Qom University of Medical Sciences Journal

November 2022. Volume 16. Number 8

Research Paper

The Effect of Melon Seed Extract on the Transcription of NF-κB and Myeloperoxidase in the Liver Tissue of Mice Poisoned With Ethylene Glycol

Mohamad-Reza Forouharmanesh[1], *Mehdi Ebrahimi[2], Maryam Eidi[3]

1. Department of Genetics, College of Biological Sciences, Varamin-Pishva Branch, Islamic Azad University, Pishva, Iran.
2. Department of Biochemistry and Biophysics, College of Biological Sciences, Varamin-Pishva branch, Islamic Azad University, Pishva, Iran.
3. Department of Biology, College of Biological Sciences, Varamin-Pishva Branch, Islamic Azad University, Pishva, Iran.

Use your device to scan and read the article online

Citation Forouharmanesh MR, Ebrahimi M, Eidi M. [The Effect of Melon Seed Extract on the Transcription of NF-κB and Myeloperoxidase in the Liver Tissue of Mice Poisoned With Ethylene Glycol (Persian)]. Qom Univ Med Sci J. 2022; 16(8):664-675. https://doi.org/10.32598/qums.16.8.2687.1

https://doi.org/10.32598/qums.16.8.2687.1

Received: 08 Jul 2022
Accepted: 26 Sep 2022
Available Online: 01 Nov 2022

Keywords:
Melon,
Ethylene glycol,
Myeloperoxidase,
NF-kB

ABSTRACT

Background and Objectives The liver is exposed to poisoning caused by various chemical compounds. Considering the antioxidant effects found in melon seeds and the role of nuclear factor kappa B (NF-κB) and Myeloperoxidase (MPO) in inflammation caused by oxidative stress, the present study aims to assess the effect of hydroethanolic extract of melon seeds on the transcriptional of NF-κB encoding genes and the MPO gene expression in rats with ethylene glycol-induced toxicity.

Methods Thirty male rats were randomly divided into five groups of healthy control, poisoned control (0.75% ethylene glycol), and three melon extract-treated poisoned groups (0.75% ethylene glycol and 150, 300, or 600 mg/kg body weight of melon extract) and were treated for 38 days. Then, the liver tissue of the rats was removed to evaluate the transcription of NF-κB encoding genes and the MPO level by real-time PCR method.

Results The transcription level of NF-κB encoding genes and the MPO level in the poisoned control group rats significantly increased compared to the healthy group. Treatment with hydroethanolic extract of melon seeds at concentrations of 300 and 600 mg/kg body weight caused a significant decrease in the transcription of NF-κB encoding genes. Treatment with hydroethanolic extracts at concentrations of 150, 300, and 600 mg/kg body weight caused a significant decrease in the MPO level compared to the poisoned control group.

Conclusion The decrease in MPO and NF-κB encoding genes after administration of hydroethanolic extract of melon seeds indicates the therapeutic effect of this extract on liver damage.

**** Corresponding Author:***
Mehdi Ebrahimi
Address: Department of Biochemistry and Biophysics, College of Biological Sciences, Varamin-Pishva branch, Islamic Azad University, Pishva, Iran.
Tel: +98 (990) 0880519
E-Mail: ebrahimi@iauvaramin.ac.ir

Copyright © 2023 Qom University of Medical Sciences. Published by Tehran University of Medical Sciences
This work is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International license(https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/).
Noncommercial uses of the work are permitted, provided the original work is properly cited.

Qom University of Medical Sciences Journal

Extended Abstract

Introduction

The liver plays an important role in many physiological processes such as glucose homeostasis, production of essential proteins, production of lipoproteins and lipids, production and secretion of bile acids, and vitamin storage. Oxidative stress is a major risk factor for liver diseases. For this reason, inhibition of oxidation and inflammatory processes by antioxidants plays an important role in preventing or treating liver diseases. Most toxic chemicals cause damage to liver cells by inducing lipid peroxidation and other oxidative effects. Ethylene glycol maybe accidentally ingested, especially by children, due to its sweet taste, or intentionally consumed by adults as an alternative to ethanol or be used for suicide. Although ethylene glycol toxicity is not common, it can have high morbidity and mortality. Nuclear factor kappa B (NF-κB) is a transcription factor and a regulator of innate immunity. The NF-κB signaling pathway links pathogenic signals to cellular danger signals, thus organizing cellular resistance against invading pathogens. NF-κB plays an important role in regulating the expression of genes whose products are involved in tissue damage and inflammation and, therefore, may be detectable as early biomarkers in chemical poisoning.

Myeloperoxidase (MPO) is one of the main components of azurophilic granules in neutrophil granulocytes. The antimicrobial activity of MPO is due to its enzymatic function to produce hypochlorous acid and other toxic oxygen products. It generates reactive oxygen species (ROS) which are involved in processes leading to tissue damage. Hypochlorous acid is an oxidizer of sulfhydryl and thioether groups of proteins. The MPO products are also involved in lipid peroxidation. Accumulation of hydroperoxides that accumulate in lipid compounds strengthens the function of hypochlorous acid. Antioxidants reduce the effects of toxic agents on the liver. Natural antioxidants in many compounds are classified as secondary metabolites. Polyphenols (phenolic acids and flavonoids) and terpenoids (carotenoids) and foods containing these compounds in large amounts play a role in preventing many diseases. Melon (Cucumis melo var. inodorus) has many vitamins A and C and cellulose. Melon has diuretic effects. In this regard, it is effective in removing waste materials and urinary sediments. Melon seeds and peels are usually discarded, while the extracts obtained the seeds have significant antioxidant effects. Considering the antioxidant effects of melon, the present study aims to evaluate the effect of hydroalcoholic extract of melon seeds on the transcription of genes encoding NF-κB and the MPO expression level in male laboratory rats poisoned with ethylene glycol.

Methods

Melon seeds were dried in the shade at a room temperature. Then, the seeds were powdered and hydroethanolic extract was prepared by soaking method. Thirty male Wistar rats weighing 180±20 g were randomly divided into five groups of 6 including healthy control, poisoned control (0.75% ethylene glycol) and three melon extract-treated poisoned groups (0.75% ethylene glycol and 150, 300 and 600 mg/kg body weight of hydroethanolic extract of melon seeds orally) for 38 days. After the treatment period, the rats were first anesthetized using ether and their liver was removed for evaluating the transcription level of genes encoding NF-κB and MPO. The RNA extraction and cDNA synthesis from liver tissue was done using GeneAll kit made in Korea. Transcription level of genes was assessed with real-time PCR technique. The difference between groups was examined using One-way analysis of variance (ANOVA) and t-test.

Results

The performance of the designed primers and the conditions of PCR, the PCR product was evaluated using and agarose gel electrophoresis (1.5%) method. The presence of a single band within the expected range and absence of additional bands indicated the optimal performance of the primers and the conditions of PCR. The results showed that the daily oral ethylene glycol administration significantly increased the expression of the NF-κB encoding gene in the liver tissue of the poisoned groups compared to the healthy control group ($P<0.001$). Treatment by hydroethanolic extract of melon seeds at concentrations of 300 and 600 mg/kg/body weight caused a significant decrease in the expression of NF-κB encoding gene compared to the poisoned control group. In addition, the ethylene glycol administration caused a significant increase in the MPO gene expression in the poisoned control group compared to the healthy control group ($P< 0.001$). Treatment by hydroethanolic extract of melon seeds at concentrations of 150, 300 and 600 mg/kg of body weight caused a significant decrease in MPO gene expression compared to the poisoned control group ($P< 0.001$).

Discussion

The consumption of hydroethanolic extract of melon seeds can reduce the expression level of MPO and NF-κB encoding genes in the liver poisoned by ethylene glycol. Therefore, the hydroethanolic extract of melon seeds has therapeutic and protective effects against ethylene glycol poisoning.

Ethical Considerations

Compliance with ethical guidelines

All stages of animal experiments were carried out after receiving the required permission (Code: IR.IAU.VARAMIN.REC.1399.016) and under the supervision of the National Ethics Committee in Biomedical Research.

Funding

The paper was extracted from the MSc. thesis of the Mohamad-Reza Forouharmanesh, Department of genetic, College of Biological science, Varamin-Pishva Branch of Islamic Azad University.

Authors contributions

Conceptualization, Methodology, Investigation and Supervision: Mehdi Ebrahimi and Maryam Eidi; Writing–Original Draft, Mohamad-Reza Forouharmanesh; Writing–Review & Editing: Mehdi Ebrahimi; Funding Acquisition: Mohamad-Reza Forouharmanesh; Resources: all authors;

Conflicts of interest

The authors declared no conflict of interest.

Acknowledgements

We would like to thank the College of Biological science, Varamin-Pishva Branch of Islamic Azad University, for their help with data collection.

مجله
دانشگاه علوم پزشکی قم

مقاله پژوهشی

تأثیر عصاره دانه خربزه بر رونویسی فاکتور نکروزدهنده-کاپا بی و میلوپراکسیداز در بافت کبدی موش مسموم‌شده با اتیلن گلیکول

محمدرضا فروهرمنش[۱]، *مهدی ابراهیمی[۲]، مریم عیدی[۳]

۱. گروه ژنتیک، دانشکده علوم زیستی، واحد ورامین-پیشوا، دانشگاه آزاد اسلامی، پیشوا، ایران.
۲. گروه بیوشیمی و بیوفیزیک، دانشکده علوم زیستی، واحد ورامین-پیشوا، دانشگاه آزاد اسلامی، پیشوا، ایران.
۳. گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم زیستی، واحد ورامین-پیشوا، دانشگاه آزاد اسلامی، پیشوا، ایران.

Use your device to scan and read the article online

Citation Forouharmanesh MR, Ebrahimi M, Eidi M. [The Effect of Melon Seed Extract on the Transcription of NF-κB and Myeloperoxidase in the Liver Tissue of Mice Poisoned With Ethylene Glycol (Persian)]. Qom Univ Med Sci J. 2022; 16(8):664-675. https://doi.org/10.32598/qums.16.8.2687.1

https://doi.org/10.32598/qums.16.8.2687.1

تاریخ دریافت: ۱۷ تیر ۱۴۰۱
تاریخ پذیرش: ۰۴ مهر ۱۴۰۱
تاریخ انتشار: ۱۰ آبان ۱۴۰۱

چکیده

زمینه و هدف کبد در معرض مسمومیت ناشی از ترکیبات شیمیایی مختلف قرار دارد. دانه خربزه اثرات آنتی‌اکسیدانی دارد. NF-κB و میلوپراکسیداز در بروز التهاب نقش دارند. در مطالعه حاضر تأثیر عصاره هیدروالکلی دانه خربزه بر میزان رونویسی از ژن‌های کدکننده NF-κB و MPO در موش‌های مسموم شده با اتیلن گلیکول با روش real-time PCR ارزیابی شد.

روش بررسی تعداد ۳۰ سر رت به‌صورت تصادفی در ۵ گروه سالم، کنترل مسموم (اتیلن گلیکول ۰/۷۵ درصد) و آزمایشی (اتیلن گلیکول ۰/۷۵ درصد و غلظت‌های ۱۵۰، ۳۰۰ و ۵۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن از عصاره) تقسیم و به‌مدت ۳۸ روز تیمار شدند. سپس بافت کبدی رت‌ها خارج و میزان رونویسی از ژن‌های NF-κB و MPO با روش real-time PCR بررسی شد.

یافته‌ها میزان رونویسی از ژن کدکننده NF-κB و MPO در کبد موش‌های گروه کنترل مسموم نسبت به موش‌های گروه سالم افزایش معناداری داشت. تیمار با عصاره هیدرواتانلی دانه خربزه (۳۰۰ و ۶۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن) موجب کاهش معنادار رونویسی از ژن کدکننده NF-κB در گروه‌های آزمایش شد. تیمار با عصاره هیدرواتانلی دانه خربزه (۱۵۰، ۳۰۰ و ۶۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن) موجب کاهش معنادار رونویسی از ژن MPO در گروه‌های آزمایش در مقایسه با گروه کنترل مسموم شد.

نتیجه‌گیری کاهش سطح MPO و NF-κB نشان‌دهنده تأثیر درمانی عصاره دانه خربزه بر آسیب کبدی است.

کلیدواژه‌ها:
دانه خربزه، اتیلن گلیکول، میلوپراکسیداز، ان‌اف‌کاپا بی

* **نویسنده مسئول:**
مهدی ابراهیمی
نشانی: پیشوا، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد ورامین-پیشوا، دانشکده علوم زیستی، گروه بیوشیمی و بیوفیزیک.
تلفن: ۰۸۸۰۵۱۹ (۹۹۰) ۹۸+
رایانامه: ebrahimi@iauvaramin.ac.ir

Copyright © 2023 Qom University of Medical Sciences. Published by Tehran University of Medical Sciences
This work is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International license(https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/).
Noncommercial uses of the work are permitted, provided the original work is properly cited.

مقدمه

کبد در بسیاری از فرآیندهای فیزیولوژیکی مهم مانند هومئوستاز گلوکز، تولید پروتئین‌های ضروری، تولید لیپوپروتئین و لیپیدها، تولید و ترشح اسیدهای صفراوی و ذخیره ویتامین نقش مهمی ایفا می‌کند. آسیب کبدی می‌تواند ناشی از سوءمصرف مزمن الکل، هپاتیت ویروسی یا اختلال متابولیک ارثی باشد. آسیب کبدی با نکروز سلول، فیبروز، افزایش پراکسیداسیون لیپید بافتی و کاهش سطح گلوتاتیون بافت همراه است [۱]. استرس اکسیداتیو یک عامل خطر اساسی در بروز بیماری‌های کبدی است. به همین دلیل مهار واکنش‌های اکسیداسیون و روند التهابی توسط آنتی‌اکسیدان‌ها نقش مهمی در پیش‌گیری یا درمان صدمات کبدی دارد [۲].

بیشتر مواد شیمیایی سمی با القای پراکسیداسیون لیپیدها و سایر اثرات اکسیداتیو باعث آسیب به سلول‌های کبدی می‌شوند [۱]. اتیلن‌گلیکول به‌دلیل مزه شیرین ممکن است به‌طور اتفاقی، مخصوصاً توسط کودکان خورده شود یا به‌طور عمدی توسط بزرگسالان به‌عنوان یک جایگزین اتانول مصرف‌شده و یا برای خودکشی مورد استفاده قرارگیرد. اگرچه سمیت اتیلن گلیکول شایع نیست، اما در صورت بروز، می‌تواند عوارض و مرگ‌ومیر بالایی داشته باشد [۳]. گلیکولیک اسید حاصل از متابولیسم اتیلن گلیکول به‌همراه سایر متابولیت‌ها منجر به اسیدوز شدید متابولیک می‌شود و ازطرفی اسید اگزالیک تولیدشده نیز به کلسیم متصل‌شده و کریستال‌های غیرمحلول کلسیم اگزالات را تشکیل می‌دهد که می‌تواند باعث آسیب‌دیدگی گسترده بافت‌ها شود [۴].

فاکتور هسته‌ای کاپا B (NF-κB[1]) یک فاکتور رونویسی پروتئینی است و به‌عنوان یک تنظیم‌کننده ایمنی ذاتی محسوب می‌شود. مسیر سیگنالینگ NF-κB سیگنال‌های بیماری‌زا را به سیگنال‌های خطر سلولی ارتباط می‌دهد. بنابراین مقاومت سلولی را در برابر عوامل بیماری‌زای مهاجم سازمان‌دهی می‌کند [۵]. فاکتورهای رونویسی هسته‌ای مانند NF-κB و NF-IL6 نقش مهمی در تنظیم بیان ژن‌هایی دارند که محصولات این ژن‌ها در آسیب بافت و التهاب نقش دارند و بنابراین ممکن است به‌عنوان نشانگرهای زیستی اولیه در مسمومیت‌های شیمیایی قابل ردیابی باشند [۶].

میلوپراکسیداز[2] یک پروتئین هم‌دار است و یکی از اجزای اصلی گرانول‌های آزوروفیلیک در گرانولوسیت‌های نوتروفیل محسوب می‌شود. بهترین فعالیت ضدمیکربی میلوپراکسیداز بهواسطه عملکرد آنزیمی آن برای تولید اسیدهیپوکلروز و سایر محصولات اکسیژنی سمی است. میلوپراکسیداز در واکنش‌های گونه‌های فعال اکسیژن [3] تولید می‌شود. گونه‌های فعال اکسیژن تولیدشده توسط میلوپراکسیداز در فرآیندهای منجر به آسیب بافتی نقش دارد. اسید هیپوکلروز به‌عنوان اکسیدکننده گروه‌های سولفیدریل و تیواتر پروتئین‌ها محسوب می‌شود. محصولات میلوپراکسیداز در پراکسیداسیون لیپیدها نیز نقش دارند. تجمع هیدروپراکسیدهایی که در ترکیبات لیپیدی انباشته می‌شوند موجب تقویت عملکرد اسیدهیپوکلروز می‌شود [۷].

آنتی‌اکسیدان‌ها موجب کاهش اثرات عوامل سمی بر کبد می‌شوند. آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی در بسیاری از ترکیبات به‌عنوان متابولیت‌های ثانویه طبقه‌بندی می‌شوند. برای مثال، پلی‌فنول‌ها (اسیدهای فنولیک و فلاونوئیدها) و ترپنوئیدها (کاروتنوئیدها) و مصرف غذاهای حاوی این ترکیبات به مقدار زیادی در جلوگیری از بسیاری از بیماری‌ها نقش دارند [۱].

خربزه گیاهی از خانواده کوکوربیتاسه[4] با نام علمی کوکومیس ملو واریته ایندوروس[5] است. خربزه دارای مقدار زیادی ویتامین A و C و سلولز است. به‌طورکلی خانواده خربزه شامل انواع گرمک و طالبی نیز می‌شود که البته این ۲ نوع کم‌آب‌تر از خربزه هستند. خربزه اثر مدر دارد و از این نظر در دفع مواد زائد و رسوبات ادراري مؤثر واقع می‌شود [۸]. بخش‌هایی از میوه خربزه مانند دانه و پوست معمولاً دور ریخته می‌شود؛ این درحالی است که عصاره‌های به‌دست‌آمده از دانه خربزه با استفاده از حلال‌های مختلف، ویژگی آنتی‌اکسیدانی قابل‌توجهی دارد [۹].

باتوجه‌به اثرات آنتی‌اکسیدانی موجود در خربزه، در مطالعه حاضر تأثیر عصاره هیدروالکلی دانه خربزه بر میزان رونویسی از ژن‌های کدکننده NF-κB و MPO در موش‌های آزمایشگاهی نر مسموم‌شده با اتیلن‌گلیکول ارزیابی شد.

روش بررسی

تهیه عصاره هیدرواتانلی از دانه خربزه

ابتدا خربزه[6] از منطقه ورامین خریداری‌شده، دانه‌ها جداسازی شد و پس از تأیید توسط متخصص گیاه‌شناسی (مؤسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر) در سایه و دمای ۲۴ درجه سانتی‌گراد خشک شد. سپس دانه‌ها به‌وسیله آسیاب برقی خرد و پودر شدند. برای تهیه عصاره هیدرواتانلی مقدار ۳۰۰ گرم از پودر با ۲۵۰۰ میلی لیتر اتانل ۹۸ درصد مخلوط و به‌مدت ۷۲ ساعت در ظرف در بسته و در تاریکی نگهداری و روزانه مخلوط شد. سپس، مخلوط با استفاده از فیلتر کاغذی (کاغذ واتمن) صاف شد و حلال توسط روتاری جدا شد و برای خشک شدن کامل عصاره در بن‌ماری ۵۰ درجه سانتی‌گراد قرارداده شد و زمان شروع آزمایشات در ظرف دربسته در دمای ۴- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

1. Nuclear Factor Kappa B
2. Myeloperoxidase(MPO)
3. Reactive Oxygen Species (ROS)
4. Cucurbitaceae
5. Cucumis melo var. inodorus
6. Cucumiss melo L

جدول ۱. میزان، غلظت و نوع ماده مصرفی برای تیمار با آنزیم DNase

ترکیبات	حجم (میکرولیتر)
RNA	۷
Reaction buffer with $MgCl_2$ (10x)	۱
DEPC-treated water	۱/۵
EDTA	۱
DNase (200 ng)	۱۴/۵
Total volume	۲۵

مجله
دانشگاه علوم پزشکی قم

حیوانات آزمایشگاهی

در این مطالعه ۳۰ سر رت نر نژاد ویستار با وزن ۲۰±۱۸۰ گرم مورد استفاده قرار گرفت. موش‌های صحرایی از انستیتو پاستور کرج تهیه شدند و برای سازگاری با شرایط به مدت یک هفته قبل از شروع آزمایشات در محیط آزمایشگاه تحقیقاتی دانشگاه آزاد اسلامی واحد ورامین-پیشوا نگهداری شدند. در تمام مدت آزمایش، موش‌های صحرایی در قفس‌های استاندارد، دمای ۲± ۲۴ سانتی‌گراد، چرخه روشنایی و تاریکی ۱۲ ساعته و رطوبت ۴۰ درصد نگهداری شدند. در این مدت موش‌های صحرایی به‌صورت آزادانه به غذای استاندارد و آب دسترسی داشتند.

گروه‌های مورد مطالعه

رت‌های موردمطالعه به‌صورت تصادفی در ۵ گروه ۶ تایی تقسیم‌بندی شد و به‌صورت ۳ تایی در قفس‌های مجزا در دوره تیمار ۳۸ روز نگهداری شدند. گروه کنترل سالم که هیچ تیماری دریافت نکردند. گروه کنترل مسموم که به‌مدت ۳۸ روز اتیلن گلیکول (۷۵ درصد) در آب آشامیدنی دریافت کردند. گروه‌های مسموم آزمایش که علاوه‌بر دریافت اتیلن گلیکول (۷۵ درصد) در آب آشامیدنی غلظت‌های ۱۵۰، ۳۰۰ و ۶۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن عصاره هیدرواتانلی دانه خربزه به‌صورت خوراکی به‌مدت ۳۸ روز دریافت کردند.

نمونه‌گیری از حیوانات

برای انجام تحلیل‌های مورد نیاز در این بررسی، ابتدا رت‌ها با استفاده از اتر بیهوش شدند. با ایجاد شکاف عرضی در ناحیه شکمی، اندام‌های داخلی خارج و دسترسی به کبد فراهم شد. سپس کبد رت‌ها برای مطالعه بیان ژن‌ها برداشته شد. بافت‌های اضافی اطراف کبد مانند بافت چربی حذف شد. نمونه‌های کبد به‌دست‌آمده بلافاصله در تانک ازت قرارداده شد. پس از انتقال به آزمایشگاه نمونه‌ها در فریزر ۷۰- درجه سانتی‌گراد قرارداده شد.

استخراج RNA کل و سنتز cDNA

استخراج RNA از بافت کبد رت‌ها، با استفاده از کیت GeneAll ساخت کشور کره و باتوجه‌به دستورالعمل کیت انجام شد. برای حذف DNA ژنومی، RNA کل به‌دست‌آمده، هر نمونه با DNase تیمار انجام شد. برای این منظور، مواد طبق جدول شماره ۱ ترکیب شدند. ابتدا به‌مدت ۳۰ دقیقه در ۳۷ درجه سانتی‌گراد و سپس به‌مدت ۱۰ دقیقه در ۶۵ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد.

سنتز cDNA با استفاده از کیت شرکت Genall و طبق دستورالعمل کیت انجام شد. به‌صورت خلاصه، ۴۰۰ نانوگرم RNA کل با آب DNase and RNase free به حجم نهایی ۱۰ میکرولیتر مخلوط شده و به‌مدت ۵ دقیقه در بن ماری ۶۵ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. سپس ۱۰ میکرولیتر از Master Mix همراه با پرایمر

جدول ۲. درجه حرارت و مدت زمان لازم برای سنتز cDNA

درجه حرارت	مدت زمان
۲۵ درجه سانتی‌گراد	۵ دقیقه
۵۵ درجه سانتی‌گراد	۳۰-۶۰ دقیقه
۹۵ درجه سانتی‌گراد	۵ دقیقه

مجله
دانشگاه علوم پزشکی قم

Oligo dt به آن اضافه و به آرامی مخلوط شد. انکوباسیون براساس جدول شماره ۲ و با استفاده از دستگاه ترموسایکلر[7] انجام شد.

اندازه‌گیری بیان ژن‌ها با تکنیک real-time PCR

پرایمرهای موردنیاز برای اجرای تکنیک quantitative real-time PCR با استفاده از نرم‌افزار Primer3 طراحی شدند. ابتدا توالی mRNA ژن‌های موردنظر از سایت NCBI دریافت شدند. با استفاده از نرم‌افزار آنلاین Primer3 و به‌روش Intron spanning پرایمرها طراحی و اختصاصیت پرایمرها در سایت NCBI بررسی شدن برای بررسی تشکیل ساختارهای ثانویه در پرایمرها از نرم‌افزار (Oligo analyzer (IDT استفاده شد. توالی پرایمرهای طراحی‌شده در جدول شماره ۳ مشخص شده است.

برای اجرای Real-Time PCR از کیت مخصوص Quanti Nova SYBER Green PCR Kit استفاده شد. اجزای موردنیاز برای انجام واکنش real time-PCR (جدول شماره ۴) ترکیب شده و در دستگاه Rotor-Gene-Q (شرکت Qiagene) قرار داده شد. به ازای هر نمونه cDNA واکنش real time-PCR ۳ بار تکرار شد. همچنین، برای اطمینان از عدم‌آلودگی و خطاهای حاصل از آن، برای هر ژن ۳ کنترل منفی درنظر گرفته شد که در آن به‌جای cDNA از آب مقطر استریل استفاده شد. برنامه دمایی و زمانی مورد استفاده در real time-PCR براساس جدول شماره ۵ تنظیم شد.

تجزیه‌وتحلیل داده‌های real-time PCR

داده‌های به‌دست‌آمده از روش real-time PCR با استفاده از نرم‌افزار Rest تحلیل‌شده و تغییرات بیان ژن‌های مورد نظر در نمونه‌های بافت کبد نسبت به بافت سالم به‌صورت $2^{-\Delta\Delta ct}$ محاسبه شد. اختلافات مشاهده‌شده بین گروه‌ها براساس آزمون آماری تحلیل واریانس یک‌طرفه[8] و آزمون تی[9] مورد تجزیه‌وتحلیل قرار گرفت. معنادار بودن اختلافات در سطوح P<۰/۰۵، P<۰/۰۱، P<۰/۰۰۰۱ بررسی شد.

یافته‌ها

بررسی کیفی محصولات PCR

به‌منظور بررسی عملکرد پرایمرهای طراحی شده و همچنین شرایط اجرای PCR محصول حاصل از PCR با استفاده از روش

7. BIO RAD

8. One-Way (Anova)
9.T-Test

جدول ۳. توالی پرایمرهای طراحی‌شده.

نام ژن		توالی (۵'→۳')	پرایمر (جفت‌باز)	محصول PCR (جفت باز)
MPO	پیش‌رو	GCGATAGGTTTTGGTGGGAG	۲۰	۱۶۵
	معکوس	AGCTCACAAAGTCTCGGGG	۱۹	
NF-κB	پیش‌رو	CGCAAAAGGACCTACGAGAC	۲۰	۱۹۳
	معکوس	TGGGGGAAAACTCATCAAAG	۲۰	
GAPDH	پیش‌رو	TGCCAGCCTCGTCTCATAG	۱۹	۱۹۷
	معکوس	ACTGTGCCGTTGAACTTGC	۱۹	

مجله دانشگاه علوم پزشکی قم

جدول ٤. ترکیبات مورد استفاده برای Real-Time PCR

ماده مصرفی	غلظت (میکرولیتر)
Master Mix	۲/۵
Forward and Reverse Primer	۰/۸
H_2O	۶/۲
cDNA (200 ng)	۰/۵
Total volume	۱۰

مجله دانشگاه علوم پزشکی قم

جدول ۵. مراحل، عمل انجام‌شده در هر مرحله، درجه حرارت و مدت‌زمان لازم و تعداد سیکل برای Real-Time PCR

مرحله	چرخه	مدت‌زمان (ثانیه)	دما (C°)
Initial denaturation	۱		۹۵
Denaturation	۴۰	۳۰	۹۵
Annealing	۴۰	۶۰	۶۰-۵۵
Extention	۴۰	۱۵	۷۲
Hold	۱	۳۰	۹۵

مجله
دانشگاه علوم پزشکی قم

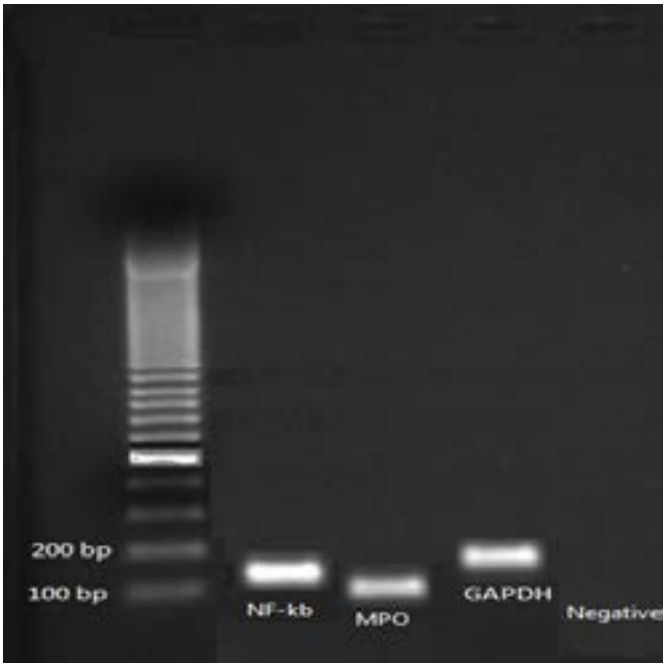
الکتروفورز ژل آگارز، ۱/۵ درصد ارزیابی شد. باندهای به‌دست‌آمده از PCR در تصویر شماره ۱ نشان داده شده است. همان‌طور که مشخص است وجود تک‌باند در محدوده مورد انتظار و عدم‌وجود باندهای اضافی و همین‌طور شدت باند، نشان‌دهنده مطلوب‌بودن عملکرد پرایمرها و شرایط مورداستفاده برای انجام PCR است.

تغییرات رونویسی ژن NF-κB

نتیجه بررسی میزان رونویسی از ژن NF-κB در بافت کبدی گروه‌های موردمطالعه در تصویر شماره ۲ نشان داده شده است. نتایج تحقیق حاضر نشان داد تیمار روزانه خوراکی اتیلن گلیکول موجب افزایش معنادار بیان ژن کدکننده NF-κB در بافت کبد گروه‌های مسموم نسبت به کنترل سالم می‌شود (P<۰/۰۰۱). تیمار عصاره هیدرواتانلی دانه خربزه در غلظت‌های ۳۰۰ و ۶۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن موجب کاهش معنادار بیان ژن کدکننده NF-κB در گروه‌های آزمایش در مقایسه با گروه کنترل مسموم می‌شود.

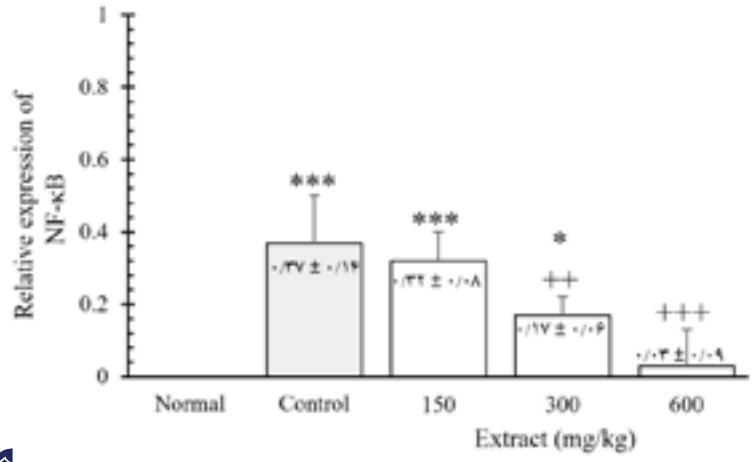
تغییرات رونویسی ژن MPO

براساس نتایج به‌دست‌آمده از بررسی تغییرات رونویسی ژن MPO در بافت کبدی گروه‌های مورد مطالعه (تصویر شماره ۳)، تیمار روزانه خوراکی اتیلن گلیکول موجب افزایش معنادار بیان ژن MPO در گروه کنترل مسموم نسبت به کنترل سالم می‌شود (P<۰/۰۰۱). علاوه‌براین، تیمار عصاره هیدرواتانلی دانه خربزه در غلظت‌های ۱۵۰، ۳۰۰ و ۶۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن موجب کاهش معنادار بیان ژن MPO در گروه‌های آزمایش در مقایسه با گروه کنترل مسموم می‌شود (P<۰/۰۰۱).



تصویر ۱. ژل الکتروفورز محصول PCR از ژن‌های مورد بررسی

مجله
دانشگاه علوم پزشکی قم

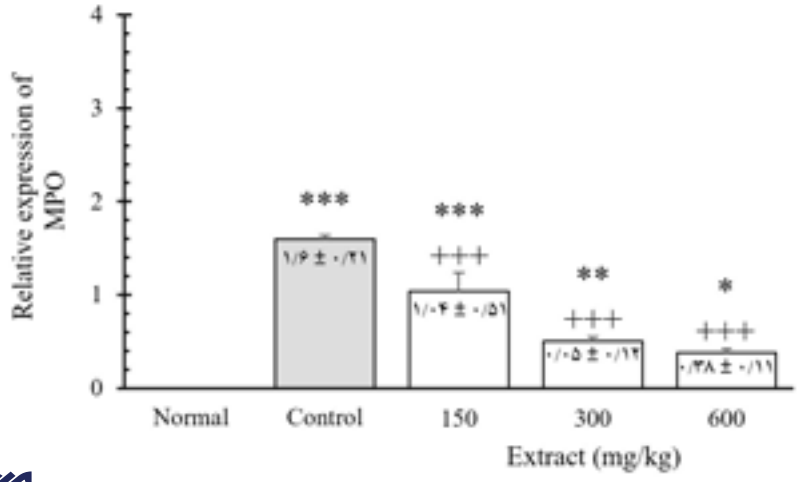


تصویر ۲. اثر تیمار خوراکی عصاره هیدرواتانلی دانه خربزه در غلظت‌های ۱۵۰، ۳۰۰ و ۶۰۰ میلیگرم بر کیلوگرم وزن بدن به‌مدت ۳۸ روز بر بیان ژن کدکننده NF-κB در موش‌های صحرایی مسموم‌شده توسط اتیلن گلیکول. هر ستون میانگین و انحراف‌معیار را برای ۶ سر موش صحرایی نشان می‌دهد. نمادهای * و *** به‌ترتیب نشان‌دهنده سطح معناداری P<۰/۰۵ و P<۰/۰۰۱ نسبت به گروه کنترل سالم و نماد ++ و +++ به‌ترتیب نشان‌دهنده سطح P <۰/۰۱ و P<۰/۰۰۱ نسبت به گروه کنترل مسموم می‌باشد.

بحث

در مطالعه حاضر تأثیر عصاره هیدرواتانلی دانه خربزه بر رونویسی از ژن‌هایNF-κB وMPO در مسمومیت کبدی ناشی از اتیلن گلیکول در موش مورد ارزیابی قرارگرفت. براساس نتایج مطالعه حاضر، میزان رونویسی از ژن کدکننده NF-κB در کبد موش‌های تیمارشده با اتیلن گلیکول افزایش معناداری نسبت به موش‌های کنترل سالم دارد. در تیمار با عصاره هیدرواتانلی دانه خربزه در غلظت‌های ۳۰۰ و ۶۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن موجب کاهش معنادار رونویسی از ژن کدکننده NF-κB در گروه‌های آزمایش در مقایسه با گروه کنترل مسموم می‌شود. نتایج پژوهشی که بلاژکا و همکاران انجام دادند، نشان داد مسمومیت کبدی با استامینوفن موجب تغییر در اتصال فاکتورهای رونویسی خاص به DNA به‌ویژه NF-kB و NF-IL6 به‌عنوان تنظیم‌کننده‌های منفی واسطه‌های التهابی مشتق از سلول‌های کبد عمل می‌کنند [۶].

در پژوهش دیگر اثرات تعدیل‌کننده آنتی‌اکسیدان α-توکوفرول سوکسینات و گلوکوکورتیکوئید دگزامتازون بر فعال‌سازی NF-κB مورد ارزیابی قرارگرفت. یافته‌های حاصل از این پژوهش نشان داد آسیب کبدی موجب القاء فعال‌شدن فاکتور رونویسی کلیدی NF-κB و سیتوکین TNF-a می‌شود. آنتی‌اکسیدان-توکوفرول سوکسینات تأثیری بر فعال‌سازی NF-κB نداشته است؛ درحالی‌که دگزامتازون موجب کاهش بیان این فاکتور می‌شود.



تصویر ۳. اثر تیمار خوراکی عصاره هیدرو اتانلی دانه خربزه در غلظت‌های ۱۵۰، ۳۰۰ و ۶۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن به‌مدت ۳۸ روز بر بیان ژن MPO در موش‌های صحرایی مسموم‌شده توسط اتیلن گلیکول. هر ستون میانگین و انحراف‌معیار را برای ۶ سر موش صحرایی نشان می‌دهد. نمادهای *، ** و *** به‌ترتیب نشان‌دهنده سطح معناداری P<۰/۰۰۱، P<۰/۰۱ و P<۰/۰۵ نسبت به گروه کنترل سالم و نماد +++ نشان‌دهنده سطح P<۰/۰۰۱ نسبت به گروه کنترل مسموم می‌باشد.

علاوه‌براین، میزان بیان IκB-α در ماکروفاژهای کبدی تیمارشده با دگزامتازون افزایش می‌یابد. بر همین اساس، مسیر NF-κB/ IκB-α به‌عنوان یک هدف مهم برای مداخلات درمانی در هنگام آسیب کبدی محسوب می‌شود [۱۰].

نتایج برخی مطالعات نشان می‌دهد عصاره برخی گیاهان می‌توانند موجب کاهش بیان یا مهار فعال‌شدن NF-κB شود. برای مثال، در مطالعه‌ای مکانیسم عمل دارویی عصاره آبی Artemisia capillaris Thunb بر التهاب کبدی ناشی از لیپوپلی ساکاریدهای باکتریایی در سلول‌های کبدی انسانی HepG2 و کبد موش مورد بررسی قرارگرفت. عصاره آبی موردنظر بیان پروتئین‌های التهابی ازجمله COX-2 ، iNOS و TNF-α را مهار کرده، انتقال هسته‌ای NF-κB و تخریب I-κBα به‌واسطه پیش تیمار با عصاره آبی متوقف شد. این نتایج نشان داد اثر مهاری این عصاره در بیان پروتئین‌های التهابی ازطریق سرکوب فعال‌سازی NF-κB انجام می‌شود [۱۱]. در پژوهشی که کای انجام داد، مکانیسم عمل دارویی عصاره آبی نوعی داروی مرسوم کره‌ای متشکل از ترکیب Artemisia capil-laris، Gardenia jasminoide و Rheum rhabarbarum بر روي هپاتیت وابسته به سلول T القاشده توسط کانکاوالین A در موش‌ها مورد ارزیابی قرار گرفت.

براساس نتایج گزارش‌شده در این مطالعه، عصاره آبی موردنظر با مهار فعال‌شدن NF-κB موجب کاهش تولید TNF-a می‌شود [۱۲]. بررسی تأثیر ماده مؤثره شیرین بیان[۱۰] بر آسیب کبدی القایی توسط تتراکلریدکربن و اتانل نشان می‌دهد اتصال NF-κB در کبد موش‌های گروه کنترل در مقایسه با کبد نرمال افزایش داشته، اما سطح اتصال در کبد گروه دریافت‌کننده ماده مؤثره شیرین‌بیان تقریباً طبیعی بود. براساس این نتایج، ماده مؤثره شیرین‌بیان می‌تواند فعالیت اتصال NF-κB در مسمومیت تتراکلریدکربن و آسیب مزمن کبدی ناشی از اتانول را مهار کند و این اثر ممکن است مکانیسم حفاظتی ماده مؤثره شیرین‌بیان از کبد در مقابل هپاتوتوکسین و سیروز کبدی باشد [۱۳]. بنابراین باتوجه‌به نتایج به‌دست‌آمده در پژوهش حاضر و پژوهش‌های بررسی‌شده می‌توان اظهار کرد که کاهش میزان NF-κB نقش مهمی در فرایند بهبود آسیب کبدی بدون درنظر گرفتن عامل ایجادکننده آن دارد. این نتایج می‌تواند اثر درمانی عصاره هیدرواتانلی دانه خربزه بر مسمومیت کبدی را تأیید کند.

براساس نتایج پژوهش حاضر میزان رونویسی از ژن کدکننده MPO در کبد موش‌های تیمارشده با اتیلن گلیکول نسبت به موش‌های کنترل سالم افزایش معناداری دارد. تیمار عصاره هیدرواتانلی دانه خربزه در غلظت‌های ۱۵۰، ۳۰۰ و ۶۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن موجب کاهش معنادار رونویسی از ژن MPO در گروه‌های آزمایش در مقایسه با گروه کنترل مسموم می‌شود. براساس نتایج گزارش‌شده توسط اَمن‌زاده و همکاران نیز میزان بیان MPO در کبد موش‌های مسموم‌شده با تتراکلریدکربن افزایش می‌یابد [۷]. نتایج پژوهشی که ژای و همکاران انجام دادند نیز نشان می‌دهد میزان MPO بافت کبدی به‌دنبال مسمومیت با کانکاوالین A افزایش می‌یابد. تیمار با عصاره Rabdosia amethystoides، میزان MPO افزایش‌یافته در اثر مسمومیت با کانکاوالین A را در بافت کبد به‌طور قابل‌توجهی کاهش می‌دهد [۱۴]. نتایج پژوهشی که لی یو و همکاران انجام دادند، نشان می‌دهد مصرف عصاره میوه Sonneratia apetala پس از مسمومیت کبدی ناشی از استامینوفن موجب کاهش تولید MPO می‌شود [۱۵]. در پژوهش دیگری که توسط لی و همکاران انجام شد تأثیر عصاره Aesculus hippocastanum بر مسمومیت کبدی ناشی از استامینوفن بررسی شد. نتایج این پژوهش نشان داد استفاده از این عصاره موجب کاهش فعالیت MPO کبدی می‌شود [۱۶]. در پژوهش دیگر نشان داده شد که عصاره هیدرواتانلی Lepidium sativum میزان MPO و NF-κB که به‌دنبال آن آسیب کبدی افزایش‌یافته را کاهش می‌دهد [۱۷]. نتایج به‌دست‌آمده در مطالعه حاضر در سایر مطالعات نشان می‌دهد که به‌دنبال مصرف مواد شیمیایی میزان تولید MPO در بافت کبدی افزایش می‌یابد که نتیجه آن بروز التهاب در این بافت است. درصورت ادامه، التهاب تشدید می‌شود و می‌تواند موجب بروز آسیب کبدی شود. بااین‌حال، استفاده از عصاره هیدرواتانلی خربزه می‌تواند با کاهش سطح التهاب در بافت کبدی، ضمن جلوگیری از آسیب به کبد، شرایط را برای ادامه سم‌زدایی ترکیبات شیمیایی توسط کبد فراهم کند

نتیجه‌گیری

در تمامی مطالعات یادشده کاهش فعالیت و یا سطح MPO و NF-κB به‌عنوان شاخص مهمی مبنی‌بر تأثیر محافظتی عصاره یا روش درمانی موردنظر بر کبد محسوب می‌شود. باتوجه‌به این که در مطالعه حاضر نیز میزان بیان ژن‌های MPO و NF-κB در مسمومیت کبدی ناشی از اتیلن گلیکول به‌دنبال مصرف عصاره دانه خربزه کاهش می‌یابد، بنابراین می‌توان اظهار کرد که عصاره هیدرواتانلی دانه خربزه دارای اثرات درمانی و محافظتی در برابر مسمومیت اتیلن گلیکول می‌باشد.

ملاحظات اخلاقی

پیروی از اصول اخلاق پژوهش

تحقیق حاضر در قالب پایان‌نامه مقطع کارشناسی‌ارشد رشته ژنتیک (کد: IR.IAU.VARAMIN.REC.1399.016) در دانشگاه آزاد اسلامی واحد ورامین-پیشوا و با رعایت موازین اخلاق در پژوهش‌های زیستی انجام شده است.

10. Glycyrrhizin

حامی مالی

مقاله برگرفته از پایان‌نامه مقطع کارشناسی ارشد محمدرضا فروهرمنش، گروه ژنتیک، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد ورامین-پیشوا است وهیچ‌گونه کمک مالی از سازمان‌های تأمین مالی در بخش‌های عمومی، تجاری یا غیرانتفاعی دریافت نکرده است.

مشارکت نویسندگان

مفهوم‌سازی، روش‌شناسی، بررسی و نظارت: مهدی ابراهیمی و مریم عیدی؛ نگارش-پیش‌نویس اصلی، محمدرضا فروهرمنش: نگارش-نقد و ویرایش، مهدی ابراهیمی؛ تأمین مالی: محمدرضا فروهرمنش؛ منابع: همه نویسندگان.

تعارض منافع

بنابر اظهار نویسندگان، این مقاله تعارض منافع ندارند.

تشکر و قدردانی

از معاونت پژوهشی دانشگاه آزاد اسلامی واحد ورامین-پیشوا به سبب حمایت‌هایشان از این مطالعه تشکر و قدردانی می‌شود.

References

[1] Abbaszadeh S, Nosrati Andevari A, Koohpayeh A, Naghdi N, Alizadeh M, Beyranvand F, et al. Folklore medicinal plants used in liver disease: A review. Int J Green Pharm (IJGP). 2018; 12(3):S463. [Link]

[2] Bak J, Je NK, Chung HY, Yokozawa T, Yoon S, Moon JO. Oligonol ameliorates CCl4-induced liver injury in rats via the NF-Kappa B and MAPK signaling pathways. Oxid Med Cell Longev. 2016; 2016:3935841. [DOI:10.1155/2016/3935841] [PMID] [PMCID]

[3] Gummin DD, Mowry JB, Beuhler MC, Spyker DA, Brooks DE, Dibert KW, et al. 2019 Annual report of the american association of poison control centers' national poison data system (npds): 37th Annual Report. Clin Toxicol (Phila). 2020; 58(12):1360-541. [DOI:10.1080/15563650.2020.1834219] [PMID]

[4] Garg U, Lowry J, Algren DA. Ethylene glycol and other glycols.: Analytical and interpretation issues. In: Dasgupta A, editor. Critical issues in alcohol and drugs of abuse testing. Cambridge: Academic Press; 2019. [DOI:10.1016/B978-0-12-815607-0.00005-8]

[5] Albensi BC. What is nuclear factor kappa B (NF-κB) doing in and to the mitochondrion? Front Cell Dev Biol. 2019; 7:154. [DOI:10.3389/fcell.2019.00154] [PMID] [PMCID]

[6] Blazka ME, Beuccoleri A, Simeonova PP, Germolec DR, Pennypacker KR, Luster MI. Acetaminophen-induced hepatotoxicity is associated with early changes in NF-kB and NF-IL6 DNA binding activity. Res Commun Mol Pathol Pharmacol. 1995; 92(3):259-73. [Link]

[7] Amanzada A, Malik IA, Nischwitz M, Sultan S, Naz N, Ramadori G. Myeloperoxidase and elastase are only expressed by neutrophils in normal and in inflammed liver. Histochem Cell Biol. 2011; 135(3):305-15. [DOI:10.1007/s00418-011-0787-1] [PMID] [PMCID]

[8] Zargari A. [Medicinal plants (Persian)]. Tehran: Tehran Univercity; 1997.

[9] Rolim PM, Fidelis GP, Padilha CEA, Santos ES, Rocha HAO, Macedo GR. Phenolic profile and antioxidant activity from peels and seeds of melon (Cucumis melo L. var. reticulatus) and their antiproliferative effect in cancer cells. Braz J Med Biol Res. 2018; 51(4):e6069. [DOI:10.1590/1414-431x20176069] [PMID] [PMCID]

[10] Fox ES, Kim JC, Tracy TF. NF-κB activation and modulation in hepatic macrophages during cholestatic injury. J Surg Res. 1997; 72(2):129-34. [DOI:10.1006/jsre.1997.5172] [PMID]

[11] Hong SH, Seo SH, Lee JH, Choi BT. The aqueous extract from Artemisia capillaris Thunb. inhibits lipopolysaccharide-induced inflammatory response through preventing NF-κB activation in human hepatoma cell line and rat liver. Int J Molecular Med. 2004; 13(5):717-20. [DOI:10.3892/ijmm.13.5.717]

[12] Cai H, Song YH, Xia WJ, Jin MW. Aqueous extract of Yin-Chen-Hao decoction, a traditional Chinese prescription, exerts protective effects on concanavalin A-induced hepatitis in mice through inhibition of NF-k B. J Pharm Pharmacol. 2006; 58(5):677-84. [DOI:10.1211/jpp.58.5.0013] [PMID]

[13] Wang JY, Guo JS, Li H, Liu SL, Zern MA. Inhibitory effect of glycyrrhizin on NF-κB binding activity in CC14-plus ethanol-induced liver cirrhosis in rats. Liver. 1998; 18(3):180-5. [DOI:10.1111/j.1600-0676.1998.tb00147.x] [PMID]

[14] Zhai KF, Duan H, Cao WG, Gao GZ, Shan LL, Fang XM, et al. Protective effect of Rabdosia amethystoides (Benth) Hara extract on acute liver injury induced by Concanavalin A in mice through inhibition of TLR4-NF-κB signaling pathway. J Pharmacol Sci. 2016; 130(2):94-100. [DOI:10.1016/j.jphs.2015.12.006] [PMID]

[15] Liu J, Luo D, Wu Y, Gao C, Lin G, Chen J, et al. The protective effect of Sonneratia apetala fruit extract on acetaminophen-induced liver injury in mice. Evid Based Complement Alternat Med. 2019; 2019:6919834. [PMID] [PMCID]

[16] Lee HC, Yu HP, Liao CC, Chou AH, Liu FC. Escin protects against acetaminophen-induced liver injury in mice via attenuating inflammatory response and inhibiting ERK signaling pathway. Am J Trans Res. 2019; 11(8):5170-82. [PMID]

[17] Raish M, Ahmad A, Alkharfy KM, Ahamad SR, Mohsin K, Al-Jenoobi FI, et al. Hepatoprotective activity of Lepidium sativum seeds against D-galactosamine/lipopolysaccharide induced hepatotoxicity in animal model. BMC Complement Altern Med. 2016; 16(1):501. [PMID] [PMCID]