

بررسی اثر مهاری ایزورامنتین بر بیان ژن‌های NOXs و سطح ROS تولید شده در سلول‌های ستاره‌ای کبد و نقش آن در جلوگیری از پیشرفت فیروز کبدی

مجتبی رشیدی^۱، مریم چراغ‌زاده^۱، الهام شاکریان^۲، عماد مطور^۳، هستی بهشتی نسب^۴، سمانه صالحی‌پور باورصاد^۱

مقاله پژوهشی

چکیده

مقدمه: بیماری فیروز کبدی اغلب به فعال شدن سلول‌های ستاره‌ای کبد (HSC (Hepatic stellate cells و تشکیل بیش از حد زخم در کبد نسبت داده می‌شود. ایزورامنتین با مهار بیان ژن‌های فیروژنیک ناشی از TGF-β1 (Transforming growth factor beta)، در برابر فیروز کبدی اثر محافظتی دارد. در این مطالعه، نقش ایزورامنتین بر میزان بیان فاکتورهای فیروز کبدی و سطح ROS (Reactive oxygen species) در سلول‌های ستاره‌ای کبد مورد بررسی قرار گرفت.

روش‌ها: ابتدا سلول‌ها تا رسیدن به تراکم مناسب در محیط کشت DMEM همراه با ۱۰ درصد از FBS (Fetal Bovine Serum) کشت داده شدند و با غلظت‌های ۷۵ و ۱۰۰ میکرومولار از ایزورامنتین به مدت ۲۴ ساعت تیمار شدند، سپس میزان بیان ژن‌های α-SMA، Collagen1α، NOX1، NOX2 و نیز سطح ROS برای ارزیابی فیروز کبدی مورد سنجش قرار گرفت.

یافته‌ها: نتایج نشان داد که میزان بیان ژن‌های α-SMA، Collagen1α، NOX1، NOX2 و نیز سطح ROS در غلظت ۲ng/m از TGF-β1 نسبت به گروه شاهد، افزایش معنی‌داری پیدا کرد. همچنین در حضور غلظت‌های ۷۵ و ۱۰۰ میکرومولار ایزورامنتین بیان این ژن‌ها و نیز سطح ROS نسبت به گروه فیروز به صورت معنی‌داری کاهش یافت.

نتیجه‌گیری: TGF-β با افزایش بیان ژن‌های درگیر در پیشرفت بیماری فیروز کبدی و نیز افزایش سطح ROS یافت افزایش تولید ماتریکس خارج سلولی از جمله Collagen1α می‌شود. ایزورامنتین باعث کاهش بیان ژن‌های درگیر در پیشرفت فیروز کبدی می‌شود. در نتیجه می‌تواند از پیشرفت فیروز کبدی جلوگیری کند.

واژگان کلیدی: فیروز کبدی؛ ایزورامنتین (۳-متیل کوئرستین)؛ TGF-β1؛ NADPH؛ اکسیداز؛ گونه‌های فعال اکسیژن

ارجاع: رشیدی مجتبی، چراغ‌زاده مریم، شاکریان الهام، مطور عماد، بهشتی نسب هستی، صالحی‌پور باورصاد سمانه. بررسی اثر مهاری ایزورامنتین بر بیان ژن‌های NOXs و سطح ROS تولید شده در سلول‌های ستاره‌ای کبد و نقش آن در جلوگیری از پیشرفت فیروز کبدی. مجله دانشکده پزشکی

اصفهان ۱۴۰۳؛ ۴۲ (۷۵۷): ۱۲۰-۱۱۳

یک مرحله محوری در پیشرفت بیماری‌های مزمن کبدی است که اغلب در سیروز کبدی به اوج خود می‌رسد. علاوه بر این، ممکن است با کارسینوم کبدی (HCC (Hepatocellular carcinoma و نارسایی کبد مرتبط باشد. در نتیجه، شناسایی عوامل پیش فیروتیک جدید که در ایجاد فیروز کبدی نقش دارند، از اهمیت بالایی برخوردار است.

در فرایند فیروز کبدی، فعال شدن سلول‌های ستاره‌ای کبدی

مقدمه

فیروز کبدی، به عنوان یک مکانیسم ترمیمی در پاسخ به آسیب‌های مزمن کبدی ایجاد می‌شود که با تجمع ماتریکس خارج سلولی (Extra cellular matrix) (ECM) مشخص می‌شود. عفونت‌های هپاتیت ویروسی مانند هپاتیت B و هپاتیت C، سوء مصرف الکل، اختلالات خودایمنی و ناهنجاری‌های متابولیک ارثی به عنوان عوامل اصلی ایجاد فیروز کبدی هستند (۱، ۲). فیروز کبدی، نشان‌دهنده‌ی

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

۲- دکترا، مرکز تحقیقات سلولی مولکولی، گروه بیوشیمی بالینی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز، اهواز، ایران

۳- کارشناسی ارشد، مرکز تحقیقات سلولی مولکولی، گروه هماتولوژی، دانشکده‌ی پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز، اهواز، ایران

۴- کارشناسی ارشد، مرکز تحقیقات سلولی مولکولی، گروه بیوشیمی بالینی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز، اهواز، ایران

نویسنده‌ی مسؤول: سمانه صالحی‌پور باورصاد؛ استادیار، مرکز تحقیقات سلولی مولکولی، گروه بیوشیمی بالینی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز، اهواز، ایران
Email: s.salehipour@yahoo.com

روش‌ها

کشت و تیمار HSCها: مطالعه‌ی حاضر با مجوز کمیته‌ی اخلاق دانشگاه علوم پزشکی جنیدی شاپور اه‌سواز (IR.AJUMS.REC.1400.512) طراحی و انجام شد. در این مطالعه، ایزورامنتین از شرکت Sigma، (Fetal bovine serum) از شرکت FBS، آنتی‌بیوتیک‌های پنی‌سیلین و استرپتومایسین (Dulbecco's Modified Eagle Medium) از شرکت DMEM از شرکت Bio-Idea 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. این رده‌ی سلولی، ویژگی‌های کلیدی سیگنالینگ سایتوکین‌ها، متابولیسم رتینوئید و فیبروز را حفظ می‌کند، و این باعث می‌شود که این رده‌ی سلولی برای مطالعات مبتنی بر تشخیص و درمان فیبروز کبدی انسان بسیار مناسب باشد. سلول‌ها به مدت ۲۴ ساعت در شرایط Starvation قرار داده شدند، سپس تیمار سلول‌ها با غلظت‌های ۷۵ و ۱۰۰ میکرومولار ایزورامنتین (۱۲) به مدت ۲۴ ساعت انجام شد. برای انجام آزمایش سه گروه در نظر گرفته شد: ۱- گروه شاهد؛ ۲- گروه تیمار با TGF- β (گروه فیبروز کبدی) و ۳- گروه ایزورامنتین (گروه درمان).

تکنیک Real-Time PCR به منظور انجام Real time PCR. سلول‌های LX-۲ تیمار شده بعد از اتمام زمان انکوباسیون توسط تریپسین از کف پلیت جمع‌آوری شدند. سپس، محتویات پلیت به مدت ۵ دقیقه با دور ۱۲۰۰۰rpm در دمای ۴ درجه سانتیگراد گردید. سپس، رسوب سلولی جهت استخراج توتال RNA با استفاده از کیت شرکت کیازن (آلمان) طبق دستورالعمل شرکت سازنده، استخراج و با استفاده از دستگاه نانودراپ میزان OD طول موج ۲۶۰ به ۲۸۰ خوانش و عدد ۲.۱ بدست آمد. سپس سنتز cDNA با استفاده از کیت تاکارا (ژاپن) از روی توتال RNA انجام شد. واکنش Real-Time PCR برای سنجش میزان بیان ژن‌های NOX1، NOX2، α -SMA، Collagen1 α و GAPDH با استفاده از کیت "RealQ Plus 2x Master Mix Green" (Ampliqon, Denmark) (low Rox) و با استفاده از دستگاه Applied Biosystems QuantStudio3 انجام شد. شروع به کار دستگاه با حرارت دادن محلول RT-PCR تا دمای ۹۵ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۱۵ دقیقه، به دنبال آن ۴۰ سیکل دناتوراسیون در دمای ۹۵ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۱۵ ثانیه و اتصال پرایمرها در دمای ۶۰ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه بود. کل زمان اجرای این پروتکل در سیستم ما ۱۱۰ دقیقه به طول انجامید. پرایمرهای مورد استفاده به شرح زیر می‌باشند که از شرکت سیناکلون (ایران) خریداری شدند. از GAPDH به عنوان کنترل داخلی جهت

(Hepatic stellate cells) HSCs نقش مهمی را ایفا می‌کند (۳). سلول‌های ستاره‌ای کبدی تحت تأثیر عوامل رشد (شامل PDGF و TGF- β)، سایتوکین‌های التهابی (مانند IL1 β و TNF α)، کموکاین‌ها و محصولات استرس اکسیداتیو فعال می‌شوند. متعاقباً، HSCهای فعال شده به سنتز ماتریکس خارج سلولی در کبد کمک می‌کنند.

رسوب کلاژن، به ویژه، نقش مهمی در پیشرفت فیبروز کبد ایفا می‌کند (۴، ۵). TGF- β به عنوان یک مارکر اصلی در میان عوامل مسئول فعال‌سازی HSC ظاهر می‌شود. به عنوان یک سایتوکین پروفیبروتیک کلیدی در کبد، TGF- β نقش مرکزی را در فعال‌سازی سلول‌های ستاره‌ای کبد ایفا می‌کند و آن‌ها را به میوفیبروبلاست تبدیل می‌نماید. این فرایند منجر به افزایش بیان کلاژن نوع ۱، نوع کلاژن غالب تولید شده در مراحل اولیه فیبروز کبدی می‌شود که به تجمع بیش از حد ماتریکس خارج سلولی و تغییرات سلولی کمک می‌کند (۶، ۷).

مسیر سیگنالینگ آغاز شده توسط TGF- β شامل گیرنده‌ی نوع ۱ آن است. در سطح سلول، TGF- β با دو نوع گیرنده‌ی غشایی، یعنی نوع ۱ و نوع ۲ (T β RI و T β RII) تعامل دارد، که هر دو دارای فعالیت سرین ترئونین کیناز هستند. پس از اتصال TGF- β به T β RII، گیرنده‌ی تحت فسفوریلاسیون و فعال‌سازی قرار می‌گیرد و متعاقباً Smad2/3 (R-Smad) را در ناحیه‌ی C ترمینال خود با استفاده از فعالیت کینازی فسفریله می‌کند. این فعال‌سازی Smad2/3 را قادر می‌سازد تا یک کمپلکس هترومیریک با Smad4 (Co-Smad) تشکیل دهد، که سپس برای رونویسی ژن به هسته منتقل می‌شود. این فرایند شامل رونویسی ژن‌های مرتبط با پروتئین‌های ماتریکس خارج سلولی مانند کلاژن و همچنین بیان ژن‌های NOXs و به دنبال آن افزایش سطح ROS (Reactive oxygen species) است. از این‌رو، سایتوکین TGF- β به عنوان عنصر اساسی در پیشرفت فیبروز کبد عمل می‌کند (۸، ۹).

ایزورامنتین، یک فلاونوئید مشتق شده از Hippophae rhamnoides L، دارای خواص آنتی‌اکسیدانی، ضد التهابی و ضد توموری است. با مهار اتوفازای سلول‌های کبدی و تسریع آپوپتوز، اثرات محافظتی کبدی را نشان می‌دهد (۱۰). مطالعات قبلی نشان داده‌اند که ایزورامنتین می‌تواند فیبروز کبدی ناشی از CCl4 را با سرکوب سیگنالینگ Smad با واسطه‌ی TGF- β کاهش دهد (۱۱). با این حال، مشخص نیست که آیا ایزورامنتین می‌تواند فیبروز کبدی را با کاهش دادن سطح ROS توسط آنزیم‌های NOXs کاهش دهد یا خیر. این مطالعه با هدف بررسی تأثیر ایزورامنتین به عنوان یک عامل ضد فیبروتیک بر میزان بیان ژن‌های NOX1، NOX2، Collagen1 α و نیز سطح ROS در سلول‌های ستاره‌ای کبد انجام شده است.

نرمالیزه کردن بیان ژن استفاده شد.

(version 24, IBM Corporation, Armonk, NY) مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. سطح معنی‌داری ($P < 0/05$) در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

بررسی مورفولوژی سلول‌ها و بیان mRNA ژن‌های پروفیبروزیک در حضور ایزورامنتین: با توجه به فوتیپ و ظاهر سلول‌های 2LX، تبدیل سلول‌های HSC ساکن به میوفیبروبلاست‌های فیبروزیک شاخص اولیه فعال شدن این سلول‌ها است. سلول‌های فعال شده شکل دوکی داشتند که درازتر بودند و به میوفیبروبلاست‌ها تبدیل می‌شدند، اما سلول‌های غیرفعال تقریباً گرد بودند. شکل سلول‌های کنترل و سلول‌های تیمار شده با $TGF-\beta$ و ایزورامنتین در شکل 1 (A, B, C) نشان داده شده است. به منظور بررسی اثر ایزورامنتین بر میزان بیان ژن‌های α -SMA، Collagen1 α ، ابتدا به عنوان گروه فیروز کبدی، تیمار سلول‌ها با $TGF-\beta$ با غلظت 2ng/ml به منظور آسیب سلولی و ایجاد شرایط فیروتیک به مدت 24 ساعت انجام شد. سپس بیان mRNA ژن‌های پروفیبروزیک ذکر شده با تکنیک Real-Time PCR اندازه‌گیری شد. سپس گروه درمان نیز پس از 24 ساعت تیمار با $TGF-\beta$ با غلظت‌های 75 و 100 میکرومولار از ایزورامنتین به مدت 24 ساعت تیمار و انکوبه شدند. نتایج نشان داد که میزان بیان ژن‌های α -SMA، Collagen1 α در غلظت‌های 75 و 100 میکرومولار ایزورامنتین نسبت به گروه $TGF-\beta$ کاهش معنی‌داری داشتند ($P < 0/05$) (شکل 1، D, E).

بیان mRNA ژن‌های NOX1، NOX2 در حضور ایزورامنتین: به منظور بررسی اثر ایزورامنتین بر میزان بیان ژن‌های NOX1، NOX2 ابتدا به عنوان گروه فیروز کبدی، تیمار سلول‌ها با $TGF-\beta$ با غلظت 2 ng/ml به منظور آسیب سلولی و ایجاد شرایط فیروتیک به مدت 24 ساعت انجام شد. سپس بیان mRNA ژن‌های NOX1، NOX2 با تکنیک Real-Time PCR اندازه‌گیری شد. سپس گروه درمان نیز پس از 24 ساعت تیمار با $TGF-\beta$ با غلظت‌های 75 و 100 میکرومولار از ایزورامنتین به مدت 24 ساعت تیمار و انکوبه شدند. نتایج نشان داد که میزان بیان ژن‌های NOX1، NOX2 در غلظت‌های 75 و 100 میکرومولار ایزورامنتین نسبت به گروه $TGF-\beta$ کاهش معنی‌داری داشتند ($P < 0/05$) (شکل 2، A, B).

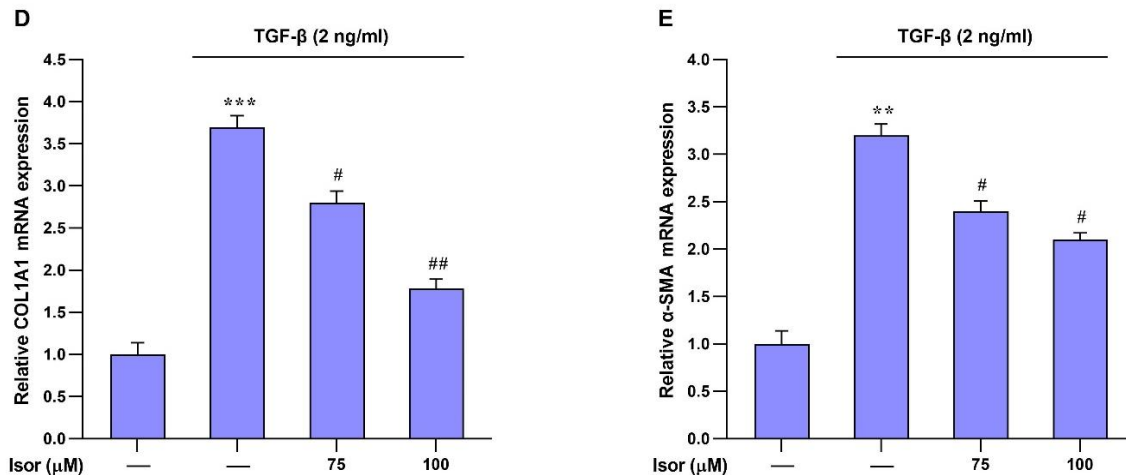
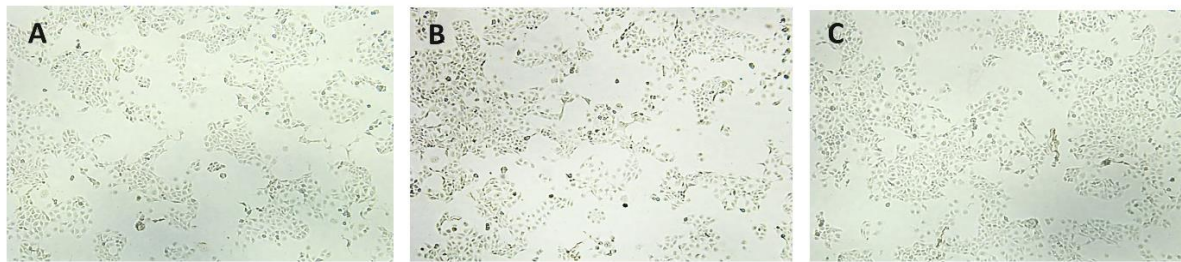
میزان تولید رادیکال‌های آزاد (ROS): به منظور بررسی اثر ایزورامنتین بر میزان تولید رادیکال‌های آزاد (ROS) در سلول‌های 2LX، ابتدا به عنوان گروه فیروز کبدی، تیمار سلول‌ها با $TGF-\beta$ و با غلظت 2ng/ml به منظور آسیب سلولی و ایجاد شرایط فیروتیک به مدت 24 ساعت انجام شد. سپس میزان تولید ROS درون سلولی اندازه‌گیری شد.

NOX1	:	5'-	توالی رفتت ژن
			AGGCTCCAGACCTCCATTGA- 3'
NOX1:	5'-	توالی برگشتت ژن	
			AAGGCAAGGCAGTTCCGAG- 3'
NOX2	:	5'-	توالی رفتت ژن
			GGCATTCTAGTACAGCTCA- 3'
NOX2:	5'-	توالی برگشتت ژن	
			ATTGGTCCTCGGGAGTCAGA- 3'
α -SMA	:	5'-	توالی رفتت ژن
			GCCATCTTCATTGGGATGGA- 3'
α -SMA	:	5'-	توالی برگشتت ژن
			CCCTGACAGGACGTTGTGA- 3'
Collagen1 α	:	5'-	توالی رفتت ژن
			CCGATGGATTCCAGTTCGAGT- 3'
Collagen1 α	:	5'-	توالی برگشتت ژن
			GGGACTTCTGAGGTTGCCA- 3'
GAPDH	:	5'-	توالی رفتت ژن
			CTCTCTGCTCCTCCCTGTTC- 3'
GAPDH	:	5'-	توالی برگشتت ژن
			CGATACGGCCAAATCCGTTC- 3'

اندازه‌گیری میزان تولید رادیکال‌های آزاد (ROS) در سلول: در

این روش، از ماده‌ی DCHF (دی کلرودی‌هیدروفلورسئین) برای شناسایی گونه‌های فعال اکسیژن ROS استفاده می‌شود. DCHF توانایی نفوذ به سلول‌های زنده و استری‌زدایی را دارد که توسط آنزیم‌های استراز داخل سلولی کاتالیز می‌شود و منجر به گیر افتادن آن در داخل سلول می‌گردد. پس از بازسازی توسط گونه‌های اکسیژن آزاد ROS، DCHF خواص فلورسانس را نشان می‌دهد. فلورسانس ساطع شده توسط این فلوروفور را می‌توان در طول موج تحریک/انتشار 480/525 نانومتر، با استفاده از فلورمتری با صفحه اندازه‌گیری کرد. به همین منظور، سلول‌های 2-LX به تعداد 5×10^4 سلول در هر چاهک قرار داده شدند. بعد از 24 ساعت، سلول‌های 2-LX با $TGF\beta 1$ با غلظت 2ng/ml به مدت 24 ساعت انکوبه شدند. سپس سلول‌ها با غلظت‌های 75 و 100 میکرومولار ایزورامنتین به مدت 24 ساعت انکوبه شدند. در پایان زمان انکوباسیون، سلول‌ها با PBS شستشو داده شدند و $25 \mu M$ از محلول DCHF به هر چاهک اضافه شد و به مدت 30 دقیقه در دمای 37 درجه قرار داده شد. بعد از اتمام زمان فوق، فلورسانس در طول موج تحریک/انتشار 480/525 نانومتر، با استفاده از دستگاه فلوریمتر مدل 6270 ساخت کمپانی Jenway انگلیس اندازه‌گیری گردید.

آزمایشات سه بار تکرار شدند. داده‌های حاصل به صورت میانگین \pm انحراف معیار) و با استفاده از آزمون ANOVA و Tukey به کمک نرم‌افزار SPSS نسخه‌ی 24



شکل ۱. شکل (A): مورفولوژی سلول‌های گروه شاهد، شکل (B): مورفولوژی سلول‌های تیمار شده با غلظت ۲ ng/ml TGF- β نسبت به گروه شاهد، شکل (C): مورفولوژی سلول‌های تیمار شده با ایزورامنتین نسبت به گروه TGF- β می‌باشد. شکل (D, E): بیان mRNA ژن‌های α -SMA و Collagen1 α در حضور ایزورامنتین در رده سلولی LX2: نتایج حاصل از سه بار تکرار بصورت (انحراف معیار \pm میانگین) و تغییرات بیان mRNA ژن‌های α -SMA و Collagen1 α در زمان ۲۴ ساعت نسبت به گروه شاهد گزارش شده است. مطابق شکل، بیان ژن‌های α -SMA و Collagen1 α در غلظت ۲ ng/ml TGF- β نسبت به گروه شاهد بصورت معنی‌داری افزایش پیدا کرد (***: TGF- β vs Control و $P < 0.001$; #: $P < 0.05$ Isor vs TGF- β). همچنین بیان ژن‌های α -SMA و Collagen1 α در غلظت‌های ۷۵ و ۱۰۰ میکرومولار ایزورامنتین نسبت به گروه TGF- β کاهش بیان معنی‌داری پیدا کرده است (# $P < 0.05$ و $P < 0.01$). سطح معنی‌داری $P < 0.05$ در نظر گرفته شد. از ژن GAPDH به عنوان ژن مرجع استفاده شده است.

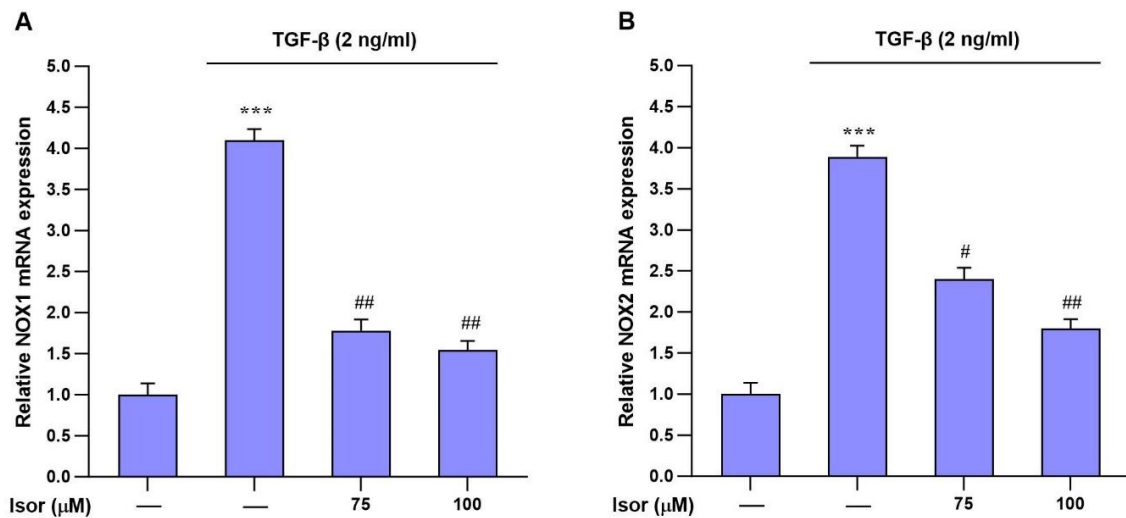
در چند سال اخیر، استفاده از داروهای مشتق شده از گیاهان به طور قابل توجهی در زمینه‌ی درمانی افزایش یافته است. ایزورامنتین، یک ترکیب فلاونوئیدی، در برگ، گل و میوه Hippophae rhamnoides L. و Ginkgo biloba L. و سایر گیاهان وجود دارد.

ایزورامنتین، یکی از مهم‌ترین مواد مؤثره در میوه‌های Hippophae rhamnoides L. و برگ‌های Ginkgo biloba L. است که دارای طیف وسیعی از اثرات فارماکولوژیک از جمله محافظت از قلب و عروق، نقش ضد التهابی، ضد تومور، آنتی‌اکسیدان، آنتی‌باکتری و آنتی‌ویروس است. ایزورامنتین در فیروز هم نقش آنتی‌اکسیدانی دارد. اثرات فارماکولوژیک ایزورامنتین به تنظیم TGF- β ، NF- κ B، MAPK، PI3K/AKT و سایر مسیرهای سیگنالینگ و عوامل پایین دست آن مربوط می‌شود.

سپس گروه درمان نیز پس از ۲۴ ساعت تیمار با TGF- β با غلظت‌های ۷۵ و ۱۰۰ میکرومولار از ایزورامنتین به مدت ۲۴ ساعت تیمار و انکوبه شدند. نتایج نشان داد که میزان تولید ROS درون سلولی در غلظت‌های ۷۵ و ۱۰۰ میکرومولار از ایزورامنتین نسبت به گروه TGF- β کاهش معنی‌داری پیدا کرد ($P < 0.05$) (شکل ۳).

بحث

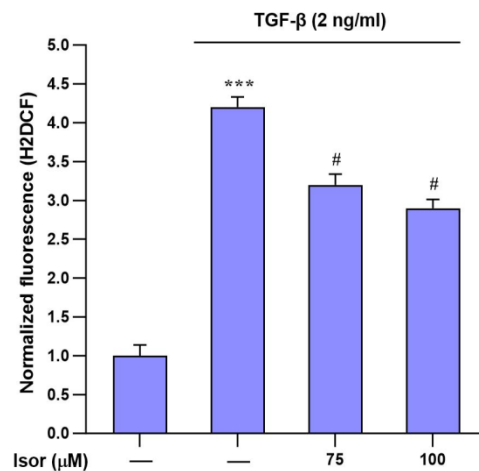
فیروز کبد، یک بیماری مزمن ناشی از عفونت‌های ویروسی (مانند ویروس هپاتیت B و C)، سوء مصرف الکل و همچنین اختلالات متابولیک و ژنتیکی است. این وضعیت منجر به تجمع غیر طبیعی پروتئین‌های ماتریکس خارج سلولی از جمله کلاژن می‌شود. در حال حاضر، فقدان داروهای ضد فیروتیک مؤثر و کارآمد برای درمان فیروز کبدی یک چالش جهانی مهم است (۱۳، ۱۴).



شکل ۲. بیان mRNA ژن‌های NOX1 و NOX2 در حضور ایزورامنتین در رده‌ی سلولی LX2: نتایج حاصل از سه بار تکرار بصورت (انحراف معیار ± میانگین) و تغییرات بیان mRNA ژن‌های NOX1 و NOX2 در زمان ۲۴ ساعت نسبت به گروه شاهد گزارش شده است. مطابق شکل، بیان ژن‌های NOX1 و NOX2 در غلظت ۲ ng/ml TGF-β نسبت به گروه شاهد بصورت معنی‌داری افزایش پیدا کرد (***: TGF-β vs Control, $P < 0.001$). همچنین بیان ژن‌های NOX1 و NOX2 پس از تیمار سلول‌ها با غلظت‌های ۷۵ و ۱۰۰ میکرومولار ایزورامنتین نسبت به گروه TGF-β، کاهش بیان معنی‌داری پیدا کرده است (#). معنی‌داری Isor vs TGF-β $P < 0.001$ و $P < 0.05$. سطح معنی‌داری $P < 0.05$ در نظر گرفته شد. از ژن GAPDH به عنوان ژن مرجع استفاده شده است.

ایزورامنتین می‌تواند رادیکال DPPH و رادیکال ABTS را از بین ببرد و پراکسیداسیون لیپیدی میتوکندری کبد را در شرایط آزمایشگاهی مهار کند و فعالیت آنتی‌اکسیدانی از خود نشان دهد (۱۰). ایزورامنتین، دارای طیف وسیعی از اثرات پیشگیرانه و درمانی بر روی بیماری‌های قلبی-عروقی (۱۵، ۱۶) و عروق مغزی (۱۷) است، مانند ضد تصلب شرایین، محافظت از سلول‌های اندوتلیال، ضد ایسکمی میوکارد، ضد فشارخون، ضد هیپوگلیسمی و ضد ترومبوز. اثرات محافظتی ایزورامنتین بر سیستم قلبی-عروقی تقریباً با خواص آنتی‌اکسیدانی، ضد التهابی و ضد آپوپتوز مرتبط است. علاوه بر این، ایزورامنتین همچنین می‌تواند عملکرد عصبی را بهبود بخشد، شناخت و حافظه را تقویت کند و از اختلالات عصبی جلوگیری و آن‌ها را درمان کند (۱۰).

در این مطالعه، ما بررسی کردیم که آیا ایزورامنتین می‌تواند از پیشرفت فیروز در مدل فیروز کبدی ناشی از TGF-β جلوگیری کند. نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که غلظت‌های ۷۵ و ۱۰۰ میکرومولار ایزورامنتین می‌تواند باعث کاهش معنی‌دار میزان بیان ژن‌های NOX1، NOX2، Collagen1α، α-SMA در زمان ۲۴ ساعت نسبت به گروه TGF-β شود. مطالعات نشان دادند، که مسیر سیگنالینگ TGF-β یکی از مهم‌ترین مسیرهای سیگنالینگ درگیر در پیشرفت و پاتوژنز بیماری فیروز کبدی است (۱۸). در روند پیشرفت فیروز کبدی، HSCهای فعال شده، نقش اصلی را



شکل ۳. میزان تولید ROS درون سلولی در حضور ایزورامنتین در رده‌ی سلولی LX2: نتایج حاصل از سه بار تکرار بصورت (انحراف معیار ± میانگین) و تغییرات تولید ROS درون سلولی در زمان ۲۴ ساعت نسبت به گروه شاهد گزارش شده است. مطابق شکل میزان تولید ROS درون سلولی در غلظت ۲ ng/ml TGF-β نسبت به گروه شاهد بصورت معنی‌داری افزایش پیدا کرد (***: TGF-β vs Control, $P < 0.001$). همچنین میزان تولید ROS درون سلولی در غلظت‌های ۷۵ و ۱۰۰ میکرومولار ایزورامنتین نسبت به گروه TGF-β، کاهش بیان معنی‌داری پیدا کرده است (#). سطح معنی‌داری Isor vs TGF-β $P < 0.05$. معنی‌داری $P < 0.05$ در نظر گرفته شد.

به عنوان منبع اصلی تولید ECM در کبد بازی می‌کنند (۱). سلول‌های ستاره‌ای فعال کبدی (HSCs) مقدار قابل توجهی ماتریکس خارج سلولی آزاد می‌کنند و ترشح بیش از حد پروتئین‌های ماتریکس عاملی در ایجاد فیروز کبدی است. بیماری‌های مزمن کبدی استرس اکسیداتیو (OS) (Oxidative stress) را به عنوان یک ویژگی مشخص نشان می‌دهند و این استرس اکسیداتیو نقش اساسی در فعال‌سازی HSCها ایفا می‌کند. هپاتوسیت‌ها گونه‌های اکسیژن فعال ROS تولید می‌کنند که به نوبه خود به عنوان سیگنال‌های فعال‌سازی پاراکرین برای تحریک فعال شدن HSCها عمل می‌کنند (۱۹، ۲۰).

اکسیدازهای (NOXs) NADPH خانوادگی از آنزیم‌ها را تشکیل می‌دهند که مسئول تولید گونه‌های فعال اکسیژن ROS، مانند سوپراکسید یا پراکسید هیدروژن هستند که عملکردهای مختلفی را در دفاع و سیگنال‌دهی میزان انجام می‌دهند. سلول‌های پستانداران هفت ایزوفرم NOX به نام‌های NOX1-5، DUOX1 و DUOX2 را بیان می‌کنند. تمام ایزوفرم‌های NOX آنزیم‌های متصل به غشاء هستند که برای فعالیت خود به NADPH وابسته می‌باشند. در زمینه‌ی فیروز کبدی، ایزوفرم‌های NOX1 و NOX2 به ویژه در سلول‌های ستاره‌ای کبدی (HSCs) برجسته هستند و نقش مهمی در ایجاد این وضعیت دارند. NOX نقش مهمی در پاسخ التهابی و فیروز در اندام‌های مختلفی از جمله کبد ایفا می‌کند. در کبد، NOXها از طریق تولید ROS منجر به فعال‌سازی سلول‌های ستاره‌ای کبدی، و کمک به فیروز کبدی می‌شوند. NOXها به عنوان منبع مهمی از گونه‌های فعال اکسیژن ROS در کبد عمل می‌کنند و نقش مهمی در میانجی‌گری پاسخ‌های فیروژنیک ناشی از آنژیوتانسین II، PDGF و TGF- β در سلول‌های ستاره‌ای کبدی (HSCs) و ماکروفاژها دارند. در مطالعه‌ای نشان داده شد که فاگوسیتوز اجسام آپوپتوز توسط HSCها، متعاقب مرگ سلول‌های کبدی، منجر به فعال شدن NOX و تولید فراوان کلاژن می‌شود. این فرایند پایه‌ای برای ایجاد فیروز کبدی فراهم می‌کند (۲۱).

از طریق گیرنده‌ی نوع I آن واسطه می‌شود. در سطح سلولی، TGF- β با دو گیرنده‌ی پوششی غشایی، نوع ۱ و ۲ (T β RI و T β RII)، که هر دو دارای فعالیت سرین-ترئونین کیناز هستند، تعامل دارد. پس از اتصال TGF- β به T β RI، T β RII فسفریله شده و فعال می‌شود، متعاقباً Smad2/3 (R-Smad) در باقی‌مانده‌های سرین خاص در ناحیه‌ی C ترمینال آن‌ها فسفریله می‌شود. در نتیجه، Smad3/2 توانایی اتصال به Smad4 Co-Smad را به دست می‌آورد و یک کمپلکس هترومیری تشکیل می‌دهد که به هسته منتقل می‌شود. سپس این مجموعه ژن‌هایی مانند NOX و پروتئین‌های ماتریکس خارج سلولی مانند کلاژن را رونویسی می‌کند (۱۸).

مطالعات پیشین نشان دادند که ایزورامنتین از طریق فعال کردن سیگنالینگ Nrf2-ARE، مهار تولید ROS با واسطه‌ی TGF- β و متعاقباً سرکوب مسیر سیگنالینگ کلاسیک TGF- β /Smad، فعال‌سازی HSC را سرکوب می‌کند. این منجر به مهار بیان ژن فیروز شامل α -SMA و PAI-1 می‌شود و در نتیجه اثر مهار بر فعال شدن HSC اعمال می‌کند و در نتیجه از فیروز کبدی جلوگیری می‌شود (۱۰). مطالعه‌ی ما نشان داد که این مهار تولید ROS به واسطه‌ی کاهش بیان NOX1 و NOX2 می‌باشد که با کاهش ROS تولیدی در HSCهای فعال شده با TGF β 1 همراه است که در نهایت منجر به بهبود فیروز کبدی می‌شود. همان‌طور که می‌دانیم استرس اکسیداتیو یکی از محرک‌های اصلی در ایجاد فیروز و مرگ سلولی از طریق ایجاد آسیب سلولی و آسیب کبدی است. در پاسخ به آسیب‌های کبدی و افزایش ترشح سیتوکین‌های پیش‌التهابی مانند TGF- β ، HSCها از حالت سکون فعال می‌شوند که منجر به رسوب بیش از حد ماتریکس خارج سلولی ECM و در نهایت ایجاد اسکار می‌شود (۲۳). مطالعه‌ی ما اثر حفاظتی ایزورامنتین به واسطه‌ی کاهش NOX1 و NOX2 در ROS در HSC تحریک شده با TGF- β 1 را نشان داد. از این‌رو، با سرکوب بیان ژن‌هایی که در نهایت توسط این مسیر سیگنالینگ فعال می‌شوند، تولید ماتریکس خارج سلولی کاهش می‌یابد که منجر به بهبود کلی فیروز کبدی می‌شود.

تاکنون مطالعات مختلفی اثرات محافظتی ایزورامنتین در ممانعت از پیشرفت فیروز کبدی ناشی از تراکلرید کربن (CCl4) در موش را بررسی کرده‌اند. ایزورامنتین با کاهش تولید ماتریکس خارج سلولی (ECM) و تسریع اتوفازی از فیروز کبد محافظت می‌کند. این اثرات محافظتی به مهار مسیر سیگنالینگ TGF- β 1/Smad نسبت داده شده است (۲۲). در مطالعه‌ی ما، ایزورامنتین کاهش مؤثری را در بیان ژن‌های NOX1، NOX2 و α -SMA نشان داد. α -SMA یک نشانگر حیاتی است که انتقال سلول‌های ستاره‌ای کبدی HSCs از یک فنوتیپ غیرفعال به یک فنوتیپ فعال (میوفیبروبلاست) را در حضور TGF- β نشان می‌دهد. مسیر سیگنال‌دهی متعارف فعال شده توسط

نتیجه‌گیری

به طور خلاصه، درمان با ایزورامنتین در نهایت از فعال شدن سلول‌های ستاره‌ای کبدی HSCs جلوگیری می‌کند، در نتیجه آسیب کبدی ناشی از تجمع بیش از حد کلاژن و گونه‌های اکسیژن فعال در شرایط آزمایشگاهی را کاهش می‌دهد. ایزورامنتین قادر است با کاهش بیان NOX1 و NOX2 منجر به کاهش ROS تولیدی در HSCهای فعال شده با TGF- β 1 شود و این امر باعث کاهش بیان ژن‌های فیروز کبدی از جمله α -SMA و Collagen1 α می‌شود که نشان از بهبود فیروز

دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز با شماره طرح CMRC-0053 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.

کبدی و مهار مسیر سیگنالینگ TG-F β را دارد. این یافته‌ها شواهد قانع‌کننده‌ای ارائه می‌کنند که ایزورامنتین ممکن است به عنوان یک عامل امیدوارکننده برای درمان فیبروز کبد ظاهر شود.

تشکر و قدردانی

نتایج گزارش شده در این مطالعه، حاصل طرح تحقیقاتی ثبت شده در

References

- Aydın MM, Akçalı KC. Liver fibrosis. *Turk J Gastroenterol* 2018; 29(1): 14-21.
- Dobie R, Wilson-Kanamori JR, Henderson BE, Smith JR, Matchett KP, Portman JR, et al. Single-cell transcriptomics uncovers zonation of function in the mesenchyme during liver fibrosis. *Cell Rep* 2019; 29(7): 1832-47. e8.
- Parola M, Pinzani M. Liver fibrosis: Pathophysiology, pathogenetic targets and clinical issues. *Mol Aspects Med* 2019; 65: 37-55.
- Lim BJ, Lee W-K, Lee HW, Lee KS, Kim JK, Chang HY, et al. Selective deletion of hepatocyte platelet-derived growth factor receptor α and development of liver fibrosis in mice. *Cell Commun Signal* 2018; 16(1): 93.
- Dewidar B, Meyer C, Dooley S. TGF- β in hepatic stellate cell activation and liver fibrogenesis-updated 2019. *Cells* 2019; 8(11): 1419.
- Afarin R, Rezaei HB, Yaghooti H, Mohammadtaghvaei N. Fibroblast Growth Factor 21 Reduces Cholesterol-Induced Hepatic Fibrogenesis by Inhibiting TGF- β /Smad3C Signaling Pathway in LX2 Cells. *Hepatitis Monthly* 2021; 21(4): e113321.
- Afarin R, BABAAHMADI RH, Yaghouti SH, Mohammad TN. 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 [in Persian]. *J Isfahan Med Sch* 2021; 39(619): 212-8.
- Liu H, Dong F, Li G, Niu M, Zhang C, Han Y, et al. Liuweiwuling tablets attenuate BDL-induced hepatic fibrosis via modulation of TGF- β /Smad and NF- κ B signaling pathways. *J Ethnopharmacol* 2018; 210: 232-41.
- Shakerian E, Akbari R, Mohammadtaghvaei N, Gahrooie MM, Afarin R. Quercetin Reduces Hepatic Fibrogenesis by Inhibiting TGF- β /Smad3 Signaling Pathway in LX-2 Cell Line. *Jundishapur J Natural Pharmaceutical Products* 2022; 17(1): e113484.
- Gong G, Guan Y-Y, Zhang Z-L, Rahman K, Wang S-J, Zhou S, et al. Isorhamnetin: A review of pharmacological effects. *Biomed Pharmacother* 2020; 128: 110301.
- Ganbold M, Shimamoto Y, Ferdousi F, Tominaga K, Isoda H. Antifibrotic effect of methylated quercetin derivatives on TGF β -induced hepatic stellate cells. *Biochem Biophys Rep* 2019; 20: 100678.
- Rashidi M, Matour E, Nasab HB, Cheraghzadeh M, Shakerian E. Isorhamnetin exerts antifibrotic effects by attenuating platelet-derived growth factor-BB-induced HSC-T6 cells activation via suppressing PI3K-AKT signaling pathway. *Iranian Biomed J* 2023; 27(4): 199-204.
- Mohammadzadeh G, Afarin R, Bavarsad SS, Aslani F, Zadeh SA, Shakerian E. Comparison of the effects of cholesterol, palmitic acid, and glucose on activation of human hepatic stellate cells to induce liver fibrosis. *J Diabetes Metab Disord* 2022; 21(2): 1531-8.
- Afarin R, Behdarvand T, Shakerian E, Bavarsad SS, Rashidi M. Exosomes of Whartons' jelly mesenchymal stem cell reduce the NOX genes in TGF- β -induced hepatic fibrosis. *Iran J Basic Med Sci* 2022; 25(12): 1498-503.
- Zhao TT, Yang TL, Gong L, Wu P. Isorhamnetin protects against hypoxia/reoxygenation-induced injury by attenuating apoptosis and oxidative stress in H9c2 cardiomyocytes. *Gene* 2018; 666: 92-9.
- Jiang H, Yamashita Y, Nakamura A, Croft K, Ashida H. Quercetin and its metabolite isorhamnetin promote glucose uptake through different signalling pathways in myotubes. *Sci Rep* 2019; 9(1): 2690.
- Ishola IO, Osele MO, Chijioke MC, Adeyemi OO. Isorhamnetin enhanced cortico-hippocampal learning and memory capability in mice with scopolamine-induced amnesia: role of antioxidant defense, cholinergic and BDNF signaling. *Brain Res* 2019; 1712: 188-96.
- Afarin R, Rezaei HB, 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 [in Persian]. *J Isfahan Med Sch* 2021; 39(619): 212-8.
- 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.
- Kim HH, Choi SE, Jeong W-I. Oxidative stress and glutamate excretion in alcoholic steatosis: Metabolic synapse between hepatocyte and stellate cell. *Clin Mol Hepatol* 2020; 26(4): 697-704.
- Roehlen N, Crouch E, Baumert TF. Liver fibrosis: mechanistic concepts and therapeutic perspectives. *Cells* 2020; 9(4): 875.
- Liu N, Feng J, Lu X, Yao Z, Liu Q, Lv Y, et al. Isorhamnetin inhibits liver fibrosis by reducing autophagy and inhibiting extracellular matrix formation via the TGF- β 1/Smad3 and TGF- β 1/p38 MAPK pathways. *Mediators Inflamm* 2019; 2019.
- Ganbold M, Owada Y, Ozawa Y, Shimamoto Y, Ferdousi F, Tominaga K, et al. Isorhamnetin alleviates steatosis and fibrosis in mice with nonalcoholic steatohepatitis. *Sci Rep* 2019; 9: 16210.

Investigating the Inhibitory Effect of Isorhamnetin on the Expression of NOXs Genes as well as the Level of ROS in Hepatic Stellate Cells and Its Role in Preventing the Progression of Liver Fibrogenesis

Mojtaba Rashidi¹, Maryam Cheraghzadeh¹, Elham Shakerian², Emad Matour³,
Hasti Beheshti Nasab⁴, Samaneh Salehipour Bavarsad¹

Original Article

Abstract

Background: Liver fibrosis disease is often attributed to the activation of Hepatic Stellate Cells (HSC) and excessive scarring in the liver. Isoramantin has a protective effect against liver fibrosis by inhibiting the expression of fibrogenic genes caused by Transforming growth factor beta (TGF- β 1). In this research, the role of Isorhamnetin in inhibiting the activation of liver stellate cells has been investigated.

Methods: First, the cells were cultured in DMEM culture medium with 10% of Fetal Bovine Serum (FBS) until reaching the appropriate density, and were treated with 75, 100 μ M of Isorhamnetin for 24 hours, then the expression levels of NADPH Oxidase (NOX1, NOX2), Collagen1 α , alpha-smooth muscle actin (α -SMA) and Reactive oxygen species (ROS) levels were measured to evaluate liver fibrosis.

Findings: The results showed that the expression level of NOX1, NOX2, Collagen1 α , and α -SMA genes and the level of ROS in the concentration of 2ng/m of TGF- β increased significantly compared to the control group. Also, in the presence of 75 and 100 μ M Isorhamnetin, the expression of these genes and the level of ROS decreased significantly compared to the fibrosis group.

Conclusion: TGF- β increases the expression of genes involved in the progression of liver fibrosis and increases the level of ROS, which increases the production of extracellular matrix, including collagen 1 α . Isorhamnetin reduces the expression of genes involved in the development of liver fibrosis. Thus, it can prevent the development of liver fibrosis.

Keywords: Liver fibrosis; Isorhamnetin (3-methylquercetin); Transforming growth factor beta; NADPH Oxidase; Reactive oxygen species

Citation: Rashidi M, Cheraghzadeh M, Shakerian E, Matour E, Beheshti Nasab H, Salehipour Bavarsad S. Investigating the Inhibitory Effect of Isorhamnetin on the Expression of NOXs Genes as well as the Level of ROS in Hepatic Stellate Cells and Its Role in Preventing the Progression of Liver Fibrogenesis. J Isfahan Med Sch 2024; 42(757): 113-20.

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

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

3- MSc, Cellular and Molecular Research Center, Department of Hematology, School of Paramedicine, Ahvaz Jundishapur University of Medical Sciences, Ahvaz, Iran

4- MSc, 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, Assistant Professor, 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