مقاله پژوهشی

بررسی اثر سایتوتوکسیسیتی 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 نسرین عاقل[1]، دکتر علی خدادادی[2]، دکتر مجید اسماعیلیان[3]

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 کاملا شناخته شده است. مطالعات انجام شده دال بر اثر مهاری ترکیبات ضد التهاب غیر استروئیدی (NSAIDs) و استروئیدی (دگزامتازون) بر روی ماتریکس متالوپروتئینازها است.

مواد و روش کار: در این تحقیق اثر مهاری و سمیت سلولی عصاره هیدروالکلی گیاهان شیرین بیان و بابونه در مقایسه با داروهای استروئیدی و غیر استروئیدی با به کارگیری سل لاین فیبروسارکوما (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 ۹۵۰۰ µg/ml و ۹۳۳/۳۳ و سمیت سلولی به دست آمده برای این گیاهان، به ترتیب، معادل ۳۲۶/۶۷ µg/ml و ۳۴۵۰ بود.

نتیجه گیری: گیاهان بابونه و شیرین بیان سمیت سلولی بسیار کمتری ولی اثر مهاری 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 ۰/۱ 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 متالوپروتئینازها (MMPs) خانواده هایی از آندوپپتیدازهای وابسته به عناصر روی و کلسیم می‌باشند که توانایی روتئولیز بسیاری از ترکیبات ماتریکس خارج سلولی را دارند (کلاژن‌ها، پروتئوگلیکان‌ها و گلیکو پروتئین ها) و با این کار سبب تشدید روند پاسخ‌های التهابی می‌شوند (۲،۱). در شرایط پاتولوژیک نظیر بیماری آرتریت روماتوئید، بیماری‌های قلبی - عروقی و سایر بیماری‌های التهابی تجزیه بیش از حد 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 کارسینوژنز 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 دایمی است لیکن در سلول‌های

[1] استادیار گروه فارماکوگنوزی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز (نویسنده مسئول)

[2] استادیار گروه ایمنولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز

[3] دکترای حرفه ای داروسازی

سیستم ایمنی نظیر ماکروفاژها و نوتروفیل‌ها به فرم ذخیره وجود داشته و تحت شرایط مختلف آزاد می‌شوند، لذا مهار کننده‌های طبیعی MMPs در کنترل فعالیت التهاب نقش به سزایی 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 مهار کنندگی 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 فلاوانونی (لیکوئیرتین) تشکیل شده‌اند (۷). ماده مؤثره ضد التهابی این گیاه گلیسیریزین است که به میزان ۶-۱۲درصد در ریزوم خشک وجود دارد. از ترکیبات مؤثره گل‌های بابونه فلاونوئیدهای گروه متوکسی فلاوان‌ها و متوکسی فلاونول‌ها (آپی ژنین و لوتئولین) 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 مهار کنندگی عصاره‌های هیدروالکلی ریزوم شیرین بیان[1] و گل‌های بابونه[2] با بکارگیری سل لاین فیبروساکروما (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 مهار کنندگی آنها بر روی فعالیت ماتریکس متالوپروتئینازها قبلا 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.

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 فیبروساركوما 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 میکرویونیت در میلی‌لیتر 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 سایتوتوکسیسیتی 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 مهار کنندگی 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

[1] Glycyrrhiza glabra
[2] Matricaria aurea

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:

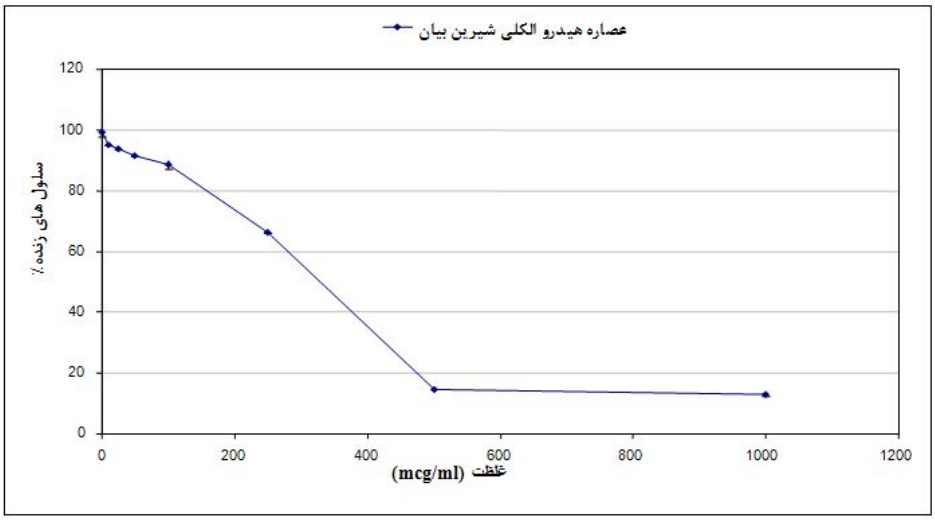
آزمون آماری Kruskal – Wallis و متعاقب آن تست Conover – Inman به منظور مقایسه اثرات سایتوتوکسیسیتی و مهارکنندگی عصاره گیاهان شیرین بیان و بابونه با داروهای دیکلوفناک، پیروکسیکام و دگزامتازون مورد استفاده قرار گرفت. در این مطالعه P value کمتر از ۰/۰۵ معنی دار تلقی گردید.

نتایج

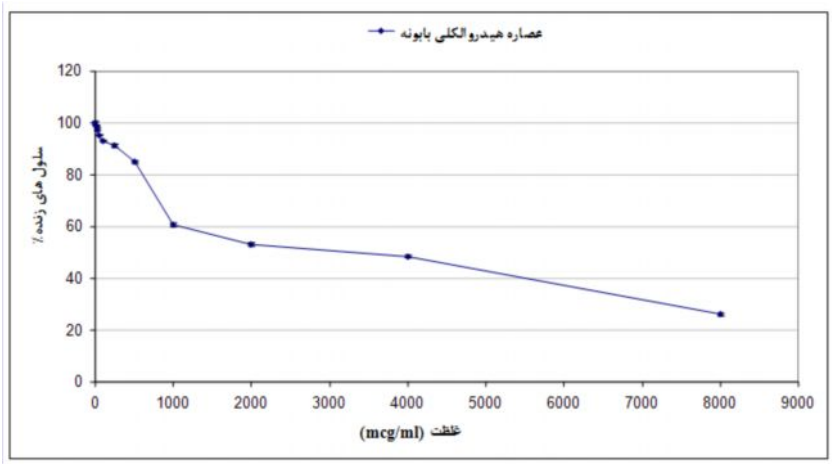
سلول‌ها به مدت ۲۴ ساعت تحت تیمار با غلظت‌های بالارونده عصاره‌های گیاهان شیرین بیان و بابونه و همچنین داروهای پیروکسیکام، دگزامتازون و دیکلوفناک قرار گرفتند. درصد سلول‌های زنده در هر چاهک محاسبه و براساس میانگین سه بار تکرار نمودارهای مربوطه رسم گردید (نمودارهای ۱-۳). سپس برای هر نمودار مقدار IC50 محاسبه گردیده و مورد آنالیز آماری 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 مهاری 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 مهاری خود را در دوزهای بالاتر نشان می‌دهند. گیاهان بابونه و شیرین بیان با P <۰/۰۰۴۳ با یکدیگر و با سایر داروها بکار رفته از لحاظ اثر مهارکنندگی اختلاف معنی‌دار دارند (جدول ۲).

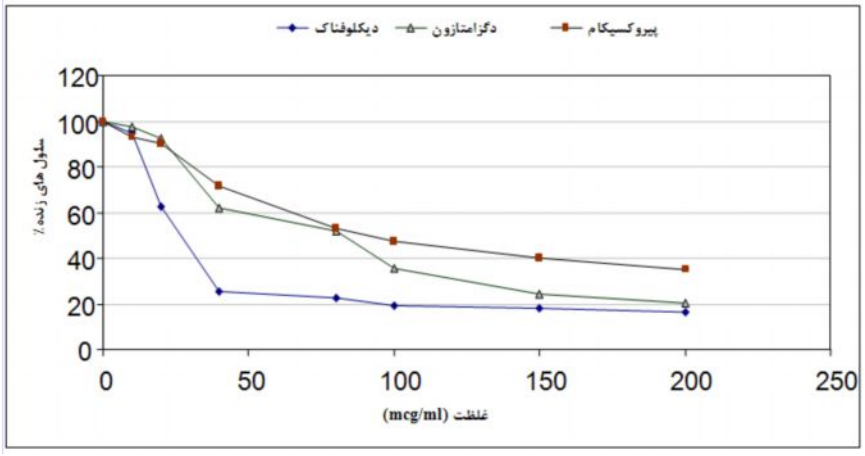
همان‌طور که از نمودارها مشخص است، گیاهان بابونه و شیرین‌بیان به صورت وابسته به دوز دارای سمیت سلولی هستند (جدول ۱). این گیاهان با P < ۰/۰۰۴۳ اختلاف معنی داری با یکدیگر و با داروهای دیکلوفناک، پیروکسیکام و دگزامتازون دارند (جدول ۱).



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



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



نمودار (۳): اثرات سایتوتوکسیسیتی داروهای دیکلوفناک، دگزامتازون، پیروکسیکام

جدول (۱): مقایسه میانگین IC50 های به دست آمده(mcg/ml) مربوط به اثرات سایتوتوکسیسیتی با استفاده از تست های آماری Kruskal-Wallis و Conover-Inman

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

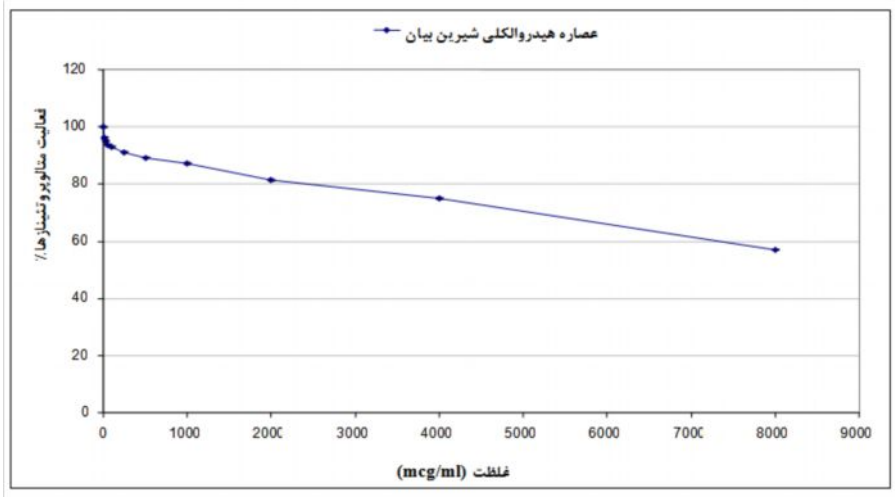
Kruskal-Wallis test:

5 = گروه ها

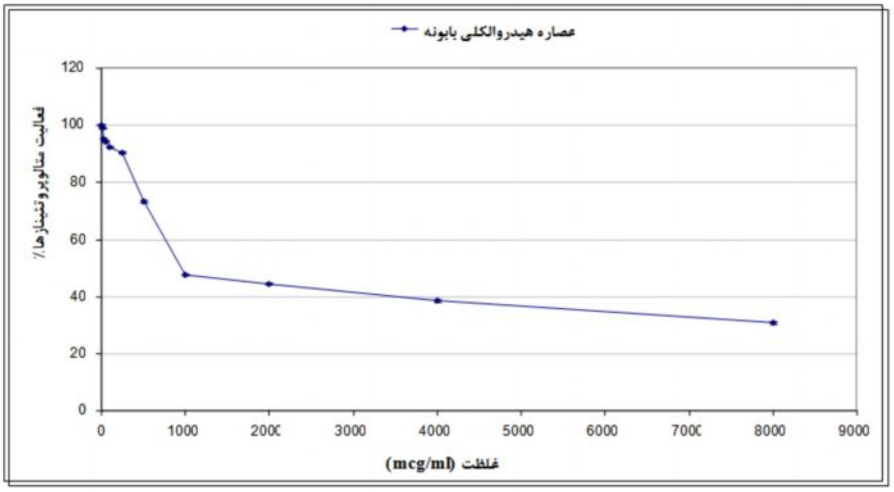
4 = درجه آزادی

15 = تعداد مشاهدات

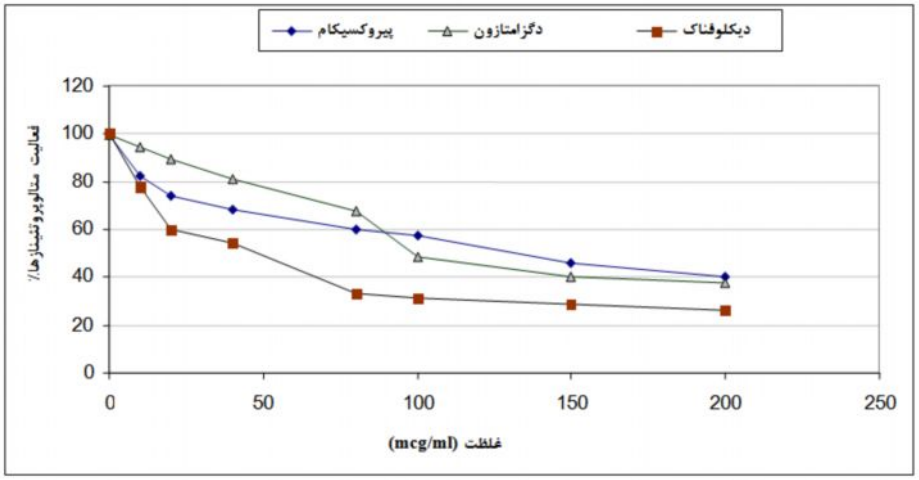
*اختلاف معنی دار با $p < 0.0043$ وجود دارد.



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



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



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

جدول (۲): مقایسه میانگین IC50 های بدست آمده (mcg/ml) مربوط به اثرات مهارکنندگی با استفاده از تست‌های آماری Kruskal-Wallis و Conover-Inman

	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:

گروه‌ها = 5

درجه آزادی = 4

تعداد مشاهدات = 15

*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 زخم ها 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 حالی‌که بر روی فعالیت مهار کننده‌های بافتی آنها و نیز بیوسنتز تاثیری ندارند (۱۱). مکانیسم احتمالی فعالیت مهارکنندگی داروهای ضدالتهاب غیراستروئیدی از راه مهار رونویسی ژن ماتریکس متالوپروتئینازها است (۱۲). سرکوب ماتریکس متالوپروتئینازها یکی از مکانیسم‌هایی است که داروهای ضد التهاب غیر استروئیدی، آنژیوژنز و متاستاز سلول‌های سرطانی را مهار می‌کنند (۱۲،۱۱).

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 edulice و Passiflora foetida (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 IC50=۹۳۳/۳۳ µg/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 کلروفرمی 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 IC50=۹۳۳/۳۳ µg/ml اثری حدوداً ده برابر قوی‌تر از شیرین بیان با IC50=۹۵۰۰ µg/ml نشان می‌دهد. گیاهان بابونه (IC50= ۳۴۵۰ µg/ml) و شیرین بیان (IC50=۳۲۶/۶۷ µg/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 chemopreventation 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