

Research Paper

Protective Effect of Rosmarinic Acid on Inflammatory Changes of Hepatic Cells in Non-alcoholic Steatohepatitis in Mice: Cyclooxygenase 2/ Prostaglandin E2 Pathway



Tahereh Komeili-Movahhed¹ , *Azam Moslehi¹

1. Cellular & Molecular Research Center, Qom University of Medical Sciences, Qom, Iran.



Citation Komeili-Movahhed T & Moslehi A. [Protective Effect of Rosmarinic Acid on Inflammatory Changes of Hepatic Cells in Non-alcoholic Steatohepatitis in Mice: Cyclooxygenase 2/ Prostaglandin E2 Pathway (Persian)]. *Qom Univ Med Sci J.* 2023; 16(11):868-879. <https://doi.org/10.32598/qums.16.11.65.7>

<https://doi.org/10.32598/qums.16.11.65.7>



Received: 02 Oct 2022

Accepted: 19 Des 2022

Available Online: 01 Feb 2023

Keywords:

Liver, Nonalcoholic fatty liver disease, Matrix Metalloproteinase-9, Prostaglandin E2, Rosmarinic acid

ABSTRACT

Background and Objectives Nonalcoholic Steatohepatitis (NASH) is one of the common liver diseases, characterized by excessive lipid accumulation (steatosis) and inflammation in the liver. Inflammation is one of main reasons for this disease which takes place from different pathways. Rosmarinic Acid (RA) is an antioxidant and anti-inflammatory product with positive effects on the improvement of liver injuries. This study aims to evaluate protective effect of RA against liver inflammation caused by NASH in male mice through affecting cyclooxygenase-2/ Prostaglandin E2 (COX-2/PEG2) pathway and Matrix Metalloproteinase-9 (MMP-9).

Methods In this study, 24 C57/BL6 male mice were used. They were divided into four groups of 6 including; Control, RA, NASH, and NASH+RA. The NASH was induced by a methionine/choline-deficient diet for 8 weeks. The RA was administrated intraperitoneally and daily for 8 weeks. After 8 weeks, the animals were sacrificed and their liver was removed. hematoxylin and eosin staining was preformed for histological evaluation and real-time PCR and ELISA assays were used for molecular studies.

Results The RA significantly reduced hepatic steatosis and inflammation as well as the expression of MMP-9 and COX-2 which led to the significant reduction of PEG2 level.

Conclusion It seems that RA can reduce liver inflammation and thereby attenuate NASH in male mice by reducing the expression of COX-2 enzyme and MMP-9 and the concentration of PEG2.

* Corresponding Author:

Azam Moslehi

Address: Cellular & Molecular Research Center, Qom University of Medical Sciences, Qom, Iran.

Tel: +98 (912) 6510485

Email: amoslehi@muq.ac.ir



Copyright © 2023 Qom 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.

Extended Abstract

Introduction

Nonalcoholic Steatohepatitis (NASH) is one of the common liver diseases, characterized by excessive lipid accumulation (steatosis) and inflammation in the liver. Epidemiological studies have shown that almost 20% of patients with nonalcoholic fatty liver disease have NASH. It is predicted that NASH will become the main reason for liver transplantation from 2020 to 2025. NASH can lead to cirrhosis, fibrosis and ultimately hepatocellular carcinoma. Although the pathophysiology of NASH is not completely understood, studies have demonstrated that inflammation is one of main reasons for this disease which takes place from different pathways including matrix metalloproteinases and prostaglandins. Cyclooxygenase-2 (COX-2) is a key enzyme in prostaglandins. It stimulates prostaglandin E2 (PGE2), which, with increasing inflammation, can cause the development of NASH. Evidence shows that COX2 and prostaglandin E2 levels are high in people with NASH. Increased prostaglandin E2 level can increase the production of Matrix Metalloproteinase 9 (MMP-9) through the effect on EP2 and EP4 prostaglandin receptors in cells.

Rosmarinic Acid (RA) is a pure compound which is commonly found in plants from Lamiaceae family including *Rosmarinus officinalis* (rosemary), *Coleus aromaticus*, *Origanum vulgare* L. (oregano) and *thymus vulgaris* L. (thyme). The beneficial effects of RA on the diabetes, sepsis, hepatotoxicity and brain injuries have already been reported. It reduces blood glucose by inhibiting insulin resistance and increasing GLUT4 expression. It is considered as an antioxidant and anti-inflammatory product with positive effects on liver injuries. This study aims to evaluate the effect of RA on the MMP-9 expression level and COX-2/PGE2 pathway in male mice with NASH.

Methods

In this study, samples were 24 C57/BL6 male mice weighing 25-27g which bought from Pasteur Institute of Iran. Animals were kept in a temperature-controlled room at a 12:12 light/dark cycle with free access to foods and tap water. Then, they were randomly divided into four groups of 6): Control group (receiving normal diet plus normal saline daily (i.p) for 8 weeks), RA group (receiving normal diet plus 10-mg/kg RA (i.p) daily for 8 weeks), NASH group (receiving Methionine/Choline-Deficient (MCD) diet for 8 weeks to induce NASH), and NASH + RA group (receiving MCD diet plus 10-mg/kg RA for

8 weeks). After 8 weeks, the animals were anaesthetized with a ketamine-xylazine solution and then sacrificed. The abdomen was opened by a midline incision and the liver was immediately removed, weighted and washed in an ice-cold physiological saline. A part of the liver was dissected and kept at -80°C .

A part of the middle lobe was dissected and fixed in 10% natural buffered formalin. Then, 5- μm slices from paraffin-embedded liver tissue were obtained for Hematoxylin And Eosin (H&E) staining. An pathologist blind to the experiment performed histopathological study to determine hepatic steatosis, hepatocyte ballooning, and lobular inflammation.

Results

Total RNA was extracted from the frozen tissue samples using Trizol solution. Complementary DNAs (cDNA) were made from mRNA templates for qualitative real-time PCR. For ELISA assays, a part of the liver tissue was cut and weighted, mixed with Phosphate-Buffered Saline (PBS) buffer, homogenized by an electrical homogenizer, and centrifuged (4000-6000 rpm for 10 min). The prepared supernatants were then assessed for PGE2 levels using an ELISA kit according to the instructions of the manufacturer and read by ELISA reader in 450 nm. Data normality was checked by the Kolmogorov-Smirnov test. Data were expressed as mean \pm standard error of the mean (SEM). One-way analysis of variances (ANOVA) was used to compare with the study groups followed by Tukey's post hoc test in SPSS. $P < 0.05$ was statistically significant.

Discussion

NASH caused excessive lipid droplet accumulation, hepatocyte ballooning, and lobar inflammation in mice. However, RA improved steatosis and edema and reduced inflammation. MMP-9 gene expression significantly increased in the NASH group compared to the control group, while administration of RA significantly reduced the MMP-9 gene expression in the NASH+RA group compared to the NASH group. COX-2 expression significantly increased in the NASH group compared to the control group, but significantly decreased in the NASH+RA group compared to the NASH group. PGE2 level significantly increased in the NASH group compared to the control group, but RA significantly reduced its level in the NASH+RA group compared to the NASH group.

Ethical Considerations

Compliance with ethical guidelines

This study was approved by the Ethics Committee of [Qom University of Medical Sciences](#) (Code: IR.MUQ.REC. 1400.003).

Funding

This research did not receive any grant from funding agencies in the public, commercial, or non-profit sectors.

Authors contributions

All authors contributed equally in preparing all parts of the research.

Conflicts of interest

The authors declare no conflict of interest.

Acknowledgements

The authors would like to thank [Qom University of Medical Sciences](#) for getting ethical code.

مقاله پژوهشی

بررسی اثرات حفاظتی رزمارینیک اسید بر التهابی سلول‌های کبد در مدل استئاتوهپاتیت غیرالکلی در موش سوری: سیکلواکسیژناز ۲/ پروستاگلندین E2

طاهره کمیلی موحد^۱، اعظم مصلحی^{۱*}

۱ مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی قم، قم، ایران.

Use your device to scan
and read the article online**Citation** Komeili-Movahhed T & Moslehi A. [Protective Effect of Rosmarinic Acid on Inflammatory Changes of Hepatic Cells in Non-alcoholic Steatohepatitis in Mice: Cyclooxygenase 2/ Prostaglandin E2 Pathway (Persian)]. *Qom Univ Med Sci J.* 2023; 16(11):?. <https://doi.org/10.32598/qums.16.11.65.7>**doi** <https://doi.org/10.32598/qums.16.11.65.7>

چکیده

تاریخ دریافت: ۱۰ مهر ۱۴۰۱

تاریخ پذیرش: ۲۸ آذر ۱۴۰۱

تاریخ انتشار: ۱۲ بهمن ۱۴۰۱

زمینه و هدف استئاتوهپاتیت غیرالکلی یکی از بیماری‌های شایع کبدی است که با تجمع بیش از حد چربی (استئاتوز) و التهاب در کبد شناخته می‌شود. التهاب یکی از علل اصلی برای ایجاد و پیشرفت این بیماری است که از مسیرهای مختلفی اتفاق می‌افتد. رزمارینیک اسید به‌عنوان یک فرآورده آنتی‌اکسیدان و ضدالتهاب در نظر گرفته می‌شود که اثرات مثبتی بر بهبود آسیب‌های کبدی دارد. هدف از انجام این مطالعه، بررسی اثرات حفاظتی رزمارینیک اسید بر کاهش التهاب کبدی القاشده به‌وسیله استئاتوهپاتیت غیرالکلی در موش‌های سوری نر از طریق اثر بر مسیر سیکلواکسیژناز ۲/ پروستاگلندین E2 و ماتریکس متالوپروتئیناز ۹ می‌باشد.

روش بررسی در این مطالعه از ۲۴ سر موش‌های سوری نر نژاد C57/BL6 استفاده شد. حیوانات به ۴ گروه مساوی شامل کنترل، رزمارینیک اسید، استئاتوهپاتیت غیرالکلی و استئاتوهپاتیت غیرالکلی-رزمارینیک اسید تقسیم شدند. در گروه‌های ۳ و ۴، استئاتوهپاتیت غیرالکلی با استفاده از رژیم غذایی فاقد متیونین و کولین و در طی ۸ هفته القا شد. در گروه‌های رزمارینیک اسید و استئاتوهپاتیت غیرالکلی-رزمارینیک اسید، حیوانات روزانه رزمارینیک اسید را به‌صورت داخل صفاقی دریافت کردند. پس از ۸ هفته حیوانات کشته شدند و نمونه بافت کبد تهیه شد. برای بررسی بافت‌شناسی از رنگ آمیزی هماتوکسیلین-ئوژین و برای مطالعات مولکولی از روش ریل تایم پی سی آر و الیزا استفاده شد.

یافته‌ها این مطالعه نشان داد که استفاده از رزمارینیک اسید موجب بهبود استئاتوز و التهاب در بافت کبد شد. همچنین رزمارینیک اسید باعث کاهش بیان ماتریکس متالوپروتئیناز ۹ و آنزیم سیکلواکسیژناز ۲ شد. در نهایت سطح کبدی پروستاگلندین E2 به‌صورت معناداری کاهش یافت.

نتیجه‌گیری به نظر می‌رسد استفاده از رزمارینیک اسید می‌تواند با کاهش بیان ژن‌های آنزیم سیکلواکسیژناز ۲ و ماتریکس متالوپروتئیناز ۹ و نیز کاهش غلظت پروستاگلندین E2 موجب کاهش التهاب و در نتیجه بهبود بیماری استئاتوهپاتیت غیرالکلی القاشده در موش‌های سوری نر شود.

کلیدواژه‌ها:

کبد، بیماری کبد چرب
غیرالکلی، ماتریکس
متالوپروتئیناز-۹،
پروستاگلندین E2،
رزمارینیک اسید

* نویسنده مسئول:

اعظم مصلحی

نشانی: قم، دانشگاه علوم پزشکی قم، مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی.

تلفن: ۶۵۱۰۴۸۵ (۹۱۲) ۹۸+

رایانامه: amoslehi@muq.ac.ir

Copyright © 2023 Qom 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

از طرف دیگر، بیان شده است که افزایش سطح پروستاگلندین E2 موجب افزایش تولید ماتریکس متالوپروتئیناز ۹ از طریق تأثیر بر گیرنده‌های پروستاگلندینی EP2 و EP4 در سلول‌ها انجام می‌شود [۴].

رزمارینیک اسید یک ماده مؤثره در گیاهانی چون رزمارینوس افیشیالیس، رزماری، پونه کوهی و آویشن [۱۳]. مطالعات گذشته اثرات قابل توجه رزمارینیک اسید را بر بهبود دیابت، شوک سپتیک و آسیب‌های معدی و کلیوی نشان داده‌اند [۱۴-۱۶]. رزمارینیک اسید با مهار مقاومت به انسولین و افزایش انتقال‌دهنده گلوکز نوع ۴^۲ موجب کاهش گلوکز خون می‌شود [۱۷]. رزمارینیک اسید اثرات قابل توجهی نیز در کاهش التهاب داشته است و به‌عنوان یک ترکیب ضدالتهاب قوی شناخته می‌شود [۱۳، ۱۸]. همچنین رزمارینیک اسید با کاهش فعالیت مسیر سیکلواکسیژناز ۲/پروستاگلندین E2 موجب کاهش سطح گلوکز در خون و بهبود دیابت در موش‌های مبتلا به دیابت می‌شود [۱۷]. علاوه بر این، مطالعه‌ای دیگر نشان داد رزمارینیک اسید موجب کاهش بیان ماتریکس متالوپروتئیناز ۹ و ماتریکس متالوپروتئیناز ۲ در سلول‌های HEPG2 کبد شده است [۱۹].

باتوجه به شیوع و اهمیت بیماری استئاتوهپاتیت غیرالکلی و اهمیت التهاب در پیشرفت این بیماری و نیز اثرات مثبت رزمارینیک اسید، این مطالعه برای ارزیابی اثرات رزمارینیک اسید بر کاهش بیان ماتریکس متالوپروتئیناز ۹ و مسیر سیکلواکسیژناز ۲/ پروستاگلندین E2 طراحی شد.

روش بررسی

این مطالعه در دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی قم و بر روی ۲۴ سر موش سوری نر نژاد C57/BL6، در محدوده وزنی ۲۳ تا ۲۵ گرم انجام شد. در مدت مطالعه، حیوانات در شرایط استاندارد دمایی (۲۹±۲) درجه سانتی‌گراد، رطوبت نسبی (۴۵ تا ۴۸ درصد)، سیکل زمانی (۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی) و دسترسی آزاد به آب و غذا داشتند. برای انجام آزمایش، حیوانات به‌طور تصادفی به ۴ گروه ۶ تایی به ترتیب زیر تقسیم شدند.

گروه کنترل

شامل حیوانات سالم و دارای دسترسی به غذای معمولی بودند.

گروه رزمارینیک اسید

شامل حیوانات سالم و دارای رژیم غذایی معمولی بوده که روزانه به مدت ۸ هفته ۱۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم رزمارینیک اسید را به‌صورت داخل صفاقی دریافت می‌کردند [۵].

کبد چرب غیرالکلی یکی از شایع‌ترین بیماری‌های کبدی به‌ویژه در جوامع پیشرفته می‌باشد. شیوع کلی آن حدود ۲۵ درصد تخمین زده می‌شود [۱]. امروزه تغییر شیوه زندگی، به‌خصوص استفاده از رژیم‌های پرچربی و کم‌تحرکی منجر به چاقی و دیابت نوع ۲ شده است که هر ۲ منجر به اختلال در متابولیسم لیپیدها می‌شود [۲، ۳]. بیماری کبد چرب غیرالکلی با رسوب توده‌های بزرگ چربی در بافت کبد مشخص می‌شود. در ادامه با افزایش تولید اکسیدان‌ها، سیتوکین‌های التهابی همراه می‌شود و عارضه ثانویه‌ای به اسم استئاتوهپاتیت غیرالکلی را ایجاد خواهد کرد که با تجمع چربی در کبد یا استئاتوز و التهاب کبدی مشخص می‌شود [۴]. حداقل ۲۰ درصد از موارد استئاتوهپاتیت در نهایت به فیبروز و سیروز کبدی منجر خواهد شد و احتمالاً در آینده شایع‌ترین علت پیوند کبد خواهد بود [۵]. در واقع التهاب در سلول‌های هپاتوسیتی یکی از مهم‌ترین عوامل ایجادکننده استئاتوهپاتیت غیرالکلی می‌باشد که با به‌راه انداختن آبشاری از مسیرهای سلولی و مولکولی مختلف موجب آسیب‌های جدی به کبد و اختلال عملکرد آن خواهد شد [۵]. ایجاد التهاب در سلول‌ها از مسیرهای مختلفی انجام می‌شود که ۲ تا از آن‌ها متالوپروتئینازهای ماتریکس سلولی و پروستاگلندین‌های التهابی می‌باشند [۶]. متالوپروتئینازهای ماتریکس سلول از انواع پروتئازهای سلولی هستند که قادر به تجزیه انواع پروتئین‌های سلولی مثل آنزیم‌ها، رسپتورها و هورمون‌ها و تولید سیتوکین‌های التهابی می‌باشند [۷].

انواع مختلف ماتریکس متالوپروتئینازها نقش مهمی در ایجاد التهاب و پیشرفت بیماری استئاتوهپاتیت غیرالکلی دارند [۶، ۸]. در این میان، نشان داده شده است که سطح خونی ماتریکس متالوپروتئیناز ۹ یکی از فاکتورهای پیش‌بینی‌کننده در پیش‌آگهی بیماران مبتلا به کبد چرب و پیشرفت آن‌ها به سمت استئاتوهپاتیت باشد [۹]. کاهش آن گام مهمی در بهبود آسیب‌های کبدی ناشی از کبد چرب و استئاتوهپاتیت غیرالکلی می‌باشد. پروستاگلندین‌ها نیز دسته دیگری از مولکول‌های التهابی هستند که از اسید آراشیدونیک که یک اسید چرب در غشاء سلول می‌باشد، تولید می‌شوند و سیکلواکسیژناز ۲ یک آنزیم کلیدی در این مسیر می‌باشد [۱۰]. در بین انواع آن‌ها پروستاگلندین E2، نشان داده شده است که با افزایش التهاب موجب پیشرفت بیماری کبد چرب و آسیب جدی به کبد می‌شود [۱۱]. گزارش‌های ارائه‌شده که افزایش سنتز پروستاگلندین E2 با پیشرفت بیماری استئاتوهپاتیت غیرالکلی همراه است و موجب بدتر شدن آسیب‌های کبدی می‌شود [۱۱، ۱۲]. همچنین افزایش سطح پروستاگلندین E2 با ایجاد اتوفازی در سلول‌های ستاره‌ای کبد موجب پیشرفت آن به سمت فیبروز کبدی خواهد شد [۴].

2. Glucose Transporter 4 (GLUT4)

1. COX2

COX2: (F) CTGGTCTGATGATGTATGCC

(R) TCCTATGAGTATGAGTCTGCTG

MMP9: (F) CACTTTCCTTCACCTCC

(R) TTGCCGTCCTTATCGTAG

GAPDH: (F) TGGCCTCCGTGTTCTCTAC

(R) GAGTTGCTGTTGAAGTCGCA

روش انجام آزمایش الایزا

جهت سنجش مقدار پروستاگلندین E2، از روش الایزا استفاده شد. در ابتدا ۱۰۰ میلی گرم از بافت کبد جدا و وزن شد؛ سپس ۱ میلی لیتر بافر فسفات به آن اضافه و سانتریفوژ شد. مایع رویی که همان سوپرناتانت است، برداشته شد. سپس با استفاده از کیت مخصوص سنجش پروستاگلندین E2 (زلبیو، آلمان)، مقدار پروستاگلندین اندازه گیری شد. و با استفاده از دستگاه ELISA reader و در طول موج ۵۴۰ نانومتر تعیین شد.

ارزیابی آماری داده‌ها

داده‌های این مطالعه به صورت میانگین \pm انحراف معیار بیان شدند. روش ارزیابی آماری و مقایسه بین گروه‌های مختلف، تحلیل واریانس یک طرفه^۴ و آزمون تعقیبی توکی^۵ بود. در تمامی محاسبات $P < 0/05$ به عنوان سطح معناداری در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

بررسی اثر رزمارینیک اسید بر تغییرات بافت‌شناسی کبد در بیماری استئاتوهپاتیت غیرالکلی القاشده در موش‌های سوری نر

بررسی‌های به دست آمده از مطالعات بافت‌شناسی نشان دادند که در گروه‌های کنترل و رزمارینیک اسید، ساختار کبد طبیعی است و سلول‌های کبدی به صورت منظم در اطراف مجرای ورید مرکزی قرار گرفته‌اند، در حالی که در گروه استئاتوهپاتیت غیرالکلی، سلول‌ها بزرگ است و در سیتوپلاسم آن‌ها قطرات درشت چربی مشاهده می‌شود. همچنین التهاب سلول‌های کبدی و افزایش ماکروفاژها در آن دیده می‌شود، اما در گروه استئاتوهپاتیت غیرالکلی-رزمارینیک اسید، تجمع چربی با کاهش همراه است و التهاب به میزان بسیار کمتری دیده می‌شود (تصویر شماره ۱).

گروه استئاتوهپاتیت

شامل حیواناتی بودند که به مدت ۸ هفته تحت رژیم فاقد متیونین-کولین^۳ قرار داشتند تا بیماری استئاتوهپاتیت غیرالکلی در آن‌ها ایجاد شود [۲۰].

گروه استئاتوهپاتیت غیرالکلی-رزمارینیک اسید

شامل موش‌های سوری که رژیم MCD را به مدت ۸ هفته دریافت کردند و هم‌زمان تزریق روزانه ۱۰ میلی گرم به ازای هر کیلوگرم رزمارینیک اسید را دریافت می‌کردند.

پس از ۸ هفته حیوانات با استفاده از تزریق داروی بیهوشی کتامین-گزیلازین به میزان ۶۵ گرم به ازای هر کیلوگرم کتامین و ۰/۰۱ گرم به ازای هر کیلوگرم گزیلازین بیهوش شدند [۵]. ناحیه شکم برش داده شد و کبد در معرض دید قرار گرفت. کبد بلافاصله خارج و شسته شد. بخشی از آن در فرمالین ۱۰ درصد قرار داده شد. بخش دیگری از بافت نیز جهت اندازه‌گیری بیان ژن‌ها و انجام الایزا در فریزر -۸۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

روش انجام رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین-ائوزین

۲۴ ساعت پس از قرار گرفتن بخشی از لوب میانی کبد در فرمالین ۱۰ درصد، بافت با استفاده از غلظت‌های مختلف الکل، آبگیری و با پارافین قالب‌گیری شد. سپس برش‌های ۵ میکرومتری از این قالب‌ها تهیه شد و تحت رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین و ائوزین قرار گرفت. در نهایت با استفاده از میکروسکوپ نوری^۴ وجود استئاتوز (تجمع توده‌های چربی) و التهاب کبدی بررسی شد.

روش انجام ریل‌تایم RT-PCR

جهت بررسی بیان ژن‌های مسیر سیکلواکسیژناز ۲ و ماتریکس متالوپروتیناز ۹ از روش ریل‌تایم RT-PCR استفاده شد. در این روش ابتدا RNA با استفاده از محلول تریزول (یکتا تجهیز، ایران) از بافت کبد استخراج شد؛ میزان خلوص آن با استفاده از دستگاه نانودراپ^۵ آلمانی تعیین شد. سپس با استفاده از کیت سنتز cDNA (یکتا تجهیز، ایران) از روی آن cDNA به‌طور معکوس ساخته شد. سرانجام با استفاده از پرایمرهای اختصاصی و سایبرگرین (بیوفکت، کره جنوبی) به عنوان ماده نشاندار رنگی و دستگاه ریل‌تایم (AB، USA)، میزان بیان هر کدام از ژن‌ها به‌طور کمی با استفاده از روش $\Delta\Delta CT$ اندازه‌گیری و با میزان بیان ژن گلیسرآلدئید-۳-فسفات دهیدروژناز^۶ مقایسه شد. توالی پرایمرهای مورد استفاده به شرح زیر است:

3. Methionine-Choline Deficient (MCD)

4. OLYMPUS, AX70

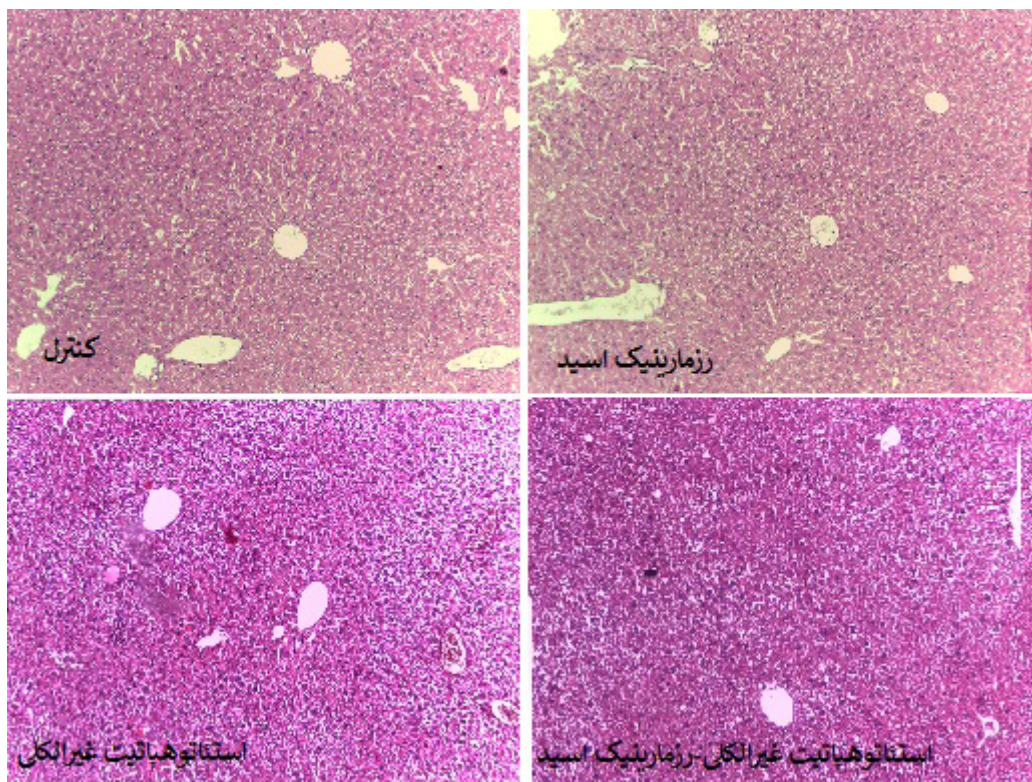
5. Nanolytik

6. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)

7. ELZOBIO

8. One-way ANOVA

9. Tukey



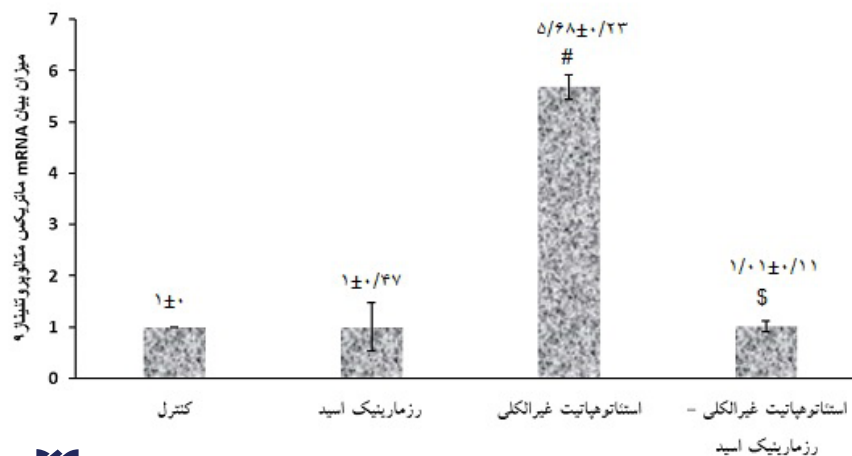
مجله
دانشگاه علوم پزشکی قم

تصویر ۱. نشان‌دهنده استئاتوز (تجمع چربی) و التهاب در گروه استئاتوهپاتیت غیرالکلی و کاهش استئاتوز و التهاب در گروه استئاتوهپاتیت غیرالکلی-رزمارینیک اسید

۱، $P < 0/01$ ، درحالی‌که استفاده از رزمارینیک‌اسید به مدت ۸ هفته در موش‌های مبتلا به استئاتوهپاتیت غیرالکلی موجب کاهش بیان ماتریکس متالوپروتئیناز ۹ به‌عنوان یک فاکتور التهابی در گروه استئاتوهپاتیت غیرالکلی-رزمارینیک‌اسید نسبت به گروه استئاتوهپاتیت غیرالکلی شد ($1/01 \pm 0/11$ در مقابل $5/68 \pm 0/23$) ($P < 0/01$) (تصویر شماره ۲).

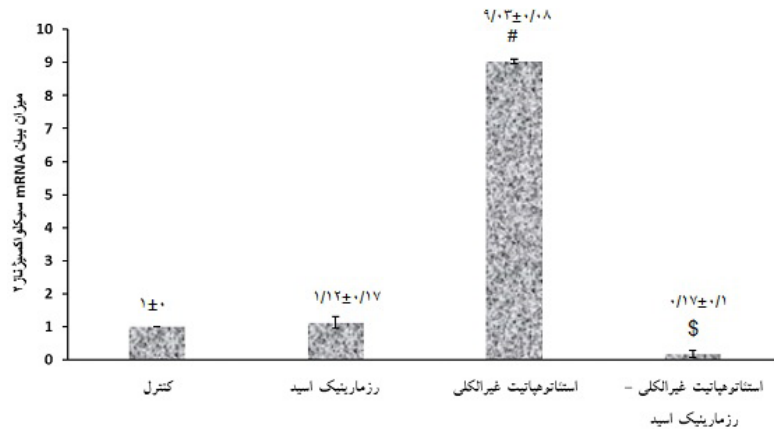
بررسی اثر رزمارینیک اسید بر میزان بیان ژن ماتریکس متالوپروتئیناز ۹ کبد در بیماری استئاتوهپاتیت غیرالکلی القا شده در موش‌های سوری نر

داده‌های به‌دست آمده از این مطالعه، افزایش معناداری در میزان بیان mRNA ژن ماتریکس متالوپروتئیناز ۹ در گروه استئاتوهپاتیت غیرالکلی نسبت به گروه کنترل نشان داد ($5/68 \pm 0/23$ در مقابل



مجله
دانشگاه علوم پزشکی قم

تصویر ۲. میزان بیان mRNA ژن ماتریکس متالوپروتئیناز ۹ در بافت کبدی نشان‌دهنده افزایش معنادار در مقایسه با گروه کنترل، $5/68 \pm 0/23$ نشان‌دهنده افزایش معنادار در مقایسه با گروه استئاتوهپاتیت غیرالکلی 1 ± 0



مجله دانشگاه علوم پزشکی قم

تصویر ۳. میزان بیان mRNA ژن آنزیم سیکلواکسیژناز ۲ در بافت کبدی # نشان دهنده افزایش معنادار در مقایسه با گروه کنترل، \$ نشان دهنده افزایش معنادار در مقایسه با گروه استئاتوهپاتیت غیرالکلی

رزمارینیک اسید در موش های مبتلا به استئاتوهپاتیت غیرالکلی موجب کاهش معنادار سطح پروستاگلندین E2 نسبت به گروه استئاتوهپاتیت غیرالکلی شد (0/22 ± 0/01 در مقابل 0/06 ± 0/04) (P < 0/05) (تصویر شماره ۴).

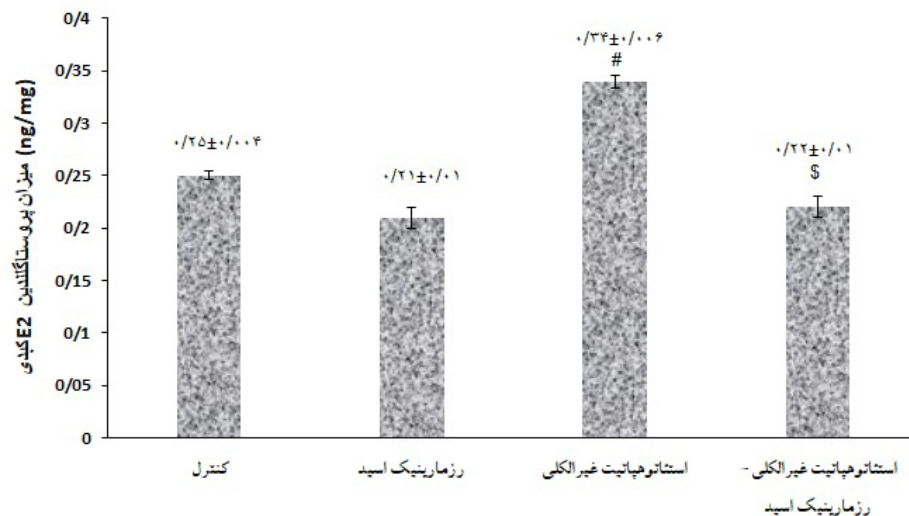
بحث

بیماری استئاتوهپاتیت غیرالکلی یک اختلال شایع و جدی در کبد می باشد که التهاب یکی از عوامل اصلی در ایجاد و پیشرفت آن است. یافته های حاصل از این مطالعه نشان داد که استفاده از رزمارینیک اسید هم زمان با ایجاد استئاتوهپاتیت غیرالکلی به صورت قابل ملاحظه ای میزان بیان آنزیم سیکلواکسیژناز ۲ و سطح پروستاگلندین E2 را کاهش داد. همچنین بیان ماتریکس متالوپروتئیناز ۹ به عنوان یکی دیگر از شاخص های التهابی در کبد به صورت معناداری کاهش یافت. رزمارینیک اسید ماده مؤثر

اثر رزمارینیک اسید بر میزان بیان ژن سیکلواکسیژناز ۲ کبد در بیماری استئاتوهپاتیت غیرالکلی القا شده در موش های سوری نر

نتایج این مطالعه افزایش معناداری در میزان بیان mRNA ژن سیکلواکسیژناز ۲ در گروه استئاتوهپاتیت غیرالکلی نسبت به گروه کنترل نشان داد (9/03 ± 0/08 در مقابل 1، P < 0/001). استفاده از رزمارینیک اسید به مدت ۸ هفته در موش های گروه استئاتوهپاتیت غیرالکلی - رزمارینیک اسید با کاهش معنادار بیان سیکلواکسیژناز ۲ نسبت به گروه استئاتوهپاتیت غیرالکلی همراه شد (0/17 ± 0/1 در مقابل 9/03 ± 0/08) (P < 0/001) (تصویر شماره ۳).

یافته های حاصل از آزمایش الایزا نشان داد که میزان پروستاگلندین E2 بافت کبد در گروه استئاتوهپاتیت غیرالکلی نسبت به گروه کنترل به صورت معناداری افزایش یافت (0/06 ± 0/04 در مقابل 0/25 ± 0/04) (P < 0/05). در حالی که استفاده از



مجله دانشگاه علوم پزشکی قم

تصویر ۴. میزان غلظت پروستاگلندین E2 در بافت کبدی # نشان دهنده افزایش معنادار در مقایسه با گروه کنترل، \$ نشان دهنده افزایش معنادار در مقایسه با گروه استئاتوهپاتیت غیرالکلی

بیان آنزیم سیکلوآکسیژناز و سطح پروستاگلندین E2 کبد در موش‌های سوری مبتلا به دیابت نوع ۱ شد [۱۱۷]. در پژوهشی دیگر، رزمارینیک اسید موجب کاهش میزان پروستاگلندین E2 بافت غضروف در التهاب ایجاد شده به وسیله لیپوبلی ساکاریدها شد [۲۷]. یافته‌های ناشی از مطالعه ما نیز هم‌راستا با گزارشات قبلی بوده است و نشان می‌دهد که رزمارینیک اسید با کاهش بیان آنزیم سیکلوآکسیژناز و سطح پروستاگلندین E2 کبد، موجب کاهش التهاب و بهبود بیماری استئاتوهایپاتیت غیرالکلی القا شده در موش‌های سوری شده است.

متالوپروتئینازهای ماتریکس سلولی خانواده بزرگی از آنزیم‌های پروتیناز هستند که قادر به تجزیه پروتئین‌های ماتریکس خارج سلولی هستند. آن‌ها منجر به شکستن مولکول‌های گیرنده‌ها، تولید سیتوکین‌ها و فعال کردن انواع مختلفی از آنزیم‌ها می‌باشند [۶] و در فرایند التهاب و آپوپتوز نقش ویژه‌ای دارند. مطالعات گذشته نشان داده‌اند که ماتریکس متالوپروتئیناز ۹ در ایجاد التهاب در بسیاری از اختلالات نقش دارد [۱۹]. همچنین فعال شدن متالوپروتئینازهای ماتریکس سلولی به ویژه ماتریکس متالوپروتئیناز ۹ در فرایند ایجاد و پیشرفت التهاب در بیماری استئاتوهایپاتیت غیرالکلی نیز دخیل است [۹].

نتایج این مطالعه نشان داد استفاده از رزمارینیک اسید به مدت ۸ هفته موجب کاهش بیان ماتریکس متالوپروتئیناز ۹ شد. در همین رابطه، مطالعات گذشته نشان می‌دهد که استفاده از رزمارینیک اسید موجب کاهش ماتریکس متالوپروتئیناز ۹ و پروستاگلندین E2 در سلول‌های HepG2 کبد و ملانومای انسانی شد [۱۴، ۲۳]. از طرف دیگر، گزارش‌ها بیان می‌کنند که بین ماتریکس متالوپروتئیناز ۹ و ساخت پروستاگلندین‌ها تعاملاتی زیادی وجود دارد. در همین زمینه، جو-هونگ و همکاران نشان دادند که پروستاگلندین E2 قادر است موجب القای ماتریکس متالوپروتئیناز ۹ در سلول‌های دندریتی و مهاجرت آن‌ها به مغز استخوان شود [۲۸].

پژوهش دیگری بیان کرد که افزایش سطح پروستاگلندین E2 می‌تواند باعث افزایش ماتریکس متالوپروتئیناز ۹ در سلول‌های ماکروفاژی شود و همراه با التهاب است [۲۹]. نتایج این مطالعه نشان داد که استفاده از رزمارینیک اسید به مدت ۸ هفته موجب کاهش بیان ماتریکس متالوپروتئیناز ۹ شد. باتوجه به مطالعات گذشته و نتایج حاصل از این آزمایش به نظر می‌رسد که در اینجا نیز رزمارینیک اسید با مهار بیان ماتریکس متالوپروتئیناز ۹ و سیکلوآکسیژناز ۲ موجب کاهش سطح پروستاگلندین E2 شده و به این ترتیب به کاهش التهاب و بهبود بیماری استئاتوهایپاتیت غیرالکلی منجر شده است.

اصلی در گیاهانی چون رزماری است. مطالعات انجام شده در گذشته نشان می‌دهد رزمارینیک اسید اثرات قابل توجهی در بهبود استرس اکسیداتیو، التهاب و آپوپتوز در بیماری‌های مختلف دارد [۱۵، ۱۶، ۱۸، ۲۱]. کیم و همکاران قبلاً نشان داده‌اند که رزمارینیک اسید موجب حفاظت کبد در برابر استرس اکسیداتیو و آپوپتوز در موش‌های سوری مبتلا به NASH می‌شود [۲۲].

در این مطالعه، استفاده از رزمارینیک اسید در موش‌های مبتلا استئاتوهایپاتیت غیرالکلی موجب بهبود بافت و ساختار کبد در مقایسه با موش‌های بیمار شد. در واقع در طی القای استئاتوهایپاتیت غیرالکلی در موش‌های سوری، استئاتوز یا تجمع چربی به صورت فضاهای خالی بزرگ در سلول‌ها دیده شد که منجر به احتقان و بزرگ شدن آن‌ها شده بود. همچنین التهاب لوبار و افزایش تعداد سلول‌های التهابی به عنوان نشانه‌های اصلی در لام‌های میکروسکوپی دیده شد و استفاده از رزمارینیک اسید توانست به صورت مؤثری این التهاب و استئاتوز را بهبود بخشد. مطالعات انجام شده در گذشته بیان می‌کنند که رزمارینیک اسید موجب کاهش التهاب در کبد، پانکراس، کلیه و حتی مغز می‌شود [۲۳-۲۵].

در مطالعه‌ای حسینیان و همکاران گزارش کرده‌اند که استفاده از رزمارینیک اسید آسیب کبدی ناشی از مصرف استامینوفن را بهبود بخشیده و سطوح سرمی ALT و AST را کاهش داده است [۱۳]. همچنین اسوارنالاتا^{۱۰} و همکاران گزارش کردند که رزمارینیک اسید موجب کاهش آسیب کلیوی ناشی از مواجهه با کادمیم از طریق کاهش بیان NF-κB و التهاب شده است [۲۶]. نتایج این مطالعات، یافته‌های به دست آمده از این آزمایش را تأیید می‌کنند؛ در اینجا نیز رزمارینیک اسید توانسته موجب بهبود ساختار و بافت کبد در موش‌های مبتلا به استئاتوهایپاتیت غیرالکلی شود.

در این مطالعه برای درک بهتر مکانیسمی که به وسیله آن رزمارینیک اسید موجب بهبود التهاب در کبد موش‌های سوری مبتلا استئاتوهایپاتیت غیرالکلی می‌شود، مسیر سیکلوآکسیژناز ۲ و پروستاگلندین E2 در بافت کبد مورد بررسی قرار گرفت. نتایج به دست آمده نشان داد که میزان بیان آنزیم سیکلوآکسیژناز و سطح پروستاگلندین E2 کبد در گروه استفاده کننده از رزمارینیک اسید کاهش یافته است. پروستاگلندین‌ها یکی از عوامل مهم در ایجاد التهاب در بافت‌های مختلف و در انواع بیماری‌ها می‌باشند و یکی از این بیماری‌ها استئاتوهایپاتیت غیرالکلی است [۶]. در واقع گزارشات قبلی نشان می‌دهند که در بیماری استئاتوهایپاتیت غیرالکلی مسیر ساخت پروستاگلندین‌ها فعال و موجب افزایش التهاب در کبد می‌شوند [۱۱]. در همین رابطه ون و یین گزارش کردند که رزمارینیک اسید موجب کاهش

نتیجه‌گیری

نتایج این مطالعه نشان داد رزمارینیک‌اسید با کاهش بیان ژن‌های آنزیم سیکلواکسیژناز ۲ و ماتریکس متالوپروتئیناز ۹ و نیز کاهش غلظت پروستاگلندین E2 موجب کاهش التهاب و در نتیجه موجب بهبود بیماری استئاتوهایپاتیت غیرالکلی القاشده در موش‌های سوری نر شده است.

این مطالعه مسیر دیگری را نشان می‌دهد که به‌وسیله آن اثرات مثبت رزمارینیک‌اسید در بهبود آسیب کبدی ناشی از بیماری استئاتوهایپاتیت غیرالکلی آشکار می‌شود.

ملاحظات اخلاقی

پیروی از اصول اخلاق پژوهش

کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی قم این مطالعه را با کد اخلاق IR.MUQ.REC.1400-003 تأیید کرده است.

حامی مالی

این پژوهش هیچ‌گونه کمک مالی از سازمانی‌های دولتی، خصوصی و غیرانتفاعی دریافت نکرده است.

مشارکت‌نویسندگان

تمام نویسندگان در آماده‌سازی این مقاله مشارکت داشتند.

تعارض منافع

بنابر اظهار نویسندگان، این مقاله تعارض منافع ندارد.

تشکر و قدردانی

نویسندگان از دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی قم بابت دادن کد اخلاق تشکر می‌کنند.

References

- [1] Powell EE, Wong VW, Rinella M. Non-alcoholic fatty liver disease. *Lancet*. 2021; 397(10290):2212-24. [DOI:10.1016/S0140-6736(20)32511-3] [PMID]
- [2] Polyzos SA, Kountouras J, Mantzoros CS. Obesity and non-alcoholic fatty liver disease: From pathophysiology to therapeutics. *Metabolism* 2019; 92:82-97. [DOI:10.1016/j.metabol.2018.11.014] [PMID]
- [3] Manne V, Handa P, Kowdley KV. Pathophysiology of non-alcoholic fatty liver disease/nonalcoholic steatohepatitis. *Clin Liver Dis*. 2018; 22(1):23-37. [DOI:10.1016/j.cld.2017.08.007] [PMID]
- [4] Cao Y, Mai W, Li R, Deng S, Li L, Zhou Y, et al. Macrophages evoke autophagy of hepatic stellate cells to promote liver fibrosis in NAFLD mice via the PGE2/EP4 pathway. *Cell Mol Life Sci*. 2022; 79(6):303. [PMID]
- [5] Komeili-Movahhed T, Bassirian M, Changizi Z, Moslehi A. SIRT1/NFkappaB pathway mediates anti-inflammatory and anti-apoptotic effects of rosmarinic acid on in a mouse model of nonalcoholic steatohepatitis (NASH). *J Recept Signal Transduct Res*. 2022; 42(3):241-50. [DOI:10.1080/10799893.2021.1905665] [PMID]
- [6] Dai W, Sun Y, Jiang Z, Du K, Xia N, Zhong G. Key genes associated with non-alcoholic fatty liver disease and acute myocardial infarction. *Med Sci Monit*. 2020; 26:e922492. [DOI:10.12659/MSM.922492]
- [7] Fei J, Liang B, Jiang C, Ni H, Wang L. Luteolin inhibits IL-1 β -induced inflammation in rat chondrocytes and attenuates osteoarthritis progression in a rat model. *Biomed Pharmacother*. 2019; 109:1586-92. [DOI:10.1016/j.biopha.2018.09.161] [PMID]
- [8] Yuan Y, Naito H, Kitamori K, Hashimoto S, Asano T, Nakajima T. The antihypertensive agent hydralazine reduced extracellular matrix synthesis and liver fibrosis in nonalcoholic steatohepatitis exacerbated by hypertension. *PLoS One*. 2020; 15(12):e0243846. [PMID]
- [9] Coilly A, Desterke C, Guettier C, Samuel D, Chiappini F. FABP4 and MMP9 levels identified as predictive factors for poor prognosis in patients with nonalcoholic fatty liver using data mining approaches and gene expression analysis. *Sci Rep*. 2019; 9(1):19785. [PMID] [PMCID]
- [10] Wong CT, Bestard-Lorigados I, Crawford DA. Autism-related behaviors in the cyclooxygenase-2-deficient mouse model. *Genes Brain Behav*. 2019; 18(1):e12506. [DOI:10.1111/gbb.12506] [PMID]
- [11] Chung MY, Mah E, Masterjohn C, Noh SK, Park HJ, Clark RM, et al. Green Tea lowers hepatic COX-2 and prostaglandin E2 in rats with dietary fat-induced nonalcoholic steatohepatitis. *J Med Food*. 2015; 18(6):648-55. [DOI:10.1089/jmf.2014.0048] [PMID]
- [12] Zhao JS, Zhu FS, Liu S, Yang CQ, Chen XM. Pioglitazone ameliorates nonalcoholic steatohepatitis by down-regulating hepatic nuclear factor-kappa B and cyclooxygenases-2 expression in rats. *Chin Med J (Engl)*. 2012; 125(13):2316-21. [PMID]
- [13] Hasanein P, Seifi R. Beneficial effects of rosmarinic acid against alcohol-induced hepatotoxicity in rats. *Can J Physiol Pharmacol*. 2018; 96(1):32-7. [DOI:10.1139/cjpp-2017-0135] [PMID]
- [14] Diao J, Wei J, Yan R, Liu X, Li Q, Lin L, et al. Rosmarinic acid suppressed high glucose-induced apoptosis in H9c2 cells by ameliorating the mitochondrial function and activating STAT3. *Biochem Biophys Res Commun*. 2016; 477(4):1024-30. [DOI:10.1016/j.bbrc.2016.07.024] [PMID]
- [15] Domitrovic R, Potocnjak I, Crncevic-Orlic Z, Skoda M. Nephroprotective activities of rosmarinic acid against cisplatin-induced kidney injury in mice. *Food Chem Toxicol*. 2014; 66:321-8. [DOI:10.1016/j.fct.2014.02.002] [PMID]
- [16] Heidari F, Komeili-Movahhed T, Hamidizad Z, Moslehi A. The protective effects of rosmarinic acid on ethanol-induced gastritis in male rats: Antioxidant defense enhancement. *Res Pharm Sci*. 2021; 16(3):305-14. [DOI:10.4103/1735-5362.314829] [PMID] [PMCID]
- [17] Wen YJ, Yin MC. The anti-inflammatory and anti-glycative effects of rosmarinic acid in the livers of type 1 diabetic mice. *Biomedicine (Taipei)*. 2017; 7(3):19. [PMID] [PMCID]
- [18] Fan YT, Yin GJ, Xiao WQ, Qiu L, Yu G, Hu YL, et al. Rosmarinic acid attenuates sodium taurocholate-induced acute pancreatitis in rats by inhibiting nuclear factor-kappaB activation. *Am J Chin Med*. 2015; 43(6):1117-35. [DOI:10.1142/S0192415X15500640] [PMID]
- [19] An Y, Zhao J, Zhang Y, Wu W, Hu J, Hao H, et al. Rosmarinic acid induces proliferation suppression of hepatoma cells associated with NF-kappaB signaling pathway. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2021; 22(5):1623-32. [DOI:10.31557/APJCP.2021.22.5.1623] [PMID] [PMCID]
- [20] Komeili Movahhed T, Moslehi A, Golchoob M, Ababzadeh S. Allantoin improves methionine-choline deficient diet-induced nonalcoholic steatohepatitis in mice through involvement in endoplasmic reticulum stress and hepatocytes apoptosis-related genes expressions. *Iran J Basic Med Sci*. 2019; 22(7):736-44. [PMID]
- [21] Eo SH, Kim SJ. Rosmarinic acid induces rabbit articular chondrocyte differentiation by decreases matrix metalloproteinase-13 and inflammation by upregulating cyclooxygenase-2 expression. *J Biomed Sci*. 2017; 24(1):75. [DOI:10.1186/s12929-017-0381-5] [PMID] [PMCID]
- [22] Kim M, Yoo G, Randy A, Son YJ, Hong CR, Kim SM, et al. Lemon balm and its constituent, rosmarinic acid, alleviate liver damage in an animal model of nonalcoholic steatohepatitis. *Nutrients* 2020; 12(4):1166. [DOI:10.3390/nu12041166] [PMID] [PMCID]
- [23] Huang L, Chen J, Quan J, Xiang D. Rosmarinic acid inhibits proliferation and migration, promotes apoptosis and enhances cisplatin sensitivity of melanoma cells through inhibiting ADAM17/EGFR/AKT/GSK3 β axis. *Bioengineered*. 2021; 12(1):3065-76. [DOI:10.1080/21655979.2021.1941699] [PMID] [PMCID]
- [24] Zhang Y, Chen X, Yang L, Zu Y, Lu Q. Effects of rosmarinic acid on liver and kidney antioxidant enzymes, lipid peroxidation and tissue ultrastructure in aging mice. *Food Funct*. 2015; 6(3):927-31. [DOI:10.1039/C4FO01051E] [PMID]

- [25] Thingore C, Kshirsagar V, Juvekar A. Amelioration of oxidative stress and neuroinflammation in lipopolysaccharide-induced memory impairment using Rosmarinic acid in mice. *Metab Brain Dis.* 2021; 36(2):299-313. [DOI:10.1007/s11011-020-00629-9] [PMID]
- [26] Joardar S, Dewanjee S, Bhowmick S, Dua TK, Das S, Saha A, et al. Rosmarinic acid attenuates cadmium-induced nephrotoxicity via inhibition of oxidative stress, apoptosis, inflammation and fibrosis. *Int J Mol Sci.* 2019; 20(8):2027. [DOI:10.3390/ijms20082027] [PMID] [PMCID]
- [27] Chen WP, Jin GJ, Xiong Y, Hu PF, Bao JP, Wu LD. Rosmarinic acid down-regulates NO and PGE₂ expression via MAPK pathway in rat chondrocytes. *J Cell Mol Med.* 2018; 22(1):346-53. [DOI:10.1111/jcmm.13322] [PMID] [PMCID]
- [28] Yen JH, Khayrullina T, Ganea D. PGE₂-induced metalloproteinase-9 is essential for dendritic cell migration. *Blood.* 2008; 111(1):260-70. [DOI:10.1182/blood-2007-05-090613] [PMID] [PMCID]
- [29] Kothari P, Pestana R, Mesraoua R, Elchaki R, Khan KM, Dannenberg AJ, et al. IL-6-mediated induction of matrix metalloproteinase-9 is modulated by JAK-dependent IL-10 expression in macrophages. *J Immunol.* 2014; 192(1):349-57. [DOI:10.4049/jimmunol.1301906] [PMID] [PMCID]