مجله دانشکده علوم پزشکی نیشابور

www.journalnums.ac.ir

Downloaded from journal.nums.ac.ir at 18:42 IRDT on Friday April 24th 2020

میزان HMGB1 تولید شده از رده سلولی میکروگلیال BV-2 ملتهب، تحت تاثیر جزء گلیسیریزین گیاه شیرین‌بیان

اکرم امینیان[۱]، فرشید حمیدی*[۱]، هادی محب علیان[۲]

۱- گروه علوم پایه، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران

۲- گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران

مقاله پژوهشی اصیل

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۲/۲۳

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۶/۱۰

***نویسنده مسئول:** فرشید حمیدی

گروه علوم پایه، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران

تلفن: ۳۸۸۰۵۵۹۹

پست الکترونیک:

Farshidhamidi@um.ac.ir

چکیده

مقدمه

گیاه شیرین‌بیان در طب سنتی اکثر مناطق جهان به عنوان دارو استفاده می‌شود، ارزش این گیاه به‌واسطه اثرات ضد سرفه، ضد دیابت، ضد میکروبی و آنتی‌اکسیدانی مورد تایید قرار گرفته است.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه اثر جزء گلیسیریزین گیاه شیرین‌بیان بر HMGB1 تولیدی در رده سلولی میکروگلیا (BV-2) به عنوان یک واسطه التهابی در مدل سلولی (برون‌تنی) مورد بررسی قرار گرفت. این مطالعه شامل شش گروه (هر گروه سه تکرار) بود. گروه اول (کنترل منفی)، سلول‌ها لیپوپلی ساکارید و گلیسیریزین دریافت نکردند. در گروه دوم (کنترل مثبت)، سلول‌های BV-2 القا شده با لیپوپلی ساکارید و بدون گلیسیریزین و در گروه ۳، ۴، ۵ و ۶ به ترتیب به محیط کشت سلول‌ها ۰/۲، ۰/۴، ۱/۲ و ۴ میکروگرم بر میلی‌لیتر گلیسیریزین افزوده شد، سپس میزان HMGB1 توسط کیت الایزا در زمان‌های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت سنجیده شد.

یافته‌ها

در هر ۳ گروه زمانی با افزایش غلظت گلیسیریزین میزان پروتئین HMGB1 کاهش یافته ولی در گروه ۲۴ ساعت بین غلظت‌های ۰/۲ و ۱/۲ و در گروه ۷۲ ساعت بین کنترل مثبت و غلظت ۰/۲ اختلاف معنی‌دار مشاهده نشده است، لذا نتیجه گرفته می‌شود که غلظت‌های مذکور بایستی در جهت موثرترین دوز افزایش داده شوند.

نتیجه‌گیری

هم‌راستا با مطالعات پیشین، گلیسیریزین موجب کاهش تولید HMGB1 در رده سلولی میکروگلیا شد.

کلیدواژه‌ها

شیرین بیان، پروتئین HMGB1، گلیسیریزین، سلول میکروگلیا

Downloaded from journal.nums.ac.ir at 18:42 IRDT on Friday April 24th 2020

مقدمه

استفاده از گیاهان دارویی جهت کاهش التهاب‌های بوجود آمده در اثر عوارض مختلف، همواره در جوامع بومی رایج بوده و در سال‌های اخیر نیز به عنوان راهکاری جهت کاهش علائم التهابی برخی از بیماری های التهابی مغزی مانند پارکینسون، آلزایمر، پریون و مالتیپل اسکلروزیس مورد توجه قرار گرفته است، یکی از مهمترین گیاهان مورد استفاده در این راستا، گیاه شیرین‌بیان است. گیاه شیرین‌بیان با نام علمی Glycyrrhiza glabra، گیاهی چند ساله از خانواده بقولات است که به‌واسطه دارا بودن ترکیبات دارویی و غذایی مهم در ریشه و ریزوم آن در دنیا مورد توجه صنایع دارویی، غذایی و حتی دخانیات قرار گرفته است (۱، ۲).شیرین‌بیان در اکثر نقاط ایران به حد وفور و به حالت خودرو می‌روید. این گیاه بیشتر در مزارع دیم زار و آبیِ اطراف کرمانشاه، تویسرکان، لرستان و همچنین در بعضی مزارع دشت گرگان دیده می‌شود (۳). مناسب‌ترین مناطق جهت رشد شیرین‌بیان، مناطق نیمه گرمسیری و ساحل رودخانه‌هایی است که در معرض سیلاب‌های دوره‌ای قرار دارند. دمای مناسب برای رشد شیرین‌بیان دمای ۵ تا ۲۶ درجه سانتی گراد می‌باشد (۲). قسمت‌های مهم گیاه شیرین‌بیان که عصاره از آن گرفته می شود، ریشه‌های بلند و درهم پیچیده عمقی آن است. ترکیب تقریبی محتویات ریشه شیرین‌بیان شامل: رطوبت ۲۰٪، گلیسیریزین که اصلی‌ترین ترکیب ریشه شیرین‌بیان است ۵-۲۴٪، قندها ۱۶-۳٪، نشاسته ۳۰٪ و خاکستر ۶٪ می‌باشد (۴). میزان گلیسیریزین ریشه شیرین‌بیان به مقدار قابل توجهی بستگی به واریته، منشا و شرایط آب و هوایی منطقه کشت دارد. محتوای گلیسیریزین، قند و مقدار عصاره آن با بالا رفتن سن گیاه افزایش می‌یابد (۵). مصرف زیاد شیرین‌بیان دارای آثار سوء در بدن می‌باشد زیرا با حفظ سدیم و ازدست‌دهی پتاسیم موجب ادم، افزایش فشار خون، سرکوب سیستم رنین-آنژیوتانسین-آلدوسترون و نهایتاً، هیپرمینرالوکورتیکوئیدیسم می شود (۶). گلیسیریزین یک ساپونین-گلوکورونید با فرمول C42 H62 O16 مهمترین ترکیب موجود در ریشه شیرین‌بیان می‌باشد. این ماده بیش از ۲۴ درصد از وزن خشک ریشه را تشکیل می‌دهد (۷) و در ریشه شیرین‌بیان به صورت نمک‌های پتاسیم و کلسیم وجود دارد، از یک قسمت غیر قندی (یک ساختار پنج حلقه‌ای تری ترپنیک) که به دو مولکول گلوکورونیک اسید متصل شده، تشکیل شده است و بر اثر هیدرولیز توسط گلوکورونیداز به قسمت غیر قندی گلیسیرتیک اسید و دو مولکول گلوکورونیک اسید تبدیل می‌شود (۸). با مصرف خوراکی، گلیسیریزین به شکل ۱۸ بتا گلیسیریتیک اسید وارد جریان خون شده سپس با عبور از طریق سد خونی-مغزی به مغز می‌رسد. گزارش شده است که این ترکیب اثرات مختلف دارویی از جمله اثرات ضدالتهابی و محافظت کننده نورونی دارد (۹).

پروتئین HMGB1 (High Mobility Group Box protein-1) یک پروتئین هسته‌ای غیر هیستونی، تکامل یافته و به شدت محافظت شده می‌باشد که به عنوان چاپرون DNA عمل کرده و در تعدادی از فعالیت‌های هسته‌ای مثل: رونویسی، تکثیر، ترمیم DNA و گردهمایی نوکلئوزوم‌ها شرکت می‌کند (۱۰، ۱۱). در کنار اعمال هسته‌ای، پروتئین HMGB1 در سیتوپلاسم سلول‌ها می‌تواند سبب فعال شدن اتوفاژی به واسطه تعامل با Beclin-1 شود و در محیط خارج سلولی به عنوان مولکول DAMP عمل کند، که برای تحریک التهاب، به سلول‌های مجاور و سیستم ایمنی هشدار می‌دهد (۱۲). نامگذاری HMGB1 براساس سرعت حرکت الکتروفورتیک بسیار بالای آن بر روی ژل‌های پلی آکریلامید می‌باشد (۱۰). چهار مدل مختلف پروتئین های HMGB در پستانداران وجود دارد، HMGB1-4، که بسیار گسترده و سرا سری در

Downloaded from journal.nums.ac.ir at 18:42 IRDT on Friday April 24th 2020

سلول‌ها بیان می‌شود. HMGB1 یک پروتئین به شدت متحرک داخل هسته سلول می‌باشد که بر روی ساختار کروماتینی اثر گذاشته و دسترسی جایگاه‌های اتصالی به عوامل تنظیمی مانند فاکتورهای رونویسی و نوکلئوزوم‌ها را افزایش می‌دهد (۱۳). مولکول HMGB1 درتمامی سلول‌های هسته دار حیوانی بیان می شود. زمانی‌که مولکول HMGB1 طی مرگ سلولی به صورت پسیو یا فعال به داخل محیطِ خارج سلولی ترشح و آزاد می شود؛ این پروتئین نیاز به هویت جدیدی دارد تا بتواند به عنوان مدیاتور التهابی قوی و هدایت کننده مؤثر برای کموکاین‌ها و سایتوکاین‌ها عمل کند و نهایتاً بتواند فعالیت‌های نوروایمیون و یا متابولیک را به طرز صحیحی کنترل کند (۱۰). پروتئین HMGB1 بعد از جا به جایی به محیط خارج سلولی، به عنوان یک سیگنال هشدار دهنده عمل کرده و التهاب را از طریق دو ابزار اساسی و جداگانه تحریک می‌کند؛ پروتئین HMGB1 در خارج سلول ممکن است مشابه سایر آلارمین‌ها و مدیاتورهای مشتق از پاتوژن‌ها، مستقیما به رسپتورهای سطح سلول‌های سوماتیک و ایمنی (غیر سوماتیک) متصل شود و آبشار سیگنالینگ داخل سلولی را فعال نماید، که نتیجه آن التهاب می‌باشد. علاوه بر این پروتئین HMGB1 می‌تواند به تعدادی از مولکول‌های فعال (کننده) ایمنی محلول در خارج سلول متصل شده و به داخل سیستم اندوزومالی به عنوان کمپلکس‌های اتصالی HMGB1 اندوسیتوزه شود، همچنین داخل لیزوزوم‌ها پروتئین HMGB1 توانایی تخریب لیزوزوم را داراست (۱۴).

سلول‌های میکروگلیال، ماکروفاژهای تخصص یافته‌ای هستند که به صورت وسیعی در مغز پخش شده‌اند. میکروگلیال‌ها شامل ۱۰-۲۰ درصد کل سلول‌های گلیال در سیستم عصبی بزرگسالان می‌باشند. سلول‌های میکروگلیال می‌توانند نقش دوگانه‌ای ایفا کنند که شرکت در دفاع از میزبان و همچنین فاگوسیت نمودن بافت‌های تخریب شده و سلول‌های مرده از جمله این نقش‌ها می‌باشد. سلول‌های میکروگلیال همچنین می‌توانند التهاب عصبی را از طریق ترشح واسطه‌های نوروتوکسیک و التهابی در بیماری‌های مزمن مغزی تقویت کنند و باعث دمیلینه شدن آکسون‌ها شوند. یکی از انواع رایج سلول‌های میکروگلیال در سیستم عصبی که در تحقیقات مورد استفاده قرار می‌گیرد سلول BV-2 می‌باشد و بیشترین شباهت رفتاری را در محیط کشت با میکروگلیاهای انسانی از خود نشان داده است (۱۰). از آنجا که آسیب‌های ذکر شده به سیستم عصبی می‌تواند شدید باشد، یافتن راهکاری برای کاهش التهابات و اثرات مخرب آن همواره در اولویت محققین این حوزه قرار داشته است و تهیه داروهایی با منشا گیاهی که در زمان کوتاهی دارای بهترین اثر باشند مورد توجه بوده است.

بنابراین در این تحقیق و به علت خصوصیات ضد التهابی تایید شده جزء گلیسیریزین ریشه گیاه شیرین بیان، کاهش اثرات التهابی در سلول‌های BV-2 (با اندازه گیری میزان HMGB1 تولید شده) در زمان‌های مختلف ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت بررسی شد، البته در موارد مشابه تحقیقاتی با روش‌های دیگر و بر روی سلول‌های مختلف و یا سایر فاکتورهای التهابی انجام شده و اثر ضد التهابی گلیسیریزین تایید شده است، مثلاً در سال ۲۰۱۵، یو و همکاران نشان دادند گلیسیریزین اثر التهابی HMGB1 آزاد شده از سلول‌های کبدی و میکروگلیال را مهار می‌کند (۹). همچنین سانگ و همکاران در سال ۲۰۱۳ اثر ضد التهابی گلیسیریزین بر تجویز سیستمیک لیپوپلی ساکارید را بررسی کردند، بر اساس مطالعات آنها گلیسیریزین با سرکوب بیان ژن سایتوکین‌های پیش التهابی، مانع فعال شدن میکروگلیاها در بافت مغز شد (۱۰)، اما اهداف این تحقیق، بررسی اثرات غلظت های متفاوت گلیسیریزین در طول ۳ دوره زمانی

Downloaded from journal.nums.ac.ir at 18:42 IRDT on Friday April 24th 2020

مختلف بر سلول‌های میکروگلیای موشی بود که با فرضیه کاهش فاکتور التهابی HMGB1 در اثر مجاورت با گلیسیریزین، دستیابی به موثرترین غلظت به عنوان مهمترین هدف این تحقیق بود.

مواد و روش‌ها

در مطالعه‌ی حاضر از رده‌ی سلولی BV-2 میکروگلیال موشی برای ایجاد مدل التهاب در مغز استفاده شده است. برای سلول‌های رده BV-2 محیط کشت حاوی DMEM همراه با ۱۰٪ FBS و ۱۰۰u/ml پنی سیلین و ۱۰۰ mg/ml استرپتومایسین تهیه گردید. سلول‌ها از موسسه پاستور حاوی $۵×۱۰^۶$ سلول در هر میلی‌لیتر با درصد زنده‌مانی ۹۶٪، خریداری شد. همچنین برای تهیه‌ی ۵۰ میلی‌لیتر محیط کشت، از ۴۴/۵ میلی‌لیتر DMEM، ۵ میلی‌لیتر FBS و ۰/۵ میلی‌لیتر Pen-Strep استفاده شد. مقدار ۲۰ میکرولیتر از میکروتیوب حاوی سلول را برداشته و با ۲۰µl رنگ تریپان بلو مخلوط نموده پس از آن با انجام پیپتینگ جهت مخلوط نمودن کامل رنگ با سلول‌ها، ۲۰ µl از مخلوط را از طریق سمپلر بر روی لام نئوبار انتقال داده و عمل شمارش سلولی را توسط میکروسکوپ اینورت با روش صحیح شمارش سلولی و با دقت انجام گرفت. سپس محاسبه تعداد سلول در هر میلی‌لیتر در لام نئوبار انجام شد.

با در اختیار داشتن پلیت مولتی ول ۹۶ چاهکی (هدف انجام ۳ تکرار برای هر ۶ گروه مورد مطالعه) در داخل ۱۸ چاهک از آن ۱۷۰ µl محیط کشت اضافه نموده، سپس به هر ۱۸ چاهک مولتی ول ۵ µl از فالکون حاوی سلول (۱۰۰۰۰۰ سلول)، در مرحله بعد به ۱۵ چاهک آن ۱µl ماده التهاب زای لیپوپلی ساکارید افزوده می‌شود (۳ چاهک از ۱۸ چاهک متعلق به گروه کنترل بدون لیپوپلی ساکارید و گلیسیریزین و ۳ چاهک متعلق به گروه کنترل ملتهب با لیپوپلی ساکارید ولی بدون گلیسیریزین است). در این مرحله به ۱۲ چاهک باقیمانده، گلیسیریزین با غلظت‌های افزایشی ۰/۲ ، ۰/۴، ۱/۲ و ۴ میکروگرم بر میلی‌لیتر اضافه می‌شود. سپس به مدت ۲۴ تا ۷۲ ساعت فرآیند کشت و مجاورسازی انجام می‌گیرد. در ادامه جهت تعیین میزان پروتئین HMGB1 در این مطالعه از تست الایزا استفاده شد. یکی از مشکلات این نوع آزمایشات، وجود آلودگی‌های آزمایشگاهی و تأثیرگذاری بر نتایج آزمایشات است، به‌همین جهت گروه کنترل بدون لیپوپلی ساکارید و گلیسیریزین، نیز طراحی شد تا با ارزیابی HMGB1 تولیدی این گروه، وجود آلودگی ثانویه خارج از آزمایش منتفی شده و در مرحله نهایی جهت سنجش میزان پروتئین HMGB1 توسط دستگاه الایزا ریدر در طول موج ۴۵۰ نانومتر، مولتی ول به جایگاه آن منتقل می‌شود. معادله خطی رگراسیون بر اساس جذب نوری نمونه‌ها را سنجیده و طبق آن غلظت نمونه‌ها محاسبه می‌شود. میزان دقت کیت خریداری شده از شرکت Bioassay Technology Laboratoty جهت سنجش میزان پروتئین HMGB1، ۰/۵۵ نانوگرم بر میلی‌لیتر و بازه سنجش کیت مذکور ۱ تا ۴۰۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر می‌باشد. برای آنالیز داده‌ها در این آزمایش از نرم‌افزار SPSS وGraphPad PRISM و روش‌های پارامتریک آنالیز واریانس اندازه‌های تکراری درون گروهی و بین گروهی و مقایسه چندگانه توکی استفاده شد تا ارتباط معنی داری بین گروه‌ها در روند زمان مشخص شود.

یافته‌ها

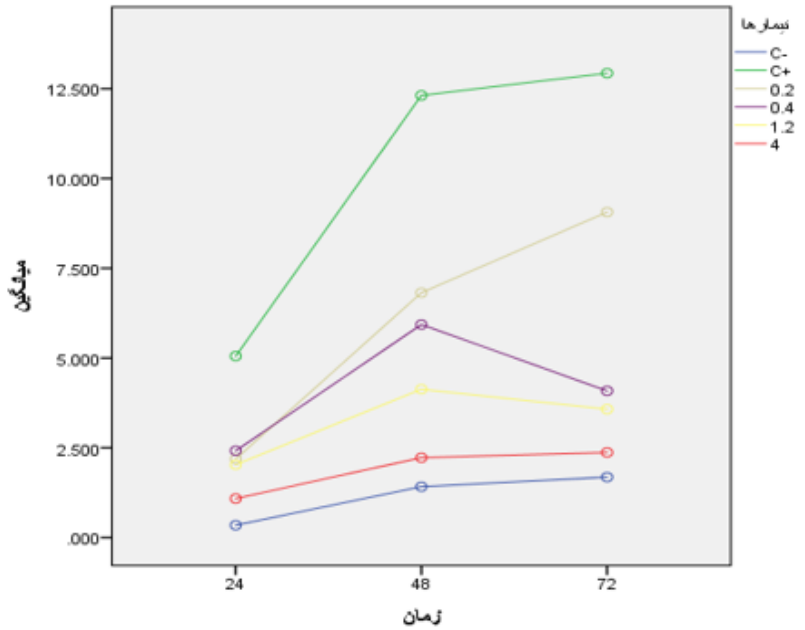
هدف از این مطالعه انتخاب ایمن‌ترین دوز و بهترین زمان برای تأثیر گلیسیریزین بر گروه‌های ملتهب سلولی-می‌باشد لذا با برقراری آنالیزهای درون گروهی و بین گروهی، واکنش سلول‌ها در طول زمان بررسی شدند. در آنالیزهای آماری مشخص شد که با افزایش غلظت گلیسیریزین، میزان فاکتور التهابی HMGB1 کاهش می‌یابد. همچنین براساس مقایسه چندگانه بین تیمارها بر اساس آزمون توکی نیز ارتباط معنی

Downloaded from journal.nums.ac.ir at 18:42 IRDT on Friday April 24th 2020

داری بین گروه‌ها در روند زمان مشاهده شد، البته برای گذشت بیش از ۴۸ ساعت از التهاب بایستی غلظت گلیسیریزین افزایش داده شود. با مقایسه چندگانه اثر تیمار و زمان نیز نتایج مذکور مجددا مشاهده شدند.

از طرفی مقادیر ناچیز و حداقلی میزان HMGB1 تولید شده در گروه کنترل بدون لیپوپلی ساکارید و گلیسیریزین، نشان از عدم آلودگی‌های ثانویه آزمایشگاهی و عدم تأثیرگذاری بر نتایج آزمایش دارد. طبق داده‌های بدست آمده از روش الایزا، پاسخ سلول‌های میکروگلیای ملتهب متأثر از گلیسیریزین با ۴ غلظت مختلف ۰/۲، ۰/۴، ۱/۲، ۴ میکروگرم بر میلی‌لیتر ثبت شد. در ابتدا آمار توصیفی از کل داده‌های سه گروه زمانی مجزا در ۲۴ و ۴۸ و ۷۲ ساعت، و چهار غلظت ماده گلیسیریزین با روش سنجش توسط کیت الایزا به‌دست آمد و سپس سایر آنالیزهای آماری توسط نرم افزار محاسبه شد.

نمودار ۱- نمودار خطی رابطه سه متغیره بین میانگین HMGB1 و گروه‌های زمانی و تیمارها



همانطور که در نمودار ۱ مشاهده می‌شود، طی سه گروه زمانی (بر اساس اثر غلظت‌های گلیسیریزین) بیشترین میانگین HMGB1 مربوط به غلظت ۰/۲ µg/ml و کمترین آن مربوط به غلظت ۴ µg/ml است. همچنین در نمودارهای ۲، ۳، ۴ و ۵ نتایج حاصل از اثر گلیسیریزین بر میزان HMGB1 تولیدی توسط سلول‌های ملتهب در سه زمان به تصویر کشیده شده است.

در این راستا گروه‌های آزمایشی به ترتیب زیر می‌باشند:

گروه C^-: سلول BV-2 سالم (بدون تحریک با LPS)؛

گروه C^+: سلول BV-2 تحریک شده با LPS ؛

گروه ۰/۲: سلول BV-2 تحریک شده با LPS تحت اثر گلیسیریزین با غلظت ۰/۲ µg/ml ؛

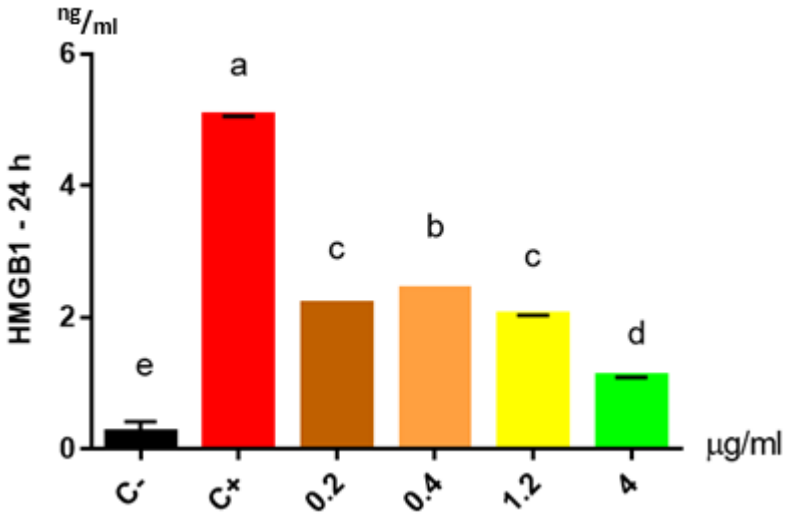
گروه ۰/۴: سلول BV-2 تحریک شده با LPS تحت اثر گلیسیریزین با غلظت ۰/۴ µg/ml ؛

گروه ۱/۲ : سلول BV-2 تحریک شده با LPS تحت اثر گلیسیریزین با غلظت ۱/۲ µg/ml ؛

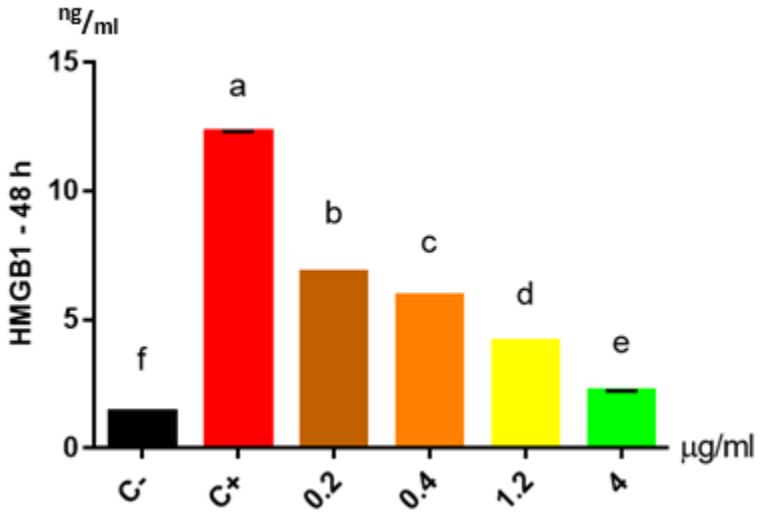
گروه ۴: سلول BV-2 تحریک شده با LPS تحت اثر گلیسیریزین با غلظت ۴ µg/ml

Downloaded from journal.nums.ac.ir at 18:42 IRDT on Friday April 24th 2020

نمودار ۲- نمودار ستونی میانگین و انحراف معیار HMGB1 در گروه‌های مختلف در زمان ۲۴ ساعت، بر اساس افزایش غلظت گلیسیریزین، وجود حروف متفاوت بر روی هر ستون نشانه ارتباط معنی‌دار بین گروه‌ها می‌باشد (p<۰/۰۵).

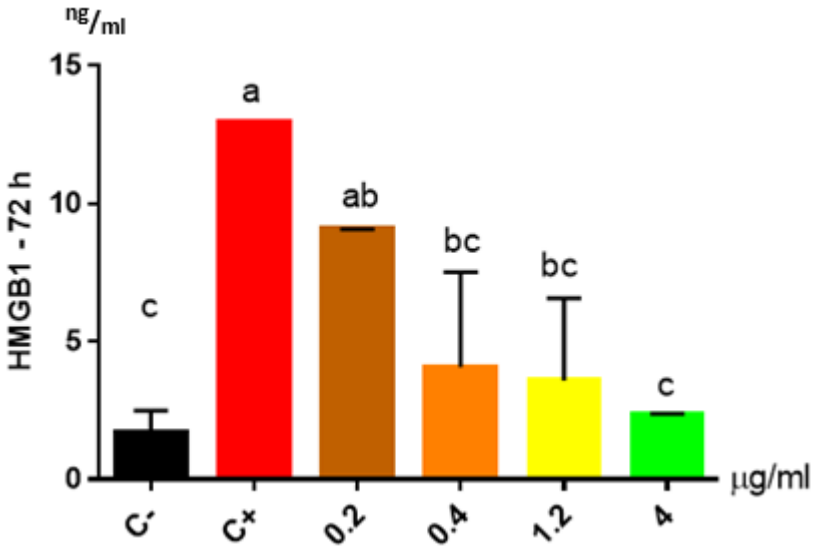


نمودار ۳- نمودار ستونی میانگین و انحراف معیار HMGB1 در گروه‌های مختلف در زمان ۴۸ ساعت، بر اساس افزایش غلظت گلیسیریزین، وجود حروف متفاوت بر روی هر ستون نشانه ارتباط معنی دار بین گروه‌ها می‌باشد (p<۰/۰۵).

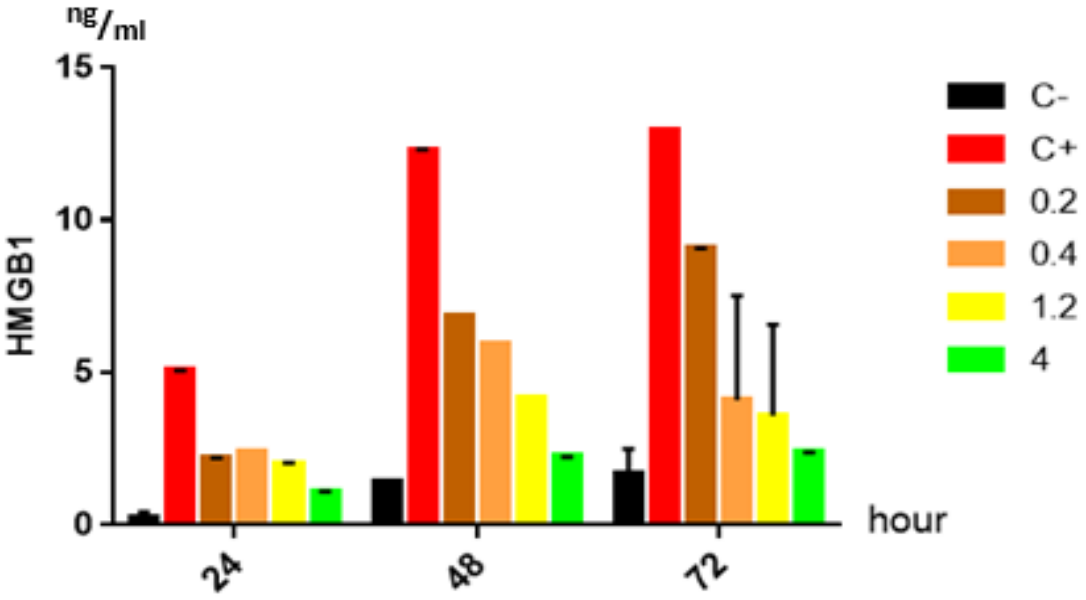


Downloaded from journal.nums.ac.ir at 18:42 IRDT on Friday April 24th 2020

نمودار۴- نمودار ستونی میانگین و انحراف معیار HMGB1 در گروه‌های مختلف در زمان ۷۲ ساعت، بر اساس افزایش غلظت گلیسیریزین، وجود حروف متفاوت بر روی هر ستون نشانه ارتباط معنی دار بین گروه‌ها می‌باشد (p<۰/۰۵).



نمودار۵- نمودار ستونی میانگین و انحراف معیار HMGB1 در گروه‌های مختلف در زمان‌های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت، بر اساس افزایش غلظت گلیسیریزین.



Downloaded from journal.nums.ac.ir at 18:42 IRDT on Friday April 24th 2020

بحث

فاکتور پیش التهابی HMGB1 بر اساس یافته‌های دیگر محققان دارای اثرگذاری بیشتر بر فرایند التهاب و سلول‌های سیستم ایمنی نسبت به سایر فاکتورهای پیش التهابی می‌باشد. انتخاب فاکتور پیش التهابی HMGB1 در این مطالعه بیش از پیش توجیه علمی دارد چراکه این پروتئین اگر به خارج از سلول ترشح شود، قابلیت به‌دست گرفتن تنظیمات مسیر التهاب را دارد. با توجه به مطالعات صورت گرفته بر روی فاکتور پیش التهابیHMGB1 ،تاکنون مطالعه این فاکتور در رده سلول‌های میکروگلیای موشی (BV-2) با دیدگاه کاهش التهاب در شرایط برون تنی با استفاده از کیت الایزا انجام نشده است.

نتیجه تحقیقات بیانچی در سال ۲۰۰۹ نشان داد که کمپلکسHMGB1 با اینترلوکین ۱ بتا فعالیت پیش التهابی قوی‌تری نسبت به اینترلوکین ۱ بتا به تنهایی دارد (۱۵). گونگ جی و همکاران در سال ۲۰۱۲ اثر محافظتی گلیسیرزین در آسیب ایسکمیک طناب نخاعی را بررسی نمودند. در این مطالعه با اعمال انسداد آئورت، موش‌های نر Sprague-Dawley دچار آسیب ایسکمیک طناب نخاعی کمری شدند. سپس نمونه‌های طناب نخاعی کمری برای ارزیابی فاکتورهای التهابی توسط ELISA ارزیابی شدند. نتایج نشان دهنده، کاهش سایتوکاین‌های التهابی و مهار آزادی HMGB1 بود (۱۶). در سال ۲۰۱۴ ژیانگ اثر حفاظتی گلیسیریزین بر روی سلول‌های التهابی پانکراس را بررسی کردند و مشخص شد که تجویز گلیسیریزین بعد از پانکراتیت تروماتیک، سبب کاهش واضح فاکتورهای التهابی و فاکتور نکروز توموری و اینترلوکین ۶ و کاهش پروتئین و بیان mRNAی HMGB1 می‌شود (۱۷)؛ از طرفی آرتور لو و همکاران اثر گلیسیریزین بر روی سلول‌های اپیتلیال توبولی کلیه (TEC) را بررسی کردند و بر اساس نتایج آن‌ها، گلیسیریزین با مهار تعامل HMGB1 با سلول‌ها مانع مرگشان می‌شود (۱۸)؛ همچنین بیر و همکاران ثابت کردند لیپوپلی ساکارید توسط افزایش بیان mRNA مارکرهای التهابی فاکتور نکروز توموری، نیتریک اکساید سنتاز القایی، اینترلوکین ۱و۶ و فعال شدن شدیدی سلول‌های گلیال سبب تحریک حذف نورون‌های دوپامینرژیک در جسم سیاه می‌شود (۱۹). شن ال و همکاران اثر حفاظتی گلیسیریزین را در موش با ۳۰٪ سوختگی سطح کلی بدن بررسی کردند و نشان دادند که تزریق داخل صفاقی گلیسیریزین بعد از سوختگی سبب کاهش سطح بیان mRNA و پروتئین HMGB1 در سلول‌های ارگان‌های داخلی بدن می‌شود (۲۰). لی من و همکاران نیز قدرت التهابی HMGB1 را توسط سلول‌های شوآن آزمایش کردند. بر اساس مطالعات آن‌ها HMGB1 برای تحریک سایتوکین‌های پیش التهابی، نیاز به ایجاد کمپلکس با لیگاندهای پیش التهابی دارد (۲۱)،

تاکور و همکاران در سال ۲۰۱۶ اثر گلیسیریزین بر روی رت‌های دیابتی شده را مورد مطالعه قرار دادند. بر اساس مطالعات آنها تجویز گلیسیریزین در شرایط هیپرگلیسمیک موجب کاهش بیان HMGB1 و TLR4 و فاکتور هسته‌ای κB (NF-κB) شده، که مانع پیشرفت بیماری کلیوی دیابتیک می‌شود (۲۲). در سال ۲۰۱۶ شیونگ و همکاران اثر حفاظتی گلیسریزین در سکته مغزی را مورد مطالعه قرار دادند. یافته‌های آن‌ها نشان داد که گلیسیریزین توسط مهار آزادی HMGB1، مانع عملکرد سلول‌های T شده، در نتیجه گلیسیریزین سبب کاهش التهاب عصبی می‌شود (۲۳). چن و همکاران در سال ۲۰۱۷ اثر ضد التهابی گلیسیریزین بر روی موش‌ها با کولیت القا شده را بررسی کردند. این مطالعه نشان داد که گلیسیریزین سبب کاهش تولید مدیاتورهای التهابی اینترفرون گاما و اینترلوکین ۶ و HMGB1 شده. نهایتاً حذف HMGB1 سبب سرکوب تکثیر TH-17 در کولیت القایی می‌شود (۲۴). بلوسی و همکاران نیز در سال ۲۰۱۷ اثر ضد التهابی گلیسیریزین را بر روی بیماران مبتلا به التهاب مزمن راه‌های هوایی بالایی بررسی کردند. نتایج نشان داد که گلیسیریزین مهمترین آنتی بادی ضد HMGB1 بوده، که مانع

Downloaded from journal.nums.ac.ir at 18:42 IRDT on Friday April 24th 2020

گسترش فرآیندهای التهابی در گوش میانی می‌شود (۲۵). فنگ ژاو و همکاران در سال ۲۰۱۷ اثر محافظتی گلیسیریزین در رت با سپسیس القا شده را مورد بررسی قرار دادند. نتایج آن‌ها نشان داد که گلیسیریزین توسط مهار تعامل HMGB1 با رسپتورهای RAGE و TLR4 ، سبب سرکوب مسیر التهابی فاکتور هسته‌ای κB می‌شود (۲۶). هونگ ژنگ و همکاران در سال ۲۰۱۷ اثر محافظتی گلیسیریزین در موش‌های دیابتی شده را مورد بررسی قرار دادند. طبق مطالعات آن‌ها گلیسیریزین سبب کاهش فاکتورهای التهابی فاکتور نکروز توموری و اینترلوکین‌های ۱ و ۶ و HMGB1 و مهار بیان RAGE و TLR4 می‌شود (۲۷).

اوکوما و همکاران در سال ۲۰۱۷ نشان دادند گلیسیریزین با باند شدن به HMGB1 مانع اتصال آن به رسپتور RAGE می‌شود. تجویز داخل وریدی گلیسیریزین بعد از ترومای مغزی مانع افزایش نفوذ پذیری سد خونی – مغزی و نقص عملکردهای حرکتی می‌شود. این اثرات مفید گلیسیریزین به‌دلیل کاهش بیان فاکتور نکروز توموری و اینترلوکین ۱ و ۶ می‌باشد (۲۸). گو و همکاران در سال ۲۰۱۸ اثر درمانی گلیسیریزین در آسیب مغزی تروماتیک (TBI) را بررسی کردند. یافته‌های آن‌ها نشان داد که گلیسیریزین توسط سرکوب فعالیت فنوتیپ M1 و تقویت فنوتیپ M2 میکروگلیاها موجب مهار آزادی و بیان HMGB1 بعد از TBI شده، سبب بازیابی عملکرد نورولوژیکی و کاهش ناحیه آسیب دیده می‌شود (۲۹). آنجلوپلی و همکاران نیز در سال ۲۰۱۸ اثر محافظتی گلیسیریزین درمدل حیوانی پارکینسون را مورد مطالعه قرار دادند. بر اساس یافته‌های آن‌ها گلیسیریزین به‌عنوان آنتی بادی ضد HMGB1، تخریب عصبی در بیماری پارکینسون را مهار می‌کند (۳۰). در تحقیقات قبلی نویسندگان این مقاله در سال‌های ۲۰۱۷ و ۲۰۱۸، اثر گلیسریزین ریشه گیاه شیرین بیان بر روی میزان میزان نیتریک اکساید (۳۱)، اینترلوکین ۶ (۳۲)، اینترلوکین۱بتا (۳۳) و میزان فاکتور نکروز توموری آلفا (۳۴) تولیدی از سلول‌های BV-2 تحریک شده با LPS مورد مطالعه قرار گرفته و کاهش میزان آن‌ها در غلظت‌های بالای گلیسیریزین ثبت و تایید شده است. با توجه به مطالعات پیشین، ماده گلیسیریزین اثر قطعی در کاهش التهاب دارد، به این صورت که در مطالعه شن و همکاران با تزریق داخل صفاقی در وضعیت سوختگی از طریق انتشار وسیع در ارگان‌های داخلی اثر ضد التهابیش به‌صورت گسترده اعمال می‌شود. در سلول‌های ملتهب پانکراسی در مطالعه ژیانگ و همکاران و در سلول‌های کلیویِ رت‌های دیابتی شده در مطالعه تاکور و همکاران و در سلول‌های مغزی در مطالعه شیونگ و همکاران، گلیسیریزین با مهار آزادی فاکتورهای التهابی به ویژه فاکتور پیش التهابی HMGB1 سبب سرکوب شرایط التهابی می‌شود. همچنین در سلول‌های اپیتلیال توبولی کلیه در مطالعه آرتور لو و همکاران و در رت‌های با سپسیس القا شده در مطالعه فنگ ژاو و همکاران و تجویز داخل وریدی بعد از ترومای مغزی در مطالعه اوکوما و همکاران گلیسیریزین از طریق مهار تعامل HMGB1 با رسپتورهای مخصوص (TLR-4 و RAGE) مانع گسترش التهاب می‌شود.

در آزمایشات انجام شده در این مطالعه، گلیسیریزین فاکتور پیش التهابی HMGB1 در مایع رویی سلول‌های ملتهب میکروگلیای موشی را کاهش داده است، بر این اساس می‌توان این فرضیه را مد نظر قرار داد که علاوه بر مهار آزادی HMGB1 از سلول‌های ملتهب و مهار تعامل HMGB1 با رسپتورهای مخصوص طبق مطالعات پیشین، گلیسیریزین این قابلیت را دارد که میزان HMGB1 را در مجاورت سلول‌های ملتهب کاهش دهد تا میزان فراخوانی سلول‌های ایمنی به محل آسیب یا به عبارتی فعالیت کموتاکتیک HMGB1 را کاهش دهد که به گونه‌ای مشابه با مطالعه بلوسی بر روی سلول‌های التهابی راه‌های هوایی فوقانی (بینی) در سال ۲۰۱۷ می‌باشد. و مطالعه گونگ جی بر روی موش‌های ایسکمی شده با استفاده از روشی مشابه با این پروژه یعنی سنجش الایزا نیز تایید نمود که تجویز داخل رگی

Downloaded from journal.nums.ac.ir at 18:42 IRDT on Friday April 24th 2020

گلیسیریزین نیز میزان سایتوکاین التهابی HMGB1 را کاهش می‌دهد. همچنین در مطالعه هونگ ژنگ گلیسیریزین علاوه بر مسیرهای ضد التهابی که ذکر شد، حتی بیان رسپتورهای مخصوص HMGB1 یعنی RAGE و TLR-4 را نیز تحت تاثیر قرار می‌دهد؛ بر این اساس می‌توان نتیجه گرفت که گلیسیریزین احتمالاً از طریق چندین مسیر درون و برون سلولی اثر ضد التهابیش را بر روی سلول‌های ملتهب اعمال می‌کند.

نتیجه گیری

در تحقیق حاضر، در شرایط آزمایشگاهی پس از ایجاد التهاب با لیپوپلی ساکارید در سلول‌های میکروگلیا BV-2، و با اندازه گیری فاکتور HMGB1، اثر ضد التهابی گلیسیریزین تا ۷۲ ساعت پس از ایجاد التهاب تایید شد و با افزایش غلظت، اثرات ضد التهابی نیز نمایان‌تر شده است، به صورتیکه در غلظت ۴ µg/ml موثرترین اثر ضد التهابی گلیسیریزین ظاهر شده است. بنابراین بر اساس مطالعه حاضر و سایر تحقیقات همسو و تحقیقات قبلی نویسنده مشخص است که گلیسیریزین به عنوان یکی از اجزای استخراج شده از ریشه گیاه شیرین بیان با اثر وابسته به دوز می‌تواند موجب کاهش التهاب در سلول‌های ملتهب میکروگلیا در شرایط برون تنی شود.

تشکر و قدردانی

این تحقیق با تصویب شورای پژوهشی دانشکده دامپزشکی دانشگاه فردوسی مشهد و با کد ۳/۴۶۰۰۶ در قالب طرح پژوهشی پایان نامه انجام شده است، بدینوسیله نویسنده مراتب تشکر و قدردانی خود را از پرسنل آزمایشگاهی دخیل در انجام مطالعه اعلام می‌دارد.

تعارض منافع

در این پژوهش تضاد منافعی برای نویسندگان وجود ندارد.

References

1. Vaez zadeh F. Iranian Slavic forms and comparison of its active ingredients. Dissertation, Faculty of Pharmacy, University of Tehran; 1342. [In Persian].
2. Isbrucker RA, Burdock GA. Risk and safety assessment on the consumption of Licorice root (Glycyrrhiza sp.), its extract and powder as a food ingredient, with emphasis on the pharmacology and toxicology of glycyrrhizin. Regul Toxicol Pharmacol. 2006 Dec 1;46(3):167-92.
3. Lesani Khoshnik. Types of Licorice Plant in Iran and their location, Dissertation, Faculty of Pharmacy University Tehran; 1341. [In Persian].
4. Fenwick GR, Lutomski J, Nieman C. Liquorice, Glycyrrhiza glabra L.—Composition, uses and analysis. Food Chem. 1990 Jan 1;38(2):119-43.
5. Fiore C, Eisenhut M, Ragazzi E, Zanchin G, Armanini D. A history of the therapeutic use of liquorice in Europe. J Ethnopharmacol. 2005 Jul 14;99(3):317-24.
6. Feng X, Ding L, Qiu F. Potential drug interactions associated with glycyrrhizin and glycyrrhetinic acid. Drug Metab Rev. 2015 May;47(2):229-38.
7. Charpe TW, Rathod VK. Extraction of glycyrrhizic acid from licorice root using ultrasound: process intensification studies. Chem. Eng. Process. 2012 Apr 30;54:37-41.
8. Asl MN, Hosseinzadeh H. Review of pharmacological effects of Glycyrrhiza sp. and its bioactive compounds. Phytother Res. 2008 Jun 1;22(6):709-24.
9. Yu JY, Ha JY, Kim KM, Jung YS, Jung JC, Oh S. Anti-inflammatory activities of licorice extract and its active compounds, glycyrrhizic acid, liquiritin and liquiritigenin, in BV2 cells and mice liver. Molecules. 2015 Jul 20;20(7):13041-54.
10. Song JH, Lee JW, Shim B, Lee CY, Choi S, Kang C, Sohn NW, Shin JW. Glycyrrhizin alleviates neuroinflammation and memory deficit induced by systemic lipopolysaccharide treatment in mice. Molecules. 2013 Dec 17;18(12):15788-803.
11. Kang R, Chen R, Zhang Q, Hou W, Wu S, Cao L, et al. HMGB1 in health and disease. Mol Aspects Med. 2014 .40:1-116.
12. Reeves R. Nuclear functions of the HMG proteins. Biochim Biophys Acta *Gene* Regul Mech. 2010 .1799(1):3-14.

Downloaded from journal.nums.ac.ir at 18:42 IRDT on Friday April 24th 2020

13. Scaffidi P, Misteli T, Bianchi ME. Release of chromatin protein HMGB1 by necrotic cells triggers inflammation. Nature. 2002 Jul 11;418(6894):191-5.
14. Antoine DJ, Jenkins RE, Dear JW, Williams DP et al. Molecular forms of HMGB1 and keratin-18 as mechanistic biomarkers for mode of cell death and prognosis during clinical acetaminophen hepatotoxicity. J Hepatol. 2012 May;56(5):1070-9.
15. Bianchi ME. HMGB1 loves company. J Leukoc Biol. 2009;86(3):573-6.
16. Gong G, Yuan L-b, Hu L, Wu W, Yin L, Hou J-l, et al. Glycyrrhizin attenuates rat ischemic spinal cord injury by suppressing inflammatory cytokines and HMGB1. Acta Pharmacol. Sin. 2012 .33(1):11.
17. Xiang K, Cheng L, Luo Z, Ren J, Tian F, Tang L, et al. Glycyrrhizin suppresses the expressions of HMGB1 and relieves the severity of traumatic pancreatitis in rats. PloS one. 2014.9(12):e115982.
18. Lau A, Wang S, Liu W, Haig A, Zhang Z-X, Jevnikar AM. Glycyrrhizic acid ameliorates HMGB1-mediated cell death and inflammation after renal ischemia reperfusion injury. Am J Nephrol. 2014.40(1):84-95.
19. Beier EE, Neal M, Alam G, Edler M, Wu L-J, Richardson JR. Alternative microglial activation is associated with cessation of progressive dopamine neuron loss in mice systemically administered lipopolysaccharide. Neurobiol Dis. 2017.:115-27.
20. Shen L, Cui Z, Lin Y, Wang S, Zheng D, Tan Q. Anti-inflammative effect of glycyrrhizin on rat thermal injury via inhibition of high-mobility group box 1 protein. Burns.41(2):372-8.
21. Man L-l, Liu F, Wang Y-j, Song H-h, Xu H-b, Zhu Z-w, et al. The HMGB1 signaling pathway activates the inflammatory response in Schwann cells. Neural Regen. Res. 2015. 10(10):1706.
22. Thakur V, Nargis S, Gonzalez M, Pradhan S, Terreros D, Chattopadhyay M. Role of Glycyrrhizin in the Reduction of Inflammation in Diabetic Kidney Disease. Nephron. 2017 .137(2):137-47.
23. Xiong X, Gu L, Wang Y, Luo Y, Zhang H, Lee J, et al. Glycyrrhizin protects against focal cerebral ischemia via inhibition of T cell activity and HMGB1-mediated mechanisms. J NEUROINFLAMM. 2016 .13(1):241.
24. Chen X, Fang D, Li L, Chen L, Li Q, Gong F, et al. Glycyrrhizin ameliorates experimental colitis through attenuating interleukin-17-producing T cell responses via regulating antigen-presenting cells. Immunol res. 2017 .65(3):666-80.
25. Bellussi LM, Vindigni C, Cocca S, Butorano MAGM, Livi W, Corallo G, et al. High-mobility group box protein 1 expression in inflammatory diseases of the middle ear. Int J Immunopathol Pharmacol. 2017 .30(2):168-73.
26. Zhao F, Fang Y, Deng S, Li X, Zhou Y, Gong Y, et al. Glycyrrhizin protects rats from sepsis by blocking HMGB1 signaling. BioMed research international. Biomed Res Int. 2017. 9119647.
27. Zhang H, Zhang R, Chen J, Shi M, Li W, Zhang X. High Mobility Group Box1 Inhibitor Glycyrrhizic Acid Attenuates Kidney Injury in Streptozotocin-Induced Diabetic Rats. Kidney Blood Press Res. 2017 .42(5):894-904.
28. Okuma Y, Liu K, Wake H, Liu R, Nishimura Y, Hui Z, et al. Glycyrrhizin inhibits traumatic brain injury by reducing HMGB1-RAGE interaction. Neuropharmacology. 2014 .85:18-26.
29. Gao T, Chen Z, Chen H, Yuan H, Wang Y, Peng X, et al. Inhibition of HMGB1 mediates neuroprotection of traumatic brain injury by modulating the microglia/macrophage polarization. Biochem Biophys Res Commun. 497(1):430-6.
30. Angelopoulou E, Piperi C, Papavassiliou AG. High-mobility Group Box 1 in Parkinson's disease: from pathogenesis to therapeutic approaches. **J** NEUROCHEM. 2018. 146(3):211-218.
31. Rafiei N, Hamidi F, Mohebalian H. Effects of Glycyrrhizin Component of Licorice on NO Production by Lipopolyssacharide- induced Microglial cell line, BV-2. The national Conference on Herbal Drugs in Veterinary Medicine. 2017. [In Persian]
32. Aghighi O, Hamidi F, Mohebalian H. Effects of Glycyrrhizin Component of Licorice on IL-6 Production by Lipopolyssacharide- stimulated Microglial cell line, BV-2. The International Conference on Agricultural Science Medicinal Plants Traditional Medicine. 2018. [In Persian]
33. Dehghani K, Hamidi F, Mohebalian H. Effects of Glycyrrhizin Component of Licorice on IL-1β Production by Lipopolyssacharide-stimulated Microglial cell line, BV-2. The International Conference on Agricultural Science Medicinal Plants Traditional Medicine. 2018. [In Persian]
34. Azarakhsh M, Hamidi F, Mohebalian H. P13: Anti-Inflammatory Effect of Glycyrrhizin on TNF-α Produced by Inflamed Microglia Cell (BV-2). Neurosci J Shefaye Khatam. 2018; 6 (S1) :44-44.

Journal of Neyshabur University of Medical Sciences

www.journalnums.ac.ir

Amount of High Mobility Group Box protein-1Produced by Inflamed Microgelial cell line, BV-2, Under the Effect of Glycyrrhizin Component of Glycyrrhiza glabra (Licorice)

Akram Aminian[1], Farshid Hamidi[*1], Hadi Mohebalian[2]

1- Department of Basic Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran
2- Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran

Downloaded from journal.nums.ac.ir at 18:42 IRDT on Friday April 24th 2020

Type of Article

Received: 13 May 2019
Accepted: 1 September 2019

***Corresponding Author:**
Farshid Hamidi,
Department of Basic Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran.
TEL: 05138805599
Email:
Farshidhamidi@um.ac.ir

A B S T R A C T

Introduction
Glycyrrhiza glabra is a plant used in traditional medicine across the world for its pharmacological value. Its value has been proved such as anti-cough, anti-diabetes, anti-microbial, and antioxidant effects.

Materials and Methods
In this study, the effect of a glycyrrhizin component of HMGB1's microglia product becomes in the survey, in terms of informative meditating on in vitro modeling that have six groups (with three replications). In the negative control group, no Gly and LPS were involved. In the positive control group, the cells were induced with LPS and no Gly, and in 3, 4, 5 and 6 groups 0.2, 0.4, 1.2 and 4 µg/ml Gly were added respectively. The amounts of HMGB1 were measured at 24, 48 and 72 hours with the sandwich ELISA kit.

Results
At all three times, the HMGB1 was decreased with increasing Gly, but in 24 h between 0.2 and 1.2 concentrations and in 72 h between positive control and 0.2 no significant difference was found. So it is concluded that this amount should be increased for the effective dose.

Conclusion
Along with previous studies, Glycyrrhizin reduced the production of HMGB1 in the microglial cell line.

Keywords
Glycyrrhiza glabra, HMGB1 protein, glycyrrhizin, Microglial cell

► ***Please cite this article as:*** Aminian A, Hamidi F, Mohebalian H. Amount of High Mobility Group Box protein-1Produced by Inflamed Microgelial cell line, BV-2, Under the Effect of Glycyrrhizin Component of Glycyrrhiza glabra (Licorice). J Neyshabur Univ Med Sci 2020;7(4):31-42.