# بررسی اثر عصاره‌ی گیاهی برگ انجیر بر فعالیت ماتریکس متالوپروتئینازهای (MMPs) در کشت سلول‌های فیبروبلاست (HEP2)

ناهید اطیابی[۱*]، گلشاد نیکنام[۲]، سیدمهدی نصیری[۳] و محمد طاهری[۲]

تاریخ دریافت: ۹۴/۹/۲۹ تاریخ پذیرش: ۹۵/۳/۳


## چکیده

هدف از این مطالعه، بررسی اثر مهاری عصاره‌ی برگ انجیر (*Ficus Carica*) بر فعالیت ماتریکس متالوپروتئینازها و در نتیجه ممانعت از تکثیر و متاستاز سلول‌های توموری، در کشت سلول فیبروبلاست (HEP2) است. به این منظور، عصاره‌ی برگ انجیر به سه شکل آبی، آبی - الکلی و الکلی تهیه شد. با استفاده از پلیت‌های ۲۴ خانه‌ای کشت سلول حاوی رده‌ی سلولی فوق، به ترتیب مقادیر ۵ µl عصاره‌ی آبی (غلظت نهایی ۰/۵ درصد)، ۱۰ µl عصاره‌ی آبی (غلظت نهایی ۱ درصد)، ۵ µl عصاره‌ی آبی – الکلی (غلظت نهایی ۰/۵ درصد)، ۱۰ µl عصاره‌ی آبی – الکلی (غلظت نهایی ۱ درصد)، ۱ µl عصاره‌ی الکلی (غلظت نهایی ۰/۱ درصد) و ۵ µl عصاره‌ی الکلی (غلظت نهایی ۰/۵ درصد) اضافه شد. برای هر گوده، یک گوده کنترل، با محتویات مشابه گوده تست اما فاقد عصاره، در نظر گرفته شد. سپس پلیت‌ها در گرمخانه کشت سلول گذاشته شدند و اثرات عصاره پس از گذشت ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت، با استفاده از روش رنگ‌آمیزی تریپان بلو برای مشاهده سیتوتوکسیسیتی و روش زایموگرافی ژلاتین برای دیدن باندهای هضمی، مورد بررسی قرار گرفتند. نتایج به دست آمده در بررسی با میکروسکوپ معکوس، نشان داد، عصاره‌ی الکلی به میزان ۵ و ۱ میکرولیتر به ترتیب پس از ۲۴ و ۴۸ ساعت به طور کامل موجب مرگ سلولی گردید. پس از گذشت ۷۲ ساعت، مقدار ۱۰ µl از عصاره‌ی آبی- الکلی برگ انجیر نیز، باعث مرگ سلول-ها شد. در بررسی فعالیت آنزیم‌ها به روش زایموگرافی، در تمامی گوده‌های تست، اثر مهاری عصاره‌ی برگ انجیر بر فعالیت ماتریکس متالوپروتئینازها مشاهده شد. از طرفی در تمامی گوده‌های کنترل باند هضمی ایجاد شده با مقایسه با مارکر استاندارد مورد استفاده، وزن مولکولی MMP9 را نشان می‌داد. این بررسی اثر مهاری عصاره‌ی برگ انجیر بر فعالیت ماتریکس متالوپروتئینازها را تأیید می-کند. از این رو، توصیه می‌شود با استفاده از روش‌های مولکولی در کنار زایموگرافی و انجام مطالعات بالینی، به بررسی بیش‌تر اثر عصاره‌ی این گیاه بر انواع متالوپروتئینازها به طور جداگانه پرداخته شود.


**کلمات کلیدی:** متالوپروتئینازها، فیبروبلاست، عصاره‌ی برگ انجیر، زایموگرافی، سیتوتوکسیسیتی

## مقدمه

ماتریکس متالوپروتئینازها[۱] (MMPs) خانواده‌ای از آنزیم‌های دارای فعالیت پروتئازی هستند که خود زیرمجموعه‌ی خانواده‌ی بزرگتری از پروتئازها، به نام فوق خانواده مت‌زینسن[۲] می‌باشند. MMPs ها علاوه بر تجزیه‌ی پروتئین‌های ماتریکس خارج سلولی، شامل کلاژن، ژلاتین، الاستین و کازئین، در پردازش مولکول‌های فعال زیستی، گیرنده‌های سطح سلول، آزاد کردن لیگاندهای اپوپتوز و غیرفعال کردن کموکاین‌ها و

[۱*] استاد گروه بیماری‌های داخلی، دانشکده‌ی دامپزشکی، دانشگاه تهران (نویسنده‌ی مسئول) E-mail: natyabi@ut.ac.ir
[۲] دانش‌آموخته‌ی دکترای حرفه‌ای، دانشکده‌ی دامپزشکی، دانشگاه تهران
[۳] دانشیار گروه بیماری‌های داخلی، دانشکده‌ی دامپزشکی، دانشگاه تهران
[۴] کارشناس آزمایشگاه مرکزی، دانشکده‌ی دامپزشکی، دانشگاه تهران

1- Matrix metalloproteinases (MMPs)
2- Metzincin

سیتوکاین‌ها، دارای نقش شناخته شده هستند ( Libert and Van lint 2007) ماتریکس متالوپروتئینازها نقش مهمی در بازسازی بافت‌های مرتبط با فرایندهای مختلف فیزیولوژیک یا پاتولوژیک مانند ریخت‌زایی، رگ‌زایی، ترمیم بافت و متاستاز ایفا می‌کنند . علاوه بر این، ماتریکس متالوپروتئینازها در روند استئوآرتریت نقش فعال دارند (Lee et al. 2003 ) نقش فعال ماتریکس متالوپروتئینازها در بیماری‌زایی آنوریسم آئورت عنوان شده است که مقادیر زیاد این آنزیم‌ها باعث تخریب ساختار پروتئین‌های دیواره‌ی آئورت می‌گردد. علاوه بر این، به هم خوردن تعادل بین مقدار این آنزیم‌ها و مهارکننده‌های آن‌ها از نشانه‌های بیماری‌های حاد و مزمن قلبی – عروقی می‌باشد ( Snoek-van Beurden and Von den Hoff 2005).

MMPs ها با تجزیه‌ی پروتئین‌های ماتریکس خارج سلولی سبب متازتاز تومورها شده و یا شرایط محیطی مناسب برای تحریک پرولیفراسیون سلول‌ها و ایجاد تومور اولیه را فراهم می‌کنند ( Chambers and Matrisian 1997).

از طرفی مطالعات دیگر نشان داده‌اند که پرولیفراسیون سلول‌های توموری تهاجمی، با افزایش تولید انواع ماتریکس متالوپروتئینازهای استرومال تشدید می‌گردد و در این شرایط متاستاز سلول‌های توموری نیز آسان‌تر انجام می‌گیرد ( Deryugina and Quigley 2006, Egeblad and Werb 2002, John and Tuszynski 2001).

گزارش شده است که مقادیر MMP1، MMP2 و MMP9 در تومور سرویکس رحم افزایش می‌یابند، به ویژه MMP9 که با اثر ساپرسیون بر اینترلوکین۲ (IL2) و در نتیجه سلول‌های لنفوسیت T، نقش مهمی در پرولیفراسیون سلول‌های توموری ایفا می‌کند ( Sheu et al. 2001) . با اطلاعاتی که از MMPs های مترشحه از استروما و نقش واکنشی آن‌ها بین سلول‌های توموری و سلول‌های استرومال وجود دارد، دریچه‌ای به روی درمان اختصاصی سرطان‌ها با استفاده از فعال کردن ممانعت کننده‌های ماتریکس متالوپروتئینازها به وجود آمده است که شاید ارزش درمانی بالایی داشته باشد ( Jodele et al. 2006).

امروزه در علم پزشکی، مطالعات متعددی در زمینه‌ی شناسایی ترکیبات و خواص درمانی گیاهان دارویی و استفاده از آن‌ها به جای داروهای شیمیایی به عنوان جانشین مناسب، کم خطر و بهینه از نظر اقتصادی، صورت گرفته است. Mozaffarian در ۲۰۱۲ با مطالعه بر گیاهان طبی اظهار کردند که انجیر از گیاهانی است که قسمت‌های مختلف آن از بعد پزشکی حائز اهمیت بوده و در طب سنتی ایران نیز از آن به فراوانی استفاده شده است. به طوری که پماد خمیر انجیر دارای اثر رفع التهاب در تومورها بوده ودر جلوگیری از ابتلا به سرطان کاربرد داشته است و نیز از خواص ضدباکتریال و ضدقارچی آن به فراوانی استفاده می‌شده است.

گزارش شده است که شیرابه و عصاره‌ی گونه‌های مختلف انجیر دارای اثر سیتوتوکسیسیتی بر رده‌ی سلول‌های سرطانی انسانی هستند. این دانشمندان اثر سیتوتوکسیسیتی عصاره‌ی اتانولی میوه و برگ انجیر گونه‌ی *فیکوس کارینا* را بر رده‌ی سلولی انسانی Hela بررسی و مرگ سلولی را در غلظت‌های مختلف عصاره‌ی این گیاه گزارش کردند (Khodarahmi et al. 2011).

Rubnov و همکاران ۲۰۰۱، گزارش کردند که ترکیبات آسیل شیرابه‌ی انجیر *فیکوس کارینا* و لوبیای سویا، اثر سیتوتوکسیسیتی بسیار قوی و اثر مهار کنندگی بر پرولیفراسیون انواع رده‌ی سلول‌های توموری دارند.

گزارش شده که شیرابه‌ی درخت انجیر فیکوس کارینارا را در غلظت ۱۰ mg/ml، ماده‌ای مؤثر برای مهار تولید و تکثیر رده‌ی سلول‌های توموری معرفی کردند (Hashemi and Abediankenari 2013).

انجیر[1] با نام علمی *فیکوس کارینا*[2]، میوه‌ای مغذی و مطبوع بوده و منبع غنی از بتاکاروتن و ویتامین‌ها است. انجیر علاوه بر مواد قندی، مواد ازته پروتئینی و مواد چربی، دارای ماده‌ی شیمیایی به نام پسورالن[3] یا فیکوزین[4] است. پسورالن در اتر به حالت متبلور در می‌آید و در دمای ۱۶۳ تا ۱۶۴ درجه ذوب می‌شود. با توجه به افزایش روزافزون ابتلا به سرطان تحت تأثیر زندگی صنعتی امروزی در گروه‌های مختلف سنی و هزینه‌ی زیاد و محدودیت‌های درمان شیمیایی آن‌ها، همچنین اهمیت دارویی، غذایی و صنعتی ویژه‌ای که گیاهان دارویی مختلف برای بشر دارند، بررسی ترکیبات اجزای مختلف گیاهانی مانند انجیر و بهره‌برداری از ترکیبات مهم موجود در آن‌ها اهمیت ویژه‌ای می‌یابد. به خصوص این که اثرات ضد توموری این گیاه در تحقیقات فوق گزارش شده است و گیاه انجیر را، به ویژه شیرابه‌ی درخت، میوه و برگ آن را از بعد پزشکی حائز اهمیت کرده است.

بنابراین هدف از مطالعه‌ی حاضر استفاده از عصاره‌ی برگ انجیر در محیط کشت سلولی فیبروبلاست و بررسی تأثیر انواع عصاره‌ی آبی، آبی – الکلی و الکلی برگ این گیاه بر ماتریکس متالوپروتئینازهای مترشحه در محیط کشت سلولی بوده است. نتایج این مطالعه می‌تواند بیان‌گر اثرات عصاره‌ی برگ انجیر در ممانعت از افزایش فعالیت ماتریکس متالوپروتئینازها و پیش‌گیری از متاستاز سلول‌های توموری و یا ممانعت از تشدید پرولیفراسیون تومورهای بدخیم باشد.

## مواد و روش کار

عصاره‌ی برگ انجیر خشک به روش ماسراسیون[5] و طبق روش‌های عصاره‌گیری از گیاهان مؤسسه‌ی استاندارد ایران، تهیه شد (Samsam 1992). روش کار با حلال-های مختلف به شرح زیر است:

۱- تهیه‌ی عصاره‌ی آبی برگ انجیر: در این روش یک گرم از پودر برگ انجیر با ۱۰ml آب مقطر استریل تزریقی مخلوط و داخل یک فالکون به حجم ۱۵ml ریخته شد (دور این فالکون، جهت برقراری شرایط تاریکی و جلوگیری از اثر نور بر مخلوط، فویل آلومینیومی پوشانده شد). این مخلوط ۷۲ ساعت در دمای آزمایشگاه قرار گرفت، در طی این مدت، مخلوط روزی سه بار به خوبی هم زده شد. پس از ۷۲ ساعت، مخلوط مذکور به مدت پنج دقیقه در ۴۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ شد، محلول رویی به عنوان عصاره‌ی آبی برگ انجیر برداشت و به وسیله‌ی تبخیر چرخشی[6] در دمای ۴۰ درجه‌ی سانتی‌گراد تغلیظ شد؛ عصاره‌ی حاصل جهت از دست دادن کامل حلال به مدت ۲۴ ساعت در دمای آزمایشگاه قرار گرفت. سپس ۱۰mg از این عصاره‌ی جامد جهت تهیه‌ی عصاره‌ی مایع، در ۱ml آب مقطر حل شد (غلظت ۱۰μg در ۱μl یا یک در صد). پس از آن، عصاره‌ی مذکور در ویال‌های ۲ml ریخته و در دمای منفی ۲۰ درجه‌ی سانتی‌گراد منجمد گردید.

۲- تهیه‌ی عصاره‌ی آبی – الکلی برگ انجیر: در این روش یک گرم از پودر برگ انجیر با ۱۰ml اتانول ۷۰ درصد مرک مخلوط شد (اتانول ۷۰ درصد با استفاده از اتانول ۹۶ درجه و آب مقطر ساخته شد) و ۷۲ ساعت در شرایط تاریکی و در دمای آزمایشگاه مطابق روش بالا سانتریفیوژ شد و محلول رویی به عنوان عصاره‌ی آبی – الکی برگ انجیر برداشت و پس از تغلیظ با تبخیر چرخشی و از دست دادن کامل حلال، ۱۰mg از این عصاره‌ی جامد جهت تهیه‌ی عصاره‌ی مایع، در ۱ml الکل ۷۰ درصد حل شد؛ (غلظت ۱۰μg در ۱μl یا یک درصد). پس از آن، عصاره‌ی مذکور در ویال‌های یک و نیم سی‌سی

1- Fig
2- *Ficus carica*
3- Psoralen
4- Ficusin
5- Maceration
6- Rotary evaporatin

ریخته و در دمای منفی ۲۰ درجه‌ی سانتی‌گراد نگهداری شد.

۳- تهیه‌ی عصاره‌ی الکلی برگ انجیر : در این روش میزان یک گرم از پودر برگ انجیر با ۱۰ml اتانول ۹۶ درصد مرک مخلوط شد و سپس به مدت ۷۲ ساعت تا یک هفته در شرایط تاریکی و در دمای آزمایشگاه، مطابق روش بالا سانتریفیوژ شد و ۵۰ml از محلول رویی جهت تبخیر چرخشی برداشت شد و در دمای ۴۰ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت نیم ساعت تبخیر الکل صورت گرفت. پس از تبخیر الکل عصاره به صورت رسوبات سبز رنگ نامحلول در آب باقی ماند. این مخلوط به دست آمده در دمای اتاق خشک شد تا فاز آب نیز جدا شود (در این بررسی پس از گذشت ۲۴ تا ۴۸ ساعت بخش آبی مخلوط، خشک شد). سپس ۱۰mg از این عصاره‌ی جامد جهت تهیه‌ی عصاره‌ی مایع، در ۱ml DMSO[1] حل شد (غلظت ۱۰µg در ۱µl یا یک درصد). پس از آن، عصاره‌ی مذکور در ویال‌های ۲ml ریخته و در دمای منفی ۲۰ درجه‌ی سانتی‌گراد نگهداری شد.

سلول فیبروبلاست انسانی با منشاء سلول‌های اپی‌تلیال[2] (HEP2) از سل لاین تهیه شده در موسسه‌ی رویان تهران، در فلاسک‌های کشت سلول DMEM[3]، حاوی ۵ درصد سرم جنین گاوی FBS[4] به مدت ۵ روز تا یک هفته کشت کشت داده شد. سلول‌ها پس از سه بار پاساژ و رسیدن سلول‌ها به تعداد مورد نیاز $2\times10^5$/ml، به مقدار ۱ml در ۱۴ خانه پلیت ۲۴ خانه‌ای مخصوص کشت سلول، به همراه مواد زیر کشت داده شدند:

۱- یک میلی‌لیتر از محیط کشت DMEM حاوی ۵ درصد سرم جنین گاوی FBS

۲- ال-گلوتامین ۲ میلی‌مولار

۳- آنتی‌بیوتیک پنی‌سیلین به میزان ۱۰۰ U/ml

۴- آنتی‌بیوتیک استرپتومایسین به میزان ۱۰۰ µg /ml

۵- ضدقارچ آمفوتریسین B به میزان ۰/۲۵ µg

در هر سری آزمایش، حداقل ۳ سری پلیت مشابه گذاشته می‌شد. تا صحت آزمایش‌ها تایید شوند. پلیت‌ها به مدت ۴۸ ساعت در گرمخانه کشت سلول با شرایط دمایی ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد، حاوی ۵ درصد دی-اکسیدکربن قرار داده شدند. هر ۲۴ ساعت یک بار شمارش سلولی و وضعیت زنده بودن سلول‌ها با رنگ-آمیزی تریپان بلو و استفاده از میکروسکوپ بررسی می-شد. چنانچه سلول‌ها تا ۹۸ درصد زنده و سالم بودند آزمایش ادامه می‌یافت. پس از گذشت ۴۸ ساعت که سلول‌ها ۵۰ درصد کف پلیت را پر کرده بودند (با استفاده از میکروسکوپ معکوس)، پلیت‌های کشت سلول سه بار با محلول نمکی بافر فسفات PBS شست و شو داده شدند. پس از آن به میزان ۱ml محیط کشت DMEM فاقد سرم به هر گوده از ۱۴ گوده پلیت اضافه گشت.

سپس به دو گوده‌ی اول عصاره‌ی آبی برگ انجیر به میزان ۵µl و ۱۰µl اضافه گردید. دو گوده‌ی کنترل نیز برای هر یک از آن‌ها در نظر گرفته شد که حاوی ۱ml محیط کشت فاقد سرم بودند و به آن‌ها به جای عصاره‌ی آبی برگ انجیر، ۵µl و ۱۰µl آب مقطر استریل به عنوان ماده‌ی بی اثر تلقیح شد (در جمع ۴ گوده برای عصاره‌ی آبی).

به دو گوده‌ی بعدی، به ترتیب ۵µl و ۱۰µl عصاره‌ی آبی - الکلی برگ انجیر اضافه شد. برای این گوده‌ها نیز دو گوده کنترل حاوی ۱ml محیط کشت فاقد سرم و به ترتیب به میزان ۵µl و ۱۰µl الکل ۷۰ درصد به عنوان ماده‌ی بی اثر اضافه شد (در جمع ۴ گوده برای عصاره‌ی آبی- الکلی).

به دو گوده‌ی نهایی به میزان ۵µl و ۱µl عصاره‌ی الکلی برگ انجیر اضافه گردید. برای این دو گوده نیز، دو گوده‌ی کنترل حاوی ۱ml محیط کشت فاقد سرم به همراه DMSO (به عنوان ماده‌ی بی اثر) به میزان ۵µl و ۱µl در نظر گرفته شد (در جمع ۴ گوده برای عصاره‌ی الکلی).

1- Dimethyle sulfoxide
2- Human Epithelial cell
3- Dulbecco"s Modified eagle Medium
4- Fetal Bovine Serum

علاوه بر این، دو گوده جهت حصول اطمینان از این که آنزیم‌های درگیر، متالوپروتئینازهای مورد نظر هستند نیز در نظر گرفته شد؛ هر دو گوده حاوی سلول و ۱ml محیط کشت فاقد سرم بودند (که در مرحله‌ی هضمی زایموگرافی، به بافر هضمی یکی از آن‌ها EDTA، افزوده شد و دیگری با بافر هضمی بدون EDTA، مورد زایموگرافی قرار گرفت). لازم به ذکر است تمامی مراحل مربوط به کشت سلول به منظور جلوگیری از آلودگی‌های احتمالی، در زیر هود لامینار انجام گردید. پس از آن، پلیت کشت سلول در گرم‌خانه کشت سلول با شرایط دمایی ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد و حاوی ۵ درصد دی-اکسیدکربن قرار داده شد.

پس از گذشت ۲۴ ساعت، پلیت‌ها به وسیله‌ی میکروسکوپ معکوس[1] مورد بررسی قرار گرفتند. تا سلول‌های زنده، سالم و نرمال را با سلول‌هایی که دچار مرگ سلولی شده بودند تشخیص داده شوند. برای تأیید وضعیت سلامت یا مرگ سلولی از روش رنگ‌آمیزی تریپان‌بلو استفاده شد. سپس، به میزان ۰/۵ml از محیط کشت سلولی هر گوده برداشت و در ستون‌های میکروفیلتراسیون اپندورف با برش[2] معادل ۱۰KDریخته شد، سپس به مدت هشت دقیقه با سرعت ۱۳۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ شد، مقدار ۱۰µl از ماده روی فیلتر جهت زایموگرافی برداشت شد. بررسی میکروسکوپی، در ساعات ۴۸ و ۷۲ نیز تکرار شد و زایموگرافی دو بار، یکی پس از ۲۴ ساعت و دیگری پس از گذشت ۷۲ ساعت، انجام گردید.

روش رنگ‌آمیزی تریپان‌بلو: ۲۰۰µL سلول، در شرایط استریل به لوله‌ی اپندورف ۲ میلی‌لیتری منتقل و با حجم مساوی از تریپان بلو ۰/۴ درصد در محلول کلرور سدیم ۰/۸۱ درصد و PBS ۰/۰۸ درصد، به مدت ۳ دقیقه در حرارت آزمایشگاه انکوبه شد. سپس به وسیله‌ی لام نئوبار و میکروسکوپ نوری سلول‌های زنده شمارش گردیدند. میزان زنده‌مانی ۹۸ درصد مثبت تلقی می‌شد (Altman et al. 1993).

روش زایموگرافی بر ژلاتین: برای انجام این آزمایش مطابق روش Taheri در سال ۲۰۱۴، از صفحات شیشه‌ای ژل اکریل‌آمید استفاده شد؛ برای این منظور با استفاده از دستگاه الکتروفورز عمودی بیوراد[3] جهت جدا نمودن باندهای پروتئینی، از ژل متراکم کننده ۵ درصد و ژل جداکننده‌ی ۱۲ درصد استفاده شد (Taheri et al. 2014).

تهیه ژل جدا کننده: به منظور ساخت ۱۰ml ژل جداکننده‌ی ۱۲ درصد، ۳۳۰۰µl آب مقطر (که به آن به میزان ۰/۱ درصد ژلاتین اضافه شده و در دمای ۶۰ درجه-ی سانتی‌گراد حل شده بود)، ۴۰۰۰µl مخلوط اکریل آمید- بیس اکریل آمید۳۰ درصد، ۲۵۰۰ µl محلول تریس ۱/۵mM با ۸/۸ =pH، ۱۰۰µl SDS محلول ۱۰ درصد، ۵۰µl محلول ۱۰ درصد آمونیوم پرسولفات و ۵µl TEMED را با هم مخلوط نموده و در فضای بین شیشه‌ها ریخته شد. سپس روی آن، به منظور داشتن سطح صاف در ژل جداکننده، پس از پلیمریزه شدن ژل جدا کننده، آب مقطر اضافه گردید.

تهیه‌ی ژل متراکم کننده: ژل متراکم کننده ۵ درصد به صورت زیر ساخته شد: جهت ساخت ۵ml از این ژل، ۳۴۰۰µl آب مقطر، با ۸۵۰µl مخلوط اکریل آمید- بیس اکریل آمید ۳۰ درصد، ۶۲۵µl از محلول تریس یک مولار با ۶/۸=pH، ۵۰µl محلول ۱۰SDS درصد، ۲۵µl میکرولیتر محلول آمونیوم پرسولفات ۱۰ درصد، و ۵µl TEMED با هم مخلوط شد و پس از تخلیه‌ی آب مقطر روی ژل جدا کننده، در فضای باقی‌مانده‌ی بین دو شیشه اضافه گردید. سپس شانه‌ی مخصوص در داخل این ژل قرار داده شد. پس از پلیمریزه شدن ژل متراکم کننده، صفحات شیشه‌ای حاوی ژل‌های اکریل آمید، در داخل تانک زایموگرافی قرار گرفت. تانک با بافر حرکت

1- Inverted Microscope
2- Cut off
3- Biorad

زایموگرافی (شامل : ۳gr تریس، ۱۴/۴gr گلیسین، SDS۱gr در یک لیتر آب مقطر) پر شد. شانه‌ی مذکور از ژل خارج شده و نمونه‌ها در گوده‌های ایجاد شده به وسیله‌ی شانه، ریخته شد. برای آماده‌سازی نمونه‌ها ۱۰µl از سوپ کشت سلولی میکروفیلتر شده با ۱۰µl بافر نمونه‌ی زایموگرافی (۳/۵۵ml آب مقطر دیونیزه، ۱/۲۵ml تریس ۰/۵ مولار با pH=۶/۸، ۲/۵ ml گلیسرول، ۲ml SDS۱۰ درصد و ۰/۲ml برومو فنول بلو ۰/۵ درصد) مخلوط شد و پس از گذشت پنج دقیقه، ۱۲ µl از آن داخل گوده مربوطه ریخته شد.

برای تعیین وزن مولکولی باندهای به دست آمده، از مارکر پروتئینی ساخت شرکت سینا کلون، که در گوده‌ی مجزایی ریخته شد، استفاده گردید.

علاوه بر نمونه‌های مورد آزمایش، در دو گوده‌ی مجزا سرم خون انسان جهت مقایسه و عصاره‌ی آبی- الکلی برگ انجیر جهت اطمینان از عدم وجود آنزیم‌های پروتئازی در خود عصاره، ریخته شد. سپس ولتاژ دستگاه روی ۸۰ ولت تنظیم گردید و تا زمان رسیدن خط رنگ به انتهای ژل، عمل الکتروفورز ادامه یافت. پس از اتمام الکتروفورز، ژل از دستگاه خارج شد و به مدت نیم ساعت در محلول حاوی ترایتون X۱۰۰ با غلظت ۲/۵ درصد قرار گرفت تا SDS حذف شود. سپس به مدت ۱۸ ساعت در بافر انکوباسیون (تریس ۵۰mM با pH=۸، حاوی ۵mM کلسیم کلرید در ۵۰۰ml آب مقطر) قرار گرفت (این بافر برای تمام نمونه‌های زایموگرافی یکسان استفاده شد؛ اما در زایموگرافی یکی از گوده‌هایی که تنها حاوی سلول و محیط کشت، بدون هرگونه عصاره یا ماده‌ی بی اثر بودند، علاوه بر موارد فوق، به آن EDTA نیز افزوده گشت). سپس ژل رنگ‌آمیزی شد.

به منظور تهیه‌ی محلول رنگ، ۲/۵gr پودر کوماسی بلو با ۹۰۰ml متانول ۵۰ درصد و ۱۰۰ml اسید استیک گلاسیال مخلوط شد. جهت ساخت محلول رنگ بر ۳۰۰ml متانول، ۶۰۰ml آب مقطر و ۱۰۰ml اسید استیک با هم مخلوط شد. ژل را به مدت نیم ساعت در محلول رنگ قرار داده و سپس از محلول رنگ خارج کرده و در محلول رنگ‌بر قرار داده شد. باندهای مربوط به هضم ژلاتین توسط متالوپروتئینازها به صورت شفاف در زمینه‌ی آبی مشخص گردید.

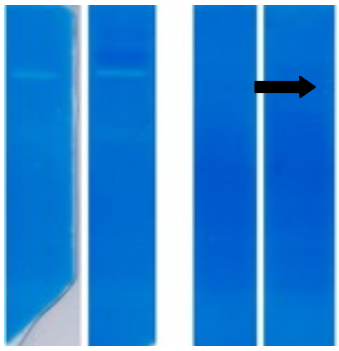
## نتایج

در بررسی و مشاهده‌ی گوده‌های کشت سلول حاوی عصاره‌های برگ انجیر، شامل عصاره‌ی آبی، آبی - الکلی و الکلی، پس از ۲۴ ساعت، با استفاده از میکروسکوپ معکوس و رنگ‌آمیزی تریپان‌بلو و بررسی سلول‌ها با میکروسکوپ نوری، سلول‌های تمام گوده‌ها تا ۹۸ درصد، سالم و نرمال بودند؛ به جز در گوده‌ی تست حاوی ۵µl عصاره‌ی الکلی برگ انجیر، که سلول‌ها به کلی از بین رفته و دچار مرگ سلولی شده بودند. در بررسی ۴۸ ساعت بعد، در تمامی گوده‌ها سلول‌های زنده و نرمال مشاهده شدند به جز گوده‌های تست حاوی ۵µl و یک ۱µl عصاره‌ی الکلی برگ انجیر. مشاهده و کنترل سلول‌ها ۷۲ ساعت بعد نیز تکرار شد که این بار علاوه بر سلول-های گوده‌های اخیر، سلول‌های گوده تست حاوی ۱۰µl عصاره‌ی آبی - الکلی برگ انجیر نیز، تماماً دچار مرگ سلولی شده بود. سلول‌های گوده‌ی تست حاوی ۵µl عصاره‌ی آبی - الکلی برگ انجیر، حتی پس از طی زمان ۷۲ ساعت تا ۹۸ درصد زنده و سالم و نرمال بودند.

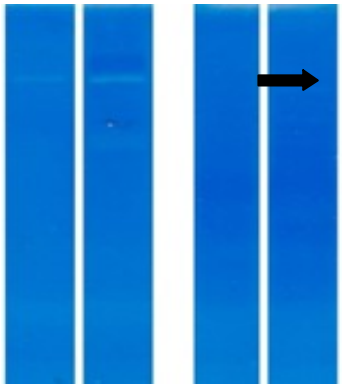
پس از زایموگرافی محیط کشت سلولی گوده‌های مذکور، نتایج زیر به دست آمد:

در گوده‌ی تست (محتوی ۱۰µl عصاره‌ی آبی برگ درخت انجیر)، پس از گذشت هر یک از زمان‌های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت، هیچ باند هضمی در زایموگرام حاصله ایجاد نشد، در گوده‌ی کنترل این تست (محتوی ۱۰µl آب مقطر، جایگزین عصاره‌ی آبی)، در زایموگرام حاصل از هر دو زمان ۲۴ و ۷۲ ساعت بعد، باند هضمی به وضوح مشاهده شد (تصویر ۱). این مشاهده نشان می‌دهد که در گوده‌های تست، عصاره‌ی برگ انجیر در غلظت فوق اثر مهاری بر MMPs های آزاد شده داشته و در نتیجه باند هضمی تشکیل نشده است.

در گوده‌ی تست ۵µl از عصاره‌ی آبی برگ درخت انجیر نیز، زایموگرام حاصل بعد از ۲۴ ساعت در بر دارنده‌ی باند هضمی پروتئین نبود. اما در زایموگرام ۷۲ ساعت بعد، باند هضمی بسیار ضعیف و باریکی نمایان شد. در گوده‌ی کنترل این تست (محتوی ۵µl آب مقطر، به جای عصاره آبی ) نتایج زایموگرافی پس از هر دو زمان، حضور باند هضمی پروتئین را نشان می‌داد (تصویر ۲).



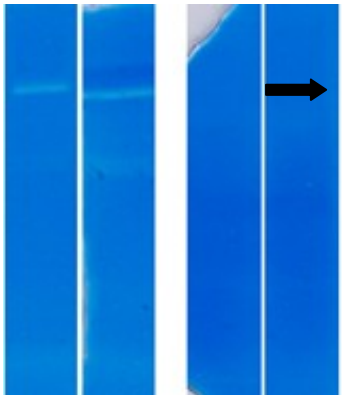
**تصویر ۱: به ترتیب از چپ به راست، زایموگرام کنترل ۲۴ و ۷۲ ساعت و نمونه تست ۱۰µl عصاره آبی برگ انجیر، پس از ۲۴ و ۷۲ ساعت**



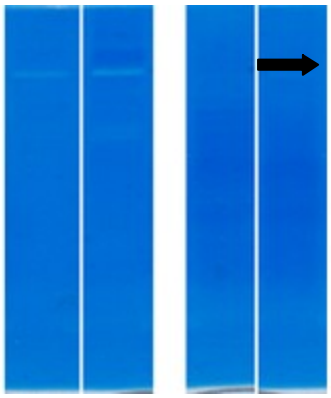
**تصویر ۲: به ترتیب از چپ به راست، زایموگرام کنترل ۲۴ و ۷۲ ساعت و نمونه تست ۵µl عصاره آبی برگ انجیر، پس از ۲۴ و ۷۲ ساعت**

در گوده‌ی حاوی ۱۰µl عصاره‌ی آبی – الکلی برگ درخت انجیر، پس از ۲۴ ساعت به دلیل اثر مهاری عصاره، در زایموگرام مربوط به آن، باند هضمی تشکیل نشد و پس از ۷۲ ساعت نیز به دلیل مرگ سلولی نتایج زایموگرافی فاقد ارزش گردید. اما در گوده‌ی کنترل این تست (شامل ۱۰µl الکل ۷۰ درصد به جای عصاره‌ی آبی– الکلی ) نتایج زایموگرافی، پس از هر دو زمان مذکور، حضور باند هضمی را نشان می‌داد (تصویر ۳).

در گوده‌ی تست حاوی ۵µl عصاره‌ی آبی – الکلی برگ درخت انجیر، نتایج زایموگرافی پس از ۲۴ هیچ باند هضمی را نشان نمی‌داد، در حالی که در زایموگرام حاصله پس از ۷۲ ساعت، باند هضمی بسیار ظریفی، تشکیل شده بود و در گوده‌ی کنترل این تست (حاوی ۵µl الکل ۷۰ درصد به جای عصاره‌ی آبی – الکلی)، پس از هر دو زمان مذکور، باند هضمی تشکیل شد (تصویر ۴).



**تصویر ۳: به ترتیب از چپ به راست، زایموگرام گوده کنترل ۲۴ و ۷۲ ساعت و نمونه تست ۱۰µl عصاره آبی– الکلی برگ انجیر پس از ۲۴ و ۷۲ ساعت**



**تصویر ۴: به ترتیب از چپ به راست، زایموگرام گوده کنترل ۲۴ و ۷۲ ساعت، و نمونه تست ۵µl عصاره آبی– الکلی برگ انجیر پس از ۲۴ و ۷۲ ساعت**

در گودهی تست حاوی ۵µl عصارهی الکلی برگ درخت انجیر، به دلیل مرگ سلولها پس از ۲۴ ساعت زایموگرافی انجام نشد، چرا که در موارد مرگ سلولها زایموگرام از ارزش تشخیصی برخوردار نخواهد بود. اما در گودهی کنترل حاوی ۵µl مادهی DMSO به جای عصارهی الکلی، در هر دو زمان ۲۴ و ۷۲ ساعت، باند هضمی پروتئین تشکیل شد.

در گودهی تست ۱µl عصارهی الکلی برگ درخت انجیر، در زایموگرام حاصل پس از ۲۴ ساعت، هیچ باند پروتئینی مشاهده نگردید. اما در ۴۸ و ۷۲ ساعت بعد، به دلیل مرگ سلولی کامل و زایموگرام به دلیل عدم برخورداری از ارزش تشخیصی، تهیه نشد. در گودهی کنترل حاوی ۱µl مادهی DMSO ، (جایگزین عصارهی الکلی)، در هر دو زمان ۲۴ و ۷۲ ساعت، باند پروتئینی تشکیل گردید.

زایموگرام گودهی عصارهی برگ انجیر، در هیچ یک از زمانهای ۲۴ و ۷۲ ساعت، دارای باند هضمی پروتئینی نبودند، این نتیجه، احتمال حضور آنزیمهای متالوپروتئازی را در خود عصاره رد میکند. در زایموگرام گوده حاوی سلول و محیط کشت بدون هیچ عصاره یا مادهی بی اثر، باندهای هضمی پروتئین، ظاهر شد. اما در زایموگرام گوده محتوی سلول و محیط کشت، بدون عصاره یا ماده-ی بی اثر، که به بافر هضمی زایموگرام آن، EDTA افزوده شده بود، هیچ باند هضمی پروتئین پدیدار نگشت. زیرا EDTA با شلاته کردن کلسیم، کوفکتور مورد نیاز فعال بودن متالوپروتئینازها را از دسترس خارج میکند و در نتیجهی اثر پروتئازی MMPs ها مهار میشود.

زایموگرام حاصل از گودهی محتوی سرم انسان، دارای باندهایی بود که نشان دهندهی حضور متالوپروتئازهای فعال میباشد. زایموگرام حاصله از گودهی مارکر پروتئینی، در مقایسه با زایموگرام گودههای تست و کنترل، وزن مولکولی باندهای ظهور یافته را در اختیار ما قرار میدهد. باند ایجاد شده در زایموگرامهای تست مطالعهی حاضر، در مقایسه با مارکر پروتئینی، دارای وزن مولکولی ۹۲ KD بود؛ که این وزن مولکولی مربوط به ماتریکس متالوپروتئاز ۹ (MMP9) میباشد.

## بحث

نتایج حاصل از این بررسی نشان میدهد عصارههای آبی و آبی- الکلی برگ انجیر، سبب مهار کامل و یا کاهش فعالیت ماتریکس متالوپروتئینازها، در کشت سلول فیبروبلاست میشود. در حضور میزان ۵µl از عصارهی آبی، پس از ۷۲ ساعت، باندهای پروتئینی بسیار ضعیفی تشکیل گردید؛ این نشان میدهد که غلظت ۵µl از عصارهی آبی، در طولانی مدت نمیتواند مهارکنندهی مناسبی برای فعالیت ماتریکس متالوپروتئینازها، باشد. در صورتی که در میزان ۱۰µl از این عصاره، مهار کامل و عدم حضور باند هضمی در تمام ۷۲ ساعت دیده میشد. از این رویداد میتوان چنین گرفت که میزان ۱۰µl از عصارهی آبی، در مهار فعالیت ماتریکس متالوپروتئینازها، موفقتر از میزان ۵µl (باتوجه به اثر مشابه هر دو مقدار، در سالم ماندن سلولها حتی پس از گذشت ۷۲ساعت)، عمل کرده است.

عصارهی آبی- الکلی برگ انجیر در میزان ۱۰µl، مهار کامل فعالیت متالوپروتئینازها را نشان داد؛ اما این میزان از عصاره، باعث مرگ سلولها پس از گذشت ۷۲ ساعت شد. در حالی که میزان ۵µl از این عصاره، حالت نرمال و سالم ماندن سلولها را به طور کامل، حتی پس از گذشت ۷۲ ساعت، به همراه داشت. در نتیجه، یافتن مقدار مناسبتر عصارهی آبی- الکلی، هم از نظر مهار ماتریکس متالوپروتئینازها و هم از نظر حفظ سلامتی سلولها، نیازمند آزمایشهای بیشتر میباشد.

عصارهی الکلی برگ انجیر، حتی در مقدار یک لاندا، منجر به مرگ سلولی میشود؛ در نتیجه، بررسی اثرات این نوع عصاره بر فعالیت ماتریکس متالوپروتئینازها و سپس دستیابی به مقادیر مؤثر و غیرتوکسیک از این عصاره، نیازمند مطالعات بیشتر میباشد.

به طور کلی، چهار دسته پروتئاز در سلول‌ها وجود دارند، متالوپروتئازها، سرین پروتئازها، اسپارتیک پروتئازها و سیستئین پروتئازها. اسپارتیک پروتئازها و سیستئین پروتئازها، پروتئازهایی هستند که در pH=۳/۵-۴ فعالیت می‌کنند، از آن جا که بافر هضمی مورد استفاده در این مطالعه، دارای pH قلیایی بود، بنابراین امکان فعالیت این دو دسته پروتئاز منتفی می‌گردد . از طرفی، متالوپروتئازها و سرین پروتئازها برای عملکرد خود نیاز به pH قلیایی و مشابه دارند، با این تفاوت که سرین پروتئازها به کوفکتور فلزی نیازی ندارند، در حالی که فعالیت متالوپروتئینازها وابسته به کوفکتور فلزی می‌باشد. Hu و همکاران در سال ۲۰۰۴ و Toledano و همکاران در سال ۲۰۱۲ گزارش کردند که EDTA با شلاته کردن کلسیم، کوفکتور مورد نیاز متالوپروتئینازها را از دسترس خارج می‌کند و افزودن کلراید روی نیز این ممانعت را تشدید می‌کند، بنابراین در بررسی حاضر اگر با افزودن EDTA، همچنان فعالیت پروتئازی برقرار بود، می‌توان نتیجه گرفت پروتئاز فعال، سرین پروتئاز بوده و نه متالوپروتئاز . در حالی که در این بررسی با افزودن EDTA، به بافر هضمی زایموگرافی، فعالیت پروتئازی متوقف شد، بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که آنزیم فعال، متالوپروتئاز بوده است (Hu et al. 2004, Toledano et al. 2012).

گوده‌ی مارکر پروتئینی، در مقایسه با زایموگرام گوده‌های تست و کنترل، وزن مولکولی باندهای تشکیل شده را در اختیار ما قرار می‌دهد . باند ایجاد شده در زایموگرام‌های تست این بررسی حاضر، با مقایسه با مارکر پروتئینی، دارای وزن مولکولی ۹۲ KD بود، که این وزن مولکولی مربوط به ماتریکس متالوپروتئاز ۹، (MMP9) می‌باشد . Young Heui و همکاران ۲۰۰۷ در سل لاین فیبروبلاست، فعالیت ماتریکس متالوپروتئینازهای دیگر مداوم نبوده و نیازمند تحریک می‌باشند و یا در مقادیر بسیار ناچیز، تولید شوند که در این صورت نیز قدرت ایجاد باند را نخواهند داشت. در این موارد باید از روش‌های مولکولی برای تعیین نوع MMP استفاده گردد.

Grimm و همکاران در سال ۲۰۰۴، در مطالعه‌ی خود بر اثرات آنتی‌اکسیدانی و مهارکنندگی ماتریکس متالوپروتئینازها، به وسیله‌ی متابولیت‌های عصاره‌ی پوست درخت کاج دریایی[1]، دریافتند که متابولیت‌های عصاره‌ی پوست این درخت شامل M1[2] و M2[3] اثرات مهاری قوی روی ماتریکس متالوپروتئینازهای ۱ (MMP1)، ۲ (MMP2) و ۹ (MMP9) دارند، به گونه‌ای که این دو متابولیت با غلظت ۰/۵ mM، تا حدود ۵۰ درصد باعث مهار شدید ترشح MMP9 شدند. از طرفی این متابولیت‌ها در مهار آنزیم‌ها، بسیار فعال‌تر از پیش‌ساز خود عمل کردند.

Jin و همکاران در سال ۲۰۰۵، موفق به کشف و شناسایی یک مهارکننده‌ی جدید و قوی بر ماتریکس متالوپروتئیناز ۹ (MMP9) شدند که عصاره‌ی متانولی گیاه شمشاد[4] بود. این مهارکننده‌ی قوی، دارای ترکیب فنولی شامل کلوروژنیک اسید[5] می‌باشد . در این مطالعه کلوروژنیک اسید اثر مهاری قوی بر فعالیت ماتریکس متالوپروتئیناز ۹، در روش وابسته به غلظت، در زایموگرافی از خود نشان داد. همچنین، این بررسی نشان داد که کلوروژنیک اسید اثر سیتوتوکسیسیتی در تکثیر سلولی نداشته است. اطلاعات این مطالعه نشان می‌دهد که به طور طبیعی، مکانیسم‌های احتمالی پیش‌گیری از سرطان به وسیله‌ی مواد شیمیایی مختلف، مانند اسید کلوروژنیک و دیگر ترکیبات فنولی روی می‌دهد.

Young Heui و همکاران در سال ۲۰۰۷، با جمع‌آوری ۶۰ نوع گیاه طبیعی از جزیره‌ی جوجو[6] واقع در نیمه‌ی جنوبی جمهوری کره، اثرات ترکیبات این گیاهان طبیعی

1- *Maritime Pine bark*
2- $\delta$ −3-4- Dihydroxyphenyl-$\delta$-valerolactone
3- $\delta$ −3-Methoxy-4-Hydroxyphenyl-$\delta$-valerolactone
4- *Euonymus alatus*
5- Chlorogenic acid (3-Caffeoylquinic acid)
6- Jeoju Island

را بر مهار رادیکال‌های آزاد، فعالیت آنزیم الاستاز، ماتریکس متالوپروتئیناز ۱ و کاهش بیان mRNA ماتریکس متالوپروتئیناز ۱ مطالعه نمودند. هدف از این مطالعه، بررسی اثرات ضدپیری این ترکیبات و یافتن ترکیبات طبیعی جدید برای استفاده در لوازم آرایشی بود. نتایج این مطالعه در مورد کاهش بیان mRNA ماتریکس متالوپروتئیناز ۱، با استفاده از روش RT-PCR نشان داد که گل گیاه فلفل قرمز[1]، دانه‌ی گیاه لوئی یا نی[2] و ریشه‌ی نوعی سرخس[3] در مهار ماتریکس متالوپروتئیناز ۱، کمی ضعیف‌تر از گیاه اپی‌گالوکاتچین گالات[4] (EGCG) که به عنوان کنترل استفاده شده بود، عمل کردند. علاوه بر این، عصاره‌ی چهار گیاه شامل گل گیاه فلفل آبی[5]، ریشه‌ی گیاه فلیپندورا گلابریما[6]، ریشه‌ی گیاه نیمفا تتراگونا[7] و برگ ژاپونی سیاه و سبز کاملیا[8]، قادر هستند به طور کامل بیان ماتریکس متالوپروتئیناز ۱ (MMP1) را در سلول‌های فیبروبلاست انسانی مهار کنند. این نتایج نشان داد که عصاره‌ی این چهار گیاه، از مجموع ۶۰ گیاه جمع‌آوری شده، می‌توانند به عنوان ماده‌ی طبیعی ضدپیری در لوازم آرایشی استفاده شوند.

Lee و همکاران در سال ۲۰۰۴، روی اثرات عصاره‌های گیاهی بر فعالیت ماتریکس متالوپروتئینازهای ناشی از اشعه‌ی UVA در کشت سلول فیبروبلاست پوست انسان، مطالعه کردند. اشعه‌ی UVA، در تمام فصول سال در نور خورشید وجود داشته و اثرات آن بر پوست، بیش‌تر درونی می‌باشد، به گونه‌ای که در دراز مدت، منجر به چین و چروک پوست و ایجاد لکه‌های قهوه‌ای که زمینه‌ساز سرطان پوست هستند، می‌گردد. هدف از این مطالعه نیز، توسعه و یافتن ترکیبات ضدچروکیدگی پوست با منشاء گیاهی بود. فعالیت ماتریکس متالوپروتئیناز ۱، با روش فلوئورسنس و با استفاده از ژلاتین به عنوان پیش ماده، اندازه‌گیری شد . علاوه بر این، بیان ماتریکس متالوپروتئیناز ۱، ناشی از تابش اشعه‌ی UVA، با روش الایزا و زایموگرافی ژلاتین در کشت سلول فیبروبلاست پوست انسانی و تکنیک RT-PCR، مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. نتایج این مطالعه نشان داد که عصاره‌ی گیاه دیسنترا[9] و جوانه‌های گل گیاه پای خر[10] دارای اثر مهاری قوی هستند، به گونه‌ای که غلظت w/v ۰/۰۵ درصد عصاره‌ی گیاه دیسنترا، تا ۸۷ درصد و همین غلظت از عصاره‌ی جوانه و گل گیاه پای خر، تا ۹۲ درصد فعالیت ماتریکس متالوپروتئیناز ۱ (MMP1) را مهار می‌کنند. در مقدار w/v ۰/۱ درصد، این عصاره‌ها، اثر مهاری مشابه با اثر ۲۰۰ میکرولیتر ویتامین C، در سرکوب بیان ماتریکس متالوپروتئیناز ۱ (MMP1)، ناشی از تابش اشعه‌ی UVA مشاهده شد. این نتایج نشان می‌دهد که عصاره‌ی این دو گیاه، در جلوگیری از پیری پوست ناشی از تابش نور آفتاب و اشعه مؤثرند و پتانسیل استفاده در لوازم آرایش ضدپیری پوست، در این عصاره‌ها وجود دارد.

Hoe-Yune و همکاران در سال ۲۰۱۴ با مطالعه بر عصاره‌ی درخت کاج[11]، تاثیرات محافظتی آن را بر فیبروبلاست پوست انسان، در مقابل اشعه‌ی UVB و پیری و چروکیدگی ناشی از آن را نشان دادند. این عصاره سبب مهار بیان ماتریکس متالوپروتئینازها و افزایش بیان تیپ یک پروکلاژن، می‌شد. این دانشمندان گزارش کردند که تحت تأثیر اشعه‌ی UVB، ماتریکس متالوپروتئینازها، خصوصاً ماتریکس متالوپروتئینازهای ۱، ۳ و ۹ (MMP1, MMP3, MMP9) با تخریب کلاژن، باعث کاهش الاستیسیته‌ی پوست می‌شوند. در این مطالعه، اثرات و مکانیسم عمل عصاره‌ی برگ درخت کاج بر روی پوست و سلول‌های فیبروبلاست پوست انسان پس از قرارگیری

1- *Capsicum annum*
2- *Typha orientalis*
3- *Pyrrosia Hastata*
4- Epigallocatechin gallate
5- *Persicaria hydropiper*
6- *Filipendula glaberrima*
7- *Nymphaea tetragona*
8- *Camelia japonica*
9- *Dicentra spectabilis*
10- Tussilago farfara
11- *Pinus Densiflora*

در معرض اشعه‌ی UVB، با روش‌های RT-PCR، تست وسترن بلات (Western blot) و سنجش فعالیت آنزیمی، مورد بررسی قرار گرفت. این عصاره، از خود فعالیت آنتی‌اکسیدانی نشان داد و در شرایط آزمایشگاه باعث مهار الاستاز شد، همچنین سمیت سلولی ناشی از اشعه UVB را مهار کرد و باعث مهار تولید ماتریکس متالوپروتئیناز ۱، MMP1 و مهار بیان mRNA ماتریکس متالوپروتئیناز ۱ و ۳ و ۹، در کشت سلول فیبروبلاست انسانی، گشت. همچنین، این عصاره باعث مهار فعالیت ماتریکس متالوپروتئیناز ۲، (MMP2) و مهار بیان mRNA آن گردید. علاوه بر این، این عصاره درخت کاج مانع کاهش پروکلاژن Type 1، در هنگام قرار گرفتن پوست در معرض اشعه‌ی UVB می‌شد . نتایج مطالعات Jung و همکاران، نشان داد که عصاره‌ی درخت کاج، با تنظیم فعالیت ماتریکس متالوپروتئینازهای ناشی از اشعه و ساخت پروکلاژن Type 1، می‌تواند به عنوان یک ماده‌ی مؤثر ضدپیری، مفید باشد. Lee و همکاران در سال ۲۰۰۳ گزارش کردند بعضی از گیاهان با اجزای فنولی بالاتر، فعالیت بیولوژیکی متفاوتی را نشان می‌دهند که می‌توانند به عنوان مهارکننده‌های روند پیری و چروکیدگی پوست، استفاده شوند.

Lee و همکاران ۲۰۰۹، بر اثرات گیاهان بومی تایوان بر ماتریکس متالوپروتئیناز ۹ (MMP9) پس از مواجه با اشعه‌ی ماورای بنفش نوع B، مطالعه کردند. آن‌ها هشت گیاه بومی تایوان را عصاره‌گیری نمودند. اجزای فنولی ترکیبات بیولوژیکی گیاهان فوق با روش فولین سیوکالتو اندازه‌گیری شدند . فعالیت ماتریکس متالوپروتئیناز ۹ (MMP9) نیز به روش زایموگرافی ژلاتین اندازه گرفته شد. همه‌ی این عصاره‌ها، مهار فعالیت MMP9 را در کشت سلول، پس از مواجهه با اشعه‌ی فرابنفش نوع B نشان دادند. نتایج این مطالعه نشان داد که تمامی ترکیبات فنولی می‌توانند بر فعالیت MMP9 مؤثر باشند.

با بررسی مطالعات پژوهش‌گران مختلف در ارتباط با اثر گیاهان طبیعی و دارویی و همچنین انواع مختلف عصاره‌ی آن‌ها بر مهار ماتریکس متالوپروتئینازها در محیط کشت سلولی و در بدن موجود زنده، می‌توان نتیجه گرفت که با مهار MMP ها و افزایش فعالیت آن‌ها به وسیله‌ی گیاهان دارویی، می‌توان از متاستاز تومورها، پرولیفراسیون سلول‌های بدخیم و چروکیدگی پوست در اثر اشعه‌ی فرابنفش، پیری زودرس در اثر تجزیه و کاهش بافت کلاژن زیر پوست و کارتیلاژ غضروف و مفاصل بدن انسان و سایر آثار مضر افزایش فعالیت این آنزیم‌های سلولی ممانعت کرد. نتایج مطالعه‌ی حاظر، نیز بیان‌گر اثر مهاری عصاره‌ی برگ انجیر بر بیان ماتریکس متالوپروتئینازها در کشت سلول فیبروبلاست، می‌باشد. به ویژه این اثر را بر مهار MMP9 نشان می‌دهد. مطالعه‌ی حاضر به روش زایموگرافی انجام شده است و همانند مطالعات سایر محققین نتایج مشابهی را بر مهار این آنزیم-های پروتئینی نشان داده است. چنانچه این بررسی با روش‌های دقیق مولکولی انجام شود، تولید و مهار سایر MMP ها را نیز می‌توان بررسی نمود. از این رو توصیه می‌شود با استفاده از روش‌های مختلف و انجام مطالعات بالینی به بررسی بیش‌تر اثر عصاره‌ی برگ انجیر به عنوان یک گیاه دارویی مفید، بر انواع متالوپروتئینازها، به طور جداگانه پرداخته شود.

## منابع


Altman, S.A.; Randers, L. and Rao, G. (1993). Comparison of trypan blue dye exclusion and Flurometric asseys for mammalian cell viability determinations, Biotechnology Progress, 9 (6): 671-674.

Chambers, A.F. and Matrisian, L.M. (1997). Changing views of the role of matrix metalloproteinases in metastasis, Journal of the National Cancer Institute, 89(17): 1260-1270.

Deryugina, E.L.; Quigley, J.P. (2006). Matrix Metalloproteinases and Tumor Metastasis. Cancer Metastasis Reviews, 25(1): 9-34.

Egeblad, M. and Werb, Z. (2002). New functions for the matrix metalloproteinase in cancer progression. Nature Reviews Cancer, 2, 161-174.

Grimm, T.; Schafer, A. and Hogger, P. (2004). Antioxidant activity and inhibition of matrix metalloproteinases by metabolites of maritime pine bark extract (pycnogenol). Free Radical Biology and Medicine, 36 (6), 811-822.

Hashemi, S.A. and Abediankenari, S. (2013). Suppressive effect of fig (*Ficus carica*) latex on esophageal cancer cell proliferation, Scientific Journal of the Faculty of Medicine in Niš 30(2): 93-96.

Hu, J.; Zhang, X.; Nothnick, W.B. and Spencer, T.E. (2004). Matrix metalloproteinases and their tissue inhibitors in the developing neonatal mouse uterus. Biology of Reproduction; 71(5): 598-604.

Jin, U.H.; Lee, J.Y.; Kang, S.K.; Kim, J.K.; Park, W.H.; Kim, J.G. et al. (2005). A phenolic compound, 5-caffeoylquinic acid (chlorogenic acid), is a new type and strong matrix metalloproteinase-9 inhibitor:Isolation and identification from methanol extract of Euonymus alatus. Life Sciences, 77 (22): 2760-2769.

Jodele, S.; Blavier, L.; Yoon, J.M. and DeClerck, Y.A. (2006). Modifying the soil to affect the seed: role of stromal-derived matrix metalloproteinases in cancer progression, Cancer Metastasis Reviews, 25 (1): 35-43.

John, A. and Tuszynski, GP. (2001). The role of Matrix Metalloproteinases in tumor angiogenesis and tumor metastasis. Pathology Oncology Research, 7(1): 14-23.

Jung, H.Y.; Shin J.C.; Park, S.M.; Kim, N.R.; Kwak, W. and Choi, B.H. (2014). Pinus densifloria extract protects human skin fibroblasts against UVB-induced photoaging by inhibiting the expression of MMPs and increasing type 1 procollagen expression. Toxicology Reports, 1: 658-666.

Khodarahmi, G.A.; Ghasemi, N.; Hassanzadeh, F. and Safaie, M. (2011). Cytotoxic effects of different extracts and latex of *Ficus carina* on HELA cell line. Iranian Journal of Pharmaceutical Research: 10(2): 273-277.

Kim, H.Y.; Kim, K.S.; Han, C.S.; Yang, H.C.; Park S.H.; KO, K.I. et al. (2007). Inhibitory effects of natural plants of Jeju Island on elastase and MMP-1 expression. INT. J. COSMETIC SCI. 29 (6): 487-488.

Lee, Y.J.; Lee, E.B.; Kwon, Y.E.; Lee, J.J.; Cho, W.S.; Kim, H.A. and Song, Y.W. (2003). Effect of estrogen on the expression of matrix metalloproteinase, MMP-1, MMP-3, and MMP-13 and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 in osteoarthritis chondrocytes, (Rheumatology International) Rheumatology International, 23(6): 282-288.

Lee, D.H.; Lee, B.C.; Yoon, E.J.; Lee, K.E.; Park, S.M.; Pyo, H.B. et al. (2004). Development of effects of plant extracts on the activity and expression of UVA-induced MMPs (matrix-metalloproteases). International Journal of Cosmetic Science, 26 (6): 317-319.

Lee, Y.L.; Lee, M.H.; Chang, H.J.; Huang, P.Y.; Huang, I.J.; Cheng, K.T. and Leu, S.J. (2009). Taiwanese native plants inhibit matrix metalloproteinase-9 activity after ultraviolet B irradiation. Molecules, 14(3): 1062-1071.

Mozaffarian, V. (2012). Recognition of Medicinal and Aromatic Plants of Iran. Tehran, Research Institute of Forests and Rangelands, 710-712.

Rubnov, S.; Kashman, Y.; Rabinowitz, R.; Schlesinger, M. and Mechoulam, R. (2001), Suppressors of cancer cell proliferation from fig (*Ficus carica*) resin: isolation and structure Elucidation. Journal of Natural Products, 64 (7), 993-996.

Samsam, Shariat (1992). Evaluation and diagnostic methods of extraction of effective extract compound of Pharmacological plants, first ed. Mony Express, 14-16.

Sheu, B.C.; Hsu, S.M.; Ho, H.N.; Lien, H.C.; Huang, S.C. and Lin, R.H. (2001). A novel role of metalloproteinase in cancer-mediated immunosuppression, Cancer Research 61: 237-242.

Snoek-van Beurden, PAM. and Von den Hoff, J.W. (2005). Zymographic techniques for the analysis of matrix metalloproteinases and their inhibitors. Bio Techniques, 38(1): 73-83.

Taheri, M.; Nabian, S.; Nikbakht, Gh.R. and Yousefi, P. (2014). Study of cathepsins involved in haemoglobin and vitellin digestion in *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *annulatus* larvae by one- and two- dimensional zymography. Journal of Veterinary Research, 69(1), 25-31.

Toledano, M.; Yamauti, M.; Osorio, E. and Osorio, R. (2012). Zinc-inhibited MMP-mediated collagen degradation after different dentine demineralization procedures. Caries Research, 46: 201-207.

Van Lint, P. and Libert, C. (2007). Chemokine and cytokine processing by matrix metalloprotein and its effect on leukocyte migration and inflammation. Journal of Leukocyte Biology, 82 (6): 1375-1381.

# The effects of fig leaf extract on the matrix metalloproteinases (MMPs) activities in the fibroblast (HEP2) cell culture

Atyabi, N.[1]; Niknam, G.[2]; Nasiri, S.M.[3] and Taheri, M.[4]

Received: 20.12.2015 Accepted: 23.05.2016

**Abstract**

The aim of this study was to evaluate the effects of fig leaf extract on the activity of MMPs, in fibroblast (HEP2) cell culture. For this purpose, fig leaf extract was prepared in three forms: 1) aqueous, 2) hydro-alcoholic and 3) alcoholic extracts. Using a 24 wells cell culture plates, six wells of a plate were filled with 5$\mu$l aqueous extract, 10$\mu$l aqueous extract, 5$\mu$l hydro _ alcoholic extract, 10$\mu$l hydro_ alcoholic extract, 5$\mu$l alcoholic extract, and 1$\mu$l alcohlic extract, as test samples, respectively. For each test sample, it was considered a control well, with the same content as test, but without the extracts. Thereafter, the plates were incubated at 37° C and 5%$CO_2$. The effects of different extracts, were investigated after 24, 48 and 72 hours, using an inverted microscope and determination of cell viability and cytotoxicity by trypan blue staining. and zymography test with gelatin for MMPs Activities. The result of the study were as follows: the alcoholic extract at a concentration of 5$\mu$l caused cell death after 24 h, and a concentration of 1$\mu$l of alcoholic extract, also led to cell death after 48 hours. Hydro_ alcoholic extract caused cell death, at a concentration of 10$\mu$l, after 72 hours. In zymography test, it was observed the inhibitory effect of fig leaf extract on the MMPs activities, in all tested doses. However, there were seen enzyme activities in all control tests which showed the same molecular weight bands, 92KD, as was shown in standard marker and belonged to MMP9. The present study, confirmed the inhibitory effect of fig leaf extract on the activity of MMPs in cell cultures. It is recommended to continue this study with molecular methods besides zymography, and clinical observation, using the fig leaf extract and its inhibitory effects on the other kinds of MMPs, separately.

**Key Words**: Matrix metalloproteinases, Fibroblast, Fig leaf extracts, Zymography, Cytotoxicity

1- Professor, Department of Large Animal Medicine, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran, Iran
2- DVM Graduated from Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran, Iran
3- Associate Professor, Department of Large Animal Medicine, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran, Iran
4- Central Laboratory Expert, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran, Iran
**Corresponding Author:** Atyabi, N., E-mail: natyabi@ut.ac.ir