

مهار مهاجم و مهاجرت اسانس هسته عنب از طریق مهار بیان ژن متالوپروتئیناز ۹ در سلول های THP-1 تحریک شده با LPS

الهام قدوسی دهنوی^۱، حسین مقصودی^{۲*}، رضا حاجی حسینی^۱

(۱) گروه بیوتکنولوژی، دانشگاه پیام نور، مرکز ری، تهران، ایران

(۲) گروه زیست شناسی، دانشگاه پیام نور، مرکز شرق، تهران، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۲/۱۲

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۵/۲۸

چکیده

مقدمه: مهاجم و مهاجرت، که مرتبط با پاسخ های التهابی است نقش مهمی را در روند بیماری زائی استئوآرتریت بازی می کند. متالوپروتئینازها به عنوان یکی از مهم ترین بیومارکرهای کاتابولیک نقش به سزایی را در میزان مهاجم و مهاجرت سلولی در سلول های مونوسیت/ماکروفاژ بازی می کنند. هدف از این مطالعه، بررسی خاصیت ضد مهاجمی و ضد مهاجرتی اسانس هسته عنب به وسیله مهار متالوپروتئینازی ۱، ۲، ۳ و ۹ که در جریان بیماری استئوآرتریت افزایش بیان پیدا می کنند است.

مواد و روش ها: میوه عنب از شهر اصفهان جمع آوری، هسته ها جدا و در مرکز ذخایر ژنتیک ایران اسانس گیری شد. تاثیر اسانس هسته عنب بر روی میزان مهاجم و مهاجرت سلولی با transwell chambers، میزان بیان ژن ۱، ۲، ۳، ۹ MMP با ریل تایم، میزان بیان پروتئین با وسترن بلائینگ و الایزا و میزان فعالیت MMP-2 و MMP-9 توسط ژلاتین زیموگرافی بررسی گردید.

یافته های پژوهش: غلظت ۵۰ میکروگرم بر میلی لیتر از اسانس به طور مشخصی توانست میزان مهاجم و مهاجرت سلولی را در THP-1 تحریک شده با LPS در مقایسه با گروه کنترل کاهش معناداری نشان دهد ($P < 0.05$) و هم چنین نتایج نشان داد که این خاصیت ضد مهاجمی اسانس در سلول های THP-1 تحریک شده با LPS مربوط به بیان MMP-9 هم در سطح بیان ژن و فعالیت پروتئین MMP-9 است که نسبت به گروه های کنترل کاهش معناداری نشان دادند ($P < 0.05$).

بحث و نتیجه گیری: اسانس هسته عنب قادر به مهار توانایی مهاجرت و مهاجم سلولی القاء شده به وسیله LPS شده و می توان آن را به عنوان یک راه کار تئوریک برای درمان استئوآرتریت پیشنهاد کرد.

واژه های کلیدی: استئوآرتریت، اسانس هسته عنب، مهاجم، مهاجرت، متالوپروتئیناز

* نویسنده مسئول: گروه زیست شناسی، دانشگاه پیام نور، مرکز شرق، تهران، ایران

Email: hosseinm2002@gmail.com

Copyright © 2018 Journal of Ilam University of Medical Science. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution international 4.0 International License (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>) which permits copy and redistribute the material, in any medium or format, provided the original work is properly cited.

مقدمه

استئوآرتریت یکی از مهم ترین اختلالات مزمن سلامت انسان و شایع ترین شکل آرتریت می باشد. عوامل ارثی، مکانیکی و فاکتورهای بیولوژیکی از مهم ترین عوامل بروز استئوآرتریت است که در نهایت با تخریب غضروف، درد، تغییر شکل، کاهش عملکرد و از دست دادن حرکت مشخص می شود (۱). تخریب غضروف مفصلی به عنوان یک ویژگی پاتولوژیک و بارز این بیماری محسوب می شود (۲). ماتریکس غضروف از کلاژن ها (عمدتاً کلاژن تیپ II و مقدار کمی کلاژن تیپ IX و XI) و پروتئوگلیکان ها تشکیل شده است. اگر چه تعدادی از پروتئینازها در ورم مفاصل یافت شده است اما متالوپروتئینازها به عنوان کلیدی ترین آنزیم ها برای تخریب ماتریکس غضروف در نظر گرفته می شود (۳). هم چنین نقش آن ها در پیشرفت بیماری استئوآرتریت در میان سایر آنزیم های تخریب گر متابولیکی (۴) و پاسخ به فرآیندهایی مانند تهاجم و مهاجرت در بسیاری از رده های سلولی مشخص شده است (۵). متالوپروتئینازها یک خانواده بزرگ از آنزیم های پروتئولیتیک وابسته به روی Zn^{2+} هستند و برای سوسترای خاص ویژگی عمل دارند اما در نهایت می توان آن ها را به حداقل ۵ گروه اصلی شامل کلاژنازها (8-، MMP-1 و MMP-13)، ژلاتینازها (MMP-2 و MMP-9)، استرومولیزین ها (10-، MMP-3 و MMP-11)، ماتریلیزین ها (MMP-7 و MMP-26) و متالوپروتئینازهای متصل به غشاء (14-، MMP-15، -16، -17، -24، 25) (MMP-14) طبقه بندی کرد (۶). سایتوکاین های پیش التهابی $IL-1\beta$ ، $IL-6$ ، $IL-15$ ، $IL-17$ ، $IL-18$ ، $IL-21$ و فاکتور توموری نکروزی آلفا $TNF-\alpha$ به عنوان تنظیم گرهای مثبت در جهت پیشرفت استئوآرتریت دخالت داشته و باعث القای قدرتمند تولید MMP ها در سلول های غضروف مفصلی می شود (۷).

مطالعات قبلی بالینی برای درمان استئوآرتریت بیشتر بر روی مهار پاتوژن بیماری، شامل مهار تخریب غضروف و فاکتورهای کاتابولیک مانند مهار متالوپروتئینازها و هم چنین سایتوکین های پیش التهابی مانند $TNF-\alpha$ ، $IL-1\beta$ و غیره استوار بود

ولی به دلیل عوارض جانبی شایع همانند عوارض گوارشی مانند سوء هاضمه، تهوع، زخم پپتیک و خونریزی و هم چنین تشدید نارسایی احتقانی قلب، افزایش فشار خون، اختلالات کبدی، کلیوی، تنفسی و اثربخشی کم دارای نتایج رضایت بخش و مورد قبولی نبود (۸). در حال حاضر استفاده از داروهای گیاهی در بسیاری از کشورهای توسعه یافته به عنوان داروهای مکمل و جایگزین (CAM)، پذیرفته شده است. هم چنین به دلیل دسترسی آسان و قیمت پایین گیاهان دارویی و با توجه به فقر و عدم دسترسی به دارو مدرن، برای ۸۰-۶۵ درصد از جمعیت جهان در کشورهای در حال توسعه برای حفظ سلامت و مراقبت از بهداشت اولیه خود، مصرف آن ها توسط سازمان بهداشت جهانی جهت حفظ سلامتی توصیه شده است (۹). هم چنین تخمین زده شده است که در حدود ۲۵ درصد از ترکیبات فعال در گیاهان دارویی از منابع طبیعی و به ویژه از گیاهان به دست آمده است. گیاه عنب با نام علمی *Ziziphus jujube* گیاهی از خانواده رامناسه *Rhamnaceae* که به طور گسترده ای در اروپا و جنوب شرقی آسیا توزیع شده است. میوه این گیاه خوراکی و دارای خواص متعدد مانند رفع اختلالات گوارشی و کبدی، ضعف، چاقی، مشکلات ادراری، دیابت، عفونت های پوستی، التهاب گلو، برونشیت، کم خونی، اسهال، بی خوابی و سرطان است (۱۰). در طب سنتی چین و کره از عصاره هسته عنب برای درمان بی خوابی و اضطراب استفاده می شود. علاوه بر این خاصیت آنتی اکسیدانی و ضد باکتریایی اسانس هسته عنب گزارش شد. هم چنین خاصیت ضد التهابی اسانس هسته عنب بر روی گوش ملتهبه موش تحریک شده با TPA گزارش شده است (۱۱).

تا به امروز، اثرات ضد تهاجمی و ضد مهاجرتی اسانس هسته عنب گزارش نشده است. بنا بر این هدف از این مطالعه، ارزیابی تاثیرات اسانس هسته عنب بر روی مهار توانایی تهاجم و مهاجرت به واسطه بیان بیومارکرهایی هم چون متالوپروتئینازها، مخصوصاً 9، 3، 2، MMP-1 که در جریان بیماری های استئوآرتریت افزایش بیان پیدا می کنند، بر روی سلول های THP-1 تحریک شده با LPS به عنوان

مدلی شبیه به سلول های مونوسیت/ماکروفاژ موجود در غشاء سینوویال که در فرآیند تهاجم و مهاجرت سلولی و بیان فاکتورهای پیش التهابی و متالوپروتئینازها نقش مهمی دارند مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش ها

مواد گیاهی: برای انجام این مطالعه، ابتدا دانه های هسته عناب در شهریور ماه ۱۳۹۵ از باغات اصفهان جمع آوری شد. دانه ها از میوه جدا و هسته ها تمیز و به دور از نور آفتاب خشک و سپس توسط دستگاه خرد کننده کاملاً آسیاب و به صورت پودر درآورده شد. کد میوه ها و دانه های خشک شده توسط هر باریوم دانشگاه اصفهان مورد تأیید قرار گرفت. در نهایت در حدود ۳۰۰ گرم از دانه های آسیاب و پودر شده برای اسانس گیری به مرکز ذخایر ژنتیک ایران ارسال گردید. استفاده از دستگاه کولنجر یک روش متداول برای تهیه اسانس از گیاهان می باشد. در حدود ۳۰۰ گرم پودر هسته عناب را در بالون ژوژه دستگاه ریخته و تا دو سوم حجم بالون را از آب مقطر پر کرده و سپس به مدت سه ساعت تحت تقطیر آبی در دستگاه کولنجر قرار داده شد. آن گاه اسانس را جدا کرده و سپس برای جذب آب اضافی از اسانس از سولفات سدیم استفاده شد. اسانس حاصل را که در حدود ۳۰ ماکروگرم بر میلی لیتر بود را تا قبل از سایر مراحل آزمایش در درجه حرارت ۴ درجه سانتی گراد نگهداری و برای رقیق کردن اسانس و تهیه رقت های سریالی از متانول به عنوان حلال استفاده شد.

تهیه و کشت سلولی: رده سلولی ماکروفاژ/مونوسیت THP-1 در آبان ۱۳۹۴ از انستیتو پاستور ایران تهیه و به آزمایشگاه تحقیقاتی دانشگاه پیام نور مرکز شهر ری انتقال یافت. محیط کشت مورد استفاده برای رشد سلولی: RPMI-۱۶۴۰ متوسط (GIBCO®, Grand Island, NY, USA) شده با ۲ میلی مولار ال-گلوتامین (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)، ۱۰ درصد FBS (Aldrich, St. Louis, MO, USA)، ۱/۵ گرم بر لیتر سدیم بیکربنات (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)، ۴/۵ گرم بر لیتر قند (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)، ۱۰ میلی مولار از ۴-(۲-هیدروکسی

اتیل) پیپیرازین-۱-اتان سولفونید (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)، ۱ میلی مولار سدیم پیروات (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) و β ۰/۰۵ میلی مولار مرکاپتوتاتانول (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)، ۵۰ ماکروگرم بر میلی لیتر جنتامایسین (داروپخش، تهران، ایران)، ۱۰۰ U/ml پنی سیلین، ۱۰۰ ماکروگرم بر میلی لیتر استرپتومایسین (زیست ایده، تهران، ایران)، ۰/۲۵ ماکروگرم بر میلی لیتر آمفوتریسین میکروگرم در میلی لیتر (سیلا، بمبئی، هند). سلول ها در محیط کشت سلولی داخل انکوباتور تحت شرایط دی اکسید کربن ۵ درصد، رطوبت ۹۵ درصد و دمای ۳۷ درجه سانتی گراد کشت داده شد و پس از رسیدن به تراکم بالای ۸۵ درصد، سلول های معلق در محیط کشت توسط سانتریفیوژ جدا و توانایی زیستی سلول ها با استفاده از روش تریپان بلو اندازه گیری شد. سپس سلول ها با توان زیستی بالا در پلیت های ۶ خانه ای با تراکم 5×10^5 کشت و با همان روش قبلی تیمار شدند (۱۲).

سنجش توانایی زیستی سلول: در این روش آنزیماتیک به عنوان سوبسترای واکنش از نمک های محلول تترازولیوم که مهم ترین آن ها MTT (۳-۵،۴-دی متیل-تيازول-۲-یل) ۲،۵ دی فیل تترازولیوم است استفاده می شود. تترازولیوم نمک محلول در آب است و هنگامی که این ترکیب در محیط کشت فاقد فنل رد یا PBS آماده سازی گردد ترکیب زرد رنگی را ایجاد می کند و زمانی که این محلول رنگی MTT به سلول های محیط کشت افزوده گردد، حلقه MTT فقط در میتوکندری سلول های سالم در حضور آنزیم دهیدروژناز شکسته شده و به ترکیب نامحلول فورمازان تبدیل می شود. بلورهای نامحلول در آب فورمازان توسط حلال های آلی مانند DMSO و یا ایزوپریل اسیدی حل شده و سپس جذب نوری رنگ بنفش ایجاد شده توسط اسپکترومتری در طول موج ۵۷۰ نانومتر قرائت می شود. به طور خلاصه سلول های THP-1 در پلیت های ۹۶ خانه ای با تراکم 5×10^5 سلول در هر خانه کشت داده شد و پس از تیمار با غلظت های متفاوتی از اسانس (۰-۹۰۰ ماکروگرم

میلی لیتر) و با تکرار ۳ بار به مدت ۲۴ ساعت تیمار شدند. سپس به هر کدام از پلیت ها در حدود ۲۰ میلی لیتر از محلول (۵ میلی گرم بر میلی لیتر) MTT افزوده و به مدت ۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه گردید. سپس کریستال های فورمازان در ۱۰۰ میلی لیتر از DMSO حل و جذب نوری آن در طول موج ۵۷۰ نانومتر با استفاده از یک خواننده میکروپلیت (BioteK, Germany) اندازه گیری شد (۱۳).

سنجش مهاجرت و تهاجم سلولی در شرایط آزمایشگاهی: مهاجرت سلولی در شرایط آزمایشگاهی به وسیله اتاقک های کشت ترانسول با ضخامت ۶/۵ میلی متر و قطر منافذ ۸ میلی متر اندازه گیری شد (Costar NY14831, USA). تعداد 10^5 سلول THP-1، بعد از تیمار با اسانس هسته عنب به مدت ۲۴ ساعت، در قسمت بالایی فیلتر دولایه پلیت Transwell Chamber کشت بدون سرم همراه یا بدون LPS (*Escherichia coli*, strain 0128:B12, Sigma) به میزان ۱ ماکروگرم بر میلی لیتر به قسمت پایین پلیت اضافه شد و به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی گراد و غلظت گاز CO_2 ۵ درصد نگهداری شد تا سلول ها به طبقه پایین مهاجرت کنند. سپس سلول های مهاجرت نکرده در طبقه بالا توسط سوآپ استریل جمع آوری شده و با رنگ کریستال ویوله رنگ آمیزی شدند. سلول های مهاجرت نکرده در ۵ میدان توسط میکروسکوپ با بزرگ نمایی ۱۰۰ شمارش شدند. برای تعیین سنجش میزان تهاجم طبق پروتکل ابتدا منافذ در قسمت بالایی فیلتر دولایه توسط ماتریژل پوشش داده شد و محیط کشت به قسمت پایینی اتاقک اضافه شد. سپس تعداد 5×10^4 سلول را به محیط کشت مخلوط شده با FBS ۲ درصد انتقال داده و به Transwell که قبلاً ماتریژل زده بودیم اضافه شدند و به مدت ۲۴ ساعت به سلول ها اجازه تهاجم و مهاجرت داده شد. سپس سلول های بالایی توسط سوآپ برداشته شده و

سلول های پائینی شمارش شدند.

Quantitative Real-time Polymerase Chain Reaction (qRT-PCR). بیان ژن برای MMP-1, 2, 3, 9 و هم چنین ژن خانه دار گلیسرالدئید ۳-فسفات دهیدروژناز (GADH) که به عنوان کنترل داخلی انتخاب شد، مورد ارزیابی قرار گرفت. استخراج RNA با استفاده از معرف RNA Plus (سیناژن، ایران) طبق دستورالعمل ارائه شده صورت گرفت. غلظت و کیفیت RNA تخلیص شده با استفاده از اسپکتروفتومتری تعیین شد. در مرحله بعد سنتز cDNA با استفاده از کیت 2step RT-PCR (sigma-Aldrich, UK) با استفاده از پرایمرهای الیگومر dT انجام شد. در انتها بر روی cDNA، با انجام PCR غلظت نمونه تولید شده افزایش پیدا کرد. مقدار ۱ میکروگرم از هر نمونه RNA برای سنتز cDNA استفاده گردید. بیان mRNA متالوپروتئینازهای ۱ و ۲ و ۳ و ۹ توسط Real time PCR با استفاده از آزمایش بیان Taqman q-PCR (Invitrogen) بررسی گردید. طراحی پرایمر توسط سایت NCBI Blast انجام گرفت و ساخت پرایمرها به شرکت سیناکلون سفارش داده شد. لیست پرایمرها و پروپ در جدول شماره ۱ خلاصه شده است. واکنش PCR شامل فعال شدن آنزیم در دمای ۹۵ درجه سانتی گراد به مدت ۵ دقیقه، ۴۰ سیکل شامل ۹۵ درجه سانتی گراد به مدت ۱۵ ثانیه، ۶۰ درجه سانتی گراد به مدت ۲۰ ثانیه و ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ ثانیه می باشد. برای هر نمونه سه بار تکرار در نظر گرفته شد و قبل از آنالیز داده ها، نمودار منحنی نقطه ذوب (Melting curve) برای هر ژن مورد بررسی قرار گرفت تا صحت مربوط به پیک ژن مورد نظر و عدم پرایمر دایمر تایید شود. چرخه آستانه (CT) برای ژن کنترل درونی GAPDH mRNA و CT نمونه ها مشخص و کمیت نسبی mRNA با استفاده از روش $2^{-\Delta\Delta CT}$ و با استفاده از فرمول $\Delta\Delta CT = (Ct_{Target} - Ct_{GAPDH}) - (Ct_{Control} - Ct_{GAPDH})$ محاسبه شد (۱۳).

جدول شماره ۱. لیست پرایمرها (توالی نوکلئیدی، نقطه ذوب پرایمرها و اندازه محصول PCR)

Primer Name	Forward 5' to 3'	Reverse 5' to 3'	Tm	
			Forward	Reverse
H.MMP-1	3'- AGTGGCCAGTGGTTGAAAA -5'	3'- CCACATCAGGCACTCCACAT -5'	60.03	60.03
H.MMP-2	3'- TGTGACGCCACGTGACAAG -5'	3'- CTCCTGTGGGGCCTCGTAT -5'	60.88	60.76
H.MMP-3	3'- GATTGGAGGTGACGGGGAAG -5'	3'- GCTAAGCAGCAGCCCATTTG -5'	60.11	60.18
H.MMP-9	3'- CAGACCTGGGCAGATTCCAA -5'	3'- CTGGATGACGATGTCTGCGT -5'	59.67	60.18
H.GAPDH	3'- GCGCTCACTGTTCTCCCTC -5'	3'- TGGGTGTCGCTGTTGAAGTC -5'	55.00	60.27

ELISA: فعالیت MMP-9 در محیط کشت بدون سرم سلولی به وسیله کیت الایزا (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) طبق دستورالعمل کارخانه سازنده بررسی و میزان جذب نمونه ها توسط دستگاه خواننده میکروپلیت (مدل ۳۵۵۰؛ Bio-Rad) در طول موج ۴۵۰ نانومتر خوانده شد. منحنی استاندارد MMP-9 با استفاده از غلظت های شناخته شده متالوپروتئینازها ترسیم گردید. این آزمایش با سه بار تکرار انجام شد.

وسترن بلات: برای تایید میزان کاهش بیان MMPs از روش وسترن بلات استفاده شد. پس از تیمار سلول ها، عصاره های پروتئینی سلول های THP-1 از راه هموژنیزه کردن سلول ها در بافر RIPA (۵۰ میلی مولار Tris-HCl، ۱ درصد تریتون X-100، ۰/۲ درصد سدیم داکسی کولات، ۱ میلی مولار Na-EDTA، ۱ میلی مولار PMSF) استخراج شده و غلظت آن توسط روش برادفورد اندازه گیری شد. ۳۰-۴۰ میکروگرم از عصاره پروتئینی روی ژل SDS-PAGE الکتروفورز شد. سپس ژل بر روی غشاء نیتروسولوز منتقل و سپس به مدت ۱۶ ساعت در دمای ۴ درجه سانتی گراد در محلول ۲ درصد BSA انکوبه گردید. در مرحله بعد، غشاء با آنتی بادی های اولیه MMP-1 (۱:۲۰۰)، MMP-2 (۱:۲۰۰)، MMP-3 (۱:۲۰۰)، MMP-9 (۱:۲۰۰) (Santa Crus, USA) به مدت ۱ ساعت در ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه شد. پس از چهار بار شستشوی ۵ دقیقه ای با بافر TBST، غشاء به مدت یک ساعت با آنتی بادی های ثانویه anti-mouse antibody (Santa Crus, USA) HRP با رقت ۱/۵۰۰۰ انکوبه شد. چهار نوبت شستشوی ۵ دقیقه ای انجام شد. برای آشکار سازی و ردیابی باند از بلوترانزیلوم (NBT) و برومو کلروئیدیل فسفات (BCIP)

استفاده شد و در تاریکی انکوبه گردید تا باندها ظاهر شدند. این آزمایش با سه بار تکرار انجام شد (۱۳).
ژلاتین زایموگرافی: برای تعیین سنجش فعالیت و ترشح آنزیمی MMP-2 و MMP-9 از روش ژلاتین زایموگرافی استفاده می شود. پس از تیمار سلول ها به مدت ۲۴ ساعت انکوبه گردید تا زمانی که بیش از ۸۵ درصد کف پیل از سلول پوشیده شد. سپس الکتروفورز توسط SDS PAGE حاوی ژلاتین ۱ درصد انجام شد و سپس ژل ۲ نوبت با محلول شستشودهنده که شامل تریتون ۲/۵ درصد و محلول X-100 است به مدت ۳۰ دقیقه شستشو گردید تا SDS حذف شود. در مرحله بعد ژل به مدت یک شب در ۳۷ درجه سانتی گراد در محلول (۵۰ میلی مولار Tris-HCl با pH ۷/۵، ۵ میلی مولار CaCl₂ و ۱ میلی مولار ZnCl₂ نگهداری گردید و رنگ آمیزی ژل با Coomassie brilliant ۰.۰۲۵% (CBB; Sigma) R-2500 به مدت ۳۰ دقیقه انجام گردید. سپس رنگ بری ژل توسط محلول Distain و سپس آب مقطر انجام گردید تا هاله های شفاف که نشانگر فعالیت پروتئولیتیک آنزیم است ظاهر شدند. میزان فعالیت آنزیم هم از طریق چشمی و از هم از طریق دانسیتومتری سنجیده شد (۱۴).

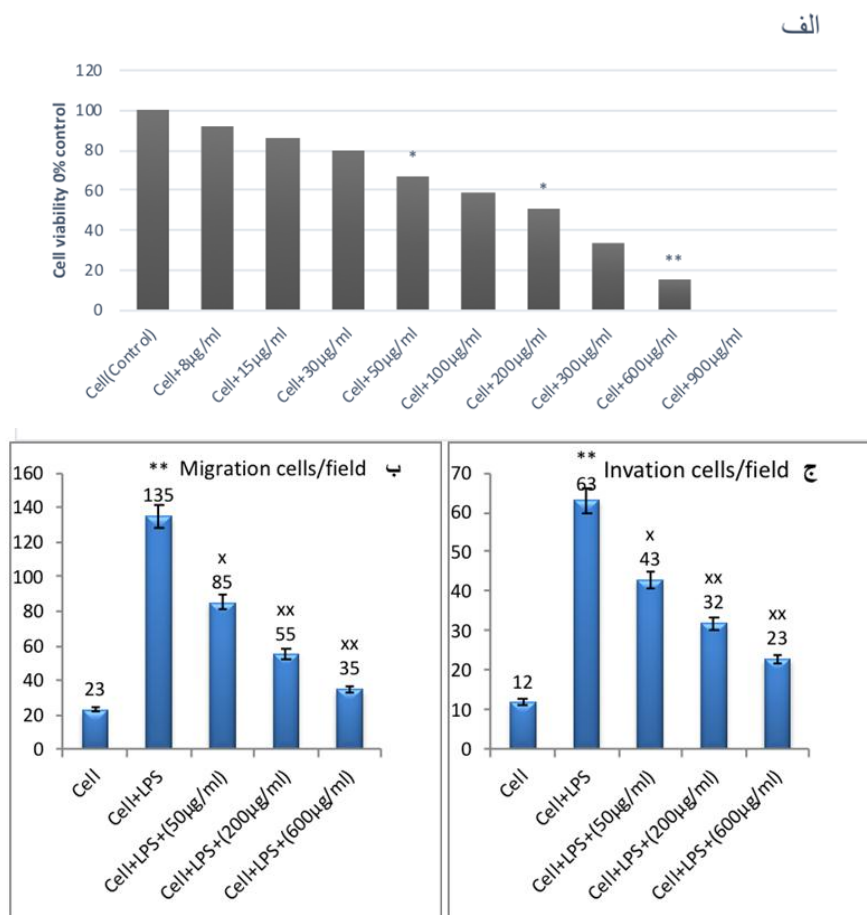
ارزیابی آماری: در تحقیق حاضر کلیه آزمایش ها به صورت میانگین ۳ بار تکرار \pm خطای استاندارد نمایش داده شده است. برای تجزیه و تحلیل آماری داده ها از آنالیز یک طرفه آنوا و آزمون تی استیودنت استفاده شد و سطح معنی دار $P < 0.05$ در نظر گرفته شد.

یافته های پژوهش

اثر مهارکنندگی اسانس هسته عناب بر روی توانایی زیستی سلول های THP-1: در این آزمایش، اثر سمیت سلولی اسانس هسته عناب در THP-1 توسط سنجش MTT برآورد شد (شکل شماره ۱). سلول های THP-1 با غلظت های مختلف اسانس

به صفر رسید. میزان $LC_{50}=200$ (مقداری از غلظت اسانس است که باعث کاهش قدرت زیستی سلول تا ۵۰ درصد می شود). ماکروگرم بر میلی لیتر اندازه گیری و میانگین آن $Media\ LC_{50}=50$ (میانگین بهینه میزان دوز زیست پذیری سلول بر طبق بررسی در مقالات) ماکروگرم بر میلی لیتر اندازه گیری شد. بنا بر این دوز ۵۰، ۲۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر برای انجام آزمایشات بیشتر و دوز ۶۰۰ به عنوان غلظتی که سه برابر LC_{50} است و در آن غلظت تقریباً اکثر سلول ها توانایی زیستی خود را از دست می دهند، به عنوان کنترل شاهد در نظر گرفته شد.

هسته عنب از غلظت ۰ تا ۹۰۰ میکروگرم/میلی لیتر در سرم محیط کشت به مدت ۲۴ ساعت تیمار شدند. سلول های THP-۱ که با غلظت های ۰ تا ۳۰ میکروگرم/میلی لیتر تحت درمان قرار گرفتند، اثر قابل توجهی بر میزان حیات سلولی در ۲۴ ساعت از خود نشان ندادند. علاوه بر این بقای سلول های THP-۱ زمانی که با غلظت های بالاتر از ۲۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر یعنی دقیقاً در غلظتی که بیشترین اثر سایتوتوکسیکی دیده می شود، تیمار شده بودند به طور قابل توجهی مهار شد به طوری که در غلظت ۹۰۰ میکروگرم/میلی لیتر توانایی زیستی سلول ها به تقریباً



شکل شماره ۱. الف: سلول های THP-۱ با غلظت های مشخصی از اسانس هسته عنب در محیط کشت حاوی سرم به مدت ۲۴ ساعت انکوبه شدند و سپس توانایی زیستی سلول ها توسط تست MTT اندازه گیری شد. $P=0.05$ ، $P=0.01$ ، * و ج: توانایی مهاجرت و تهاجم سلولی، سلول های THP-۱ به وسیله سنجش میزان مهاجرت و تهاجم سلولی مشخص شد. سلول های THP-۱ با غلظت مشخصی از اسانس هسته عنب به مدت ۲۴ ساعت تیمار شدند. سپس به سلول های THP-۱ با یا بدون LPS (۱ میلی گرم بر میلی لیتر) به مدت ۲۴ ساعت، اجازه مهاجرت داده شد. سلول هایی که مهاجرت و تهاجم کرده بودند در سه آزمایش مستقل به صورت میانگین \pm خطای استاندارد در نمودار فوق رسم شد. نتایج توسط آزمون آنوا مورد ارزیابی قرار گرفت. $P=0.01$ ، $P=0.05$ ، $P=0.01$ ، * برابر گروه کنترل، $P=0.05$ ، $P=0.01$ ، * برای گروه تیمار و تحریک شده با LPS.

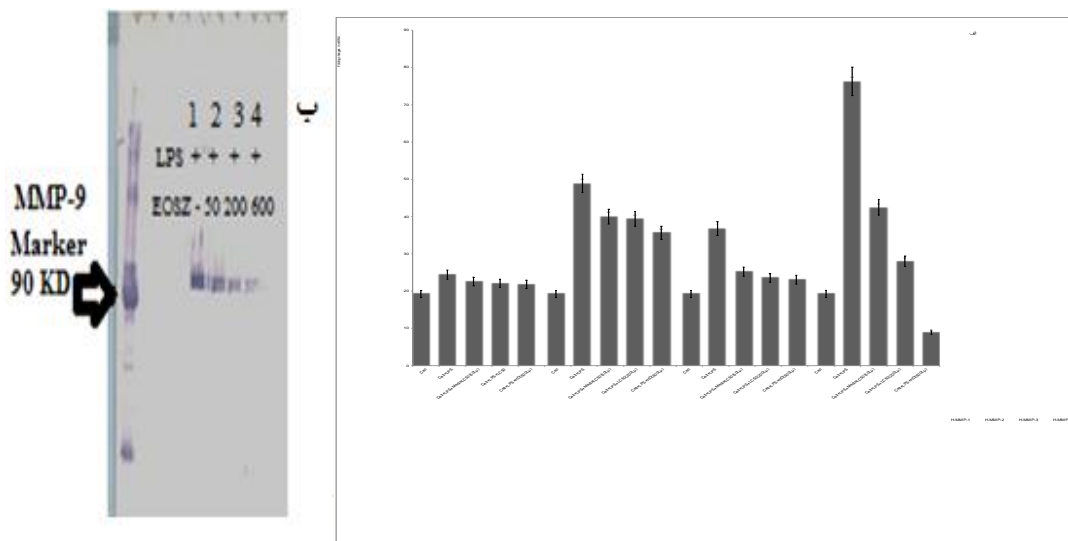
اثر مهارکنندگی اسانس هسته عنب بر روی توانایی مهاجرت و تهاجم سلول های THP-1: به منظور بررسی اثر مهارکنندگی اسانس هسته عنب بر روی توانایی مهاجرت و تهاجم سلول های THP-1 که با LPS تحریک شده بودند از ترانسول چمبر استفاده شد. همان طور که در شکل شماره ۱ قسمت ب و ج مشاهده می شود توانایی مهاجرت سلولی در محیط آزمایشگاهی سلول های THP-1 تا ۳/۵ برابر زمانی که با LPS تحریک شده بودند افزایش یافت. به طور مشابهی اطلاعات به دست آمده از سنجش تهاجم سلولی نشان می دهد که تحریک با LPS باعث افزایش قدرت تهاجم سلول های THP-1 تا ۷/۰۲ برابر در مقایسه با گروه کنترل شد. با این حال سرکوب توانایی مهاجرت و تهاجم سلولی در سلول های THP-1 تحریک شده با LPS وابسته به دوز است. نتایج حاصله حاکی از آن است که غلظت های غیر سمی از اسانس هسته عنب از ۵۰ تا ۲۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر در شرایط آزمایشگاهی قادر به کاهش میزان توانایی تهاجم و مهاجرت سلولی در سلول های THP-1 تحریک شده با LPS می شود.

اسانس هسته عنب با کاهش بیان ژن MMP-9 باعث کاهش توانایی مهاجرت و تهاجم در سلول های THP-1 تحریک شده با LPS می شود: به منظور بررسی اثر مهار اسانس هسته عنب بر روی توانایی مهاجرت و تهاجم سلولی در محیط آزمایشگاهی، ما اثر اسانس هسته عنب را بر روی میزان بیان ژن های متالوپروتئینازها مورد آزمایش قرار دادیم. همان گونه که در شکل شماره ۲-الف نشان داده شده است، LPS باعث القاء بیان ژن MMP-2,9 در سلول های THP-1 شد ولی زمانی که سلول ها را با اسانس هسته عنب هم تیمار کردیم باعث کاهش سرکوبی بیان ژن MMP-9 القاء شده توسط LPS شد که این مهار بیان ژن به میزان دوز مصرفی اسانس هسته عنب وابسته بود. در حالی که تیمار با اسانس هسته عنب تاثیر چندانی روی مهار بیان ژن های 1, 2, 3-MMP نداشت. در مرحله بعد ما اثر اسانس هسته عنب را در میزان بیان پروتئین متالوپروتئیناز در عصاره لیز شده سلولی توسط تست وسترن بلاتینگ مورد ارزیابی قرار

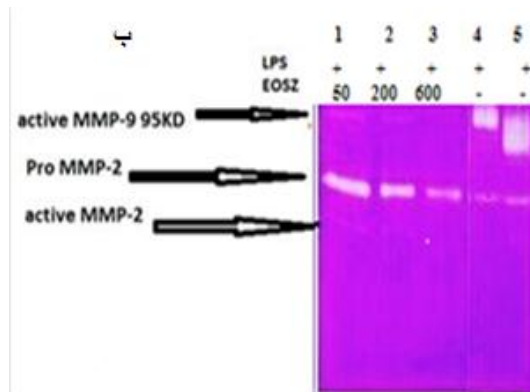
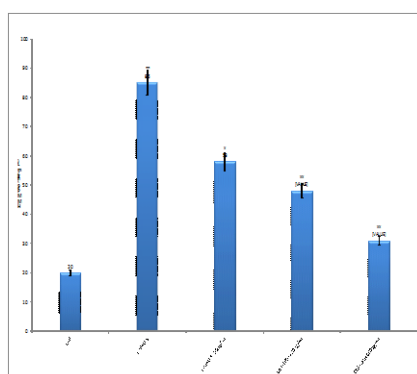
دادیم و همان طور که در شکل شماره ۲-ب نمایش داده می شود، LPS باعث القاء بیان پروتئین MMP-9 شد ولی تیمار با دوز غیر سمی باعث سرکوب بیان پروتئین شد. سپس به منظور بررسی اثر اسانس هسته عنب بر روی میزان ترشح و فعالیت پروتئولیتیکی پروتئین MMP-9، محیط رویی کشت یا سوپر ناتانت را به وسیله تست الایزا اندازه گیری کردیم. همان گونه که در شکل شماره ۳-الف مشخص شده است، میزان ترشح و فعالیت پروتئولیتیکی MMP-9 در سلول های THP-1 زمانی که با LPS به میزان ۱ میلی گرم بر میلی لیتر در محیط کشت بدون سرم به مدت ۲۴ ساعت القاء شده بود به میزان قابل توجهی افزایش پیدا کرد. اما تیمار سلول های THP-1 با اسانس هسته عنب باعث مهار اثر القائی LPS بر میزان ترشح و فعالیت پروتئین MMP-9 شد و این اثر مهار به میزان دوز مصرفی اسانس هسته عنب بستگی داشت. این نتایج حاکی از آن است که اسانس هسته عنب به طور انتخابی باعث مهار بیان ژن MMP-9 القاء شده با LPS هم در سطح بیان ژن و هم در میزان پروتئین شده و متعاقباً باعث سرکوب میزان فعالیت پروتئین MMP-9 نیز شده است. در مرحله بعد ما اثر اسانس هسته عنب را بر روی فعالیت پروتئولیتیکی MMP-9 را در محیط کشت به وسیله ژلاتین زیموگرافی مورد آزمایش قرار دادیم. همان گونه که در شکل شماره ۳-ب نشان داده شده است، نتایج حاصله حاکی از آن است که میزان ترشح و فعالیت MMP-9 القاء شده با LPS به وسیله اسانس هسته عنب مهار شده و این مهارکنندگی به دوز مصرفی بستگی دارد. علاوه بر این، ما سپس اثر اسانس هسته عنب را بر روی ترشح پروتئین های 1,2,3,9-MMP در عصاره لیز شده سلولی که قبلاً با LPS تحریک شده بود مورد بررسی قرار دادیم. همان گونه که در شکل شماره ۳-ب نشان داده شده است، بیان MMP-9 به وسیله LPS در سلول های THP-1 القاء می شود، اما زمانی که سلول ها با اسانس هسته عنب هم تیمار می شوند باعث مهار بیان MMP-9 القاء شده با LPS می شوند و این مهار به دوز مصرفی اسانس هسته عنب وابسته است. در حالی که تیمار با اسانس

هسته عنب تاثیر بر روی مهار بیان سایر

متالوپروتئینازهای مورد مطالعه نداشت.



شکل شماره ۲. EOSZ با کاهش بیان ژن MMP-9 باعث کاهش توانایی مهاجرت و تهاجم در سلول های THP-1 تحریک شده با LPS می شود. سلول های THP-1 با غلظت های مشخصی از EOSZ پس از این که با LPS به میزان ۱ میلی گرم بر میلی لیتر تحریک شده بود به مدت ۲۴ ساعت انکوبه شدند. الف و ب: بعد از ۲۴ ساعت مقدار mRNA و میزان پروتئین درونی MMP-1, 2, 3, 9 به وسیله qRT-PCR و وسترن بلات اندازه گیری شد. GADH هم به عنوان ژن کنترل درونی استفاده شد. نمودار سطح mRNA در سه آزمایش مستقل به صورت میانگین \pm خطای استاندارد در نمودار فوق مشخص است. نتایج توسط آزمون آنوا مورد ارزیابی قرار گرفت. $P=0.01$ ** برابر گروه کنترل، $P<0.05$ و $P<0.01$ XXP برای گروه تیمار و تحریک شده با LPS.



شکل شماره ۳. مایع رویی محیط کشت یا سوپرناتانت جمع آوری شد و برای بررسی میزان فعالیت و ترشح MMP-9 به ترتیب به وسیله روش های الایزا و ژلاتین زیموگرافی مورد سنجش قرار گرفت. الف: هیستوگرام نشان دهنده نتایج الایزا از سه آزمایش مستقل به صورت میانگین \pm خطای استاندارد در نمودار فوق مشخص است. نتایج توسط آزمون آنوا مورد ارزیابی قرار گرفت. $P=0.01$ ** برابر گروه کنترل، $P<0.05$ و $P<0.01$ XXP برای گروه تیمار و تحریک شده با LPS. ب: نتایج ژلاتین زیموگرافی نشان می دهد که ترشح و فعالیت MMP-9 زمانی که سلول های THP-1 در محیط کشت بدون سرم حاوی ۱ میلی گرم بر میلی لیتر LPS به مدت ۲۴ ساعت قرار می گیرند القاء می شود. تیمار سلول های THP-1 با EOSZ باعث سرکوبی ترشح و فعالیت MMP-9 القاء شده به وسیله LPS شده و این به دوز مصرفی EOSZ بستگی دارد. نتایج حاصل حاکی از آن است که اثر انتخابی و مهاري اسانس هسته عنب هم بر بیان MMP-9 القاء شده به وسیله LPS هم در سطح ژن و هم در سطح پروتئین و متعاقباً باعث مهار فعالیت آنزیمی MMP-9 می شود.

در غضروف طبیعی، تعادل بین عوامل کاتابولیک و آنابولیک به منظور حفظ تمامیت ساختاری ECM ماتریکس غضروف وجود دارد، در میان شاخص های مختلف بیولوژیکی مرتبط با استئوآرتریت متالوپروتئینازها نقش مهمی در تخریب غضروف بازی می کنند، در نتیجه موجب پیشرفت این بیماری می شوند (۱۵). سطوح ماتریکس پروتئیناز در غضروف و سینوویال بافت بیماران مبتلا به آرتریت روماتوئید (RA) و افراد مبتلا به استئوآرتریت (OA) بالاست و MMP ها نقش مهمی در پاتوفیزیولوژی آتروپاتیک بازی می کنند (۱۶). علاوه بر این نقش MMP ها در پاسخ به فرآیندهایی مانند تهاجم و مهاجرت در بسیاری از رده های سلولی مشخص شده است (۱۷). از نقطه نظر بیان ژن، مطالعات قبلی بالینی برای درمان استئوآرتریت بیشتر بر روی مهار پاتوژن بیماری متمرکز بود که شامل مهار تخریب غضروف و فاکتورهای کاتابولیک، مهار لmfوکاین ها، مهار نیتريت اكسيد NO، سایتوکین های پیش التهابی مانند $IL-1\beta$ ، $TNF-\alpha$ و هم چنین متالوپروتئینازها که به عنوان یکی از عمده ترین فاکتورهای کاتابولیک تخریبی دخیل در پاتوفیزیولوژی استئوآرتریت است. مهارکننده های مصنوعی متالوپروتئینازها (MMPis) برای اولین بار در مطالعات برای تفسیر علت آسیب فیزیولوژیک ناشی از متالوپروتئینازها توسعه پیدا کردند. این مهارکننده ها قادرند به طور عمده اثرات پروتئولیتیک ناشی از فعالیت MMP ها را بلوکه کرده و هم چنین از تبدیل پروآنزیم های MMP ها به شکل فعال آن ها جلوگیری به عمل آورند. ولی به دلیل عوارض جانبی بالا و اثربخشی کم، دارای نتایج رضایت بخشی و مورد قبول نبود (۱۸، ۱۹). علاوه بر این داروهای مانند داروهای غیراستروئیدی ضدالتهابی (NSAIDs) و مهارکننده های انتخابی COX-2 که برای درمان استئوآرتریت تجویز می شوند فقط قادر به کاهش علائم التهابی هستند اما قادر به درمان پاتوژن بیماری نیستند (۲۰). می توان گفت که هیچ داروی اصلاح کننده استئوآرتریت (DMOADs) که بتواند بیماری را مهار کرده یا از پیشرفت آن جلوگیری کند به طور روتین در دسترس نیست. با توجه به عدم وجود

داروهای مدرن و بی خطر، بررسی ترکیبات فعال و موثر گیاهان دارویی برای درمان بیماری ها توسط سازمان بهداشت جهانی WHO توصیه شده است (۲۱). بنا بر این نیاز به توسعه داروهای جدید با تاثیر و عملکردی متفاوت با حداقل عوارض جانبی وجود دارد. محصولات طبیعی با رویکرد ضد التهابی و ضد تهاجمی با تاثیر گذاری مناسب و کمترین ریسک و عوارض جانبی برای درمان و پیشگیری از استئوآرتریت برای این منظور مناسب می باشند.

لیپوپلی ساکارید (LPS)، از اجزاء تشکیل دهنده دیواره سلولی باکتری های گرم منفی است که در طول لیز باکتریایی آزاد شده و اثر مستقیمی در فرآیندهای هم چون التهاب، رشد تومور، تهاجم و متاستاز هم در شرایط آزمایشگاهی و غیر آزمایشگاهی می شود (۲۲) و قادر به القاء ترشح متالوپروتئینازها در سلول های ماکروفاژ و سلول های کندروئوسیت هم در تنظیم رونویسی از این ژن ها و هم در میزان ترجمه متالوپروتئینازها می باشد (۲۳).

در راستای این امر، ما در این پژوهش به بررسی توانایی اثر اسانس هسته عنباب بر کاهش توانایی مهاجرت و تهاجم سلول های THP-1 از طریق ارزیابی بیومارکرهایی همانند متالوپروتئینازهای القاء شده توسط LPS که در پاتوژن استئوآرتریت دخالت دارند می پردازیم. بدین منظور از سلول های THP-1 به عنوان یک مدل شبیه به مونوسیت ها/ماکروفاژ استفاده شد.

نتایج این مطالعه نشان داد که اسانس و مواد استخراج شده از هسته عنباب در غلظت غیر سمی ۵۰ میکروگرم بر میلی لیتر دارای خاصیت ضد تهاجمی و مهاجرتی در سلول های THP-1 تحریک شده با LPS در مقایسه با گروه کنترل بوده و نتایج ریل تایم، وسترن بلات، الایزا و زیموگرافی نشان داد که این خاصیت ضد تهاجمی و مهاجرتی اسانس از طریق مهار در سطح بیان ژن، میزان ترشح و فعالیت پروتئین MMP-9 صورت پذیرفت.

MMP-9 یک پروتئین ۹۲ کیلو دالتونی و مهم ترین آنزیم تخریب کننده ECM می باشد و بیان بالای آن در بین MMP ها از اهمیت زیادی در روند

تهاجم سلول های فیروبلست و ماکروفاژ در فرآیند بیماریزایی در استئوآرتریت برخوردار است (۲۴). MMP-2 و MMP-9 از خانواده ژلاتینازها بوده و هر دو به صورت خارج سلولی در پاسخ به فاکتورهای مانند فاکتورهای رشد، سایتوکین ها، شیموکین ها و ماتریکس خارج سلولی ترشح شده و در روند باسازی ماتریکس خارج سلولی بسیار موثرند و فعالیت پروتئازی آن ها در فرآیندهایی مانند تهاجم، مهاجرت، التهاب و متاستاز از طریق باسازی بافتی نقش مهمی را بر عهده دارند (۲۵). میزان MMP-2 و MMP-9 در مایع ساینوویال افراد مبتلا به استئوآرتریت در مقایسه با افراد نرمال بالاتر است (۲۶). تحقیقات نقش منحصر به فرد MMP-9 را در روند تهاجم و مهاجرت نشان داده اند (۲۶). هم چنین ثابت شده ماکروفاژها و منوسیت ها منبع غنی از mRNA و پروتئین پیش ساز MMP-9 است (۳۷). LPS باعث تحریک سلول های THP-1 شده که نهایتاً منتج به بیان و ترشح MMP ها و در نهایت باعث تنظیم سطح انتقال و ترجمه ژن MMP ها می شود (۲۷). در مطالعه اخیر تحریک سلول ها با LPS باعث افزایش سطح بیان MMP-9 می شود و به دنبال آن تیمار با اسانس هسته عنب (EOSZ) باعث کاهش بیان MMP-9 شد. هم چنین نتایج نشان داد که مهار تهاجم THP-1 های تحریک شده با LPS با مهار بیان MMP-9 رخ داده است که احتمالاً به خاطر توانایی اثر این متالوپروتئیناز در تخریب بافت فیبرونکتین و توانایی تهاجم بالای آن در مقایسه با MMP-2 و سایر متالوپروتئینازها است.

شکل فعال MMP-9 به شکل همو دایمر وجود دارد. فعالیت پروتئولیتیکی متالوپروتئینازها در سطح ترشح به وسیله TIMP که به طور اختصاصی به نسبت ۱:۱ به دومین کاتالیتیکی متصل می شوند مهار می شود که دومین PEX از MMP-9 به طور اختصاصی به TIMP-1 و TIMP-2 به دومین PEX از MMP-2 باند می شود در حالی که بقیه MMP ها برای فعال شدن به TIMP برای اتصال به دومین کاتالیکی خود احتیاج دارند (۲۸). دومین PEX از پروتئین پیش ساز MMP-9 نقش مهمی در فرآیند مهاجرت سلولی دارد و مشخص شد که TIMP-1 که

با دومین PEX تعامل دارد و مانع از دایمریزه شدن MMP-9 شده و مهاجرت و تهاجم سلولی را مهار می کند و حذف آن مهاجرت و تهاجم سلولی را افزایش داد، در حالی که حذف TIMP-2 تاثیری در روند تهاجم و مهاجرت سلولی نداشت (۲۹). هم چنین در جا به جایی دومین pex از MMP-9 با دومین pex از MMP-2 میزان مهاجرت و تهاجم سلولی به شدت کاهش پیدا داد (۳۰).

در این تحقیق اثرات مهارکنندگی اسانس هسته عنب روی رشد و تکثیر سلول های رده THP-1 دیده شد که این اثر مهاری به دوز اسانس وابسته است به گونه ای که با افزایش غلظت اسانس این اثر مهاری افزایش بیشتری از خود نشان داد. اثرات مهاری غلظت غیر سمی ۵۰=MLC50 ماکروگرم بر میلی لیتر که میانگین بهینه میزان دوز زیست پذیری سلول است، روی تهاجم و مهاجرت سلول های رده THP-1 قابل توجه بود به طوری که اسانس هسته عنب در این غلظت توانست بیش از ۵۷ درصد مهاجرت و ۵۵ درصد تهاجم سلول های رده THP-1 را نسبت به شاهد که تنها با LPS تیمار شده بود را کاهش دهد. نتایج ژلاتین زایموگرافی نشان دادند کاهش فعالیت پروتئین MMP-9 در محیط کشت با مقدار غلظت اسانس هسته عنب در ارتباط است. با استفاده از روش وسترن بلاتینگ مشاهده شد که میزان بیان پروتئین MMP-9 در سلول های تیمار شده با اسانس هسته عنب به طور معنی داری نسبت به شاهد کاهش نشان داده است. نتایج الیزا هم بر این شواهد صحنه گذاشت. به طور خلاصه نتایج این تحقیق نشان دادند که اسانس هسته عنب به طور موثری تهاجم و مهاجرت سلول های مونوسیت/ماکروفاژ مانند THP-1 را در شرایط آزمایشگاهی کاهش می دهد که به نظر می رسد قسمتی از آن از طریق کاهش بیان پروتئین های MMP-9 می باشد. با توجه به تحقیقات گذشته می توان پیشنهاد داد که احتمالاً اسانس هسته عنب از طریق تاثیر روی مهارکننده متالوپروتئیناز بافتی (TIMP-1) برای اتصال به دومین PEX از MMP-9 است که در نتیجه مانع از دایمریزه شدن MMP-9 و در نتیجه جلوگیری از عملکرد آن و عدم مهاجرت و

سپاسگزاری

تمام هزینه های این پژوهش توسط نویسنده مسئول تامین شده است. نویسندگان مراتب سپاس و قدردانی خود را از ریاست محترم دانشگاه پیام نور واحد شهر ری به خاطر فراهم آوردن محیط آزمایشگاه برای انجام این تحقیق اعلام می دارد.

تهاجم سلول های THP-1 می شود. روی هم رفته نتایج حاصله ما ثابت می کند که اسانس هسته عناب دارای اثرات استئوآرتروتری است و می توان به عنوان یک راه کار تئوریک برای درمان استئوآرتروز و به عنوان یک داروی ضد تهاجمی و یک داروی بی خطر و جایگزین داروهای شیمیایی پیشنهاد کرد.

Reference

- Davidson EB, Vitters EL, Vankraan PM, Vanberg WB. Expression of transforming growth factor- β and the TGF β signalling molecule SMAD-2P in spontaneous and instability induced osteoarthritis role in cartilage degradation chondrogenesis and osteophyte formation. *Annals Rheum Dis* 2006; 65:1414-21. doi:10.1136/ard.2005.045971
- Goldring MB, Otero M, Plumb DA, Dragomir C, Favero M, Elhachem K, et al. Roles of inflammatory and anabolic cytokines in cartilage metabolism signals and multiple effectors converge upon MMP-13 regulation in osteoarthritis. *European Cells Mate* 2011; 21:202. doi: 10.22203/eCM.v021a16
- Heard BJ, Martin L, Rattner JB, Frank CB, Hart DA, Krawetz R. Matrix metalloproteinase protein expression profiles cannot distinguish between normal and early osteoarthritic synovial fluid. *BMC Musculoskel Disord* 2012;13:126. doi: 10.1186/1471-2474-13-126
- Benedetti S, Canino C, Tonti G, Medda V, Calcaterra P, Nappi G, et al. Biomarkers of oxidation inflammation and cartilage degradation in osteoarthritis patients undergoing sulfur-based spa therapies. *Clin Biochem* 2010 31;43:973-8. doi:10.1016/j.clinbiochem.2010.05.004
- Heard BJ, Martin L, Rattner JB, Frank CB, Hart DA, Krawetz R. Matrix metalloproteinase protein expression profiles cannot distinguish between normal and early osteoarthritic synovial fluid. *BMC Musculoskel Disord* 2012; 13:126. doi:10.1186/1471-2474-13-126
- Bourboulia D, Stetlerstevenson WG. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases positive and negative regulators in tumor cell adhesion. *Cancer Biol* 2010; 20: 161-8. doi:10.1016/j.semcancer.2010.05.002
- Kapoor M, Martelpelletier J, Lajeunesse D, Pelletier JP, Fahmi H. Role of proinflammatory cytokines in the pathophysiology of osteoarthritis. *Nature Rev Rheumatol* 2011;7:33-42. doi:10.1038/nrrheum.2010.196
- Qvist P, Bayjensen AC, Christiansen C, Dam EB, Pastoureau P, Karsdal MA. The disease modifying osteoarthritis drug is it in the horizon? *Pharmacol Res* 2008;58:1-7. doi:10.1016/j.phrs.2008.06.001
- Anqueztraxler C. The legal and regulatory framework of herbal medicinal products in the European union a focus on the traditional herbal medicines category. *Drug Inform J* 2011;45:15-2 doi:10.1016/j.jep.2014.07.044
- Hoshyar R, Mohaghegh Z, Torabi N, Abolghasemi A. Antitumor activity of aqueous extract of Ziziphus jujube fruit in breast cancer: an in vitro and in vivo study. *Asian Pac J Rep* 2015;4:116-22. doi:10.1186/s40816-016-0029-0
- Koohi hosseinabadi O, Andishehtadbir A, Bahadori P, Sepehrimanesh M, Mardani M, Tanideh N. Comparison of the therapeutic effects of the dietary and topical forms of Zizyphus jujuba extract on oral mucositis induced by 5-fluorouracil a golden hamster model. *J Clin Exp Dent* 2015;7:304. doi: 10.4317/jced.52198
- Maghsoudi H, Hallajzadeh J, Rezaei pour M. Evaluation of the effect of polyphenol of escin compared with ibuprofen and dexamethasone in synoviocyte model for osteoarthritis an in vitro study. *Clin Rheumatol* 2018; 16:1-8. doi:10.1007/s10067-018-4097-z
- Maghsoudi H, Vaziri A, Alebouyeh M. Investigation of puniceic acid effects on matrix metalloproteinase genes expression in bovine fibroblast like-synoviocytes as a model of osteoarthritis. *J Med Plants* 2018; 3:31-44.

- 14.Herron GS, Banda MJ, Clark EJ, Gavrilovic JE, Werb ZE. Secretion of metalloproteinases by stimulated capillary endothelial cells II expression of collagenase and stromelysin activities is regulated by endogenous inhibitors. *J Biol Chem* 1986; 261:2814-8.
- 15.Radha MS, Gangadhar MR. Serum enzyme of matrix metalloproteinase-3 in patients with knee osteoarthritis. *Int J Rec Sci Res* 2015;6:4457-60. doi:10.1043/1543-2165(2007)131[563:SLOMMS]2.0.CO;2
- 16.Buissonlegendre N, Smith S, March L, Jackson C. Elevation of activated protein C in synovial joints in rheumatoid arthritis and its correlation with matrix metalloproteinase II. *Arth Rheumatol* 2004;50:2151-6. doi:10.1002/art.20313
- 19.Gong Y, Chippadavenkata UD, Oh WK. Roles of matrix metalloproteinases and their natural inhibitors in prostate cancer progression. *Cancers* 2014; 6:1298-327. doi:10.3390/cancers6031298
- 20.Itoh Y. Metalloproteinases in rheumatoid arthritis: potential therapeutic targets to improve current therapies. *Prog Mole Biol Trans Sci* 2017; 148: 327-38. doi:10.1016/bs.pmbts.2017.03.002
- 21.Kapoor M, Kojima F, Crofford LJ. Arachidonic acid derived eicosanoids in rheumatoid arthritis implications and future targets. *Arth Rheumatol* 2006;2: 323-30. doi:10.2217/17460816.1.3.323
- 22.Singh JA, Saag KG, Bridges SL, Akl EA, Bannuru RR, Sullivan MC, et al. American college of rheumatology guideline for the treatment of rheumatoid arthritis. *Arth Rheumatol* 2016; 68:1-26. doi :10.1002/art.39480
- 23.Kim JD, Kang SM, Park MY, Jung TY, Choi HY, Ku SK. Ameliorative anti diabetic activity of dangnyosoko a chinese herbal medicine in diabetic Rats. *Biosci Biotechnol Biochem* 2007;71:1527-34. doi: 10.1271/bbb.70058
- 24.Philippe L, Alsaleh G, Suffert G, Meyer A, Georgel P, Sibilia J, et al. TLR2 expression is regulated by microRNA miR-19 in rheumatoid fibroblast like synovocytes. *J Immunol* 2012; 188:454-61. doi:10.4049/jimmunol.1102348
- 25.Kessenbrock K, Plaks V, Werb Z. Matrix metalloproteinases regulators of the tumor microenvironment. *Cell* 2010; 141:52-67. doi:10.1016/j.cell.2010.03.015
- 26.Alameddine HS, Morgan JE. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitor of metalloproteinases in inflammation and fibrosis of skeletal muscles. *J Neuromuscul Dis* 2016;3:455-73. doi: 10.3233/JND-160183
- 27.Roy R, Yang J, Moses MA. Matrix metalloproteinases as novel biomarker s and potential therapeutic targets in human cancer. *J Clinl Oncol* 2009;27:5287-97. doi: 10.1200/JCO.2009.23.5556
- 27.Wassilew GI, Lehnigk U, Duda GN, Taylor WR, Matziolis G, Dynybil C. The expression of proinflammatory cytokines and matrix metalloproteinases in the synovial membranes of patients with osteoarthritis compared with traumatic knee disorders. *J Arthroscop Rel Surg* 2010; 26:1096-104. doi: 10.1016/j. arthro.2009. 12.018
- 28.Ugarteberzal E, Vandooren J, Bailon E, Opdenakker G, Garcipardo A. Inhibition of MMP-9-dependent degradation of gelatin but no other MMP-9 substrates by the MMP-9 hemopexin domain blades 1 and 4. *J Biol Chem* 2016; 4: 115. doi: 10.1074/jbc.M115.708438
- 29.Bailon E, Ugarteberzal E, Amigo-jimenez I, Vansteen P, Opdenakker G, Garciamarco JA, et al. Overexpression of progelatinase B/proMMP-9 affects migration regulatory pathways and impairs chronic lymphocytic leukemia cell homing to bone marrow and spleen. *J Leukocyte Biol* 2014; 96:185-99. doi:10.1189/jlb.3HI0913-521R
- 30.Kessenbrock K, Wang CY, Werb Z. Matrix metalloproteinases in stem cell regulation and cancer. *Matrix Biol* 2015;44: 184-90. doi:10.1016/j.matbio.2015.01.022
- 31.Dufour A, Zucker S, Sampson NS, Kuscu C, Cao J. Role of matrix metalloproteinase-9 dimers in cell migration design of inhibitory peptides. *J Biol Chem* 2010;285: 35944-56. doi:10.1074/jbc.M109.091769

Zizyphus jujuba Seed Essential Oil Inhibits Lipopolysaccharide-Stimulated THP-1 Cells Invasion and Migration through Suppression of Matrix Metalloproteinase-9 Expression

Ghodousidehnavi E¹, Maghsoudi H^{2*}, Hajihosseini R¹

(Received: May 2, 2017

Accepted: August 19, 2017)

Abstract

Introduction: Migration and invasion features, which were associated with inflammatory response, play a vital role in the pathogenesis of osteoarthritis. Metalloproteinases (MMPs) as one of the most important catabolic bio-markers play a critical role in THP-1 invasion and migration induced by lipopolysaccharides (LPS). The aim of this study was to investigate the anti-invasive and anti-migratory properties of Zizyphus jujuba seed essential oil by inhibiting metalloproteinase 1, 2, 3, and 9, which are expressed during the development of osteoarthritis.

Materials & Methods: The seeds of Z. jujuba were collected from Isfahan. The seeds were separated and the essence was extracted in the Center of Genetic Resources of Iran. The effect of Zizyphus jujuba seed essential oil on cell viability, migration, and invasion of THP-1 cells was analyzed using MTT assay and transwell chambers assay, respectively. The expression of MMP-1, 2, 3, and 9 genes was evaluated by Real-time PCR, protein

expression with Western blotting and ELISA, and the activity of MMP-2 and MMP-9 was investigated by gelatin-zymography.

Findings: Zizyphus jujuba seed essential oil (50 µg/ml) could remarkably suppress the migratory and invasive capacity of THP-1 cells stimulated with LPS compared with the control group ($P < 0.05$). Results showed that Zizyphus jujuba seed essential oil significantly suppressed LPS-stimulated THP-1 migration and invasion by inhibiting MMP-9 expression and activity ($P < 0.05$).

Discussion & Conclusions: Zizyphus jujuba seed essential oil could inhibit THP-1 migration and invasion induced by LPS by suppressing MMP-9 expression, providing a theoretical foundation for the clinical treatment of osteoarthritis with Zizyphus jujuba seed essential oil.

Keywords: Osteoarthritis, Zizyphus jujuba essential oil, Invasion, Migration, Metalloproteinase

1. Dept of Biotechnology, Faculty of Sciences, Payame Noor University, Tehran, Iran

2. Dept of Biology, Faculty of Sciences, Payame Noor University, Tehran, Iran

* Corresponding author Email: hosseinm2002@gmail.com