

## ارزیابی اثر مهارکنندگی دارچین در جلوگیری از تشکیل فوم سل در هم کشتی پلاکت‌ها و مونوسیت‌ها

مریم خیابانی‌راد<sup>۱</sup> (M.Sc)، محمدحسین محمدی<sup>۲</sup> (Ph.D)، نادر وظیفه شیران<sup>۱</sup> (M.Sc)، محسن حمیدپور<sup>۲\*</sup> (Ph.D)

۱- گروه خون‌شناسی و بانک خون، دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران

۲- مرکز تحقیقات سلول‌های بنیادی خونساز، گروه خون‌شناسی و بانک خون، دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۱۲/۲ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۴/۴

\* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۲۱-۲۲۷۱۷۵۰۴ mohsenhp@smbu.ac.ir

### چکیده

هدف: آترواسکلروزیس یکی از علل بروز بیماری قلب و عروق می‌باشد. به دنبال آسیب اندوتلیوم عروق پلاکت‌ها در آن ناحیه تجمع پیدا کرده و موجب فراخوانی مونوسیت‌ها و تبدیل آن‌ها به ماکروفاژ می‌شود، با انباشته شدن LDL در زیر اندوتلیال دیواره شریانی به تدریج به ox-LDL تبدیل می‌شود. ماکروفاژها با بلعیدن ox-LDL تبدیل به فوم سل (ماکروفاژ حاوی لیپیدها) شده و سپس منجر به تشکیل آتروم می‌گردد. عصاره گیاهان دارویی متعددی از جمله دارچین، برای کمک به درمان این بیماری مورد استفاده قرار می‌گیرند. عصاره آبی دارچین باعث تعدیل فعال سازی ماکروفاژ و کاهش کلاسترول سلولی می‌شود و در درمان آترواسکلروزیس مفید است. لذا در این مطالعه اثر مهارکنندگی دارچین در جلوگیری از تشکیل فوم سل‌ها در هم کشتی پلاکت‌ها و مونوسیت‌ها مورد ارزیابی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها: میزان دوز موثر عصاره آبی دارچین (Cinnamon)، بر رده سلولی منوسیتی (U937) توسط آزمون MTT بررسی و بهترین دوز انتخاب شد. تعداد فوم سل‌ها با رنگ آمیزی Oil Red O و بیان ژن‌های گیرنده‌های کلاسترول در ماکروفاژها با استفاده از Real time-PCR سنجیده شد.

یافته‌ها: تعداد فوم سل‌ها هنگام تیمار ماکروفاژ و پلاکت با عصاره آبی دارچین نسبت به کنترل کاهش معناداری داشت. بیان ژن‌های LXR $\alpha$ , CD36, ABCA1 و PPAR $\gamma$  که نقش کلیدی در متابولیسم کلاسترول و گیرنده آن به عهده دارند در ماکروفاژهای نمونه‌های تیمار شده با دارچین نسبت به نمونه کنترل افزایش معناداری داشتند ( $P < 0.05$ ).

نتیجه‌گیری: عصاره آبی دارچین سبب کاهش تشکیل فوم سل‌ها شده و می‌تواند کمک به درمان آترواسکلروزیس پیشنهاد شود.

### واژه‌های کلیدی: دارچین، پلاکت خون، فوم سل، آترواسکلروزی

#### مقدمه

التهابی می‌گردند [۸]. از طرفی پلاکت‌ها به وسیله اسکاونجر ر سپتورهای خود مانند CD36 می‌توانند ox-LDL را از محیط برداشت کرده و سپس با بر همکنش با ماکروفاژها و بلعیده شده توسط آن‌ها منجر به تشکیل فوم سل شده و در روند بروز پلاک آترواسکلروتیک دخیل باشند [۹-۱۲]. سیلان LDL در ماکروفاژ با چندین ژن تنظیم می‌شود؛ از جمله ABCA1 (ATP-binding cassette)، Liver X Receptor (LXR)، و PPAR $\gamma$  (Peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$ ) که منجر به خروج کلاسترول شده، در حالی که CD36 به عنوان یک رسپتور (ورودی) موجب ورود کلاسترول به سلول می‌شود [۱۳].

آترواسکلروزیس یک بیماری التهابی پیش‌رونده است که به دلیل رسوب لیپیدها در سلول‌های اندوتلیوم سرخرگ‌ها ایجاد می‌شود و یکی از علل بیماری قلب و عروق می‌باشد [۲، ۱]. بروز این بیماری در سال‌های اخیر در جهان از جمله ایران بین ۲۰ تا ۴۵ درصد افزایش یافته است [۳، ۴]. گرچه مکانیسم آترواسکلروزیس پیچیده است ولی موادی مانند LDL، ox-LDL و سلول‌هایی از جمله: اندوتلیال، ماکروفاژها و پلاکت‌ها در بروز آن نقش دارند [۵، ۶]. آسیب اندوتلیوم عروق، موجب تحریک پلاکت‌ها شده، پلاکت‌های فعال مواد میتوزن و التهابی آزاد کرده [۷] و موجب فراخوانی مونوسیت‌ها به محل ضایعه شده و باعث تمایز آن‌ها به ماکروفاژهای

آماده سازی عصاره آبی دارچین: عصاره آبی دارچین در دانشکده‌ی طب سنتی دانشگاه علوم پزشکی شهیدبهشتی، توسط روش ماسراسیون تهیه و به روش فریز درایر خشک شد و نمونه‌ی دارچین با نام علمی *Cinnamomum cassia* (L.) و *presi* و کد بازار دارویی HMS-512 در دیتا بانک هر باریوم مرکز تحقیقات طب سنتی ثبت شد. برای استفاده، ابتدا ۱۰۰۰ میلی‌گرم پودر دارچین در ۱ میلی‌لیتر (Phosphate Buffer) PBS (Saline) حل شد و به عنوان ذخیره در دمای ۴ درجه نگهداری شد.

تهیه **ox-LDL**: ۵ حجم از محلول LDL تهیه شده از شرکت (Pishtaz Teb, IRAN) را به‌طور مستقیم به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در مجاورت ۱ حجم از محلول سولفات مس قرار داده که غلظت نهایی آن برابر با ۵ میکرومولار شد. سپس محلول حاصل به داخل کیسه دیالیز منتقل شد و به مدت ۲ ساعت در محلول EDTA (۱ میلی‌مولار) در دمای محیط و سپس ۲۴ ساعت در PBS در دمای ۴ درجه قرار گرفت و بعد از این مدت در شرایط استریل به داخل میکروتیوب منتقل شد و در دمای ۴ درجه نگهداری شد. جهت اطمینان از صحت و غلظت ox-LDL تهیه‌شده جذب نوری آن با رقت ۱:۱۰ در برابر استاندارد ox-LDL (Thermo fisher, USA) در طول موج‌های ۳۶۰ نانومتر با دستگاه اسپکتروفوتومتر (HALO VIS-20) اندازه‌گیری شد [۲۳].

تهیه پلاکت: کیسه‌ی پلاکت از سازمان انتقال خون تهیه شد و سپس در زیر هود ۱۰ میلی‌لیتر از آن در لوله فالتکون ریخته و در ۲۰۰g به مدت ۱۳ دقیقه در دمای اتاق به منظور جداسازی پلاسما غنی از پلاکت سانتریفوژ گردید. ۷ میلی‌لیتر پلاسما غنی از پلاکت در ۸۰۰g به مدت ۱۳ دقیقه سانتریفوژ گردید. مایع رویی تخلیه و تکمه‌ی پلاکتی با بافر Tyrode hepes حاوی کلسیم شست و شو گردید و در نهایت شمارش پلاکت‌ها با لام تئوبار انجام شد و به نسبت ۱ (سلول فیکس شده در چاهک پلیت) به ۱۰۰ (پلاکت) به چاهک اضافه شد.

کشت سلولی: در این مطالعه، سل‌لاین مونوسیتی با نام تجاری U937 از انی‌سیتو پاستور ایران تهیه گردید. سل‌لاین U937 برای اولین بار در سال ۱۹۷۴ از مرد ۳۷ ساله‌ی مبتلا به لنفوم هیستوسیتیک منتشر گرفته شده است. از ویژگی‌های این سلول: در محیط کشت هر ۳۰ تا ۴۰ ساعت یک بار دو برابر می‌شود و از نظر فنوتیپینگ؛ CD4، CD15، CD33، CD54 مثبت می‌باشد این سلول‌ها در محیط کشت RPMI حاوی ۱۰ درصد سرم جنین گاوی (FBS) و ۱ درصد از

برای درمان اتروسکلروزیس از استاتین که از داروهای مهارکننده آنزیم هیدروکسی متیل گلو تاریل کوآنزیم آ ردوکتاز هست استفاده می‌شود، متأسفانه شواهد نشان داده که در افرادی که مصرف طولانی استاتین دارند عوارض جانبی بسیاری بروز کرده است، از رایج‌ترین این عوارض می‌توان به میالژی عضلانی اشاره کرد [۱۴]. از طرفی امروزه، داروهای گیاهی به عنوان مکمل در کمک به درمان بیماری‌های قلبی - عروقی استفاده می‌شود [۱۵]. استفاده از گیاهان دارویی به دلیل خواص ضد لیپیدی، آنتی‌اکسیدانی و ضد التهابی امری رایج است، از جمله این مکمل‌ها می‌توان به عصاره‌های مرزه، ترخون [۱۷،۱۶] سیر، زنجبیل و زردچوبه اشاره کرد که دارای خواص ضد آترواسکلروتیک می‌باشد [۱۸]. پلی‌فنول‌های موجود در این گیاهان دارای اثر پلیوتروپیک (چند نمودی) هستند از جمله جلوگیری از تشکیل فوم سل، کاهش LDL سرمی و افزایش بیان پروتئین‌های CD36 و PPAR $\gamma$  و در نهایت تعامل NK-kB-DNA که منجر به تولید TNF- $\alpha$ ، ROS و مهار بیان پروتئین‌های MMP9 و MMP2 در ماکروفاژهای شده و منجر به کاهش بروز پلاک اتروسکلروتیک می‌گردد [۱۸،۱۹]. دارچین هم از گیاهان دارویی است که علاوه بر داشتن ترکیبات پلی‌فنلی عمدتاً حاوی ترکیبات موثری مانند سینامالدهید، اسید سینامیک، سینامات نیز می‌باشد [۱۹-۲۱]. ترکیبات فنلی و سینامیکی باعث کاهش سطح کلسترول سرمی از طریق مهار فعالیت هیدروکسی متیل گلو تاریل کوآنزیم آ ردوکتاز کبدی می‌شود [۲۲]. با توجه به فرایند تشکیل فوما سل از ماکروفاژ، از سل‌لاین U937 که از رده منوسیتی می‌باشد برای کشت در آزمایشگاه و تبدیل به ماکروفاژ استفاده می‌شود. ماکروفاژها با بلعیدن لیپیدها موجود در محیط کشت به فوم سل تبدیل شده که با رنگ‌آمیزی اتوزین همتوک سیلین (H&E) به صورت سلول کف مانند مشاهده می‌شوند. لذا در این مطالعه سل‌لاین U937 را به عنوان مدل ماکروفاژ انتخاب کرده و اثر عصاره دارچین را به منظور کاهش فوم سل‌ها و بیان ژن اسکاونجر رسپتورها مورد بررسی قرار دادیم.

## مواد و روش‌ها

هدف از این تحقیق، انجام آزمایشاتی به منظور بررسی مورفولوژیک منوسیت‌های القا شده به سمت ماکروفاژ و کشت داده شده با پلاکت و ox-LDL به تنهایی و همراه با یک‌دیگر که حاصل آن تشکیل فوم سل‌ها می‌باشد. از طرفی بررسی اثر عصاره دارچین در مهار تشکیل این فوم سل‌ها و همچنین بیان میزان ژن گیرنده‌های سطحی و درون هسته‌ای فوم سل‌ها می‌باشد.

گروه ۲: ماکروفاژ+ox-LDL (کنترل در این گروه)، ماکروفاژ+ox-LDL+دارچین (تیمار)  
گروه ۳: ماکروفاژ+ox-LDL+پلاکت (کنترل در این گروه)، ماکروفاژ+ox-LDL+پلاکت+دارچین (تیمار)  
گروه ۴: ماکروفاژ+پلاکت (کنترل در این گروه)، ماکروفاژ+پلاکت+دارچین (تیمار)

بررسی لیپیدهای درون سلولی با رنگ آمیزی Oil-Red O: رنگ آمیزی Oil-Red O برای بررسی فوم سل ها با استفاده روش اصلاح شده که توسط دکتر مهرپوری و همکاران معرفی شده انجام شد [۲۵]. سلول های تربیت شده در پلیت ۴۸ خانه ای با PBS شست و شو داده و سپس به مدت ۳۰ دقیقه با فرمالین ۱۰ درصد فیکس شدند. سپس سلول ها را با مدت ۱ دقیقه با ایزوپروپانول ۶۰ درصد رنگ پذیر کرده و به مدت ۳۰ دقیقه با رنگ Oil-Red O رقیق شده (۱:۱) با آب مقطر رنگ آمیزی شدند. سپس ۱۵ ثانیه رنگ بری با ایزوپروپانول انجام شد و مجدداً سلول ها ۲ بار با PBS شست و شو داده شدند و در نهایت با میکروسکوپ نوری Olympus فوم سل ها مشاهده شدند و با استفاده از برنامه Image J کمیت فوم سل ها نسبت به کنترل محاسبه شدند [۲۶].

بررسی تغییرات بیان ژن رسپتورهای درگیر در متابولیسم کلسترول با آزمون Real-Time PCR: جهت بررسی تغییرات بیان ژن های اسکاونجر رسپتورهای کلسترول بر روی ماکروفاژهای حاصل از سل لاین U937 از روش Real-Time PCR کمی استفاده شد. پس از تیمار این سلول ها با عصاره ای آبی دارچین و پلاکت و ox-LDL، RNA استخراج و سپس سنتز cDNA انجام شد و در نهایت میزان بیان اسکاونجر ورودی از جمله CD36 و رسپتورهای هسته ای PPAR $\gamma$  و LXR و همچنین اسکاونجر خروجی ABCA1 با پرایمرهای طراحی شده در جدول ۱ مورد بررسی و آنالیز قرار گرفت.

آنتی بوتیک پنی سیلین-۱ ستریتوماپ سین در دمای ۳۷ درجه ی سانتی گراد و رطوبت ۵ درصدی اکسید کربن کشت و پا ساز داده شد.

بررسی فعالیت متابولیک سلول ها به روش MTT: بررسی فعالیت متابولیک سلول ها را با کمک از روش اصلاح شده (Boncler et al) [۲۴] انجام شد به ترتیبی که: سلول های U937 را به مقدار ۶۰ هزار سلول با دوز ۲۰۰ نانومولار PMA و ۱۰۰ میکرولیتر محیط کشت حاوی FBS در چاهک های پلیت ۹۶ خانه ای کشت شد. روز سوم دوزهای مختلف دارچین (۷۰۰-۵۰ میکروگرم بر میلی لیتر) را محاسبه کرده و در هر چاهک ریخته شد. ۴۸ ساعت پس از اضافه کردن دارچین کل محیط حاوی آن را خالی کرده و ۱۰۰ میکرولیتر محیط تازه ریخته و پودر MTT را با غلظت ۵ mg در ۱ سی سی PBS حل کرده و به مقدار ۱۰ میکرولیتر به چاهک ها اضافه شد. پلیت ها ۳ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه نگهداری شد و سپس ۱۲ دقیقه با دور ۳۷۰۰ rpm در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد سانتریفوژ شده و مایع رویی را خالی کرده، به طوری که محلول داخل چاهک ها نباشد و ۱۰۰ میکرولیتر DMSO به هر چاهک اضافه کرده و به مدت ۵ دقیقه پلیت را تکان داده تا محلول یک دستی حاصل شود. سپس با الیزا ریدر XL800 در طول ۵۷۰ nm میزان جذب رنگ محلول ها خوانش شده و فعالیت متابولیک سلول ها، محاسبه گردید. سپس دوزهای مناسب از نظر این که تاثیر سایتوتوکسیک بر روی سلول ها نداشته باشد برای انجام مرحله ی بعدی یعنی رنگ آمیزی oil red o برای بررسی تاثیر این عصاره بر تمایز ماکروفاژها به سمت فوم سل و بیان ژن ها انتخاب شد. لازم به ذکر است ox-LDL به مقدار ۸۰ میکروگرم بر میلی لیتر و پلاکت به مقدار ۱۰۰ به ۱ (سلول) به چاهک ها اضافه گردید.

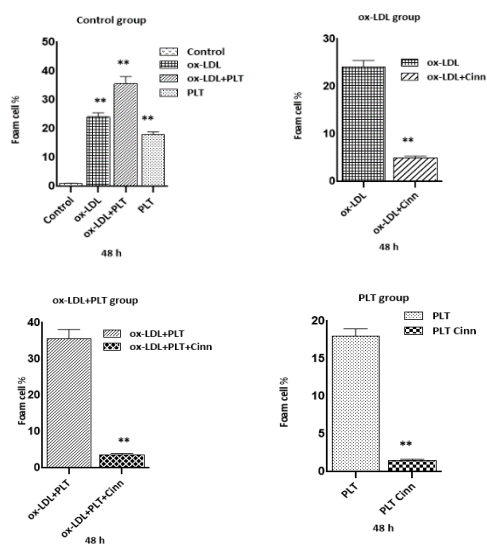
گروه ها به صورت زیر دسته بندی شدند:  
گروه ۱: ماکروفاژ PMA+U937 cells; (کنترل در این گروه)، ماکروفاژ+ox-LDL، ماکروفاژ+ox-LDL+پلاکت، ماکروفاژ+پلاکت

جدول ۱. پرایمر های طراحی شده که برای تهیه cDNA استفاده شد.

Primers that were used for cDNA synthesis.			
Gene	Forward primer (5'-3')	Reverse primer (5'-3')	Product size (bp)
ABCA1	GGCAATCATCAGGGTGCTGACG	CCGCAGAAAGATGTCATCAACG	97
CD36	GCAGCAACATTCAAGTTAAGC	AGCCTCTGTTCCAAGTATAG	158
PPAR $\gamma$	ATTCTCAGTGGAGACCGCCC	GGAAATGTTGGCAGTGGCTC	292
LXR	ACAACCCTGGGAGTGAGAGT	AACATCAGTCGGTCATGGGG	295
ABL1	CTTCTTGGTGCGTGAGAGTGAG	GACGTAGAGCTTGCCATCAGAAG	115

مقدار در مقایسه با کنترل هر گروه (تیمار نشده با دارچین) کاهش معناداری داشت. ( $P < 0.05$ ) که نتایج آن در شکل ۲ نشان داده شده است.

بیان ژن گیرنده‌های دخیل در متابولیسم کلسترول: نتایج Real-Time PCR نشان داد که دارچین موجب افزایش بیان ژن های PPAR $\gamma$  با ( $P < 0.01$ ) و LXR با ( $P < 0.05$ ) در سلول‌های تریت شده با عصاره دارچین می‌باشد. این ژن‌ها نقش فعالی در متابولیسم کلسترول فوم سل‌ها دارند و جری‌ها را آماده خروج از سلول می‌کند. شکل‌های ۳ و ۴ نشان‌دهنده بیان این ژن‌ها می‌باشد. از طرفی افزایش بیان ژن های ABCA1 با ( $P < 0.01$ ) و CD36 با ( $P < 0.05$ ) به عنوان گیرنده لیوپروتین‌های حامل کلسترول در این سلول‌ها مشاهده می‌شود. شکل‌های ۵ و ۶ نشان داده شده میزان بیان این ژن‌ها می‌باشد.



شکل ۲. میزان تشکیل فوم سل‌ها در چهار گروه کنترل، ox-LDL، (A) (B) (C) ox-LDL+PLT و (D) PLT. ( $p < 0.05$ ,  $** < 0.01$ )

## نتایج

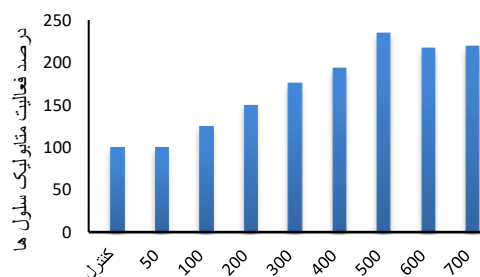
### بررسی جذب نوری ox-LDL

ox-LDL تهیه شده با توجه به افزایش میزان OD در طول موج ۳۴۰ نانومتر نسبت به ox-LDL استاندارد تأیید شده و غلظت آن برابر  $1/62 \text{ mg/ml}$  می‌باشد (جدول ۲).

جدول ۲. غلظت و جذب کلسترول اکسید شده نشان داده شده است

نام ماده	جذب نوری ۳۴۰ نانومتر	غلظت
LDL	0.154	1 mg/ml
oxi-LDL	0.217	1.62 mg/ml
oxi-LDL استاندارد	0.181	2.5 mg/ml

میزان تاثیر گذاری دارچین با آزمون MTT: دارچین در وضعیت وابسته به دوز مانع از تکثیر سلول‌ها شد، لذا در ادامه مطالعه دوز ۱۰۰ و ۲۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر که کمترین اثر مهاري در تکثیر سلول‌ها را داشتند انتخاب شد. طی بررسی ۴۸ ساعته مشخص شد که این دو دوز در مقایسه با کنترل به ترتیب ۲۵ درصد و ۵۰ درصد بر فعالیت متابولیک سلول‌ها اضافه کردند (شکل ۱).

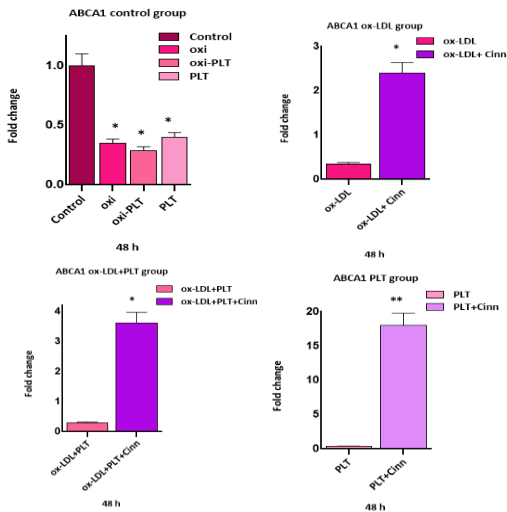


دوزهای مختلف دارچین بر حسب میکروگرم بر میلی‌لیتر

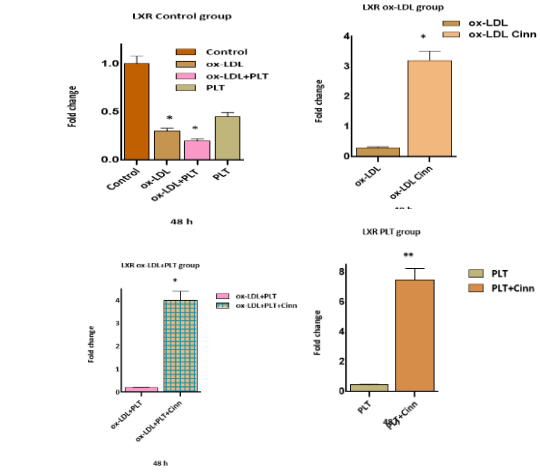
شکل ۱. نتایج تست MTT و درصد فعالیت متابولیک سلول‌ها در تیمار با دوزهای مختلف دارچین

نتایج حاصل از رنگ‌آمیزی Oil Red O: دوز ۲۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر دارچین به عنوان دوز امنی که سیتوتوکسیک نبوده و بهترین اثر را در کاهش تشکیل فوم سل‌ها دارد به عنوان دوز آزمایش انتخاب شد و برای ادامه مسیر مورد بررسی قرار گرفت. در نتیجه میزان تشکیل فوم سل‌ها در گروه ۱ شامل سلول‌های U937 ای که PMA خورده (کنترل این گروه) به مدت ۴۸ ساعت، حدود ۱ درصد بود و در همین گروه به ترتیب ox-LDL + پلاکت حدود ۳۵ درصد و ox-LDL ۲۴ درصد و پلاکت به تنهایی ۱۸ درصد بیشترین میزان فوم سل را داشتند.

در گروه دوم ox-LDL + دارچین ۵ درصد و در گروه سوم پلاکت + ox-LDL + دارچین ۳/۷ درصد و در گروه چهارم پلاکت + دارچین ۱/۵ درصد فوم سل داشت. که این



شکل ۳. میزان بیان ژن ABCA1 در چهار گروه کنترل، ox-LDL، ox-LDL+PLT (A) و (B) PLT (C) و (D) PLT+ox-LDL. (\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ )

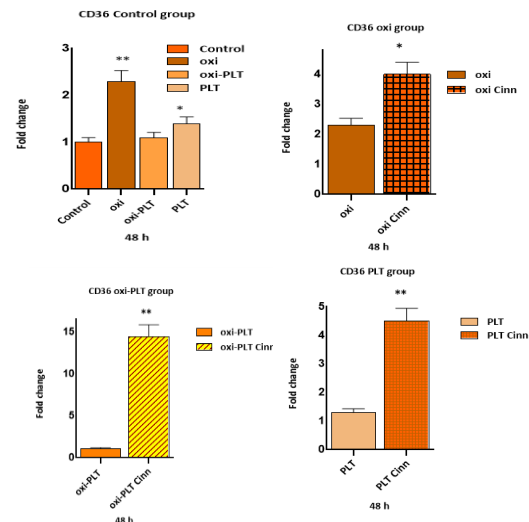


شکل ۴. میزان بیان ژن CD36 در چهار گروه کنترل، ox-LDL، ox-LDL+PLT (A) و (B) PLT (C) و (D) PLT+ox-LDL. (\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ )

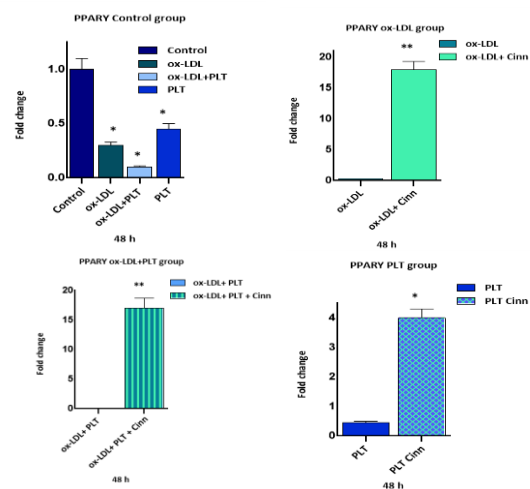
### بحث و نتیجه گیری

فومسل‌ها اصلی‌ترین سلول تشکیل‌دهنده پلاک آتروسکلروتیک می‌باشند. عوامل مختلفی در تشکیل فومسل‌ها نقش دارند، از مهم‌ترین عوامل می‌توان به وجود لیپیدهای اشباع شده در دیواره عروق اشاره کرد [۲۷،۳]. علاوه بر آن عوامل دیگری از جمله آسیب سلول‌های اندوتلیال عروق و منوسیت‌ها و برهم‌کنش پلاکت‌ها با آن‌ها نیز مؤثر هستند [۲۵]. در این مطالعه برای بررسی تشکیل فومسل‌ها ناشی از هم‌کشتی منوسیت‌ها و پلاکت‌ها در کنار ox-LDL از رنگ‌آمیزی Oil Red O استفاده شد. نتایج حاصل از رنگ‌آمیزی Oil Red O نشان داد که هم‌کشتی پلاکت و منوسیت‌ها در کنار ox-LDL باعث تشکیل فومسل‌های بیشتری به ترتیب نسبت به ox-LDL و پلاکت به تنهایی می‌شوند. با اضافه کردن عصاره دارچین به عنوان ماده مهارکننده، مشاهده شد که تعداد این فومسل‌ها نسبت به کنترل‌های خود (نمونه‌های فاقد عصاره دارچین) در هر گروه کاهش چشمگیری یافته بود. برای بررسی میزان بروز ژن‌هایی که نقش بسزایی در ورود و خروج و متابولیسم کلسترول سلولی دارند از روش RQ-PCR استفاده شد. نتایج حاکی از این بود که: بیان ژن‌های PPAR $\gamma$ ، LXR، ABCA1 کاهش و CD36 (به جز گروه حاوی ox-LDL + PLT) در گروه ۱ نسبت به کنترل افزایش داشت اما در گروه‌های ۲، ۳، ۴ بیان تمام این ژن‌ها افزایش چشمگیری داشت.

مطالعه‌ای که در سال ۲۰۱۴ توسط Badrmya و همکارانش انجام شد، با رنگ‌آمیزی Oil Red O نشان دادند که دارچین موجب کاهش محتوای لیپیدی در سلول لاین 3T3-L1



شکل ۵. میزان بیان ژن ABCA1 در چهار گروه کنترل، ox-LDL، ox-LDL+PLT (A) و (B) PLT (C) و (D) PLT+ox-LDL. (\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ )



شکل ۶. میزان بیان ژن PPAR $\gamma$  در چهار گروه کنترل، ox-LDL، ox-LDL+PLT (A) و (B) PLT (C) و (D) PLT+ox-LDL. (\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ )

مستلزم افزایش بیان تعداد مارکرهای ماکروفاژهای M2 از جمله آرژیناز-۱، مانوز رسپتور و CD36 می‌شود [۳۰]. از طرفی SDF-1 پلاکتی ماکروفاژهای M2 را با خاصیت ضد التهابی القا می‌کند، اما در ادامه به واسطه‌ی آسیبی که به شبکه‌ی آندوپلاسمی آن‌ها وارد می‌شود، این ماکروفاژها سیکل معیوبی را پیش می‌گیرند که فاقد فیدبک منفی بوده و منجر به تجمع لیپید و عدم خروج آن می‌شود. این روند معیوب تا آنجا پیش می‌رود که این سلول‌ها تبدیل به فوم سل‌ها شده که منجر به پلاک آترواسکلروز و وخیم‌تر شدن شرایط می‌گردند [۳۴]. مطالعات هم‌چنین، نشان دادند که افزایش بیان mRNA PPAR $\gamma$  نشان‌دهنده‌ی القای ماکروفاژ به سمت M2 ماکروفاژ (ماکروفاژ ضد التهابی) است [۳۰]. از طرفی پلی‌مرهای پلی‌فنلی در دارچین دارای فعالیت آنتی‌اکسیدانی هستند و نشان داده شده است که استرس اکسیداتیو را از طریق مهار آنزیم ۵-لیپواکسیژناز کاهش می‌دهد و عملکرد قلبی عروقی را بهبود بخشد [۳۵].

این مطالعه نشان داد که حضور پلاکت به طور هم‌زمان با ox-LDL می‌تواند با اثر هم‌افزایی باعث ایجاد بیش‌تر فوم سل‌ها نسبت به ox-LDL و پلاکت به تنهایی شود و پروفایل بیان ژن‌های دخیل در متابولیسم لیپید را تحت تاثیر قرار دهد. عصاره‌ی آبی دارچین نیز به تنهایی می‌تواند، باعث کاهش تشکیل فوم سل‌ها با تاثیر بر بیان ژن‌های دخیل در ورود و خروج چربی داخل سلول و احتمالاً می‌تواند مانع تشکیل پلاک آترواسکلروتیک شود. بنابراین می‌توان دارچین را برای به عنوان یک مکمل برای درمان ضایعه‌ی آترواسکلروزیس در بیماران قلبی - عروقی پیشنهاد کرد.

### تشکر و قدردانی

نویسندگان مقاله از مسئولین محترم معاونت تحقیقات دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی و دانشکده پیراپزشکی بخاطر پشتیبانی و همکاری کمال تشکر را دارند.

### منابع

- [1] Toth P. Subclinical atherosclerosis: what it means and what we can do about it. *Int J Clin Pract* 2008; 62: 1246-1254.
- [2] Duan L, Xiong X, Hu J, Liu Y, Li J, Wang J. Panax notoginseng saponins for treating coronary artery disease: a functional and mechanistic overview. *Front Pharmacol* 2017; 8: 702-711.
- [3] Cheraghi M, Asadi-Samani M. Atherosclerosis: Pathophysiology and promising herbal remedies in traditional Persian medicine. *Der Pharmacia Lett* 2016; 8: 58-66. (Persian)
- [4] Badimon L, Vilahur G. Thrombosis formation on atherosclerotic lesions and plaque rupture. *J Int Med* 2014; 276: 618-632.
- [5] Wilson P, Cannon C, Downey B. Overview of the risk equivalents and established risk factors for cardiovascular disease. *UpToDate*. Post TW, Editors, UpToDate Waltham; 2015. 2017.

(آدیوسیت) می‌شود [۲۷]. مکانیسم قطعی عملکرد دارچین در کاهش لیپیدهای درون سلولی هنوز مشخص نشده ولی مواد سیامیدالدهید و پلی‌فنولی که از مشتقات مهم دارچین است می‌باشد [۲۸،۲۹]. برای ورود و خروج کلسترول به درون سلول رسپتورهای متعددی نقش دارند. از جمله رسپتورها می‌توان به PPAR $\gamma$  اشاره کرد. آزمایشات بالینی نشان داده که، PPAR $\gamma$  یک رسپتور هسته‌ای و فاکتور رونویسی است که در ماکروفاژها فعال شدن PPAR $\gamma$ ، التهاب را به وسیله‌ی تنظیم بیان ژن‌ها و افزایش جذب و خروج کلسترول مهار می‌کند که روی LXR که آن هم یک ژن هدف در متابولیسم لیپید و لیپروتئین است، اثر می‌گذارد که در ادامه، این سیگنال موجب افزایش بیان اسکاونجر خروجی ABCA1 جهت خروج کلسترول و اسکاونجر ورودی CD36 جهت ورود کلسترول می‌شود [۳۰].

Sung Hee Kim و همکارانش در سال ۲۰۱۰ اثر ضد هایپرلیپیدمیک و ضد هایپرگلیسمی عصاره دارچین کاسیا در مدل موشی دیابت نوع ۲ مورد بررسی قرار دادند و اثبات کردند بیان ژن PPAR $\gamma$  در بافت چربی افزایش می‌یابد و تاثیر چشمگیری در بهبود هایپرلیپیدمی و هایپرگلیسمی و متابولیسم کبد دارد [۳۱]. در سال ۲۰۰۸ Xiayan Sheng و همکارانش نشان داد که عصاره آبی دارچین باعث افزایش بیان PPAR $\gamma$  و ژن‌های هدف آن از جمله CD36 در سلول لاین آدیوسیتی 3T3-L1 می‌شود و هم‌چنین ممکن است یک جایگزین برای فعال‌کننده PPAR در مدیریت دیابت مرتبط با چاقی و هایپرلیپیدمی باشد [۳۲]. با توجه به نتایج به دست آمده از این مطالعه، توام با افزایش بیان ژن PPAR $\gamma$  در تیمار با دارچین، بیان اسکاونجر ورودی CD36 افزایش یافت تا تمام چربی‌های موجود در اطراف سلول برای متابولیزه شدن به درون سلول وارد شوند. از طرفی با افزایش بیان ژن PPAR $\gamma$ ، بیان ژن LXR نیز افزایش یافته که این خود از طرفی موجب افزایش بیان اسکاونجر خروجی ABCA1 جهت خروج و پاک‌سازی سلول از چربی برای جلوگیری از تشکیل فوم سل شده است.

در همین راستا مطالعاتی که روی بیان ژن‌های گیرنده کلسترول شده، نشان داد که افزایش PPAR $\gamma$  باعث افزایش بیان ژن CD36 اما کاهش SRA به عنوان اسکاونجر رسپتور ورودی و افزایش رسپتور هسته‌ای LXR و سپس القای افزایش بیان ABCA1 در جهت ایجاد اثرات آنتی‌آتروژنیک در فوم سل‌ها می‌شود [۳۲،۳۳]. هم‌چنین مطالعات نشان داده‌اند که بیان PPAR $\gamma$  و افزایش فعالیت آن، باعث افزایش تمایز ماکروفاژها به سمت M2 ماکروفاژها می‌شود و به نوبه‌ی خود

- [22] Rahman S, Begum H, Rahman Z, Ara F, Iqbal MJ, Yousuf AK. Effect of cinnamon (Cinnamomum cassia) as a lipid lowering agent on hypercholesterolemic rats. *J Enam Med College* 2013; 3: 94-98. (Persian).
- [23] Esterbauer H, Dieber-Rotheneder M, Waeg G, Striegl G, Juergens G. Biochemical structural and functional properties of oxidized low-density lipoprotein. *Chem Res Toxicol* 1990; 3: 77-92.
- [24] Boncler M, Róžalski M, Krajewska U, Podśędek A, Watala C. Comparison of PrestoBlue and MTT assays of cellular viability in the assessment of anti-proliferative effects of plant extracts on human endothelial cells. *J Pharmacol Toxicol Methods* 2014; 69: 9-16.
- [25] Mehrpouri M, Bashash D, Mohammadi MH, Gheydari ME, Shahabi Satsar E, Hamidpour M. Co-culture of platelets with monocytes induced M2 macrophage polarization and formation of foam cells: shedding light on the crucial role of platelets in monocyte differentiation. *Turk J Hematol* 2019; 36: 97-105.
- [26] Xu S, Huang Y, Xie Y, Lan T, Le K, Chen J, et al. Evaluation of foam cell formation in cultured macrophages: an improved method with Oil Red O staining and DiI-oxLDL uptake. *Cytotechnology* 2010; 62: 473-481.
- [27] Badrnya S, Schrottmaier WC, Kral JB, Yaiw K-C, Volf I, Schabbauer G, et al. Platelets mediate oxidized low-density lipoprotein-induced monocyte extravasation and foam cell formation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2014; 34: 571-580.
- [28] Mashour NH, Lin GI, Frishman WH. Herbal medicine for the treatment of cardiovascular disease: clinical considerations. *Arch Int Med* 1998; 158: 2225-2234.
- [29] Hamidpour R, Hamidpour M, Hamidpour S, Shahdari M. Cinnamon from the selection of traditional applications to its novel effects on the inhibition of angiogenesis in cancer cells and prevention of Alzheimer's disease, and a series of functions such as antioxidant, anticholesterol, antidiabetes, antibacterial, antifungal, nematocidal, acaracidal, and repellent activities. *J Tradit Complement Med* 2015; 5: 66-70.
- [30] Duan SZ, Usher MG, Mortensen RM. Peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$ -mediated effects in the vasculature. *Circ Res* 2008; 102: 283-294.
- [31] Kim SH, Choung SY. Antihyperglycemic and antihyperlipidemic action of Cinnamomi Cassiae (Cinnamon bark) extract in C57BL/Ks db/db mice. *Arch Pharm Res* 2010; 33: 325-333.
- [32] Sheng X, Zhang Y, Gong Z, Huang C, Zang YQ. Improved insulin resistance and lipid metabolism by cinnamon extract through activation of peroxisome proliferator-activated receptors. *PPAR Res* 2008; 2008: 581348.
- [33] Lazar MA. Progress in cardiovascular biology: PPAR for the course. *Nat Med* 2001; 7: 23-24.
- [34] Daub K, Langer H, Seizer P, Stellos K, May AE, Goyal P, et al. Platelets induce differentiation of human CD34+ progenitor cells into foam cells and endothelial cells. *FASEB J* 2006; 20: 2559-2561.
- [35] Anderson RA, Broadhurst CL, Polansky MM, Schmidt WF, Khan A, Flanagan VP, et al. Isolation and characterization of polyphenol type-A polymers from cinnamon with insulin-like biological activity. *J Agric Food Chem* 2004; 52: 65-70.
- [6] Shigematsu K, Watanabe Y, Nakano H, Committee KSR. Influences of hyperlipidemia history on stroke outcome; a retrospective cohort study based on the Kyoto Stroke Registry. *BMC Neurol* 2015; 15: 44-51.
- [7] Chatterjee M, Gawaz M. Platelets in atherosclerosis. platelets in thrombotic and non-thrombotic disorders: Springer; 2017; p: 993-1013.
- [8] Stephen J, Emerson B, Fox KA, Dransfield I. The uncoupling of monocyte-platelet interactions from the induction of proinflammatory signaling in monocytes. *J Immunology* 2013; 191: 5677-5683.
- [9] Kral JB, Schrottmaier WC, Salzmann M, Assinger A. Platelet interaction with innate immune cells. *ransfus Med Hemother* 2016; 43: 78-88.
- [10] von Hundelshausen P, Weber C. Platelets as immune cells: bridging inflammation and cardiovascular disease. *Circ Res* 2007; 100: 27-40.
- [11] Stellos K, Gnerlich S, Kraemer B, Lindemann S, Gawaz M. Platelet interaction with progenitor cells: vascular regeneration or injury? *Pharmacol Rep* 2008; 60: 101.
- [12] Freedman JE, Loscalzo J. Platelet-monocyte aggregates: bridging thrombosis and inflammation. *Circulation* 2002; 105: 2130-2132.
- [13] Wu C, Chen R, Liu M, Liu D, Li X, Wang S, et al. Spiromastixones inhibit foam cell formation via regulation of cholesterol efflux and uptake in RAW264. 7 macrophages. *Mar Drugs* 2015; 13: 6352-6365.
- [14] Ramkumar S, Raghunath A, Raghunath S. Statin therapy: review of safety and potential side effects. *Acta Cardiol Sin* 2016; 32: 631.
- [15] Yasini M, Hamidpour M, Ayatollahi A, shahmehr M, Kehanpour N. Synergic effects of summer savory extract and aspirin on human platelets function. *Koomesh* 2019; 21. (Persian).
- [16] Hedaryan AH, Hamidpour M, Ayatollahi AM, Allah bakhshian Farsiani M. The synergic effect of artemisia dracunculus (Tarragon) extract and Aspirin (ASA) on platelet function. *J Med Plants* 2019; 2: 1-10.
- [17] Hamidpour R, Hamidpour S, Hamidpour M, Shahdari M, Sohrawy M. Summer savory: from the selection of traditional applications to the novel effect in relief, prevention, and treatment of a number of serious illnesses such as diabetes, cardiovascular disease, Alzheimer's disease, and cancer. *J Tradit Compl Med* 2014; 4: 140-144.
- [18] Nimgulkar C, Ghosh S, Sankar AB, Uday KP, Surekha M, Madhusudhanachary P, et al. Combination of spices and herbal extract restores macrophage foam cell migration and abrogates the athero-inflammatory signalling cascade of atherogenesis. *Vascul Pharmacol* 2015; 72: 53-63.
- [19] Amin KA, El-Twab TMA. Oxidative markers, nitric oxide and homocysteine alteration in hypercholesterolemic rats: role of atorvastatine and cinnamon. *Int J Clin Exp Med* 2009; 2: 254.
- [20] Hesaraki S, Yahyaei B. Histopathological comparison of the effects of Ceylon cinnamon, Plantagolanceolata and Flaxseed linum on experimental cutaneous wound healing process in rats. *Koomesh* 2016; 17: 752-760. (Persian).
- [21] M.ahdieh Mehrpouri, Rafie Hamidpour, Mohsen Hamidpour. Cinnamon inhibits platelet function and improves cardiovascular system. *J Med Plants* 2020; 19: 1-11.

## Inhibitory effect of Cinnamon on prevention of foam cell formation in platelet and monocytes co-culture

Maryam khiabani Rad (M.Sc)<sup>1</sup>, Mohammad Hossein Mohammadi (Ph.D)<sup>2</sup>, Nader Vazifeh Shiran (M.Sc)<sup>1</sup>, Mohsen Hamidpour (Ph.D)<sup>\*2</sup>

1- Dept. of Hematology and Blood Banking, School of Allied Medical Sciences, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran

2- HSCT Research Centre, Department of Hematology and Blood Banking, School of Allied Medical Sciences, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran

\* Corresponding author. +98 21-22717504 mohsenhp@sbmu.ac.ir

Received: 21 Feb 2020; Accepted: 24 Jun 2020

**Introduction:** Atherosclerosis is one of the leading causes of cardiovascular disease. Following endothelial damage and platelet aggregation in that area and the recruitment of monocytes and their conversion to macrophages, LDL gradually accumulates under the endothelial artery wall and gradually oxidized and convert to oxi-LDL. By swallowing it, the macrophages turn into foam cell and then atheroma formation. Medicinal plant extracts are used to treat diseases due to their low side effects. Cinnamon water extract modulates macrophage activation and lowers cellular cholesterol and is useful in the treatment of atherosclerosis. Therefore, in this study, the inhibitory effect of cinnamon in preventing the foam cell formation in platelets and monocytes co-culture was evaluated.

**Materials and Methods:** The cellular toxicity of cinnamon cassia water extract was assessed by the MTT test on the U937 (monocyte) cell line and the best dose was selected. The formation of foam cells was measured by Oil Red O staining and the expression of cholesterol receptor genes in macrophages using Real time PCR.

**Results:** The data showed that the formation of foam cell when treating macrophages and platelets with cinnamon water extract compared to control, had a significant reduction. The expression of LXR $\alpha$ , CD36, ABCA1, and PPARY genes, as the output receptor, input, and nucleus of cholesterol in macrophages, increased significantly compared to control in samples treated with cinnamon ( $P < 0.05$ ).

**Conclusion:** Cinnamon water extract reduces the formation of foam cells and can be recommended in the treatment of atherosclerosis.

**Keywords:** Cinnamon, Blood Platelet, Foam Cell, Atherosclerosis.