

## بررسی اثر سائیتوتوکسیسیتی و بازدارندگی عصاره ریزوم شیرین بیان (*Glycyrrhiza glabra*) و گل بابونه (*Matricaria aurea*) بر فعالیت ماتریکس متالوپروتئینازها (MMPs) در مقایسه با ترکیبات استروئیدی و غیر استروئیدی در کشت سلولی فیبروساکروما

دکتر نسرين عاقل<sup>۱</sup>، دکتر علی خدادادی<sup>۲</sup>، دکتر مجید اسماعیلیان<sup>۳</sup>

تاریخ دریافت ۸۶/۲/۲۳، تاریخ پذیرش ۸۶/۹/۶

### چکیده

**مقدمه:** آنزیم‌های ماتریکس متالوپروتئیناز (MMPs)، خانواده بزرگ آنزیم‌های پروتئولیتیک وابسته به کلسیم و روی هستند که در تجزیه ترکیبات مختلف ماتریکس خارج سلولی نقش دارند. نقش این آنزیم‌ها در پیشرفت و گسترش بیماری‌های التهابی (آرتریت روماتوئید)، بیماری‌های قلبی عروقی و تومورهای سرطانی کاملاً شناخته شده است. مطالعات انجام شده دال بر اثر مهار ترکیبات ضد التهاب غیر استروئیدی (NSAIDs) و استروئیدی (دگزامتازون) بر روی ماتریکس متالوپروتئینازها است.

**مواد و روش کار:** در این تحقیق اثر مهار و سمیت سلولی عصاره هیدروالکلی گیاهان شیرین بیان و بابونه در مقایسه با داروهای استروئیدی و غیر استروئیدی با به کارگیری سل لاین فیبروساکروما (Wehi 164) برای بررسی سمیت سلولی و روش ژلاتین زایموگرافی برای سنجش میزان اثر مهارکنندگی بر فعالیت ماتریکس متالوپروتئینازها بررسی شد.

**یافته‌ها:** نتایج نشان داد که اثر مهار کنندگی شیرین بیان و بابونه، به ترتیب، معادل  $95.00 \mu\text{g/ml}$  و  $933/33$  و سمیت سلولی به دست آمده برای این گیاهان، به ترتیب، معادل  $326/67 \mu\text{g/ml}$  و  $3450$  بود.

**نتیجه گیری:** گیاهان بابونه و شیرین بیان سمیت سلولی بسیار کمتری ولی اثر مهار ضعیف تری نسبت به داروهای استروئیدی و غیر استروئیدی بکار رفته در این تحقیق از خود نشان دادند. همچنین مشخص شده است که سمیت سلولی بابونه  $0/1$  سمیت سلولی شیرین بیان است.

**کلید واژگان:** ماتریکس متالوپروتئینازها، شیرین بیان، گل بابونه، سمیت سلولی

مجله پزشکی ارومیه، سال نوزدهم، شماره دوم، ص ۱۳۸-۱۳۲، تابستان ۱۳۸۷

آدرس مکاتبه: اهواز، دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور، دانشکده پزشکی گروه ایمن شناسی، تلفن ۰۹۱۶۱۱۸۳۳۵۷

E-mail: Alkhodadadi@yahoo.com

### مقدمه

ماتریکس خارج سلولی موجب تخریب بافت می‌گردد و واکنش‌های التهابی را تسریع می‌کند. یکی از نقش‌های پاتولوژیک مهم MMP ها سرطان است. این ماتریکس‌ها در شروع کارسینوم‌ها و افزایش آنژیوژنز تومور و تخریب ساختمان بافت سرطانی نقش دارند و با شکست سدهای غشاء بازال باعث گسترش متاستاتیک تومور و پیشرفت آن می‌شوند. تولید MMPs در اکثر سلول‌ها یک فرآیند دائمی است لیکن در سلول‌های

ماتریکس متالوپروتئینازها (MMPs) خانواده‌هایی از آندوپیتیدازهای وابسته به عناصر روی و کلسیم می‌باشند که توانایی روتولیز بسیاری از ترکیبات ماتریکس خارج سلولی را دارند (کلاژن‌ها، پروتئوگلیکان‌ها و گلیکو پروتئین‌ها) و با این کار سبب تشدید روند پاسخ‌های التهابی می‌شوند (۲۰۱). در شرایط پاتولوژیک نظیر بیماری آرتریت روماتوئید، بیماری‌های قلبی - عروقی و سایر بیماری‌های التهابی تجزیه بیش از حد

<sup>۱</sup> استادیار گروه فارماکولوژی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز (نویسنده مسئول)

<sup>۲</sup> استادیار گروه ایمنولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز

<sup>۳</sup> دکترای حرفه ای داروسازی

تهیه عصاره‌های گیاهی:

ریشه گیاه شیرین بیان و گل‌های گیاه بابونه به صورت تایید شده از شرکت گل داروی اصفهان خریداری شد. عصاره هیدروالکلی گیاهان فوق به روش پرکولاسیون به مدت ۴۸ ساعت با استفاده از حلال اتانول ۸۰ درجه تهیه گردید. عصاره‌ها پس از صاف کردن، توسط دستگاه تقطیر در خلاء تا حد خشکی تغلیظ شدند. عصاره‌های خشک تا زمان استفاده در یخچال نگهداری شدند.

ارزیابی اثرات سایتوتوکسیسیته عصاره‌های گیاهی:

کشت سلول - سلول لاین فیبروسارکوما Wehi 164 تهیه شده از بانک سلولی انستیتو پاستور ایران به تعداد بیست هزار سلول در هر چاهک در پلیت ۹۶ خانه‌ای در محیط کشت RPM 1640 دارای ۵ درصد سرم جنین گوساله، پنی سیلین صد میکرونیوت در میلی لیتر و استرپتومایسین صد میکروگرم در میلی لیتر تحت شرایط ۵ درصد دی اکسید کربن در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و رطوبت اشباع کشت داده شدند (۸).

آنالیز دوز پاسخ - رقت‌های سریال دیکلوفناک سدیم، پیروکسیکام و دگزامتازون با غلظت ۱۰ تا ۲۰۰ میکروگرم در میلی لیتر، عصاره هیدروالکلی بابونه با غلظت ۱۰ تا ۸۰۰۰ میکروگرم در میلی لیتر و شیرین بیان با غلظت ۱۰ تا ۱۰۰۰ میکروگرم در میلی لیتر به کشت سلول‌ها اضافه شد و پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون، سلول‌ها مورد رنگ سنجی قرار گرفتند. از محیط کشت سلول‌ها به منظور انجام تست زایموگرافی نمونه برداری شد. مراحل فوق ۳ بار تکرار شدند.

رنگ سنجی - به منظور بررسی اثرات سایتوتوکسیسیته پس از هر آزمایش، سلول‌ها با بافر سالین فسفات سرد شسته و با محلول فرمالدئید ۵ درصد به مدت ۵ دقیقه ثابت شدند. سلول‌های تثبیت شده با کریستال ویوله یک درصد به مدت ۵ دقیقه رنگ آمیزی شدند. پس از شستشو، به سلول‌های رنگ آمیزی شده محلول اسید استیک ۳۳ درصد اضافه شد. رنگ ارغوانی حاصل با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر (Epson, Germany) در طول موج ۵۸۰ نانومتر خوانده شد و درصد سلول‌های زنده محاسبه گردید.

ارزیابی اثرات مهارکنندگی عصاره‌های گیاهی:

ژلاتین زایموگرافی - نمونه‌ها در ژل پلی آکریل آمید حاوی دو میلی گرم در میلی لیتر در حضور دودسیل سولفات تحت شرایط غیر احیاء به مدت سه ساعت در هشتاد ولت الکتروفورز شدند. سپس ژل با Triton x 100 با غلظت ۲/۵ درصد به منظور حذف سدیم دودسیل شسته شدند. ژل حاصل به مدت یک شب در

سیستم ایمنی نظیر ماکروفاژها و نوتروفیل‌ها به فرم ذخیره وجود داشته و تحت شرایط مختلف آزاد می‌شوند، لذا مهارکننده‌های طبیعی MMPs در کنترل فعالیت التهاب نقش به‌سزایی دارند (۴،۳).

یکی از روش‌های بررسی فعالیت‌های آنزیمی روش زایموگرافی است. در این روش سوبسترای واکنش با مواد تشکیل دهنده SDS PAGE کوپل شده و سپس الکتروفورز انجام می‌شود. پس از اتمام کار، ژل با بافر شستشو شده و در بافر حاوی کاتیون‌های لازم برای فعالیت متالوپروتئینازها جهت عمل آنزیم روی سوبسترا انکوبه می‌شود. فعالیت پروتئولیتیک پس از رنگ آمیزی و رنگ‌بری با ظهور هاله‌های شفاف و بی‌رنگ تعیین می‌شود (۵).

مطالعات انجام شده بر روی گیاهان دارویی در زمینه اثر مهارکنندگی آنها بر روی ماتریکس متالوپروتئینازها بسیار محدود است. این بررسی‌ها نشان داده‌اند که فلاونوئیدها، در غلظت‌های فیزیولوژیکی، قادرند دو گروه از این آنزیم‌ها به نام MMP-2 و MMP-9 را مهار کنند (۶).

ریزوم گیاه شیرین بیان حدود ۱- ۱/۵ درصد ترکیبات فلاونوئیدی دارد که عمدتاً از جفت ایزومرهای چالکونی (ایزولیکوئیرتین) و فلاونونی (لیکوئیرتین) تشکیل شده‌اند (۷). ماده مؤثره ضد التهابی این گیاه گلیسیریزین است که به میزان ۶-۱۲ درصد در ریزوم خشک وجود دارد. از ترکیبات مؤثره گل‌های بابونه فلاونوئیدهای گروه متوکسی فلاوان‌ها و متوکسی فلاونول‌ها (آپی ژنین و لوتولین) را می‌توان نام برد که اثرات ضد التهابی دارند. ترکیبات ماتریسین، بیزابولول و اکسیدهای آن نیز اثر ضد التهابی دارند (۷). در این مطالعه سعی شده است اثرات سایتوتوکسیسیته و مهارکنندگی عصاره‌های هیدروالکلی ریزوم شیرین بیان<sup>۱</sup> و گل‌های بابونه<sup>۲</sup> با بکارگیری سل لاین فیبروسارکوما (Wehi 164) برای بررسی سمیت سلولی و روش ژلاتین زایموگرافی برای سنجش میزان اثر مهارکنندگی بر فعالیت ماتریکس متالوپروتئینازها مورد بررسی قرار گیرد. نتایج بدست آمده با داروهای ضد التهاب غیر استروئیدی (دیکلوفناک و پیروکسیکام) و استروئیدی (دگزامتازون) که اثرات سایتوتوکسیسیته و مهارکنندگی آنها بر روی فعالیت ماتریکس متالوپروتئینازها قبلاً اثبات شده است، مقایسه گردید.

## مواد و روش کار

کلیه مواد شیمیایی و محیط‌های کشت مورد نیاز در این تحقیق از شرکت Roche آلمان تهیه شده است.

<sup>1</sup> Glycyrrhiza glabra

<sup>2</sup> Matricaria aurea

قرار گرفت (جدول ۱). مایع روئی محیط کشت‌های هر چاهک را برداشته و میزان فعالیت متالوپروتئینازها در آن اندازه‌گیری شد. اعداد بدست آمده نمایانگر فعالیت نسبی آنزیم بوده که به صورت Relation expression بیان شده است. در نمودارهای (۴-۶) فعالیت نسبی آنزیم (که به دلیل روند کاهنده به نام اثر مهارى خوانده می‌شود) مربوط به هر گیاه و داروها ذکر شده است. بعد از محاسبه IC50 مربوط به آنها، گروه‌های مختلف مورد آنالیز آماری قرار گرفتند (جدول ۲).

چنان‌که مشاهده می‌شود، عصاره‌های تام ریزوم شیرین بیان و گل‌های بابونه به صورت وابسته به دوز سبب کاهش فعالیت ماتریکس متالوپروتئینازها می‌شوند (جدول ۲). در مقایسه با داروهای استروئیدی و غیراستروئیدی بکار رفته در این تحقیق، گیاهان فوق اثر مهارى خود را در دوزهای بالاتر نشان می‌دهند. گیاهان بابونه و شیرین بیان با  $P < 0.0043$  با یکدیگر و با سایر داروها بکار رفته از لحاظ اثر مهارکنندگی اختلاف معنی‌دار دارند (جدول ۲).

همان‌طور که از نمودارها مشخص است، گیاهان بابونه و شیرین بیان به صورت وابسته به دوز دارای سمیت سلولی هستند (جدول ۱). این گیاهان با  $P < 0.0043$  اختلاف معنی‌دارى با یکدیگر و با داروهای دیکلوفناک، پیروکسیکام و دگزامتازون دارند (جدول ۱).

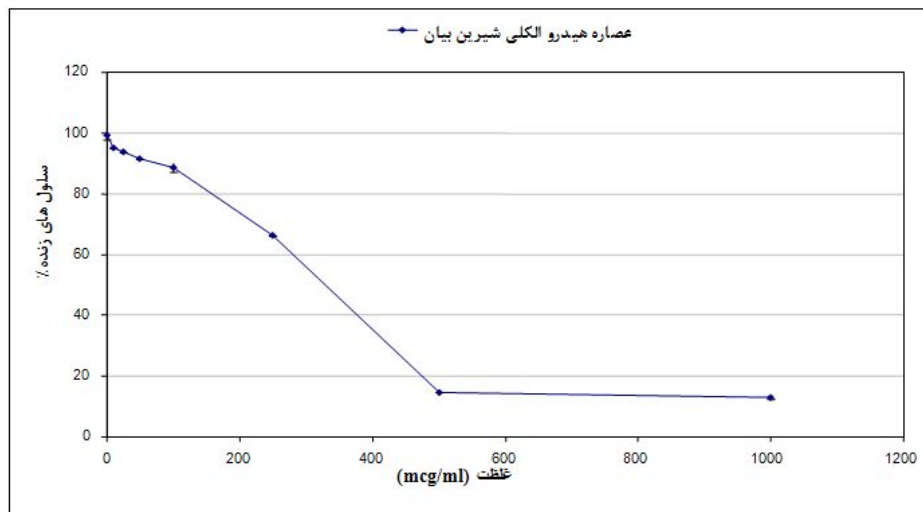
۳۷ درجه سانتی‌گراد درون محلول حاوی ۰/۱ مولار تریس هیدروکلراید و ۱۰۰ میلی مولار کلسیم کلراید نگهداری و سرانجام با کوماسی آبی (۰/۰۵٪) رنگ آمیزی شد. در این حالت مناطق پروتئولیز شده (باندهای بی‌رنگ) در زمینه اصلی مشخص شدند (۹). ارزیابی کمی از طریق محاسبه چگالی سطح به وسیله نرم افزار رایانه‌ای امکان پذیر شد که در نهایت فعالیت آنزیم به صورت نسبی بیان شد.

#### آنالیز آماری:

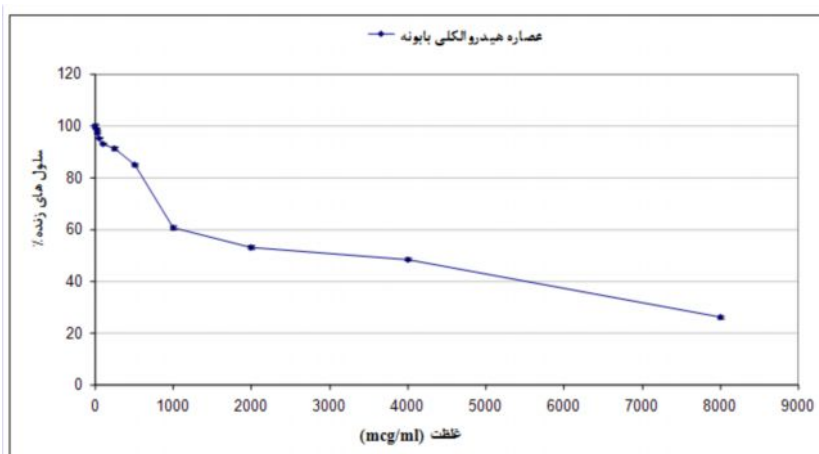
آزمون آماری Kruskal - Wallis و متعاقب آن تست Conover - Inman به منظور مقایسه اثرات سایتوتوکسیسیته و مهارکنندگی عصاره گیاهان شیرین بیان و بابونه با داروهای دیکلوفناک، پیروکسیکام و دگزامتازون مورد استفاده قرار گرفت. در این مطالعه P value کمتر از ۰/۰۵ معنی‌دار تلقی گردید.

#### نتایج

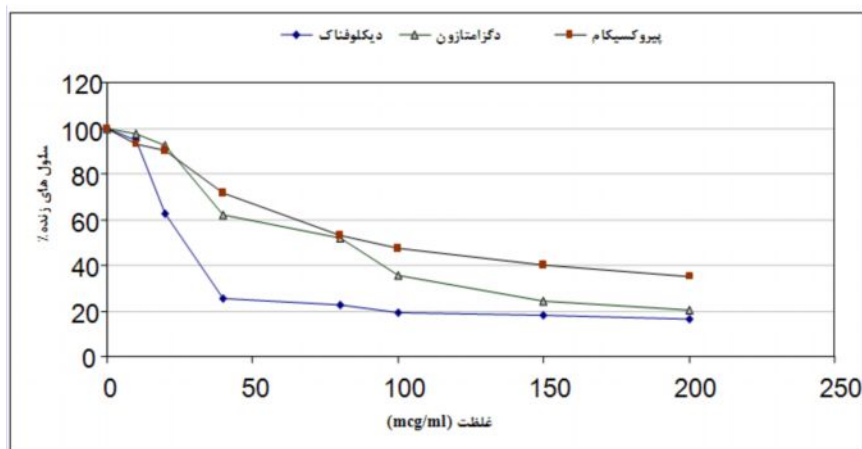
سلول‌ها به مدت ۲۴ ساعت تحت تیمار با غلظت‌های بالارونده عصاره‌های گیاهان شیرین بیان و بابونه و همچنین داروهای پیروکسیکام، دگزامتازون و دیکلوفناک قرار گرفتند. درصد سلول‌های زنده در هر چاهک محاسبه و براساس میانگین سه بار تکرار نمودارهای مربوطه رسم گردید (نمودارهای ۱-۳). سپس برای هر نمودار مقدار IC50 محاسبه گردیده و مورد آنالیز آماری



نمودار(۱): اثرات سایتوتوکسیسیته عصاره هیدرو الکلی گیاه شیرین بیان



نمودار (۲): اثرات سایتوتوکسیسیته عصاره هیدرو الکلی گیاه بابونه



نمودار (۳): اثرات سایتوتوکسیسیته داروهای دیکلوفناک، دکزامتازون، پیروکسیکام

جدول (۱): مقایسه میانگین IC50 های به دست آمده (mcg/ml) مربوط به اثرات سایتوتوکسیسیته با استفاده از تست های

آماري Kruskal-Wallis و Conover-Inman

	بابونه (3450 ± 50.00)	پیروکسیکام (90 ± 1.00)	دکزامتازون (82.67 ± 0.76)	دیکلوفناک (27.00 ± 0.50)
شیرین بیان (326.67 ± 2.36)	*	*	*	*
بابونه (3450 ± 50.00)		*	*	*
پیروکسیکام (90 ± 1.00)			*	*
دکزامتازون (82.67 ± 0.76)				*

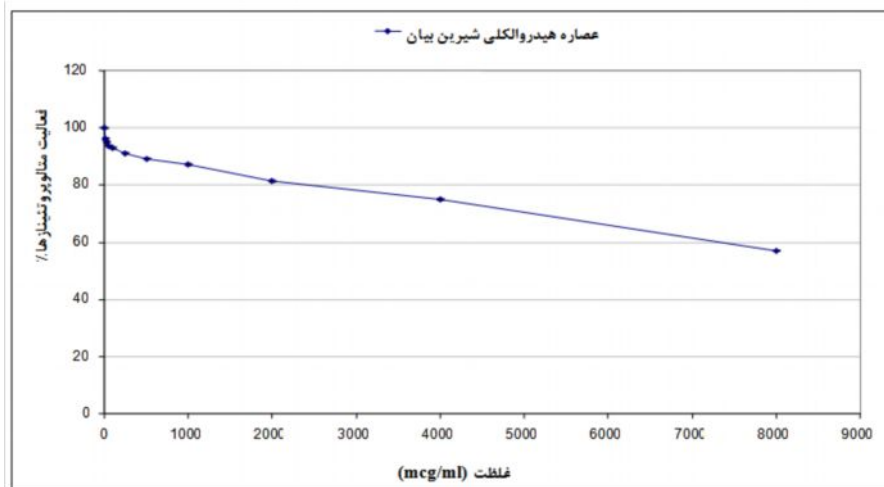
Kruskal-Wallis test:

= 5 گروه ها

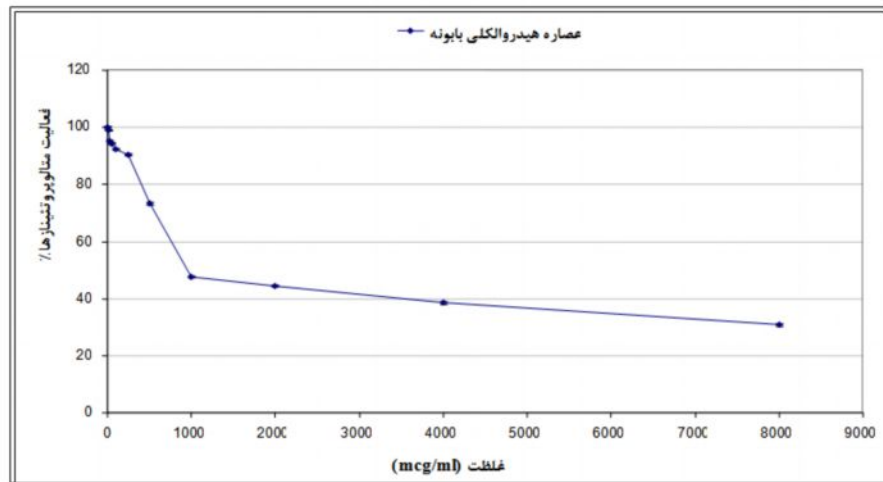
= 4 درجه آزادی

= 15 تعداد مشاهدات

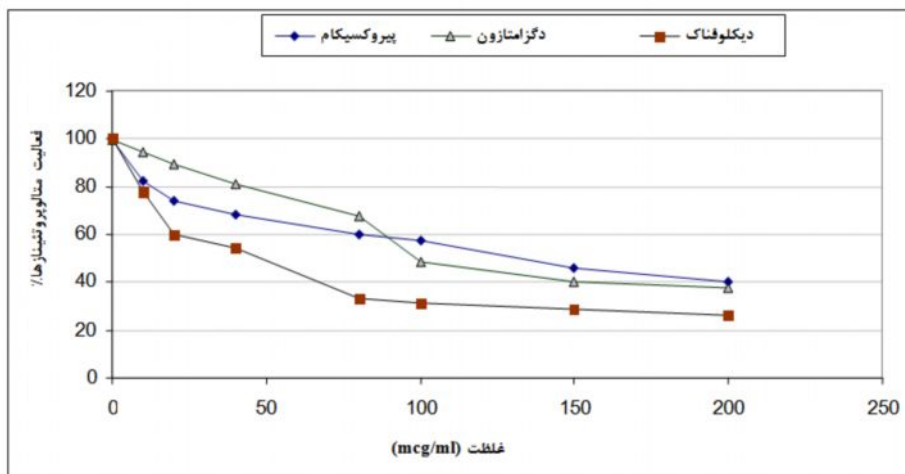
\*اختلاف معنی دار با  $p < 0.0043$  وجود دارد.



نمودار (۴): اثرات مهيار کنندگی عصاره هیدرو الکلی گیاه شیرین بیان



نمودار (۵): اثرات مهيار کنندگی عصاره هیدرو الکلی گیاه بابونه



نمودار (۶): اثرات مهيار کنندگی داروهای دیکلوفناک، دگزامتازون، پیروکسیکام

**جدول (۲):** مقایسه میانگین IC50 های بدست آمده (mcg/ml) مربوط به اثرات مهارکنندگی با استفاده از تست‌های

آماري Conover-Inman و Kruskal-Wallis

	بابونه (933.33 ± 28.87)	پیروکسیکام (134.33 ± 1.15)	دگزامتازون (97.67 ± 0.58)	دیکلوفناک (47.33 ± 0.58)
شیرین بیان (9500 ± 50.00)	*	*	*	*
بابونه (933.33 ± 28.87)		*	*	*
پیروکسیکام (134.33 ± 1.15)			*	*
دگزامتازون (97.67 ± 0.58)				*

Kruskal-Wallis test:

5 = گروه‌ها

4 = درجه آزادی

15 = تعداد مشاهدات

\* اختلاف معنی دار با  $p < 0.0043$  وجود دارد.

### بحث و نتیجه گیری

ماتریکس متالوپروتئینازها (ماتریکسین‌ها) توسط سلول‌های التهابی مانند ماکروفاژها، لنفوسیت‌ها، نوتروفیل‌ها و ائوزینوفیل‌ها و نیز توسط سلول‌های ساختمانی مانند فیبروبلاست‌ها، سلول‌های اپی تلیال و اندوتلیال تولید می‌شوند. ماتریکسین‌ها با از بین بردن پروتئین‌های سطحی سلول‌ها (عامل استحکام بین سلول‌ها) باعث افزایش مهاجرت سلول‌های اپیتلیال و متاستاز سلول‌های سرطانی می‌شوند (۱۰). سایتوکینین‌ها (در سلول‌های آسیب دیده) و هیپوکسی (ویژگی بافت‌های ملتهب مانند زخم‌ها و تومورها) منجر به القاء متالوپروتئینازها می‌شوند.

بررسی‌ها نشان داده اند که داروهای ضد التهاب غیر استروئیدی و نیز دگزامتازون فعالیت ماتریکس متالوپروتئیناز را مهار می‌کنند در حالی که بر روی فعالیت مهار کننده‌های بافتی آنها و نیز بیوسنتز تائیری ندارند (۱۱). مکانیسم احتمالی فعالیت مهارکنندگی داروهای ضد التهاب غیر استروئیدی از راه مهار رونویسی ژن ماتریکس متالوپروتئینازها است (۱۲). سرکوب ماتریکس متالوپروتئینازها یکی از مکانیسم‌هایی است که داروهای ضد التهاب غیر استروئیدی، آنژیوزنز و متاستاز سلول‌های سرطانی را مهار می‌کنند (۱۱، ۱۲).

استفاده از ترکیبات ضد التهاب غیر استروئیدی موجب عوارض جانبی متعددی نظیر اختلالات گوارشی و زخم معده است. یافتن ترکیبات موثر در مهار ماتریکسین‌ها با عوارض جانبی و سمیت سلولی کمتر مورد نظر همه دانشمندان است.

مطالعات انجام شده بر روی گیاهان در زمینه اثر مهار کنندگی آنها بر روی ماتریکس متالوپروتئینازها بسیار محدود می‌باشد. Puricelli و همکاران اثر مهارکنندگی عصاره‌های آبی دو گیاه *Passiflora foetida* و *Passiflora edulice* (آفریقای جنوبی) پرداختند (۱۳). هر دو گیاه بر MMP-2 و MMP-9 به صورت وابسته به دوز اثر مهاری داشتند. همچنین IC50 مربوط به *Passiflora foetida* (حدود ۱ mg/ml) و *Passiflora edulice* (حدود ۴ mg/ml) محاسبه گردیده بود. طبق یافته‌های این تحقیق، بابونه با  $IC_{50} = 933.33/28.87 \mu g/ml$  از اثر مهاری بهتری نسبت به *Passiflora edulice* برخوردار است.

در مطالعه دیگری، اثر مهاری ۸۷ گیاه طب سنتی کره که در درمان انواع سرطان‌ها تجویز می‌شدند بر علیه MMP-9 مورد بررسی قرار گرفت (۱۴). عصاره‌های آبی و نیز فراکسیون‌های کلروفومی و هگزانی برخی از آنها اثر مهاری ضعیفی روی این آنزیم داشته‌اند. اثر مهاری تعدادی از فلاونوئیدها گیاهی بر علیه MMP-2 و MMP-9 نیز بررسی شده است (۱۵).

از لحاظ میزان فعالیت مهاری، بابونه با  $IC_{50} = 933.33/28.87 \mu g/ml$  اثری حدوداً ده برابر قوی‌تر از شیرین بیان با  $IC_{50} = 9500/50.00 \mu g/ml$  نشان می‌دهد. گیاهان بابونه ( $IC_{50} = 345.0 \mu g/ml$ ) و شیرین بیان ( $IC_{50} = 326/67 \mu g/ml$ ) سمیت بسیار کمتری نسبت به داروهای استروئیدی و غیراستروئیدی بکار رفته در این تحقیق دارند. همچنین مشخص شده است که سمیت سلولی بابونه ۰/۱ سمیت سلولی شیرین بیان است.

**References:**

1. Nagase H, Woessner JF. Matrix metalloproteinases. *J Biol Chem* 1999; 274: 21491-4.
2. Mossova, I, Kotra LP, Fridman, R, Mobashery S. Matrix Metalloproteinases: structure, evolution and diversification. *FASEB J* 1998; 12: 1075-95.
3. Edwards DR. The roles of tissue inhibitors of metalloproteinases in tissue remodeling and cell growth. *Int J Obes* 1996; 20: S9- 15.
4. Gomez DE. Tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, regulation and biological function. *Eur J Cell Biol* 1997; 74: 111-22.
5. Sarath G, De la Motte RS, Wagner FW. Protease assay methods. In: Beynon RJ, Bond JS, Editors. *Proteolytic enzymes- a practical approach*. Oxford: IRL Press; 1994. P. 25-55.
6. Gebhardt R, Ende C. Inhibition of matrix metalloproteinase-2 and -9 activities by selected flavonoids. *Planta Med* 2004; 70 (10):1006-8
7. کمیته تدوین فارماکوپه گیاهی ایران: فارماکوپه گیاهی ایران. تهران، وزارت بهداشت درمان و آموزش پزشکی، معاونت غذا و دارو، ۱۳۸۱. صفحات: ۱۰۷-۹۹ و ۷-۵۲۰.
8. Saadat F, Zomorodian K, Pezeshki M, Khorramizadeh MR. The potential role of nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDS) in chemoprevention of cancer. *Pak J Med Sci* 2003; 19: 13-7.
9. Heussen C, Dowdle EB. Electrophoretic analysis of plasminogen activators in polyacrylamide gels containing sodium dodecyl sulfate and copolymerized substrates. *Anal Biochem* 1980; 102: 196-202.
10. Burke B. The role of matrix metalloproteinase 7 in innate immunity. *J Immunobiol* 2004; 209: 51-6.
11. Sadowski T, Steinmeyer J. Effects of non-steroidal anti inflammatory drugs and dexamethasone on the activity and expression of matrix metalloproteinase-1, matrix metalloproteinase-3 and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 by bovine articular chondrocytes. *Osteoarthritis Cartilage* 2001; 9(5): 407-15.
12. Pan MR, Hung WC. Non-steroidal anti inflammatory drugs inhibit matrix metalloproteinase-2 via suppression of the ERK/Sp1-mediated transcription. *J Biol Chem* 2002; 277: 32775-80.
13. Puricelli L, Dell'Aica I, Sartor L, Garbisa S, Caniato R. Preliminary evaluation of inhibition of matrix-metalloproteinase MMP-2 and MMP-9 by *Passiflora edulis* and *P. foetida* aqueous extracts. *Fitoterapia J* 2003; 74 (3):302-4.
14. Seo UK, Lee YJ, Kim JK, Cha BY, Kim DW, Nam KS, et al. Large-scale and effective screening of Korean medicinal plants for inhibitory activity on matrix metalloproteinase-9. *J Ethnopharmacol* 2005; 97(1): 101-6.
15. Ende E, Gebhardt R. Inhibition of matrix metalloproteinase-2 and -9 activities by selected flavonoids. *Planta Med* 2004; 70 (10):1006