

بررسی تغییرات بیان ژن‌های *TNF- α* ، *BCL2*، *IL-6*، *IL-1* در موش‌های صحرایی نر مبتلا به سنگ کلیه تحت تیمار عصاره آبی گل کاسنی (*Cichorium intybus* L.)

مهديه الزمان امامیان^۱، مریم طهرانی پور^۲، غلامحسین واعظی^۳، خدیجه نژاد شاهرخ آبادی^۴، عبدالحسین شیروی^۵

۱- گروه زیست شناسی، واحد دامغان، دانشگاه آزاد اسلامی، دامغان، ایران.

۲- دانشیار، دکترای تخصصی فیزیولوژی جانوری، گروه زیست شناسی، واحد مشهد، دانشگاه آزاد اسلامی، مشهد، ایران.

۳- گروه میکروبیولوژی، واحد کرج، دانشگاه آزاد اسلامی، البرز، ایران. gh.vaezi@yahoo.com

۴- استادیار، دکترای تخصصی ژنتیک مولکولی، گروه زیست شناسی، واحد مشهد، دانشگاه آزاد اسلامی، مشهد، ایران.

۵- گروه زیست شناسی، واحد دامغان، دانشگاه آزاد اسلامی، دامغان، ایران.

تاریخ دریافت: ۹۸/۱/۱۳ تاریخ پذیرش: ۹۸/۳/۱۰

چکیده

زمینه و هدف: سایتوکین‌های *TNF- α* ، *IL-6*، *IL-1* باعث پاسخ التهابی و عفونت، و در نهایت افزایش تخریب سلول (کاهش بیان پروتئین آنتی آپوپتوز *BCL2*) در بافت آسیب دیده می‌شوند. در این مطالعه هدف بررسی اثر عصاره آبی گل کاسنی را بر بیان ژن‌های مربوطه است.

روش کار: در این مطالعه ۲۴ سر موش صحرایی نر نژاد ویستار در چهار گروه ۶ تایی: کنترل سالم، گروه دریافت کننده اتیلن گلیکول، گروه‌های پیشگیری با دوزهای ۲۰۰ mg/kg و ۵۰ mg/kg که تزریق داخل صفاقی عصاره آبی گل کاسنی را به همراه ۱٪ اتیلن گلیکول برای القاء تشکیل بلورهای کلسیم، از روز اول آزمایش و به مدت ۳۰ روز دریافت کردند. استخراج RNA از بافت کلیه انجام شد و cDNA سنتز شد. توسط تکنیک Real time PCR، سطح بیان *TNF- α* ، *BCL2*، *IL-6*، *IL-1* مورد بررسی قرار گرفت. یافته‌ها: آنالیز داده‌ها به کمک آزمون واریانس یک طرفه (ANOVA)، تست Tukey و نرم افزار SPSS نشان داد که در گروه‌های پیشگیری: بیان ژن *BCL2* افزایش و *TNF- α* کاهش معنی دار یافت ($P < 0/001$). هم‌چنین افزایش معنی دار ($P < 0/001$) بیان ژن‌های *IL-6* (در گروه‌های پیشگیری با دوز ۵۰) و *IL-1* (در گروه‌های پیشگیری با دوز ۲۰۰) مشاهده شد. نتیجه‌گیری: عصاره گل کاسنی در رفع اثرات تکروری ناشی از *TNF- α* و به تبع کاهش آپوپتوز سلول‌های اپی تلیال کلیوی موثر است، اما بر *IL-6* و به ویژه رفع عفونت ناشی از *IL-1* تاثیر ندارد.

واژه‌های کلیدی: گل کاسنی (*Cichorium intybus* L.)، *TNF- α* ، *BCL2*، *IL-6*، *IL-1*.

مقدمه

شود (۱۱). سایتوکاین‌های پیش التهابی عمدتاً *TNF- α* ، *IL-1 β* ، *IL-6* هستند (۶). بررسی‌ها نشان دادند ترشح سایتوکاین‌ها با آزاد شدن هورمون‌های استرس مرتبط می‌باشند و یک عامل استرس‌زا باعث القا سنتز سایتوکاین‌های پیش التهابی مانند *TNF- α* و *IL-6* در بدن می‌شود (۵). در جریان التهاب نیز، *TNF- α* ترشح می‌شود که باعث تشدید پاسخ ایمنی می‌گردد (۲). فاکتور *TNF- α* هم‌چنین از طریق افزایش فعالیت سوپراکسید، کاهش نیتریک اکسید اندوتلیالی منجر به کاهش

تعامل بین کلسیم و اگزالات در دستگاه گوارش در شکل‌گیری سنگ کلیه اگزالات کلسیم تأثیرگذار است (۲۱). کلیه‌ها مسیر اصلی دفع و تنها محل شناخته شده عملکرد اگزالات هستند. قرار گرفتن سلول‌های اپی تلیال کلیوی در معرض اگزالات باعث آسیب اکسیداتیو می‌شود (۲۳). استرس اکسیداتیو ناشی از کریستال‌های اگزالات کلسیم و بار بالای اگزالات، منجر به التهابات میان بافتی می‌شود که می‌تواند با افزایش بیان سایتوکین‌های مختلف مولد التهاب مشخص

التهابی، پراکسیداسیون لیپیدی غشاء سلولی و آسیب‌های اکسیداتیو DNA همراه با تولید متابولیت‌های سمی باعث مرگ برنامه ریزی شده سلول می‌شود (۸). بنابر این افزایش سایتوکین‌های التهابی و آسیب‌های اکسیداتیو DNA در بیماری‌های مرتبط با کلیه شایع است (۳۰). مکمل‌های آنتی‌اکسیدان حفاظت سلولی را در کلیه با مهار بیان بیش از حد سایتوکین‌های التهابی فراهم می‌کنند (۱۲). در این راستا نیز وجود آنتوسیانین‌ها در گل‌های کاسنی (*c. intybus*) گزارش شده اند (۲۴). علاوه بر این برخی ترکیبات کاسنی مانند ساپونین‌ها، ترکیبات پلی‌فنولیک، فلاونوئیدها و اسیدهای پلی‌فنولیک (۱۱)، سیکوریک اسید (۲۰)، β -سیتواسترول (۱۶) خاصیت ضد التهابی دارند. به طوری که یکی از مهم‌ترین ترکیبات آنتی‌اکسیدان در کاسنی فلاونوئیدها و اسیدهای فنولیک هستند که دارای فعالیت آنتی‌اکسیدانی هستند که با توجه به حضور گروه‌های هیدروکسیل در ساختار رادیکال‌های آزاد خود، به عنوان سیستم دفاعی در برابر آسیب‌های اکسیداتیو به دلیل عمل می‌کنند. فنول و یا پلی‌فنول‌ها موجود در کاسنی نشان داده شده است که دارای سطوح بالایی از فعالیت‌های آنتی‌اکسیدانی هستند که مکانیسم عمل این ترکیبات آنتی‌اکسیدانی، به خنثی کردن رادیکال‌های آزاد و جلوگیری از تجزیه هیدرو پراکسیدها توسط رادیکال‌های آزاد بر می‌گردد (۲۰)، (۱۱). از طرفی فلاونوئیدها دارای اثرات ضد التهابی نیز می‌باشند (۳). در مقالات مختلف نیز خاصیت ضد التهابی کاسنی مکرر اشاره و ثابت شده است (۳۱، ۱۹). به طور مثال در مطالعه‌ای که بر روی سلول‌های سرطان روده بزرگ در انسان صورت گرفت، مشخص شد که عصاره کاسنی موجب مهار TNF- α از طریق سرکوب بیان سیکلو‌اکسیژناز (COX-2) می‌شود (۱۶). همچنین TNF- α و IL-1 موجب افزایش بیان ICAM-1 (مولکول عامل چسبندگی داخل سلولی - ۱) و

فیلتراسیون گلومرول شده و اثرات مستقیمی بر باز جذب سدیم توبولی دارد (۴). TNF- α از سایتوکین‌های مهم سیستم ایمنی می‌باشد که در تحریک پاسخ‌های ایمنی نقش دارد و این سایتوکین از سلول‌های مختلف ایمنی از جمله ماکروفاژها و مونوسیت‌های فعال ترشح می‌شود. این سایتوکین هم‌چنین می‌تواند سبب القاء مرگ برنامه ریزی شده (آپوپتوز) در سلول‌های هدف گردد (۱). آپوپتوز که به مرگ سلولی برنامه ریزی شده شهرت دارد، بر اثر برهم‌کنش پروتئین‌های خانواده BCL2 که شامل پروتئین آنتی‌آپوپتوتیک BCL2 و پروتئین پرو آپوپتوتیک Bax است ایجاد می‌شود (۷). پروتئین‌های پرو آپوپتوتیک (Bax) از سیتوپلاسم به جدار میتوکندری تغییر مکان داده و سبب نفوذپذیری جدار خارجی میتوکندری می‌شود که خود منجر به آزاد شدن سیتوکروم c و شروع آپوپتوز می‌شود بر خلاف عملکرد پروتئین Bax، پروتئین آنتی‌آپوپتوز BCL2 از پارگی جدار میتوکندری جلوگیری می‌کند (۲۷، ۷). IL-1 نیز در پاسخ التهابی در برابر عفونت نقش مهمی بازی می‌کند (۹) و باعث یک پاسخ التهابی عمومی از جمله اعزام نوتروفیل‌ها و ماکروفاژها به محل تشکیل کریستال‌های کلسیمی در توبول‌های ادراری نیز می‌شوند (۲۵). در رابطه با IL-6 باید گفت اینترلوکین ۶ سایتوکاینی است که نه تنها در پاسخ التهابی و عفونت دخیل است بلکه سوخت و ساز بدن، احیا و فرآیندهای عصبی را تنظیم می‌کند. بنابراین IL-6 در هردو نقش متضاد ضد التهابی و پیش التهابی را ایفا می‌کند اما عمدتاً نقش پیش التهابی دارد (۱۰). هم‌چنین در مطالعات قبلی ثابت شده که پلی‌مورفیسم محرک عملکرد IL-6 یعنی پلی‌مورفیسم تک نوکلئوتیدی (SNPs) که بر بیان سطح IL-6 تاثیر می‌گذارد، در ارتباط با عملکرد کلیه و شیوع بیماری مزمن کلیه می‌باشد (۲۶). تولید بیش از حد گونه نیتروژن واکنشی در نتیجه افزایش بیان ژن‌های واسطه‌گر پیش

ابتدا گل های کاسنی در سایه خشک و تا زمان عصاره گیری در محیط خشک نگهداری شدند و در آسیاب برقی کاملاً پودر شده سپس ۱۰۰ گرم از پودر در ۱۰۰۰ میلی لیتر آب شد و به مدت ۷۲ ساعت در آون در دمای ۳۵ درجه سانتی گراد قرار داده شد. محلول حاصل نیز با پمب خلاء و قیف بوخنر صاف شد و پس از حذف ناخالصی در دمای ۳۵ درجه سانتی گراد در آون خشک شد. از پودر خشک شده برای تهیه دوزهای ۵۰ و ۲۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن موش استفاده شد این عصاره روزانه به صورت تازه تهیه و در اختیار حیوانات قرار داده شد (۱۷، ۱۵، ۱۴).

تیمار حیوانات

تعداد ۲۴ سر موش صحرایی نر نژاد ویستار (wistar) با سن یکسان و میانگین وزنی 250 ± 10 گرم به طور تصادفی به ۴ گروه ۶ تایی: گروه کنترل سالم، گروه دریافت کننده اتیلن گلیکول (EG)، گروه پیشگیری با دوز پایین (۵۰ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن عصاره آبی گل کاسنی) و گروه پیشگیری با دوز بالا (۲۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن عصاره آبی گل کاسنی) تقسیم شدند (۱۵). از این حیث که سیستم بدنی موش مشابه با سیستم بدن انسان می باشد، رت های نژاد ویستار را جهت آزمایش فوق در نظر گرفته شد. موش ها در اتاق حیوانات با درجه حرارت 23 ± 2 درجه سانتی گراد و دوره نوری ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی نگهداری گردیدند. حیوانات ضمن دسترسی آزادانه به آب و غذا در مدت ۳۰ روز به صورت زیر تیمار شدند: به آب آشامیدنی تمام گروه ها به جز گروه کنترل سالم، ۱٪ اتیلن گلیکول (۱۸) در مدت ۳۰ روز اضافه شد. هم-چنین در گروه کنترل سالم و گروه اتیلن گلیکول ۱٪ آب مقطر به صورت درون صفاقی از روز اول تیمار به مدت ۳۰ روز، تزریق گردید. گروه های پیشگیری با دوزهای ۲۰۰ mg/kg و ۵۰ mg/kg وزن بدن عصاره آبی

VCAM-1 (مولکول چسبنده سلول های عروقی-۱) در سلول های اپی تلیال تنفسی می شوند و ائوزینوفیل ها میزان چسبندگی به این سلول ها را پس از تحریک افزایش می دهند (۲۸)، طوری که در مطالعه ای که بر میزان بیان این سایتوکین ها در سوختگی و التهابات ناشی از سوختگی انجام شده مشخص شد که التهاب نیز نقش مهمی در پیشرفت آسیب های کلیوی ناشی از سوختگی-های شدید دارد. سایتوکین های پیش التهابی مانند TNF- α ، IL-1 و IL-6، و مولکول چسبندگی سلول: ICAM-1 می توانند واکنش های التهابی قوی در پاسخ به محرک مضر را آغاز کنند. در موش هایی با شدت سوختگی، سطح بیان mRNA مربوط به TNF- α ، IL-1 و ICAM-1 در بافت کلیه با افزایش معنی دار همراه بوده است (۳۲). بنابراین با استناد به مطالعات قبلی در رابطه با تاثیر کاسنی بر تخفیف التهاب و عفونت ناشی از افزایش سایتوکین-های التهابی مانند TNF- α ، و اثبات اثر ضد التهابی ترکیبات آنالیز شده حاصل از عصاره کاسنی، که قاعداً اثر مستقیم این ترکیبات را در کاهش بیان ژن های TNF- α ، IL-1 و IL-6 یا افزایش بیان پروتئین ضد آپوپتوز BCL2 اثبات می کند، بر آن شد تا اثر عصاره آبی گل کاسنی را بر میزان بیان ژن سایتوکین های پیش التهابی IL-1، IL-6، TNF- α و پروتئین BCL2 و اثرات ناشی از این سایتوکین ها بر سلول های اپی تلیال کلیوی مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش ها

نمونه گل کاسنی (*Cichorium intybus* L.) از روستای اسدآباد نیشابور جمع آوری شده و بعد از شناسایی توسط متخصصین گیاه شناسی پژوهشکده علوم گیاهی دانشگاه فردوسی مشهد به شرح زیر شناسایی و در هر بار یوم کد گذاری شده است:

Cichorium intybus L.
Family: Asteraceae (Compositae)
Voucher sp. no. : 38201(FUMH)

روش عصاره گیری

گل کاسنی را در مدت ۳۰ روز به صورت تزریق درون صفاقی دریافت کردند (۱۸، ۱۳). این مطالعه بر اساس مصوبه کمیته اخلاقی دانشگاه آزاد و مطابق اعلامیه هلسینکی انجام شد.

استخراج RNA، سنتز cDNA و سنجش بیان ژن‌ها به روش Real time PCR:

تیمار با اتیلن گلیکول با دوز مصرفی ۱٪ (۱۸) در گروه‌های کنترل منفی و پیشگیری، موجب التهاب و آسیب کلیه در این گروه‌ها می‌شود، در نتیجه سطح بیان ژن‌های مورد مطالعه تمامی نمونه‌ها در گروه کنترل سالم و گروه پیشگیری با گروه کنترل منفی مقایسه می‌شود. بنابراین در طی مراحل آزمایش از بافت کلیه تمامی نمونه‌ها، نمونه برداری صورت گرفت. سپس مراحل استخراج RNA با استفاده از کیت استخراج RNA و طبق پروتکل شرکت دنا زیست - آسیا به روش ستونی انجام شد. با استفاده از تکنیک اسپکتروفتومتری نانو دراپ از کمیت RNA استخراج شده و استخراج صحیح آن اطمینان حاصل شد. دستگاه به طور اتوماتیک غلظت RNA را با استفاده از جذب نوری در طول موج ۲۶۰ نانومتر، محاسبه و دستگاه غلظت نمونه مورد نظر را در طول موج مربوطه، بر حسب میکروگرم بر میکرولیتر، محاسبه می‌کند. بنابراین جهت کنترل کمیت یا غلظت RNA، نانودراپ انجام شد. همچنین جهت اطمینان از کنترل کیفیت مقدار RNA استخراج شده RNA بر روی ژل آگارز ۱/۵ درصد قرار داده و طبق دستورالعمل کیت سنتز cDNA (شرکت پارس توس)، تقریباً ۵ میکروگرم از هر یک از نمونه‌های RNA برداشته و cDNA سنتز شد. توالی نوکلئوتیدی پرایمر Forward و توالی نوکلئوتیدی پرایمر Revers مکمل ژن‌های IL-1، IL-6، BCL2، TNF- α در رت از طریق نرم افزار الیگو ۷ (سایت NCBI) مورد بررسی قرار گرفت تا از اختصاصی بودن محل جفت شدن پرایمرها اطمینان حاصل شود، مطابق جدول ۱ در انتها تکنیک Real time PCR با استفاده از پرایمر

اختصاصی ژن‌های IL-1، IL-6، BCL2، TNF- α و ژن GAPDH که به عنوان House keeping استفاده شد، و طبق پروتکل پیشنهادی کیت شرکت پارس توس انجام پذیرفت. واکنش Real time PCR برای تکثیر ژن‌های IL-1، IL-6، BCL2، TNF- α طبق پروتکل با ۱۰ میکرولیتر سایبرگرین، ۱ میکرولیتر Template cDNA، ۷/۷ میکرولیتر آب مقطر و پرایمر اختصاصی در دمای ۶۳ درجه سانتی‌گراد انجام شد. مرحله تکثیر شامل یک مرحله واسرشت شدن ابتدایی در دمای ۹۵ درجه سانتی-گراد به مدت ۲۰ ثانیه، باز شدن رشته الگو در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ ثانیه، اتصال پرایمر به الگو و تکثیر قطعه مورد نظر در دمای ۶۱ درجه سانتی-گراد به مدت ۳۰ ثانیه و در پایان یک مرحله انتهایی در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه بود.

نتایج

اثر عصاره آبی گل کاسنی (*Cichorium intybus*) (L) بر تغییر بیان ژن‌های IL-1، IL-6، BCL2، TNF- α در بافت کلیه موش صحرایی نر مورد بررسی قرار گرفت. در جدول ۲، اختلاف معنی دار بین گروه‌ها با سطح معنی داری ($P < 0/05$) در نظر گرفته شده است.

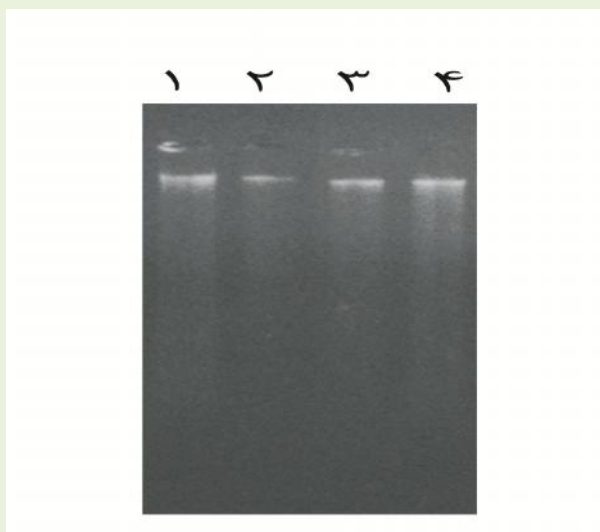
TNF- α ، در گروه‌های پیشگیری با دوز پایین (۵۰ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن) و پیشگیری با دوز بالا (۲۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن) نسبت به گروه دریافت کننده اتیلن گلیکول کاهش معنی داری ($P < 0/001$) یافته است (جدول ۲). افزایش بیان ژن BCL2 نیز در گروه پیشگیری با دوز پایین (۵۰ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن) و در گروه پیشگیری با دوز بالا (۲۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن) نسبت به گروه دریافت کننده اتیلن گلیکول معنی دار ($P < 0/001$) می‌باشد (جدول ۲). کاهش بیان ژن IL-6 در گروه پیشگیری با دوز بالا (۲۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن) معنی دار نیست و تقریباً تفاوتی با گروه اتیلن گلیکول ندارد اما

گروه دریافت کننده اتیلن گلیکول مشاهده می شود (جدول ۲). نمودار های ۱، ۲، ۳، ۴ مربوطه تکثیر ژن های مربوطه و تصویر ژل الکتروفورز (شکل ۱) مربوط به استخراج RNA می باشد.

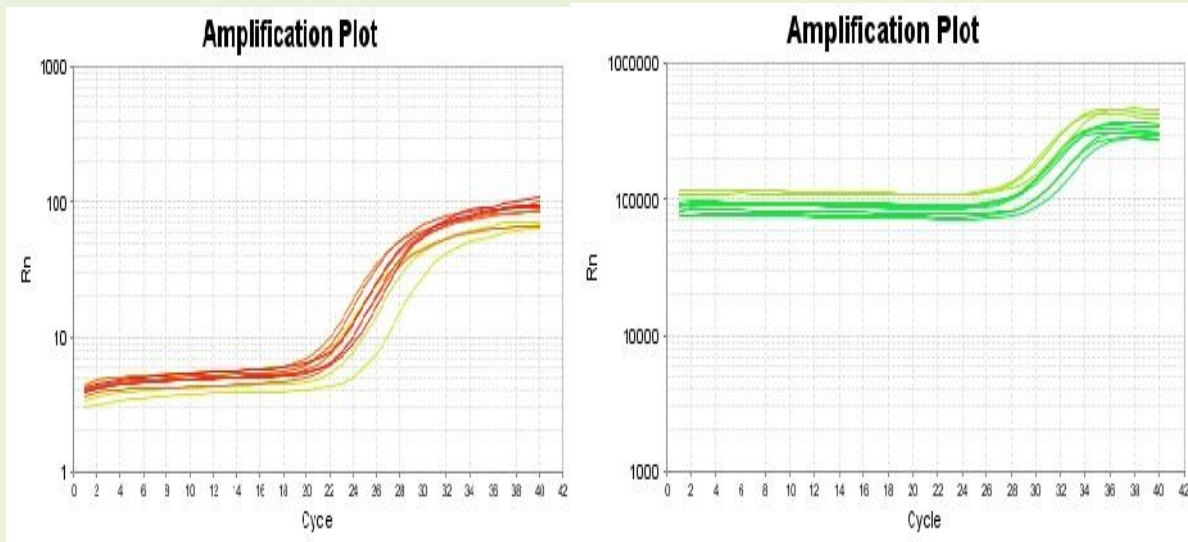
در دوز ۵۰ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن میزان بیان ژن IL-6 افزایش معنی داری ($P < 0/001$) را نشان می دهد (جدول ۲). افزایش بیان ژن IL-1 در گروه های پیشگیری با دوز پایین (۵۰ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن)، پیشگیری با دوز بالا (۲۰۰: $P < 0/001$) نسبت به

جدول ۱- توالی پرایمر مورد استفاده برای بررسی بیان ژن های GAPDH، IL-1، IL-6، BCL2، TNF-

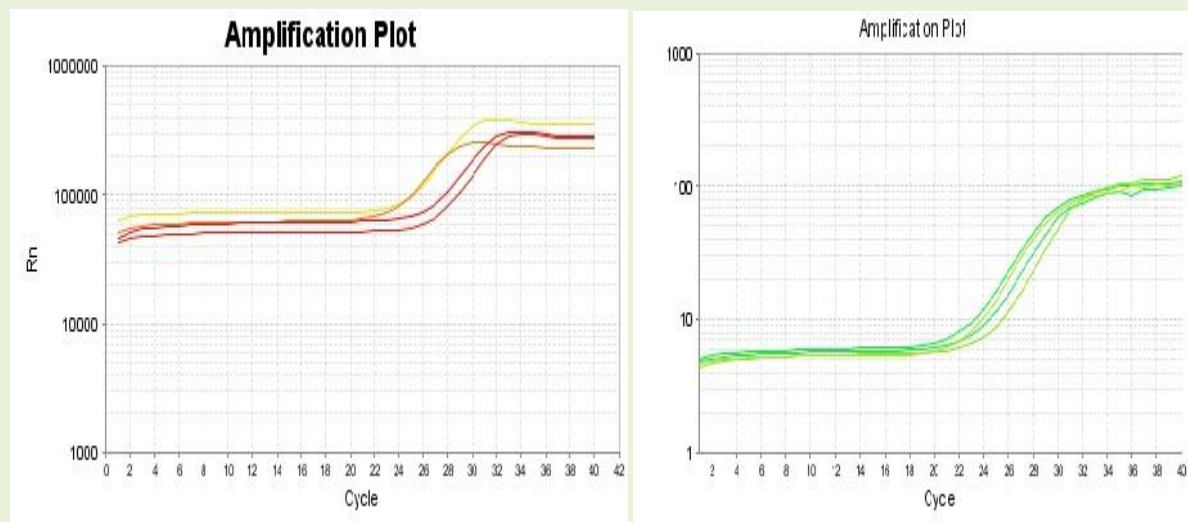
GENES	Primer Sequence	TM
GAPDH	Forward: 5'-TGCTGGTGCTGAGTATGTCG-3'	60°C
	Reverse: 5'-GCATGTCAGATCCACAACGG-3'	60°C
TNF-	Forward: 5'-GGTGATCGGTCCCAACAAGGA-3'	56.3°C
	Reverse: 5'-CACGCTGGCACAGCCACTC-3'	57.6°C
IL-1	Forward: 5'-CTCCATGAGCTTTGTACAAGG-3'	52.4°C
	Reverse: 5'-TGCTGATGTACCAGTTGGGG-3'	53.8°C
IL-6	Forward: 5'-CACGGCCTTCCCTACTTCAC-3'	55.9°C
	Reverse: 5'-TGCAAGTGCATCATCGTTGT-3'	49.7°C
BCL2	Forward: 5'-CATGCGACCTCTGTTTGA-3'	48.0°C
	Reverse: 5'-GTTTCATGGTCCATCCTTG-3'	48.9°C



شکل ۱- ژل الکتروفورز و ترتیب گروه ها، ۱: گروه کنترل سالم، ۲: گروه اتیلن گلیکول (۱٪)، ۳: اتیلن گلیکول ۱٪+ دوز ۵۰ گل کاسنی، ۴: گروه اتیلن گلیکول ۱٪+ دوز ۲۰۰ گل کاسنی



نمودارهای ۱ و ۲- تکثیر ژن‌های BCL2 و TNF- α (به ترتیب از راست به چپ) در واکنش Real time PCR



نمودارهای ۳ و ۴- تکثیر ژن‌های IL-6 و IL-1 (به ترتیب از راست به چپ) در واکنش Real time PCR

جدول ۲- توالی پرایمر مورد استفاده برای بررسی بیان ژن‌های TNF- α ، BCL2، IL-6، IL-1

ژن‌ها	کنترل سالم	اتیلن گلیکول (۱٪)	اتیلن گلیکول ۱٪+ دوز ۵۰ mg/kg	اتیلن گلیکول ۱٪+ دوز ۲۰۰ mg/kg	P
TNF- α	۱±۰	۱/۰۶±۰/۰۱	۰/۴۷±۰/۰۳	۰/۱۱±۰/۰۲	P<۰/۰۰۱
BCL2	۱±۰	۱/۰۵±۰/۰۰۳	۱/۳۹±۰/۰۲	۱/۷۵±۰/۰۵	P<۰/۰۰۱
IL-1	۱±۰	۰/۲۶±۰/۰۰۵	۰/۷۹±۰/۰۲	۱/۱±۰/۰۲	P<۰/۰۰۱
IL-6	۱±۰	۰/۹۹±۰/۰۲	۳/۷۷±۰/۲۷	۰/۸۱±۰/۰۸	P<۰/۰۰۱

مقایسه بین گروه اتیلن گلیکول با گروه کنترل سالم و * بین گروه اتیلن گلیکول با گروه پیشگیری با دوز ۲۰۰ mg/kg و ۵۰ mg/kg نشان می‌دهد. سطح معنی‌داری در سطح (# و *) P<۰/۰۵، (## و **) P<۰/۰۱، (### و ***) P<۰/۰۰۱ در نظر گرفته شده است.

بحث و نتیجه‌گیری

دریافت عصاره آبی گل کاسنی مورد بررسی قرار دهد. با توجه به این که در تیمار با عصاره آبی گل کاسنی موجب افزایش معنی‌دار IL-6 در دوز ۵۰ mg/kg وزن بدن و در دوز ۲۰۰ mg/kg IL-6 باعث کاهش اما تفاوت معناداری با گروه اتیلن گلیکول ندارد شده در

این مطالعه بدین منظور طراحی گردید تا میزان بیان سایتوکین‌های پیش‌التهابی IL-1، IL-6، TNF- α (۳۲) و آنکوژن آنتی‌آپوپتوز BCL2 (۲۲) را در بافت کلیه موش‌های صحرائی نر تیمار شده با اتیلن گلیکول پس از

TNF- در تنظیم بیان Bcl-2 نقش موثری ایفا کرده است چرا که اثر عصاره گل کاسنی بر هر دو هم راستا می باشد. TNF- یک سایتوکاین التهابی اولیه هست که افزایش بیان آن، احتمال آپوپتوز در سلول‌های اپی تلیال را هشدار می‌دهد و تصور می‌شود که نقش اصلی را در آسیب‌های کلیوی بازی می‌کند. مسیر TNF- در لوله‌های ادراری از طریق مسیر گیرنده مرگ سلولی و القاء آپوپتوز و تولیدگونه‌های اکسیژن واکنشی می‌باشد (۲۲). اگرچه ارتباط بین گونه‌های اکسیژن واکنشی و آپوپتوز توبول‌های ادراری روشن به نظر می‌رسد، اما در مورد ژن‌های درگیر در القاکننده آپوپتوز یا تولید گونه‌های اکسیژن واکنشی اطلاعات کمی وجود دارد (۲۹). اما با این حال استرس اکسیداتیو نقش اصلی را در پیشرفت آسیب‌های شدید کلیه بازی می‌کند. به طوری که گونه‌های اکسیژن واکنشی (ROS) یک فاکتور اصلی جهت آزاد شدن سایتوکین‌های دخیل در آسیب بافت کلیه هستند که منجر به پراکسیداسیون لیپیدی، اکسیداسیون پروتئین، آسیب DNA، کاهش آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان و سرانجام مرگ سلول و آسیب کلیه می‌شوند. تخمین زده شده که سایتوکین‌های پیش‌التهابی مانند TNF-، IL-1، IL-6، ICAM-1 (مولکول عامل چسبندگی داخل سلولی -۱) و کاسپاز-۳ می‌توانند به شدت واکنش‌های التهاب‌زا را در پاسخ به تحریکات ناشی از آسیب بافت کلیه القا کنند (۳۲). بنابراین مکانیسم ذکر شده فقط می‌تواند در مورد TNF- و Bcl-2 قابل توجه باشد و کاهش بیان معنی‌دار TNF- و افزایش بیان Bcl-2 در تیمار با عصاره گل کاسنی، از طریق مکانیسم فوق‌بررسی آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان، سنجش گونه‌های اکسیژن واکنشی و کاسپاز-۳ قابل بررسی می‌باشد. چرا که با افزایش IL-1 به ویژه در دوز ۲۰۰ mg/kg ($P < 0/001$) و در مورد IL-6 افزایش بیان در دوز ۵۰ mg/kg مشاهده می‌

مجموع به نظر می‌رسد گل کاسنی اثر قابل توجهی بر بیان IL-6 (در دوز ۲۰۰ mg/kg) نداشته باشد. با استناد به این که IL-6 موجب اختلال در عملکرد کلیه و شیوع بیماری مزمن کلیه می‌شود (۲۶)، به نظر می‌آید عصاره گل کاسنی توانسته بر التهابات ناشی از IL-6 در بافت کلیه فائق آید. در حالی که IL-1 نقش مهمی در پاسخ التهابی در برابر عفونت از طریق افزایش بیان عوامل چسبندگی اندوتلیال ایفا می‌کند در نتیجه اجازه نفوذ لکوسیت در محل عفونت را می‌دهد (۹). ممکن است IL-1 یکی از عوامل بروز آسیب بافتی در تیمار با دوز ۲۰۰ mg/kg گل کاسنی باشد که با افزایش دوز مصرفی گل کاسنی ($P < 0/001$) در ایجاد عفونت ناشی از تهاجم لوکوسیت‌های آزادکننده IL-1 دخالت دارد (جدول ۲). زیرا بیان IL-1 در دوز ۲۰۰ mg/kg وزن بدن نسبت به دوز ۵۰ mg/kg افزایش یافته است. اما در تحقیق حاضر کاهش بیان سایتوکین التهابی TNF- افزایش بیان آنکوژن آنتی آپوپتوز Bcl-2 قابل ملاحظه است (جدول ۲). مرگ سلولی شامل آپوپتوز (BAX) و نکروز (TNF-) است که در اثر آسیب و مسمومیت بافت اتفاق می‌افتد (۳۲). در یک بافت آسیب دیده، یکی یا هر دو می‌توانند عامل تخریب سلول شوند. پروتو آنکوژن‌های دخیل در آپوپتوز شامل BAX/BAK/ FAS و آنتی آپوپتوز BCL-2/BCL-X1 می‌باشند (۳۲). اتصال خارج سلولی TNF- به گیرنده‌های سطح سلول موجب تنظیم بالادست پروتئین پیش آپوپتوز Bax و تنظیم پایین دست پروتئین ضد آپوپتوز Bcl-2 می‌شود و چون Bcl-2 به عنوان یک آنکوژن آنتی آپوپتوز (۱۹) تلقی می‌شود که افزایش آن می‌تواند در مهار آپوپتوز سلولی ناشی از عوامل التهاب‌زا، عفونت‌زا و مخرب سلول، موثر باشد و با توجه به این که عصاره گل کاسنی توانسته در افزایش بیان Bcl-2 و کاهش بیان TNF- به طور معنی‌داری موثر باشد، احتمالاً

رادیکال آزاد، کاسپازها و... در افزایش بیان پروتوانکوژن آنتی آپوپتوز Bcl-2 ($P < 0/001$) و کاهش بیان TNF- α ($P < 0/001$) در کاهش تخریب سلولی در سلول‌های پارانشیمال توپول ادراری کلیه ناشی از مسمومیت با اتیلن گلیکول، موثر واقع شود.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله از مساعدت و همراهی دانشگاه آزاد مشهد و دانشگاه علوم پزشکی مشهد به ویژه جناب آقای دکتر محمدیان، دکتر حسین آیت الهی و دکتر موسی الرضا حاج زاده تشکر و قدردانی می‌گردد.

و TNF- α در کاراته کاران. مجله پزشکی هرمزگان. سال شانزدهم. شماره ۱. ص ۲۷-۳۶.

۶- طاهری کلانی، ع. ا.، ابراهیم، خ.، آذربایجانی، م. ع. ۱۳۹۱. اثر ترمین استقامتی بر سطوح سرمی سایتوکاین‌های پیش التهابی، تستوسترون و کورتیزول در مردان جوان غیرفعال. دو ماهنامه علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه. سال شانزدهم. شماره ۴. ص ۳۰۲-۳۱۱.

۷- نمازی، ن.، پازکی طرودی، ح.، داوودی، ح.، عجمی، م. ۱۳۹۱. بررسی نقش مسیرهای آپوپتوتیک و آنتی آپوپتوتیک در مسیر اثر اسیدهای چرب امگا ۳ بر آسیب ناشی از ایسکمی - رپرفیوژن در کلیه رت. مجله علوم تغذیه و صنایع غذایی ایران. سال هفتم. شماره ۵. ص ۵۳۱-۵۳۷.

8. Ahmadiasl, N., Banaei, Sh., Alihemmati, AR., Baradaran, B., Azimian, E. (2014). Anti-Inflammatory effect of erythropoietin and melatonin on renal ischemia reperfusion. injury in male rats. *Advanced Pharmaceutical Bulletin*, 4(1);49-54.

9. Alshehri, A., Elsayed, H. (2012). Molecular and biochemical evaluation of anti-proliferative effect of (*Cichorium endivia*, L.) phenolic extracts on breast cancer cell line: MCF7. *J of Biotechnology and Pharmaceutical Research*, 3(4); 74-82.

10. Chalaris, A., Scheller, J., Schmidt arras, D., Rose john, S. (2011). The pro-and anti-inflammatory properties of the cytokine interleukin-6. *Biochimica Biophysica Acta*, 1813; 878-888.

گردد (جدول ۲). در این مطالعه، دلیل تفاوت در بیان سایتوکین‌ها مشخص نیست ولی ممکن است الگوهای متفاوت در سطح سلولی برای تولید سایتوکین‌ها و به تبع نفوذ لوکوسیت‌ها در سلول‌های پارانشیمال کلیه وجود داشته باشد. عصاره آبی گل موجب افزایش بیان IL-1 (در دوز ۲۰۰ : $P < 0/001$) و IL-6 (در دوز ۵۰ : $P < 0/001$) شده و نتوانسته اثرات ناشی التهاب و عفونت این سایتوکین‌ها در کلیه تخفیف دهد. اما احتمالاً ترکیبات آنتی اکسیدان ذکر شده در گل، توانسته به واسطه افزایش آنزیم‌های آنتی اکسیدان و کاهش

منابع

۱- برادران قوامی، ش.، محبی، س. ر.، اخوان سپه، ی. ع.، ناقوسی، ح.، طاهایی، س. م. ا.، عظیم زاده، پ.، همکاران. ۱۳۹۲. بررسی پلی مورفیسم پروموتور ناحیه ۳۰۸-درتومور نکرور فاکتور (TNF- α) در بیماران ایرانی مبتلاء به هپاتیت C مزمن. مجله علوم پزشکی دانشگاه آزاد اسلامی. سال بیست و سه. شماره ۲. ص ۹۳-۹۹.

۲- تریبانیان، ب.، پارسه، ر.، بقایی، ب. ۱۳۹۴. پاسخ اینترلوکین-6، عامل نکرورآلفا و کورتیزول به فعالیت شدید ورزشی در زنان ورزشکار. مجله علوم پزشکی رازی. سال بیست و دو. شماره ۱۳۳. ص ۱-۷.

۳- سعیدی، ج.، لطفی، م.، بزرگی، ه.، زنده دل، ا. ۱۳۹۰. بررسی اثرات پیشگیری کننده عصاره آبی گیاه جعفری (*Petroselinum sativum*) بر سنگ کلیه در موش‌های نر نژاد ویستار. فصلنامه فیزیولوژی و تکوین جانوری دانشگاه آزاد اسلامی زنجان. پیاپی شانزدهم. شماره ۴. ص ۱-۱۱.

۴- حبیبیان، م.، پیری، م.، آذربایجانی، م.، هدایتی، م. ۱۳۹۱. اثر حمایتی تمرین هوازی در مقابل برخی از شاخص‌های پیش التهابی ناشی از مهار مزمن نیتریک اکسید سنتاز در بافت کلیه موش‌های صحرائی. مجله دانشگاه علوم پزشکی بابل. سال پانزدهم. شماره ۱. ص ۳۰-۳۷.

۵- فرزانه‌گی، پ.، محمدزاده، م.، آذربایجانی، م. ع. ۱۳۹۳. اثر تعاملی تمرینات ورزشی و مکمل بر سطوح استراحتی IL-10

- 11.D. Shad, M.A., Nawaz, H., Rehman, T., Ikram, N. (2013). Determination of some biochemical, phytochemicals and antioxidant properties of different parts of *cichorium intybus* L. A comparative study. The Journal of Animal & Plant Sciences, 23(4);1060-1066.
12. Ganesh, R., Sridharan, B., Micheal, S., Ramachandran, A., Viswanathan, P. (2015). Citrus bioflavonoids ameliorate hyperoxaluria induced renal injury and calcium oxalate crystal deposition in wistar rats. Advanced Pharmaceutical Bulletin, 5(10); 1-9.
13. Ganbari Hadjzadeh, M.A.R., Khoei A.R., Hadjzadeh, Z., Parizady M.R. (2007). Ethanolic extract of *Nigella sativa* L. seeds on ethylene glycol-induced kidney calculi in rats. Endourology and Stone Disease, 4(2); 86-90.
14. Ghaderi, S., Fatemi Tabatabaei, S.R., Rashno, M., Askaripour M. (2016). The aqueous extract of *Portulaca oleracea* ameliorates neurobehavioral dysfunction and hyperglycemia related to streptozotocin-diabetes induced in ovariectomized rats. Iranian J of Pharmaceutical, 15(2); 561-571.
15. Jamshidzadeh, A., Khoshnood, M.J., Dehghani, Z., Niknahad, H. (2006). Hepatoprotective Activity of *Cichorium intybus* L. Leaves extract against carbon tetrachloride induced toxicity. Iranian J of Pharmaceutical Research, 1; 41-46.
16. Katiyar, P., Kumar, A., Mishra, A.K. Dixit, R.K., Kumar, A., Kumar, R. (2015). Kasni (*Cichorium intybus* L.) a propitious traditional medicinal herb. International Journal of Pharmacognosy, 2(8); 368-380.
17. Khaksari, M., Rezvani, M.E., Sajadi, M.A., Soleimani, A. (2000). The effect of topically applied water extract of *Rhazya stricta* on cutaneous wound healing in rats. Koomesh, 1 (3); 1-10.
18. Khajavi Rad, A., Hajjizadeh, M.A.R., Rajaei, Z., Mohammadian, N., Valliollahi, S., Sonei, M. (2011). The beneficial effect of cyndon dactylon fractions on ethylene glycol-induced kidney calculi in rats. Endourology and Stone disease, 8(3); 179-184.
19. Koner, A., Ghosh, S., Roy, P. (2011). Isolation of antimicrobial compounds from chicory (*Cichorium intybus* L.) root. International Journal of Research in Pure and Applied Microbiology, 1(2); 13-18.
20. Khorshid Abbas, Z., Saggu, S.H., I Sakeran, M., Zidan, N., Rehman, H., Ansari, A. (2014). Phytochemical antioxidant and mineral composition of hydroalcoholic extract of chicory (*Cichorium intybus* L.) leaves. Saudi J of Biological Sciences, 2015(22); 322-326.
21. Lange, J.N., Wood, K.D., Mufarrij, P.W., Callahan, M.F., Easter, L., Knight, J. (2012). The impact of dietary calcium and oxalate ratios on stone risk. Urology, 79(6); 1226-1229.
22. Li, W., Yan, M., Liu, Y., Liu, Z., Wang, Z., Chen, C. (2016). Ginsenoside Rg5 ameliorates cisplatin-induced nephrotoxicity in mice through inhibition of inflammation, oxidative stress, and apoptosis. Nutrients, 8(566); 1-17.
23. Marengo, S.R., Romani, A.M. (2008). Oxalate in renal stone disease: the terminal metabolite that just won't go away. Nat Clin Pract Nephrol, 4(7); 368-77.
24. Mehmood, N., Zubair, M., Rizwan, K., Rasool, N., Shahid, M., Uddin, A.V. (2012). Antioxidant, antimicrobial and phytochemical analysis of *Cichorium intybus* seeds extract and various organic fractions. Iranian J of Pharmaceutical Research, 11(4); 1145-1155.
25. Mulay, S.R., Evan, A., Anders, H. (2013). Molecular mechanism of crystal related kidney inflammation and injury. Implications for cholesterol embolism, crystalline nephropathies and kidney stone disease. Nephrol Dial Transplant, 30; 1-8.
26. Okada, R., Wakai, K., Naito, M., Morita, E., Kawai, S., Hamajima, N. (2012). Proanti inflammatory polymorphisms and chronic kidney disease: a cross sectional study. BMC Nephrology, 13(2); 2-8.
27. Piltan, A., Totonchi, M., Rezazadeh, M., Gourabi, H., Karimian, L., Baghaban Eslaminejad, M. (2010). Quantitative expression of bag1, bax and bcl-2 genes in human embryos with different fragmentation grades derived from ART. Yakhteh Medical Journal, 12(2); 257-266.
28. Thomas, P. (2001). Tumor necrosis factor- : The role of this multifunctional cytokine in asthma. Immunology and Cell Biology, 79; 132-140.
29. Sheng, L-Ch., Lau, J. Godin, G., Maachi, N., Wu, H., Xin Zhu, J. (2012). Bcl-2-modifying factor induces renal proximal tubular cell apoptosis in diabetic mice. Original Article, 61; 474-484.
30. Wen Ying, G., Jin Guiz, L. (2012). Chicory seeds: a potential source of nutrition for Food and feed. J of Animal & Plant Sciences, 13(2); 1736-1746.
31. Zaman, R., Noorul Basar, S. (2013). A review article of beekhe kasni (*Cichorium intybus*) its traditional uses and pharmacological

actions. Research Journal of Pharmaceutical Sciences, 2(8); 1-4.
32. Zhi Bai, X., He, H., GAO, JX., Liu, Y., Qi Liu, J., Han, SCh. (2016). Melatonin prevents

acute kidney injury in severely burned rats via the activation of sirtl. Scientific Reports, 6(32199); 1-13.



Archive of SID

Study of the Gene Expression Changes TNF- α , BCL2, IL-6, and IL-1 In Male Rats with Nephrolithiasis Treated the Aqueous Extract of *Cichorium intybus* L. Flower

M. Zaman Emamiyan¹, M. Tehranipour², Gh.Hassan Vaezi³, Kh. Nejad Shahrokh Abadi⁴, A. Shiravi⁵

1. Department of Biology, Damghan Branch, Islamic Azad University, Damghan, Iran.

2. Associate Professor, PhD in Animal Physiology, Department of Biology, Mashhad Branch, Islamic Azad University, Mashhad, Iran

3. Department of Microbiology, Faculty of Sciences, Karaj Branch, Islamic Azad University, Alborz, Iran. gh.vaezi@yahoo.com

4. Assistant Professor, PhD in Molecular Genetics, Department of Biology, Mashhad Branch, Islamic Azad University, Mashhad, Iran

5. Department of Biology, Damghan Branch, Islamic Azad University, Damghan, Iran.

Received: 2018. 2. 4

Accepted: 2019.31.5

Abstract

Introduction & Objective: Cytokines TNF- α , IL-6, and IL-1 cause an inflammatory response or infection, and ultimately increase cell destruction (reduced expression of anti-apoptotic BCL2 protein) in damaged tissue. In this study, we investigated the effect of the aqueous extract of chicory flower on the expression of relevant genes.

Material and Methods: Twenty-four male Wistar rats were assigned to four groups of Since the first day of the intervention, the healthy control group, received ethylene glycol group, prevention groups was administered 50 mg/kg and 200 mg/kg of the aqueous extract of intraperitoneal chicory aqueous extract and 1% ethylene glycol (EG) for the induction of calcium crystals formation. The intervention was continued for 30 days. RNA was extracted from kidney tissues and cDNA was synthesized. Finally, using the Real Time polymerase chain reaction (PCR) technique, the expression levels of IL-1, IL-6, BCL2, and TNF- α were evaluated.

Results: Data analysis by one-way analysis of variance, Tukey's test and software SPSS showed that in the prevention groups 1 and 2, there was a significant increase in BCL2 expression and a significant reduction in TNF- α expression ($P < 0.001$). Also, the expression of IL-1 significantly increased in rats administered 200 mg of chicory extract, while the expression of IL-6 was significantly enhanced in rats given 50 mg of chicory extract ($P < 0.001$).

Conclusion: Chicory flower extract is effective in eliminating the necrotic effects of TNF- α and consequently, reducing apoptosis in renal epithelial cells. However, it does not affect IL-6, particularly the removal of infection caused by IL-1.

Keywords: Chicory Flower (*Cichorium intybus* L.), IL-1, IL-6, BCL2, TNF- α .