging agents in cancer chemotherapy: serendipity and chemical biology. *Chem Biol.* 2013; 20(5): 648-659.
 41. Thayyullathil F, Chathoth S, Hago A, Patel M, Galadari S. Rapid reactive oxygen species (ROS) generation

- induced by curcumin leads to caspase-dependent and -independent apoptosis in L929 cells. *Free Radic Biol Med.* 2008; 45(4): 1403–1412.
42. Choudhuri T, Pal S, Das T, Sa G. Curcumin selectively induces apoptosis in deregulated cyclin D1-expressed cells at G2 phase of cell cycle in a p53-dependent manner. *J Biol Chem.* 2005; 280(20): 20059–20068.
43. Cao J, Jia L, Zhou HM, Liu Y, Zhong LF. Mitochondrial and nuclear DNA damage induced by curcumin in human hepatoma G2 cells. *Toxicol Sci.* 2006; 91(2): 476-483.
44. Link A, Balaguer F, Shen Y, Lozano JJ, Leung HCE, Boland CR, et al. Curcumin modulates DNA methylation in colorectal cancer cells. *PLoS One.* 2013; 8(2): p. e57709.