DOI: 10.48305/jims.v40.i664.0172

مجله دانشکده پزشکی اصفهان — سال چهلم/شماره‌ی ۶۶۴/هفته‌ی چهارم اردیبهشت ۱۴۰۱

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۹/۲۱ — تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۱۲/۱۱ — تاریخ چاپ: ۱۴۰۱/۲/۲۸

اثر سیلیبینین بر میزان بیان ژن‌های NOX1، NOX2 و تولید گونه‌های فعال اکسیژن در سلول‌های ستاره‌ای کبد تیمار شده با TGF-β

مجتبی رشیدی[۱]، رضا آفرین[۱]، الهام شاکریان[۱]، شهلا اسدی‌زاده[۱]، سمانه صالحی‌پور باورصاد[۱]

مقاله پژوهشی

چکیده

مقدمه: فیبروز کبدی، یک بیماری مزمن است که در اثر عفونت‌های ویروسی (مانند ویروس هپاتیت B و C)، سوء مصرف الکل و اختلالات متابولیکی و ژنتیکی ایجاد می‌شود و منجر به تجمع بیش از حد پروتئین‌های ماتریکس خارج سلولی از جمله کلاژن می‌شود. پیشرفت فیبروز کبدی می‌تواند باعث سیروز و سرطان کبد شود. در این مطالعه به بررسی نقش سیلیبینین در جلوگیری از پیشرفت بیماری فیبروز کبدی پرداخته شده است.

روش‌ها: سلول‌های LX2 در محیط کشت DMEM همراه با ۱۰ درصد از FBS (Fetal bovine serum) کشت داده شدند. در مرحله‌ی اول، تیمار سلول‌ها با TGF-β با غلظت ۲ ng/ml (گروه فیبروتیک) به منظور آسیب سلولی و ایجاد شرایط فیبروتیک به مدت ۲۴ ساعت انجام شد. سپس با غلظت‌های ۱۰، ۲۰، ۴۰، ۶۰ و ۸۰ میکرومولار از سیلیبینین (گروه‌های درمان) به مدت ۲۴ ساعت، تیمار شدند و میزان بیان mRNA ژن‌های αSMA، collagen1α، NOX1 و NOX2 و میزان تولید ROS (Reactive oxygen species) درون سلولی مورد سنجش قرار گرفت.

یافته‌ها: نتایج نشان داد که میزان بیان mRNA ژن‌های αSMA، collagen1α، NOX1 و NOX2 در غلظت‌های ۶۰ و ۸۰ میکرومولار سیلیبینین نسبت به گروه فیبروتیک به صورت معنی‌داری کاهش یافت. همچنین میزان تولید ROS درون‌سلولی در غلظت‌های ۶۰ و۸۰ میکرومولار از سیلیبینین نسب به گروه فیبروتیک کاهش معنی‌داری پیدا کرد ($P < ۰/۰۵$).

نتیجه‌گیری: بر اساس مطالعه‌ی ما، سیلیبینین با کاهش بیان ژن‌های درگیر در پیشرفت فیبروز کبدی، باعث مهار فعال شدن Hepatic stellate cells (HSCs) و کاهش آسیب کبدی ناشی از تولید فراوان کلاژن و گونه‌های فعال اکسیژن در شرایط آزمایشگاهی شد. این نتایج شواهدی را نشان می‌دهد که سیلیبینین ممکن است یک عامل جذاب برای درمان فیبروز کبد باشد.

واژگان کلیدی: فیبروزکبدی؛ سیلیبینین؛ گونه‌های فعال اکسیژن؛ Transforming growth factor beta

ارجاع: رشیدی مجتبی، آفرین رضا، شاکریان الهام، اسدی‌زاده شهلا، صالحی‌پور باورصاد سمانه. **اثر سیلیبینین بر میزان بیان ژن‌های NOX1، NOX2 و تولید گونه‌های فعال اکسیژن در سلول‌های ستاره‌ای کبد تیمار شده با TGF-β.** مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۴۰۱؛ ۴۰ (۶۶۴): ۱۷۸-۱۷۲

مقدمه

بیماری فیبروز کبدی، یک پاسخ ایمنی ذاتی به آسیب‌های مزمن از جمله عفونت ویروسی (مانند هپاتیت B و C)، مصرف مزمن الکل و بیماری‌های متابولیکی مانند استئاتوهپاتیت غیر الکلی (Non-alcoholic steatohepatitis) NASH است (۱). صرف نظر از علت زمینه‌ای، آسیب‌های تکراری باعث آسیب التهابی و مرگ سلول پارانشیمی (به طور عمده هپاتوسیت‌ها) می‌شوند، از بین رفتن هپاتوسیت‌ها منجر به انتشار محتویات سلولی آن‌ها (به عنوان مثال DNA) و گونه‌های واکنش‌پذیر اکسیژن (Reactive oxygen species) ROS می‌شود که این عوامل باعث فعال شدن سلول‌های دیگری به نام سلول‌های ستاره‌ای شکل (HSCها) در کبد می‌شوند برای پاسخ شدیدتر به آسیب وارد شده، HSCها شکل معمول ستاره‌ای خود را از دست می‌دهند و به سلول‌هایی شبیه میوفیبروبلاست تبدیل می‌شوند. این میوفیبروبلاست‌های مشتق شده از HSCها، باعث افزایش تولید پروتئین‌های ماتریکس خارج سلولی مانند کلاژن و در نتیجه تجمع زیاد ماتریکس خارج سلولی می‌شوند (۲).

۱- مرکز تحقیقات سلولی مولکولی، گروه بیوشیمی بالینی، دانشکدی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز، اهواز، ایران

نویسنده‌ی مسؤول: سمانه صالحی پور باورصاد: مرکز تحقیقات سلولی مولکولی، گروه بیوشیمی بالینی، دانشکدی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز، اهواز، ایران

Email: s.salehipour@yahoo.com

در مرحله‌ی بعد، ماکروفاژها و میوفیبروبلاست‌ها با ترشح واسطه‌های التهابی مانند TNFα، IL-1β و IL-6 و فاکتورهای پروفیبروژنیک، از جمله (Platelet-derived growth factor) PDGF و (Transforming growth factor beta) TGFβ باعث فراخوانی بیشتر سلول‌های ایمنی T و نوتروفیل‌ها می‌شوند (۳، ٤). در نهایت، ترشح فاکتور TGFβ باعث تبدیل بیشتر HSCها به حالت فعال یعنی میوفیبروبلاست می‌گردد و فاکتور PDGF نیز باعث تکثیر این میوفیبروبلاست‌ها می‌شود. میوفیبروبلاست‌های مشتق شده از HSCها باعث افزایش تولید αSMA و Collagen1α و تجمع زیاد ماتریکس خارج سلولی می‌شوند. ماکروفاژها می‌توانند با ترشح پروتئازهایی به نام MMPها، باعث تخریب ماتریکس زیاد تولید شده بعد از ترمیم آسیب شوند، اما فعالیت پروتئازی MMPها با تولید همزمان فاکتوری به نام TIMP توسط ماکروفاژها و میوفیبروبلاست‌ها، مهار می‌شود که منجر به تجمع و رسوب ماتریکس و در نتیجه اسکار می‌شود. در واقع عدم تعادل بین تخریب و تجمع ECM (Extracellular matrix) منجر به فیبروز می‌گردد (۵).

استرس اکسیداتیو (Oxidative stress) OS فرایندی اساسی است که باعث آسیب کبدی و شروع فیبروز کبدی می‌شود. این مربوط به یک تعادل تغییر یافته بین فاکتورهای سلولی پرو اکسیدان و آنتی‌اکسیدان است که منجر به تولید ROS و گونه‌های ازت واکنش‌پذیر (RNS) می‌شود. ROS خانواده‌ای از واسطه‌های پرو فیبروتیک شامل سوپراکسیدها، پراکسید هیدروژن (H2O2) و رادیکال‌های هیدروکسیل را تشکیل می‌دهد. آن‌ها در طی متابولیسم سلولی طبیعی و به ویژه در طی فسفوریلاسیون اکسیداتیو و پراکسیداسیون لیپید در سلول‌های کبدی، HSCها و ماکروفاژها تولید می‌شوند. در سطوح پایین، ROS می‌تواند به عنوان پیام‌رسان‌های ثانویه برای فعال کردن پاسخ‌های مختلف سلولی عمل کند. با این حال، در سطوح بالا، آن‌ها باعث اختلال در لیپیدهای سلولی، پروتئین‌ها و DNA شده و منجر به نکروز سلول‌های کبدی و آپوپتوز می‌شوند. علاوه بر این، ROSها می‌توانند تولید فاکتورهای التهابی و پروفیبروژنیک را توسط HSCهای فعال شده، سلول‌های کوپفر و سایر سلول‌های پیش‌التهاب تحریک کنند. تولید ROS با اتانول، تجمع اسید چرب آزاد (Free fatty acid) FFA، رسوب آهن و عفونت ویروسی مزمن تشدید می‌شود (٦). اکسیدازهای (NOX) NADPH منبع اصلی ROS در کبد هستند و پاسخ‌های فیبروژنیک ناشی از آنژیوتانسین II، PDGF و TGF-β را در HSCها و ماکروفاژها واسطه‌گری می‌کنند.

خار مریم، گیاهی گل‌دار از خانواده‌ی گل آفتاب‌گردان یا استراسه (Asteraceae) می‌باشد (۷). عصاره‌ی استخراج شده از این گیاه واجد ۸۰-٦۵ درصد سیلیمارین (کمپلکس فلاونوئیدی) و ۳۵-۲۰ درصد اسید چرب لینولئیک است. سیلیبینین، ماده‌ی اصلی موجود در سیلی مارین است که در پزشکی کاربردهای فراوان دارد. مهم‌ترین کاربرد درمانی این گیاه، اثر محافظتی روی کبد می‌باشد که در مطالعات حیوانی و انسانی نیز گزارش شده است (۸). در مطالعات بالینی متعددی، مصرف این ماده در درمان بیماری‌های کبدی مانند سیروز، هپاتیت ویروسی و سمی مزمن، کبد چرب و التهاب مجاری صفرا مؤثر بیان شده است که دلیل آن را خواص آنتی‌اکسیدانی این ماده می‌دانند (۹). در این مطالعه ما اثرات سیلیبینین بر روی ژن‌های دخیل در پیشرفت فیبروز کبدی از جمله ژن‌های NOX1 و NOX2 در حضور و عدم حضور TGF-β در رده‌ی سلولی LX2 را بررسی می‌کنیم.

روش‌ها

کشت و تیمار HSCها: مطالعه‌ی حاضر با مجوز کمیته‌ی اخلاق دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز (IR.AJUMS.REC.1400.390) طراحی و انجام شد. در این مطالعه، TGF-β از شرکت Sigma، FBS (Fetal bovine serum) از شرکت Gibco، آنتی‌بیوتیک‌های پنی‌سیلین و استرپتومایسین و محیط کشت DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) از شرکت ایده زیست خریداری شدند.

در این مطالعه از رده‌ی سلولی LX2 استفاده شد. این رده‌ی سلولی یک نوع از سلول‌های ستاره‌ای کبد انسان به صورت نرمال و نامیرا (Immortalized human hepatic stellate cell) است. سلول‌های LX2 در محیط کشت DMEM همراه با ۱۰ درصد از FBS کشت داده شدند. یک گروه به عنوان گروه شاهد (گروه سالم) در نظر گرفته شد. در مرحله‌ی بعد، تیمار سلول‌ها با TGF-β با غلظت ۲ng/ml (گروه فیبروتیک) (۱۰) به منظور آسیب سلولی و ایجاد شرایط فیبروتیک به مدت ۲٤ ساعت انجام شد. سپس با غلظت‌های ۱۰، ۲۰، ٤۰، ٦۰ و ۸۰ میکرومولار از سیلیبینین (گروه‌های درمان) به مدت ۲٤ ساعت تیمار شدند و میزان بیان mRNA ژن‌های αSMA، collagen1α، NOX1 و NOX2 و میزان تولید ROS درون سلولی مورد سنجش قرار گرفت.

تکنیک MTT assay: به منظور بررسی اثر غلظت‌های متفاوت سیلیبینین بر میزان بقای رده‌ی سلولی LX2، در هر چاهک ظرف‌های ۹٦ خانه، حدود ۵۰۰۰ سلول از رده‌ی سلولی مورد نظر را کشت داده و ۲٤ ساعت در انکوباتور قرار داده شد. سپس سلول‌های هر خانه با غلظت‌های ۱۰، ۲۰، ٤۰، ٦۰، ۸۰ و ۱۰۰ میکرومولار از سیلیبینین پس از حل شدن در محیط کشت (۱۱) تیمار شدند و به مدت ۲٤ ساعت در انکوباتور با شرایط دمایی ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد و دی‌اکسید کربن

۵ درصد انکوبه شدند. محیط سلول‌ها تعویض شد و ترکیب MTT با غلظت ۰/۵ mg/ml به سلول‌ها اضافه و برای ٤ ساعت در انکوباتور قرار داده شد. سپس محیط حاوی MTT را حذف و برای حل شدن کریستال‌های فورمازان ۱۰۰ میکرولیتر DMSO به هر چاهک اضافه شد. در نهایت جذب نمونه‌ها در ۵۹۵ نانومتر توسط دستگاه الایزا ریدر مشخص شد.

تکنیک Real-Time PCR. پس از جمع‌آوری سلول‌ها، توتال RNA با استفاده از کیت شرکت یکتا تجهیز آزما (ایران) طبق دستورالعمل شرکت سازنده استخراج و با استفاده از دستگاه نانودراپ میزان OD طول موج ۲٦۰ به ۲۸۰ خوانش و عدد ۱/۹ به دست آمد. سپس سنتز cDNA از روی توتال RNA انجام شد. واکنش Real-Time PCR برای سنجش میزان بیان ژن‌های αSMA، collagen1α، NOX1 و NOX2 با استفاده از کیت RealQ Plus 2x Master Mix Green" low Rox" (Ampliqon, Denmark) و با استفاده از دستگاه Applied Biosystems QuantStudio3 انجام شد. پرایمرهای مورد استفاده به شرح زیر می‌باشند که از شرکت سیناکلون (ایران) خریداری شدند.

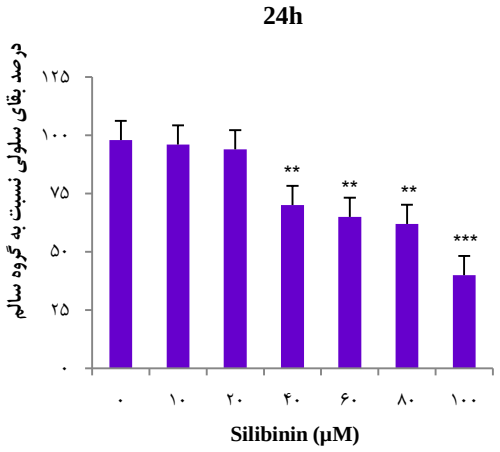
توالی رفت ژن αSMA: 5'- CCGGGACTAAGACGGGAATC- 3'
توالی برگشت ژن αSMA: 5'- CCATCACCCCCTGATGTCTG- 3'
توالی رفت ژن Collagen1α: 5'- GGAATGAAGGGACACAGAGGTT- 3'
توالی برگشت ژن Collagen1α: 5'- AGTAGCACCATCATTTCCACGA- 3'
توالی رفت ژن NOX1: 5'- CTGTTGCCTAGAAGGGCTCC- 3'
توالی برگشت ژن NOX1: 5'- ACAGGCCAATGTTGACCCAA- 3'
توالی رفت ژن NOX2: 5'- CCTAAGATAGCGGTTGATGG- 3'
توالی برگشت ژن NOX2: 5'- GACTTGAGAATGGATGCGAA- 3'
توالی رفت ژن GAPDH: 5'- GACAGTCAGCCGCATCTTCT- 3'
توالی برگشت ژن GAPDH: 5'- GCCCAATACGACCAAATCCGT- 3'

اندازه‌گیری میزان تولید رادیکال‌های آزاد (ROS) در سلول: در این آزمایش، از ماده‌ی (Dichlorodihydrofluorescein diacetate) DCFH-DA برای شناسایی این گونه‌های واکنشگر استفاده می‌شود. این ماده به سلول‌های زنده نفوذ کرده و سپس توسط آنزیم‌های استراز داخل سلولی داستر (de-esterified) می‌شود و درون سلول به دام می‌افتد. در ادامه پس از احیا شدن توسط گونه‌های آزاد اکسیژن، از خود خاصیت فلورسانس نشان می‌دهد. این فلوروفور در طول موج Ex/Em = ٤٨٥/٥٢٥ نانومتر در فلوریمتری با پلیت قابلیت خوانش دارد.

آزمایشات سه بار تکرار شدند. داده‌های حاصل به صورت (میانگین و انحراف معیار) و با استفاده از آزمون ANOVA و Tukey به کمک نرم‌افزار SPSS نسخه‌ی ۲۲ (version 22, IBM Corporation, Armonk, NY) مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. سطح معنی‌داری $P < ۰/۰۵$ در نظر گرفته شد.

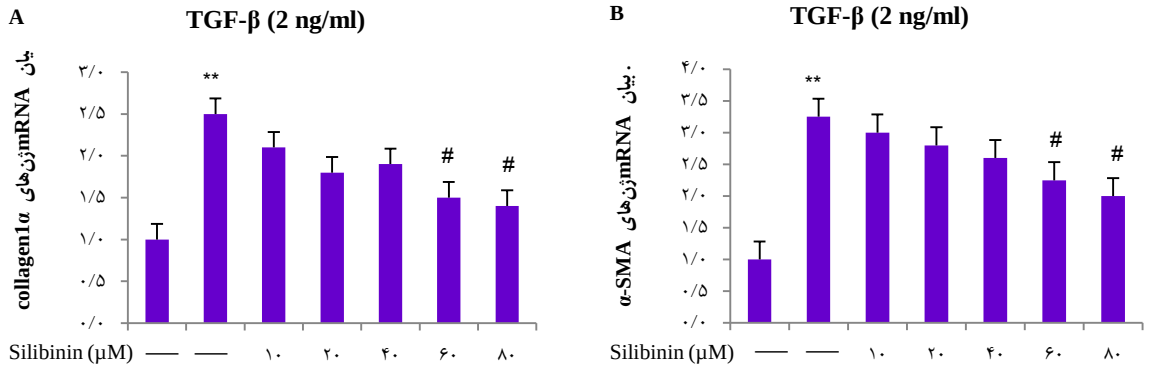
یافته‌ها

اثر سیلیبینین بر زنده ماندن سلول‌های ستاره‌ای کبد: به منظور دست‌یابی به غلظت‌های مناسب از سیلیبینین برای تیمار سلولی، آزمایش MTT در زمان ٢٤ ساعت انجام شد. بدین منظور ابتدا سلول‌ها با غلظت‌های ۱۰، ۲۰، ٤۰، ٦۰، ۸۰ و ۱۰۰ میکرومولار از سیلیبینین تیمار شدند. در غلظت ۱۰۰ میکرومولار سیلیبینین، درصد بقای سلولی نسبت به گروه سالم به طور معنی‌داری کاهش پیدا کرد ($P < ۰/۰۰۱$). به همین دلیل برای بررسی بیان ژن‌ها، غلظت‌های پایین‌تر IC۵۰ مورد استفاده قرار گرفت (شکل ۱).



شکل ۱. نمودار نتایج میزان بقای سلول‌های ستاره‌ای کبد تیمار شده با غلظت‌های متفاوت سیلیبینین به مدت ٢٤ ساعت. میزان IC۵۰ برابر ۹۳/٤ میکرومولار به دست آمد، که نشان می‌دهد در غلظت‌های بالاتر از IC۵۰ میزان بقای سلول‌های ستاره‌ای کبد به صورت معنی‌داری کاهش می‌یابد. *: ($P < ۰/۰۰۱$)؛ **: ($P < ۰/۰۱$).**

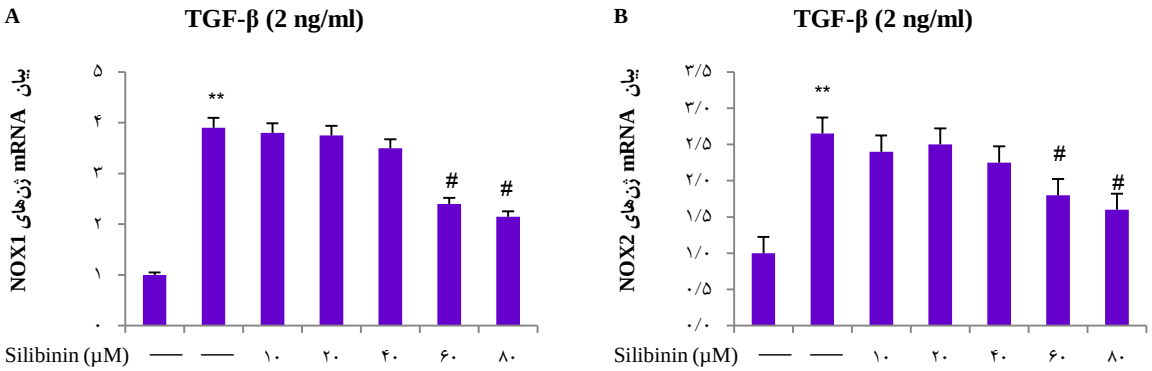
بیان mRNA ژن‌های پروفیبروژنیک در حضور سیلیبینین: به منظور بررسی اثر سیلیبینین بر میزان بیان mRNA ژن‌های αSMA، collagen1α، NOX1 و NOX2، یک گروه به عنوان گروه شاهد (گروه سالم) در نظر گرفته شد.



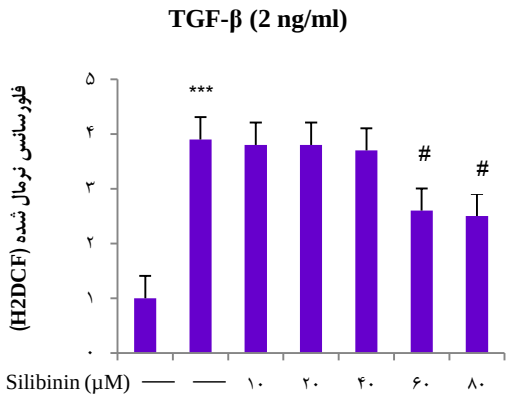
شکل ۲. بیان mRNA ژن‌های αSMA و collagen1α در حضور سیلیبینین در رده‌ی سلولی LX2: نتایج حاصل از سه بار تکرار به صورت (میانگین ± انحراف معیار) و تغییرات بیان mRNA ژن‌های αSMA و collagen1α در زمان ۲۴ ساعت نسبت به گروه سالم گزارش شده است. مطابق شکل، بیان ژن‌های αSMA و collagen1α در غلظت‌های ۶۰ و ۸۰ میکرومولار سیلیبینین نسبت به گروه فیبروتیک کاهش بیان معنی‌داری پیدا کرده است. سطح معنی‌داری $P < ۰/۰۵$ در نظر گرفته شد. از ژن GAPDH به عنوان ژن مرجع استفاده شده است. **: ($P < ۰/۰۱$)، #: ($P < ۰/۰۵$).

سپس تیمار سلول‌ها، با TGF-β با غلظت ۲ng/ml (۱۰) به منظور آسیب سلولی و ایجاد شرایط فیبروتیک (گروه فیبروتیک) به مدت ۲۴ ساعت انجام شد و بیان mRNA ژن‌های پروفیبروژنیک ذکر شده با تکنیک Real-Time PCR اندازه‌گیری گردید. پس از ۲۴ ساعت تیمار با TGF-β در مرحله‌ی بعد، سلول‌ها با غلظت‌های ۱۰، ۲۰، ۴۰، ۶۰ و ۸۰ میکرومولار از سیلیبینین (گروه‌های درمان) به مدت ۲۴ ساعت تیمار و انکوبه شدند. نتایج حاصل از آنالیز تکنیک Real-Time PCR نشان داد که میزان بیان ژن‌های αSMA، collagen1α، NOX1 و NOX2 در غلظت‌های ۶۰ و ۸۰ میکرومولار از سیلیبینین نسب به گروه فیبروتیک کاهش معنی‌داری داشتند ($P < ۰/۰۵$). (اشکال ۲ و ۳).

میزان تولید رادیکال‌های آزاد (ROS) در سلول: به منظور بررسی اثر سیلیبینین بر میزان تولید رادیکال‌های آزاد (ROS) در سلول ابتدا به عنوان گروه فیبروتیک، تیمار سلول‌ها با TGF-β با غلظت ۲ ng/ml به منظور آسیب سلولی و ایجاد شرایط فیبروتیک به مدت ۲۴ ساعت انجام گردید. سپس میزان تولید ROS درون‌سلولی اندازه‌گیری شد. سپس گروه‌های درمان نیز پس از ۲۴ ساعت تیمار با TGF-β با غلظت‌های ۱۰، ۲۰، ۴۰، ۶۰ و ۸۰ میکرومولار از سیلیبینین به مدت ۲۴ ساعت تیمار و انکوبه شدند. نتایج نشان داد که میزان تولید ROS درون سلولی در غلظت‌های ۶۰ و ۸۰ میکرومولار از سیلیبینین نسب به گروه فیبروتیک کاهش معنی‌داری پیدا کرد ($P < ۰/۰۵$) (شکل ٤).



شکل ۳. بیان mRNA ژن‌های NOX1 و NOX2 در حضور سیلیبینین در رده‌ی سلولی LX2: نتایج حاصل از سه بار تکرار به صورت (میانگین ± انحراف معیار) و تغییرات بیان mRNA ژن‌های NOX1 و NOX2 در زمان ۲۴ ساعت نسبت به گروه سالم گزارش شده است. مطابق شکل، بیان ژن‌های NOX1 و NOX2 در غلظت‌های ۶۰ و ۸۰ میکرومولار سیلیبینین نسبت به گروه فیبروتیک، کاهش بیان معنی‌داری پیدا کرده است. سطح معنی‌داری $P < ۰/۰۵$ در نظر گرفته شد. از ژن GAPDH به عنوان ژن مرجع استفاده شده است. **: $P < ۰/۰۱$، ***: $P < ۰/۰۰۱$، #: $P < ۰/۰۵$



شکل ٤. میزان تولید **ROS** درون سلولی در حضور سیلیبینین در رده‌ی سلولی **LX2**؛ نتایج حاصل از سه بار تکرار به صورت (میانگین ± انحراف معیار) و تغییرات تولید **ROS** درون سلولی در زمان ٢٤ ساعت نسبت به گروه سالم گزارش شده است. مطابق شکل، میزان تولید **ROS** درون سلولی در غلظت‌های ٦٠ و ٨٠ میکرومولار سیلیبینین نسبت به گروه فیبروتیک کاهش بیان معنی‌داری پیدا کرده است. سطح معنی‌داری **P** < ٠/٠٥ در نظر گرفته شد. از ژن **GAPDH** به عنوان ژن مرجع استفاده شده است.
*** **P** < ٠/٠٠١؛ # **P** < ٠/٠٥

بحث

فیبروز کبدی یک بیماری مزمن است که در اثر عفونت‌های ویروسی (مانند ویروس هپاتیت B و C)، سوء مصرف الکل و اختلالات متابولیکی و ژنتیکی ایجاد شده و منجر به تجمع بیش از حد پروتئین‌های ماتریکس خارج سلولی از جمله کلاژن می‌شود. در حال حاضر، کمبود داروهای ضد فیبروتیک مؤثر و کارآمد برای درمان فیبروز کبد یک مشکل بزرگ جهانی است (١٢، ١٣).

در این مطالعه، ما بررسی کردیم که آیا سیلیبینین می‌تواند از پیشرفت فیبروز در مدل فیبروز کبدی ناشی از TGF-β جلوگیری کند. نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که غلظت‌های بالاتر از ٨٠ میکرومولار از سیلیبینین باعث مرگ بیش از نیمی از سلول‌های ستاره‌ای در محیط کشت می‌شود و به همین دلیل از غلظت‌های پایین‌تر از IC٥٠ برای تیمار سلولی استفاده شد. همچنین نتایج نشان داد که میزان بیان ژن‌های αSMA، collagen1α، NOX1 و NOX2 در حضور غلظت‌های ٦٠ و ٨٠ میکرومولار از سیلیبینین در زمان ٢٤ ساعت نسبت به گروه فیبروتیک با کاهش معنی‌داری همراه بودند.

مطالعات نشان دادند، که مسیر سیگنالینگ TGF-β یکی از مهم‌ترین مسیرهای سیگنالینگ درگیر در پیشرفت و پاتوژنز بیماری فیبروز کبدی است (١٤). در روند پیشرفت فیبروژنز کبدی، HSCهای فعال شده، نقش اصلی را به عنوان منبع اصلی تولید ECM در کبد بازی می‌کنند (١٥). HSCهای فعال شده، ماتریکس خارج سلولی فراوانی را ترشح می‌کنند، بنابراین ترشح بیش از حد پروتئین‌های ماتریکس باعث ایجاد فیبروز کبدی می‌شود. یکی از مشخصه‌های بیماری مزمن کبد، استرس اکسیداتیو (OS) است که در فعال شدن HSCها نقش دارد. گونه‌های اکسیژن واکنش‌پذیر (ROS) تولید شده توسط سلول‌های کبدی، سیگنال‌های فعال‌سازی پاراکرین را برای HSCها فراهم می‌کنند (١٦، ١٧).

NOXها خانواده‌ای از آنزیم‌ها هستند که برای طیف وسیعی از عملکردهای دفاعی و سیگنالینگ میزبان، ROS (سوپراکسید یا پراکسید هیدروژن) را تولید می‌کنند. هفت ایزوفرم NOX در سلول‌های پستانداران بیان می‌شود (NOX1-5، DUOX1 و DUOX2). همه‌ی ایزوفرم‌های NOX آنزیم‌های متصل به غشاء هستند که برای فعالیت خود به NADPH وابسته هستند. ایزوفرم‌های NOX1 و NOX2 بیشتر در HSCها بیان می‌شوند و در توسعه‌ی فیبروز کبد نقش دارند (٦، ١٨).

Lan و همکاران نشان دادند که، جلوگیری از بیان ژن‌های NOX، آسیب کبدی ناشی از التهاب و فیبروز در موش‌هایی که CCl4 دریافت کرده بودند به طور چشمگیری بهبود پیدا کرد (١٩). NOXs منبع اصلی ROS در کبد است و پاسخ‌های فیبروژنیک ناشی از آنژیوتانسین II، PDGF و TGF-β را در HSCها و ماکروفاژها واسطه می‌کند.

Liang و همکاران نشان دادند، فاگوسیتوز اجسام آپوپتوتیک توسط HSCها پس از مرگ سلول‌های کبد، منجر به فعال شدن NOXs و تولید فراوان کلاژن می‌شود که می‌تواند زمینه‌ی پیشرفت فیبروز کبدی را فراهم کند (٢٠).

در مطالعه‌ی ما، سیلیبینین توانست در حضور TGF-β، به طور مؤثری بیان ژن‌های NOX1، NOX2 و همچنین بیان ژن αSMA که یک نشانگر مهم برای تغییر فنوتیپ HSCها از حالت غیرفعال به حالت فعال (میوفیبروبلاست) می‌باشد را کاهش دهد. مسیر سیگنالینگ متعارفی که توسط TGF-β فعال می‌شود، توسط گیرنده‌ی نوع یک خود واسطه‌گری می‌شود. در سطح سلولی TGF-β دارای دو نوع رسپتور عرض غشایی نوع ١ و ٢ (TβRI و TβRII) با فعالیت سرین ترئونین کینازی می‌باشد. به دنبال قرار گرفتن TGF-β بر روی TβRII باعث فسفریله و فعال کردن TβRI می‌شود که Smad٢/٣ (Rsmad) را در محل رزیدیوهای خاص سرین در ناحیه‌ی c ترمینال‌شان فسفریله می‌کند به این ترتیب Smad٢/٣ توانایی اتصال به Smad٤ (Co-Smad) را برای تشکیل کمپلکس هترومریک Smad پیدا می‌کند و در نهایت برای رونویسی ژن‌هایی از جمله NOXs و پروتئین‌های ماتریکس خارج سلول مانند کلاژن وارد هسته می‌شود (١٤).

نتیجه‌گیری

بنابراین، سرکوب بیان ژن‌هایی که در نهایت توسط این مسیر سیگنالینگ فعال می‌شوند، باعث کاهش ماتریکس خارج سلولی و در نهایت باعث بهبود فیبروز کبدی می‌شود. درمان با سیلیبینین در نهایت از طریق تداخل در مسیر سیگنالینگ NOXs و کاهش ROS باعث مهار فعال شدن HSCها و کاهش آسیب کبدی ناشی از کلاژن فراوان در شرایط آزمایشگاهی می‌شود. این نتایج نشان داد که سیلیبینین ممکن است یک عامل جذاب برای درمان فیبروز کبد باشد.

تشکر و قدردانی

نتایج گزارش شده در این مطالعه، حاصل طرح تحقیقاتی ثبت شده در دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز با شماره طرح CMRC-0038 می‌باشد. تمامی امور مربوط به اجرای این مطالعه، در گروه بیوشیمی و مرکز تحقیقات سلولی ملکولی دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز انجام شده است. از اساتید محترم و کارشناسان دلسوزی که در انجام این طرح همکاری نمودند، کمال تشکر را داریم.

References

1. Seki E, Schnabl B. Role of innate immunity and the microbiota in liver fibrosis: crosstalk between the liver and gut. J Physiol 2012; 590(3): 447-58.
2. Carloni V, Luong TV, Rombouts K. Hepatic stellate cells and extracellular matrix in hepatocellular carcinoma: more complicated than ever. Liver Int 2014; 34(6): 834-43.
3. Seki E, De Minicis S, Österreicher CH, Kluwe J, Osawa Y, Brenner DA, et al. TLR4 enhances TGF-β signaling and hepatic fibrosis. Nat Med 2007; 13(11): 1324-32.
4. Liu C, Chen X, Yang L, Kisseleva T, Brenner DA, Seki E. Transcriptional repression of the transforming growth factor β (TGF-β) Pseudoreceptor BMP and activin membrane-bound inhibitor (BAMBI) by Nuclear Factor κB (NF-κB) p50 enhances TGF-β signaling in hepatic stellate cells. J Biol Chem2014; 289(10): 7082-91.
5. Qu Y, Zhang Q, Cai X, Li F, Ma Z, Xu M, et al. Exosomes derived from miR-181-5p-modified adipose-derived mesenchymal stem cells prevent liver fibrosis via autophagy activation. J Cell Mol Med 2017; 21(10): 2491-502.
6. Crosas-Molist E, Fabregat I. Role of NADPH oxidases in the redox biology of liver fibrosis. Redox Biol 2015; 6: 106-11.
7. Tamayo C, Diamond S. Review of clinical trials evaluating safety and efficacy of milk thistle (Silybum marianum [L.] Gaertn.). Integr Cancer Ther 2007; 6(2): 146-57.
8. Xu F, Yang J, Negishi H, Sun Y, Li D, Zhang X, et al. Silibinin decreases hepatic glucose production through the activation of gut–brain–liver axis in diabetic rats. Food Funct 2018; 9(9): 4926-35.
9. Lv DD, Wang YJ, Wang ML, Chen EQ, Tao YC, Zhang DM, et al. Effect of silibinin capsules combined with lifestyle modification on hepatic steatosis in patients with chronic hepatitis B. Sci Rep 2021; 11(1): 655.
10. Shi YF, Zhang Q, Cheung PY, Shi L, Fong CC, Zhang Y, et al. Effects of rhDecorin on TGF-β1 induced human hepatic stellate cells LX-2 activation. Biochim Biophys Acta 2006; 1760(11): 1587-95.
11. Trappoliere M, Caligiuri A, Schmid M, Bertolani C, Failli P, Vizzutti F, et al. Silybin, a component of sylimarin, exerts anti-inflammatory and anti-fibrogenic effects on human hepatic stellate cells. J Hepatol 2009; 50(6): 1102-11.
12. Reungoat E, Grigorov B, Zoulim F, Pécheur EI. Molecular crosstalk between the hepatitis C virus and the extracellular matrix in liver fibrogenesis and early carcinogenesis. Cancers (Basel) 2021; 13(9): 2270.
13. Schuppan D, Ashfaq-Khan M, Yang AT, Kim YO. Liver fibrosis: Direct antifibrotic agents and targeted therapies. Matrix Biol 2018; 68-69: 435-51.
14. Afarin R, Babaahmadi Rezaei H, Yaghouti SH, Taghvaei NM. The effect of cholesterol on the activation of TGF-β/Smad3C signaling pathway in hepatic stellate cells and its role in the progression of liver fibrogenesis. J Isfahan Med Sch 2021; 39(619): 212-8. [In Persian].
15. Aydın MM, Akçalı KC. Liver fibrosis. Turk J Gastroenterol 2018; 29(1): 14-21.
16. Lin L, Gong H, Li R, Huang J, Cai M, Lan T, et al. Nanodrug with ROS and pH dual-sensitivity ameliorates liver fibrosis via multicellular regulation. Adv Sci (Weinh) 2020; 7(7): 1903138.
17. Kim HH, Choi SE, Jeong WI. Oxidative stress and glutamate excretion in alcoholic steatosis: Metabolic synapse between hepatocyte and stellate cell. Clin Mol Hepatol 2020; 26(4): 697.
18. Paik YH, Kim J, Aoyama T, De Minicis S, Bataller R, Brenner DA. Role of NADPH oxidases in liver fibrosis. Antioxid Redox Signal 2014; 20(17): 2854-72.
19. Lan T, Kisseleva T, Brenner DA. Deficiency of NOX1 or NOX4 prevents liver inflammation and fibrosis in mice through inhibition of hepatic stellate cell activation. PloS One 2015; 10(7): e0129743.
20. Liang S, Kisseleva T, Brenner DA. The role of NADPH oxidases (NOXs) in liver fibrosis and the activation of myofibroblasts. Front Physiol 2016; 7: 17.

DOI: *10.48305/jims.v40.i664.0172*

Journal of Isfahan Medical School **Vol. 40, No. 664, 4th Week, May 2022**

Received: 12.12.2021 Accepted: 02.03.2022 Published: 18.05.2022

The Effects of Silibinin on Gene Expression of NOX1, NOX2, and the Production of Reactive Oxygen Species in TGF-B-Treated Liver Stellate Cells

Mojtaba Rashidi[1], Reza Afarin[1], Elham Shakerian[1], Shahla Asadizadeh[1], Samaneh Salehipour-Bavarsad[1]

Original Article

Abstract

Background: Liver fibrosis is a chronic disease caused by viral infections (such as hepatitis B and C viruses), alcohol abuse, and metabolic and genetic disorders that leads to excessive accumulation of extracellular matrix proteins, including collagen. The progression of liver fibrosis can leads to cirrhosis and liver cancer. In this study, the role of silibinin in the prevention of liver fibrosis progression was investigated.

Methods: LX2 cells were cultured in DMEM medium with 10% Fetal Bovine Serum (FBS). In the first stage, cells were treated with TGF-β at a concentration of 2 ng / ml (fibrotic group) for cell damage and fibrotic conditions for 24 hours, then at concentrations of 10, 20, 40, 60 and 80 µM of silibinin (The treatment groups) were treated for 24 hours and the mRNA expression of αSMA, collagen1α, NOX1 and NOX2 genes and the rate of intracellular reactive oxygen species (ROS) production were measured.

Findings: The results showed that the mRNA expression of αSMA, collagen1α, NOX1 and NOX2 genes at concentrations of 60 and 80 µM silibinin was significantly reduced compared to the TGF-β group. Also, the rate of intracellular ROS production at 60 and 80 µM concentrations of silibinin was significantly reduced compared to the TGF-β group ($P < 0.05$).

Conclusion: According to our study, silibinin inhibits the activation of Hepatic stellate cells (HSCs) by reducing the expression of genes involved in the progression of hepatic fibrosis and reduces liver damage caused by excessive production of collagen and reactive oxygen species in vitro. The findings from this study indicate that silybinin may be a potential therapeutic agent in the treatment of liver fibrosis.

Keywords: Liver fibrosis; Silibinin; Reactive oxygen species; Transforming growth factor beta

Citation: Rashidi M, Afarin R, Shakerian E, Asadizadeh S, Salehipour-Bavarsad S. **The Effects of Silibinin on Gene Expression of NOX1, NOX2, and the Production of Reactive Oxygen Species in TGF-B-Treated Liver Stellate Cells.** J Isfahan Med Sch 2022; 40(664): 172-8.

1- Cellular and Molecular Research Center, Department of Clinical Biochemistry, School of Medicine, Ahvaz Jundishapur University of Medical Sciences, Ahvaz, Iran

Corresponding Author: Samaneh Salehipour-Bavarsad, Cellular and Molecular Research Center, Department of Clinical Biochemistry, School of Medicine, Ahvaz Jundishapur University of Medical Sciences, Ahvaz, Iran; Email: s.salehipour@yahoo.com