

# ◆ مهار تهاجم و مهاجرت انسانس هسته عناب از طریق مهار بیان Zen متالوپروتئیناز ۹ در سلول های THP-1 تحریک شده با LPS

الهام قدوسی دهنوی<sup>۱</sup>، حسین مقصودی<sup>۲\*</sup>، رضا حاجی حسینی<sup>۱</sup>

۱) گروه بیوتکنولوژی، دانشگاه پیام نور، مرکز رحی، 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:** تهاجم و مهاجرت، که مرتبط با پاسخ های التهابی است نقش مهمی را در روند بیماری زائی استئوآرتیت بازی می کند. متالوپروتئینازها به عنوان یکی از مهم ترین بیومارکرهای کاتابولیک نقش به سزایی را در میزان تهاجم و مهاجرت سلولی در سلول های مونوسیت/ماکروفاز بازی می کنند. هدف از این مطالعه، بررسی خاصیت ضد تهاجمی و ضد مهاجرتی انسانس هسته عناب به وسیله مهار متالوپروتئینازی ۱، ۲، ۳ و ۹ که در جریان بیماری استئوآرتیت افزایش بیان پیدا می کنند است.

**مواد و روش ها:** میوه عناب از شهر اصفهان جمع آوری، هسته ها جدا و در مرکز ذخیر ژنتیک ایران انسانس گیری شد. تأثیر انسانس هسته عناب بر روی میزان تهاجم و مهاجرت سلولی با transwell chambers، میزان بیان ژن MMP-1, 2, 3, 9 با ریل تایم، میزان بیان پروتئین با وسترن بلاستینگ و الیزا و میزان فعالیت MMP-2 و MMP-9 توسط ژلاتین زیموگرافی بررسی گردید.

**یافته های پژوهش:** غلظت ۵۰ میکروگرم بر میلی لیتر از انسانس به طور مشخصی توانست میزان تهاجم 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 تهاجمی انسانس در سلول های THP-1 تحریک شده با LPS مربوط به بیان ژن MMP-9 هم در سطح بیان ژن و فعالیت پروتئین ۹ است که نسبت به گروه های کنترل کاهش معناداری نشان دادند( $P<0.05$ ).

**بحث و نتیجه گیری:** انسانس هسته عناب قادر به مهار توانایی مهاجرت و تهاجم سلولی القاء شده به وسیله LPS شده و می توان آن را به عنوان یک راه کار تئوریک برای درمان استئوآرتیت پیشنهاد کرد.

**واژه های کلیدی:** استئوآرتیت، انسانس هسته عناب، تهاجم، مهاجرت، متالوپروتئیناز

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

Email: hosseinnm2002@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

استئوآرتربیت یکی از مهم ترین اختلالات مزمن سلامت انسان و شایع ترین شکل آرتربیت می باشد. عوامل ارثی، مکانیکی و فاکتورهای بیولوژیکی از مهم ترین عوامل بروز استئوآرتربیت 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 استئوآرتربیت 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 ZN<sup>2+</sup> بزرگ از آنزیم های پروتولیتیک وابسته به روی هستند و برای سوبسترای خاص ویژگی عمل دارند اما در نهایت می توان آن ها را به حداقل ۵ گروه اصلی شامل کلاژنазها (8-13)، MMP-1 و MMP-13، ژلاتینازها (2-9)، استرمولیزین ها (MMP-3، 10-11)، ماتریلیزین ها (MMP-7 و MMP-26) و متالوپروتئینازهای متصل (MMP-14، 15، 16، 17، 24، 25) به غشاء(۶). سایتوکاین های پیش التهابی IL-17، IL-6، IL-15، IL-18، IL-21، IL-1 $\beta$ ، و فاکتور توموری نکروزی آلفا- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) به عنوان تنظیم گرهای مشیت در جهت پیشرفت استئوآرتربیت دخالت داشته و باعث القای قدرتمند تولید MMP ها در سلول های غضروف مفصلی می شود(۷).

مطالعات قبلی بالینی برای درمان استئوآرتربیت بیشتر بر روی مهار پاتوزن 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 پیتیک 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 ۶۵-۸۰ 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 چهت 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 عناب 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 خوارکی 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 عناب برای درمان بی خوابی و اضطراب استفاده می شود. علاوه بر این خاصیت آنتی اکسیدانی و ضد باکتریایی اسانس هسته عناب گزارش شد. هم چنین خاصیت ضد التهابی اسانس هسته عناب بر روی گوش ملتبه موش تحریک شده با TPA گزارش شده است(۱۱).

تا به امروز، اثرات ضد تهاجمی و ضد مهاجرتی اسانس هسته عناب گزارش نشده است. بنا بر این هدف از این مطالعه، ارزیابی تاثیرات اسانس هسته عناب بر روی مهار توانایی تهاجم و مهاجرت به واسطه بیان بیومارکرهایی هم چون متالوپروتئینازها، مخصوصاً ۹ MMP-1، 2، 3، 2، 3، 9 که در جریان بیماری های استئوآرتربیت افزایش بیان پیدا می کنند، بر روی سلول های THP-1 تحریک شده با LPS به عنوان

اتیل) پیرازین-۱-اتان سولفونیک اسید(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)، ۱ میلی مولار سدیم پیرووات(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) و ۰/۰۵ میلی مولار مرکاپتواتانول(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(سپیلا، 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 ساترتفیوژ جدا و توانایی زیستی سلول ها با استفاده از روش تریپیان بلو اندازه گیری شد. سپس سلول ها با توان زیستی بالا در پلیت های ۶ خانه ای با تراکم  $5 \times 10^5$  کشت و با همان روش قبلی تیمار شدند(۱۲).

سنجرش توانایی زیستی سلول: در این روش آنزیماتیک به عنوان سوبسترای واکنش از نمک های MTT محلول تترازولیوم که مهم ترین آن ها (۳-۵،۴-۵-دی متیل-تیازول-۲-یل) ۲،۵ دی فنیل 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 بنفس ایجاد شده توسط اسپکتروفومتری در طول موج ۵۷۰ نانومتر قرائت می شود. به طور خلاصه سلول های THP-1 در پلیت های ۹۶ خانه ای با تراکم  $5 \times 10^5$  سلول در هر خانه کشت داده شد و پس از تیمار با غلظت های متفاوتی از اسانس(۰-۹۰۰ میلی مولار ۴-۲-هیدروکسی

مدلی شبیه به سلول های مونوسیت/اماکروفائز 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 تائید 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 متدائل 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 نقطیر 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 متنالو به عنوان حلال استفاده شد.

تهیه و کشت سلولی: رده سلولی ماکروفائز /مونوسیت-1 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: ۱۶۴۰-RPMI متوسط (GIBCO®, Grand Island, NY, USA) شده با ۲ میلی مولار ال-گلوتامین(-Sigma FBS (Aldrich, St. Louis, MO, USA) ۱۰ درصد (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) ۱/۵ گرم بر لیتر سدیم بیکربنات(Sigma-Aldrich) ۴/۵ گرم بر لیتر قدر (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) ۱۰ میلی مولار از ۴-۲-هیدروکسی

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 گلیسرالدید ۳-فسفات دهیدروژناز (GADH) که به عنوان کنترل داخلی انتخاب شد، مورد ارزیابی قرار گرفت. استخراج RNA با استفاده از معرف RNA 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 اسپکتروفوتومتری تعیین شد. در مرحله بعد ۲step RT-PCR سنتر cDNA با استفاده از کیت ۲step RT-PCR (sigma-Aldrich, UK) با استفاده از پرایمرهای الیگومر dT انجام شد. در انتهای بر روی cDNA، با انجام PCR غلظت نمونه تولید شده افزایش پیدا کرد. مقدار ۱ میکروگرم از هر نمونه RNA برای سنتر 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) انجام گرفت. طراحی پرایمر توسط سایت NCBI Blast انجام گرفت و ساخت پرایمرها به شرکت سیناکلون سفارش داده شد. لیست پرایمرها و پرپوپ 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 دایم رتایید شود. چرخه آستانه (CT) برای ژن کنترل درونی GAPDH و CT mRNA نمونه ها مشخص و کمیت نسبی mRNA با استفاده از روش کیفت سنجی نسبی روش  $\Delta\Delta^{ACT}$  و با استفاده از فرمول  $\Delta\Delta CT = (Ct_{Target} - Ct_{GAPDH}) - (Ct_{Control} - Ct_{GAPDH})$  محاسبه شد(۱۳).

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).

سنجرش مهاجرت و تهاجم سلولی در شرایط آزمایشگاهی: مهاجرت سلولی در شرایط آزمایشگاهی به وسیله اتفاق 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 عناب به مدت ۲۴ ساعت، در قسمت بالایی فیلتر دولایه پلیت کشت داده شد. سپس محیط Transwell Chamber کشت بدون سرم همراه یا بدون LPS (Escherichia coli, strain 0128:B12, Sigma 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 سنجرش میزان تهاجم طبق پروتکل ابتداء منافذ در قسمت بالایی فیلتر دولایه توسط ماتریتل پوشش داده شد و محیط کشت به قسمت پایینی اتفاق اضافه شد. سپس تعداد  $5 \times 10^4$  سلول را به محیط کشت مخلوط شده با ۲ درصد انتقال داده و به ۲۴ ساعت به قبلاً ماتریتل 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

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

Primer Name	Forward 5' to 3'	Reverse 5' to 3'	Tm	
			Forward	Reverse
H.MMP-1	3'- AGTGGCCCAGTGGTTGAAAA -5'	3'- CCACATCAGGCCTCCACAT -5'	60.03	60.03
H.MMP-2	3'- TGTGACGCCACGTGACAAG -5'	3'- CTCCTGTGGGGCTCGTAT -5'	60.88	60.76
H.MMP-3	3'- GATTGGAGGTGACGGGGAAAG -5'	3'- GCTAACAGCAGCCCATTG -5'	60.11	60.18
H.MMP-9	3'- CAGACCTGGGAGATTCCAA -5'	3'- CTGGATGACGATGTCTGCGT -5'	59.67	60.18
H.GAPDH	3'- GCGCTCACTGTTCTCTCCCTC -5'	3'- TGGGTGTCGCTGTTGAAGTC -5'	55.00	60.27

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 روشن ژلاتین زایموگرافی استفاده می شود. پس از تیمار سلول ها به مدت ۲۴ ساعت انکوبه گردید تا زمانی که بیش از ۸۵ درصد کف پیلت 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 CaCl<sub>2</sub> و ۱ میلی مولار ZnCl<sub>2</sub> نگهداری گردید و رنگ آمیزی ژل با Coomassie brilliant R-2500 ۰.۲۵% (Sigma) 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 پروتولیتک 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 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 انسانس هسته عناب بر روی توانایی زیستی سلول های THP-1: در این آزمایش، اثر سمیت سلولی انسانس هسته عناب در ۱ توسط سنجش MTT برآورد شد(شکل شماره ۱). سلول های THP-۱ با غلظت های مختلف انسانس

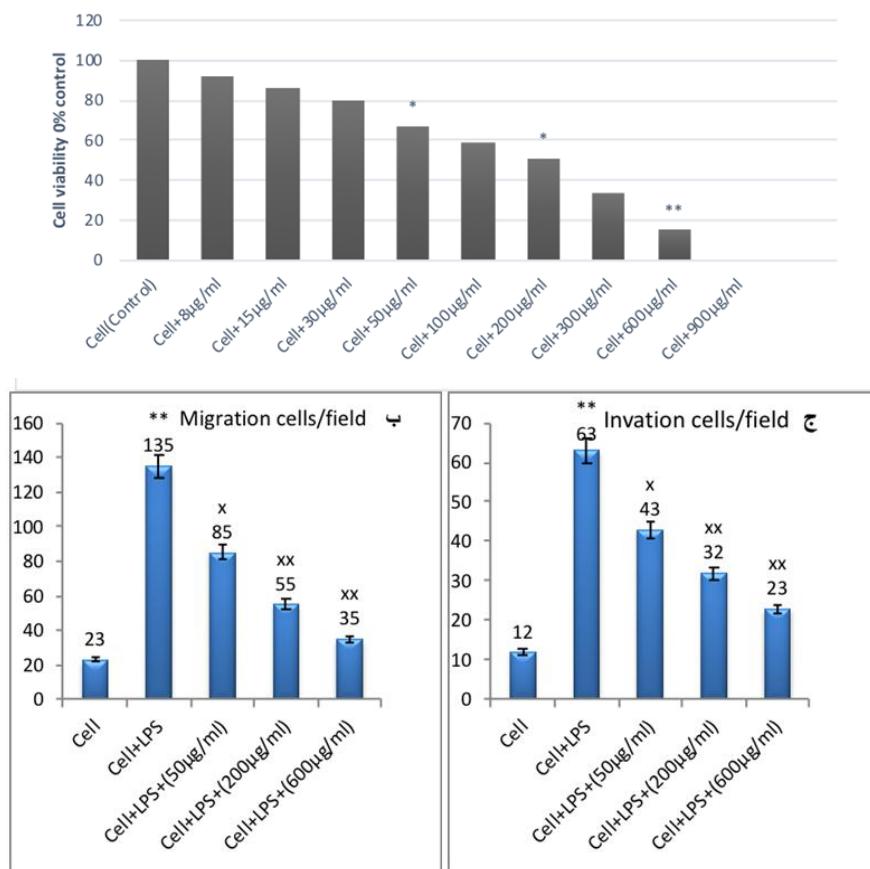
الیز /ELISA/ فعالیت MMP-9 در محیط کشت بدون سرم سلولی به وسیله کیت الایزا (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) دستورالعمل کارخانه سازنده بررسی و میزان جذب نمونه ها توسط دستگاه خواننده میکروپلیت(مدل ۳۵۵ Bio-Rad) در طول موج ۴۵۰ نانومتر خوانده شد. منحنی استاندارد MMP-9 با استفاده از غلظت های شناخته شده متالوپروتئینازها ترسیم گردید. این آزمایش با سه بار تکرار انجام شد.

وسترن بلاط: برای تایید میزان کاهش بیان MMPs از روش وسترن بلاط 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-۱۰۰، 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 روزگار شد. سپس ژل بر روی غشاء نیتروسلولز 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) سانتی گراد انکوبه شد. پس از چهار بار شستشوی ۵ دقیقه ای با بافر TBST، غشاء به مدت یک ساعت با anti-mouse antibody (Santa Crus, USA) با رقت کانثوگه شده با HRP (Santa Crus, USA) با رقت ۱/۵۰۰۰ انکوبه شد. چهار نوبت شستشوی ۵ دقیقه ای انجام شد. برای آشکار سازی و ردیابی باند از بلوترازیلیوم(NBT) و بروم کلرونیدیل فسفات(BCIP) (DOI: 10.29252/sjmu.26.4.197)

به صفر رسید. میزان  $LC_{50}=200$  مقداری از غلظت انسان است که باعث کاهش قدرت زیستی سلول تا  $50$  درصد می‌شود). ماکروگرم بر میلی لیتر اندازه گیری و میانگین آن  $LC_{50}=50$  Media (میانگین بهینه میزان دوز زیست پذیری سلول بر طبق بررسی در مقالات) ماکروگرم بر میلی لیتر اندازه گیری شد. بنا بر این دوز  $200$ ،  $50$  میکروگرم بر میلی لیتر دوز برای انجام آزمایشات بیشتر و دوز  $600$  به عنوان غلظتی که سه برابر  $LC_{50}$  است و در آن غلظت تقریباً اکثر سلول‌ها توانایی زیستی خود را از دست می‌دهند، به عنوان کنترل شاهد در نظر گرفته شد.

هسته عناب از غلظت  $0$  تا  $900$  میکروگرم/میلی لیتر در سرم محیط کشت به مدت  $24$  ساعت تیمار شدند. سلول‌های THP-1 که با غلظت‌های  $0$  تا  $300$  میکروگرم/میلی لیتر تحت درمان قرار گرفتند، اثر قابل توجهی بر میزان حیات سلولی در  $24$  ساعت از خود نشان ندادند. علاوه بر این بقای سلول‌های THP-1 زمانی که با غلظت‌های بالاتر از  $200$  میکروگرم بر میلی لیتر یعنی دقیقاً در غلظتی که بیشترین اثر سایتوکسیکی دیده می‌شود، تیمار شده بودند به طور قابل توجهی مهار شد به طوری که در غلظت  $900$  میکروگرم/میلی لیتر توانایی زیستی سلول‌ها به تقریباً

## الف



شکل شماره ۱. الف: سلول‌های THP-1 با غلظت‌های مشخصی از انسان هسته عناب در محیط کشت حاوی سرم به مدت  $24$  ساعت انکوبه شدند و سپس توانایی زیستی سلول‌ها توسط تست MTT اندازه گیری شد.  $**P=0.05$ ,  $**P=0.01$ . ب و ج: توانایی مهاجرت و تهاجم سلولی، سلول‌های THP-1 به وسیله سنجش میزان مهاجرت و تهاجم سلولی مشخص شد. سلول‌های THP-1 با غلظت مشخصی از انسان هسته عناب به مدت  $24$  ساعت تیمار شدند. سپس به سلول‌های THP-1 با یا بدون LPS (۱ میلی گرم بر میلی لیتر) به مدت  $24$  ساعت، اجازه مهاجرت داده شد. سلول‌هایی 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.  $**P=0.05$ ,  $**P=0.01$  برای گروه کنترل و تحریک شده با LPS.

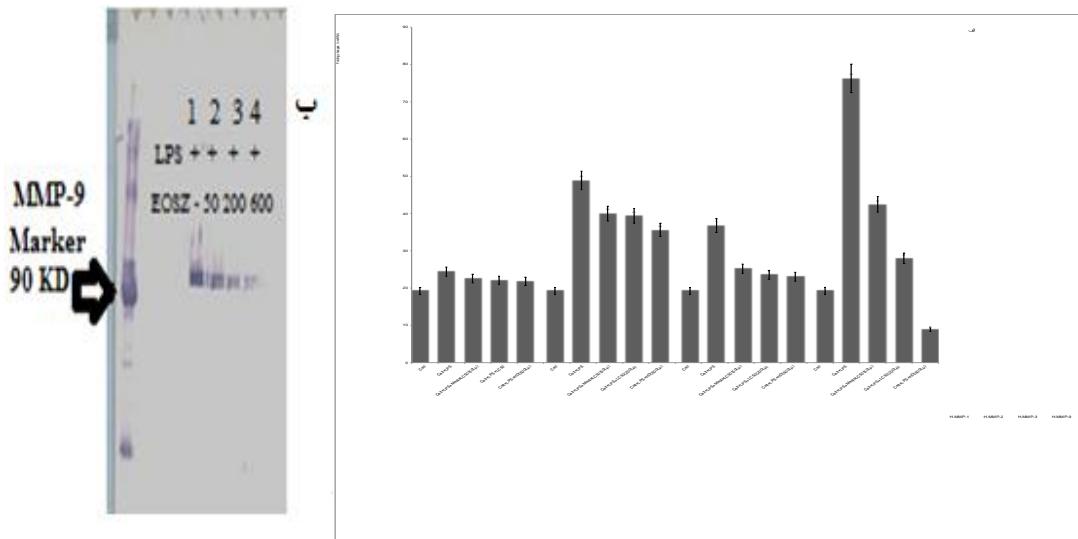
دادیم و همان طور که در شکل شماره ۲-ب نمایش داده می شود، LPS باعث القاء بیان پروتئین MMP-9 شد ولی تیمار با دوز غیر سمی باعث سرکوب بیان پروتئین شد. سپس به منظور بررسی اثر انسانس هسته عناب بر روی میزان ترشح و فعالیت پروتئولیتیکی پروتئین ۹ MMP، محیط رویی کشت یا سوپر ناتانت را به وسیله تست الایزا اندازه گیری کردیم. همان گونه که در شکل شماره ۳-الف مشخص شده است، میزان ترشح و فعالیت پروتئولیتیکی ۹ MMP 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 انسانس هسته عناب باعث مهار اثر القائی LPS بر میزان ترشح و فعالیت پروتئین ۹ MMP شد و این اثر مهاری به میزان دوز مصرفی انسانس هسته عناب بستگی داشت. این نتایج حاکی از آن است که انسانس هسته عناب 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 ۹ MMP نیز شده است. در مرحله بعد ما اثر انسانس هسته عناب را بر روی فعالیت پروتئولیتیکی ۹ MMP 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 ۹ MMP القاء شده با LPS به وسیله انسانس هسته عناب مهار شده و این مهارکنندگی به دوز مصرفی بستگی دارد. علاوه بر این، ما سپس اثر انسانس هسته عناب را بر روی ترشح پروتئین های MMP-1,2,3,9 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 انسانس هسته عناب هم تیمار می شوند باعث مهار بیان ۹ MMP القاء شده با LPS می شوند و این مهار به دوز مصرفی انسانس هسته عناب وابسته است. در حالی که تیمار با انسانس هسته عناب تاثیر چندانی روی مهار بیان ژن های ۱, ۲, ۳, ۴ نداشت. در مرحله بعد ما اثر انسانس هسته عناب را در میزان بیان پروتئین متالوپروتئیناز در عصاره لیز شده سلولی توسط وسترن بلاتینگ مورد ارزیابی قرار

اثر مهارکنندگی انسانس هسته عناب بر روی توانایی مهاجرت و تهاجم سلول های THP-1: به منظور بررسی اثر مهارکنندگی انسانس هسته عناب 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 انسانس هسته عناب 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.

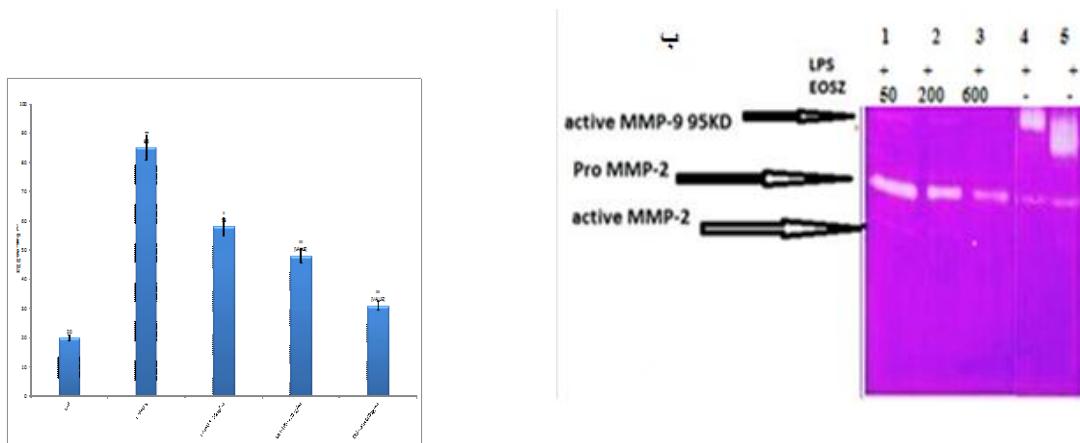
انسانس هسته عناب با کاهش بیان ژن MMP-9 باعث کاهش توانایی مهاجرت و تهاجم در سلول های THP-1 تحریک شده با LPS می شود: به منظور بررسی اثر مهاری انسانس هسته عناب بر روی توانایی مهاجرت و تهاجم سلولی در محیط آزمایشگاهی، ما اثر انسانس هسته عناب را بر روی میزان بیان ژن های متالوپروتئینازها مورد آزمایش قرار دادیم. همان گونه که در شکل شماره ۲-الف نشان داده شده است، LPS باعث القاء بیان ژن ۲,۹ MMP در سلول های THP-1 شد ولی زمانی که سلول ها را با انسانس هسته عناب هم تیمار کردیم باعث کاهش سرکوبی بیان ژن MMP-9 القاء شده توسط LPS شد که این مهار بیان ژن به میزان دوز مصرفی انسانس هسته عناب وابسته بود. در حالی که تیمار با انسانس هسته عناب تاثیر چندانی روی مهار بیان ژن های ۱, ۲, ۳, ۴ نداشت. در مرحله بعد ما اثر انسانس هسته عناب را در میزان بیان پروتئین متالوپروتئیناز در عصاره لیز شده سلولی توسط وسترن بلاتینگ مورد ارزیابی قرار

هسته عناب تاثیری بر روی مهار بیان سایر

متالوبروتئینازهای مورد مطالعه نداشت.



شکل شماره ۲. با کاهش بیان زن **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 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 سترن بلاط اندازه گیری شد. **GADPH** هم به عنوان زن 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.  $**P=0.01$  و  $XP<0.05$  برابر گروه کنترل،  $XXP<0.01$  برای گروه تیمار و تحریک شده با LPS.



شکل شماره ۳. مایع روبی محیط کشت یا سوپرناکنت 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. 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 مهاری انسانس هسته عناب هم بر بیان **MMP-9** های القاء شده به وسیله LPS هم در سطح زن و هم در سطح پروتئین و متعاقباً باعث مهار فعالیت آنزیمی **MMP-9** می شود.

داروهای مدرن و بی خطر، بررسی ترکیبات فعال و موثر گیاهان دارویی برای درمان بیماری‌ها 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 استئوآرتربیت برای این منظور مناسب می‌باشدند.

لیپولی ساکارید(LPS)، از اجزاء تشکیل دهنده دیواره سلولی باکتری‌های 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 می‌شود(۲۲) و قادر به القاء ترشح متالو پروتئینازها در سلول‌های ماکروفاز و سلول‌های کنдрؤوسیت هم در تنظیم رونویسی از این ژن‌ها و هم در میزان ترجممه متالوپروتئینازها می‌باشد(۲۳).

در راستای این امر، ما در این پژوهش به بررسی توانایی اثر اسانس هسته عناب بر کاهش توانایی مهاجرت و تهاجم سلول‌های THP-1 از طریق ارزیابی بیومارکرهای همانند متالوپروتئینازهای القاء شده توسط LPS که در پاتوژن اسٹئوآرتربیت دخالت دارند می‌پردازیم. بدین منظور از سلول‌های THP-1 به عنوان یک مدل شبیه به مونوویسیت‌ها/ماکروفاز استفاده شد.

نتایج این مطالعه نشان داد که اسانس و مواد استخراج شده از هسته عناب در غلظت غیر سمی ۵۰ میکروگرم بر میلی لیتر دارای خاصیت ضد تهاجمی و مهاجرتی در سلول‌های THP-1 تحریک شده با LPS در مقایسه با گروه کنترل بوده و نتایج ریل تایم، وسترن بلات، الیزا 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 می‌باشد و بیان بالای آن در بین MMP‌ها از اهمیت زیادتری در روند

در غضروف طبیعی، تعادل بین عوامل کاتابولیک و آنابولیک به منظور حفظ تمامیت ساختاری ECM ماتریکس غضروف وجود دارد، در میان شاخص‌های مختلف بیولوژیکی مرتبط با استئوآرتربیت متالوپروتئینازها نقش مهمی در تخریب غضروف بازی می‌کنند، در نتیجه موجب پیشرفت این بیماری می‌شوند(۱۵). سطوح ماتریکس پروتئیناز در غضروف و سینوویال بافت بیماران مبتلا به آرتربیت رماتوئید(RA) و افراد مبتلا به استئوآرتربیت(OA) بالاست و MMP‌ها نقش مهمی در پاتوفیزیولوژی آتروپاتیک بازی می‌کند(۱۶). علاوه بر این نقش MMP‌ها در پاسخ به فرآیندهایی مانند تهاجم و مهاجرت در بسیاری از رده‌های سلولی مشخص شده است(۱۷). از نقطه نظر بیان ژن، مطالعات قبلی بالینی برای درمان استئوآرتربیت بیشتر بر روی مهار پاتوژن بیماری مرکز بود که شامل مهار تخریب غضروف و فاکتورهای کاتابولیک، مهار لمفوکاین‌ها، مهار نیتریت اکسید NO، سایتوکین‌های پش التهابی مانند TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  و هم چنین متالوپروتئینازها که به عنوان یکی از عمدۀ ترین فاکتورهای کاتابولیک تخریبی دخیل در پاتوفیزیولوژی استئوآرتربیت است. مهارکننده‌های مصنوعی متالوپروتئینازها(MMPIs) برای اولین بار در مطالعات برای تفسیر علت آسیب فیزیولوژیک ناشی از متالوپروتئینازها توسعه پیدا کردند. این مهارکننده‌ها قادرند به طور عمدۀ اثرات پروتئولیتیک ناشی از فعالیت MMP‌ها را بلوکه کرده و هم چنین از تبدیل پروآنزیم‌های MMP‌ها به شکل فعال آن‌ها جلوگیری به عمل آورند. ولی به دلیل عوارض جانبی بالا و اثربخشی کم، دارای نتایج رضایت‌بخشی و مورد قبول نبود(۱۸,۱۹). علاوه بر این داروهای مانند داروهای غیراستروئیدی ضدالتهابی(NSAIDs) و مهارکننده‌های انتخابی COX-2 که برای درمان استئوآرتربیت تجویز می‌شوند فقط قادر به کاهش علائم التهابی هستند اما قادر به درمان پاتوژن بیماری نیستند(۲۰). می‌توان گفت که هیچ داروی اصلاح کننده استئوآرتربیت(DMOADs) که بتواند بیماری را مهار کرده یا از پیشرفت آن جلوگیری کند به طور روتین در دسترس نیست. با توجه به عدم وجود

با دومین PEX تعامل دارد و مانع از دامیریزه 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 ۲ TIMP-2 تاثیری در روند تهاجم و مهاجرت سلولی نداشت(۲۹). هم چنین در جا به جایی دُمین pex از MMP-9 با دُمین pex از MMP-2 میزان مهاجرت و تهاجم سلولی به شدت کاهش پیدا داد(۳۰).

در این تحقیق اثرات مهارکنندگی اسانس هسته عناب روی رشد و تکثیر سلول های رده ۱ 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  $50\text{ }\mu\text{g/ml}$  MLC50 ماکروگرم بر میلی لیتر که میانگین بهینه میزان دوز زیست پذیری سلول است، روی تهاجم و مهاجرت سلول های رده ۱ THP-1 قابل توجه بود به طوری که اسانس هسته عناب در این غلظت توانست بیش از ۵۷ درصد مهاجرت و ۵۵ درصد تهاجم سلول های رده ۱ 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 عناب در ارتباط است. با استفاده از روش وسترن بلاستینگ مشاهده شد که میزان بیان پروتئین MMP-9 در سلول های تیمار شده با اسانس هسته عناب به طور معنی داری نسبت به شاهد کاهش نشان داده است. نتایج الیزا هم بر این شواهد صحه گذاشت. به طور خلاصه نتایج این تحقیق نشان دادند که اسانس هسته عناب به طور موثری تهاجم و مهاجرت سلول های مونوکوپیتی/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 عناب از طریق تاثیر روی مهارکننده متالوپروتئیناز بافتی MMP-9 (TIMP-1) برای اتصال به دومین PEX از MMP-9 است که در نتیجه مانع از دامیریزه شدن MMP-9 و در نتیجه جلوگیری از عملکرد آن و عدم مهاجرت و

تهاجم سلول های فیبروبلاست و ماکروفاز در فرآیند بیماریزایی در استئوارتیت 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، شیمیوکین ها و ماتریکس خارج سلولی ترشح شده و در روند باسازی ماتریکس خارج سلولی بسیار موثرند و فعالیت پروتئازی آن ها در فرآیندهای 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 سینوویال افراد مبتلا به استئوارتیت 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 ماکروفازها و منوسيت 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 عناب (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 تحریک بافت فیبرونکتین و توانایی تهاجم بالای آن در مقایسه با MMP-2 و سایر متالوپروتئینازها است.

شكل 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 ها برای فعال شدن به TIMP برای اتصال به دُمین کاتالیتیکی 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

### سپاسگزاری

تمام هزینه های این پژوهش توسط نویسنده مسئول تامین شده است. نویسنده‌گان 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 استئوارتیتی است و می توان به عنوان یک راه کار تئوریک برای درمان استئوارتیت و به عنوان یک داروی ضد تهاجمی و یک داروی بی خطر و جایگزین داروهای شیمیایی پیشنهاد کرد.

### Reference

- 1.Davidson EB, Vitters EL, Vankraan PM, Vanberg WB. Expression of transforming growth factor- $\beta$  and the TGF $\beta$  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
- 2.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
- 3.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
- 4.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
- 5.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
- 6.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.semancer.2010.05.002
- 7.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
- 8.Qvist P, Bayjensen AC, Christiansen C, Dam EB, Pastourea 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
- 9.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
- 10.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
- 11.Koohihosseiniabadi 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
- 12.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 in vitro study. *Clin Rheumatol*2018; 16:1-8. doi:10.1007/s10067-018-4097-z
- 13.Maghsoudi H, Vaziri A, Alebouyeh M. Investigation of punicic 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 synoviocytes. *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 Clin 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, Garciapardo 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.3H10913-521R
- 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 E<sup>1</sup>, Maghsoudi H<sup>2\*</sup>, Hajihosseini R<sup>1</sup>

(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