

# کاهش بیان ژن های $TNF-\alpha$ ، $IL-1\beta$ ، $COX-2$ و کاهش تولید $PGE_2$ و $NO$ در کندروسیت های مفصلی و مونوسیت/ماکروفاژ توسط عصاره آبی گیاه خارشتر *Alhagi maurorum L.*

حسین مقصودی<sup>\*</sup>، سمانه حاج الهیاری<sup>۱</sup>، عبدالمجید ناروئی<sup>۱</sup>

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

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۴/۹

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۱۱/۱۶

## چکیده

**مقدمه:** امروزه بیماری استئوآرتریت (آرتروز) را یک بیماری دژنراتیو نمی دانند با توجه به عوارض جانبی مانند زخم های پپتیک، مسمومیت های کبدی و عوارض کلیوی ناشی از درمان داروهای کورتون و غیر استروئیدی، استفاده از گیاهان دارویی به عنوان یک درمان جایگزین پیشنهاد می شود. گیاه خارشتر *Alhagi maurorum L.* به طور معمول در طب سنتی به عنوان یک درمان برای دردهای روماتیسمی استفاده می شود. بنا بر این این تحقیق با هدف اندازه گیری کاهش بیان ژن های  $TNF-\alpha$ ، خارشتر *Alhagi maurorum L.* انجام گرفت.

**مواد و روش ها:** عصاره آبی گیاه خار شتر از مرکز ذخایر ژنتیکی تهیه گردید. برای تهیه سلول ها مفصل و مایع مفصلی متاکارپ اندام حرکتی قدامی گوساله ۸ ماهه هلشتاین کاملاً سالم، بلافاصله بعد از کشتار داخل کیسه استریل به آزمایشگاه ارسال گردید. سلول های THP-1 به صورت فلاسکی حاوی  $6 \times 10^6$  و ۶۰ میلی لیتر محیط کشت غنی شده از انستیتو پاستور تهیه گردید. هر یک از انواع سلول ها در شرایط مناسب کشت داده شد و *viability* آن ها با روش تریپان بلو ارزیابی شد و پس از تکثیر و به منظور افزایش سطح سایتوکین ها به وسیله لیپوپلی ساکارید (LPS) تیمار شدند. بعد از کشت مجدد سلول ها در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد در انکوباتور  $CO_2$  دار با رطوبت ۹۰ درصد برای مراحل بعدی نگهداری شد. پس از جداسازی RNA و تهیه cDNA انجام PCR & RT-PCR و سپس با استفاده از روش Real Time-PCR به بررسی میزان بیان ژن های مورد نظر پرداخته شد.

**یافته های پژوهش:** بیان ژن  $COX-2$  به میزان ۳۶/۵۹ درصد توسط عصاره آبی گیاه خار شتر کاهش یافت. بیان ژن  $IL-1\beta$  به میزان ۵۰ درصد توسط عصاره آبی گیاه خار شتر کاهش یافت. بیان ژن  $TNF-\alpha$  به میزان ۵۱/۸۶ درصد توسط عصاره آبی گیاه خار شتر کاهش یافت و تولید  $NO$  و  $PGE-2$  در اثر عصاره آبی خارشتر به ترتیب به میزان ۴۸ درصد و ۵۲ درصد کاهش یافت.

**بحث و نتیجه گیری:** عصاره آبی گیاه خار شتر منجر به کاهش بیان ژن  $COX-2$  و  $iNOS$  در سلول های ساینوویوسیت تحریک شده

**واژه های کلیدی:** عصاره آبی گیاه خارشتر، اوستئوآرتریت، سایتوکین ها، کندروسیت، مونوسیت، ماکروفاژ

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

Email: hossein\_m2002@yahoo.com

Copyright © 2019 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

آرتروز شایع ترین بیماری مفصلی انسان در دنیا است و به عنوان مثال شیوع آرتروز زانو در ایران در سنین ۸۲-۱۵ در حدود ۱۶ درصد گزارش شده است (۱) مشخصه آرتروز فرسایش غضروف بین مفصلی و تحریک استخوان سازی در استخوان زیر غضروف است. مشخص شده است که این بیماری نه تنها یک بیماری دژنراتیو می باشد بلکه درجاتی از التهاب سینوویوم نیز در مفاصل بروز می کند. مشخص شده است در طی پروسه بیماری کندروسیت ها، سینوویوسیت ها فعال شده و سلول های مونونوکلئار (مونوسیت و ماکروفاژ) نیز در مفصل تجمع می یابند (۲). این سلول های فعال شده سیتوکین های التهابی شامل:  $TNF-\alpha$ ,  $iL-1\beta$  را تولید کرده و از طرفی با بیان آنزیم های  $COX-2$ ,  $iNOS$  موجب افزایش تولید  $PGE_2$ ,  $NO$  می شوند (۳). و این مواد پیش التهابی با مکانیسم های شناخته شده ای (۴) مانند: تحریک سنتز متالوپروتئینازها و مهار تولید مهارکننده بافتی متالوپروتئینازها، تحریک آپوپتوز کندروسیت ها (۵)، و مهار سنتز پروتئوگلیکان ها در افزایش تخریب غضروف نقش ایفا می کنند (۶).

سالانه میلیون ها نفر از مبتلایان به آرتروز برای تسکین درد ناشی از بیماری مجبور به استفاده از داروهای ضد درد به خصوص ضدالتهاب های غیر استروئیدی مانند (ایبوپروفن، دیکلوفناک سدیم و ناپروکسین) و استروئیدها می شوند. داروهای ضدالتهابی غیر استروئیدی دارای عوارض گوارشی و کلیوی می باشند و استروئیدها نیز دارای عوارضی شامل ابتلا به دیابت، فشارخون بالا و پوکی استخوان می باشند. شیوع بالای آرتروز به خصوص آرتروز زانو حجم بالای مصرف داروهای سنتتیک و میزان بالای عوارض جانبی این داروها منجر به تحمیل هزینه های بسیار زیاد در بودجه بهداشت و درمان کشورها می گردد (۷). بنا بر این بعد از مشخص شدن نقش التهاب در پاتوژنز اوستئوآرتریت در طی سال های اخیر بسیاری از محققین در تلاش اند تا نقش ضد التهاب انواع گونه های گیاهان دارویی را مشخص نموده تا شانس استفاده از داروهای ضد درد و ضد

التهابی با عوارض جانبی کمتر را برای بیماران فراهم آورند.

خارشتر یا اشتراغاز با نام علمی *Alhag imaurorum L.* گیاهی دارویی و از خانواده پروانه داران بدون کرک، سبزرنگ، و یکی از بنشن ها به شمار می رود. گل ها بیضی تا سرنیزه ای می باشند. *Alhagi* با نام فارسی خارشتر، به طور معمول در طب سنتی به عنوان یک درمان برای دردهای روماتیسمی استفاده می شود (۸). اغلب اسانس های گیاهی استخراج شده از گیاهان دارای خواص ضدقارچی، ضدانگل، ضدباکتری می باشند (۹). خارشتر دارای دو گونه به نام های (B.M) *A.pseudoalhagi* و *A.graecorum Boiss* می باشد (۱۰). ماده موثری گیاه دارای خاصیت مسهل و مدر است (زرگری) جوشانده اندام هوایی آن برای معالجه عفونت های روده کاربرد دارد (۱۱) این گیاه باعث تحریک سیستم عصبی مرکزی شده و فعالیت مغز و قلب را افزایش می دهد (۱۲). این گیاه حاوی شش فلاونوئید گلیکوزید اصلی و حاوی ترکیبات استرول ها و اسیدهای چرب و آلکالوئید می باشد (۱۳).

هدف از این مطالعه بررسی نقش ضد التهاب گیاه خارشتر از طریق تاثیر بر بیان ژن  $TNF-\alpha$ ,  $iL-1\beta$  جدا شده از مفصل (carpometacarpal CMC)  $COX-2$ ,  $iNOS$  در سلول های کندروسیت گوساله هشت ماهه نژاد هلستاین و تولید  $PGE_2$ ,  $NO$  در سلول های  $THP-1$  به عنوان مدلی شبیه به انفیلتراسیون سلولی مونوسیت و ماکروفاژ در مفصل آرتروزی می باشد.

## مواد و روش ها

کشت سلولی کندروسیت ها و  $THP-1$ . برای جداسازی سلول های کندروسیت از مفصل (carpometacarpal CMC) گوساله هشت ماهه سالم استفاده گردید. ابتدا کندیل خارجی مفصل مورد نظر، توسط کورت در اندازه های کمتر از ۱ میلی متر برداشته شد و پس از دو نوبت شستشو با بافر PBS,  $pH7.2$ , 1 Mollar با استفاده از آنزیم *Collagenase Type II* به مدت ۱۶ ساعت، در بن ماری ۳۷ درجه سانتی گراد نگهداری و سپس سلول ها توسط فیلتر

تعداد بیشتر، میزان رنگ ایجاد شده بیشتر است. جذب نوری رنگ ارغوانی ظاهر شده در طول موج ۵۴۰-۴۹۰ nm اندازه گیری می شود (۱۵).

#### گروه های مورد مطالعه: سلول های غضروفی

مورد مطالعه در این بررسی در هفت گروه مورد بررسی (جدول شماره ۱) قرار گرفتند. گروه اول: به منظور اندازه گیری سطح بیان ژن های مورد نظر در حالت نرمال فقط واجد سلول های غضروفی، گروه دوم: به منظور تاثیر عصاره بر بیان ژن های مورد نظر در سلول های تحریک نشده شامل سلول های غضروفی و عصاره گیاه خارشتر، گروه سوم: شامل سلول های غضروفی تحریک شده توسط LPS به منظور ایجاد مدلی شبیه استوآرتريت، گروه چهارم: به منظور تاثیر عصاره گیاه خارشتر در مدلی شبیه بیماری، شامل سلول های غضروفی به علاوه LPS و عصاره گیاه خارشتر، گروه پنجم: به منظور این که آیا PBS به عنوان پلاسبو تاثیری بر بیان ژن های مورد مطالعه دارد یا خیر، و شامل سلول های غضروفی به علاوه LPS و PB سلول های غضروفی به علاوه LPSS، گروه ششم و هفتم: برای مقایسه تاثیر عصاره گیاه خار گروه شتر با داروهای رایج در درمان استوآرتريت از دگزامتازون (گروه ۶) و NSAID (گروه ۷) در مدلی شبیه بیماری استوآرتريت استفاده شد و این دو گروه شامل سلول های غضروفی به علاوه LPS و دگزامتازون (گروه ۶) و NSAID (گروه ۷).

استریل جدا گردید و برای پاساژ (Subculture) به فلاسک مخصوص انتقال پیدا کرد و تا زمانی که ۸۵ درصد حجم فلاسک توسط لایه تک سلولی پوشانده شود، در انکوباتور با شرایط ۵% CO<sub>2</sub>، دما، ۳۷ درجه سانتی گراد و رطوبت نگهداری شد. سپس برای شمارش سلول ها از محلول تریپسین ۰/۲۵ درصد و برای شمارش سلولی از تریپان بلو ۰/۴ درصد استفاده شد (۱۴).

سلول های THP-1 (به دو صورت چسبنده Adherent و غیر چسبنده Non-adherent تقسیم می شوند) تهیه شده از انستیتو پاستور (Pasteur Institute, Iran)، پس از انتقال به آزمایشگاه با رسیدن به تراکم بالای ۸۵ درصد سلول های معلق در محیط کشت جدا و پس از شمارش با تریپان بلو به میزان لازم به پلیت ها انتقال داده شد.

تعیین سایتو توکسیته توسط *MTT* Assay و تریپان بلو: جهت بررسی اثر سایتو توکسیته در عصاره آبی گیاه خارشتر و تعیین LC<sub>50</sub> از روش رنگ سنجی استفاده شد. پودر MTT یک نمک تترازولیوم محلول در آب نرمالی است که این محلول در محیط کشت فاقد فنل رد یا بافر PBS حل می شود و ترکیب زرد رنگ ایجاد می کند. اساس این تست شکستن نمک MTT توسط آنزیم سوکسینات دهیدروژناز (SDH) میتوکندریایی زنده است. نتیجه این حالت ایجاد بلورهای نامحلول فرمازان ارغوانی رنگ است که توسط DMSO به حالت محلول در می آید. هر چه سلول ها فعال تر و

جدول شماره ۱. مشخصات گروه های مورد بررسی

گروه	سینویو سیت	عصاره	LPS	PBS	دگزامتا زون	NSAID
۱	+ve	-ve	-ve	-ve	-ve	-ve
۲	+ve	+ve	-ve	-ve	-ve	-ve
۳	+ve	-ve	+ve	-ve	-ve	-ve
۴	+ve	+ve	+ve	-ve	-ve	-ve
۵	+ve		+ve	+ve	-ve	-ve
۶	+ve		+ve	-ve	+ve	-ve
۷	+ve		+ve	-ve	-ve	+ve

Iran) استفاده شد. نتایج به دست آمده از (CT)، (Treshhold cycle) توسط دو روش ۱- منحنی استاندارد و ۲- روش Pffafi method مورد ارزیابی قرار گرفت.

ct های حاصله از RT-PCR اعداد شمارشی بوده و معنی دار بودن آن ها ابتدا توسط ANOVA تعیین گردید و در مرحله دوم توسط روش Student's t-test و New- maneKeuls test و REST-2000 مورد ارزیابی قرار گرفت. در پایان برای تعیین میزان بیان ژن های مربوطه از روش ( $2^{-\Delta\Delta ct}$ ) Pfaffi روشی که از اختلاف سطح بیان بین ژن اصلی (COX-2, TNF- $\alpha$ ) و ژن خانه دار (GAPDH) حاصل می شود.

*اندازه گیری میزان تولید نیتريت توسط روش کلریمتری:* با استفاده از سدیم نیتريت در غلظت های مختلف منحنی استاندارد رسم شد. سوپر ناتانت محیط کشت سلولی (۱۰۰ $\lambda$ ) با (۱۰۰ $\lambda$ ) معرف Grase (D Systems, Minneapolis, MN, & Reagent R) در یک پلیت ۹۶ خانه ته صاف در اتاق تاریک گذاشته می شود سپس OD آن ها در طول موج ۵۴۰nm استاندارد بر اساس چگالی نوری نسبت به لگاریتم غلظت، میزان تولید NO مشخص شد (۱۷).

*اندازه گیری میزان تولید PGE-2:* با استفاده از کیت Invetrogen (Cinna Gen company, Iran)، برای اندازه گیری سطوح PGE-2 ترشح شده در سوپرناتانت مایع کشت سلولی بر طبق پروتکل شرکت سازنده از محلول استاندارد PGE-2 و غلظت های مشخص آن برای تهیه منحنی استاندارد استفاده گردید. در نهایت میزان OD بلافاصله پس از انجام آزمایش توسط الایزا ریدر در طول موج ۴۵۰nm اندازه گیری شد و با استفاده از فرمول تهیه شده از ترکیب استاندارد و منحنی رسم شده ( بر اساس چگالی نوری نسبت به لگاریتم غلظت) توسط خودمان مشخص شد (۱۸).

*آنالیز آماری:* تمامی داده ها به عنوان میانگین  $\pm 1SD$  بیان شده است. آنالیز آماری با استفاده از آنالیز یک سویه واریانس (ANOVA)، نرم افزار Student-Newman REST version 2000

تیمار توسط LPS: به منظور فراهم کردن شرایطی شبیه به بیماری و افزایش بیان سایتوکین های پیش التهابی از LPS به میزان ۲۰ ng/ml استفاده شد. ابتدا  $6 \times 10^6$  سلول را در محیط کشت، کشت می دهیم پس از ۷۲ ساعت میزان ۱۰۰ ng LPS به محیط اضافه شد. سری اول پلیت ها به مدت ۲۴ ساعت به منظور بیان سایتوکین های پیش التهابی مانند COX-2, iNOS, TNF- $\alpha$  در انکوباتور CO2 نگهداری شد. سری دوم به مدت یک ساعت در انکوباتور به منظور تغییرات پروستاگلندین و NO قرار گرفت (۱۶).

*جداسازی RNA:* با استفاده از معرف (Trizol Invitrogen, Cinna Gen company, Iran) و در نهایت برای تعیین غلظت RNA از روش اسپکتروفوتومتری (UV-2100 Spectrophotometer, Aldrich, USA) استفاده گردید که در صورت وجود آلودگی DNA، از آنزیم DNase برای از بین بردن DNA اضافی استفاده می شود. برای تبدیل RNA به cDNA از کیت RT-PCR $_{2}$  step از (vivantis company, USA) بر اساس پروتکل مربوطه استفاده گردید. در انتها بر روی cDNA، با انجام PCR غلظت نمونه تولید شده افزایش پیدا کرد.

*سنتز cDNA:* برای هر نمونه ۱  $\mu$ g از RNA (توسط کیت RT-PCR $_{2}$  step) (Cinna Gen company, Iran) تبدیل به cDNA می شود RT-PCR در شرایط ۴۲ درجه سانتی گراد به مدت ۶۰ دقیقه و حرارت ۹۴ درجه سانتی گراد به مدت ۵ دقیقه (به منظور قطع سنتز cDNA) انجام شد.

*PCR Semiquantitative:* با استفاده از پرایمرهایی اختصاصی برای هر کدام از سایتوکین ها مورد مطالعه و نتایج آن در نمودار شماره ۳ آورده شده است و ژن GAPDH به عنوان ژن خانه دار استفاده گردید. شرایط استاندارد PCR انجام شد و فرآورده PCR در آگارز ژل ۱/۵ درصد همراه با اتیدیوم بروماید ۵  $\mu$ g/ml چک شد.

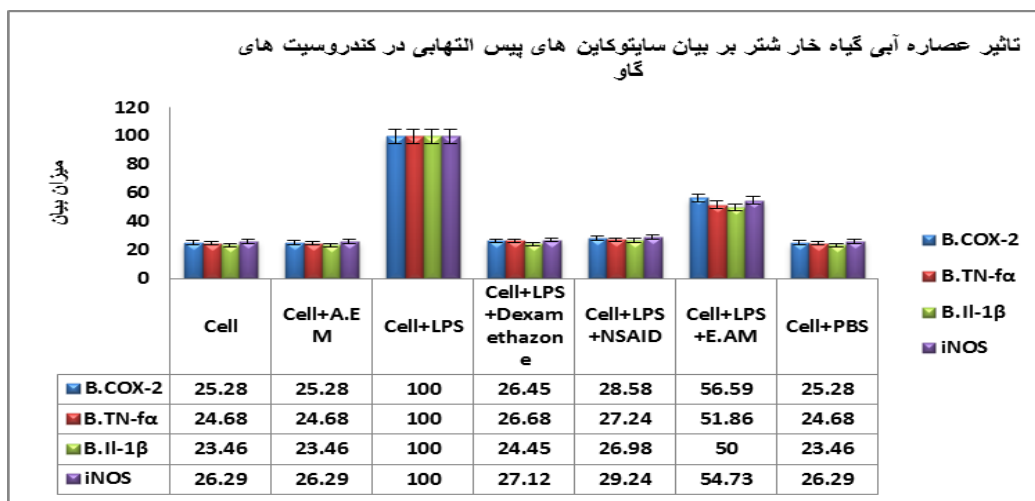
*Quantitative Real time PCR:* در زمان واقعی با استفاده از همان پرایمرهایی که برای PCR کیفی استفاده گردید، انجام شد و از evergreen به عنوان مسترمیکس کارخانه سیناکلون ( sinaclon, )

kelus test و نرم افزار SPSS vol.2000 اجرا شده است (۱۹). برای آنالیز CT،  $P < 0.05$ ،  $P < 0.001$  به شکل آماری معنی دار در نظر گرفته شده است.

### یافته های پژوهش

اثر عصاره آبی گیاه خارشتر بر بیان COX-2 و تولید PG در سلول های کندروسیت گاوی: عصاره آبی گیاه خارشتر تغییری را در بیان آنزیم COX-2 در سلول های گروه ۲ ندارد ولی در گروه ۳ با افزایش بیان ۱۰۰ درصد همراه می باشد و این افزایش بیان در گروه ۴ با تغییر مخالف روبرو شده به بیانی دیگر باعث کاهش بیان آنزیم COX-2 در سلول های تحریک شده توسط LPS به میزان ۳۶/۵۹ درصد شده است. این تغییر با معنی است. لازم به ذکر است در گروه ۵ که از پلاسبو برای درمان استفاده شده بود هیچ تغییری در میزان بیان ژن مورد نظر ایجاد نگردید. میزان سایتوکین مورد نظر در گروه ششم که از دگزامتازون به عنوان داروی اصلی در درمان مبتلایان به تورم مفصل

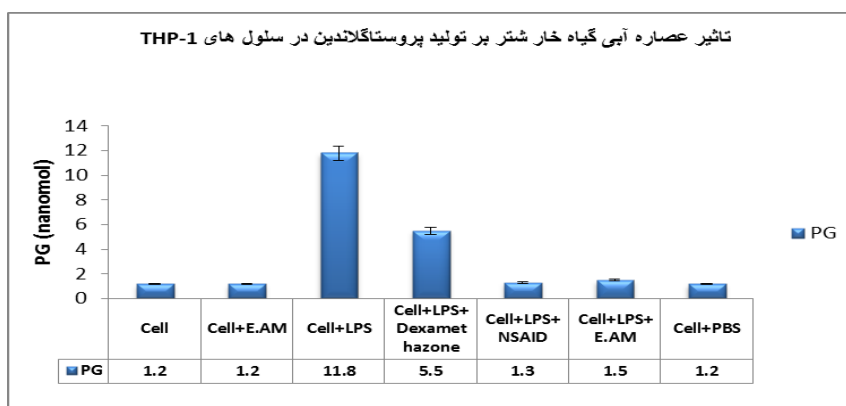
استفاده می شود و هم چنین گروه هفتم که از داروی ضد التهابی غیر استروئیدی NSAID مانند ایبوپروفن به عنوان داروی اصلی در درمان مبتلایان به تورم مفصل استفاده می شود، کاهش بسیار قابل توجهی داشته اند. کاهش ۳۶/۵۹ درصد توسط عصاره آبی گیاه خارشتر در سطح معنی داری قرار گرفته است. این کاهش توسط آنالیز آماری ANOVA مورد بررسی قرار گرفت (۲۵) و در سطح معنی دار ۰/۰۱۶ با احتساب  $P < 0.05$  مورد تایید قرار گرفت. استفاده از نرم افزار REST Vol.2009، میزان کاهش بیان سایتوکین مورد نظر در مقایسه با گروه سوم که از LPS به عنوان تیمار استفاده شده بود و گروه ششم و هفتم که به ترتیب بعد از تیمار با LPS از دگزامتازون و ایبوپروفن برای درمان استفاده شده بود، قابل توجه بود. این نتایج با نتایج سایر محققین که کاهش بیان COX-2 در تحقیق خود به دست آورده بودند کاملاً مطابقت دارد (۲۲) (نمودار شماره ۱).



نمودار شماره ۱. تأثیر عصاره خارشتر بر بیان ژن های پیش التهابی در کندروسیت ها با استفاده از RT-PCR سلول های کندروسیت با ماده موثره به مدت ۷۲ ساعت انکوبه شدند. سپس به مدت یک ساعت با LPS فعال شدند. میزان بیان COX-2 و TNF-α و iL-1β و iNOS با استفاده از روش Student's New-maneKeuls test نشان داده شده است (mean±1 SD, n=3)

شرکت Invitrogen انجام پذیرفت. کاهش تولید پروستاگلاندین در مقایسه با گروه های ۳ و ۴ معنی دار می باشد (نمودار شماره ۲).

برآورد میزان تولید PGE2 به روش ایمنواسی (ELIZA) و با استفاده از رسم منحنی استاندارد برای غلظت های متفاوت از محلول استاندارد پروستاگلاندین و فرمول ارائه شده توسط



نمودار شماره ۲. تاثیر عصاره خار شتر بر میزان تولید PG در سلول های THP-1، سلول های THP-1 با ماده موثره به مدت ۷۲ ساعت انکوبه شدند.

سپس به مدت ۲۴ ساعت با LPS فعال شدند. میزان تولید PG با استفاده از الایزا تعیین گردید (mean $\pm$ 1 SD, n=3).

اثر عصاره آبی گیاه خارشتر بر بیان  $iL-1\beta$  در سلول های کندروسیت گاوی: عصاره آبی گیاه خارشتر تغییری را در بیان آنزیم  $iL-1\beta$  در سلول های گروه ۲ ندارد ولی در گروه ۳ با افزایش بیان ۱۰۰ درصد همراه می باشد و این افزایش بیان در گروه ۴ با تغییر مخالف روبرو شده به بیانی دیگر باعث کاهش بیان آنزیم  $iL-1\beta$  در سلول های تحریک شده توسط LPS به میزان ۵۰ درصد شده است و این تغییر با معنی است. لازم به ذکر است در گروه ۵ که از پلاسبو برای درمان استفاده شده بود هیچ تغییری در میزان بیان ژن مورد نظر ایجاد نگردید. میزان بیان سایتوکین مورد نظر در گروه ششم که از دگزامتازون به عنوان داروی اصلی در درمان مبتلایان به تورم مفصل استفاده می شود و هم چنین گروه هفتم که از داروی ضد التهابی غیر استورئیدی NSAID مانند ایبوپروفن به عنوان داروی اصلی در درمان مبتلایان به تورم مفصل استفاده می شود، کاهش بسیار قابل توجهی داشته اند. کاهش ۵۱/۸۶ درصد توسط عصاره آبی گیاه خار شتر در سطح معنی داری قرار گرفته است. این کاهش توسط آنالیز آماری ANOVA مورد بررسی قرار گرفت و در سطح معنی دار ۰/۳۲۰ با احتساب  $P < 0.05$  مورد تایید قرار گرفت. استفاده از نرم افزار REST Vol.2009، میزان کاهش بیان سایتوکین مورد نظر در مقایسه با گروه سوم که از LPS به عنوان تیمار استفاده شده بود و گروه ششم و هفتم که به ترتیب بعد از تیمار با LPS از دگزامتازون و ایبوپروفن برای درمان استفاده شده بود، قابل توجه بود.

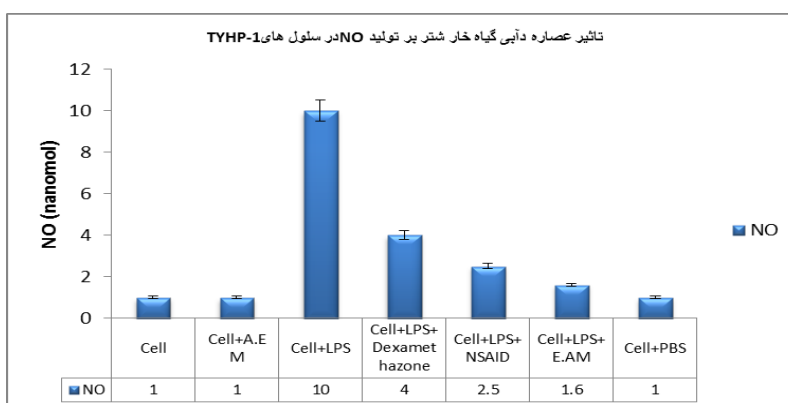
اثر عصاره آبی گیاه خارشتر بر بیان  $TNF-\alpha$  در سلول های کندروسیت گاوی: عصاره آبی گیاه خارشتر تغییری را در بیان آنزیم TN-Fa در سلول های گروه ۲ ندارد ولی در گروه ۳ با افزایش بیان ۱۰۰ درصد همراه می باشد و این افزایش بیان در گروه ۴ با تغییر مخالف روبرو شده به بیانی دیگر باعث کاهش بیان آنزیم TN-Fa در سلول های تحریک شده توسط LPS به میزان ۵۱/۸۶ درصد شده است. این تغییر معنی دار است. لازم به ذکر است در گروه ۵ که از پلاسبو برای درمان استفاده شده بود هیچ تغییری در

میزان بیان ژن مورد نظر ایجاد نگردید. میزان بیان سایتوکین مورد نظر در گروه ششم که از دگزامتازون به عنوان داروی اصلی در درمان مبتلایان به تورم مفصل استفاده می شود و هم چنین گروه هفتم که از داروی ضد التهابی غیر استورئیدی NSAID مانند ایبوپروفن به عنوان داروی اصلی در درمان مبتلایان به تورم مفصل استفاده می شود، کاهش بسیار قابل توجهی داشته اند. کاهش ۵۱/۸۶ درصد توسط عصاره آبی گیاه خار شتر در سطح معنی داری قرار گرفته است. این کاهش توسط آنالیز آماری ANOVA مورد بررسی قرار گرفت و در سطح معنی دار ۰/۳۲۰ با احتساب  $P < 0.05$  مورد تایید قرار گرفت. استفاده از نرم افزار REST Vol.2009، میزان کاهش بیان سایتوکین مورد نظر در مقایسه با گروه سوم که از LPS به عنوان تیمار استفاده شده بود و گروه ششم و هفتم که به ترتیب بعد از تیمار با LPS از دگزامتازون و ایبوپروفن برای درمان استفاده شده بود، قابل توجه بود.

اثر عصاره آبی گیاه خارشتر بر بیان  $iNOS$  و تولید NO در سلول های کندروسیت گاوی: عصاره آبی گیاه خارشتر تغییری را در بیان آنزیم iNOS در سلول های گروه ۲ ندارد ولی در گروه ۳ با افزایش بیان ۱۰۰ درصد همراه می باشد و این افزایش بیان در گروه ۴ با تغییر مخالف روبرو شده به بیانی دیگر باعث کاهش بیان آنزیم iNOS در سلول های تحریک شده توسط LPS به میزان ۳۴/۷۳ درصد شده است این تغییر معنی دار است. لازم به ذکر است در گروه ۵ که از پلاسبو برای درمان استفاده شده بود هیچ تغییری در میزان بیان ژن مورد نظر ایجاد نگردید. میزان بیان سایتوکین مورد نظر در گروه ششم که از دگزامتازون به عنوان داروی اصلی در درمان مبتلایان به تورم مفصل استفاده می شود و هم چنین گروه هفتم که از داروی ضد التهابی غیر استورئیدی NSAID مانند ایبوپروفن به عنوان داروی اصلی در درمان مبتلایان به تورم مفصل استفاده می شود، کاهش بسیار قابل توجهی داشته اند. کاهش ۳۶/۵۹ درصد توسط عصاره آبی گیاه خار شتر در سطح معنی داری قرار گرفته است. این کاهش توسط آنالیز آماری

برآورد میزان تولید NO به روش اسکتروفومتري و با استفاده از رسم منحنی استاندارد برای غلظت های متفاوت از محلول استاندارد نیتريت اکساید انجام پذیرفت و نتایج به شرح نمودار شماره ۳ ارائه شده است و بیانگر کاهش قابل توجه در میزان تولید نیتريت اکساید در مقایسه با گروه های ۳ و ۴ می باشد(نمودار شماره ۳).

ANOVA مورد بررسی قرار گرفت و در سطح معنی دار ۰/۰۳۷ با احتساب  $P < 0.05$  مورد تایید قرار گرفت. استفاده از نرم افزار REST Vol.2009، میزان کاهش بیان سایتوکین مورد نظر در مقایسه با گروه سوم که از LPS به عنوان تیمار استفاده شده بود و گروه ششم و هفتم که به ترتیب بعد از تیمار با LPS از دگزامتازون و ایبوپروفن برای درمان استفاده شده بود، قابل توجه بود.

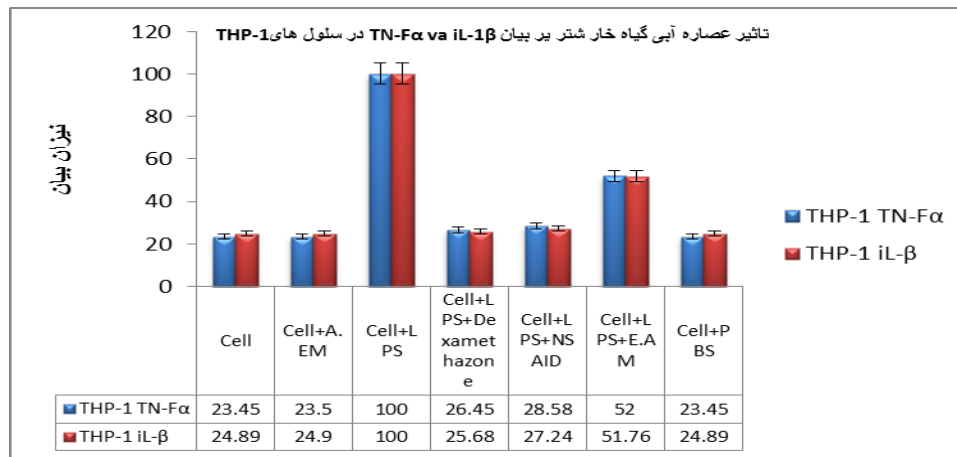


نمودار شماره ۳. تاثیر عصاره خارشته بر میزان تولید NO در سلول های THP-1 با استفاده از کلوریمتری، سلول های THP-1 با ماده موثره به مدت ۷۲ ساعت انکوبه شدند. سپس به مدت ۲۴ ساعت با LPS فعال شدند. میزان تولید NO با استفاده از منحنی استاندارد تعیین گردید (mean $\pm$ 1 SD, n=3)

که از داروی ضد التهابی غیر استروئیدی NSAID مانند ایبوپروفن به عنوان داروی اصلی در درمان مبتلایان به تورم مفصل استفاده می شود، کاهش بسیار قابل توجهی داشته اند. کاهش ۳۶/۵۹ درصد توسط عصاره آبی گیاه خارشته در سطح معنی داری قرار گرفته است. این کاهش توسط آنالیز آماری ANOVA مورد بررسی قرار گرفت و در سطح معنی دار ۰/۰۱۷ با احتساب  $P < 0.05$  مورد تایید قرار گرفت. استفاده از نرم افزار REST Vol.2009، میزان کاهش بیان سایتوکین مورد نظر در مقایسه با گروه سوم که از LPS به عنوان تیمار استفاده شده بود و گروه چهارم و پنجم که به ترتیب بعد از تیمار با LPS از دگزامتازون و ایبوپروفن برای درمان استفاده شده بود، قابل توجه بود(نمودار شماره ۴).

تاثیر عصاره آبی گیاه خارشته بر روی TNF- $\alpha$  و iL-1 $\beta$  در سلول های THP-1: عصاره آبی گیاه خارشته تغییری را در بیان آنزیم iL-1 $\beta$  و TNF $\alpha$  در سلول های گروه ۲ ندارد ولی در گروه ۳ با افزایش بیان ۱۰۰ درصد همراه می باشد و این افزایش بیان در گروه ششم با تغییر مخالف روبرو شده به بیانی دیگر باعث کاهش بیان آنزیم iL-1 $\beta$  و TNF $\alpha$  در سلول های تحریک شده توسط LPS به میزان ۵۲ درصد شده است این تغییر معنی دار است. لازم به ذکر است در گروه هفتم که از پلاسبو برای درمان استفاده شده بود هیچ تغییری در میزان بیان ژن مورد نظر ایجاد نگردید. میزان بیان سایتوکین مورد نظر در گروه چهارم که از دگزامتازون به عنوان داروی اصلی در درمان مبتلایان به تورم مفصل استفاده می شود و هم چنین گروه پنجم





نمودار شماره ۴. تاثیر عصاره خار شتر بر بیان ژن سایتوکین ها در سلول های THP-1 با استفاده از RT-PCR سلول های THP-1 با ماده موثره به مدت ۷۲ ساعت انکوبه شدند. سپس به مدت یک ساعت با LPS فعال شدند. میزان بیان  $iL-1\beta$  و  $TNF-\alpha$  با استفاده از روش (student's e New-maneKeuls) نشان داده شده است (mean $\pm$ 1 SD, n=3)

### بحث و نتیجه گیری

در این مطالعه ما برای اولین بار مشخص کردیم که اثرات ضد التهابی عصاره آبی گیاه خار شتر نه تنها در کندروسیت ها بلکه در منوسیت ها و ماکروفاژهای بافتی هم دیده می شود. ما ثابت کردیم که عصاره آبی گیاه خار شتر بیان ژن سایتوکین های پیش التهابی  $TNF-\alpha$  را در سلول های THP-1 تحریک شده با LPS سرکوب می کند. علاوه بر این بیان ژن  $iNOS$ ،  $COX-2$ ،  $iL-1\beta$  در کندروسیت های کشت شده را نیز کاهش می دهد. و نتیجه مطالعه تجربی که توسط امیری و همکاران در سال ۲۰۱۱ انجام شده و استفاده از گیاه مورد نظر برای کاهش درد ناشی از بیماری را توصیه کرده تایید می کند. این یافته پیشنهاد کننده اثر عصاره آبی خار شتر بر انواع متعددی از سلول ها است که در التهاب نقش دارند و بنا بر این احتمال این که اثرات سودمندی را در مفاصل مبتلا به استئو آرتروز داشته باشند زیاد است. Batani در سال ۱۹۹۶ (۲۵) اثرات ضد روماتیسم و مشکلات گوارشی را برای این گیاه بیان کردند.

تخریب غضروف در استئوآرتروز همراه با التهاب در غضروف، غشاءساینویال و بافت استخوان است. مطالعات مختلف اثرات زیان بار ماکروفاژهای ساینویال را در مفاصل ملتهب تایید کرده است. در یک بررسی انجام شده بر روی موش ماکروفاژهای

ساینویال در ایجاد فیبروز و استئوفیت نقش داشتند (۲۶) در یک مطالعه دیگر در سگ های مبتلا به استئوآرتروز یک رابطه مثبت بین تراکم جمعیت ماکروفاژها، طول مدت بیماری و شدت بیماری پیدا شد (۲۷). مطالعات هم چنین ثابت کردند که ماکروفاژها یک منبع اصلی از سایتوکین های پیش التهابی هستند که بالاترین سطح را در بافت ساینویال بیماران استئوآرتروزی دارند. این نتایج در مجموع پیشنهاد دهنده نقش ماکروفاژها برای ایجاد و حفظ التهاب ساینویال در مفاصل مبتلا به استئوآرتروز می باشد. در این مطالعه ما اثر عصاره آبی گیاه خار شتر را روی کندروسیت های گاوی جدا شده و سلول های THP-1 بررسی کردیم. سلول های THP-1 به عنوان مدل جایگزین منوسیت/ماکروفاژ در مطالعات بر روی مدیاتورهای پیش التهابی به طور شایعی به کار می رود (۲۸) این سلول ها به سرعت تکثیر شده و می توانند تعداد بسیار زیادی سلول زنده برای تجزیه و تحلیل در اختیار ما قرار دهند. مشاهدات ما که اثر ساپرس کننده عصاره آبی گیاه خار شتر را بر روی این نوع سلول ها نشان می دهد پیشنهاد می کند که همین اثر ضد التهابی را روی ماکروفاژهای ساینویال داشته باشد.

کندروسیت ها به عنوان تنها جزء سلولی غضروف مفصلی، در پاسخ به آسیب بافتی بیان ژن واسطه های پیش التهابی را افزایش می دهند (۲۹). کندروسیت های

می دهد برای اولین بار این مطالعه مشخص کرد که عصاره آبی گیاه خارشتر به عنوان یک مهارکننده قوی سایتوکین ها، بیان ژن  $COX-2$  و  $iNOS$  عمل می کند به طوری که تولید  $PGE_2$  و نیتريت در  $THP-1$  سرکوب می کند. تحقیقات قبلی نشان داد که این واسطه ها در پاتوژن استئوآرتریت مهم هستند و این کاهش در واسطه ها با بهبود غضروف های آسیب دیده همراه است (۵۸).

مطالعه آزمایشگاهی ما نشان داد که عصاره آبی گیاه خارشتر به کاهش بیان و تولید چنین واسطه های التهابی در سلول ها کندوسیت و منوسیت کمک می کند. منوسیت/ماکروفاژها که به عنوان سلول های ایمنی موضعی در بافت ساینوویال (بافت ساینوویال دارای دو نوع سلول، فیبروبلاست  $type II$  و ماکروفاژ  $type I$  است) وجود دارند نقش بسیار اساسی در بیماری استئوآرتریت بازی می کنند. کندروسیت ها تنها جزء اصلی غضروف مغصلی هستند و توانایی تغییرات ظاهری (phenotype modulation) را دارند این مسائل باعث می شود که سلول های منوسیت/ماکروفاژ و کندروسیت نقش بسیار مهمی در پیشرفت بیماری داشته باشند.

در مطالعه حاضر نتیجه گیری شد که اثرات ضد التهابی عصاره آبی گیاه خارشتر محدود به سلول های غضروفی نیست بلکه شامل سلول های  $THP-1$  مرتبط با غشا ساینوویال هم می شود. هم چنین ثابت شد که عصاره آبی گیاه خارشتر در یک مدل  $THP-1$  تحریک شده با  $LPS$  بیان ژن سایتوکین های پیش التهابی را سرکوب می کند. در نتیجه با توجه به نقش این مواد در پیشرفت بیماری گیاه خارشتر می تواند داروی موثری برای استئوآرتریت بوده و به عنوان جایگزین داروهای استروئیدی و غیر استروئیدی مطرح شود. پرسشی که مطرح می شود و پاسخ آن بسیاری از مشکلات درمانی استئوآرتریت را حل خواهد نمود این است که آیا اطلاعات *in vitro* همه اثرات دیده شده در بیماری استئو آرتريت باقی مانده در آزمایشات مکرر را توضیح می دهد؟ برای رسیدن به این پاسخ باید نقش عصاره آبی خارشتر برای کاهش پیش التهاب در انواع سلول های بافتی چندگانه مورد بررسی قرار گیرد

گاوی از هضم بافت غضروفی به دست آمدند و در پاساژهای متعدد فنوتیپ اولیه خود را حفظ کردند (۳۰). علاوه بر این نقش حساسی که  $COX-2$  و  $iNOS$  در بیماریزایی استئوآرتریت دارند به طور گسترده ای در کندروسیت های گاوی مورد مطالعه قرار گرفت (۳۱) مشخص شده که سایتوکین ها آنزیم های تجزیه کننده را در بافت غضروفی و بافت ساینوویال فعال می کنند بنا بر این سرکوب بیان ژن سایتوکین ها برای کاهش پیشرفت آسیب های غضروف ضروری است.  $IL-1\beta$  و  $TNF-\alpha$ ، سایتوکین ها تنظیم کننده اولیه سیر پیشرفت بیماریزایی استئوآرتریت هستند (۲۹). مطالعات نشان دادند که سطوح بالای  $IL-1\beta$  و  $TNF-\alpha$  به طور غیر طبیعی در مایع ساینوویال، ساینوویوم و بافت غضروف بیماران استئوآرتریت وجود دارد (۸). در مطالعات *In Vitro* هر دو سایتوکین  $IL-1\beta$  و  $TNF-\alpha$  ترشح پروستاگلندین را تحریک کرده و فعالینت پروتئیناز تجزیه کننده ماتریکس مانند کلاژناز، ژلاتیناز، پروتئولیکاناز، استروملازین و پلاسمینوژن فعال را افزایش می دهد (۸). اگر چه  $IL-1\beta$  از نظر فیزیولوژیکی مهم تر از  $TNF-\alpha$  است. مطالعات بر روی مدل حیوانی پیشنهاد می دهد که سایتوکین ها به طور سینرژیکی عمل کرده و تخریب غضروف را تحریک می کنند که این اثر بیشتر از آسیب مشاهده شده توسط هر یک از دو سایتوکین به تنهایی است (۳۲). عصاره آبی گیاه خارشتر سرکوب (Downregulation) بیان ژن های  $IL-1\beta$  در کندروسیت و  $TNF-\alpha$  را در  $THP-1$  تایید می کند که حدس می زنیم این عمل فرآیند تجزیه و از بین رفتن غضروف را کاهش دهد. علاوه بر آنزیم های تجزیه کننده ماتریکس،  $IL-1\beta$  و  $TNF-\alpha$  هم چنین سنتز آنزیم های  $COX-2$  و  $iNOS$  را القا می کنند. نتیجه القا  $COX-2$  و  $iNOS$  در سطوح بالای  $NO$  و  $PGE_2$  منجر به تخریب غضروف مهار سنتز ماتریکس و آپوپتوزیس کندروسیت می شود (۳۳). ثابت شده کاهش تولید  $NO$  و  $PGE_2$  درد و التهاب ناشی از علائم استئو آرتريت را کاهش می دهد (۵۷). مطالعه ما تاکید کرد که عصاره آبی گیاه خارشتر بیان ژن  $COX-2$  و  $iNOS$  را سرکوب کرده و یا کاهش

مطالعات بیشتر بر روی موش پیشنهاد می شود.

که می تواند نقش بالقوه آن را به عنوان یک روش دیگر یا تکمیلی برای داروهای غیر استروئیدی سنتزی تکمیل کند. البته در این راستا

#### Referenses

1. Davatchi F, Jamshidi AR, Banihashemi AT, Gholami J, Forouzanfar MH, Akhlaghi M, et al. WHO-ILAR copcord study stage 1 urban study in Iran. *J Rheumatol* 2008; 35:1384-90.
2. Dicesare PE, Abramson SB. Pathogenesis of osteoarthritis. *Kelley text book of rheumatology*. 7<sup>th</sup> ed. Philadelphia Elsevier Saunders Publication 2005:1493-513
3. Goldring MB. The role of the chondrocyte in osteoarthritis. *Arth Rheum J Am College Rheumatol* 2000; 43:1916-26. doi: 10.1002/1529-0131(200009)43:9<1916
4. Melchiorri C, Meliconi R, Frizziero L, Silvestri T, Pulsatelli L, Mazzetti I, et al. Enhanced and coordinated in vivo expression of inflammatory cytokines and nitric oxide synthase by chondrocytes from patients with osteoarthritis. *Arth Rheum* 1998; 41:2165-74.
5. Sandell LJ, Aigner T. Articular cartilage and changes in arthritis cell biology of osteoarthritis. *ArthRes Therap* 2001; 3:107. doi.org/10.1186/ar148
6. Khanna D, Fitzgerald JD, Khanna PP, Bae S, Singh MK, Neogi T, et al. Systematic nonpharmacologic and pharmacologic therapeutic approaches to hyperuricemia. *Arth Care Res* 2012; 64:1431-46. doi.org/10.1002/acr.21772
7. Klippel JH, Stone JH, White PH. 1<sup>th</sup> ed. *Primer on the rheumatic diseases*. Springer Sci Busi Med Publication. 2008; P.23.
8. Alsnafi AE. Therapeutic properties of medicinal plants a review of plants with hypolipidemic, hemostatic fibrinolytic and anticoagulant effects. *Asian J Pharmaceut Sci Technol* 2015; 5:271-84.
9. Brown M. In TIME-II investigators intravenous NPA for the treatment of infarcting myocardium early a double blind comparison of single bolus lanotepase vs accelerated alteplase for the treatment of patients with acute myocardial infarction. *Eur Heart J* 2000; 21:2005-13. doi:10.1053/euhj.2000.2498
10. Zojaegifer M. [New species of Liliaceae in Iran]. *Iranian Botan J* 2001; 22: 65-7. (Persian)
11. Qureshi R, Razabhatti G. Ethnobotany of plants used by the Thari people of Nara desert Pakistan. *Fitoterapia* 2008; 79:468-73. doi:10.1016/j.fitote.2008.03.010
12. Rahman MA, Mossa JS, Alsaid MS, Alyahya MA. Medicinal plant diversity in the flora of Saudi Arabia a report on seven plant families. *Fitoterapia* 2004; 75:149-61. doi:10.1016/j.fitote.2003.12.012
13. Awaad AS, Maitland DJ, Soliman GA. Hepatoprotective activity of Schouwia thebica Webb. *Bioorg Med Chem Lett* 2006; 16:4624-8. doi.org/10.1016/j.bmcl.2006.06.011
14. Maghsoudi H, Hallajzadeh J, Rezaeipour M. Evaluation of the effect of polyphenol of escin compared with ibuprofen and dexamethasone in synoviocyte model for osteoarthritis an invitro study. *Clin Rheumatol* 2018; 37:2471-8.
15. Maghsoudi H, Hajallahyari S. Down regulation of COX-2, IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  in synoviocyte by essential oil of *Fraxinus excelsior*. *Int J Con Res Rev* 2018; 9:20192-203. doi.org/10.15520/ijcrr/2018/9/03/463
16. Au RY, Altalib TK, Au AY, Phan PV, Frondoza CG. Avocado soybean unsaponifiables suppress TNF- $\alpha$  IL-1 $\beta$

- COX-2 iNOS gene expression, and prostaglandin E2 and nitric oxide production in articular chondrocytes and monocyte macrophages. *Osteoarth Cart* 2007 30; 15:1249-55 doi.10.1016/j.joca.2007.07.009
- 17.Kovacs M, Kiss A, Gonczi M, Miskolczi G, Seprenyi G, Kaszaki J, et al. Effect of sodium nitrite on ischaemia and reperfusion induced arrhythmias in anaesthetized dogs is protein S-nitrosylation involved? *Plos One*201524; 10: 0122243. doi.org/10.1371/journal.pone.0122243
- 18.Murad F. Cyclic guanosine monophosphate as a mediator of vasodilatation. *J Clin Invest* 1986; 78:1-5.
- 19.Kohr MJ, Sun J, Aponte A, Wang G, Gucek M, Murphy E et al. Simultaneous measurement of protein oxidation and S-nitrosylation during preconditioning and ischemia reperfusion injury with resin-assisted capture. *Circ Res*2011; 108:418-426.10.1161/circresaha.110.232173
- 20.Brown GC. Regulation of mitochondrial respiration by nitric oxide inhibition of cytochrom c oxidase. *Biochemica and Biophysica Acta* 2001; 1504:46-57.
- 21.Dorak MT. Real time PCR. 2<sup>th</sup> ed. Taylor Francis Publication. 2006; P.144-9.
- 22.Alsnafi AE. Therapeutic properties of medicinal plants a review of their immunological effects. *Asian J Pharmaceut Res*2015;5208-16.doi:10.4103/phrev.phrev-48-17
- 23.Sarkar S, Buha D. Effect of ripe fruit pulp extract of Cucurbita pepo Linn. *Indian J Exp Biolo* 2008; 46:639-45.
- 24.Awaad AS, Aljaber NA. Antioxidant natural plant RPMP *Ethnomedicine. Source Mech*2010; 27:1-35.
- 25.Batani D, Bossi S, Benuzzi A, Koenig M, Faral B, Boudenne JM. Optical smoothing for shock-wave generation application to the measurement of equations of state. *Las Part Beam*1996;14:211-23.doi.org/10.1017/S0263034600009940
- 26.Blom AB, Lent PL, Holthuysen AE, PM, Roth J, Rooijen N, Berg WB. Synovial lining macrophages mediate osteophyte formation during experimental osteoarthritis. *Osteoarth Cart*2004; 12:627-35.doi.org/10.1016/j.joca.2004.03.003
- 27.Benito MJ, Veale DJ, Fitzgerald O, Berg WB, Bresnihan B. Synovial tissue inflammation in early and late osteoarthritis. *Annal Rheum Dis* 2005 1; 64:1263-7. doi.org/10.1136/ard.2004.025270
- 28.Hambleton J, Weinstein SL, Lem L, Franco AL. Activation of C-Jun N-terminal kinase in bacterial lipopolysaccharide stimulated macrophages. *Proce National Acad Sci* 1996 2; 93:2774-8.
- 29.Aigner T, Kurz B, Fukui N, Sandell L. Roles of chondrocytes in the pathogenesis of osteoarthritis. *Curr Opin Rheumatol*2002; 14:578-84.
- 30.Chan PS, Caron JP, Orth MW. Effect of glucosamine and chondroitin sulfate on regulation of gene expression of proteolytic enzymes and their inhibitors in interleukin1 challenged bovine articular cartilage explants. *Am J Vet Res*2005 1; 66:1870-6.doi.org/10.2460/ajvr.2005.66.1870
- 31.Orth MW, Peters TL, Hawkins JN. Inhibition of articular cartilage degradation by glucosamine-HCl and chondroitin sulphate. *Equ Vet J*2002; 34:224-9. doi.org/10.1111/j.2042-3306.2002.tb05423.x
- 32.Lotz M. The role of nitric oxide in articular cartilage damage. *Rheum Dis Clin North Am*19991; 25:269-82. doi.org/10.1016/S0889-857X(05)70067-3
- 33.Soria MA, Largo R, Santillana J, Pernaute O, Calvo E, Hernandez M, Egido J, Beaumont G. Long term NSAID treatment inhibits COX-2 synthesis in the knee synovial membrane of patients with osteoarthritis differential proinflammatory cytokine profile between celecoxib and aceclofenac. *Annal Rheum Dis*2006 1; 65:998-1005.doi.org/10.1136/ard.2005.046920

## Reduced TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ and COX-2 Expressions and Decreased Production Rate of PGE2 and NO in Articular Chondrocytes of Monocyte/Macrophage using the Aqueous Extract *Alhagi Maurorum* L.

Maghsoudi H<sup>1</sup>\*, Hajalahayari S<sup>1</sup>, Narouie A<sup>1</sup>

(Received: February 5, 2018)

Accepted: June 30, 2018)

### Abstract

**Introduction:** Nowadays, osteoarthritis is not considered as a degenerative disease. Regarding the side effects, such as peptic ulcers, liver toxicity, and renal complications due to the use of corticosteroids and non-steroid drugs, it is recommended to utilize medicinal plants as an alternative treatment. *Alhagi Maurorum*. L is commonly used in traditional medicine as a treatment for rheumatic diseases. Therefore, this study aimed to evaluate the reduction of TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , and COX-2 gene expressions and decreased production rate of PGE2 and NO in chondrocytes of monocyte/macrophages by the aqueous extract of *Alhagi maurorum*.L.

**Materials & Methods:** The aqueous extract of *Alhagi maurorum*. L was prepared from genetic reserves. For the preparation of the cells, the joint and the subcutaneous fluid of the anatomical metacarpal of the 8-month-old fully healthy Holstein calf were sent in a sterile bag to the laboratory immediately after the slaughter. The THP-1 cells were prepared in a flask containing  $6 \times 10^6$  and 60 ml of enriched culture media from Pasteur Institute. Each cell type was cultured in appropriate conditions and the viability was evaluated by trypan blue. After

proliferation, they were treated with lipopolysaccharide to increase the level of cytokines. After re-culture of the cells at 37 ° C in a CO2-incubator with a moisture content of 90%, they were stored for the next steps. After the RNA priming and cDNA preparation, RT-PCR and PCR were performed and then the real-time-polymerase chain reaction method was used to determine the expression of the desired genes.

**Findings:** According to the results, the COX-2, IL-1 $\beta$ , and TNF- $\alpha$  gene expressions reduced by 36.59%, 50%, and 51.86%, respectively, using the aqueous extract of *Alhagi maurorum*. L. In addition, there was a reduction in the production rate of NO and PGE-2 by 48% and 52%, respectively.

**Discussion & Conclusions:** The aqueous extracts of *Alhagi maurorum*. L reduced CoX-2 and iNOS gene expression in LPS-stimulated synoviocyte cells. In addition, there was a decrease in the production of NO and PGE2 in THP-1 cells.

**Keywords:** Aqueous extract of *Alhagi maurorum*. L, Chondrocyte, Cytocines, Osteoarthritis, Macrophage, Monocyte

1. Dept of Biotechnology, Ray Branch, Payame Noor University, Ray, Tehran, Iran

\* Corresponding author Email: hossein\_m2002@yahoo.com