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

مریم خیابانی‌راد [۱](M.Sc)، محمدحسین محمدی [۲](Ph.D)، نادر وظیفه شیران [۱](M.Sc)، محسن حمیدپور [۲*](Ph.D)

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

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

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

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

چکیده

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

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

یافته‌ها: تعداد فوم سل‌ها هنگام تیمار ماکروفاژ و پلاکت با عصاره آبی دارچین نسبت به کنترل کاهش معناداری داشت. بیان ژن‌های LXRα, CD36, ABCA1 و PPARY که نقش کلیدی در متابولیسم کلسترول و گیرنده آن به عهده دارند در ماکروفاژهای نمونه‌های تیمار شده با دارچین نسبت به نمونه کنترل افزایش معناداری داشتند (P <۰/۰۵).

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

واژه‌های کلیدی: دارچین، پلاکت خون، فوم‌سل، آترواسکلروزی

مقدمه

آترواسکلروزیس یک بیماری التهابی پیش‌رونده است که به دلیل رسوب لیپیدها در سلول‌های اندوتلیوم سرخرگ‌ها ایجاد می‌شود و یکی از علل بیماری قلب و عروق می‌باشد [۲،۱]. بروز این بیماری در سال‌های اخیر در جهان از جمله ایران بین ۲۰ تا ۴۵ درصد افزایش یافته است [۳،۴]. گرچه مکانیسم آترواسکلروزیس پیچیده است ولی موادی مانند ox-LDL، LDL و سلول‌هایی از جمله: اندوتلیال، ماکروفاژها و پلاکت‌ها در بروز آن نقش دارند [۶،۵]. آسیب اندوتلیوم عروق، موجب تحریک پلاکت‌ها شده، پلاکت‌های فعال مواد میتوژن و التهابی آزاد کرده [۷] و موجب فراخوان مونوسیت‌ها به محل ضایعه شده و باعث تمایز آن‌ها به ماکروفاژهای التهابی می‌گردند [۸]. از طرفی پلاکت‌ها به وسیله‌ی اسکاونجر رسپتورهای خود مانند CD36 می‌توانند ox-LDL را از محیط برداشت کرده و سپس با برهمکنش با ماکروفاژها و بلعیده شده توسط آن‌ها منجر به تشکیل فوم‌سل شده و در روند بروز پلاک آترواسکلروتیک دخیل باشند [۹-۱۲]. سیلان LDL در ماکروفاژ با چندین ژن تنظیم می‌شود؛ از جمله ABCA1 (ATP-binding cassette), LXR (Liver X Receptor) و PPARY (Peroxisome proliferator-activated receptor-γ) که منجر به خروج کلسترول شده، درحالی که CD36 به عنوان یک رسپتور (ورودی) موجب ورود کلسترول به سلول می‌شود [۱۳].

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-08-05]

[DOI: 10.29252/koomesh.23.1.139]

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

مواد و روش‌ها

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

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

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

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

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

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-08-05]
[DOI: 10.29252/koomesh.23.1.139]

آنتی‌بوتیک پنی سیلین- ا ستر پتومای سین در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد و رطوبت ۵در صد دی‌اکسید کربن کشت و پا ساژ داده شد.

بررسی فعّالیت متابولیک سلول‌ها به روش MTT: بررسی فعالیت متابولیک سلول‌ها را با کمک از روش اصلاح‌شده (Boncler et al) [۲۴] انجام شد به ترتیبی که: سلول‌های U937 را به مقدار ۶۰ هزار سلول با دوز ۲۰۰ نانومولار PMA و ۱۰۰ میکرولیتر محیط کشت حاوی FBS در چاهک‌های پلیت ۹۶ خانه‌ای کشت شد. روز سوم دوزهای مختلف دارچین (۷۰۰-۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) را محاسبه کرده و در هر چاهک ریخته شد. ۴۸ ساعت پس از اضافه کردن دارچین کل محیط حاوی آن را خالی کرده و ۱۰۰ میکرولیتر محیط تازه ریخته و پودر MTT را با غلظت ۵ mg در ۱سی‌سی PBS حل کرده و به مقدار ۱۰ میکرولیتر به چاهک‌ها اضافه شد. پلیت‌ها ۳ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه نگهداری شد و سپس ۱۲ دقیقه با دور ۳۷۰۰ rpm در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد سانتریفوژ شده و مایع رویی را خالی کرده، به‌طوری که محلول داخل چاهک‌ها نباشد و ۱۰۰ میکرولیتر DMSO به هر چاهک اضافه کرده و به مدت ۵ دقیقه پلیت را تکان داده تا محلول یک‌دستی حاصل شود. سپس با الایزا ریدر XL800 در طول ۵۷۰ nm میزان جذب رنگ محلول‌ها خوانش شده و فعالیت متابولیک سلول‌ها، محاسبه گردید. سپس دوزهای مناسب از نظر این‌که تاثیر سایتوتوکسیک بر روی سلول‌ها نداشته باشد برای انجام مرحله‌ی بعدی یعنی رنگ‌آمیزی oil red o برای بررسی تاثیر این عصاره بر تمایز ماکروفاژها به سمت فوم سل و بیان ژن‌ها انتخاب شد. لازم به ذکر است ox-LDL به مقدار ۸۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر و پلاکت به مقدار ۱۰۰ به ۱ (سلول) به چاهک‌ها اضافه گردید.

گروه‌ها به صورت زیر دسته‌بندی شدند:

گروه ۱: ماکرو فاژ PMA+U937 cells; (کنترل در این گروه)، ماکرو فاژ+ox-LDL، ماکرو فاژ+ox-LDL+پلاکت، ماکروفاژ+پلاکت

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

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

گروه ۴: ماکروفاژ+ پلاکت (کنترل در این گروه)، ماکروفاژ+پلاکت+دارچین (تیمار)

بررسی لیپیدهای درون‌سلولی با رنگ‌آمیزی Oil-Red O: رنگ‌آمیزی Oil-Red O برای بررسی فوم سل‌ها با استفاده روش اصلاح شده که توسط دکتر مهرپوری و همکاران معرفی شده انجام شد [۲۵]. سلول‌های تریت شده در پلیت ۴۸ خانه‌ای با PBS شست‌وشو داده و سپس به مدت ۳۰ دقیقه با فرمالین ۱۰در صد فیکس شدند. سپس سلول‌ها را به مدت ۱ دقیقه با ایزوپروپانول ۶۰درصد رنگ‌پذیر کرده و به مدت ۳۰ دقیقه با رنگ Oil-Red O رقیق شده (۱:۱) با آب مقطر رنگ‌آمیزی شدند. سپس ۱۵ ثانیه رنگ‌بری با ایزوپوپانول انجام شد و مجدداً سلول‌ها ۲ بار با PBS شست‌و شو داده شدند و در نهایت با میکروسکوپ نوری Olympus فوم سل‌ها مشاهده شدند و با استفاده از برنامه Image J کمیت فوم‌سل‌ها نسبت به کنترل محاسبه شدند [۲۶].

بررسی تغییرات بیان ژن رسپتورهای درگیر در متابولیسم کلسترول با آزمون Real-Time PCR:

جهت بررسی تغییرات بیان ژن‌های اسکاونجر رسپتورهای کلسترول بر روی ماکروفاژهای حاصل از سل‌لاین U937 از روش Real-Time PCR کمی استفاده شد. پس از تیمار این سلول‌ها با عصاره‌ی آبی دارچین و پلاکت و ox-LDL، RNA استخراج و سپس سنتز cDNA انجام شد و در نهایت میزان بیان اسکاونجر ورودی از جمله CD36 و رسپتورهای هسته‌ای PPARY و LXR و هم‌چنین اسکاونجر خروجی ABCA1 با پرایمرهای طراحی شده در جدول ۱ مورد بررسی و آنالیز قرار گرفت.

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

Primers that were used for cDNA synthesis.

Gene	Forward primer (5′-3′)	Reverse primer (5′-3′)	Product size (bp)
ABCA1	GGCAATCATCAGGGTGCTGACG	CCGCAGAAAGATGTCATCAACG	97
CD36	GCAGCAACATTCAAGTTAAGC	AGCCTCTGTTCCAACTGATAG	158
PPARγ	ATTCTCAGTGGAGACCGCCC	GGAAATGTTGGCAGTGGCTC	292
LXR	ACAACCCTGGGAGTGAGAGT	AACATCAGTCGGTCATGGGG	295
ABL1	CTTCTTGGTGCGTGAGAGTGAG	GACGTAGAGCTTGCCATCAGAAG	115

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-08-05]

[DOI: 10.29252/koomesh.23.1.139]

نتایج

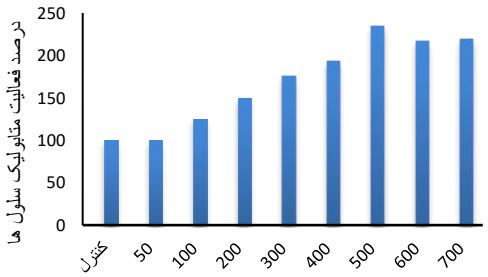
بررسی جذب نوری ox-LDL

ox-LDL تهیه شده با توجه به افزایش میزان OD در طول موج ۳۴۰ نانومتر نسبت به ox-LDL استاندارد تائید شده و غلظت آن برابر ۱/۶۲ mg/ml می‌باشد (جدول ۲).

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

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

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

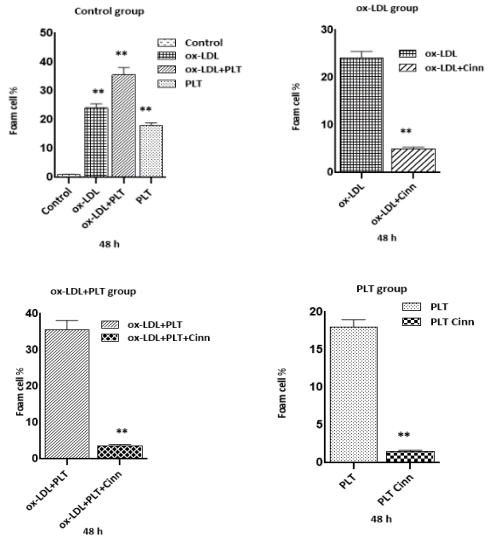


شکل ۱. نتایج تست MTT و درصد فعالیت متابولیک سلول ها در تیمار با دوزهای مختلف دارچین

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

در گروه دوم ox-LDL + دارچین ۵ درصد و در گروه سوم پلاکت + ox-LDL + دارچین ۷ /۳ درصد و در گروه چهارم پلاکت + دارچین ۱/۵ درصد فوم‌سل داشت. که این مقدار در مقایسه با کنترل هر گروه (تیمار نشده با دارچین) کاهش معناداری داشت. ($P=<0/05$) که نتایج آن در شکل ۲ نشان داده شده است.

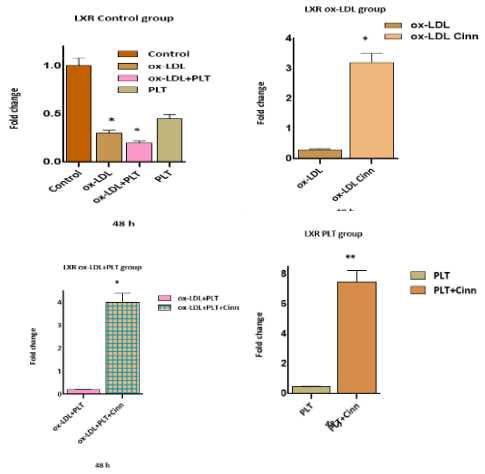
بیان ژن گیرنده‌های دخیل در متابولیسم کلسترول: نتایج Real-Time PCR نشان داد که دارچین موجب افزایش بیان ژن های PPARY با ($P<0/01$) و LXR با ($P<0/05$) در سلول‌های تریت شده با عصاره دارچین می‌باشد. این ژن‌ها نقش فعالی در متالبولیسم کلسترول فوم‌سل‌ها دارند و چربی‌ها را آماده خروج از سلول می‌کند. شکل‌های ۳ و ۴ نشان‌دهنده بیان این ژن ها می باشد. از طرفی افزایش بیان ژن های ABCA1 با ($P<0/01$) و CD36 با ($P<0/05$) به عنوان گیرنده لیپوپروتین‌های حامل کلسترول در این سلول‌ها مشاهده می‌شود. شکل‌های ۵ و۶ نشان داده شده میزان بیان این ژن‌ها می‌باشد.



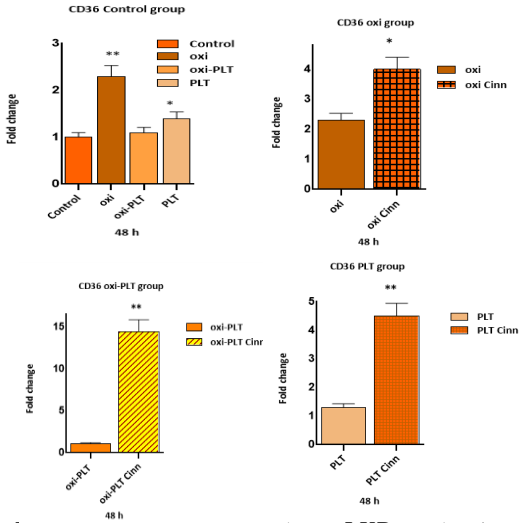
شکل ۲. میزان تشکیل فوم‌سل‌ها در چهار گروه کنترل ,ox-LDL p (*<0.05,**<0.01) .(D)PLT و (C)ox-LDL+PLT,(B)(A)

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-08-05]

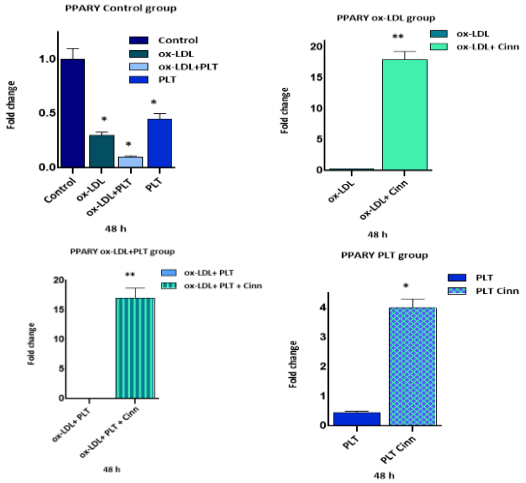
[DOI: 10.29252/koomesh.23.1.139]



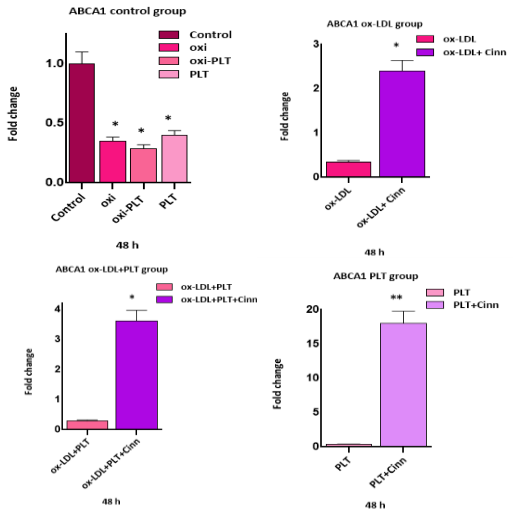
شکل ۳. میزان بیان ژن PPARY در چهار گروه کنترل ox-LDL, (A)(B)ox-LDL+PLT,(C) و PLT(D). p (*<0.05,**<0.01)



شکل ۴. میزان بیان ژن LXR در چهار گروه کنترل (A) oxi-LDL, (B) ox-PLT, (C) و PLT(D)(*<0.05,**<0.01) P



شکل ۵. میزان بیان ژن ABCA1 در چهار گروه کنترل oxi-LDL, (A)(B)oxi-PLT,(C) و Plt(D) P (*<0.05,**<0.01)



شکل ۶. میزان بیان ژن CD36 در چهار گروه کنترل oxi-LDL, (A)(B)oxi-PLT,(C) و PLT (D P (*<0.05,**<0.01

بحث و نتیجه‌گیری

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

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

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-08-05]

[DOI: 10.29252/koomesh.23.1.139]

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

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

در همین راستا مطالعاتی که روی بیان ژن‌های گیرنده کلسترول شده، نشان داد که افزایش PPARγ باعث افزایش بیان ژن CD36 اما کاهش SRA به عنوان اسکاونجر رسپتور ورودی و افزایش رسپتور هسته‌ای LXR و سپس القای افزایش بیان ABCA1 در جهت ایجاد اثرات آنتی‌آتروژنیک در فوم‌سل‌ها می‌شود [۳۲،۳۳]. هم‌چنین مطالعات نشان داده‌اند که بیان PPARγ و افزایش فعالیت آن، باعث افزایش تمایز ماکروفاژها به سمت M2 ماکروفاژها می شود و به نوبه‌ی خود مستلزم افزایش بیان تعداد مارکرهای ماکروفاژهای M2 از جمله آرژیناز-۱، مانوز رسپتور و CD36 می‌شود [۳۰]. از طرفی SDF-1 پلاکتی ماکروفاژهای M2 را با خاصیت ضد التهابی القا می‌کند، اما در ادامه به واسطه‌ی آسیبی که به شبکه‌ی آندوپلاسمی آن‌ها وارد می‌شود، این ماکروفاژها سیکل معیوبی را پیش می‌گیرند که فاقد فیدبک منفی بوده و منجر به تجمع لیپید و عدم خروج آن می‌شود. این روند معیوب تا آن‌جا پیش می‌رود که این سلول‌ها تبدیل به فوم‌سل‌ها شده که منجر به پلاک آتروسکلروز و وخیم‌تر شدن شرایط می‌گردند [۳۴]. مطالعات هم‌چنین، نشان دادند که افزایش بیان mRNA PPARγ نشان‌دهنده‌ی القای ماکروفاژ به سمت M2 ماکروفاژ (ماکروفاژ ضد التهابی) است [۳۰]. از طرفی پلی‌مرهای پلی‌فنلی در دارچین دارای فعالیت آنتی‌اکسیدانی هستند و نشان داده شده است که استرس اکسیداتیو را از طریق مهار آنزیم ۵-لیپواکسیژناز کاهش می‌دهد و عملکرد قلبی عروقی را بهبود بخشد [۳۵].

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

تشکر و قدردانی

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

منابع

[1] Toth P. Subclinical atherosclerosis: what it means and what we can do about it. Int J Clin Pract 2008; 62: 1246-1254.

[2] Duan L, Xiong X, Hu J, Liu Y, Li J, Wang J. Panax notoginseng saponins for treating coronary artery disease: a functional and mechanistic overview. Front Pharmacol 2017; 8: 702-711.

[3] Cheraghi M, Asadi-Samani M. Atherosclerosis: Pathophysiology and promising herbal remedies in traditional Persian medicine. Der Pharmacia Lett 2016; 8: 58-66. (Persian)

[4] Badimon L, Vilahur G. Thrombosis formation on atherosclerotic lesions and plaque rupture. J Int Med 2014; 276: 618-632.

[5] Wilson P, Cannon C, Downey B. Overview of the risk equivalents and established risk factors for cardiovascular disease. UpToDate. Post TW, Editors, UpToDate Waltham; 2015. 2017.

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-08-05]

[DOI: 10.29252/koomesh.23.1.139]

[6] Shigematsu K, Watanabe Y, Nakano H, Committee KSR. Influences of hyperlipidemia history on stroke outcome; a retrospective cohort study based on the Kyoto Stroke Registry. BMC Neurol 2015; 15: 44-51.

[7] Chatterjee M, Gawaz M. Platelets in atherosclerosis. platelets in thrombotic and non-thrombotic disorders: Springer; 2017; p: 993-1013.

[8] Stephen J, Emerson B, Fox KA, Dransfield I. The uncoupling of monocyte–platelet interactions from the induction of proinflammatory signaling in monocytes. J Immunology 2013; 191: 5677-5683.

[9] Kral JB, Schrottmaier WC, Salzmann M, Assinger A. Platelet interaction with innate immune cells. ransfus Med Hemother 2016; 43: 78-88.

[10] von Hundelshausen P, Weber C. Platelets as immune cells: bridging inflammation and cardiovascular disease. Circ Res 2007; 100: 27-40.

[11] Stellos K, Gnerlich S, Kraemer B, Lindemann S, Gawaz M. Platelet interaction with progenitor cells: vascular regeneration or injury? Pharmacol Rep 2008; 60: 101.

[12] Freedman JE, Loscalzo J. Platelet–monocyte aggregates: bridging thrombosis and inflammation. Circulation 2002; 105: 2130-2132.

[13] Wu C, Chen R, Liu M, Liu D, Li X, Wang S, et al. Spiromastixones inhibit foam cell formation via regulation of cholesterol efflux and uptake in RAW264. 7 macrophages. Mar Drugs 2015; 13: 6352-6365.

[14] Ramkumar S, Raghunath A, Raghunath S. Statin therapy: review of safety and potential side effects. Acta Cardiol Sin 2016; 32: 631.

[15] Yasini M, Hamidpour M, Ayatolahi A, shahmehr M, Kehanpour N. Synergic effects of summer savory extract and aspirin on human platelets function. Koomesh 2019; 21. (Persian).

[16] Hedaryan AH, Hamidpour M, Ayatolahi AM, Allah bakhshian Farsiani M. The synergic effect of artemisia dracunculus (Tarragon) extract and Aspirin (ASA) on platelet function. J Med Plants 2019; 2: 1-10.

[17] Hamidpour R, Hamidpour S, Hamidpour M, Shahlari M, Sohraby M. Summer savory: from the selection of traditional applications to the novel effect in relief, prevention, and treatment of a number of serious Illnesses such as diabetes, cardiovascular disease, Alzheimer ’s disease, and cancer. J Tradit Compl Med 2014; 4: 140-144.

[18] Nimgulkar C, Ghosh S, Sankar AB, Uday KP, Surekha M, Madhusudhanachary P, et al. Combination of spices and herbal extract restores macrophage foam cell migration and abrogates the athero-inflammatory signalling cascade of atherogenesis. Vascul Pharmacol 2015; 72: 53-63.

[19] Amin KA, El-Twab TMA. Oxidative markers, nitric oxide and homocysteine alteration in hypercholesterolimic rats: role of atorvastatine and cinnamon. Int J Clin Exp Med 2009; 2: 254.

[20] Hesaraki S, Yahyaei B. Histopathological comparison of the effects of Ceylon cinnamon, Plantagolanceolata and Flaxseed linum on experimental cutaneous wound healing process in rats. Koomesh 2016; 17: 752-760. (Persian).

[21] M.ahdieh Mehrpouri, Rafie Hamidpour, Mohsen Hamidpour. Cinnamon inhibits platelet function and improves cardiovascular system. J Med Plants 2020; 19: 1-11.

[22] Rahman S, Begum H, Rahman Z, Ara F, Iqbal MJ, Yousuf AK. Effect of cinnamon (Cinnamomum cassia) as a lipid lowering agent on hypercholesterolemic rats. J Enam Med College 2013; 3: 94-98. (Persian).

[23] Esterbauer H, Dieber-Rotheneder M, Waeg G, Striegl G, Juergens G. Biochemical structural and functional properties of oxidized low-density lipoprotein. Chem Res Toxicol 1990; 3: 77-92.

[24] Boncler M, Różalski M, Krajewska U, Podsędek A, Watala C. Comparison of PrestoBlue and MTT assays of cellular viability in the assessment of anti-proliferative effects of plant extracts on human endothelial cells. J Pharmacol Toxicol Methods 2014; 69: 9-16.

[25] Mehrpouri M, Bashash D, Mohammadi MH, Gheydari ME, Shahabi Satlsar E, Hamidpour M. Co-culture of platelets with monocytes induced M2 macrophage polarization and formation of foam cells: shedding light on the crucial role of platelets in monocyte differentiation. Turk J Hematol 2019; 36: 97-105.

[26] Xu S, Huang Y, Xie Y, Lan T, Le K, Chen J, et al. Evaluation of foam cell formation in cultured macrophages: an improved method with Oil Red O staining and DiI-oxLDL uptake. Cytotechnology 2010; 62: 473-481.

[27] Badrnya S, Schrottmaier WC, Kral JB, Yaiw K-C, Volf I, Schabbauer G, et al. Platelets mediate oxidized low-density lipoprotein–induced monocyte extravasation and foam cell formation. Arterioscler Thromb Vasc Biol 2014; 34: 571-580.

[28] Mashour NH, Lin GI, Frishman WH. Herbal medicine for the treatment of cardiovascular disease: clinical considerations. Arch Int Med 1998; 158: 2225-2234.

[29] Hamidpour R, Hamidpour M, Hamidpour S, Shahlari M. Cinnamon from the selection of traditional applications to its novel effects on the inhibition of angiogenesis in cancer cells and prevention of Alzheimer's disease, and a series of functions such as antioxidant, anticholesterol, antidiabetes, antibacterial, antifungal, nematicidal, acaracidal, and repellent activities. J Tradit Complement Med 2015; 5: 66-70.

[30] Duan SZ, Usher MG, Mortensen RM. Peroxisome proliferator-activated receptor-γ–mediated effects in the vasculature. Circ Res 2008; 102: 283-294.

[31] Kim SH, Choung SY. Antihyperglycemic and antihyperlipidemic action of Cinnamomi Cassiae (Cinnamon bark) extract in C57BL/Ks db/db mice. Arch Pharm Res 2010; 33: 325-333.

[32] Sheng X, Zhang Y, Gong Z, Huang C, Zang YQ. Improved insulin resistance and lipid metabolism by cinnamon extract through activation of peroxisome proliferator-activated receptors. PPAR Res 2008; 2008: 581348.

[33] Lazar MA. Progress in cardiovascular biology: PPAR for the course. Nat Med 2001; 7: 23-24.

[34] Daub K, Langer H, Seizer P, Stellos K, May AE, Goyal P, et al. Platelets induce differentiation of human CD34+ progenitor cells into foam cells and endothelial cells. FASEB J 2006; 20: 2559-2561.

[35] Anderson RA, Broadhurst CL, Polansky MM, Schmidt WF, Khan A, Flanagan VP, et al. Isolation and characterization of polyphenol type-A polymers from cinnamon with insulin-like biological activity. J Agric Food Chem 2004; 52: 65-70.

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-08-05]

[DOI: 10.29252/koomesh.23.1.139]

Volume 23, Issue 1 (Winter 2021), 139-145

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

Maryam khiabani Rad (M.Sc)[1], Mohammad Hossein Mohammadi (Ph.D)[2], Nader Vazifeh Shiran (M.Sc)[1], Mohsen Hamidpour (Ph.D)[*2]

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

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

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

Received: 21 Feb 2020; Accepted: 24 Jun 2020

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

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

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

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

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

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-08-05]

[DOI: 10.29252/koomesh.23.1.139]