بررسی اثر کارنوزیک اسید بر بیان ژن *TNF-α* در سلول های ساینوویو سیت تحریک شده با LPS

مهرانوش صفارپور[1]، حسین مقصودی[2*]، محمد فضیلتی[1]

۱) گروه زیست شناسی، دانشگاه پیام نور، واحد اصفهان، اصفهان، ایران

۲) گروه بیوتکنولوژی، دانشگاه پیام نور، واحد ری، ری تهران، ایران

تاریخ دریافت: ۹۶/۴/۱۷ تاریخ پذیرش:۹۶/۷/۳۰

چکیده

مقدمه: استئوآرتریت از اصلی ترین دلایل ناتوانی در بزرگسالان است. به عنوان نقص پیش رونده تخریب مفاصل، استئوآرتریت توسط آسیب های مفصلی ، تغییر در استخوان ساب کندریال و التهاب بافت سینوویوم و تاندون ها شناخته می شود. عوامل غیر دارویی که بیان واسطه های پیش التهابی را متعادل می کنند، درمان های موثر قابل ملاحظه ای برای این بیماری ایجاد می کند. هدف از انجام این مطالعه بررسی اثر کارنوزیک اسید بر بیان ژن TNF-α در ساینوویو سیت است.

مواد وروش ها: به منظور تعیین دوز مناسب کارنوزیک اسید، ۶ میلیون از ساینوویو سیت ها را در شرایط ۵٪ دی اکسید کربن و دمای ۳۷ درجه در انکوباتور ۱) فقط در محیط کشت ۲) کارنوزیک اسید با غلظت های ۰/۰۱، ۰/۰۹، ۰/۱، ۰/۹ ، ۱،۹، ۱۰ و ۹۰ میلی گرم / میلی لیتر نگه داری شده است. سلول های ساینوویو سیت با ۲۰ نانو گرم / میلی لیتر LPS به مدت یک ساعت برای اندازه گیری میزان mRNA ی TNF-α از طریق Real-time PCR و Reverse-transcriptase PCR تیمار می شوند.

یافته ها: کارنوزیک اسید بیان TNF-α را در سلول های تحریک شده با LPS کاهش می دهد . در سلول های تیمار شده با کارنوزیک اسید بیان TNF-α به میزان٪ ۴۸/۱۱ در مقایسه با گروه کنترل مثبت کاهش بیان می یابد.

بحث و نتیجه گیری: این مطالعه نشان داد که کارنوزیک اسید به عنوان مهارکننده بالقوه TNF-α است. بر اساس مطالعات پیشین این واسطه ها در ایجاد علائم بیماری موثر هستند وکاهش این واسطه ها با بهبود تخریب غضروف همراه است.

واژه های کلیدی: استئو آرتریت، کارنوزیک اسید، TNF-α، ساینوویو سیت

* **نویسنده مسئول** : گروه بیوتکنولوژی، دانشگاه پیام نور، واحد ری، ری تهران، ایران

Email: hosseinm2002@gmail.com

Copyright © 2017 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.

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2024-04-25]

[DOI: 10.29252/sjimu.25.5.133]

مقدمه

استئو آرتریت متداول ترین بیماری مفصلی در انسان و یکی از شایع ترین بیماری ها در میان پستانداران می باشد که زنان را بیش از مردان مبتلا می سازد. اگر چه علت این بیماری به طور کامل شناخته شده نیست ولی فاکتور های سیستماتیک و فاکتور های مکانیکی موضعی می توانند حساسیت به OA را به طور قابل توجه افزایش دهند (۱). استئو آرتریت به عنوان چهارمین دلیل ناتوانی در سطح جهان به شمار می آید . هم چنین این بیماری به عنوان یکی از متداول ترین نقایص ماهیچه اسکلتی، تغییرات تخریبی در مفاصل و اصلی ترین دلیل ناتوانی وکاهش کیفیت زندگی است (۲) . تغییرات تخریبی در مفاصل التهابی با یک مجموعه از رویداد های بیو شیمیایی همراه است که از جمله آن ها، تولید بیش از حد سایتوکین التهاب آوری به نام فاکتور آلفای نکروزه کننده تومور (TNF-α) است. این فاکتور توسط کندروسیت ها و ساینوویو سیت ها (سلول های لایه سینوویال) و سلول های مونو نوکلئاز (مونوسیت – ماکروفاژ) موجود در لایه های زیرین سینوویوم تولید می شوند. سایتوکین فوق الذکر به عنوان سایتوکین کلیدی قلمداد می شود که با روند پاتو ژنیک بیماری استئو آرتریت در ارتباط است. این سایتوکین به عنوان پروتئین غشاء گذر همو تترا مریک تیپ II که می تواند به درون محیط ترشح شود (۳). فاکتور آلفای نکروزه کننده تومور یک واسطه ی مهم و اصلی در پاسخ بیو لوژیکی بدن به باکتری های گرم منفی بوده و نقش بسیار مهمی را در پاسخ‌های ایمنی ذاتی در مقابل ارگانیسم های عفونت زا ایفاء می‌کند. منبع اصلی سلولی TNF، فاگوسیت های تک هسته ای فعال شده توسط لیپو پلی ساکارید (LPS) می باشند که می تواند تولید تعدادی از فاکتور های التهابی و کاتابولیک را القا می کند. این عامل در بیماران استئو آرتریت درغشاء ساینو ویال، مایع ساینو ویال غضروف و استخوان ساب کندرال بالا می رود که می تواند به طور مستقل یا با دیگر سایتوکین ها عمل کند (۴). ازطرفی سایتوکین مورد بحث موجب تحریک سنتز متالو پروتئیناز ها و بر عکس مهار تولید مهار کننده بافتی متالو پروتئیناز ها شده و لذا به نفع افزایش تخریب ماتریکس خارج سلولی عمل می کنند. تولید بیش از حد این گونه سایتوکین ها، تخریب ماتریس غضروف را از طریق متوقف کردن تولید پروتو گلیکان ها و کلاژن تیپ II موجب می شود، ضمن آن که تولید آنزیم های تخریب کننده ماتریس مثل متالو پروتئیناز (MMP) را افزایش می دهد (۵) . درمان های فعلی استئو آرتریت شامل ضد التهاب های غیر استروئیدی، گلوکو کورتیکوئید و هیالورونیک اسید، عمدتاً مبتنی بر کاهش درد و التهاب هستند، اما اثرات محدود و کوتاه مدتی در کنترل علائم و بهبود کیفیت زندگی بیمار دارند (۶). استامینوفن ضد درد انتخابی است، در موارد وجود التهاب و مقاومت به استامینوفن، دارو های ضد التهاب غیر استروئیدی (NSAIDs) موثر تر از استامینوفن هستند (۷). شایع ترین عارضه مصرفNSAIDs عوارض گوارشی مانند سوء هاضمه، تهوع، زخم پپتیک و خونریزی گوارشی می باشد. تشدید نارسایی احتقانی قلب ، افزایش فشار خون، اختلالات کبدی، کلیوی، تنفسی و عصبی نیز از عوارض دیگر مصرف این دارو ها می باشند. بروز یا تشدید آسم و منتژیت آسپتیک نیز هم از سایر عوارض این دسته از داروها گزارش شده است (۸).در مجموع می توان گفت درمان های رایج بر کاهش علائم بیماری و نه متوقف ساختن پیشرفت پاتو لوژی تمرکز دارند. این واقعیت، ضرورت جهت گیری به سمت روش های درمانی جدید که متوجه علت اصلی بیماری باشند را مشخص می سازد. استفاده از گیاهان دارویی به سبب حداقل عوارض جانبی می تواند درمان جایگزین مناسبی باشد. کارنوزیک اسید که یک دی ترپن با فرمول بسته $C_{20}H_{28}O_4$ با نام آیوپاک بنز دی

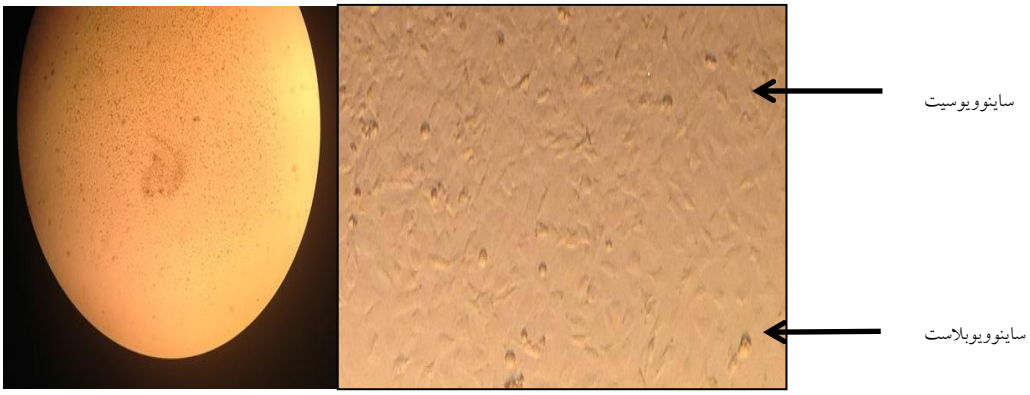
[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2024-04-25]

[DOI: 10.29252/sjimu.25.5.133]

ال آبی تین دی ترپن که به بزرگ ترین گروه (با بیش از ۵۰ هزار) متابولیت گیاهی با نام ترپنوئید متعلق است و نیز با نام ایزو ترپنوئید شناخته شده اند. به سبب دارا بودن گروه فنولیک این مولکول اغلب در دسته پلی فنل ها دسته بندی می شود (۹). این ماده دارای خواص متعددی از جمله آنتی اکسیدانی، ضد سرطانی، ضد باکتریایی و ضد ویروسی می باشد (۱۰). با توجه به اثرات ذکر شده از کارنوزیک اسید، هدف از انجام این پژوهش، بررسی اثرات ضد التهابی کارنوزیک اسید بر سلول های ساینوویو سیت به عنوان مدلی شبیه به سلول های غضروفی مبتلا به اوستئو آرتریت می باشد.

مواد و روش ها

کشت سلول های ساینوویو سیت: برای جدا سازی سلول های ساینوویو سیت از مفصل گوساله هشت ماهه سالم استفاده carpometacarpal (CMC) گردید. ابتدا مایه مفصلی توسط سرنگ استریل کشیده شده و هم چنین کندیل خارجی مفصل مورد نظر، توسط کورت در اندازه های کم تر از یک میلی متر برداشت و پس از آن دو نوبت با بافر PBS ۱مولار و pH= ۷/۲ با استفاده از آنزیم Collagenase Type II شستشو داده شد. سپس سلو ل ها به مدت ۱۶ ساعت، در بن ماری 37° C نگه داری و سپس توسط فیلتر استریل جدا گردید و برای Subculture به فلاسک مخصوص انتقال داده شد و تا زمانی که ۸۵٪ حجم فلاسک توسط لایه تک سلولی پوشانده شود در انکوباتور با شرایط CO_2 ۵٪ و دمای $37^{o}C$ و رطوبت نگه داری شد. برای شمارش سلول ها از محلول تریپسین ۲۵٪ و برای شمارش سلولی از تریپان بلو ۴٪ استفاده گردید (شکل۱).



شکل الف شکل ب

. شکل ۱: تصویر میکروسکوپی از ساینوویوسیت ها.

شکل الف: بزرگ نمایی ۱۶×۴ و شکل ب، با بزرگنمایی ۱۰×۱۶. در شکل ب: *Bovine Fibroblast like synoviocyte* شبیه سلول های دوکی شکل و *Bovine Fibroblast-like synoviocyte (synovioblast)* به صورت سلول های گرد مشاهده می شوند. عکس در آزمایشگاه کشت سلولی مرکز بیوتکنو لوژی دانشگاه پیام نور مرکز شهر ری با میکروسکوپ فاز کنتراست مدل *PLYMPUS* و دوربین مدل *Labomade JVU*۳۱۰۰ انجام شده است.

الف- تعیین سمیت به روش SDH Assay: میزان ۰، ۴، ۸، ۱۶، ۲۰ میکرو لیتر از محلول mM ۲ DCIP به چاهک های پلیت ۹۶ خانه افزوده شد. به ترتیب غلظتی معادل ۰، ۸، ۱۶، ۲۴، ۳۲، ۴۰ نانو مول در هر یک از چاهک ها ایجاد و غلظت صفر به عنوان بلانک مورد استفاده قرار گرفت. توسط بافر SDH حجم چاهک ها به ۱۰۰ میکرو لیتر رسانده شد. پس از آن تعداد $۱۰^{۶}$ ×۱ سلول به وسیله ۱۰۰ میکرولیتر از SDH Assay Buffer سرد شده مخلوط و هموژنیزه و سپس با شرایط ۱۰۰۰۰ xg مدت ۵ دقیقه به منظور

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2024-04-25]

[DOI: 10.29252/sjimu.25.5.133]

رسوب دادن مواد غیر قابل حل سانتریفیوژ و فاز بالایی به لوله میکرو فیوژ جدید انتقال یافت. مراحل بعدی کار بر اساس پروتکل روشSDH assay از شرکت سیگما انجام شد و فعالیت SDH توسط تولید محصولی با جذب در ۶۰۰nm متناسب با حضور فعال آنزیمی مشخص گردید (یک واحد از SDH مقادیری از آنزیم است که ۱µmol از DCIP در دقیقه در۷/۲ =pH ودر دمای ۲۵ C^o تولید کند).

ب- تعیین سمیت به روشLDH assay: تعداد $۱۰^۶$ ×۱ سلول در ۱۰۰ میکرو لیتر محیط کشت را به صورت سوسپانسیون در آورده و میزان ۵۰۰ میکرو لیتر از بافر LDH Assay (قبل از شروع آزمایش، بافر را در داخل ظرف حاوی یخ نگه داری شد) به لوله های میکرو فیوژ اضافه و بلا فاصله با استفاده از هموژنایزر هموژنیزه کرده و به منظور برداشتن مواد غیر قابل حل، فاز بالایی برای اندازه گیری میزان فعالیت آنزیم LDH در شرایط ۲۵ C^o , ۱۰۰۰۰xg به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ شد. سپس ۵۰-۲ میکرو لیتر از هر یک از لوله های میکرو فیوژ را به چاهک های مورد نظر انتقال و سپس حجم نهایی هر چاهک را با استفاده از بافر LDH Assay Buffer به ۵۰ میکرو لیتر می رسد.

از یکی از نمونه ها به صورت تصادفی، رقت های سریالی تهیه و به طور اختصاصی توسط روش کلوری متریک در ۴۵۰nm اندازه گیری می شود (پروتکل روشLDH assay از شرکت سیگما).

ج- تعیین سمیت به روشMTT assay : در این روش آنزیماتیک به عنوان سوبسترای واکنش از نمک های محلول تترا زولیوم که مهم ترین آن ها MTT است استفاده می شود. تترا زلیوم 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 می‌کند، 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 نا محلول فورمازان تبدیل می شود. بلور های نا محلول در آب فورمازان توسط حلال های آلی مانند DMSO و یا ایزوپریل اسیدی حل شده و سپس جذب نوری رنگ بنفش ایجاد شده توسط اسپکترو فومتری در طول موج ۵۷۰nm قرائت می‌شود (پروتکل روش MTT assay از شرکت سیگما).

د- تعیین میزان LC۵۰ با استفاده از کارنوزیک اسید: تعداد۱۰۰ هزار سلول را در پلیت ۹۶ خانه ته صاف با محیط کشت داده شده و در شرایط استاندارد نگه داری شده است و کارنوزیک اسید (تهیه شده از شرکت سیگما، انگلستان با غلظت ۹۱٪ با شماره C0609) با غلظت های µg / ml ۰/۰۱، ۰/۰۹ ، ۰/۱ ، ۰/۹، ۱، ۹، ۱۰ و۹۰ در DMSO حل شده و به چاهک ها افزوده شد. پس از ۷۲ ساعت اثرات لیز سلولی بررسی گردید. در صورت تزریق ml / microgram ۰/۹ به محیط کشت میزان ۵۰٪ سلول ها ازبین خواهند رفت که در نتیجه نهایی به دست آمده تاثیر به سزایی دارد و لذا برای جلوگیری از این خطا میزان۵۰ LC Median را محاسبه کرده که برابر با µg / ml ۰/۲۷۵ می باشد (۱۱) .

ه – تیمار سلول ها با لیپو پلی ساکارید (LPS): لیپو پلی ساکارید به عنوان عامل ایجاد کننده مدل بیماری استفاده می شود و تزریق LPS به محیط کشت حاوی سلول منجر به افزایش بیان سایتوکین های پیش التهابی و التهابی می شود (۱۲). ابتدا $۱۰^۶$ ×۶ سلول را کشت داده شد. پس از ۷۲ ساعت میزان LPS۱۰۰ng به محیط اضافه شد. سری اول پلیت ها، به مدت ۲۴ ساعت به منظور بیان سایتوکین های پیش التهابی مانند TNF-α در انکوباتور $CO_۲$ نگهداری شد.

و- تیمار سلول ها توسط دگزا متازون: دگزا متازون اثر ضد التهابی دارد و برای درمان موارد بسیار زیادی از بیماری ها و سندرم ها در موارد حساسیت، سرکوب کردن افزایش بیان سایتوکاین ها در جریان بیماری های متفاوت و به خصوص در موارد نارسایی های سیستم ایمنی مورد استفاده فراوانی دارند (۱۳) و نشان داده شده است که موجب ممانعت از بیان سایتوکاین های زیادی مانند TNF- α می شوند (۱۴). در این مطالعه از دگزا متازون با دوز nanoM ۱۰۰-۱ به عنوان کنترل مثبت به دلیل آن که مشخص شده که

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2024-04-25]

[DOI: 10.29252/sjimu.25.5.133]

توانایی کاهش بیان سایتوکین های پیش التهابی را دارد (۱۵)، استفاده گردید.

ز- تیمار سلول ها با NSAIDs: دارو های غیر استروئیدی در کاهش درد و تب و جلوگیری از تورم بسیار موثر می باشد .در این بررسی برای مقایسه اثر ضد التهابی کارنوزیک اسید با دارو ها NSAIDs ، از ایبو بروفن با دوز ۵۰-۱۰۰ nanoM ، به عنوان NSAIDs، به دلیل توانایی کاهش بیان سایتوکین های پیش التهابی در سلول های تحریک شده توسط LPS، استفاده شد (۱۶).

ح- تاییدیه کندرو سیت و ساینوویو سیت شبیه فیبرو بلاست گاوی: برای تایید ساینوویو سیت های شبییه فیبرو بلاست گاوی از آنتی بادی ویمنتین که مارکر اختصاصی سلول های مزانشیمال است (۱۷) استفاده شد. عصاره سلولی از حدود ۲×۱۰^{۵} سلول توسط هموژنیزه شدن در بافر لیز کننده و سانتریفیوژ در سرعت۱۴۰۰۰ به مدت ۱۵ دقیقه آماده گردید. غلظت پروتئین در سوپرناتانت با استفاده از روش برادفورد تعیین، نمونه های پروتئینی در SDS-PAGE ۱۲٪ جدا شد و سپس به غشای نیترو سلولزی منتقل شد (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). غشا با آنتی بادی اولیه ×۱ SDS بافر لود کننده به نمونه لیز شده اضافه و به مدت ۱۰ دقیقه جوشانده شد. سپس در SDS-PAGE ٪ ۱۲ تزریق گردید. پروتئین ها به غشاء سلولزی منتقل شده و سطح کل غشاء در تمام طول شب در بافر تثبیت کننده، تثبیت شد (T-۲۰ , PBS, pH=۷/۳,۰/۵٪ BSA). فیلتر ۳ بار به مدت ۲۰ دقیقه شستشو و برای هر بار شستشو در بافر شستشوکننده (PBS, ۷/۳, ۰/۰۵٪ BSA,Tween ۲۰ pH=) پس از شستشو بافر با آنتی بادی های اولیه ویمتین در رقت۱/۲۰۰ به مدت ۱ ساعت در ۳۷ درجه سانتی گراد نگه داری گردید. سپس فیلتر توسط بافر شستشو دهنده سه نوبت هر بار ۱۰ دقیقه شستشو داده شد. فیلتر توسط آنتی بادی ثانویه (goat anti mouse IgG, alkaline phosphates conjugate) (Sigma, USA) با رقت ۱/۵۰۰۰ تهیه شده در واش بافر به مدت ۲ ساعت در درجه حرارت اتاق نگه داری و سپس دو نوبت توسط بافر آلکلاین فسفات (mM , Tris-HCl , ۹/۵, ۱۰۰ mM $MgCl_2$۵۰NaCl ۱۰۰pH= mM) سپس در محلول تثبیت کننده نگهداری شده (افزودن ۶۶ µl ،۵۰ mg/ml نیتروبو تترا زولیوم) و ۳۳µl از ۵۰mg/ml برمو کلرو ایندیل فسفات (BCIP) در ml ۱۰ از بافر آلکالاین فسفات) در دمای اتاق به آرامی مخلوط کرده و در یک محیط تاریک نگه داری شد تا باند ظاهر شود (شکل۲). با استفاده از معرف Trizol شرکت سینا ژن و برای تعیین غلظت RNA از روش اسپکترو فتومتری (UV-۲۱۰۰ Spectrophotometer,USA) استفاده گردید و در صورت وجود آلودگی DNA، ازآنزیم DNase برای از بین بردن DNA اضافی استفاده می شود. سپس برای خالص کردن از فنل کلرفرم استفاده شد. برای خالص کردنِ DNA طبق پروتکل عمل کرده و روی ژل آگارز ٪۱ لود شد. برای تبدیل RNA به cDNA از کیت step RT-PCR ۲ از شرکت (USA, vivantis) بر اساس پروتکل مربوطه استفاده گردید. در انتها بر روی cDNA، با انجام PCR غلظت نمونه تولید شده افزایش پیدا کرد. برای هر نمونه ۱µg از RNA (توسط کیت step RT-PCR ۲) تبدیل به cDNAمی شود RT-PCRدر شرایط $۴۲^{o}c$ به مدت ۶۰ دقیقه و حرارت $۹۴^{o}c$ به مدت ۵ دقیقه (به منظور قطع سنتزcDNA) انجام شد.

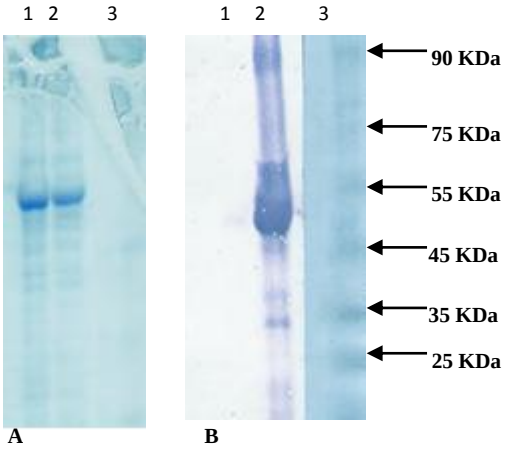
پرایمر های مورد نیاز در این پژوهش با استفاده از بانک ژن NCBI طراحی گردید و پس از اطمینان از صحت طراحی پرایمر ها جهت انجام Semiquantitative PCR (ژن GAPDH به عنوان ژن خانه دار) مطابق جدول شماره ۱ سنتز شدند. PCRدر شرایط استاندارد انجام شد و فرآورده PCR در ژل آگاروز ٪ ۱ همراه با اتیدیوم بروماید ۰/۵ µg/ml چک شد. Quantilative Real time PCR در زمان واقعی با استفاده از پرایمر های جدول ۱ انجام گردید و ازevagreen به عنوان مستر میکس کارخانه سینا کلون استفاده شد. نتایج به دست آمده از (CT)، Treshhold cycle) توسط دو روش :

۱- منحنی استاندارد ۲- روشPffafi method مورد ارزیابی قرار گرفت.

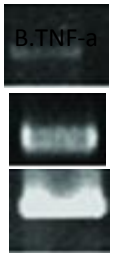
[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2024-04-25]

[DOI: 10.29252/sjimu.25.5.133]

تمامی داده ها به عنوان میانگین SD ±۱ بیان شده . آنالیز آماری با استفاده از آنالیز یک سویه واریانس (ANOVA)، نرم افزار tstudent و نرم افزار SPSS Version۲۱ , اجرا شده است. برای آنالیز CT، P< ۰/۰۵ به شکل آماری معنی دار در نظر گرفته شده است.



شکل ۲ – شکل A: SDS-PAGE و شکل B: Western blootd همان گونه که در شکل ملاحظه می شود پروتئینی با وزن مولکولی ۵۵ کیلودالتون که حاصل واکنش ایمینوهیستوشیمی است.



شکل ۳- آگارز ژل ۱٪ از نمونه های PCR product، چاهک ۱ مربوط به ملکول مارکر ۱۰۰bpچاهک شماره ۲ تا ۱٤ RNAمیزان ۵ λ از نمونه + ۱ λ از RNA dye 6X loading در چاهک ها تزریق گردید و تحت میدان الکتریکی غیر متناوب ولتاژ ۹۰ ولت و ۱۵ میلی آمپر مدت زمان ٤۵ دقیقه قرار گرفت.

آنالیز نتایج و تحلیل داده ها:

الف- مقایسه درصد زنده مانی و مرده زایی سلول ها با استفاده از کارنوزیک اسید در سلول های ساینوویو سیت

غلظت اسید کارنوزیک منجر به کاهش میزان فعالیت سلولی می شود به صورتی که در غلظت ۰/۹ *µg/ml* میزان سلول های سالم و از بین رفته با هم برابر و ۵۰٪ می باشد که معادل با ۵۰٪ LC است ولی از آن جایی که این غلظت باعث از بین رفتن نیمی از سلول ها می شود، نیاز به استفاده از غلظتی است که فاقد اثر توکسیک بر سلول ها باشد به همین دلیل میانگین ۵۰٪LC (Average LC۵۰٪) محاسبه می شود که در این آزمایش معادل ۰/۲۷۵ *µg/ml* می باشد (نمودار۱).

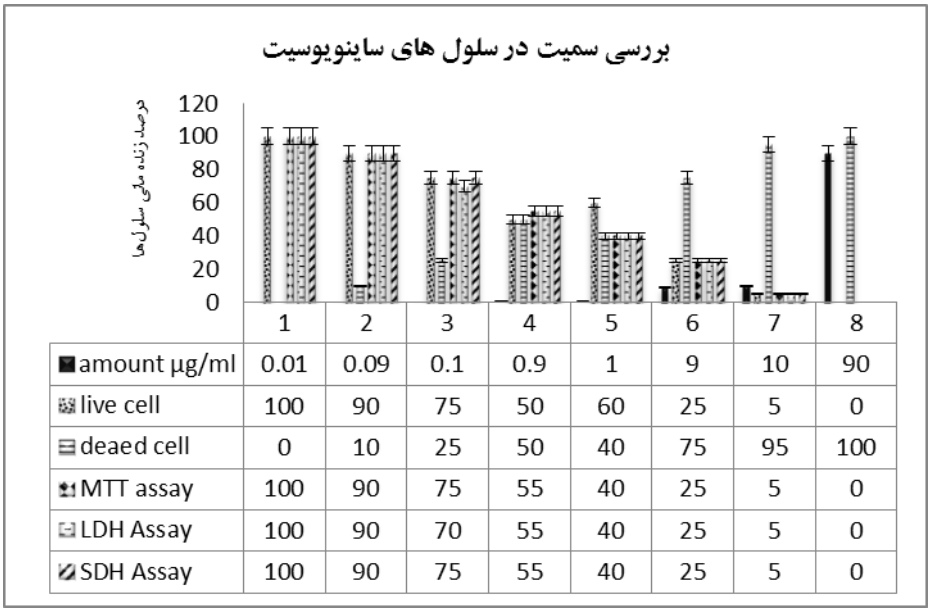
جدول۱- پرایمر های مورد استفاده در روش PCR نیمه کمی

bovine TNF-α	PCR Product Size: 100bp
Forward	3'- TAA CAA GCC GGT AGC CCA CG-5'

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2024-04-25]

[DOI: 10.29252/sjimu.25.5.133]

Reverse	3'- GCA AGG GCT CTT GAT GGC AGA-5'



	1	2	3	4	5	6	7	8
amount µg/ml	0.01	0.09	0.1	0.9	1	9	10	90
live cell	100	90	75	50	60	25	5	0
deaed cell	0	10	25	50	40	75	95	100
MTT assay	100	90	75	55	40	25	5	0
LDH Assay	100	90	70	55	40	25	5	0
SDH Assay	100	90	75	55	40	25	5	0

نمودار ۱- مقایسه درصد زنده مانی و مرده زایی سلولها با استفاده از کارنوزیک اسید در سلول‌های ساینوویوسیت.غلظت های ۰/۰۱، ۰/۰۹، ۰/۱، ۰/۹ ، ۱،۹، ۱۰ و ۹۰ میکروگرم در میلی لیتر.درغلظت ۹/ ۰میکروگرم در لیتر جمعیت سلولهای مرده و زنده با هم برابرند

ب- تاثیر کارنوزیک اسید بر بیان TNF-α

با استفاده از Real-time PCR نیمه کمی، ساینوویسیت ها به مدت ۷۲ ساعت با کارنوزیک اسید انکوبه شده و به مدت ۱ ساعت با LPS تیمار گردید. بر اساس نمودار ۲ و جدول شماره ۲ گروه cell+LPS به عنوان شاهد مثبت درنظر گرفته شده است. اختلاف معنی داری بین گروه شاهد مثبت و سایر گروه ها مشاهده گردید. آنالیز این داده ها بر اساس ANOVA انجام گرفته است و مشخص شده است که میزان بیان ژن Bovine TNF-α در اثر تحریک با LPS به میزان ۱۰۰٪ افزایش یافته است. تیمار با کارنوزیک اسید موجب کاهش بیان به میزان ۴۸/۱۱٪ می گردد (جدول۲ و نمودار۲). به منظور تایید نتایج حاصله با استفاده از روش PCR میزان بیان ژن را اندازه گیری کرد و بر اساس شکل ۳، بیان ژن B.TNF-α در سلول های ساینوویو سیت بعد از تحریک توسط LPS افزایش یافته (ردیف دوم) و بعد از تیمار توسط کارنوزیک اسید تقریبا به میزان ٪ ۱۰۰کاهش یافته است. بر اساس درخشندگی بند مورد مشاهده میزان بیان B.TNF-α در اثر تزریق کارنوزیک اسید در سلول های تحریک شده با LPS تقریبا ٪۷۵ نسبت به سلول هایی که توسط LPS تیمار شده اند کاهش داشته است. اما با افزودن DMSO به سلول تحریک شده با LPS تغییری در بیان B.TNF-α ایجاد نمی شود.

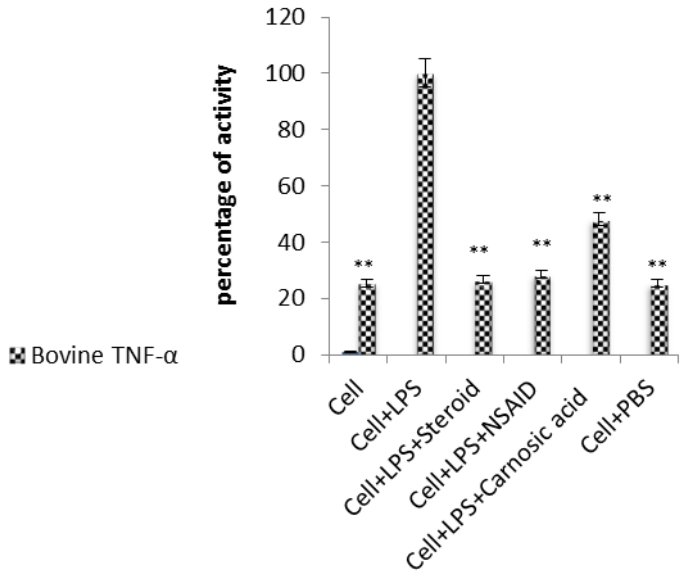
جدول۲- تاثیر کارنوزیک اسید بر بیان ژن TNF-α در سلول های ساینوویوسیت با استفاده از آنالیز RT-PCR نیمه کمی

	Cell	Cell+LPS	Cell+LPS+Steroid	Cell+LPS+NSAID	Cell+LPS+Carnosic acid	Cell+DMSO
Bovine TNF-α	۲۵/۴۵±۰/۱۱۳۷**	۱۰۰	۲۶/۵۸ ±۰/۷۱۸۴**	۲۸/۵ ±۰/۰۴۹۴**	۴۸/۱۱ ±۰/۱۲۶۷**	۲۵/۳۳±۰/۱۷۰۸**

ساینوویوسیت با کارنوزیک اسید به مدت ۷۲ ساعت انکوبه شد و به مدت ۱ ساعت با LPS تیمارشد .بیان ژن متعادل شده در مقایسه با شاهد مثبت به میزان ۰۰۱/ >pمعنی دار است

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2024-04-25]

[DOI: 10.29252/sjimu.25.5.133]



نمودار ۲ - با استفاده از Real-time PCR نیمه کمی. ساینوویسیت ها به مدت ۷۲ ساعت با کارنوزیک اسید انکوبه شده و به مدت ۱ ساعت با LPS تیمار شده است. اختلاف معنی داری بین گروه شاهد مثبت و سایر گروه ها مشاهده شده است. (p<۰/۰۰۱)

ج- آنالیز نتایج آماری بر اساس فرمول ANOVA and F static:

در آنالیز C_T توسط ANOVA، نتیجه نهایی آماری برابر با F می‌باشد، که به بررسی تغییرات بین گروه ها می‌پردازد، اختلاف بین گروه ها numerator و اختلاف داخل گروه ها denominator، در این بررسی تجزیه و تحلیل در دو گروه Cell+LPS, Cell+LPS+CA انجام پذیرفت. که در نهایت منجر به تولید F گردید، پراکندگی F توسط دو میزان درجه آزادی را بیان می‌کند، یکی به نام اختلاف بین گروه ها numerator و دیگری به نام اختلاف داخل گروه ها denominator که ترکیب این دو منجر به توزیع یا پراکندگی F شد. در صورتی که عدد جدول پراکندگی F کمتر از میزان محاسبه شده از جدول پراکندگی باشد، فرضیه پیشنهادی قابل قبول می‌باشد و میزان محاسبه شده در سطح ۵٪ قابل قبول بوده و بین نمونه ها تفاوتی وجود ندارد و اما در صورتی که F static بیش تر از میزان محاسبه شده از جدول پراکندگی باشد، فرضیه پیشنهادی غیر قابل قبول بوده و میزان به دست آمده در سطح ۵٪ قابل قبولبوده او بین نمونه ها تفاوت معنی داری وجود دارد. بنا بر این در صورتی که میزان نهایی F static کم تر از ۳/۸۹ باشد فرضیه ما قابل قبول بوده و به معنی این است که کارنوزیک اسید منجر به کاهش بیان ژن سایتوکین‌های مورد نظر در سلول‌های تیمار شده توسط LPS شده است. در صورتیکه میزان نهایی F static بیشتر از ۳/۸۹ باشد فرضیه ما غیر قابل قبول است. با توجه به نتایج مربوط به سایتوکین ها، نتایج میزان نهایی F static سایتوکین TNF- α کمتر از p-Value درج شده در جدول توزیع فراوانی است و برابر ۱/۴۵می باشد (جدول ۳). پس می توان نتیجه گرفت که فرضیه مورد قبول می باشد به این معنی که کارنوزیک اسید می تواند موجب کاهش بیان TNF-α شود که این با نتایج به دست آمده از روش های ANOVA ، پفافی وReal-time PCR مطابقت دارد.

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2024-04-25]

[DOI: 10.29252/sjimu.25.5.133]

جدول۳- آنالیز نتایج آماری بر اساس فرمول ANOVA and F static

	VEHICLE	Carnosic acid	Critical Value	Result
Bovine TNF-α	۳۲,۴۸±۰,۱۱۳۷	۱,۴۵±۰,۱۲۰۷	۳,۸۹	Acceptable

کارنوزیک اسید منجر به کاهش بیان ژن سایتوکین‌های مورد نظر در سلول‌های تیمار شده توسط *LPS* شده است. با توجه به نتایج مربوط به سایتوکین مورد نظر، نتایج میزان نهایی *F static* سایتوکین *TNF-* α کمتر از *p-Value* درج شده در جدول توزیع فراوانی است و برابر ۱/۴۵می باشد

بحث و نتیجه گیری

استئو آرتریت به عنوان بیماری است که موجب تغییر کامل ساختار مفصل می شود. این تغییرات شامل تخریب پیشرونده غضروف، مینیسک، رباط ها، التهاب سینوویال و تغییر استخوان ساب کندریال است (۱۸). مهمترین فرضیه ا ی که در رابطه با التهاب مفصل استئو آرتریتی مورد قبول واقع شده این است که بخشی از غضروف جداشده و به فضای مفصل وارد می شود و با لایه سینوویال برخورد می کند. لایه سینوویال بخش جداشده از غضروف را به عنوان عامل خارجی قلمداد کرده و به همین دلیل سلول های سینو ویال واسطه های التهابی ترشح می کنند. سایتوکین ها آنزیم های تخریب کننده را در غضروف و بافت سینو ویال فعال می کنند. بنا بر این کاهش بیان ژن سایتوکین ها موجب کاهش آسیب های مفصلی می شود (۱۹) . TNF-α یکی از سایتوکین های اولیه ای است که موجب علائم بیماری استئو آرتریت می شود (۲۰) افزایش غیر طبیعی این سایتوکین در مایع ساینوویال، سینوویوم و بافت غضروف بیماران استئو آرتریتی مشاهده می شود (۲۱). پس از کشف TNF-α سعی در یافتن وظایف این سایتوکین در بیو لوژی انسان بودند. از آن جایی که رسپتور های سایتوکین مذکور تقریبا در تمام سلول های بدن یافت شده، به نظر می رسد که این سایتوکین در فرایند های فیزیو لوژیک متفاوت موثر می باشند.کشف تاثیر پاتو فیزیو لوژیک بیماری هایی مانند بیماری های التهابی می تواند منجر به تولید دارو های جدیدی می شود که بر افزایش تولید TNF-α موثرند و بنا بر این می تواند منجر به یافتن درمان های اساسی برای بیماری هایی هم چون آرتریت روماتوئید و بیماری کرون باشد. پس می توان گفت با شناخت بیشتر نقش TNF-α در ایجاد بیماری ها می توان در آینده دارو های کاربردی بهتری برای تعدیل میزان تولید TNF-α یافت (۲۲). از دیر باز از گیاه رزماری به عنوان یک داروی گیاهی استفاده شده است به ویژه به دلیل خواصی از جمله ضد التهاب، ضد میکربی (۲۳)، ضد سرطان (۲۴) و آنتی اکسیدانت (۲۵) در چند دهه اخیر به شکل علمی برروی این گیاه و مواد موجود در آن تحقیق شده است. بر اساس پژوهشی که توسط برخی از محققین انجام گرفته شده است ، تاثیر عصاره گیاه رزماری در طی ۴ هفته در بیماران مبتلا به استئو آرتریت، آرتریت روماتوئید و سختی عضلات و مفاصل بررسی شده است. Hs-CRD (شاخص به وجود آورنده التهاب) به شکل قابل ملاحظه ای، در بیمارانی که این شاخص در آن ها افزایش یافته است را کاهش می دهد، به هر حال، کاهش التهاب وابسته به در طی درمان مشاهده می شود اما در بیماری سختی عضلات و مفاصل بهبودی در نشانه های بیماری دیده نشده است. علاوه بر این، عصاره رزماری اثرات حفاظتی بر دستگاه گوارش در برابر زخم معده را بهتر از امپرازول نشان می دهد. این مزیت به دلیل تاثیر مهاری بر نفوذ نوتروفیل ها و کاهش تولید واسطه های پیش التهابی مانند TNF-α وIL-1 می باشد (۲۶). با این اوصاف، در مطالعات پیش بالینی دیگر در رت ها میزان بالای عصاره میزان تستوسترون واسپرماتوزوئید را کاهش داده که منجر به عقیم شدن موجود می شود (۲۷). این گیاه خاصیت موضعی ضد التهابی را در ترمیم زخم در موش دارد (۲۸). کارنوزیک اسید در گیاه رزماری با پیش ماده CYP3A4 و CYP2B6 اثر متقابل دارد و هم چنین همانند تاموکسیفن در هپاتوسیت انسان با مقدار E C_{50} خاصیت سمی دارد (۲۹). یکی از ترکیبات موجود در گیاه رزماری کارنوزیک اسید است، این ترکیب به دلیل دارا بودن گروه فنولیک جز دسته پلی فنل ها قرار می گیرد (۳۰). در طی پژوهشی که بر تاثیر کارنوزیک اسید بر پاسخ التهابی پوست انجام گرفت به این نتیجه رسیدند که می تواند موجب توقف آزادسازی TNF-α می شود

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2024-04-25]

[DOI: 10.29252/sjimu.25.5.133]

(۳۱)، هم چنین تاثیر کارنوزیک اسید بر سلول های چربی در هپاتوسیت ها موجب کاهش سایتوکین ها می شود(۳۲) . با توجه به تاثیرات کارنوزیک اسید بر سایتوکین های پیش التهابی در بیماری های مختلف ما نیز در این پژوهش تاثیر کارنوزیک اسید را بر سلول های ملتهب شده توسط LPS را در مدلی شبیه استئو آرتریت بررسی شد. از آن جایی که پیش تر اشاره شد یکی از عوامل موثر بر کاهش التهاب در سلول های ساینوویو سیت و مفاصل مبتلا به استئوآرتریت کاهش بیان سایتوکین های پیش التهابی از جمله TNF-α است. در این مطالعه، ما توانستیم برای اولین بار اثر کارنوزیک اسید را بر فعالیت التهابی ساینوویو سیت ها را نشان دهیم. یافته های ما پیشنهاد کننده اثر ضد التهابی کارنوزیک اسید بر سلول های ساینوویو سیت در گیر در التهاب می باشد و بنا بر این احتمال این که اثرات سودمندی در مناطق مختلف مفاصل مبتلا به آرتروز را داشته باشند زیاد است. ما ثابت کردیم که کارنوزیک اسید بیان ژن های بسیار موثر در ساینوویو سیت های تحریک شده با LPS را سرکوب می کند. در این پژوهش مشخص شد که پس از تحریک سلول های ساینویو سیت توسط۲۰ نانو گرم / میلی لیترLPS میزان بیان سایتوکینTNF-α ۱۰۰٪ افزایش یافته است و به دنبال تیمار توسط کارنوزیک اسید، این سایتوکین به میزان ۴۸/۱۱٪ کاهش بیان یافت که در مقایسه با گروه کنترل منفی (تیمار شده با DMSO)که بدون تغییر است و گروه کنترل مثبت (تیمار شده با دگزامتازون با غلظت ۱-۱۰۰ نانومول) که دارای تغییر قابل ملاحظه و پیش بینی بوده و معنی دار است (P<۰/۰۰۱). نتایج میزان نهایی F static سایتوکین α TNF- کمتر از p-Value درج شده در جدول توزیع فراوانی است و برابر ۱/۴۵ می باشد که با توجه به این نتایج و اثرات این سایتوکین بر روند ایجاد التهاب در مفاصل مبتلا به استئو آرتریت کاهش بیان این سایتوکین می تواند در کاهش التهاب موثر باشد. که البته استفاده از این ماده به عنوان داروی جایگزین درانسان نیاز به پژوهش بر روی موجود زنده دارد .

سپاسگزاری

از ریاست محترم دانشگاه پیام نور مرکز ری جناب آقای دکتر محمد احسان تقی زاده که با پشتیبانی معنوی و حمایت بی دریغ امکان انجام این پروژه را در مکان آزمایشگاه بیو تکنو لوژی آن دانشگاه فراهم نمودند، جناب آقای محمد محمدی مدیر محترم آموزش و جناب آقای حجازیان مدیر محترم کشتارگاه صنعتی سامان گوشت و پرسنل خط کشتار برای تهیه نمودن نمونه های مایع مفصلی به منظور تولید سلول های ساینوویو سیت، تشکر و قدردانی می شود.

References

1.Pelletier PJ, Abramson ST. Osteoarthritis an inflammatory disease potential implication for the selection of new therapeutic targets. Arthritis Rheumatism 2001. P. 1237–47.

2.Cooper C AJ, Bardin T, Berenbaum F, Flamion B. How to define responders in osteoarthritis. Curr Med Res Opin 2013;29:719–29.

3.Wojdasiewicz P, Poniatowski AA, Dariusz S. The role of inflammatory and anti-inflammatory cytokines in the pathogenesis of osteoarthritis. Hindawi Publ Corp Med Inflam2014;561459:1-19.

4. Kasper MG. The role of the chondrocyte in osteoarthritis. Arth Rheum 2000;43:1916-26.

5.Vane JR, Botting RM. Cyclooxygenases 1 and 2. Annu Rev Pharmacol Toxicol2000;38:97-120.

6.Roberts S, Mccaskie A, Bari C. Prospects of stem cell therapy in osteoarthritis. Regen Med 2011;6:351-66.

7.Longo FA, Kasper DL, Hauser SL, Jameson JL, Loscalzo J. Harrisons principles of internal medicine. 3th ed. New York Mcgraw Hill Publication. 2012;P.213.

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2024-04-25]

[DOI: 10.29252/sjimu.25.5.133]

8.Risser A, Heintzman J, Page T. NSAID prescribing precautions. Am Fam Phys 2009;15:80:1371-8.

9.Hill RA. Triterpenoids. Nat Prod Rep 2013;30:1028-65.

10.Birtic S, Bily AC, Roller M. Carnosic acid. Phytochemistry2015;115:9-19.

11.E -BC. LC50 Calculations Help Predict Toxicity. Global Aquacul Advocate2005:84-7.

12.Andreasen AS, Kroghmadsen R, Taudorf S, Pedersen BK, Moller K. Human endotoxemia as a model of systemic inflammation. Curr Med Chem 2008;15:1697-705.

13.Leung D Y BJW. Update on glucocorticoid action and resistance,. J Allergy Clin Immunol 2003;111:3-22.

14.Almawi WY, Rahme AA, Rieder MJ. Regulation of cytokine and cytokine receptor expression by glucocorticoids. J Leukoc Biol 1996;60:563-72.

15.Minghetti L, Polazzi E, Greco A, Perretti M, Matsuda H. Possible involvement of 5-HT and 5-HT2 receptors in acceleration of gastrointestinal transit by escin Ib in Mice. Life Sci 2000;66:2233-8.

16.Bancos S, Topham DJ, Phipps RP. Ibuprofen and other widely used non steroidal anti-inflammatory drugs inhibit antibody production in human cells. Cell Immunol 2009;258:18-28.

17.Upragarin NA, Topten W, Landman JM, Gruys E. Serum amyloid a production by chicken fibroblast like synoviocytes. Vet Immunol Immunopathol 2005;106:39-51.

18.Bijlsma JW, Lafeber FP. Osteoarthritis an update with relevance for clinical practice. Lancet 2011;377:2115-26.

19. Roller M. Osteoarthritis as an inflammatory disease osteoarthritis is not osteoarthrosis .Osteoarth Cartil 2013;21:16-21.

20.Aigner T, Fukui N, Sandell L. Roles of chondrocytes in the pathogenesis of osteoarthritis. Curr Opin Rheumatol 2002;14:578-84.

21.Goldring SR. The role of cytokines in cartilage matrix degeneration in osteoarthritis. Clin Orthop 2004;427:27-36.

22.Laduca JR. Targeting tumor necrosis factor alpha new drugs used to modulate inflammatory diseases. Dermatol Clin 2017;30:1-5.

23.Aruoma OI, Rossi R, Aeschbach R, Khan A, Mahmood N. An evaluation of the antioxidant and antiviral action of extracts of rosemary and Provenc al herbs. Food Chem Toxicol1996;34:449-56.

24.Singletary K, Wallig M. Inhibition by rosemary and carnosol of 7,12 dimethylbenz anthracene induced rat mammary tumorigenesis and in vivo DMBA-DNA adduct formation. Cancer Lett 1996;104:43–8.

25.Richheimer SL, King GA, Kent MC, Bailey DT. Antioxidant activity of lipid soluble phenolic diterpenes from rosemary. J Am Oil Chem Soc 1996;73:507−14.

26.Amaral GP, Barcelos RP. Protective action of ethanolic extract of Rosmarinus officinalis L. in gastric ulcer prevention induced by ethanol in Rats. Food Chem Toxicol2013;55:48−55.

27. Nusier MK, Daradkah HM. Adverse effects of rosemary Rosmarinus officinalis L. on reproductive function in adultmale rats. Expl Biolo Med J 2007;232:809-13.

28. .Aigner T. Healing potential of Rosmarinus officinalis L. on full-thickness excision cutaneous wounds in alloxaninduced diabetic BALB/c Mice. J Ethnopharmacol 2010;131:443-50.

29.Dickmann LJ, Lin YS. In vitro hepatotoxicity and cytochrome P450 induction and inhibition characteristics of carnosic acid a dietary supplement with antiadipogenic properties. Drug Metab Dispos2012;40:1263-7.

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2024-04-25]

[DOI: 10.29252/sjimu.25.5.133]

30.Hill RA. Triterpenoids. Nat Prod Rep 2013;30:1028-65.

31.Oh J, Jeong S, Yang Y, Baek H, An E . Syk src pathway targeted inhibition of skin inflammatory responses by carnosic acid. Hindawi Publ Corp Med Inflam2012;781375:1-13.

32.Wang T, Tabuchi T, Satoh T, Kosaka K, Suzuki K. Carnosic acid prevents lipid accumulation in hepatocytes through the EGFR/MAPK pathway. JGastroenterol 2012;47:805-13 .

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2024-04-25]

[DOI: 10.29252/sjimu.25.5.133]

Evaluating the Effects of Carnosic acid on TNF-α Gene Expression in LPS-activated Synoviocytes

*Saffarpour M[1], Maghsoudi H[2 *], Fazilati M[1]*

(Received: July 8, 2017 Accepted: October 22, 2017)

Abstract

***Introduction*:** Osteoarthritis (OA) is a major cause of disability among adults. As a progressive degenerative joint disorder, OA is characterized by cartilage damage, changes in the subchondral bone and inflammation of the synovium tissue and tendon. Non-pharmacologic agents modulating pro-inflammatory mediator expression offer considerable promise as safe and effective treatments for OA. The aim of this study was to evaluate the effects of Carnosic acid (CA) on TNF-α gene expression in synoviocytes.

***Material & methods*:** To determine the dose response of CA, synoviocytes (5×10^5 cells/well) were incubated at 5% CO2, 37ºC for 72 h with (1) control media alone or (2) CA at concentrations of 0.01, 0.09, 0.1, 0.9, 1, 9,10and 90 mg/ml. Synoviocytes were treated with LPS (20 ng/ml) for 1h and TNF-α mRNA were measured by both reverse-transcriptase PCR and Real-time PCR.

Findings*:* CA reduced TNF-a, expression in LPS-activated synoviocytes to levels similar to nonactivated control levels. Cells activated with 20 ng/ml LPS showed a significant upregulation of TNF-α expression. In activated synoviocytes cells pretreated with CA, TNF-α was reduced by 48/11% when compared to activated control cells.

Discussion & conclusions: This study demonstrates that CA acts as a potent inhibitor of TNF-α. Previous research has shown that these mediators are important in the pathogenesis of OA and reduction in these mediators has been associated with amelioration of cartilage breakdown.

***Keywords*:** Osteoarthritis, Carnosic acid, TNF-α, synoviocyte

1. Dept of Biochemistry, Faculity of Science, Payem noor University, Isfahan, Iran
2.Dept of Biotechnology, Faculity of Science, Payem noor University, Rey,Tehran,Iran
** Corresponding author Email hosseinm2002@gmail.com:*

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2024-04-25]

[DOI: 10.29252/sjimu.25.5.133]