Journal of
Arak University of Medical Sciences

June & July 2021. Vol 24. Issue 2

Research Paper

The Antioxidant Effects of Ginger Extract on Bioavailability and Oxidative Stress-induced Apoptosis in Mesenchymal Stem Cells of Human Adipose Tissue and Rat Bone Marrow

Sahar Dehghani[1], *Leila Rouhi[2], Noosha Ziya Jahromi[1], Reza Dehghani[1], Khalil Khashei Varnamkhasti[1,3]

1. Department of Biochemistry, Shahrekord Branch, University of Islamic Azad, Shahrekord, Iran.
2. Department of Physiology, Shahrekord Branch, University of Islamic Azad, Shahrekord, Iran.
3. Department of Genetics, School of Medicine, University of Islamic Azad, Kazerun, Iran.

Use your device to scan and read the article online

Citation: Dehghani S, Rouhi L, Ziya Jahromi N, Dehghani R, Khashei Varnamkhasti Kh. [The Antioxidant Effects of Ginger Extract on Bioavailability and Oxidative Stress-induced Apoptosis in Mesenchymal Stem Cells of Human Adipose Tissue and Rat Bone Marrow (Persian)]. Journal of Arak University of Medical Sciences (JAMS). 2021; 24(2):216-229. https://doi.org/10.32598/JAMS.24.2.6146.4

https://doi.org/10.32598/JAMS.24.2.6146.4

CC BY NC

Article Info:
Received: 31 Oct 2020
Accepted: 09 Jan 2021
Available Online: 01 Jun 2021

Key words:
Ginger extract, Oxidative stress, Antioxidant, Mesenchymal stem cells, Apoptosis, Cytotoxicity

ABSTRACT

Background and Aim Proliferate potential differentiate into different cell lineages and high self-renewal of Mesenchymal Stem Cells (MSCs); thus, they are ideal tools for regenerative medicine. However, a leading problem is an oxidative stress in the target tissue and the apoptosis of transplanted stem cells before tissue repair. The pretreatment of stem cells with antioxidants may make them resistant to oxidative stress. Ginger is the main medicinal plant with antioxidant properties. This study explored the antioxidant effects of ginger extract on bioavailability and oxidative stress-induced apoptosis in human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells and rat bone marrow examined.

Methods & Materials In this study, human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells and rat bone marrow were cultured in a DMEM medium with 20% FBS. The explored cells were incubated for 4 and 6 hours for pretreatment with different concentrations of ginger extract (50, 100, 200, & 400 mg/mL); then, they were treated with 200 µM H_2O_2 for 2 hours. Bioavailability was analyzed by ELISA reader using an MTS kit and apoptosis was analyzed by flow cytometry using an Annexin V-FITC/PI kit into the manufacturer's protocol at both times. The obtained data were analyzed by Analysis of Variance (ANOVA) using SPSS.

Ethical Considerations This study was approved by the Ethics Research Committee of Shahrekord Branch, Islamic Azad University (Code: IR.IAU.SHK.REC.1397.028).

Results The MTS results indicated a dose- and time-dependent manner increase in the bioavailability of human adipose tissue-derived mesenchymal treated stem cells. Ginger extract treatment also dose- and time-dependently decreased the rate of apoptosis in rat bone marrow mesenchymal stem cells.

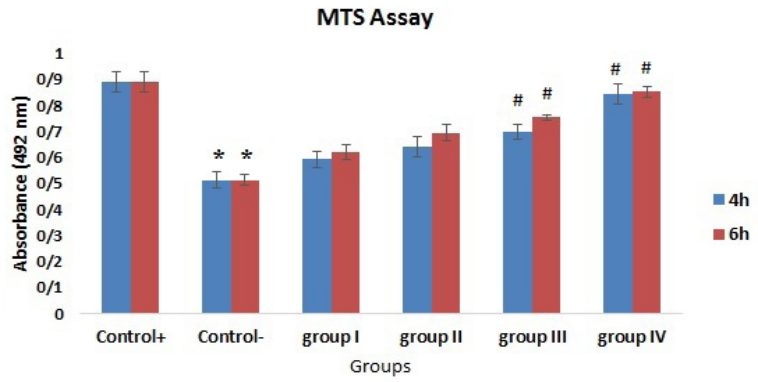
Conclusion Ginger extract, by reducing the oxidative stress in mesenchymal stem cells, elevates their lifespan in the target tissue, and increases the efficiency of these cells in tissue regeneration.

Extended Abstract

1. Introduction

Cell therapy is a subset of restorative medicine. Moreover, stem cells are the first hope for the repair of damaged tissues [3, 4]. Concerning origin, these cells are divided into two main categories of embryonic stem cells and adult stem cells [5]. Due to some limitations in the production and use of embryonic stem cells, in recent years, a new wave of research on adult stem cells has begun, i.e., extensively performed [6]. Mes-

* *Corresponding Author:*
Leila Rouhi
Address: Department of Physiology, Shahrekord Branch, University of Islamic Azad, Shahrekord, Iran.
Tel: +98 (912) 6043305
E-mail: irouhi59@gmail.com



Journal of
Arak University of Medical Sciences

Figure 1. The frequency of viable cells in human adipose tissue-derived MSCs treated with different concentrations of ginger extract for 4 and 6 hours

*P≤0.05 compared with the positive control group (cells exposed to culture medium), #P≤0.05 compared with the negative control group (cells exposed to H_2O_2).

enchymal Stem Cells (MSCs), as major adult stem cells, can differentiate into cells that are not mesenchymal derivatives [7]. However, due to the unfavorable conditions of the transplant recipient, including hypoxia and the presence of oxygen-free radicals that activate and increase aging factors by causing stress in the cell, eventually leading to apoptosis and cell death, most of the transplanted mesenchymal stem cells are lost in the early days; which in turn, this condition reduces their efficiency [12, 13]. Studies attempted to identify and use factors that prevent oxidative stress in these cells. One of these characteristics included antioxidants [14]. Ginger, with the scientific name of Zingiber officinale, is a medicinal plant with pharmacological properties, such as antioxidant, anti-apoptotic, and anti-inflammatory effects [18]. Therefore, the present study aimed to explore the antioxidant effect of ginger extract on cytotoxicity and the induction of apoptosis due to oxidative stress in human adipose tissue-derived MSCs and rat bone marrow.

2. Materials and Methods

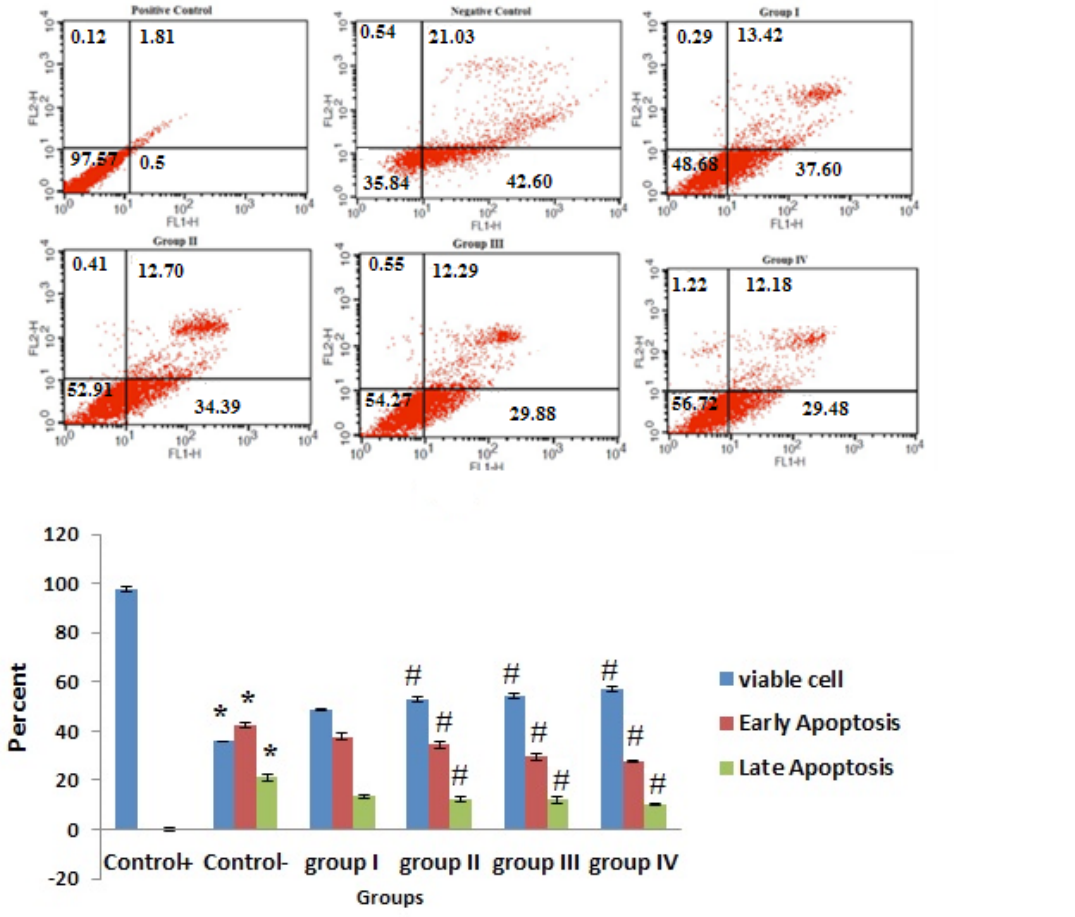
In this study, human Adipose Tissue Mesenchymal Stem Cells (AD-MSCs) were obtained from the National Center for Genetic and Biological Resources of Iran and rat bone marrow mesenchymal stem cells were extracted from the tibia and femur of rats. Cells in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) culture medium (Gibco, USA) containing 20% Foetal Bovine Serum (FBS) (Gibco, USA) and 1% Penicillin-Streptomycin (Penstrep) (Gibco, USA) in an incubator (Memmert, Germany) were cultured in flask 75 with 5% CO_2 gas pressure, 90% humidity, and at 37°C. The culture medium was changed three times a week and trypsin/EDTA solution was used to harvest the cells. To prepare the ginger extract, 500 gr of the dried ginger plant was prepared and after grinding, the resulting powder was placed in 96% alcohol for 10 days to dissolve its active ingredients in alcohol. The contents of the filter paper and the solution obtained by the rotary apparatus were then concentrated at 50°C and 60 rpm. H_2O_2 was prepared in liquid form. The assay of human adipose tissue-derived MSCs was evaluated using MTS colorimetric method. The status of apoptosis in rat bone marrow-derived MSCs were also explored by Annexin V-FITC/PI test.

3. Results

The effects of ginger extract on cytotoxicity induced by oxidative stress in human adipose tissue-derived MSCs. Oxidative stress-induced cytotoxicity in human adipose tissue-derived MSCs treated with different concentrations of ginger extract (50, 100, 200 & 400 mg/mL), after incubation periods (4 & 6 hours with ginger extract & 2 hours with H_2O_2) were evaluated using MTS test. The obtained results indicated that ginger extract could increase the bioavailability of human adipose tissue-derived MSCs in a dose- and time-dependent manner (P≤0.022*) (Figure 1).

The effects of ginger extract on the induction of oxidative stress-induced apoptosis in rat bone marrow-derived MSCs

Annexin V-FITS test was applied to evaluate the induction of apoptosis. The relevant results suggested a dose- and time-dependent reduction in the frequency of death in bone marrow-derived MSCs in the treated experimental groups.



Journal of
Arak University of Medical Sciences

Figure 2. The frequency of viable cells, primary apoptosis, and late apoptosis in bone marrow-derived MSCs of the rats treated with different concentrations of ginger extract for 4 hours

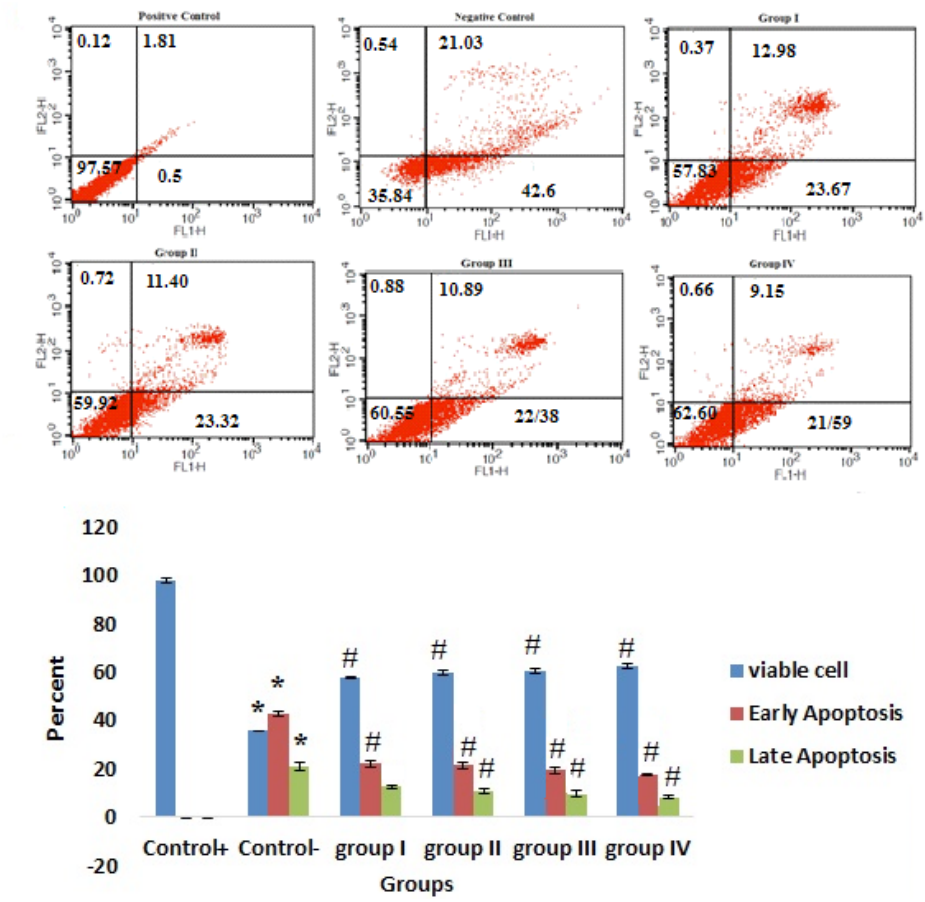
*P≤0.05 compared to the positive control group (cells exposed to culture medium), #P≤0.05 compared to the negative control group (cells exposed to H_2O_2).

As illustrated in Figure 2, in the 4-hour treatment, the frequency of cells in the early stages of apoptosis increased from 37.60% at 50 mg/mL to 29.48% at 400. Such a decrease in the frequency of apoptosis in all concentrations was significantly different from that of the negative control group. Furthermore, the frequency of cells in the late stages of apoptosis decreased with the increasing dose of ginger extract, from 13.42% at a concentration of 50 mg/mL to 12.18% at a concentration of 400 mg/mL, i.e., also a significant decrease in all concentrations, compared to the negative control group (P≤0.030) (Figure 2).

Furthermore, in the 6-hour treatment, the frequency of cells in the early stages of apoptosis increased from 23.67% at a concentration of 50 mg/mL to 21.59% at a concentration of 400 mg/mL. This decrease in the frequency of apoptosis in all concentrations significantly differed from that of the negative control group. In addition, the frequency of cells in the late stages of apoptosis decreased with increasing dose and treatment time with ginger extract, from 12.98% at a concentration of 50 mg/mL to 15.9% to 400 mg/mL, i.e., a significant decrease in the frequency of apoptosis in all concentrations, compared to the negative control group (P≤0.016) (Figure 3).

4. Discussion and Conclusion

During the normal functioning of the cells used in cell therapy, reactive oxygen species are produced that have high reactivity with DNA, proteins, carbohydrates, and lipids; they cause irreparable damage to these macromolecules to enter. Ginger is an essential medicinal plant that has long been used to treat various diseases [19]. The antioxidant effects of ginger have been studied for years. This study explored the antioxidant effects of ginger extract on cytotoxicity and the induction of oxidative stress-induced



Journal of
Arak University of Medical Sciences

Figure 3. The frequency of viable cells, primary apoptosis, and terminal apoptosis in bone marrow-derived MSCs of rats treated with different concentrations of ginger extract for 6 hours

*P≤0.05 compared to the positive control group (cells exposed to culture medium), #P≤0.05 compared to the negative control group (cells exposed to H_2O_2).

apoptosis in human adipose tissue-derived MSCs and rat bone marrow. The obtained results indicated that ginger extract reduced the frequency of human adipose tissue-derived MSCs and rat bone marrow by acting as an antioxidant, which further increased the success of using mesenchymal stem cells in the cell treatment.

Ethical Considerations

Compliance with ethical guidelines

This study was approved by the Ethics Research Committee of Shahrekord Branch, Islamic Azad University (code: IR.IAU.SHK.REC.1397.028).

Funding

This study was extracted from the Msc. thesis of the first author at the Department of Biochemistry, Faculty of Science, Shahrekord Branch, Islamic Azad University.

Authors' contributions

All authors equally contributed to preparing this article.

Conflicts of interest

The authors declared no conflict of interest.

Acknowledgements

We would like to thank the esteemed Vice Chancellor for Research of Shahrekord Branch of Azad University and everyone who contributed to this research.

This Page Intentionally Left Blank

مقاله پژوهشی

اثر آنتی‌اکسیدانی عصاره زنجبیل بر افزایش توان زیستی و کاهش آپوپتوز ناشی از استرس اکسیداتیو در سلول‌های بنیادی مزانشیمی بافت چربی انسان و مغز استخوان موش صحرایی

سحر دهقانی[۱]، *لیلا روحی[۲]، نوشا ضیاء جهرمی[۱]، رضا دهقانی[۱]، خلیل خاشعی ورنامخواستی[۱،۳]

۱. گروه بیوشیمی، دانشکده علوم پایه، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران.
۲. گروه فیزیولوژی، دانشکده علوم پایه، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران.
۳. گروه ژنتیک، دانشکده پزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی کازرون، کازرون، ایران.

اطلاعات مقاله:
تاریخ دریافت: ۱۰ آبان ۱۳۹۹
تاریخ پذیرش: ۲۰ دی ۱۳۹۹
تاریخ انتشار: ۱۱ خرداد ۱۴۰۰

چکیده

زمینه و هدف قدرت تکثیر، پتانسیل تمایز به رده‌های سلولی مختلف و خودنوسازی بالای سلول‌های بنیادی مزانشیمی (MSCs) باعث شده تا این سلول‌ها به عنوان ابزار مناسبی برای طب ترمیمی مورد توجه قرار گیرند، ولی یکی از مشکلاتی پیش‌رو، ایجاد استرس اکسیداتیو در بافت هدف و آپوپتوز سلول‌های بنیادی منتقل شده پیش از ترمیم بافت مورد نظر است. پیش تیمار سلول‌های بنیادی با آنتی‌اکسیدان‌ها ممکن است آنها را نسبت به شرایط استرس اکسیداتیو مقاوم سازد. زنجبیل از گیاهان دارویی مهم با خاصیت آنتی‌اکسیدانی است. در مطالعه حاضر، اثر آنتی‌اکسیدانی عصاره زنجبیل بر توان زیستی و القاء آپوپتوز ناشی از استرس اکسیداتیو در سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از بافت چربی انسان و مغز استخوان موش صحرایی بررسی شد.

مواد و روش‌ها در این مطالعه، سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از بافت چربی انسان و مغز استخوان موش در محیط کشت DMEM با ۲۰ درصد سرم جنین گاوی کشت داده شدند. سلول‌ها جهت پیش تیمار به مدت چهار و شش ساعت با غلظت‌های مختلف عصاره زنجبیل (۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰ و ۴۰۰ میلی‌گرم/ میلی‌لیتر) انکوبه و سپس با غلظت ۲۰۰ میکرومولار H_2O_2 به مدت دو ساعت تیمار شدند. توان زیستی با استفاده از دستگاه الایزا ریدر با روش رنگ سنجی MTS و القای آپوپتوز با استفاده از دستگاه فلوسیتومتری و کیت انکسین-پروپیدیوم یدید (Annexin-PI) طبق دستورالعمل، در هر دو زمان بررسی شد. تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم افزار آماری spss، ورژن ۱۸ و آزمون آنالیز واریانس یک طرفه (ANOVA) به انجام رسید.

ملاحظات اخلاقی این مطالعه، با کد اخلاق IR.IAU.SHK.REC.1397.028 به تصویب کمیته اخلاق معاونت پژوهشی دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد رسید.

یافته‌ها نتایج تست MTS، حاکی از افزایش وابسته به دوز و زمان توان زیستی سلول‌های بنیادی مزانشیمی تحت تیمار، مشتق از بافت چربی انسان است. همچنین تیمار با عصاره زنجبیل، سبب کاهش وابسته به دوز و زمان، میزان آپوپتوز در سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان موش صحرایی شد.

نتیجه‌گیری عصاره زنجبیل با کاهش استرس اکسیداتیو در سلول‌های بنیادی مزانشیمی طول عمر آنها در بافت هدف و کارایی این سلول‌ها در ترمیم‌های بافتی را افزایش می‌دهد.

کلیدواژه‌ها:
عصاره زنجبیل، استرس اکسیداتیو، آنتی‌اکسیدان، سلولهای بنیادی مزانشیمی، آپوپتوز، سایتوتوکسیسیتی

مقدمه

امروزه روش‌های مبتنی بر سلول درمانی در حال توسعه و به عنوان یک جایگزین مناسب برای پیوند اندام کامل مطرح است [۱، ۲]. سلول درمانی، زیر مجموعه‌ای از طب ترمیمی است و هم اکنون سلول‌های بنیادی، امید اول ترمیم بافت‌های آسیب دیده به شمار می‌روند [۳، ۴]. این سلول‌ها از لحاظ منشاء به دو دسته عمده سلول‌های بنیادی جنینی و سلول‌های بنیادی بالغ تقسیم می‌شوند [۵]. تلاش برای استفاده درمانی از سلول‌های بنیادی جنینی از حدود بیست سال پیش با کار بر روی حیوانات آغاز شد و به موازات آن، سلول‌های بنیادی انسان نیز مورد توجه قرار گرفت. تا اینکه بالاخره در سال ۱۹۹۸ نخستین گزارش از تکثیر و تمایز موفق سلول‌های بنیادی جنینی انسان در آمریکا منتشر شد، اما با توجه به بروز برخی محدودیت‌ها در تولید و استفاده

* نویسنده مسئول:
لیلا روحی
نشانی: شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد شهرکرد، دانشکده علوم پایه، گروه فیزیولوژی.
تلفن: ۶۰۴۳۳۰۵ (۹۱۲) ۹۸+
پست الکترونیکی: irouhi59@gmail.com

از سلول‌های بنیادی جنینی، در چند سال اخیر، موج جدیدی از تحقیقات بر روی سلول‌های بنیادی بالغ شروع شده و به طور گسترده‌ای در حال انجام است [۶]. سلول‌های بنیادی بالغ، به یک برنامه تکاملی متعهد هستند و از طریق برنامه ریزی مجدد ژنتیکی می‌توانند به نوعی سلول از رده‌ای متفاوت تبدیل شوند. این انعطاف پذیری، در سلول‌های بنیادی مزانشیمی (MSCs)، از مهم‌ترین سلول‌های بنیادی بالغ، به دنبال توانایی آنها در تمایز با سلول‌هایی که از مشتقات مزانشیمی نیستند، به خوبی دیده شده است [۷]. امروزه سلول‌های بنیادی مزانشیمی، بخاطر داشتن ویژگی‌هایی همچون قدرت تکثیر و خودنوسازی بالا و همچنین پتانسیل تمایز به رده‌های مختلف سلولی درکنار خاصیت ناتوانی آنها برای ایجاد تومور و تحریک سیستم ایمنی، باعث شده است تا این سلول‌ها مورد توجه ویژه متخصصان پیوند واقع شوند و به عنوان مهمترین رده سلول‌های بنیادی در طب ترمیمی مطرح باشند [۱۱- ۸]. با این وجود، به علت شرایط نامساعد محیط گیرنده پیوند از جمله هیپوکسی و وجود رادیکال‌های آزاد اکسیژن که با ایجاد استرس در سلول موجب فعال شدن و افزایش فاکتورهای پیری می‌شوند و در نهایت آپوپتوز و مرگ سلول را به دنبال دارند، تعداد زیادی از سلول‌های بنیادی مزانشیمی پیوند شده در روزهای ابتدایی پس از پیوند از بین می‌روند که این خود موجب کاهش کارایی آنها خواهد شد [۱۳، ۱۲].

با توجه به اهمیت موضوع، به منظور یافتن راه‌هایی برای افزایش طول عمر سلول‌های بنیادی مزانشیمی پیوند شده و جلوگیری از وقوع آپوپتوز در آنها، مطالعات وسیعی انجام گرفته است. در بیشتر این مطالعات، می‌کوشند تا فاکتورهایی که از استرس اکسیداتیو در این سلول‌ها جلوگیری می‌کنند، مشخص و به کار گرفته شوند. یکی از این فاکتورها، آنتی‌اکسیدان‌ها بوده‌اند [۱۴]. بررسی آثار آنتی‌اکسیدانی مواد مختلف بر سلول‌های بنیادی مزانشیمی پیوند شده، نشان داده است که آنتی‌اکسیدان‌ها در جلوگیری از پیری زودرس این سلول‌ها بسیار مؤثرند و می‌توانند آپوپتوز و مرگ سلولی را به میزان قابل توجهی به تأخیر بیاندازند [۱۵]. پس به نظر می‌رسد اعمال درمان‌های آنتی‌اکسیدانی مکمل، درکنار سلول درمانی، ضروری باشد [۱۶]. مطالعات نشان می‌دهد که ترکیبات فعال از لحاظ زیستی با توانایی خنثی سازی رادیکال‌های آزاد و فعالیت آنتی‌اکسیدانی، به فراوانی در گیاهان دارویی یافت می‌شوند [۱۷].

زنجبیل با نام علمی Zingiber officinale از جمله گیاهان دارویی با ویژگی‌های فارماکولوژیکی مانند اثرات آنتی‌اکسیدانی، آنتی‌آپوپتوزی و ضدالتهابی است که از دیرباز علاوه‌بر یک مکمل غذایی، در علم پزشکی نیز کاربرد فراوانی داشته است [۱۸]. فعالیت آنتی‌اکسیدانی گیاهان به علت حضور جزء فنلی (فلاونوئید، تانن و آنتوسیانین) آنهاست، که این جزء در زنجبیل، جینجرول نامیده می‌شود. مطالعات نشان می‌دهد که جینجرول، عاملی موثر برای جلوگیری از تولید گونه‌های فعال اکسیژن و بیان COX-2القاء شده توسط اشعه ماورابنفش است [۱۹]. مطالعات دیگری نیز اظهار داشته‌اند که عصاره هیدروالکلی زنجبیل، دارای اثر حفاظتی بر سلول‌ها در برابر استرس اکسیداتیو است [۲۱، ۲۰]. از این‌رو، در تحقیق حاضر، اثر آنتی‌اکسیدانی عصاره زنجبیل بر سایتوتوکسیسیتی و القاء آپوپتوز ناشی از استرس اکسیداتیو در سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از بافت چربی انسان و مغز استخوان موش صحرایی مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

نوع مطالعه

این مطالعه پژوهشی، به صورت تجربی از مهر ۱۳۹۷ تا اسفند ۱۳۹۷ در مرکز تحقیقات سلولی- تکوینی دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد و آزمایشگاه مرکزی دانشگاه علوم پزشکی اصفهان انجام شد.

تهیه و کشت سلولی

سلول‌های بنیادی مزانشیمی بافت چربی انسان (AD- MSC) از مرکز ملی ذخایر ژنتیکی و زیستی ایران خریداری و سلول‌های بنیادی مزانشیمی بافت مغز استخوان موش، از استخوان‌های درشت نی (تیبیا) و ران (فمور) موش صحرایی استخراج شد. بدین منظور، موش‌های مورد نظر به‌وسیله کلروفرم بیهوش و کشته شدند. سپس توسط کیت جراحی، استخوان‌های درشت نی و ران آنها جدا شد. در مرحله بعد، سر و ته استخوان‌ها شکسته و مغز استخوان از طریق آسپیراسیون با محیط کشت خارج گردید. در ادامه، سلول‌ها در محیط کشت DMEM (Dul-becco's Modified Eagle Medium) (Gibco, USA) حاوی ۲۰ درصد FBS (Foetal Bovine Serum) (Gibco, USA) و ۱ درصد Penstrep (Penicillin-Streptomycin) (Gibco, USA) در انکوباتور (Memmert, Germany) با فشار ۵ درصد گاز CO_2، رطوبت ۹۰ درصد و دمای ۳۷ درجه سانتی گراد، در فلاسک ۷۵ کشت داده شدند. محیط کشت، هفته‌ای سه بار تعویض و براي برداشت کردن سلول‌ها از محلول تریپسین/EDTA استفاده شد.

تهیه عصاره زنجبیل

برای تهیه عصاره زنجبیل، ۵۰۰ گرم گیاه زنجبیل، خشک و پس از آسیاب کردن، پودر حاصل ۱۰روز در الکل ۹۶٪ قرار داده شد تا مواد مؤثر آن در الکل حل و خارج شود. سپس محتویات از کاغذ صافی گذارنده و محلول به‌دست آمده به وسیله دستگاه روتاری و در دمای ۵۰ درجه سانتیگراد و ۶۰ دور در دقیقه تغلیظ شد. عصاره حاصل را نیز تا زمان مصرف و تهیه دوزهای مورد نیاز در فریزر ۲۰- درجه سانتیگراد نگه‌داشتند [۲۲] و H_2O_2 (با نام تجاری Hydrogen peroxide solution و شماره محصول

۲۱۶۷۶۳) به صورت آماده و به حالت مایع (SIGMA AL-DRICH-) تهیه گردید.

سنجش سایتوتوکسیسیتی درسلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از بافت چربی انسان

سایتوتوکسیسیتی ناشی از استرس اکسیداتیو در سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از بافت چربی انسان تیمار شده با عصاره زنجبیل و H_2O_2 ، با استفاده از کیت MTS (Promega,USA) (با شماره محصول G5421) ارزیابی شد. به این ترتیب که تعداد ۵×۱۰^{۳} سلول در هر چاهک پلیت ۹۶ چاهکی کشت داده شد و به سبب پیش تیمار به مدت ۴ و ۶ ساعت در چهار گروه تست شامل غلظت‌های گوناگون عصاره زنجبیل (۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰ و ۴۰۰ میلیگرم/ میلیلیتر) و گروه‌های کنترل مثبت (سلول‌ها در معرض محیط کشت) و کنترل منفی (سلول‌ها در معرض H_2O_2) انکوبه شدند. سپس با غلظت ۲۰۰ میکرومولار H_2O_2 به مدت دو ساعت تیمار و انکوبه گردیدند. پس از پایان زمان انکوباسیون، محیط رویی تیمار جمع آوری شد و پس از افزودن مقدار ۲۰ میکرولیتر محلول MTS به هر چاهک، انکوباسیون ۴ ساعته صورت گرفت. در نهایت، جذب نمونه‌ها توسط دستگاه ELISA-readerبا طول موج ۴۹۲ نانومتر خوانش شد.

سنجش آپوپتوز در سلولهای بنیادی مزانشیمی مشتق از مغز استخوان موش صحرایی

وضعیت آپوپتوز در سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از مغز استخوان موش صحرایی، از طریق تست Annexin V-FITC/ PI، با استفاده از کیت FITC Annexin V Apoptosis Detection kit (BD Pharmingen, USA)، (با شماره محصول (۵۵۶۵۴۷))، مورد ارزیابی قرار گرفت. برای بررسی آپوپتوز، پیش تیمار به مدت چهار و شش ساعت با غلظت‌های ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰ و ۴۰۰ میلی‌گرم/ میلی‌لیتر عصاره زنجبیل و تیمار دو ساعته با غلظت ۲۰۰ میکرومولار H_2O_2 انجام شد. سلول‌ها را پس از شست‌وشو با PBS و آنزیم تریپسین (Gibco، آمریکا) از پلیت جدا و سانتریفوژ شدند. رنگ‌های Annexin-V متصل به FITC (BD-Pharmingen (BD و Propidium iodide; PI) (BD Pharmingen)را به میزان پنج میکرولیتر به مدت پانزده دقیقه در دمای اتاق و محیط تاریک انکوبه و برای شمارش به‌وسیله دستگاه فلوسایتومتری (FACS Calibur، آمریکا) آماده کردند. شمارش سلولی در واحد $۱۰^{۴}$ صورت گرفت. کلیه آزمایش‌ها با سه بار تکرار صورت پذیرفت.

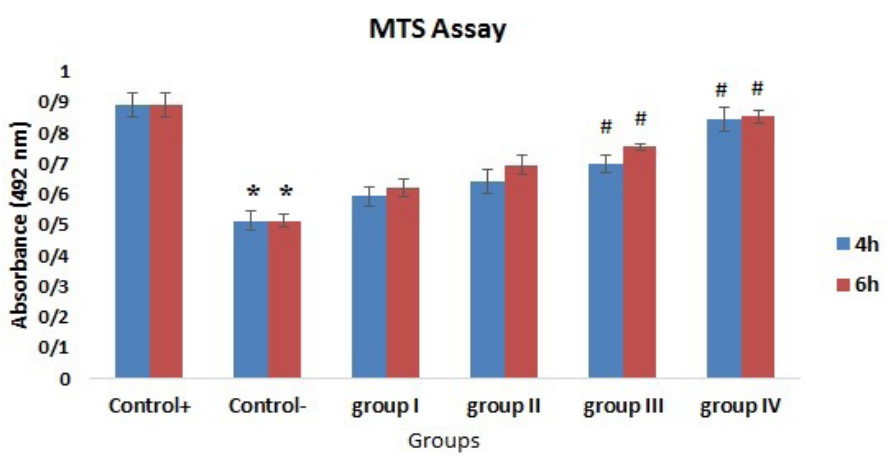
آنالیز آماری

بررسی آماری داده‌ها با استفاده از نرم افزار آماری SPSS، ورژن ۱۸ و آزمون آنالیز واریانس یک طرفه (ANOVA) انجام پذیرفت. حدود اطمینان برای همه‌ی آزمایشات، ۹۵٪ بود و $P\leq ۰/۰۵$ معنی دار محسوب شد

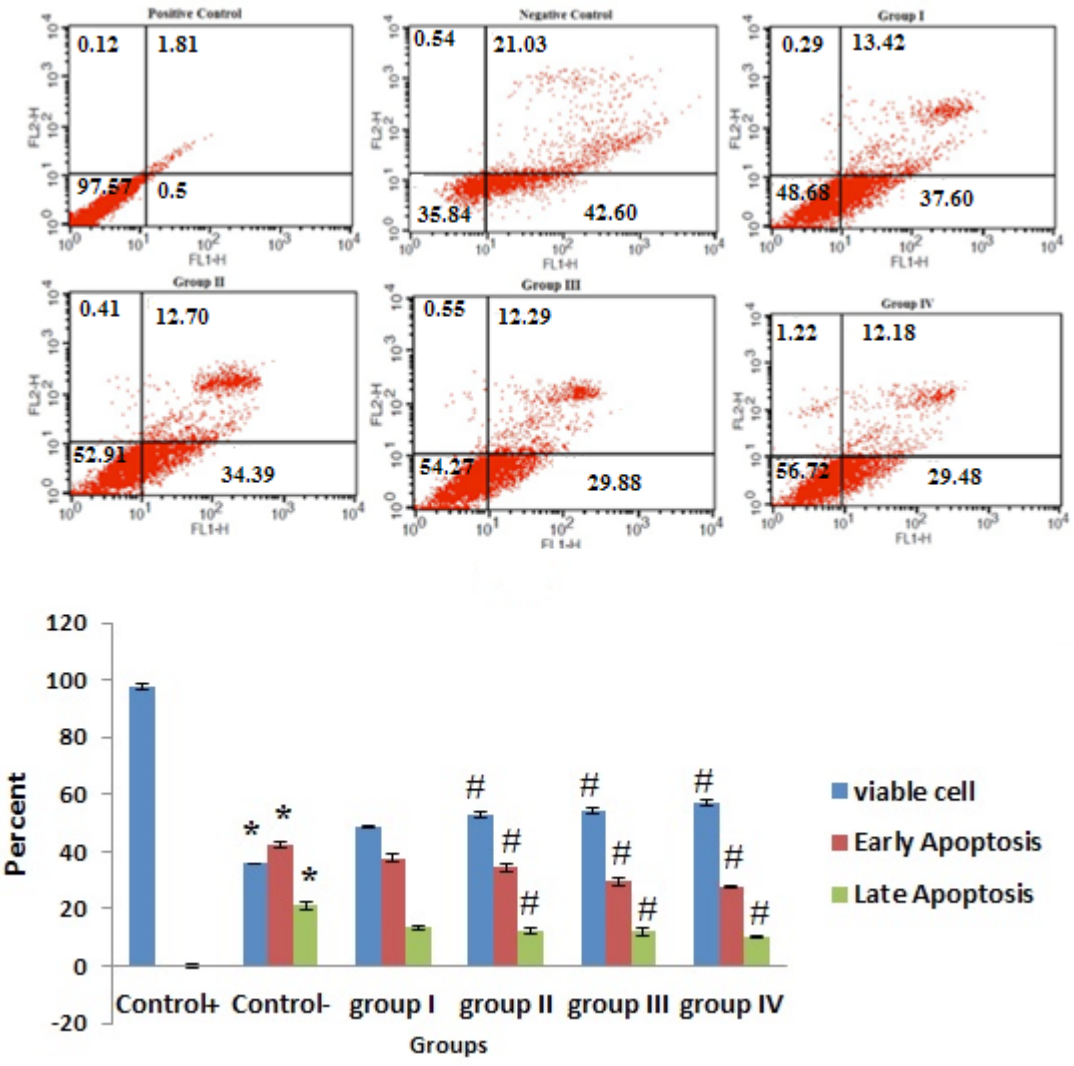
یافته‌ها

اثر عصاره زنجبیل برسایتوتوکسیسیتی ناشی از استرس اکسیداتیو در سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از بافت چربی انسان

سایتوتوکسیسیتی ناشی از استرس اکسیداتیو در سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از بافت چربی انسان تیمار شده با غلظت‌های مختلف عصاره زنجبیل (۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰ و ۴۰۰ میلیگرم/ میلیلیتر)، پس از گذشت زمان‌های انکوباسیون (چهار و شش ساعت با عصاره زنجبیل و دو ساعت با H_2O_2) با استفاده از تست MTS بررسی شد. نتایج حاصل شده از این تست نشان



تصویر ۱. درصد سلولهای زنده در سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از بافت چربی انسان تحت تیمار با غلظت‌های مختلف عصاره زنجبیل به مدت ۴ و ۶ ساعت $P\leq ۰/۰۵$در مقابل گروه کنترل مثبت (سلول‌ها در معرض محیط کشت)، $P\leq ۰/۰۵$در مقابل گروه کنترل منفی (سلولها در معرض H_2O_2).



تصویر ۲. درصد سلولهای زنده، آپوپتوز اولیه و آپوپتوز انتهایی در سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از مغز استخوان موش صحرایی تحت تیمار با غلظت‌های مختلف عصاره زنجبیل به مدت ۶ساعت

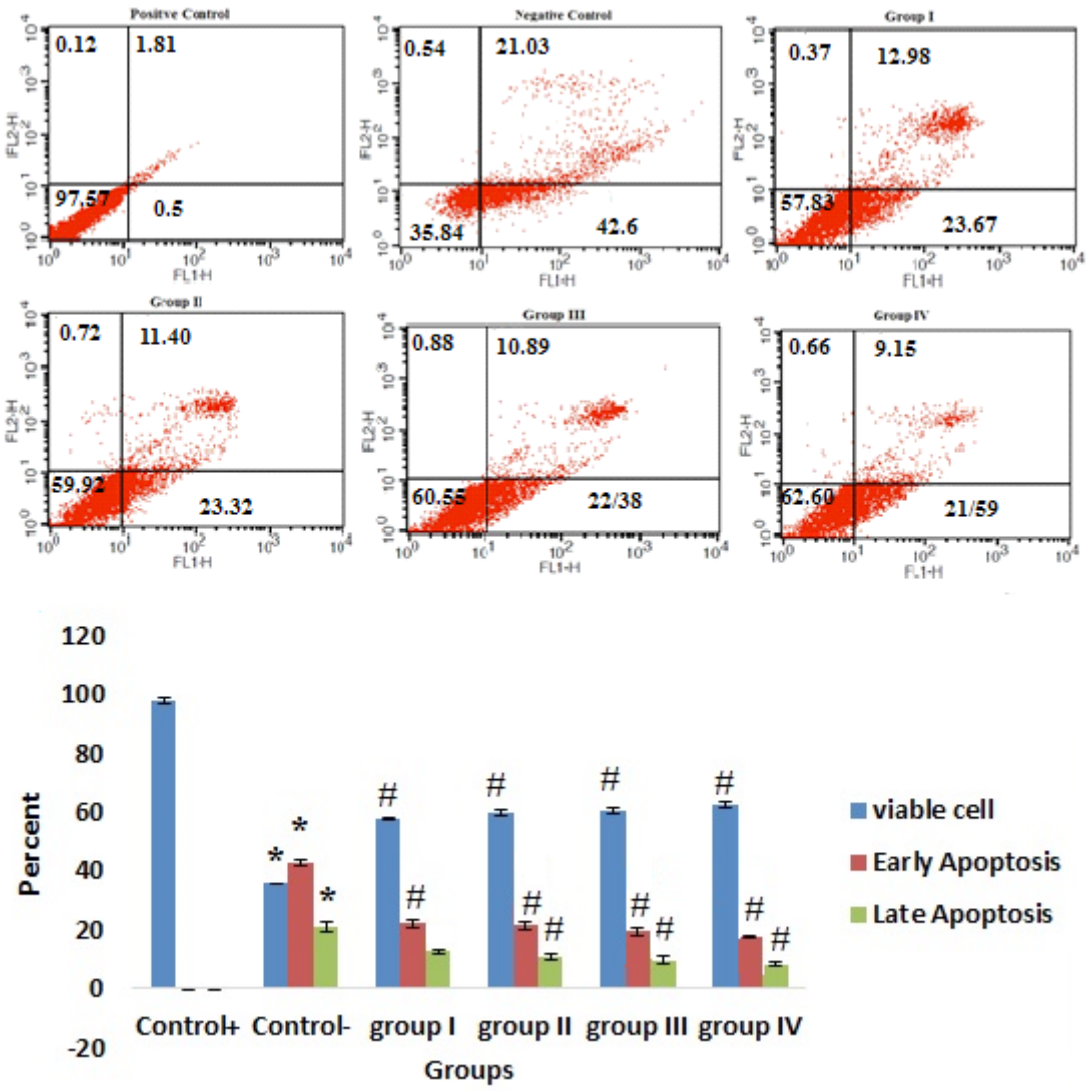
*P≤۰/۰۵ در مقابل گروه کنترل مثبت (سلولها در معرض محیط کشت)، #P≤۰/۰۵ در مقابل گروه کنترل منفی (سلولها در معرض H_2O_2).

می‌دهد که عصاره زنجبیل، توان زیستی سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از بافت چربی انسان را به‌صورت وابسته به دوز و زمان، افزایش می‌دهد (P≤۰/۰۲۲*) (تصویر شماره ۱).

اثر عصاره زنجبیل بر القاء آپوپتوز ناشی از استرس اکسیداتیو در سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از مغز استخوان موش صحرایی

برای بررسی وضعیت القاء آپوپتوز، از تست Annexin V-FITS استفاده شد. نتایج حاصل از این تست، از کاهش وابسته به دوز و زمان درصد مرگ در سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از مغز استخوان موش صحرایی در گروه‌های آزمایشی تحت تیمار خبر می‌دهد.

همان‌طور که در تصویر شماره ۲ دیده می‌شود، در تیمار چهار ساعته، درصد سلول‌هایی که در مراحل اولیه آپوپتوز هستند، از ۳۷/۶۰ درصد در غلظت ۵۰ میلی‌گرم/میلی‌لیتر به ۲۹/۴۸ درصد در غلظت ۴۰۰ میلی‌گرم/میلی‌لیتر رسیده است که این کاهش درصد آپوپتوز در همه غلظت‌ها نسبت به گروه کنترل منفی، دارای اختلاف معنی داری است. افزون بر این، درصد سلول‌هایی که در مراحل انتهایی آپوپتوز هستند، با افزایش دوز عصاره زنجبیل کمتر شده است. به گونه‌ای که از ۱۳/۴۲ درصد در غلظت ۵۰ میلی‌گرم/میلی‌لیتر به ۱۲/۱۸ درصد در غلظت۴۰۰ میلی‌گرم/میلی‌لیتر رسیده است که این کاهش درصد نیز در همه غلظت‌ها نسبت به گروه کنترل منفی معنی‌دار است (P≤۰/۰۳۰) (تصویر شماره ۲).



تصویر ۳. درصد سلولهای زنده، آپوپتوز اولیه و آپوپتوز انتهایی در سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از مغز استخوان موش صحرایی تحت تیمار با غلظت‌های مختلف عصاره زنجبیل به مدت ۴ساعت

*P≤۰/۰۵در مقابل گروه کنترل مثبت (سلولها در معرض محیط کشت)؛ #P≤۰/۰۵ در مقابل گروه کنترل منفی (سلولها در معرض H_2O_2).

همچنین در تیمار ۶ ساعته، درصد سلول‌هایی که در مراحل اولیه آپوپتوز هستند از ۲۳/۶۷ درصد در غلظت ۵۰ میلی‌گرم/میلی‌لیتر به ۲۱/۵۹ درصد در غلظت ۴۰۰ میلی‌گرم/میلی‌لیتر رسیده است که این کاهش درصد آپوپتوز در همه غلظت‌ها نسبت به گروه کنترل منفی، دارای اختلاف معنی‌داری است. همچنین درصد سلول‌هایی که در مراحل انتهایی آپوپتوز هستند با افزایش دوز و زمان تیمار با عصاره زنجبیل کمتر شده است؛ به گونه‌ای که از ۱۲/۹۸ درصد در غلظت ۵۰ میلی‌گرم/میلی‌لیتر به ۹/۱۵ درصد در غلظت ۴۰۰ میلی‌گرم/میلی‌لیتر رسیده که این کاهش درصد آپوپتوز در همه غلظت‌ها نسبت به گروه کنترل منفی، معنی‌دار است(P≤۰/۰۱۶) (تصویر شماره ۳).

بحث

طی فعالیت‌های نرمال سلول‌های به کارگرفته شده در سلول درمانی، گونه‌های فعال اکسیژن تولید خواهد شد که قدرت واکنش پذیری بالایی با DNA، پروتئین، کربوهیدرات‌ها و لیپیدها دارند و آسیب‌های جبران ناپذیری را به این ماکرو ملکول‌ها وارد می‌کنند. در سلول، سیستم‌های خاصی برای مقابله با آسیب حاصل از گونه‌های فعال اکسیژن وجود دارد که سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی نامیده می‌شود. با تولید بیش از حد این گونه‌های فعال، دفاع آنتی‌اکسیدانی سلولی تخریب می‌شود که به این حالت، استرس اکسیداتیو می‌گویند. اگر استرس اکسیداتیو ادامه

یافت، آسیب‌های اکسیداتیو به بیوملکول‌های حیاتی وارد می‌آید و تجمع این آسیب‌ها به برخی آثار بیولوژیک مانند تغییر در انتقال پیام، تغییر در بیان ژن و جهش می‌انجامد. سلول‌ها به سرعت با اعمال مجموعه‌ای از پاسخ‌های بیولوژیک مانند توقف چرخه سلولی، آپوپتوز را راه‌اندازی می‌کنند [۲۳]. آنتی‌اکسیدان‌ها، موادی هستند که در غلظت بسیار کم، اکسیداسیون را مهار می کنند یا به تأخیر می‌اندازند. آنتی‌اکسیدان‌ها با مکانیسم‌های گوناگونی عمل می‌کنند برداشت گونه‌های فعال اکسیژن مانند سوپر اکسید (O_2) و هیدروژن پراکسید (H_2O_2) یکی از این مکانیسم‌هاست [۲۴]. ترکیبات فنولی، دسته‌ای از ترکیبات با فعالیت آنتی‌اکسیدانی است که در عصاره زنجبیل وجود دارد. زنجبیل از گیاهان دارویی مهمی است که از دیرباز برای درمان بیماری‌های گوناگون استفاده شده است [۱۹]. اکنون، آثار آنتی‌اکسیدانی زنجبیل، پس از سال‌ها مطالعه در اختیار ما قرار گرفته است. برای مثال، نتایج حاصل از مطالعه‌ای در سال ۱۹۹۴، اثر آنتی‌اکسیدانی زنجبیل بر اکسیداسیون ناشی از ترکیبات لیپیدی موجود در غذا را نشان داد [۲۵]. با بررسی مطالعه دیگری که زنجبیل را عامل محافظت کننده از سلول در برابر استرس اکسیداتیو معرفی کرده است در می یابیم که ترکیبات گیاه زنجبیل، از تولید گونه‌های فعال اکسیژن جلوگیری می کند [۲۶].

بررسی آثار آنتی‌اکسیدانی و ضد التهابی زنجبیل و مشتقات آن در سال ۲۰۱۰ نیز توان آنتی‌اکسیدانی آن‌ها را به اثبات رساند [۲۷]. در سال ۲۰۱۵، اثر گیاه زنجبیل بر کولیت اولسراتیو در موش‌های BALB/C ارزیابی شد. نتایج نشان داد که زنجبیل از طریق فعالیت آنتی‌اکسیدانی و ضد التهابی، مانع از بروز کولیت اولسراتیو می‌شود [۲۸]. در سال ۲۰۱۷، خواص آنتی‌اکسیدانی، ضد التهابی و ضد آپوپتوزی زنجبیل بر آسیب‌های اکسیداتیو ناشی از آفتکش کلرپیریفوس در مغز، تخمدان و رحم رت مورد بررسی قرار گرفت. نتایج، اثر حفاظتی زنجبیل از سلول‌های رت در مقابل سایتوتوکسیستی ناشی از کلرپیریفوس را نشان داد [۲۹]. در سال ۲۰۱۹، نتایج ارزیابی نقش زنجبیل بر پاسخ‌های استرسی ناشی از بنزوآلفاپیرین در موش، اثر آنتی‌اکسیدانی آن را نمایان کرد [۳۰]. در این مطالعه نیز اثر آنتی‌اکسیدانی عصاره زنجبیل بر سایتوتوکسیسیتی و القاء آپوپتوز ناشی از استرس اکسیداتیو در سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از بافت چربی انسان و مغز استخوان موش صحرایی، بررسی شد. نتایج حاصله نشان داد که عصاره زنجبیل، با فعالیت به عنوان آنتی اکسیدان، درصد مرگ سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از بافت چربی انسان و مغز استخوان موش صحرایی را کاهش می‌دهد که موفقیت هر چه بیشتر استفاده از سلول‌های بنیادی مزانشیمی در سلول درمانی را تضمین خواهد کرد.

نتیجه‌گیری

پیش درمان یا درمان مکمل سلول‌های بنیادی مزانشیمی با عصاره زنجبیل، راهکار جدیدی در راستای افزایش بقا و بهبود عملکرد سلول‌های بنیادی مزانشیمی در ترمیم بافت‌های نارسا و آسیب دیده، برای بهبود کیفیت سلول درمانی در آینده است.

ملاحظات اخلاقی

پیروی از اصول اخلاق پژوهش

این مطالعه با کد اخلاق IR.IAU.SHK.REC.1397.028 به تصویب کمیته اخلاق معاونت پژوهشی دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد رسید.

حامی مالی

این مقاله، از پایان نامه کارشناسی ارشد نویسنده اول، در گروه بیوشیمی، دانشکده علوم‌پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد استخراج شده است و هیچ کمک مالی خاصی از سوی سازمان‌های تأمین مالی در بخش‌های دولتی، تجاری و غیرانتفاعی دریافت نکرده است.

مشارکت نویسندگان

تمام نویسندگان در طراحی، اجرا و نگارش همه بخش‌های پژوهش حاضر مشارکت داشته‌اند.

تعارض منافع

بنابر اظهار نویسندگان این مقاله تعارض منافع ندارد.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه آزاد واحد شهرکرد و کلیه عزیزانی که در اجرای این پژوهش نهایت همکاری را داشتند، کمال تشکر و قدردانی به عمل می آید.

Refrences

[1] Le Blanc K, Rasmusson I, Sundberg B, Götherström C, Hassan M, Uzunel M, et al. Treatment of severe acute graft-versus-host disease with third party haploidentical mesenchymal stem cells. Lancet. 2004; 363(9419):1439-41. [DOI:10.1016/S0140-6736(04)16104-7][PMID]

[2] Kuo TK, Hung SP, Chuang CH, Chen CT, Shih YRV, Fang SCY, et al. Stem cell therapy for liver disease: parameters governing the success of using bone marrow mesenchymal stem cells. Gastroenterology. 2008; 134(7):2111-21. [DOI:10.1053/j.gastro.2008.03.015] [PMID][PMCID]

[3] Patel AN, Genovese J. Potential clinical application of adult human mesenchymal stem cell (Prochymal) therapy. Stem Cell Cloning. 2011; 4:61-72. [DOI:10.2147/SCCAA.S11991]

[4] Nassiri Asl M, Aali E. [Review on the mesenchymal stem cells and their potential application in regenerative medicine (Persian)]. J Qazvin Univ Med Sci. 2018; 21(6):74-89. [DOI:10.29252/qums.21.6.89]

[5] Pournasr Khakbaz B, Baharvand H. [Human mesenchymal stem cells and their clinical application (Persian)]. J Iran Anat Sci. 2007; 5(19):157-206. https://www.sid.ir/en/journal/ViewPaper.aspx?id=113590

[6] Parson AB. The proteus effect: Stem cells and their promise for medicine. Washington, D.C.: Joseph Henry Press; 2004. [DOI:10.1172/JCI25763]

[7] Song L, Tuan RS. Transdifferentiation potential of human mesenchymal stem cells derived from bone marrow. FASEB J. 2004; 18(9):980-2. [DOI:10.1096/fj.03-1100fje][PMID]

[8] Oubari F, Amirizade N, Mohammadpour H, Nakhlestani M, Nikougoftar Zarif M. [The important role of FLT3-L in ex vivo expansion of hematopoietic stem cells following co-culture with mesenchymal stem cells (Persian)]. Cell Journal (Yakhteh). 2015; 17(2):201-10. [DOI:10.22074/cellj.2015.3715]

[9] Oubari F, Nikougoftar Zarif M, Amirizadeh N, Shaiegan M, Atarodi K, Nakhlestani M, et al. [Isolation and expansion of Mesenchymal Stem cells from placenta (Persian)]. Sci J Iran Blood Transfus Organ. 2013; 10:222-30. http://bloodjournal.ir/article-1-791-en.html

[10] Dehghani Fard A, Saki N, Ahmadvand M, Mahmoodinia Maymand M, Mosahebi Mohammadi M, Soleimani M. [Mesenchymal stem cell biology, application and its role in regenerative medicine (Persian)]. Sci J Iran Blood Transfus Organ. 2012; 8(4):306-20. http://bloodjournal.ir/article-1-586-en.html

[11] Ryan JM, Barry FP, Murphy JM, Mahon BP. Mesenchymal stem cells avoid allogeneic ejection. J Inflamm (Lond). 2005; 2(8):1-11. [DOI:10.1186/1476-9255-2-8][PMID][PMCID]

[12] Nasiri F, Amiri F, Mohammadipour M, Molaei S, Habibi Roudkenar M, Jalili MA. [H_2O_2-preconditioned mesenchymal stem cell regenerative effects on acute liver failure mice (Persian)]. Sci J Iran Blood Transfus Organ. 2015; 12(2):111-24. http://bloodjournal.ir/article-1-916-en.html

[13] Baksh D, Song L, Tuan RS. Adult mesenchymal stem cells: Characterization, differentiation and application in cell and gene therapy. J Cell Mol Med. 2004; 8(3):301-16. [DOI:10.1111/j.1582-4934.2004.tb00320.x]

[14] Chapel A, Bertho JM Bensidhoum M, Fouillard L, Young RG, Frick J, et al. Mesenchymal stem cells home to injure tissues when co-infused with hematopoietics cell to treat at radiation, induced-multi, organfailure syndrome. J Gene Med. 2003; 5(12):1028-38. [DOI:10.1002/jgm.452][PMID]

[15] Marquez-Curtis LA, Janowska-Wieczork A, McGann LE, Elliott JAW. Mesenchymal stromal cells derived from various tissues: Biological, clinical and cryopreservation aspects. Cryobiology. 2015; 71:181-97. [DOI:10.1016/j.cryobiol.2015.07.003][PMID]

[16] Nasir GA, Mohsin S, Khan M, Shams S, Ali G, Khan SN, et al. Mesenchymal stem cells and Interleukin-6 attenuate liver fibrosis in mice. J Transl Med. 2013; 11(3):78-97. [DOI:10.1186/1479-5876-11-78] [PMID][PMCID]

[17] Bahmani M, Saki K, Shahsavari S, Rafieian-Kopaei M, Sepahvand R, Adineh A. Identification of medicinal plants effective in infectious diseases in Urmia, northwest of Iran. Asi Paci J Trop Biomed. 2015; 5(10):858-64. [DOI:10.1016/j.apjtb.2015.06.004]

[18] Dadfar F, Hosseini S. E, Bahaoddini A. [A review of phytochemical, pharmacological and physiological properties of ginger (zingiber officinale) (Persian)]. Clin Excell. 2014; 3(1):72-86. http://ce.mazums.ac.ir/article-1-133-en.html

[19] Haksar A, Sharma A, Chawla R, Kumar R, Arora R, Singh S, et al. Zingiber officinale exhibits behavioral radioprotection against radiation. Pharmacol Biochem Behav. 2006; 84(2):179-88. [DOI:10.1016/j.pbb.2006.04.008][PMID]

[20] Stoilova I, Krastanov A, Stoyanova A, Denev P, Gargova S. Antioxidant activity of a ginger extract (Zingiber officinale). Food Chem 2007; 102(3):764-70. [DOI:10.1016/j.foodchem.2006.06.023]

[21] Mirazi N, Karami Z. [The protective effect of hydroalcoholic extract from rhizome of Zingiber officinale L. on carbon tetrachloride-induced hepatic injury in male rat (Persian)]. J Kashan Univ Med Sci (FEYZ). 2016; 20(4):297-305. http://feyz.kaums.ac.ir/article-1-3125-en.html

[22] Johari H, Sharifi E, Delirnasab F, Hemayatkhah V, Kargar H, Nikpoor M. [The effect of hydro-alcoholic extracts of ginger on lead detoxification of kidney in the immature wistar rats (Persian)]. J Rafsanjan Uni Med Sci. 2013; 12(6):417-24. http://journal.rums.ac.ir/article-1-5290-en.html

[23] Khoshtabiat L, Mahdavi M. [The role of oxidative stress in proliferation and cell death (Persian)]. J Mazandaran Univ Med Sci. 2015; 25(127):130-45. http://jmums.mazums.ac.ir/article-1-5946-en.html

[24] Halliwell B. Free radicals and antioxidants - quo vadis? Trends Pharmacol Sci. 2011; 32(3):125-30. [DOI:10.1016/j.tips.2010.12.002]

[25] Aeschbach R, Löliger J, Scott BC, Murcia A, Butler J, Halliwell B, et al. Antioxidant actions of thymol, carvacrol, 6-gingerol, zingerone and hydroxytyrosol. Food Chem Toxicol. 1994; 32(1):31-6. [DOI:10.1016/0278-6915(84)90033-4][PMID]

[26] Kim JK, Kim Y, Na KM, Surh AJ, Kim TY. Gingerol prevents UVB induced Ros production and cox-2 expression invitro and invivo. Free Rad Res. 2007; 41(5):603-14. [DOI:10.1080/10715760701209896] [PMID]

[27] Dugasani S, Pichika MR, Nadarajah VD, Balijepalli MK, Tandra S, Korlakunta JN. Comparative antioxidant and anti-inflammatory effects of [6]-gingerol,[8]-gingerol,[10]-gingerol and [6]-shogaol. J Ethnopharmacol. 2010; 127(2):515-20. [DOI:10.1016/j.jep.2009.10.004] [PMID]

[28] Ajayi BO, Adedara IA, Farombi EO. Pharmacological activity of 6-gingerol in dextran sulphate sodium-induced ulcerative colitis in BALB/c mice. Phytother Res. 2015; 29(4):566-72. [DOI:10.1002/ptr.5286][PMID]

[29] Abolaji AO, Ojo M, Afolabi TT, Arowoogun MD, Nwawolor D, Farombi EO. Protective properties of 6-gingerol-rich fraction from Zingiber officinale (Ginger) on chlorpyrifos-induced oxidative damage and inflammation in the brain, ovary and uterus of rats. Chem Biol Interact. 2017; 270:15-23. [DOI:10.1016/j.cbi.2017.03.017]

[30] Ajayi B. O, Adedara I. A. 6-Gingerol abates benzo [a] pyrene-induced colonic injury via suppression of oxido-inflammatory stress responses in BALB/c mice. Chemico-biological interactions 2019; 307:1-7. [DOI:10.1016/j.cbi.2019.04.026]

This Page Intentionally Left Blank