Arshive of SID



# تأثیر عصاره هیدروالکلی شکر تیغال (*Echinops cephalotes* L.) بر میزان بیان mRNA ژن‌های فاکتورهای التهابی در سلول‌های THP-1 و سلول‌های کندروسیت به عنوان مدلی مشابه سلول‌های مونوسیت / ماکروفاژ و سلول‌های غضروف انسانی مبتلا به استئوآرتریت

**مهدی طاهریان[۱]، حسین مقصودی[۲*]، رضا طاهریان[۳]، حسین رستگار[۴]**

۱- پژوهشکده سازمان غذا و دارو، سازمان غذا و دارو، وزارت بهداشت و درمان و آموزش پزشکی، تهران، ایران
۲- گروه بیوتکنولوژی، دانشگاه پیام‌نور، تهران، ایران
۳- کمیته پژوهشی دانشجویان، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران
۴- مرکز تحقیقات تولیدات آرایشی و بهداشتی، سازمان غذا و دارو، وزارت بهداشت و درمان و آموزش پزشکی، تهران، ایران
*آدرس مکاتبه: تهران، شهرری، میدان معلم، عباس‌آباد، سه راه تقی‌آباد، مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، دانشگاه پیام‌نور واحد ری
تلفن: ۰۹۱۹۸۳۱۸۴۸۹
پست الکترونیک: hossein_m2002@yahoo.com

**تاریخ دریافت:** ۹۶/۴/۱۶ **تاریخ تصویب:** ۹۶/۸/۲۹

## چکیده

**مقدمه:** بیماری استئوآرتریت یکی از مهم‌ترین علل معلولیت جسمی در جهان می‌باشد. با توجه به عوارض درمان‌های رایج (کورتیکواستروئیدها و داروهای ضد التهابی غیراستروئیدی) این بیماری، توسعه درمان‌های جدید ضروری است.

**هدف:** هدف از مطالعه حاضر، بررسی اثر عصاره گیاه شکرتیغال (*Echinops cephalotes* L.) بر بیومارکرهایی التهابی اصلی در استئوآرتریت می‌باشد.

**روش بررسی:** عصاره الکلی گیاه شکرتیغال، ایبوپروفن و بتامتازون جهت بررسی اثر آنها بر بیومارکرهای التهابی فراهم شدند. از سلول‌های THP-1 و سلول‌های کندروسیت به عنوان مدلی شبیه به سلول‌های مونوسیت/ماکروفاژ و سلول‌های غضروف انسانی مبتلا به استئوآرتریت استفاده شد. به منظور افزایش سطح بیان سایتوکین‌ها، هر دو نوع سلول با لیپوپلی ساکارید (LPS) تیمار شدند. پس از جداسازی RNA و تهیه cDNA، RT_PCR & PCR انجام شد و سپس با استفاده از روش Real Time- PCR میزان بیان ژن-های موردنظر بررسی شد.

**نتایج:** عصاره گیاه شکرتیغال منجر به کاهش بیان mRNA اغلب ژن‌های پیش التهابی در سلول های تحریک شده توسط LPS شد. همچنین، این عصاره باعث کاهش تولید NO و پروستاگلندین E2 در سلول های مونوست/ماکروفاژ شد. در مقایسه با اثرات ایبوپروفن و بتامتازون بر کاهش فاکتورهای التهابی، عصاره هیدروالکلی شکرتیغال اثر کمتری داشت.

**نتیجه‌گیری:** از عصاره گیاه شکرتیغال می‌توان به عنوان مکمل درمانی برای کاهش دوز کورتیکواستروئیدها و داروهای ضد التهاب غیراستروئیدی در درمان استئوآرتریت استفاده کرد.

**گل‌واژگان:** شکر تیغال، استئوآرتریت، سایتوکین، کندروسیت، مونوسیت/ماکروفاژ



www.SID.ir

Arshive of SID



## مقدمه

استئوآرتریت شایع‌ترین بیماری مفصلی انسان در دنیا است به طوری که شیوع استئوآرتریت زانو در ایران در سنین ۸۲-۱۵ در حدود ٪۱۶ گزارش شده است [۱]. شیوع مبتلایان به نوع علامت‌دار این بیماری حدود ۱۰ درصد در مردان و ۱۳ درصد در زنان بالای ۶۵ سال، در کشور آمریکا می‌باشد [۲]. مشخصه استئوآرتریت فرسایش غضروف بین مفصلی و تحریک استخوان‌سازی در استخوان زیر غضروف است و در طی سال-های اخیر مشخص شده است که این بیماری نه تنها یک بیماری دژنراتیو می‌باشد، بلکه درجاتی از التهاب سینوویوم نیز در مفاصل بروز می‌کند. مشخص شده است در طی روند بیماری کندروسیت‌ها و سلول‌های مونونوکلئار (مونوسیت و ماکروفاژ) نیز در مفصل تجمع می‌یابند [۳]. این سلول‌های فعال شده سیتوکین‌های التهابی شامل IL-1β, TNFα را تولید کرده و از طرفی با بیان آنزیم‌های iNOS ,COX-2 موجب افزایش تولید PGE2, NO می‌شوند و این مواد پیش التهابی با مکانیسم‌های شناخته شده‌ای مانند تحریک سنتز متالو پروتئینازها و مهار تولید مهارکننده بافتی متالو پروتئینازها، تحریک آپوپتوز کندروسیت‌ها و مهار سنتز پروتئوگلیکان‌ها در افزایش تخریب غضروف نقش ایفا می‌کنند [۵، ۴]. سالانه میلیون‌ها نفر از مبتلایان به استئوآرتریت برای تسکین درد ناشی از بیماری مجبور به استفاده از داروهای ضددرد بخصوص ضدالتهاب‌های غیراستروئیدی مانند (ایبوبروفن، دیکلوفناک سدیم و ناپروکسین) و استروئیدها می‌شوند. داروهای ضدالتهاب غیراستروئیدی دارای عوارض گوارشی و کلیوی می‌باشند و استروئیدها نیز دارای عوارض متعددی مانند ابتلا به دیابت، فشار خون بالا و پوکی استخوان هستند [۶]. شیوع بالای مبتلایان به استئوآرتریت بخصوص زانو و افزایش شاخص‌های امید به زندگی، افزایش تعداد سالمندان، حجم بالای مصرف داروهای سنتتیک و میزان بالای عوارض جانبی این داروها منجر به تحمیل هزینه‌های بسیار زیاد در بودجه بهداشت و درمان کشورها می‌شود. بنابراین در طی سال‌های اخیر و بخصوص بعد از مشخص شدن نقش التهاب در پاتوژنز استئوآرتریت، بسیاری از محققین در تلاش‌اند تا نقش ضدالتهاب انواع گونه‌های گیاهان دارویی را مشخص نموده تا شانس استفاده از داروهای ضددرد و ضدالتهابی با عوارض جانبی کمتر را برای بیماران فراهم آورند.

گیاه شکر تیغال (*Echinops cephalotes* L.) رده‌ای از گیاهان چندساله است. این گیاه در اغلب استان‌های ایران بویژه خراسان، فارس (جهرم)، اصفهان، کرمان، کرمانشاه، همدان، لرستان، سمنان، مازندران و تهران در بلندای ۱۸۰۰ متری از سطح دریا رویش و پراکندگی دارد [۷]. همچنین این گیاه بومی غرب اروپا و آسیای مرکزی وجنوبی نیز می‌باشد [۸]. از گیاه شکر تیغال در پزشکی قدیم به عنوان ملین دستگاه و همچنین در تخفیف بیماری‌های ریوی به عنوان خلط‌آور، برطرف‌کننده سرفه و تحریک دستگاه تنفسی تحتانی و آسم استفاده می‌شده است [۱۰، ۹] و همچنین این گیاه دارای اثر ضددرد و ضدالتهاب نیز می‌باشد [۱۱]. در این مطالعه به بررسی نقش گیاه شکر تیغال *Echinops cephalotes* L. در بیان mRNA ژن‌های COX-2، iNOS و همچنین تأثیرات آن بر TNF-α، IL-1β و IL-18 در سلول‌های کندروسیت جدا شده از مفصل *carpometacarpal* گوساله هشت ماهه نژاد هلشتاین و تولید NO و PGE2 در سلول‌های THP-1 به عنوان مدلی شبیه به انفیلتراسیون سلولی مونوسیت و ماکروفاژ در مفصل مبتلا به استئوآرتریت پرداخته می‌شود.

## مواد و روش‌ها

### آماده‌سازی عصاره شکرتیغال، ایبوپروفن و بتامتازون

عصاره هیدروالکلی شکرتیغال از مرکز ذخایر ژنتیک ایران تهیه شد و بر اساس پروتوکول‌های معمول و در دسترس تهیه شد. بتامتازون با برند تجاری سیگما (یک داروی استروئیدی) به صورت محلول آبی بتامتازون-۲۱-سولفات با غلظت ۱/۳۰mg/mL (که معادل بتامتازون با غلظت ۱/۰۰mg/mL است) (Sigma، آمریکا) استفاده شد. ایبوپروفن (Sigma، آمریکا) (یک داروی ضدالتهاب غیر استروئیدی) در آب با دمای ۱۰۰°C به مدت پنج دقیقه حل شد تا به غلظت ۱/۰۰ mg/mL برسد.



www.SID.ir

Arshive of SID



**کشت سلولی کندروسیت‌ها و THP-1**

برای جداسازی سلول‌های کندروسیت، مایع مفصلی (CMC) *carpometacarpal* گوساله هشت ماهه سالم پونگسیون جدا شده و پس از دو نوبت شستشو با بافر PBS, pH7.2, 1 Mollar با استفاده از آنزیمCollagenase Type II به مدت ۱۶ ساعت، در بن‌ماری C ۳۷° نگهداری و سپس سلول‌ها توسط فیلتر استریل جدا شد و برای Subculture به فلاسک مخصوص انتقال پیدا کرد و تا زمانی که ٪۸۵ حجم فلاسک توسط لایه تک سلولی پوشانده شود، در انکوباتور با شرایط ٪۵ دی اکسیدکربن، دمای C ۳۷° و رطوبت ٪۹۰ نگهداری شد [۱۲]. سپس برای شمارش سلولی از تریپان بلو ٪۰/۴ استفاده شد. سلول‌های THP-1 تهیه شده از انستیتوپاستور ایران به دو صورت Adherent و Non-adherant وجود دارند، که پس از انتقال به آزمایشگاه با رسیدن به تراکم بالای ٪۸۵ سلول‌های معلق در محیط کشت جدا و پس از شمارش با تریپان بلو به میزان لازم به پلیت‌ها انتقال داده شد.

**تعیین سیتوتوکسیسیتی توسط MTT assay و تریپان‌بلو**

جهت بررسی سیتوتوکسیسیتی در عصاره هیدروالکلی گیاه شکرتیغال و تعیین LC50 از روش رنگ‌سنجی استفاده شد. پودر MTT یک نمک تترازولیوم محلول در آب است که این محلول در محیط کشت فاقد فنل رد یا بافر PBS حل شده و ترکیب زردرنگ ایجاد می‌کند. 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 درمی‌آید. هر چه سلول‌ها فعال‌تر و تعداد بیشتر، میزان رنگ ایجاد شده بیشتر است. جذب نوری رنگ ارغوانی ظاهر شده در طول موج ۴۹۰-۵۴۰nm اندازه‌گیری می‌شود. میزان LC50 برای هر دو نوع سلول ۲۰µl به دست آمد.

**تیمار توسط LPS**

به منظور فراهم کردن شرایطی شبیه به بیماری و افزایش بیان سایتوکین‌های پیش التهابی از LPS به میزان ۲۰ ng/ml استفاده شد. ابتدا $۶\times۱۰^{۶}$ سلول را در محیط کشت، کشت می‌دهیم. پس از ۷۲ ساعت میزان LPS 100 ng به محیط اضافه شد. سری اول پلیت‌ها به مدت ۲۴ ساعت به منظور بیان سایتوکین‌های پیش التهابی مانند TNF-α، IL-1β، IL-18 و همچنین بیان COX-2 و iNOS در انکوباتور CO2 نگهداری شد. سری دوم به مدت یک ساعت در انکوباتور به منظور تغییرات پروستاگلاندین و NO قرار گرفت.

**جداسازی RNA**

با استفاده از معرف Trizol (Invitrogen) شرکت سیناژن و درنهایت برای تعیین غلظت RNA از روش اسپکتروفتومتری (UV-2100 Spectrophotometer) استفاده شد که در صورت وجود آلودگی DNA، از آنزیم DNase برای از بین بردن DNA اضافی استفاده می‌شود (شکل مکمل ۱).

**سنتز cDNA**

برای هر نمونه µ۱g از RNA توسط کیت 2step RT-PCR (شرکت vivantis) تبدیل به cDNA می‌شود. RT-PCR در شرایط ۴۲°C به مدت ۶۰ دقیقه و حرارت ۹۴°C به مدت ۵ دقیقه (به منظور قطع سنتز cDNA) انجام شد. در انتها، با انجام PCR غلظت نمونه cDNA تولید شده افزایش پیدا کرد.

**Semi-quantitative PCR**

با استفاده از پرایمرهایی اختصاصی برای هر کدام از سایتوکین‌های مورد مطالعه semi-quantitative PCR انجام شد و ژن GAPDH به عنوان ژن خانه‌دار استفاده شد. تحت شرایط استاندارد PCR انجام شد و فرآورده PCR در آگاروز ژل ٪ ۱/۵ همراه با اتیدیوم بروماید µg/ml ۵ چک شد (شکل شماره ۱).

**Quantitative Real time PCR**

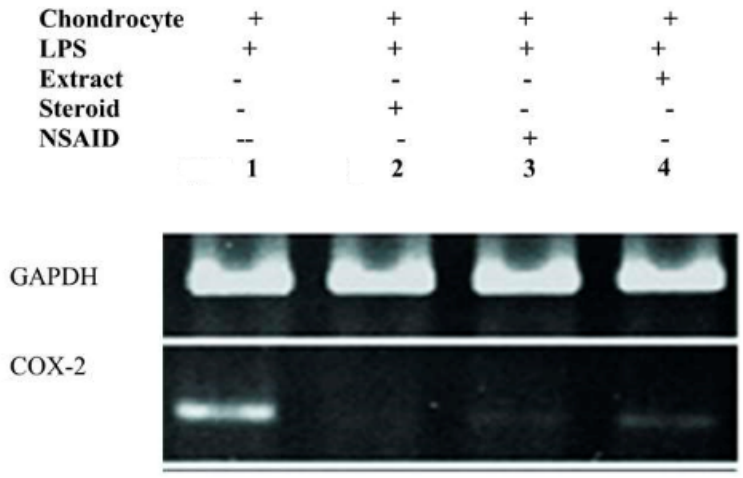
Real-time PCR با استفاده از همان پرایمرهایی که برای PCR کیفی استفاده شد، انجام شد و از evagreen به عنوان مسترمیکس کارخانه سیناکلون استفاده شد. نتایج به دست آمده از Threshold cycle (Ct value) توسط دو روش منحنی استاندارد و Pfaffi مورد ارزیابی قرار گرفت.



www.SID.ir

Arshive of SID






**شکل شماره ۱- پنج میکرولیتر از محصول نهایی همراه با یک میکرولیتر اتیدیوم بروماید در ژل آگارز تزریق شد و مدت زمان ۴۵ دقیقه در دستگاه الکتروفورز با ولتاژ ۹۰ میلی ولت قرار گرفت. در چاهک شماره ۲ میزان بین ژن تقریبا ۱۰۰ درصد سرکوب شده است. در چاهک شماره ۳ میزان بیان ژن تقریبا ۹۰ درصد سرکوب شده است. در چاهک شماره ۴ عصاره آبی گیاه تقریبا به میزان ۷۵ درصد بیان ژن را سرکوب کرده است.**

**اندازه‌گیری میزان تولید NO توسط روش کلریمتری**

با استفاده از سدیم نیتریت در غلظت‌های مختلف منحنی استاندارد رسم شد. سوپر ناتانت محیط کشت سلولی با ۱۰۰ µl معرف Grase Ragent (R&D Systems، Minneapolis، MN، USA) در یک پلیت ۹۶ خانه ته صاف در اتاق تاریک گذاشته می‌شود سپس چگالی نوری آنها در طول موج ۵۴۰nm اندازه‌گیری شد و با استفاده از منحنی استاندارد بر اساس چگالی نوری نسبت به لگاریتم غلظت، میزان تولید NO مشخص می‌شود (شکل مکمل ۲- الف).

**اندازه‌گیری میزان تولید PGE-2**

با استفاده از کیت Invitrogen، برای اندازه‌گیری سطوح PGE-2 ترشح شده در سوپرناتانت مایع کشت سلولی بر طبق پروتکل شرکت سازنده از محلول استاندارد PGE-2 و غلظت‌های مشخص آن برای تهیه منحنی استاندارد استفاده شد. درنهایت میزان چگالی نوری بلافاصله پس از انجام آزمایش توسط الایزا ریدر در طول موج ۴۰۵nm اندازه‌گیری شد و با استفاده از فرمول تهیه شده از ترکیب استاندارد و منحنی رسم شده (بر اساس چگالی نوری نسبت به لگاریتم غلظت) میزان تولید PGE-2 مشخص شد (شکل مکمل ۲- ب)

**طبقه‌بندی گروه‌های شرکت‌کننده در بررسی**

سلول‌های کندروسیت و سلول‌های THP-1 بعد از کشت در شرایط متفاوت مطابق جدول شماره ۱ تیمار شدند.

**آنالیز آماری**

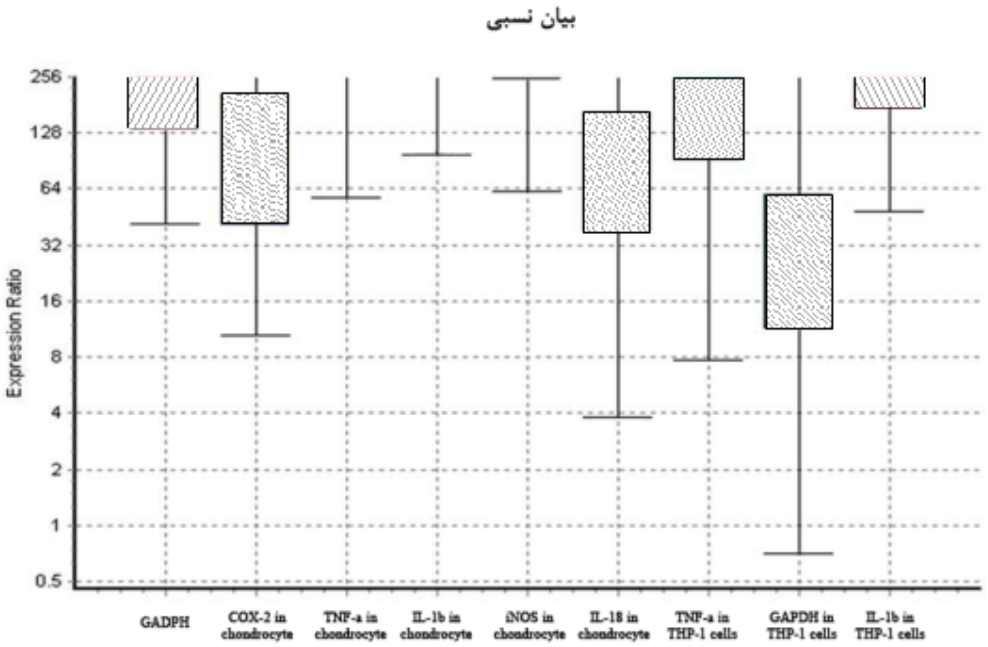
تمامی داده‌ها به عنوان میانگین ±SD بیان شده است. آنالیز آماری با استفاده از آنالیز یک سویه واریانس (ANOVA)، نرم‌افزار REST version 20 و نرم‌افزار SPSS V.20 اجرا شده است. برای آنالیز Ct، P< ۰/۰۵ به شکل آماری معنی‌دار در نظر گرفته شده است.



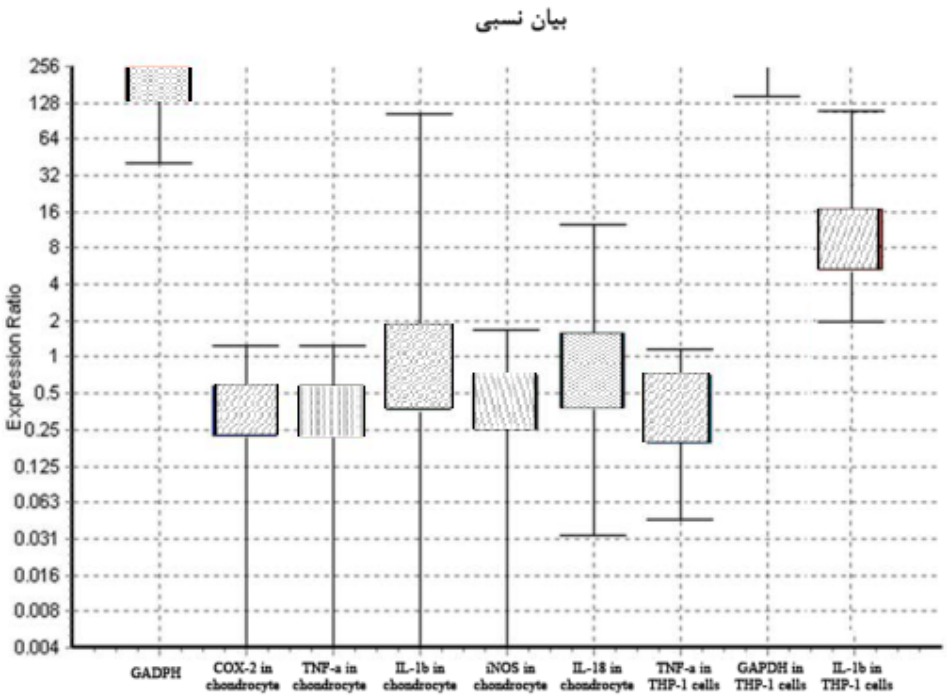
www.SID.ir

Arshive of SID






**شکل شماره ۲ (الف)**- نمودار تغییرات بیان ژن سیتوکین‌های مورد مطالعه پس از تیمار با **LPS**




**شکل شماره ۲ (ب)**- نمودار تغییرات بیان ژن سیتوکین‌های مورد مطالعه پس از تیمار با **LPS** + عصاره



www.SID.ir

Arshive of SID



جدول شماره ۱- طبقه‌بندی گروه‌های تیمار شده

| گروه | سلول‌های کندروسیت/THP-1 | عصاره گیاه شکرتیغال | لیپوپلی ساکارید | کورتیکواستروئید (پردنیزولون) | ضدالتهاب غیراستروئیدی (ایبوپروفن) | دارونما |
|---|---|---|---|---|---|---|
| ۱ | + | - | - | - | - | - |
| ۲ | + | + | - | - | - | - |
| ۳ | + | - | + | - | - | - |
| ۴ | + | + | + | - | - | - |
| ۵ | + | - | + | - | - | + |
| ۶ | + | - | + | + | - | - |
| ۷ | + | - | + | - | + | - |

## نتایج

آنالیز ابتدا توسط روش Pfaffi یا ΔΔC انجام گرفت و سپس از نرم‌افزار REST version 2000 برای آنالیز کمی استفاده شد.

آنالیز نتایج Real time-PCR به روش Pfaffi یا ΔΔC انجام گرفت:

2-ΔΔ= Expression Ratio
Ct=ΔC main cytokineΔ-C CalibraterΔΔ
Ct= (ΔΔCt main cytocine-Ct GADPH)-(Ct sample positive- Ct GADPH)

### اثر عصاره گیاه شکرتیغال برروی بیان COX-2 در کندروسیت

عصاره هیدروالکلی گیاه شکرتیغال بر بیان آنزیم COX-2 در سلول‌های گروه ۲ تأثیر ندارد. در گروه ۳ با اضافه کردن LPS در عدم حضور عصاره، افزایش بیان ۱۰۰ درصد در بیان آنزیم COX-2 مشاهده شد. در گروه ۴ (LPS+ عصاره) افزایش بیان COX-2 به میزان ۲۵ درصد مشاهده شد که به طور معنی‌داری پایین‌تر از میزان بیان این ژن در گروه ۳ بود. در گروه شماره ۶ تقریباً تغییری در میزان بیان ژن مشاهده نشد. در گروه شماره ۷ میزان بیان ژن تقریباً ۱۰ درصد افزایش یافت. تغییر مشاهده شده در افزایش بیان ژن در گروه ۴ به طور معنی داری بالاتر از گروه‌های ۶ و ۷ بود. لازم به ذکر است در گروه ۵ که از Placebo برای درمان استفاده شده بود، هیچ تغییری در میزان بیان ژن مورد نظر ایجاد نشد.

### اثر عصاره گیاه شکرتیغال بر روی بیان TNF-α در کندروسیت

عصاره هیدروالکلی گیاه شکرتیغال بر بیان TNF-α در سلول‌های گروه ۲ تأثیر ندارد. در گروه ۳ با اضافه کردن LPS در عدم حضور عصاره، افزایش بیان ۱۰۰ درصد در بیان TNF-α مشاهده شد. در گروه ۴ (LPS+عصاره) افزایش بیان TNF-α به میزان ۵۹/۳۸ درصد مشاهده شد که به طور معنی داری پایین‌تر از میزان بیان این ژن در گروه ۳ بود. افزایش بیان TNF-α در گروه ۶ حدود ۵ درصد و در گروه ۷ حدود ۱۸ درصد بود. افزایش بیان TNF-α در گروه ۴ به طور معنی‌داری بالاتر از گروه‌های ۶ و ۷ بود. لازم به ذکر است در گروه ۵ که از Placebo برای درمان استفاده شده بود، هیچ تغییری در میزان بیان ژن مورد نظر ایجاد نشد.

### اثر عصاره گیاه شکرتیغال بر روی بیان iNOS در کندروسیت

عصاره هیدروالکلی گیاه شکرتیغال بر بیان آنزیم iNOS در سلول‌های گروه ۲ تأثیر ندارد. در گروه ۳ با اضافه کردن LPS در عدم حضور عصاره، افزایش بیان ۱۰۰ درصد در بیان آنزیم iNOS مشاهده شد. در گروه ۴ (LPS+ عصاره) افزایش بیان iNOS به میزان ۷۹/۲۹ درصد مشاهده شد که به طور معنی داری پایین‌تر از میزان بیان این ژن در گروه ۳ بود. در گروه شماره ۶ تقریباً تغییری در میزان بیان ژن مشاهده نشد. در گروه شماره ۷ میزان بیان ژن تقریباً ۸ درصد افزایش یافت. افزایش بیان TNF-α در گروه ۴ به طور معنی‌داری بالاتر از گروه‌های



www.SID.ir

Arshive of SID



۶ و ۷ بود. لازم به ذکر است در گروه ۵ که از Placebo برای درمان استفاده شده بود، هیچ تغییری در میزان بیان ژن مورد نظر ایجاد نشد.

**اثر عصاره گیاه شکرتیغال بر روی بیان TNF-α در سلول‌های THP-1**

عصاره هیدروالکلی گیاه شکرتیغال بر بیان TNF-α در سلول‌های گروه ۲ تأثیر ندارد. در گروه ۳ با اضافه کردن LPS در عدم حضور عصاره، افزایش بیان ۱۰۰ درصد در بیان TNF-α مشاهده شد. در گروه ۴ (LPS+ عصاره) افزایش بیان TNF-α به میزان ۷۲/۸۸ درصد مشاهده شد که به طور معنی داری پایین‌تر از میزان بیان این ژن در گروه ۳ بود. افزایش بیان TNF-α در گروه ۶ حدود ۴ درصد و در گروه ۷ حدود ۱۴ درصد بود. افزایش بیان TNF-α در گروه ۴ به طور معنی‌داری بالاتر از گروه‌های ۶ و ۷ بود. لازم به ذکر است در گروه ۵ که از Placebo برای درمان استفاده شده بود هیچ تغییری در میزان بیان ژن موردنظر ایجاد نشد.

**اثر عصاره گیاه شکرتیغال بر میزان تولید PGE2 در سلول‌های THP1**

برآورد میزان تولید PGE2 به روش رادیوایمینواسی ELIZA و با استفاده از رسم منحنی استاندارد برای غلظت‌های متفاوت از محلول استاندارد پروستاگلاندین و فرمول ارائه شده توسط شرکت Invitrogen انجام پذیرفت و نتایج به شرح جدول شماره ۲ ارائه شده است. در گروه ۴ نسبت به گروه ۳، میزان تولید PGE2 به طور معنی‌داری ۳۲ درصد کاهش یافت. تولید PGE2 در گروه ۶، ۵۳ درصد و در گروه ۷، ۴۸ درصد کاهش یافت. میزان کاهش تولید PGE2 در گروه ۴ به طور معنی‌داری پایین‌تر از گروه‌های ۶ و ۷ بود.

**اثر عصاره گیاه شکرتیغال بر میزان تولید NO در سلول‌های THP-1**

برآورد میزان تولید NO به روش اسکتروفومتری و با استفاده از رسم منحنی استاندارد برای غلظت‌های متفاوت از محلول استاندارد نیتریت اکساید انجام پذیرفت و نتایج به شرح جدول شماره ۳ ارائه شده است. در گروه ۴ نسبت به گروه ۳، میزان تولید PGE2 به طور معنی‌داری ۳۲ درصد کاهش یافت. تولید PGE2 در گروه ۶، ۵۶ درصد و در گروه ۷، ۵۲ درصد کاهش یافت. میزان کاهش تولید PGE2 در گروه ۴ به طور معنی‌داری پایین‌تر از گروه‌های ۶ و ۷ بود.

**آنالیز نتایج RT-PCR توسط نرم‌افزار REST**

آنالیز Ct های به دست آمده از گروه سوم (Cell+LPS) بیانگر Upregulation بیان تمامی سایتوکین‌های مورد مطالعه در هر دو نوع سلول دارد. آنالیز Ct های به دست آمده از گروه چهارم Cell+Extract+LPS بیانگر Downregulation بیان تمامی سایتوکین‌ها (به جز IL-1β) در هر دو نوع سلول دارد (شکل‌های شماره ۲ و ۳).

**جدول شماره ۲- میزان تولید پروستاگلندین E2 در سلول‌های THP-1**

| گروه | Logit (%B/B0) | Picogram/ml PGE2 |
|---|---|---|
| ۱ | ۱/۱ | ۴/۰ |
| ۲ | ۱/۲ | ۴/۱ |
| ۳ | ۲/۲ | ۱۱/۸ |
| ۴ | ۱/۸ | ۸/۰ |
| ۵ | ۲/۲ | ۱۱/۸ |
| ۶ | ۱/۳ | ۵/۵ |
| ۷ | ۱/۵ | ۶/۲ |



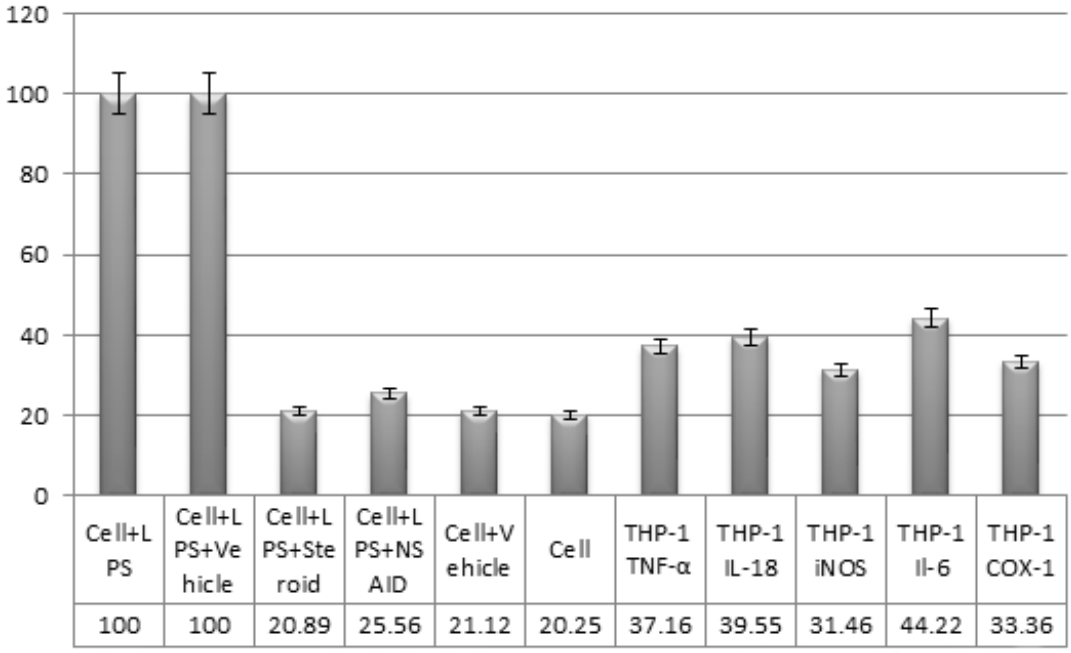
www.SID.ir

Arshive of SID



جدول شماره ۳- میزان تولید نیتریت اکساید در سلول‌های THP-1

| گروه | Optical density | Nanomol nitrite |
|---|---|---|
| ۱ | ۰/۵ | ۸۰۰ |
| ۲ | ۰/۷ | ۱۰۰۰ |
| ۳ | ۲/۴ | ۲۵۰۰ |
| ۴ | ۱/۵ | ۱۷۰۰ |
| ۵ | ۲/۴ | ۲۵۰۰ |
| ۶ | ۰/۸ | ۱۱۰۰ |
| ۷ | ۱/۰ | ۱۲۰۰ |




شکل شماره ۳- بیان نسبی ژن‌های فاکتورهای التهابی در سلول‌های مونوسیت/ماکروفاژ

## بحث

بر اساس اطلاعات ما، مطالعه‌ی حاضر اولین مطالعه‌ای است که در آن اثرات عصاره‌ی گیاه شکرتیغال در کاهش فاکتورهای التهابی در کندروسیت‌ها و سلول‌های THP-1 بررسی شده است. ما نشان دادیم که عصاره‌ی گیاه شکرتیغال بیان TNF-α را در هر دو سلول THP-1 و کندروسیت‌های تحریک شده توسط LPS کاهش می‌دهد. به علاوه، این عصاره بیان COX-2 و iNOS را در کندروسیت‌ها کاهش می‌دهد. این نتایج، اثرات ضدالتهابی عصاره شکرتیغال در طب سنتی ایران را تأیید می‌کند [۱۳]. با این حال، در مقایسه با ایبوپروفن و بتامتازون، عصاره‌ی گیاه شکرتیغال در کاهش التهاب کمتر مؤثر بود.

مطالعات پیشین اثرات سوء ماکروفاژهای سینوویال در استئوآرتریت را تحت مطالعه قرار داده‌اند. بلوم و همکاران نشان داده‌اند که ماکروفاژهای سینوویال ایجاد فیبروز و تشکیل استئوفیت را در مدل موشی استئوآرتریت القا می‌کنند [۱۴]. رابطه‌ی قوی میان تعداد ماکروفاژها در فضای سینوویال و شدت و مدت استئوآرتریت وجود دارد [۱۵]. این مطالعات،



www.SID.ir

Arshive of SID



مطرح‌کننده‌ی نقش ماکروفاژها در القا و حفظ فرآیندهای التهابی در مفاصل درگیر در استئوآرتریت هستند. از آنجایی که تولید بالای پروستاگلاندین‌ها و سایتوکین‌های التهابی در کندروسیت‌ها با بروز و شدت بیماری استئوآرتریت مرتبط است، درمان هایی که بتوانند در تولید این سایتوکین‌ها به طور مؤثری مداخله کنند، امیدهای درمانی جدی بیماری استئوآرتریت هستند [۱۷، ۱۶]. سایتوکاین‌های مختلفی در سیر بیماری استئوآرتریت افزایش پیدا می‌کنند و در پاتولوژی این بیماری دخیل هستند. TNFα و IL-1β سایتوکاین‌های اولیه دخیل در پاتولوژی استئوآرتریت هستند، بنابراین مهار بیان این سایتوکاین‌ها در کندروسیت‌ها و ماکروفاژها در کاهش آسیب غضروفی در بیماری استئوآرتریت مؤثر هستند [۱۹، ۱۸]. هم TNF-α و هم IL-1β تولید پروستاگلاندین‌ها و نیتریک اکساید و متالوپروتئینازها مانند کلاژناز، ژلاتیناز پروتئین گلیکان ها و ... را القا می‌کنند که منجر به تخریب غضروفی می‌شود [۲۰، ۴]. بنابراین، کاهش تولید پروستاگلاندین‌ها و نیتریک اکساید در کاهش درد و التهاب در استئوآرتریت مؤثر بوده است [۲۳-۲۱]. با توجه به اینکه استروئیدها و داروهای ضدالتهاب غیراستروئیدی، بیان عوامل دخیل در این موضوع را کاهش می‌دهد، این داروها، درمان شایع بیماری استئوآرتریت محسوب می‌شود.

در مطالعه حاضر، ما اثر عصاره گیاه شکرتیغال را بر روی کندروسیت‌ها و سلول‌های THP-1 بررسی کردیم. سلول‌های THP-1 انسانی مدل جایگزین مناسبی برای مونوسیت/ماکروفاژ می‌باشند و در حال حاضر در مطالعات مختلف بر روی فاکتورهای التهابی، مورد استفاده قرار می‌گیرند [۲۴]. ما برای اولین بار نشان دادیم که اثرات ضد التهابی عصاره گیاه شکر تیغال بر روی کندروسیت‌ها وفیبروبلاست‌ها محدود نیست وبه سلول‌های جانشین بافت مونوسیت /ماکروفاژ نیز گسترش داده می‌شود. ما ثابت کردیم که عصاره گیاه مورد مطالعه بیان ژن های مؤثر در التهاب بیماری OA را در THP-1 تحریک شده با LPS را سرکوب می‌کند. میزان تولید PGE2 در کندروسیت‌هایی که با عصاره گیاه و LPS تحریک شده بودند، ۶۸ درصد بود. پس عصاره گیاه شکرتیغال میزان تولید PGE2 را ٪۳۲ کاهش داده است. از طرفی میزان تولید NO را نیز ۳۲ درصد کاهش داده است. تأثیر عصاره این گیاه بر بیان ژن‌های سیتوکین TNF-αدر کندروسیت‌هایی که با LPS تیمار شده‌اند ۴۰/۶۲ درصد است. بیان ژن COX-2 در سلول‌های کندروسیت در حضور عصاره ۷۵ درصد کاهش یافت. همچنین بیان ژن سیتوکین پیش التهابی TNF-α در سلول‌های THP-1 حدود ۲۷ درصد کاهش یافت. با توجه به این نتایج مشخص شده که عصاره شکرتیغال بیان ژن‌های التهابی را کاهش می‌دهد و برای اولین بار این تحقیق مستند کرد که عصاره گیاه مورد مطالعه به عنوان یک مهارکننده قوی بیان ژن سیتوکین‌ها و تولید پروستاگلاندین و نیتریت را در هر دو رده سلولی کندروسیت‌ها وTHP-1 را سرکوب می‌کند. با این حال در مقایسه با بتامتازون و ایبوپروفن، اثر ضدالتهابی این عصاره کمتر بود.

به طور خلاصه، عصاره‌ی گیاه شکرتیغال در کاهش بیان فاکتورهای التهابی در کندروسیت‌ها و THP-1 مؤثر است که مطرح‌کننده‌ی نقش آن بر روی سلول‌های مختلف دخیل در پاتوژنز بیماری استئوآرتریت می‌باشد. با این حال، نتایج این مطالعه باید با درنظرگیری بعضی محدودیت‌ها بررسی شود. ابتدا آنکه این مطالعه یک مطالعه ی آزمایشگاهی است و مطالعات بیشتری به صورت In-vivo بر روی انسان و حیوان برای بررسی بیشتر اثر عصاره‌ی گیاه شکرتیغال بر استئوآرتریت مورد نیاز است. دوم این که در این مطالعه تمایز احتمالی سلول های THP-1 به رده‌های ماکروفاژی طی آزمایش‌ها مورد بررسی قرار نگرفت. البته قابل ذکر است که هیچ یک از متون قبلی تمایز سلول‌های THP-1 تحت القای مواد استفاده شده در این مطالعه را گزارش نکرده‌اند. از طرف دیگر حتی در صورت تمایز سلول‌های THP-1 به ماکروفاژها، با توجه به نقش ماکروفاژها در بیماری استئوآرتریت، باز هم نتایج این مطالعه ارزشمند خواهد بود. از این رو بعید است محدودیت اخیر تأثیر قابل توجهی در تفسیر نتایج به دست آمده از این مطالعه داشته باشد. در مجموع، عصاره گیاه شکرتیغال نمی تواند به عنوان جایگزین درمان‌های کنونی برای استئوآرتریت محسوب شود. در واقع این عصاره می‌تواند به عنوان یک



www.SID.ir

Arshive of SID



درمان مکمل جهت کاهش عوارض استفاده از دوزهای بالای استروئیدها و داروهای ضدالتهاب غیراستروئیدی، محسوب شود. مطالعات بیشتری برای اثبات اثرگذاری بالینی این عصاره در درمان بیماری استئوآرتریت موردنیاز است.

## منابع


**1.** Davatchi F, Jamshidi A-R, Banihashemi AT, Gholami J, Forouzanfar MH, Akhlaghi M, et al. WHO-ILAR COPCORD study (stage 1, urban study) in Iran. *The Journal of Rheumatol*. 2008; 35 (7): 1384-90.

**2.** Zhang Y and Jordan JM. Epidemiology of osteoarthritis. *Clinics in Geriatric Medicine* 2010; 26 (3): 355-69.

**3.** Wang X, Hunter D, Xu J and Ding C. Metabolic triggered inflammation in osteoarthritis. *Osteoarthritis and Cartilage* 2015; 23 (1): 22-30.

**4.** Goldring SR and Goldring MB. The role of cytokines in cartilage matrix degeneration in osteoarthritis. *Clinical Orthopaedics and Related Res*. 2004; 427: S27-S36.

**5.** Pillinger MH, Dinsell V, Apsel B, Tolani SN, Marjanovic N, Chan ES and et al. Regulation of metalloproteinases and NF-κB activation in rabbit synovial fibroblasts via E prostaglandins and Erk: contrasting effects of nabumetone and 6MNA. *British Journal of Pharmacol*. 2004; 142 (6): 973-82.

**6.** Harirforoosh S, Asghar W and Jamali F. Adverse effects of nonsteroidal antiinflammatory drugs: an update of gastrointestinal, cardiovascular and renal complications. *Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences* 2014; 16 (5): 821-47.

**7.** V M. A dictionary of Iranin plant, Names. Latin, English, Persian. Farhang Moaser. 1375.

**8.** Thorat M, Pawar B, Shelar P. Natural Indicators. *Current Pharma Res*. 2014; 4 (4): 1336.

**9.** Pranav V, Vinay J, Priya M, Sudhir B, Neha A, Love C and et al. Echinops echinatus Roxb.-A Nature's Drugstore: An overview. *American Journal of Pharm Res*. 2013; 3 (2).

**10.** Singh B, Gambhir S, Pandey V and Joshi V. Anti-inflammatory activity of Echinops echinatus. *Journal of Ethnopharmacol*. 1989; 25 (2): 189-99.

**11.** Horvath Z, Gyemant G, Danos B and Nanasi P. [Investigation of polysaccharides of Echinops species. Medicinal plant polysaccharides I]. *Acta Pharmaceutica Hungarica* 1998; 68 (4): 214-9.

**12.** Thirion S and Berenbaum F. Culture and phenotyping of chondrocytes in primary culture. Cartilage and osteoarthritis: Springer; 2004, pp: 1-14.

**13.** Amiri MS and Joharchi MR. Ethnobotanical investigation of traditional medicinal plants commercialized in the markets of Mashhad, Iran. *Avicenna Journal of Phytomedicine* 2013; 3 (3): 254-71.

**14.** Blom AB, van Lent PL, Holthuysen AE, van der Kraan PM, Roth J, van Rooijen N and et al. Synovial lining macrophages mediate osteophyte formation during experimental osteoarthritis. *Osteoarthritis and Cartilage* 2004; 12 (8): 627-35.

**15.** Benito MJ, Veale DJ, FitzGerald O, Van den Berg WB and Bresnihan B. Synovial tissue inflammation in early and late osteoarthritis. *Annals of the Rheumatic Diseases* 2005; 64 (9): 1263-7.

**16.** Goldring MB. The role of the chondrocyte in osteoarthritis. *Arthritis & Rheumatism* 2000; 43 (9): 1916-26.

**17.** Goldring MB. Chondrogenesis, chondrocyte differentiation, and articular cartilage metabolism in health and osteoarthritis. Therapeutic advances in musculoskeletal disease. 2012: 1759720X12448454.

**18.** Au RY, Al-Talib TK, Au AY, Phan PV and Frondoza CG. Avocado soybean unsaponifiables (ASU) suppress TNF-alpha, IL-1beta, COX-2, iNOS gene expression, and prostaglandin E2 and nitric oxide production in articular chondrocytes




www.SID.ir

Arshive of SID



and monocyte/macrophages. *Osteoarthritis Cartilage* 2007; 15 (11): 1249-55.

**19.** Aigner T, Kurz B, Fukui N and Sandell L. Roles of chondrocytes in the pathogenesis of osteoarthritis. *Current Opinion in Rheumatol*. 2002; 14 (5): 578-84.

**20.** Chan P-S, Caron JP and Orth MW. Effect of glucosamine and chondroitin sulfate on regulation of gene expression of proteolytic enzymes and their inhibitors in interleukin-1-challenged bovine articular cartilage explants. *American Journal of Veterinary Res*. 2005; 66 (11): 1870-6.

**21.** Chaipinyo K, Oakes BW and van Damme MPI. Effects of growth factors on cell proliferation and matrix synthesis of low-density, primary bovine chondrocytes cultured in collagen I gels. *J. Orthopaedic Res*. 2002; 20 (5): 1070-8.

**22.** Álvarez-Soria MA, Largo R, Santillana J, Sánchez-Pernaute O, Calvo E, Hernandez M and et al. 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. *Annals of the Rheumatic Diseases* 2006; 65 (8): 998-1005.

**23.** Brenner SS, Klotz U, Alscher DM, Mais A, Lauer G, Schweer H and et al. Osteoarthritis of the knee–clinical assessments and inflammatory markers. *Osteoarthritis and Cartilage* 2004; 12 (6): 469-75.

**24.** Chanput W, Mes JJ and Wichers HJ. THP-1 cell line: an in vitro cell model for immune modulation approach. *International Immunopharmacol*. 2014; 23 (1): 37-45.



www.SID.ir

Arshive of SID



# The Effect of Hydroalcoholic Extract of *Echinops cephalots* L. on Expression of Inflammatory Factors in Chondrocytes and THP-1 Cells as a Model of Monocyte/Macrophage and Human Cartilage Cells in Osteoarthritis

**Taherian M (M.Sc.)[1], Maghsoudi H (Ph.D.)[2*], Taherian R (M.D.)[3], Rastegar H (Ph.D.)[4]**

1- Food and Drug Research Institute, Iran Food and Drug Administration, Ministry of Health and Medical Education, Tehran, Iran
2- Department of Biotechnology, Payamenour University, Tehran, Iran
3- Student Research Committee, School of Medicine, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran
4- Cosmetic Products Research Center, Iran Food and Drug Administration, Ministry of Health and Medical Education, Tehran, Iran
*Corresponding author: Department of Biotechnology, Payamenour University, Tehran, Iran
Tel: +98 919-8318489
Email: hossein_m2002@yahoo.com

## Abstract

**Background: Osteoarthritis (OA) is one of the main causes of physical disability worldwide. Considering the complications of common treatments of OA, including non-steroidal anti-inflammatory drug (NSAIDs) and corticosteroids, establishment of new treatments is crucial.**

**Objective: This study aimed to explore the effect of *Echinops cephalotes* extract on the main inflammatory biomarkers in OA.**

**Methods: Hydroalcoholic extract of *Echinops cephalotes*, Ibuprofen and betamethasone were prepared to investigate their effects on inflammatory biomarkers. Human monocyte/macrophage (THP-1) cells and chondrocytes cells were used as a model of monocyte/macrophage and human cartilage cells in osteoarthritis. Lipopolysaccharide (LPS) was used to induce production of inflammatory cytokines in both cells. After RNA extraction and production of cDNA, RT_PCR & PCR were done. Then Real Time-PCR was used to investigate the amount of expression of proinflammatory genes.**

**Results: *Echinops cephalotes* extract reduced mRNA expression level of proinflammatory cytokines in the cells induced by LPS. Moreover, production of PGE2 and NO in in the LPS-induced THP-1 cells was reduced by this extract. Ibuprofen and betamethasone were more effective in reducing above inflammatory agents than the extract.**

**Conclusion: *Echinops cephalotes* extract can be used as a supplementary treatment option in osteoarthritis to reduce NSAIDs and corticosteroids dose in treatment of this disease.**

**Keywords: *Echinops cephalotes*, Chondrocyte, Cytokine, Monocyte/macrophage, Osteoarthritis**



www.SID.ir