فصلنامه علمی پژوهشی فیزیولوژی و تکوین جانوری
شماره پیاپی ۴۲، جلد ۱۱، شماره ۳، تابستان۹۷، صفحه ۴۱ تا ۵۳

الگوی بیان فاکتور نکروز تومور- آلفا(Tumor NecrosisFactor-α) تحت تاثیر عصاره هیدروالکلی زنجبیل(*Zingiber officinale*)

زینب صحرائیان
استادیار، دانشگاه ازاد اسلامی، واحد زنجان، مرکز تحقیقات بیولوژی، زنجان، ایران. **biosahraeian58@gmail.com**

تاریخ دریافت: ۹۶/۹/۳۰ تاریخ پذیرش:۹۷/۵/۲۰

چکیده

زمینه و هدف: دیابت به عنوان یک بیماری التهابی که با اختلالات متابولیسمی همراه است، شناخته می شود. فاکتور نکروز دهنده تومور آلفا(Tumor necrosis factor- Alpha, TNF-α) یکی از سایتوکاین های اصلی التهابی بوده و نقش مرکزی در دفاع میزبان، التهاب و عملکرد سیستم ایمنی دارد. مصرف گیاهان دارویی مختلف از جمله زنجبیل در جهت کاهش عوارض التهاب از گذشته‌های دور رایج بوده است. در این تحقیق به بررسی اثر غلظت های مختلف عصاره هیدروالکلی زنجبیل بر میزان بیان فاکتور نکروز تومور–آلفا در سلول های بنیادی مزانشیمی (Mesenchymal stem cells, MSCs)مشتق از مغز استخوان پرداخته شد.

روش کار: سلول های بنیادی مزانشیمی در گروه شاهد بدون دریافت عصاره زنجبیل و شش گروه تیمار با عصاره هیدروالکلی زنجبیل با غلظت های µg/ml ۱۰۰ و ۵۰ و در زمان های ۲، ۱۶و۲۴ ساعت مورد مطالعه قرار گرفتند. RNA از سلول ها ی شاهد و تیمار استخراج شده و پس از سنتز cDNA، میزان بیان ژن TNF-α به روش Real Time PCR مورد بررسی قرار گرفت. با استفاده از $^{-\Delta\Delta ct}$ ۲ میزان بیان ژن TNF-α سنجیده و نتایج با t-test مورد ارزیابی قرار گرفت.

یافته ها: نمونه های تیمار شده با عصاره زنجبیل با غلظت های µg/ml ۵۰ و ۱۰۰به مدت۱۶ و ۲۴ ساعت، برای ژن TNF-α کاهش معنی داری نشان دادند($p<۰/۰۵$). در سایر گروه های تیمار بیان معنی داری مشاهده نشد.

نتیجه گیری: با توجه به نتایج به دست آمده، این کاهش میزان بیان TNF-α ،نشان دهنده اثر دراز مدت این عصاره در مقایسه با اثر کوتاه مدت ۲ ساعته آن بوده است. بنابراین تاثیر زنجبیل بر میزان بیان ژن التهابی TNF-α وابسته به غلظت و زمان تیمار می باشد.

واژه های کلیدی: زنجبیل، فاکتور نکروز دهنده تومور آلفا، سلول های بنیادی مزانشیمی، دیابت.

مقدمه

دیابت مجموعه ای از ناهنجاری های متابولیکی است که در اثر اختلال ترشح انسولین، عملکرد انسولین یا هر دو ایجاد شده و منجر به افزایش قند خون می شود(۲). این بیماری، معضل در حال گسترش جوامع است که با افزایش مرگ و میر همراه می باشد. کنترل قند خون و افزایش حساسیت به انسولین سبب کاهش التهاب و اختلالات چربی های خون در بیماران دیابتی شده و از ابتلای این بیماران به عوارض دیابت پیشگیری می کند(۲۴،۲۸). کمبود و یا کاهش نسبی میزان انسولین در این بیماری با عوارض متابولیکی حاد نظیر اغمای هیپراسمولار و یا یک اختلال متابولیک مزمن و عوارض نامطلوب در دراز مدت نظیر ریتینوپاتی، گرفتگی عروق کلیوی، نوروپاتی، ضایعات پوستی، اختلالات سیستم قلب و گردش خون همراه می باشد. عوارض متابولیک دیابت قندی با هیپرگلیسمی و بروز اختلال در متابولیسم مواد غذایی شامل پروتئین ها، کربوهیدرات ها و لیپیدها مشخص می گردد. در سال‌های اخیر، علی رغم پیشرفت های فراوان در زمینه ترکیبات سنتزی دارویی هنوز بیماری های بسیاری، از جمله عفونت ها و ناراحتی های مزمن(دیابت) وجود دارند که

Archive of SID

www.SID.ir

به طور کامل قابل درمان نیستند. علاوه بر آن مصرف فرآورده های دارویی بسیاری که در درمان دیابت به کار می روند، دارای عوارض و مشکلاتی برای بیمار است. گیاهان دارویی و مشتقات آن ها از دیر باز در درمان دیابت و عوارض ناشی از آن(که مستقیماً با افزایش میزان بیان ژن های التهابی مرتبط می باشد) مطرح بوده اند. امروزه گرایش مجددی به مصرف گیاهان دارویی به خاطر کم بودن عوارض سوء جانبی و گوناگونی ترکیبات موثره موجود در آن ها به وجود آمده است. زنجبیل(*Zingiber officinale*) یکی از این گیاهان می-باشد. این گیاه در درمان گلودرد، سردردها، آرتریت، تب و درد ناشی از انواع سرماخوردگی ها و آنفلونزا استفاده می شود(۲۰، ۱۳، ۱۲). بیش از ۵۰ ترکیب مختلف در روغن فرار و معطر زنجبیل شناسایی شده است که اکثراً از نوع ترکیبات مونوترپنوئیدی و سزکویی ترپنوییدی می باشند. تندی زنجبیل تازه نیز به علت وجود برخی ترکیبات فنولی به نام جینجرول ها از جمله ۶-جینجرول است. فرم دهیدراته این ترکیبات مانند شوگاول ها نیز در زنجبیل خشک دیده می شود(۳). سایر ترکیبات موجود در زنجبیل شامل ۳-دی هیدرو شوگاول‌ها، پارادول ها، دی هیدرو پارادول ها، مشتقات استیله جینجرول ها، جینجردیول ها، مشتقات مونو و دی استیل جینجردیول ها، ۱-دهیدرو جینجردیون ها، دی آریل هپتانوئید ها، مشتقات متیل اتر ها، مشتقات فرولیک اسید، ترپن هایی مانند زیینجرون و زینجرول و غیره می-باشند(۳،۳۷). زنجبیل یک ماده ایمن شناخته شده است و سازمان غذا و داروی آمریکا آن را به عنوان یک مکمل غذایی در مرتبه Generally Recognized As (GRAS) Safe می داند(۳). سایتوکاین ها پروتئین های ترشح شده از سلول های ایمنی ذاتی و سازشی هستند که بسیاری از اعمال این سلول ها را میانجی گری می کنند، سایتوکاین‌هایی که در پاسخ به آنتی ژن ها و سایر میکروارگانیسم ها تولید می شوند، در ایجاد التهاب و ایمنی دخالت دارند. فاکتور نکروز دهنده تومور-آلفا(Tumor Necrosis Factor-Alfa ,TNF-α) یکی از سایتوکاین های اصلی التهابی بوده و نقش مرکزی در دفاع میزبان، التهاب و عملکرد سیستم ایمنی دارد که با پاتوژنز، توسعه و پیشرفت انواع عفونت ها، بیماری های خود ایمنی، بیماری های بدخیم و غیره ارتباط دارد(۲۹). محققین نشان داده اند که زنجبیل در بیماری های مزمن التهابی مؤثر است. ترکیبات آن مانند ۶-شوگائول و جینجرادیون با مهار سنتز NO در بلوکه کردن فعالیت ماکروفاژ و کاهش التهاب مزمن و حاد تاثیر دارند(۳۶). ۶-شوگائول تولید TNF-α, IL-1B, NO را در ماکروفاژها به طور معنی داری مهار می نماید(۲۲). هم-چنین مطالعات نشان دهنده ی کاهش سطوح بتا گلوکورونیداز و لاکتات دهیدروژناز توسط این ترکیب زنجبیل و اثرات قوی ضد التهابی آن می باشد(۳۴). زینجرول و جینجرول-۱۰ از ترکیبات مهم زنجبیل می-باشند که از طریق افزایش بیان PPARs (Peroxisome proliferator-activated receptors) و مهار فاکتور ترجمه پیش التهابی(NF-κB) دارای اثرات ضد التهابی می باشد(۲۱، ۸). یکی از ویژگی های التهاب افزایش اکسیداسیون آراشیدونیک اسید، تولید پروستاگلاندین و لوکوترین ها است. زنجبیل سبب مهار سنتز پروستاگلاندین از طریق مهار سیکلو اکسیژناز ۱ و ۲ می‌گردد. هم‌چنین عصاره این گیاه منجر به مهار تولید لوکوترین ها از طریق مهار لیپواکسیژناز ۵ می شود(۱۲). سلول های بنیادی مزانشیمی Mesenchymal Stem (Cells, MSC_s) به عنوان یک منبع مهم سلول های بنیادی بالغ کاربرد فراوانی در مهندسی بافت و سلول درمانی پیدا کرده اند(۱۰). توان سلول های بنیادی مزانشیمی در تکثیر و تمایز به بافت های مختلف سبب شده که منبع مناسبی برای آزمایشات بالینی سلول درمانی

Archive of SID

www.SID.ir

و هم چنین استفاده در ترمیم و بازسازی انواع رده های سلولی به حساب آیند(۶). این سلول ها به محل التهاب مهاجرت کرده و تأثیر ایمونومدولاتوری خود را القا می-کنند. استفاده از این سلول ها به عنوان ابزار تشخیص ضایعات، قابلیت تشریح برخی فاکتورهای رشد و سایتوکاین ها، بیان برخی ژن ها پس از مهندسی ژنتیک، در کنار استحصال و تزاید نسبتاً آسان این سلول ها بر جذابیت MSC_s افزوده است. دانشمندان بر این عقیده اند که پیوند MSC_s دستاورد جدیدی برای درمان بیماری-هایی است که با روش های درمانی کنونی قابل درمان نیستند(۵). در این تحقیق تأثیرعصاره هیدروالکلی گیاه زنجبیل در تغییر احتمالی بیان ژن فاکتور نکروز دهنده تومور آلفا در سلول های بنیادی مزانشیمی مشتق از مغز استخوان انسان مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش ها

کشت سلول های بنیادی مزانشیمی

سلول های بنیادی مزانشیمی مشتق از مغز استخوان انسان از مرکز کشت سلول های بنیادی پژوهشگاه رویان خریداری شد. این سلول ها مراحل اولیه کشت خود را سپری کرده و در پاساژ دوم با تراکم ۷۰٪ بودند. ادامه مراحل کشت تا پاساژ ششم در آزمایشگاه تحقیقاتی بیولوژی انجام شد. به سلول ها محیط کشت DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) حاوی ۱۰٪ سرم جنینی گاوی(Fetal bovine serum) FBS یک درصد ال- گلوتامین و یک درصد آنتی بیوتیک استرپتومایسین-پنی سیلین اضافه شد و در فلاسک T_{25} به طور یکنواخت کشت و در داخل انکوباتور(دمای۳۷ درجه سانتی گراد و ۵ درصد دی اکسید کربن) قرار داده شد. سلول ها با خاصیت چسبندگی خود به کف ظرف چسبیدند. در مراحل بعدی هر از۴ -۳روز با محلول شستشو(Phosphate buffered saline) PBS شستشو و سپس تعویض محیط کشت انجام شد. با رسیدن سلول ها به تراکم ۸۰-۷۰ درصد، پاساژ سلولی انجام گرفت. برای انجام پاساژ سلولی، پس از دور ریختن محیط کشت روی سلول ها و شستشوی آن ها با محلول شستشو، تریپسین روی سطح سلول ها ریخته شد. بعد از طی مدت کوتاهی در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد، با گرد و جدا شدن سلول‌ها از کف ظرف، سلول ها جمع آوری و به فلاسک‌های جدید حاوی محیط کشت تازه منتقل شدند.

تیمار سلول های بنیادی مزانشیمی

عصاره خالص هیدروالکلی زنجبیل از پژوهشکده گیاهان دارویی جهاد دانشگاهی خریداری و با کمک محیط کشت DMEM غلظت های مختلف ۵۰ و ۱۰۰ میکروگرم بر میلی لیترتهیه شد. سلول های بنیادی مزانشیمی پاساژ ششم تحت تأثیر محیط کشت حاوی عصاره زنجبیل با غلظت های µg/ml ۵۰ و µg/ml ۱۰۰ در مدت زمان های مختلف ۲، ۱۶ و ۲۴ ساعت(علت استفاده از این غلظت ها بررسی تحقیقات قبلی جهت استفاده از غلظت های غیر سمی و زمان هایی با حداکثر تاثیر احتمالی می باشد.) قرار گرفتند(۳۰، ۱۶). پس از گذشت این زمان ها، سلول ها از کف ظروف کشت جمع آوری گردید. برای آنالیز مولکولی جهت تعیین میزان بیان ژن TNF-α از تکنیکReal Time-PCR استفاده شد. میزان بیان ژن TNF-α در MSCs مشتق از مغز استخوان انسان تیمار نشده و تیمار شده با عصاره زنجبیل با یک‌دیگر مقایسه شدند. هم‌چنین میزان بیان این ژن در گروه های مختلف سلولی که تحت تیمار با عصاره زنجبیل در زمان‌های متفاوت قرار گرفته بودند، مورد بررسی و مقایسه قرار گرفت. شمارش سلولی با کمک لام نئوبار انجام گرفت که مشخص شد به طور میانگین ۱۳×۱۰^{۴} سلول در هر ml ۱ از سوسپانسیون سلولی وجود دارند.

بررسی میزان بیان ژن TNF–α

استخراج mRNA و سنتز cDNA

Archive of SID

www.SID.ir

بررسی سطوح بیان ژن TNF–α در سلول های بنیادی مزانشیمی تیمار نشده و تیمار شده با عصاره زنجبیل انجام گرفت. ابتدا محیط کشت هر فلاسک مورد نظر پس از گذشت زمان معین شده دور ریخته و سپس سلول ها با ۲ ml از PBS^-، دو بار شستشو داده شد. سلول ها تریپسینه و انکوبه گردیده و با ضربات متوالی به کنار فلاسک، سلول ها از کف فلاسک جدا شدند. پس از آن سلول-های جدا شده با پیپت، جمع آوری و در یک فالکون ml ۱۵ ریخته شدند. فالکون حاوی سلول به مدت ۵ دقیقه با دور rpm ۱۲۰۰ سانتریفیوژ گردید. محلول رویی را دور ریخته و مجدداً ml ۱ محلول شستشوی PBS^- به رسوب سلولی اضافه و با عمل سمپلینگ، رسوب به داخل میکروتیوپ منتقل شد. جهت استخراج RNA کل، از دستورالعمل شرکت سیناژن استفاده شد. برای این منظور ۱ml از محلول RNX-Plus، به صورت نیمه منجمد به یک میکروتیوپ ml ۲ حاوی نمونه همگن شده اضافه شد. سپس به مدت ۵ الی ۱۰ ثانیه ورتکس شده و در دمای اتاق به مدت ۵ دقیقه انکوبه گردید. µl ۲۰۰ کلروفرم به آن اضافه و به مدت ۱۵ ثانیه مخلوط شد. مخلوط حاصل بر روی یخ به مدت ۵ دقیقه قرار گرفت. در دمای ۴ درجه سانتی گراد با دور rpm ۱۲۰۰۰ و به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ شد. فاز آبی به دست آمده به یک میکروتیوپ ml ۱/۵ انتقال داده و هم حجم فاز آبی به آن ایزوپروپانول اضافه گردید. به آرامی با سر و ته کردن میکروتیوپ آن را مخلوط کرده و روی یخ به مدت ۱۵ دقیقه انکوباسیون صورت پذیرفت. مخلوط در دمای ۴ درجه سانتی گراد با دور rpm ۱۲۰۰۰ و به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ شد. فاز رویی را دور ریخته وبه رسوب ml ۱ اتانول ٪۷۵ اضافه و پس از آن در دمای ۴ درجه سانتی گراد با دور rpm ۷۵۰۰ و به مدت ۸ دقیقه سانتریفیوژ گردید. محلول رویی را دور ریخته و رسوب به مدت اندک جهت خشک شدن به دمای اتاق انتقال داده شد. رسوب حاصله در µl ۵۰ از DEPC treated water حل گردید. جهت کمک به حل شدن رسوب، میکروتیوپ در دستگاهی به نام Dry Plate Incubator به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۵۵–۶۰ درجه سانتی گراد قرار داده شد. پس از استخراج RNA، مرحله cDNA سازی جهت فرآیند Real Time PCR می باشد. کیت cDNA سازی از شرکت تاکارا(امینسان) خریداری گردید. ابتدا مواد موجود در جدول ۱ بر روی یخ به مقدار لازم برای هر نمونه در یک میکروتیوپ مخلوط و در دستگاه ترموسایکلر انکوبه شد.

جدول ۱- مقادیر مواد مورد نیاز جهت سنتز cDNA

مواد واکنش	مقدار	غلظت نهایی
5X primescript Buffer	۲µl	1X
Primescript RT Enzyme Mix I	۰/۵µl	
Oligo dT Primer (50 µM)	۰/۵µl	25Pmol
Random 6 mers (100 µM)	۰/۵µl	50Pmol
total RNA (0/5 µg)	۲µl	
RNase Free dH2O	٤µl	
Total	۱۰µl	

برای طراحی پرایمر توالی ژن از سایت NCBI دریافت و به وسیله نرم افزار آنلاین primer3 و Design primer در سایت NCBI پرایمرها مشخص گردید. هم-چنین با کمک سایت ensemble مکان اگزون ها و اینترون ها مشخص و جفت پرایمری را که قسمتی از اینترون های ژن را در بردارد با استفاده از بخش primer-blast در سایت NCBI انتخاب شد. پس از طراحی پرایمرها جهت اطمینان از صحت عملکرد از جمله نقطه ذوب، میزان سیتوزین و گوانین، ΔG و امکان تشکیل لوپ و دایمر–پرایمر، آن ها را از طریق نرم افزار

Archive of SID

www.SID.ir

Oligo7 بررسی گردید. پرایمرهای طراحی شده از شرکت سیناکلون دریافت شد. توالی پرایمرهای به کار برده شده در جدول ۲ آورده شده است. برای انجام این تکنیک از کیت Real Q plus 2X Master mix Green استفاده شد. تمامی موارد مورد نیاز برای واکنش اعم از dNTP، MgCl2، آنزیم تک پلی مراز، سایبرگرین، پرایمر و cDNA می باشد که طبق دستورالعمل جدول ۳ انجام شد. هم چنین برنامه دمایی ۳ مرحله ای را مطابق جدول ۴ اجرا گردید.

جدول ۲- مشخصات پرایمرهای جلوبرنده و معکوس بتا اکتین و فاکتور نکروز تومورآلفا

نام پرایمر	سکانس	تعداد (bp)
β-act F.	TTCCTTCCTGGGCATGGAGT	۲۰
β-act R.	TACAGGTCTTTGCGGATGTC	۲۰
TNF-α F.	GTAGCCCATGTTGTAGCAAACC	۲۲
TNF-α R.	TTATCTCTCAGCTCCACGCCATT	۲۲

جدول ۳- مقادیر مورد نیاز مواد در واکنش Real Time PCR

ترکیبات	حجم بر اساس هر واکنش	غلظت نهایی
Real Q plus 2X Master mix	۱۲/۵µl	1X
Primer A	۰/۵ µl(۰/۲۵-۲/۵ µl)	۰/۱ µM(۰/۰۵ -۰/۵µM)
Primer B	۰/۵ µl (۰/۲۵-۲/۵ µl)	۰/۱ µM(۰/۰۵ -۰/۵µM)
PCR grand H2O	X µl	
cDNA	X µl	

جدول ٤- برنامه دمایی ۳ مرحله ای جهت انجامReal Time PCR

Temperature	Duration of cycle	Cycle
۹۵˚C	۱۵min	۱
۹۵˚C	۱۳-۱۵s	۴۰
۵۵-۶۰˚C	۳۰s	
۷۲˚C	۳۰s	

تحلیل آماری

پس از مشخص شدن Ctها، داده ها در برنامه Rest و Excel وارد و سپس ΔCt و ΔΔCt برای نمونه ها با استفاده از فرمول زیر محاسبه گردید.

ΔCt= Ct sample - Ct house keeping gene
ΔCt= Ct TNF-α - Ct β-actin
ΔΔCt= ΔCt sample - ΔCt control

و سپس از رابطه $^{-\Delta\Delta Ct}$ ۲ تغییرات میزان بیان ژن مشخص و برای مقایسه میانگین متغیرهای کمی قبل و بعد از مداخله، در داخل هر گروه از آزمون t زوج استفاده شد. میانگین $2^{-\Delta\Delta Ct}$، انحراف معیار و P-value برای گروه های تیمار محاسبه گردید تا معنی دار بودن یا نبودن تاثیر عصاره زنجبیل بر نمونه ها بررسی شود.

نتایج

نتایج مربوط به کشت سلول ها

پس از کشت اولیه، سلول های بنیادی مزانشیمی به صورت تک لایه ای از سلول های دوکی شکل، کف ظرف را پوشاندند. با مشاهدات میکروسکوپی، ملاحظه شد که به طور فزاینده ای بر تعداد سلول های چسبنده افزوده می شود. این سلول ها در طی دوره رشد، ریخت-شناسی فیبروبلاستی خود را حفظ نمودند(شکل ۱).

نتایج مولکولی مربوط به بیان ژن TNF-α

برای بررسی بیان ژن TNF-α توسط Real-time PCR از روش کمیت سنجی نسبی و متد استفاده شد. نتایج آنالیز مولکولی نشان داد که بیان ژن TNF-α در MSCs مشتق از مغز استخوان انسان در گروه های تیمار نشده و تیمار شده با TNF–α با یک‌دیگر متفاوت بودند.

Archive of SID

www.SID.ir

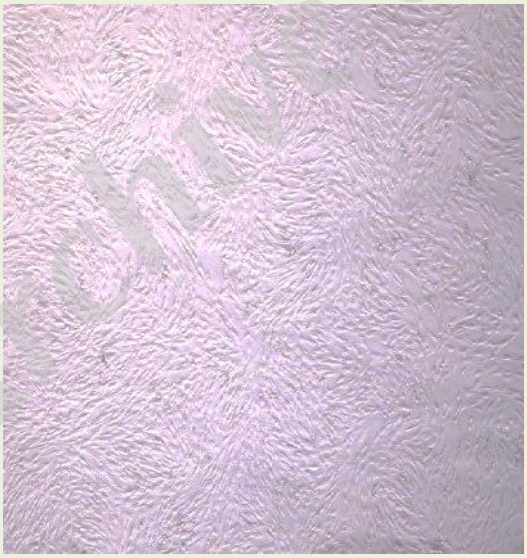
در اکثر گروه ها میزان بیان ژن در گروه های تیمار شده به طور معنی داری کمتر می باشند. نتایج حاصل از نمودار **melt curve** در نمودار ۱ نشان داده شده است.

آنالیز بیان ژن TNF-α **در غلظت** μgml^{-1} **۵۰ در سه بازه زمانی ۲، ۱۶ و ۲۴ ساعت**

نتایج به دست آمده نشان دهنده این مطلب بود که در زمان ۱۶ و ۲ ساعت پس از تیمار سلول ها با عصاره زنجبیل، میزان بیان ژن TNF-α تغییر معنی داری نشان نمی دهد اما پس از گذشت ۲۴ ساعت کاهش بیان ژن TNF-α معنی دار($P\leq ۰/۰۵$) خواهد بود. بنابراین در بازه-های زمانی صورت گرفته، زمان موثر زنجبیل برای کاهش بیان ژن TNF-α در غلظت ۵۰ میکروگرم بر میلی لیتر زمان ۲۴ ساعت بوده است که بیشترین کاهش بیان را نشان می دهد(نمودار۲ و جدول ۵).

آنالیز بیان ژن TNF-α **در غلظت** μgml^{-1} **۱۰۰ در سه بازه زمانی ۲، ۱۶ و ۲۴ ساعت**

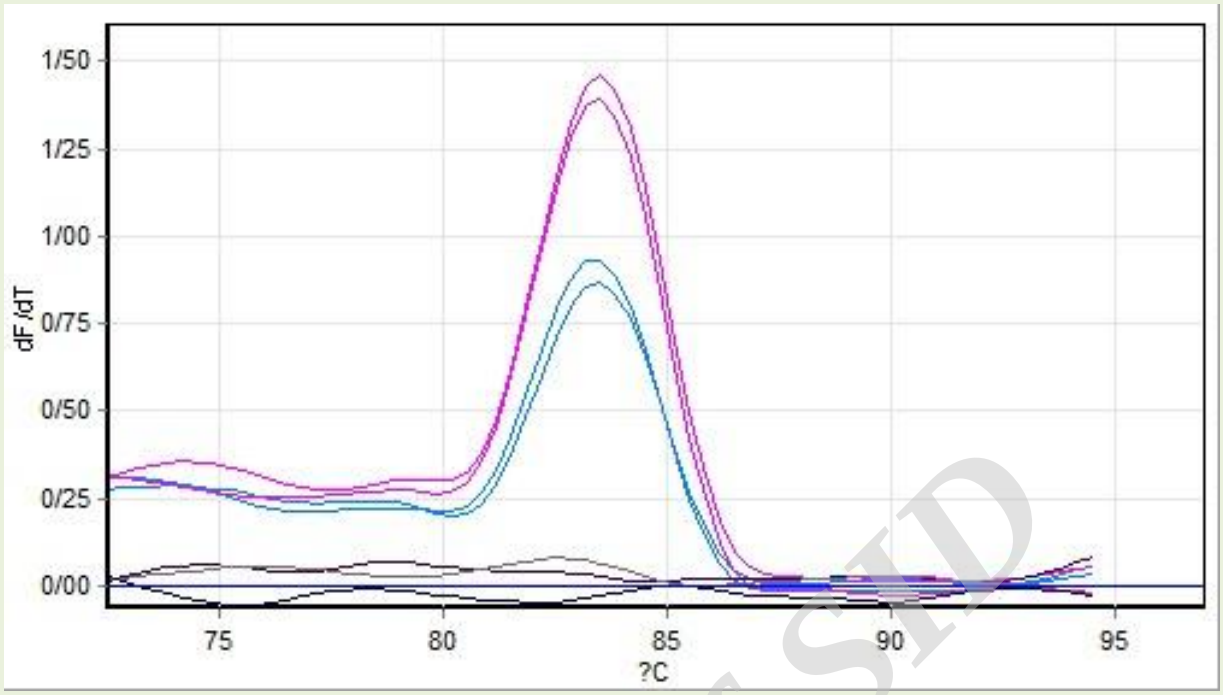
نتایج به دست آمده حاکی از آن است که ۲ ساعت پس از تیمار کاهش معنی دار بیان ژن مشاهده شد و پس از گذشت ۱۶ و ۲۴ ساعت کاهش بیان ژن TNF-α شدیدتر و معنی دار ($P\leq ۰/۰۵$) خواهد بود(نمودار ۳). در مقایسه ای که بین غلظت های ۵۰ و ۱۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر در هر سه زمان ۲، ۱۶و ۲۴ ساعته صورت گرفت، مشخص شد که به جز گروه هایی با ۲ و۱۶ ساعت تیمار با غلظت های ۵۰ میکروگرم بر میلی لیترکه افزایش بی معنی میزان بیان ژن TNF-α مشاهده شد، در سایر گروه های تیمار کاهش معنی دار میزان بیان ژن TNF-α مشاهده گردید. هم چنین گروه هایی با ۱۶ و ۲۴ ساعت تیمار باغلظت ۱۰۰ میکروگرم بر میلی لیترعصاره زنجبیل بهترین زمان و غلظت تاثیر بین گروه های فوق را دارا است(نمودار ۴). نتایج حاکی از تاثیر وابسته به غلظت و زمان عصاره زنجبیل بر میزان بیان ژن TNF-α می باشد.



شکل ۱- سلول های بنیادی مزانشیمی مشتق از مغز استخوان انسانی با تراکم ۷۰٪. پاساژ ششم. با بزرگنمایی ×۴

Archive of SID

www.SID.ir



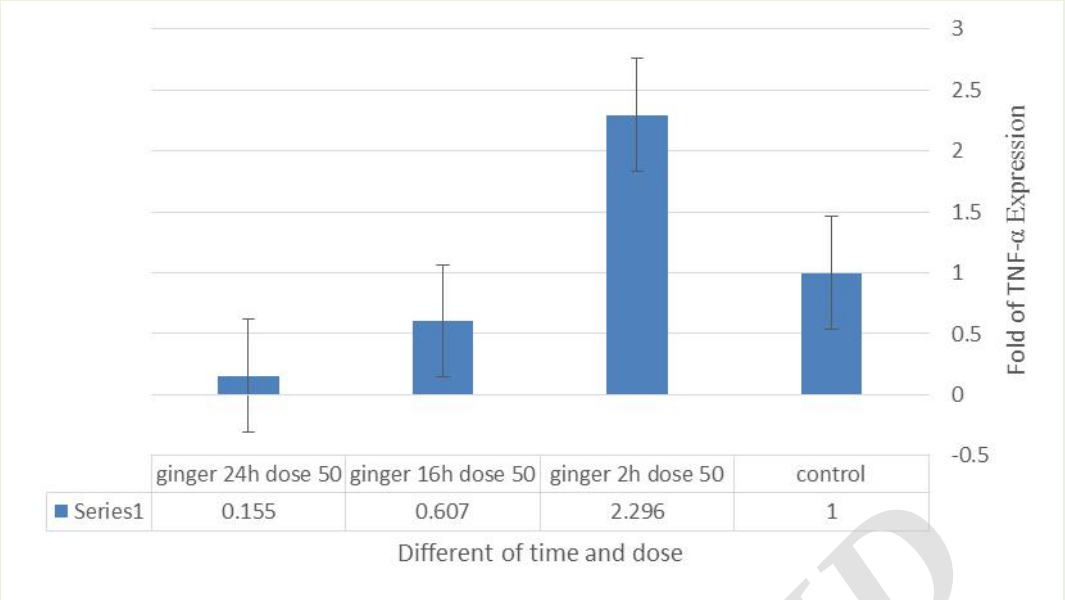
نمودار ۱- نمودار melt curve تکثیر قطعه ۱۰۱ bp ژن TNF-α با پرایمرهای اختصاصی

جدول۵- نتایج به دست آمده از آنالیز بیان ژن TNF-α در غلظت μgml^{-1} ۵۰ و μgml^{-1} ۱۰۰

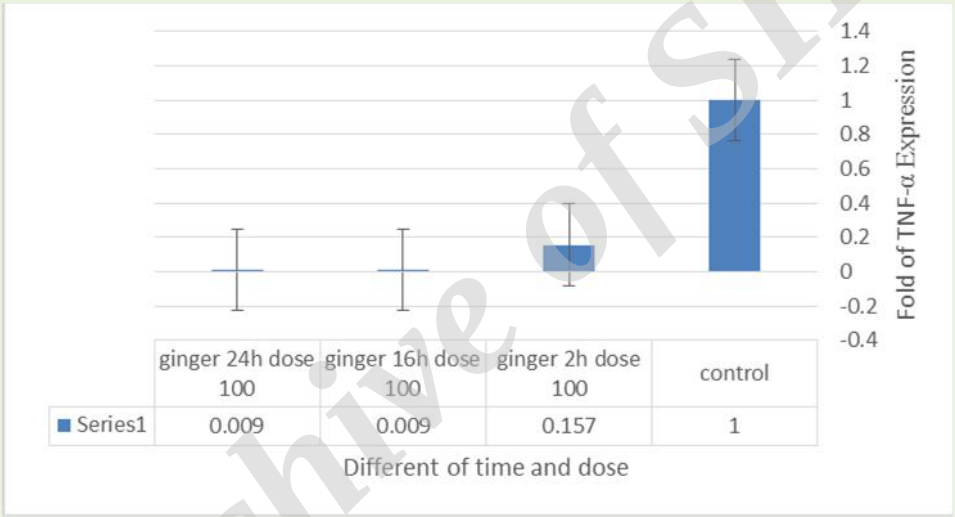
گروه	میانگین±انحراف از معیار	
کنترل	۱±۰/۰	**Ctrl**
ginger 2h dose 50	۲/۲۹۶ ±۰/۱۶۹	عدم تغییرمعنی دار **G1**
ginger 2h dose 100	۰/۱۵۷±۰/۰۳۳	کاهش معنی دار **G2**
ginger 24h dose 50	۰/۱۵۵±۰/۰۱	کاهش معنی دار **G3**
ginger 24h dose 100	۰/۰۰۹±۰/۰۰	کاهش معنی دار **G4**
ginger 16h dose 50	۰/۶۰۷±۰/۱۸۸	عدم تغییرمعنی دار **G5**
ginger 16h dose 100	۰/۰۰۹±۰/۰۰	کاهش معنی دار **G6**

Archive of SID

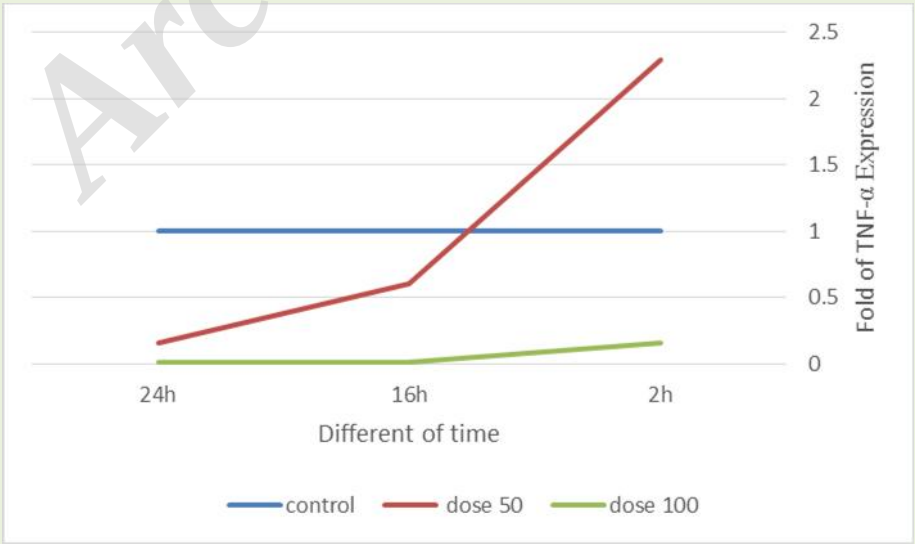
www.SID.ir



نمودار ۲- نمودار ستونی میزان بیان ژن TNF-α در غلظت $\mu g ml^{-1}$ ۵۰ از عصاره زنجبیل بعد از ۲، ۱۶ و ۲۴ ساعت.



نمودار۳ – نمودار ستونی میزان بیان ژن TNF-α در غلظت $\mu g ml^{-1}$ ۱۰۰ از عصاره زنجبیل بعد از ۲، ۱۶ و ۲۴ ساعت



نمودار ٤- نمودار خطی مقایسه تاثیر غلظت های $\mu g ml^{-1}$ ۱۰۰ و ۵۰ عصاره زنجبیل بر روی بیان ژن TNF-α در سلول های بنیادی مزانشیمی مشتق از مغز استخوان انسان

Archive of SID

www.SID.ir

بحث ونتیجه گیری

علارغم وجود داروهای شیمیایی فراوان در جهت درمان التهاب، هم چنان مشکل عدم توانایی موفق درمان التهاب به خصوص نوع مزمن آن و اثرات جانبی گسترده داروهای سنتزی وجود دارد. با توجه به مشکلات بالینی ناشی از التهاب، سعی محققین بر آن است که روش های درمانی جدید، بهتر، موثرتر و با عوارض جانبی محدودتر استفاده شود. مواد موثره موجود در زنجبیل با اثرات ضد موتاژنیک، ضد کارسینوژنیک، ضد التهابی و آنتی اکسیدانی خود می تواند در درمان بیماری های التهابی و مرتبط با سن نظیر بیماری های قلبی عروقی، دیابت، آرتریت، استئوپورز و سرطان ها وغیره موثر باشد(۱۸). تحقیقات نشان می دهند که عصاره گیاه زنجبیل احتمالاً از طریق مهار آزاد سازی واسطه های التهابی محیطی توانسته است میزان التهاب را کاهش دهد. ماده جینجرول به عنوان ترکیب موثره گیاه زنجبیل دارای توانایی قوی در مهار تولید پروستاگلاندین ها، لکوترین ها و کنین به عنوان مهم ترین واسطه ی التهابی می باشد. علاوه بر این ها مهار آزادسازی انواع سیتوکین، TNF و اینترلوکین یک بتا که جزو واسطه-های مهم التهابی می باشند توسط عصاره گیاه زنجبیل گزارش شده و نشان داده که کاهش فاکتور هسته ای کاپابی به عنوان ماده القاء شده در فرآیندهای التهابی به وسیله اینترلوکین ها، توسط آنزیم فسفاتاز کیناز موجود در گیاه کاهش و سبب مهار التهاب می گردد(۱۹). باتوجه به نتایج تحقیقات قبلی، عصاره زنجبیل قادر است التهاب را مهار کند که احتمالاً این اثر ضد التهابی عصاره از طریق مهار سیکلواکسیژنازها به خصوص سیکلواکسیژناز - ۲ و پروستاگلاندین E_2 در سیستم عصب مرکزی گردیده است(۹). هم چنین زنجبیل دارای ترکیبات فیتوشیمیایی مهمی چون فلاونوییدها می باشد که دارای اثرات ضدالتهابی دارند(۳۲). موادی مانند quercetin, rutin, catechinepicatechin, naringenin, kaempfero از جمله ترکیبات فلاونوئیدی موجود در زنجبیل می باشند(۱۱). چنان چه فلاونوییدها با مهار فعالیت گیرنده N–متیل–D–آسپارتات، سبب کاهش کلسیم داخل سلولی می گردند و به دنبال آن فعالیت آنزیم سنتزکننده نیتریک اکساید و فسفولیپاز A_2 وابسته به کلسیم را کاهش می دهند. در نتیجه با کاهش نیتریک اکساید و پروستاگلاندین ها، به ویژه پروستاگلاندین E_2 و $F_2\alpha$، اثرات ضد دردی و ضد التهابی خود را نشان می-دهند(۹). هم چنین گزارش شده است که تاثیرات ضد التهابی فلاونوئیدها ناشی از مهار سیتوکین های التهابی نظیر فاکتور نکروز دهنده تومور که از ماکروفاژهای فعال در التهاب ترشح می شوند و سبب افزایش پروتاگلاندین‌ها می گردند، می باشد(۳۲). برخی از فلاونوئیدها نیز از طریق مهار کاتکول O–متیل ترانسفراز و حفظ کاتکول آمین ها خواص آنتی اکسیدانی و ضدالتهابی خود را اعمال می کنند(۳۸). سایر ترکیبات زنجبیل از جمله شوگائول نیز دارای اثرات فارماکولوژیک مشابه با داروهای غیراستروئیدی ضدالتهابی(NSAIDS, Nonsteroidal anti-inflammatory drugs) هستند و سبب مهار متابولیسم آراشیدونیک اسید و در نهایت سنتز پروستاگلاندین می-شوند و بنابراین به عنوان یک عامل ضدالتهابی موثرتر از داروهای ضدالتهابی مرسوم و با اثرات جانبی کمتر عمل می کنند(۷). ۶ شوگائول دارای اثرات ضددردی از طریق مهار آزادسازی ماده P است. به نظر می‌رسد که ۶ شوگائول با آبشار آراشیدونیک التهاب مداخله می کند و منجر به مهار سیکلواکسیژناز و جلوگیری از آزادسازی پروستاگلاندین می شود. هم-چنین زنجبیل در درمان التهاب و روماتیسم مؤثر است که این را از طریق مهار سنتز لوکوترین و پروستاگلاندین انجام می دهد(۱۲). عصاره زنجبیل سبب مهار بیان ژن-های متعدد درگیر در پاسخ های التهابی می گردد که

Archive of SID

www.SID.ir

این شامل ژن های کدکننده سیتوکینین، کیموکینین و آنزیم سیکلواکسیژناز۲ است(۳۱، ۱). در مطالعه Levy و Simon مشخص گردید که ۶ -شوگائول(ترکیب فعال زنجبیل خشک شده)، می تواند میزان TNF-α در ماکروفاژهای فعال شده با لیپوپلی ساکارید را کاهش دهد(۲۲). تحقیقات نشان می دهند که زنجبیل از طریق مهار فعالیت فاکتور هسته ای کاپا(NF-κB)، سطوح TNF-α و IL -6 را در التهاب کبد کاهش دهد و باعث کاهش سیتوکین ها و مارکرهای التهابی کبد گردد(۲۳). هم چنین نشان داده شده که جینجرول دارای اثر محافظتی بر روی نفرون ها با کاهش فرآیند التهاب می باشد، به طوری که باعث کاهش معنی دار در mRNA و رونویسی فاکتور نکروز دهنده تومور آلفا، اینترلوکین-۲ و اینترفرون گاما می گردد(۳۳). در این تحقیق نیز مشابه نتایج ما تاثیرات وابسته به غلظت مشاهده شد. در تحقیق دیگری Shim از زنجبیل با غلظت μgml^{-1} ۱۰۰ بر روی سلول های عصبی استفاده نمود، که نتایج نشان دهنده ی مهار سیتوکین های پیش التهابی و کاهش سطوح iNOS(Inducible nitric oxcide synthase)، سیکلواکسیژناز-۲(COX2)، NF-κB و بهبود عملکرد نورولوژیکی می باشد(۳۵). ۶-هیدروجینجردیون نیز که یکی از اجزاء مهم زنجبیل می باشد قادر است سنتز iNOS، COX2، IL-1B، TNF-α و IL-6 ماکروفاژهای موش را به واسطه LPS(Lipo poly saccarides) کاهش دهد(۱۴). مطالعات بالینی تاثیر زنجبیل بر بیماران دیابتی نیز نشان می دهد که زنجبیل با کاهش خطرات عوارض مزمن ناشی از دیابت از طریق کاهش التهاب(کاهش بیان TNF-α، IL-6 و CRP (C-reactive protein) مؤثر است(۲۵، ۲۴، ۴). هم چنین نشان داده شده است که جینجرول-۲ و شوگائول-۳ موجود در زنجبیل قادرند به عنوان مهار کننده های رسپتور های سوتونین عمل کنند(۱۷) و منجر به محدود شدن آزادسازی ماده P گردند که واسطه التهابی و درد محسوب می شود. در ضمن مهار گیرنده سروتونین همراه با کاهش پروستاگلاندین ها IL-1، IL-2، IL-6 و TNF-α می-باشد(۲۷). نکته جالب آن است که زنجبیل بیان ژن های ضد التهابی نظیر IL-10 را نیز افزایش می دهد(۲۶). هم چنین عصاره زنجبیل سنتز سیتوکین های التهابی و کموکین های التهابی را در ماکروفاژهای تحریک شده مهار می کند و با تنظیم کاهشی ماکروفاژهای ارایه کننده آنتی ژن ها و مهار فعالیت آن ها باعث کاهش رشد سلول‌های T می گردد(۱۷). به نظر می رسد تأثیر زنجبیل بر کاهش التهاب از طریق تأثیر برخی ترکیبات فعال آن(جینجرول ها و زرومبون) برمهار فاکتور هسته ای κB(NF-κB) و TNF-α نیز می باشد. ترکیبات موجود در زنجبیل سبب مهار بیان NF-κB و TNF-α می شوند. مهار ژن TNF-α به وسیله زنجبیل، سبب کاهش فعالیت NF-κB شده در نتیجه سایر مسیرهای التهابی مانند آنزیم سیکلواکسیژناز۲(COX2) و محصولات ناشی از آن مانند پروستاگلاندین E2 نیز مهار می گردند. این امر باعث کاهش التهاب و عوارض آن در بدن می شود(۱۵) که با نتایج پژوهش حاضر(در مورد کاهش TNF-α که به صورت In vitro صورت پذیرفت) نیز هم-خوانی دارد. در این تحقیق و برخی مطالعات پیشین نشان داده شده که داروی گیاهی زنجبیل می تواند در کاهش فاکتورهای التهابی مؤثر باشد. پس می توان بیان نمود که زنجبیل می تواند به عنوان یک داروی گیاهی با عوارض بسیار محدود در کاهش التهاب بیماران دیابتی موثر باشد. اگر چه از نظر طب سنتی مصرف زنجبیل سابقه طولانی دارد ولی از جنبه بالینی، تاکنون مطالعات بسیار محدودی در زمینه ارزش درمانی زنجبیل تداخلات دارویی و عوارض احتمالی آن انجام گرفته است. بنابراین لزوم تحقیقات بیشتر در زمینه روشن شدن این موارد در پژوهش های آتی ضروری به نظر می رسد.

Archive of SID

www.SID.ir

منابع

1. Aimbire, F., Penna, S.C., Rodrigues, M., Rodrigues, K.C., Lopes – Martins, R. AB., Sertie, JAA. (2007). Effects of hydro alcoholic extract of *Zingiber officinalis* rhizomes on LPS induced rat airway hyper reactivity and lung inflammation. Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids, 77; 129 – 138.

2.Alberti, K., Aschner, P., Assal, JP., Bennett, P., Groop, L. (2008). Dyslipidaemia in diabetic rats. J Ethnopharmacol Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. Diabetes Care, 31(1); S55-60.

3.Ali, BH., Blunden, G., Tanira, MO., Nemmar, A. (2008). Some phytochemical, pharmacological and toxicological properties of ginger. A review of recent research. Food and chemical Toxicology, 46(2); 409-20.

4.Aryaeian, N., Arablou, T., Valizadeh, M., Sharifi, F., Fatemeh Hosseini, A., Djalali ,M. (2014). .The effect of ginger consumption on glycemic status, lipid profile and some inflammatory markers in patients with type 2 diabetes mellitus. International Journal of Nutrition and Food sciences, 65(4); 515-520.

5.Barzkar, Z. (2015). An applied research in properties and clinical application of bone marrow messnchymal stem cells. Jound of Fasa University of Medical Sciences, 5(2); 306-322.

6.Bianco, P., Robey, P.G., Simmons, P.J. (2008). Mesenchymal stem cells: Revisiting history, concepts, and assays. Cell Stem Cell, 2; 313-319.

7.Charlier, C., Michaux, C., Dual, A. (2005). Inhibition of cyclooxygenase-2 effects of ginger aqueous extract and its phenolic constituents are mediated through multiple pathways. Vascular Pharmacology, 43; 234–241.

8.Chung, SW., Kim, MK., Chung, JH., Kim, DH., Choi, JS., Anton, S. (2009). Peroxisome pro liferator activated receptor activation by a short-term feeding of zingerone in aged rats. Journal of medicinal food, 12(2); 345-50.

9.Dickenson, AH. (1994). Neuro physiology of opioid poorly responsive pain. Cancer Surv, 21; 5-16.

10. Eini, L. (2014). Expression of indoleamine 2 3-dioxygenase in endometrial mesenchymal stem cells treated with gamima interferon. Iranian Journal of Diabetes and Metabolism,13(2); 153-162.

11. Ghasemzadeh, A., Jaafar, HZ., Rahmat, A. (2010). Identification and concentration of some flavonoid components in malaysian young ginger(*Zingiber officinale*) varieties by a high performance liquid chromatography method. Molecules, 15; 6231-6243

12. Grzanna, R., Lindmark, L., Frondoza, CG. (2005). Ginger-an herbal medicinal product with broad anti-inflammatory actions. J Med Food, 8(2); 125-32.

13. Grzanna, R., Phan, P., Polotsky, A., Lindmark, L., Frondoza, CG. (2004). Ginger extract inhibits β-amyloid peptide-induced cytokine and chemokine expression in cultured thp-1 monocytes. J Altern Complement Med, 10(6); 1009-1013.

14. Guahk, GH., Ha, SK., Jung, HS., Kang, C., Kim, CH., Kim, YB. (2010). *Zingiber officinale* protects HaCaT cells and C57BL/6 mice from ultraviolet B-induced inflammation. Journal of medicinal food, 13(3); 673-80.

15. Habib, SHM., Makpol, S., Hamid, NAA., Das, S., Ngah, WZW., YusofI, YAM. (2008). Ginger extract(*Zingiber Officinale*) has anti-cancer and anti-inflammatory effects on ethionine- induced hepatoma rats. CLINICS, 63(6); 807-813.

16. Hajar Tavakoli, H., Aryaeian, N. (2016). A review of the effect of Ginger in inflammation. Rahavard salamat journal, 2(1); 52-64.

17. Huang, Q., Iwamoto, M., Aoki, S., Tanaka, N., Tajima, K., Yamahara, J. (1991). Anti-5 hydroxy tryptamine 3 effect of galanolactone, diterpenoid isolated from ginger. Chemical & Pharmaceutical Bulletin, 39(2); 397-399

18. Kim, MK., Chung, SW., Kim, DH., Kim, JM., Lee, EK., Kim, JY. (2010). Modulation of age-related NF-κB activation by dietary zingerone via MAPK pathway. Experimental gerontology, 45(6); 419-426.

19. Lantz, RC., Chen, GJ., Sarihan, M., Sólyom, AM., Jolad, SD., Timmermann, BN. (2007). The effect of extracts from ginger rhizome on inflammatory mediator production. Phytomedicine, 14; 123-128.

20. Leach, MJ., Kumar, S. (2008). The clinical effectiveness of ginger(*zingiber officinale*) in adults with osteoarthritis. Int J Evid Based Healthc, 6(3); 11-20.

21. Lee, HY., Park, SH., Lee, M., Kim, HJ., Ryu, SY., Kim, ND. (2012). 1 ـ Dehydro-[10] -gingerdione from ginger inhibits IKKβ activity for NF-κB activation and suppresses NF-κB regulated expression of inflammatory genes. British journal of pharmacology, 167(1); 128-140.

22. Levy, A., Simon, O. (2009). Six-shogaol inhibits production of tumour necrosis factor

Archive of SID

www.SID.ir

alpha, interleukin-1 beta and nitric oxide from lipo poly saccharide -stimulated macrophages. West Indian Med J, 58(4); 295-300.

23. Li, XH., McGrath, KCY., Nammi, S., Heather, AK., Roufogalis, BD. (2012). Attenuation of liver pro inflammatory responses by *Zingiber officinale* via inhibition of NF kappa B activation in high fat diet fed rats. Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology, 110(3); 238-244.

24. Mahluji, S., Attari, VE., Mobasseri, M., Payahoo, L., Ostadrahimi, A., Golzari, SE. (2013). Effects of ginger(*Zingiber officinale*) on plasma glucose level, HbA1c and insulin sensitivity in type 2 diabetic patients. Int J Food Sci Nutr, 64(6); 682-686.

25. Mahluji, S., Ostadrahimi, A., Mobasseri, M., Attari, VE., Payahoo, L. (2013). Anti-inflammatory effects of *Zingiber officinale* in type 2 diabetic patients. Advanced Pharmaceutical Bulletin, 3(2); 273-276.

26. Mu, J., Zhuang, X., Wang, Q., Jiang, H., Deng, ZB., Wang, B. (2014). Interspecies communication between plant and mouse gut host cells through edible plant derived exosome-like nanoparticles. Molecular Nutrition & Food Research, 58(7); 1561-73.

27. Muller, W., Fiebich, BL., Stratz, T. (2006). New treatment options using 5-HT3 receptor antagonists in rheumatic diseases. Current Topics in Medicinal Chemistry, 6(18); 2035-42.

28. Navarro, JF., Mora, C. (2006). Diabetes, inflammation, proinflammatory cytokines, and diabetic nephropathy. Scientific World Journal, 6; 908-917.

29. Panigrahi, R. (2014). Association of TNF-α promoter polymorphism with HBV associated disease outcome among HBV infected patients from orissa,southern part of east india . Journal of Clinical and Experimental Hepatology , 4 (3); 202-208.

30. Prasanthi, K., Chagani, S., Gundala, SR., Rida, PC., Asif, G., Sharma, V. (2012). Benefits of whole ginger extract in prostate cancer. British Journal of Nutrition, 107; 473–484.

31. Raji, Y., Udoh, US., Oluwadara, OO., Akinsomisoye, OS., Awobajo, O., Adeshoga, K. (2002). Anti-inflammatory and analgesic properties of the rhizome extract of Zingiber officinale. African Journal of Biomedical Research, 5; 121-124.

32. Rang, HP., Dale, MM., Ritter, JM.(1999). Text book of pharmacology.3th ed. New York: Churchill Livingston, 148-633.

33. Rodrigues, FA., Prata, MM., Oliveira, IC., Alves, NT., Freitas, RE., Monteiro, HS. (2014). Gingerol fraction from *Zingiber officinale* protects against gentamicin-induced nephrotoxicity. Antimicrobial agents and chemotherapy, 58(4); 1872-8.

34. Sabina, EP., Rasool, M., Mathew, L., EzilRani, P., Indu, H. (2010). 6-Shogaol inhibits monosodium urate crystal-induced inflammation–An in vivo and in vitro study. Food and Chemical Toxicology, 48(1); 229-35.

35. Shim, S., Kim, S., Choi, D-S., Kwon, Y-B., Kwon, J. (2011). Anti-inflammatory effects of [6]-shogaol: potential roles of HDAC inhibition and HSP70 induction. Food and Chemical Toxicology, 49(11); 2734-40.

36. Shimoda, H., Shan, S-J., Tanaka, J., Seki, A., Seo, J-W., Kasajima, N. (2010). Anti-inflammatory properties of red ginger extract and suppression of nitric oxide production by its constituents. Journal of Medicinal Food, 13(1); 156-62.

37. Singh, A., Duggal, S., Singh, J., Katekhaye, S. (2010). Experimental advances in pharmacology of gingerol and analogues. Pharmacie Globale(IJCP), 2(4);1-5.

38. Toker, G., Kupeli, E., Memisoglu, M., Yesilada, E. (2004). Flavonoids with anti nociceptive and anti inflammatory activities from the leaves of Tilia argentea(*Silver linden*). J Ethnopharmacol, 95; 393-7.

.

Archive of SID

www.SID.ir

The Pattern of Expression of Tumor Necrosis Factor-A Induced by Hydro-Alcoholic Extract of *Zingiber officinale*

Z.Sahraeian

1.MSc Department of biology, Zanjan branch, Islamic azad university,Zanjan.Iran. **biosahraeian58@gmail.com**

Received:2017.21. 12 **Accepted: 2018.11.8**

Abstract

Inroduction & Objective: Diabetes is known as an inflammatory disease associated with metabolic disturbances. Tumor necrosis factor- Alpha is one of the main inflammatory cytokines and plays a central role in host defense, inflammation and immune function. The use of various medicinal herbs, including ginger, has been used to reduce the complications of inflammation from the past. In this study, the effects of various concentrations of ginger hydro-alcoholic extract on TNF-α gene expression in bone marrow derived mesenchymal stem cells were investigated.

Material and Methods: Mesenchymal stem cells were studied in control group and six groups of treatment with ginger hydro-alcoholic extract at concentrations of 100 and 50 µg / ml at 2, 16 and 24 hours. mRNA of cells were extracted and after cDNA synthesis, TNF-α gene expression was investigated using q Real Time PCR. Using the expression level, the results were evaluated by t-test.

Results: Samples treated with ginger extract at a concentration of 100 and 50 µg / ml for 24 and 16 hours showed a significant decrease for TNF-α gene ($p < 0.05$) and there were no significant increase in other groups.

Conclusion: According to the results, this decrease in the expression of TNF-α indicates the long-term effect of this extract compared to its short-term effect of 2 hour. Therefore, the effect of ginger on the expression of TNF-α inflammatory gene is dependent on treatment concentration and time.

Keywords: *Zingiber officinale*, Tumor Necrosis Factor-Alpha, Mesenchymal Stem Cells, Diabetes Mellitus

Archive of SID

www.SID.ir