DOI: 10.22122/jims.v35i453.8822 Published by Vesnu Publications

مجله دانشکده پزشکی اصفهان
سال سی و پنجم/شماره‌ی ۴۵۳/هفته‌ی اول دی ماه ۱۳۹۶

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۶/۲۶
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۹/۴

بررسی تأثیر عصاره‌ی انار در بیان پروتئین کلاژن نوع II، نشانگر ویژه‌ی غضروف در روند کندروژنز سلول‌های بنیادی

مهری کتانی[۱]، بهزاد ذوالفقاری[۲]، میترا سلیمانی[۳]، علی والیانی[۳]، بتول هاشمی‌بنی[۴]

مقاله پژوهشی

چکیده

مقدمه: بافت غضروف، فاقد عروق و اعصاب است و قابلیت ترمیم ندارد. در مهندسی بافت غضروف، از سلول‌های بنیادی و عوامل رشد استفاده می‌شود. در این مطالعه، تأثیر عصاره‌ی انار به عنوان عامل غضروف‌ساز سلول‌های بنیادی مشتق از بافت چربی بررسی گردید.

روش‌ها: سلول‌های بنیادی مشتق از چربی انسانی سومین پاساژ سلولی، در محیط کشت القای کندروژنیک در داربست فیبرین به مدت ۲ هفته تحت تأثیر عصاره‌ی انار کشت داده شدند. روش‌های (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) و Western blot برای بررسی سلول‌های تمایز یافته به کار رفت.

یافته‌ها: سلول‌های بنیادی تحت تأثیر عصاره‌ی انار به کندروسیت تمایز یافتند و تولید کلاژن نوع II توسط سلول‌های متمایز شده به اثبات رسید.

نتیجه‌گیری: عصاره‌ی انار، یک القا کننده‌ی مناسب جهت بیان پروتئین کلاژن نوع II در سلول‌های بنیادی مشتق از چربی است.

واژگان کلیدی: کندروژنز، سلول‌های بنیادی، انار، کلاژن نوع II

ارجاع: کتانی مهری. ذوالفقاری بهزاد، سلیمانی میترا، والیانی علی، هاشمی‌بنی بتول. **بررسی تأثیر عصاره‌ی انار در بیان پروتئین کلاژن نوع II، نشانگر ویژه‌ی غضروف در روند کندروژنز سلول‌های بنیادی.** مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۳۹۶؛ ۳۵ (۴۵۳): ۱۵۴۵-۱۵۴۰

مقدمه

از آن جایی که غضروف نوعی بافت همبند اختصاصی فاقد عروق و اعصاب است، قابلیت ترمیم مناسبی ندارد. آسیب‌های بافت غضروف نظیر استئوآرتریت یکی از معضلات گسترده‌ی جهانی است (۱).

با وجود تحقیقات متعدد، همچنان روش مناسب و نتیجه‌بخشی برای ترمیم و بازسازی کامل ناحیه‌ی آسیب دیده‌ی غضروف ارایه نشده است. این ناکارآمدی درمان‌های متداول، تحقیقات را به سمت مهندسی بافت با استفاده از سلول‌های غضروف‌ساز، مواد داربستی و عوامل رشد سوق داده است تا بتوانند غضروف هیالن تولید نمایند (۲).

داربست مناسب برای مهندسی بافت غضروف، باید از نظر زیستی تخریب‌پذیر، سازگار و متخلخل باشد و بر فرایندهای چسبندگی، تکثیر، تمایز و مهاجرت سلول‌ها تأثیر مثبتی داشته باشد (۲).

داربست فیبرین، یکی از انواع داربست‌های طبیعی است که از پروتئین فیبرینوژن تشکیل شده است و باعث چسبندگی بهتر کندروسیت‌ها می‌شود (۳). مطالعات صورت گرفته بر روی بافت غضروف، نشان می‌دهد که کندروسیت‌های به دام افتاده در ژل فیبرین، دارای توان تولید کلاژن و الاستین بالایی می‌باشند (۴). سلول‌های بنیادی مزانشیمی (Mesenchymal stem cells یا MSCs) سلول‌های چند ظرفیتی هستند که می‌توانند در شرایط آزمایشگاهی به انواع سلول‌های تخصصی مانند کندروسیت، استئوسیت یا ادیپوسیت تبدیل شوند.

سلول‌های مزانشیمی بنیادی بالغ را می‌توان از مغز استخوان و یا

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه علوم تشریحی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
۲- استاد، گروه فارماکوگنوزی، دانشکده‌ی داروسازی و علوم دارویی و مرکز تحقیقات علوم دارویی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
۳- استادیار، گروه علوم تشریحی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
۴- دانشیار، گروه علوم تشریحی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
نویسنده‌ی مسؤول: بتول هاشمی بنی
Email: hashemibeni@med.mui.ac.ir

بافت چربی جدا کرد و به عنوان یک منبع مناسب سلولی برای مهندسی بافت استفاده نمود (۲). بیومولکول‌های مهمی در مهندسی بافت غضروف به کار می‌روند و نقش آن‌ها، القای غضروف و حفظ فنوتیپ سلول‌های غضروف است. سه خانواده از عوامل رشد که در تمایز غضروف اثر دارند شامل Transforming growth factor (TGF)، Fibroblast growth factor (FGF) و Insulin-like growth factor (IGF) می‌باشند (۲).

Transforming growth factor-beta (TGF-β)، باعث تحریک غضروف‌سازی و بیان برخی از ژن‌ها نظیر کلاژن II و ساخت گلیکوزامینوگلیکان می‌شوند و با توجه به معایبی مانند هزینه‌ی بالا و نیمه عمر پایین و تأثیر هایپرتروفه کردن سلول‌های تمایز یافته، دستیابی به ترکیب مناسب ضرورت دارد (۵).

ترکیبات طبیعی مانند عصاره‌ی انار بر غضروف تأثیر دارند. درخت انار، درخت کوچکی از خانواده‌ی Punicaceae است که بومی مشرق زمین می‌باشد. عصاره‌ی انار، مانع آسیب سلول‌های غضروفی و تغییرات پروتئوگلیکان‌های ماتریکس در مفاصل استئوآرتریت می‌شود (۶). ترکیبات عصاره‌ی انار شامل Prodelphinidin anthocyanins، Ellagic acid، Gallic acid و روغن دانه‌ی انار نیز شامل Oestrone acid punicic ellagic acid، Steroidal oestrogen و Non-steroidal phytoestrogens می‌باشند (۷).

Anthocyanins، گروهی از ترکیبات پلی‌فنول‌ها هستند که دارای فعالیت ضد التهابی هستند. عصاره‌ی انار، مانع تخریب ماتریکس و التهاب و باعث حفظ یکپارچگی غضروف از طریق مکانیسم‌های مختلف می‌شود (۸). مطالعات نشان می‌دهد مصرف انار، باعث مهار محرک‌های التهابی (عامل تخریب غضروف) می‌شود و ترکیب مناسبی برای جلوگیری از استئوآرتریت است (۹).

عصاره‌ی انار دارای اثر مهاری بر سیتوکاین‌های پیش التهابی و Mitogen-activated protein kinase (MAPK) است که MAPK منجر به فعال شدن MMP می‌گردد (۸). مطالعات نشان داده است Prodelphinidin منجر به مهار Prostaglandins E2 و تولید کلاژن نوع II می‌شود (۱۰). از آن جایی که جهت القای تمایز سلول‌های بنیادی به کندروسیت تحت تأثیر عصاره‌ی انار گزارشی به دست نیامده است. از این رو، در مطالعه‌ی حاضر سعی شده است که تأثیر عصاره‌ی انار به عنوان یک عامل القا کننده بر روند کندروژنز در سلول‌های بنیادی مشتق از چربی و تولید پروتئین کلاژن نوع II مورد بررسی قرار گیرد.

روش‌ها

جدا کردن و تکثیر سلول‌های بنیادی از بافت چربی: جهت جداسازی سلول‌های بنیادی، بافت چربی زیر جلدی انسانی با کسب اجازه‌ی کتبی از بیماران (به تعداد ۳ نفر) در اتاق عمل تحت شرایط استریل به دست آمد و به مدت ۴۰ دقیقه در انکوباتور، تحت تأثیر آنزیم کلاژناز نوع I (Sigma) به میزان ۱ میلی‌گرم به ازای هر گرم بافت چربی تجزیه گردید. سپس، آنزیم با محیط کشت Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) (Gibco) و Fetal bovine serum (FBS) ۱۰ درصد غیر فعال شد و محلول بافتی به دست آمده با شتاب ۱۴۰۰ دور در قیقه به مدت ۸ دقیقه سانتریفیوژ گردید و رسوب سلولی در محیط کشت DMEM + FBS ۱۰ درصد حاوی ۱ درصد آنتی‌بیوتیک پنی‌سیلین/استرپتومایسین (Gibco) در شرایط CO_2 ۵ درصد و حرارت ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد کشت داده شد (۱۱).

تهیه‌ی ترومبین: ۱۵ میلی‌لیتر Fresh frozen plasma (FFP) تهیه شده از مرکز بانک خون اصفهان همراه با ۱۰میلی‌لیتری گلوکونات کلسیم به مدت ۶۰ دقیقه انکوبه گردید. سپس، با شتاب ۲۲۰۰ دور در دقیقه به مدت ۸ دقیقه سانتریفیوژ انجام گرفت. محلول رویی حاوی ترومبین بود (۱۲).

عصاره‌گیری: حدود ۳ کیلوگرم میوه‌ی انار از منطقه‌ی نجف‌آباد استان اصفهان جمع‌آوری شد و حدود ۱/۵ کیلوگرم دانه‌ی انار به دست آمد. دانه‌ها به مدت چند روز خشک شدند. دانه‌های انار خشک به صورت پودر درآمد و در مقدار کافی از حلال اتانول ۷۰ درصد خیسانده شد و ۴ ساعت روی Shaker قرار داده شد. پس از ۲۴ ساعت، عصاره با قیف بوخنر صاف شد. باقی مانده‌ی گیاه روی قیف به ظرف ماسراسیون (Maceration) بازگردانده و با حلال تازه خیسانده شد. این عمل، جهت اطمینان از کامل شدن عصاره‌گیری، سه بار تکرار گردید (۱۳). عصاره‌ی مایع به دست آمده از روش ماسراسیون، در چند مرحله با استفاده از دستگاه روتاری در دمای ۴۵ درجه‌ی سانتی‌گراد و با سرعت ۶۰ دور در دقیقه، به میزان حدود یک چهارم حجم اولیه، تا تبخیر کامل اتانول تغلیظ شد. سپس، عصاره‌ی تغلیظ شده فریز گردید و با دستگاه Freeze-drying تا به دست آمدن کامل پودر نرم خشک گردید (۱۴).

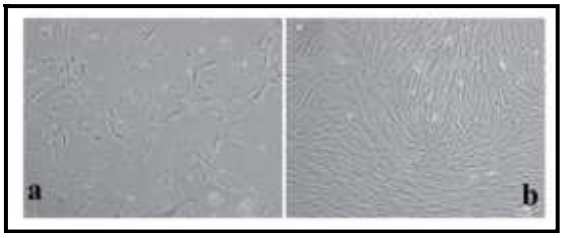
القای تمایز کندروژنیک: سلول‌های پاساژ سوم به تعداد ۱×۱۰^۶ سلول/میلی‌لیتر به ۵۰۰ میکرولیتر ترومبین موجود در چاهک پلیت ۲۴ خانه منتقل و ۵۰۰ میکرولیتر از محلول Cryocipitate (تهیه شده از مرکز بانک خون اصفهان) حاوی فیبرینوژن به آن اضافه گردید تا داربست فیبرین- سلول تشکیل شود. سپس، سلول‌های بنیادی کاشته شده در داربست، تحت تأثیر مدیوم القای کندروژنیک حاوی DMEM high glucose (Gibco)، Penicillin/streptomycin (Gibco) ۱۰۰ میکروگرم/میلی‌لیتر، دگزامتازون (Dexamethasone)

(Sigma) ۱۰۰ نانومول، insulin، transferrin، selenium (ITS) (Sigma) به ترتیب ۱۰، ۵/۵ و ۵ میکروگرم/میلی‌لیتر، Bovine serum albumin (BSA) (Sigma) ۰/۵ میلی‌گرم/میلی‌لیتر و Ascorbate 2 phosphate (ASP) (Sigma) ۵۰ میکروگرم/میلی‌لیتر، جهت تمایز به کندروسیت به مدت ۱۴ روز کشت داده شدند. در گروه مورد، از محیط کندروژنیک با غلظت ۱۰۰ میکروگرم/میلی‌لیتر عصاره‌ی انار استفاده گردید و در گروه شاهد، عصاره‌ی انار اضافه نشد (۱۲).

روش Western blot: در این روش، 10^6 سلول توسط Tris-Sodium dodecyl sulfate (Tris-SDS) ۲ درصد با pH معادل ۷/۵ (سیتومتین ژن، ایران) تجزیه شد و نمونه‌های پروتئینی با استفاده از روش Sodium dodecyl sulfate-Polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) برای ۱۲۰ دقیقه با ولتاژ ۷۰ ولت الکتروفورز گردید. آن گاه، پروتیئن‌ها به کاغذ نیتروسلولز (Whatman) با جریان ۴ میلی‌آمپر و مدت زمان ۱۲۰ دقیقه منتقل شدند. غشای نیتروسلولز برای مرحله‌ی Blocking یک شبانه‌روز در شیر خشک (سیتومتین ژن، ایران) ۴ درصد قرار گرفت. سپس، سه مرتبه با محلول Tris-Buffered saline (TBS) شسته شد. غشا، یک شب در محلول آنتی‌بادی اولیه Mouse anti-human collagen type II (Abcam) با غلظت ۱:۱۰۰۰ در دمای آزمایشگاه انکوبه شد و بعد از شستشو، در محلول Secondary antibody با غلظت ۱:۵۰۰۰ برای مدت ۳ ساعت قرار گرفت و پس از شستشوی نهایی، باندهای پروتینی با محلول 3,3′-Diaminobenzidine (DAB) (Abcam) مشخص گردید. نتایج روش Western blot با استفاده از نرم‌افزار Image J به داده‌های نیمه کمی تبدیل گردید (۱۵).

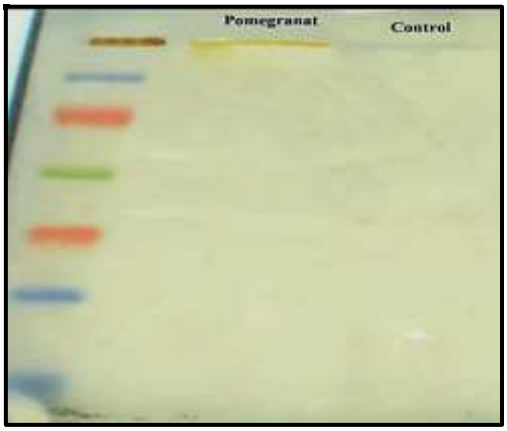
یافته‌ها

مورفولوژی سلولهای بنیادی مشتق از بافت چربی: مورفولوژی میکروسکوپی سلولهای بنیادی در پاساژ سوم، شبه فیبروبلاست و کشیده هستند ولی در کشت اولیه (P_0) سلول‌ها شکل‌های مختلفی دارند(شکل ۱).



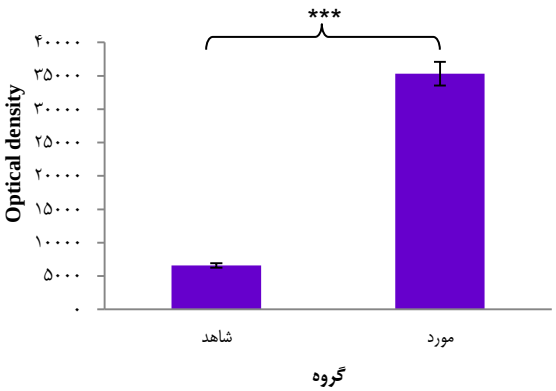
شکل ۱. تصویر میکروسکوپ اینورت از سلول‌های بنیادی انسانی مشتق از چربی در کشت اولیه بعد از سه روز (a) و در پاساژ سوم (b) (۴۰ ×)

نتایج Western blot: بر اساس نتایج Western blot پس از القای تمایز کندروژنیک، وجود پروتئین کلاژن نوع II در گروه دارای عصاره‌ی انار بر روی کاغذ نیتروسلولز به صورت کیفی مشخص گردید. در حالی که در گروه شاهد (فاقد عصاره‌ی انار) باند مربوط به این پروتئین بسیار ضعیف بود (شکل ۲).



شکل ۲. نتایج کیفی تولید پروتئین کلاژن نوع II در گروه‌های مورد (عصاره‌ی انار) و شاهد

نتایج کمی تولید پروتئین کلاژن II در گروه‌های مورد و شاهد در شکل ۳ دیده می‌شود.



شکل ۳. نتایج کمی تولید پروتئین کلاژن II در گروه‌های شاهد و مورد (عصاره‌ی انار) و مقایسه‌ی آن‌ها

*** ارتباط معنی‌داری بین دو گروه وجود داشت ($P < ۰/۰۰۱$).

بحث

از آن جایی که غضروف نوعی بافت همبند اختصاصی فاقد عروق و اعصاب است و قابلیت ترمیم مناسبی نیز ندارد، دسترسی به شیوه‌ی مناسب برای ترمیم بافت غضروف ضروری است (۱۶).

داربست فیبرین، یکی از انواع داربست‌های طبیعی است که از

پروتئین فیبرینوژن تشکیل شده است (۱۷، ۳). مطالعات صورت گرفته در زمینه‌ی بافت غضروف نشان می‌دهد که کندروسیت‌های به دام افتاده در ژل فیبرین، دارای توان تولید کلاژن و الاستین بالایی می‌باشند (۱۸، ۴). Hendrickson و همکاران، اثر داربست فیبرین بر کندروژنز سلول‌های بنیادی مشتق از مغز استخوان خرگوش را بررسی و افزایش اگریکان و کلاژن نوع II را گزارش نموده است (۱۹). برای تولید غضروف در مطالعه‌ی حاضر، سلول‌های بنیادی بافت چربی به دلیل تعداد بیشتر، در دسترس بودن راحت‌تر و قابلیت تکثیر بیشتر نسبت به سلول‌های بنیادی مغز استخوان به کار رفت (۲۱-۲۰).

یکی از ترکیبات مؤثر بر غضروف، عصاره‌ی انار (Pomegranate) است. عصاره‌ی انار، دارای اثر مهاری روی سیتوکاین‌های پیش‌التهابی و Matrix metalloproteinases (MMPs) است (۲۳-۲۲). در مطالعات انجام شده، مشخص گردیده است که Prodelphinidin (ترکیبی که در انار موجود است)، منجر به مهار Prostaglandins E2 و تولید کلاژن نوع II توسط کندروسیت‌های غضروف می‌شود (۲۴). همچنین، دارای ترکیبات مهمی مانند Anthocyanins است که از ترکیبات پلی‌فنول‌ها هستند و بر تولید کلاژن و اگریکان در کندروسیت‌ها تأثیر مثبتی دارد.

Garbacki و همکاران، اثر عصاره‌ی انار بر کندروسیت‌های انسانی را بررسی کردند و مشخص گردید که Anthocyanins بر تولید کلاژن II و پروتئوگلیکان تأثیر مثبتی دارد (۲۵).

هادی‌پور جهرمی و مظفری کرمانی، در شرایط In vivo جهت بررسی اثر عصاره‌ی انار بر مفصل تیبوفمورال موش، عصاره‌ی انار را به صورت خوراکی در دزهای معین به موش‌ها دادند و تغییرات هیستوپاتولوژیک در مفاصل زانو دو هفته بعد مورد مطالعه‌ی میکروسکوپی قرار گرفت. نتایج مطالعه نشان داد که عصاره‌ی انار باعث مهار MMP و باقی ماندن پروتئوگلیکان‌های زانو و حفاظت از غضروف زانو گردید (۲۴).

Shukla و همکاران در شرایط In vitro از عصاره‌ی انار در کندروسیت موش استفاده و تولید کلاژن II راگزارش کردند (۲۶).

Rasheed و همکاران، برای کندروسیت موش دارای OA در شرایط In vitro از عصاره‌ی انار استفاده کردند که منجر به کاهش التهاب مفاصل، کاهش Nitric oxide (NO) و تولید کلاژن II گردید (۲۷).

در گزارش‌های موجود از تحقیقات پیشین، از عصاره‌ی انار به طور عمده در مدل‌های استئوآرتریت جهت کاهش التهاب استفاده شده است و در مورد القای تمایز سلول‌های بنیادی به کندروسیت تحت تأثیر این ترکیب اطلاعاتی به دست نیامده است. در این مطالعه، برای اولین مرتبه، از عصاره‌ی انار در روند القای کندروژنز از سلول‌های بنیادی در داربست فیبرین استفاده گردید و تولید پروتئین کلاژن نوع II که نشانگر مهم غضروف می‌باشد، به اثبات رسید.

نتیجه‌گیری نهایی این که افزودن عصاره‌ی انار به محیط کندروژنیک، می‌تواند تولید کلاژن نوع II را که نشانگر مهم غضروف محسوب می‌شود، القا کند و احتمال می‌رود در روند مهندسی بافت غضروف، عامل مهم و ارزشمندی باشد.

تشکر و قدردانی

مقاله‌ی حاضر، حاصل پایان‌نامه‌ی کارشناسی ارشد است که با شماره‌ی ۳۹۵۲۶۵ در حوزه‌ی معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی اصفهان تصویب و با حمایت‌های این معاونت به انجام رسید. از این رو، نویسندگان مقاله از زحمات ایشان تشکر و قدردانی می‌نمایند.

References

1. Hardingham T, Tew S, Murdoch A. Tissue engineering: Chondrocytes and cartilage. Arthritis Res Ther 2002; 4(3): S63.
2. Oseni AO, Seifalian AM, Crowley C, Boland MZ, Butler PE. Cartilage tissue engineering: the application of nanomaterials and stem cell technology. Rijeka, Croatia: InTech; 2011.
3. Cao Z, Dou C, Dong S. Scaffolding biomaterials for cartilage regeneration. Nanomater 2014; 2014: 489128.
4. Silverman RP, Passaretti D, Huang W, Randolph MA, Yaremchuk MJ. Injectable tissue-engineered cartilage using a fibrin glue polymer. Plast Reconstr Surg 1999; 103(7): 1809-18.
5. Shafaei H, Esfandiari E, Esmaeili A, Razavi S, Hashemibeni B, Nasr Esfahani MH, et al. Optimizing a novel method for low intensity ultrasound in chondrogenesis induction. Adv Biomed Res 2013; 2: 79.
6. Rahimi HR, Arastoo M, Ostad SN. A comprehensive review of Punica granatum (Pomegranate) properties in toxicological, pharmacological, cellular and molecular biology researches. Iran J Pharm Res 2012; 11(2): 385-400.
7. Jurenka JS. Therapeutic applications of pomegranate (Punica granatum L.): A review. Altern Med Rev 2008; 13(2): 128-44.
8. Rasheed Z, Akhtar N, Haqqi TM. Pomegranate extract inhibits the interleukin-1beta-induced activation of MKK-3, p38alpha-MAPK and transcription factor RUNX-2 in human osteoarthritis chondrocytes. Arthritis Res Ther 2010; 12(5): R195.
9. Ahmed S, Wang N, Hafeez BB, Cheruvu VK, Haqqi TM. Punica granatum L. extract inhibits IL-1beta-induced expression of matrix metalloproteinases by inhibiting the activation of MAP kinases and NF-kappaB in human chondrocytes in vitro. J Nutr 2005; 135(9): 2096-102.
10. Schubert SY, Lansky EP, Neeman I. Antioxidant and eicosanoid enzyme inhibition properties of

pomegranate seed oil and fermented juice flavonoids. J Ethnopharmacol 1999; 66(1): 11-7.
11. Valiani A, Hashemibeni B, Esfandiary E, Ansar MM, Kazemi M, Esmaeili N. Study of carbon nano-tubes effects on the chondrogenesis of human adipose derived stem cells in alginate scaffold. Int J Prev Med 2014; 5(7): 825-34.
12. Yang SH, Wu CC, Shih TT, Chen PQ, Lin FH. Three-dimensional culture of human nucleus pulposus cells in fibrin clot: Comparisons on cellular proliferation and matrix synthesis with cells in alginate. Artif Organs 2008; 32(1): 70-3.
13. Hajhashemi V, Ghannadi A, Hajiloo M. Analgesic and anti-inflammatory effects of Rosa damascena hydroalcoholic extract and its essential oil in animal models. Iran J Pharm Res 2010; 9(2): 163-8.
14. Saluja AK, Donovan EA, Yamanaka K, Yamaguchi Y, Hofbauer B, Steer ML. Cerulein-induced in vitro activation of trypsinogen in rat pancreatic acini is mediated by cathepsin B. Gastroenterology 1997; 113(1): 304-10.
15. Burnette WN. "Western blotting": Electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate--polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. Anal Biochem 1981; 112(2): 195-203.
16. Boyan BD, Lohmann CH, Romero J, Schwartz Z. Bone and cartilage tissue engineering. Clin Plast Surg 1999; 26(4): 629-45, ix.
17. Eberli D. Tissue engineering for tissue and organ regeneration. Rijeka, Croatia: InTech; 2011.
18. Hollister SJ. Porous scaffold design for tissue engineering. Nat Mater 2005; 4(7): 518-24.
19. Hendrickson DA, Nixon AJ, Grande DA, Todhunter RJ, Minor RM, Erb H, et al. Chondrocyte-fibrin matrix transplants for resurfacing extensive articular cartilage defects. J Orthop Res 1994; 12(4): 485-97.
20. Zuk PA, Zhu M, Mizuno H, Huang J, Futrell JW, Katz AJ, et al. Multilineage cells from human adipose tissue: Implications for cell-based therapies. Tissue Eng 2001; 7(2): 211-28.
21. Cowan CM, Shi YY, Aalami OO, Chou YF, Mari C, Thomas R, et al. Adipose-derived adult stromal cells heal critical-size mouse calvarial defects. Nat Biotechnol 2004; 22(5): 560-7.
22. Afaq F, Saleem M, Krueger CG, Reed JD, Mukhtar H. Anthocyanin- and hydrolyzable tannin-rich pomegranate fruit extract modulates MAPK and NF-kappaB pathways and inhibits skin tumorigenesis in CD-1 mice. Int J Cancer 2005; 113(3): 423-33.
23. Larrosa M, Gonzalez-Sarrias A, Yanez-Gascon MJ, Selma MV, Azorin-Ortuno M, Toti S, et al. Anti-inflammatory properties of a pomegranate extract and its metabolite urolithin-A in a colitis rat model and the effect of colon inflammation on phenolic metabolism. J Nutr Biochem 2010; 21(8): 717-25.
24. Hadipour-Jahromy M, Mozaffari-Kermani R. Chondroprotective effects of pomegranate juice on monoiodoacetate-induced osteoarthritis of the knee joint of mice. Phytother Res 2010; 24(2): 182-5.
25. Garbacki N, Angenot L, Bassleer C, Damas J, Tits M. Effects of prodelphinidins isolated from Ribes nigrum on chondrocyte metabolism and COX activity. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol 2002; 365(6): 434-41.
26. Shukla M, Gupta K, Rasheed Z, Khan KA, Haqqi TM. Consumption of hydrolyzable tannins-rich pomegranate extract suppresses inflammation and joint damage in rheumatoid arthritis. Nutrition 2008; 24(7-8): 733-43.
27. Rasheed Z, Akhtar N, Anbazhagan AN, Ramamurthy S, Shukla M, Haqqi TM. Polyphenol-rich pomegranate fruit extract (POMx) suppresses PMACI-induced expression of pro-inflammatory cytokines by inhibiting the activation of MAP Kinases and NF-kappaB in human KU812 cells. J Inflamm (Lond) 2009; 6: 1.

DOI: 10.22122/jims.v35i453.8822 Published by Vesnu Publications

Journal of Isfahan Medical School Received: 17.09.2017

Vol. 35, No. 453, 1st Week, January 2018 Accepted: 25.11.2017

The Effect of Pomegranate Extract on Producing Type II Collagen in Differentiation of Adipose-Derived Stem Cells into Chondrocytes

Mehri Katani[1], Behzad Zolfaghari[2], Mitra Soleimani[3], Ali Valiani[3], Batool Hashemibeni[4]

Original Article

Abstract

Background: Cartilage tissue is avascular and has no repairing capacity. For cartilage tissue engineering, stem cells and growth factors are used. In this study, the effect of pomegranate as inducer for chondrogenesis of adipose-derived stem cells (ADSCs) was evaluated.

Methods: Human adipose-derived stem cells in third passage seeded in fibrin were cultured in chondrogenic medium with pomegranate for 2 weeks. 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT assay) and western blot technique were applied for evaluation of differentiated cells.

Findings: Adipose-derived stem cells differentiated into chondrocytes; and type II collagen production by differentiated cells was proved.

Conclusion: Pomegranate extract is an appropriate inducer for production of type II collagen in adipose-derived stem cells.

Keywords: Chondrogenesis, Stem cells, Pomegranate, Type II collagen

Citation: Katani M, Zolfaghari B, Soleimani M, Valiani A, Hashemibeni B. **The Effect of Pomegranate Extract on Producing Type II Collagen in Differentiation of Adipose-Derived Stem Cells into Chondrocytes.** J Isfahan Med Sch 2018; 35(453): 1540-5.

1- MSc Student, Department of Anatomical Sciences, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
2- Professor, Department of Pharmacognosy, School of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences AND Pharmaceutical Sciences Research Center, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
3- Assistant Professor, Department of Anatomical Sciences, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
4- Associate Professor, Department of Anatomical Sciences, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
Corresponding Author: Batool Hashemibeni, Email: hashemibeni@med.mui.ac.ir