

ORIGINAL ARTICLE

Effect of Gallic Acid on Alkaline Phosphatase Gene Expression in Vascular Smooth Muscle Cells

Tayebeh Ghanavati¹,
Keyhan Ghatreh-samani²,
Effat Farrokhi³,
Esfandyar Heydarian⁴,
Morteza Nikookar⁵

¹ MSc Student in Clinical Biochemistry, Faculty of Medicine, Shahrekord University of Medical Sciences, Shahrekord, Iran

² Associate Professor, Department of Biochemistry, Clinical Biochemistry Research Center, Faculty of Medicine, Shahrekord University of Medical Sciences, Shahrekord, Iran

³ Assistant Professor, Department of Genetic, Cellular and Molecular Research Center, Faculty of Medicine, Shahrekord University of Medical Sciences, Shahrekord, Iran

⁴ Professor, Department of Biochemistry, Clinical Biochemistry Research Center, Faculty of Medicine, Shahrekord University of Medical Sciences, Shahrekord, Iran

⁵ Lecturer, Department of Biochemistry, Medical Plants Research Center, Faculty of Medicine, Shahrekord University of Medical Sciences, Shahrekord, Iran

(Received June 15, 2015 Accepted August 24, 2015)

Abstract

Background and purpose: Vascular calcification is an important factor in pathogenesis of atherosclerosis. Studies have shown that alkaline phosphatase increases vascular calcification. Here we investigated the effect of gallic acid on alkaline phosphatase gene expression in vascular smooth muscle cells (VSMCs).

Materials and methods: In this experimental study humans aorta VSMCs were incubated with beta glycerol phosphate as calcification-inducing media. Then these cells were treated with 160, 180 and 200 μMol concentration of gallic acid for 24h, 48h and 72h. The total RNA was extracted and cDNA was synthesized and then alkaline phosphatase expression was measured by real time PCR. Alkaline phosphatase specific activity was measured by spectrophotometry.

Results: Overall, 160, 180 and 200 μMol concentration of gallic acid decreased alkaline phosphatase gene expression in vascular smooth muscle cell by 1.98, 2.03, and 3.16 folds, respectively after 72h compared with the control group. The alkaline phosphatase specific activity also decreased compared to that of the control group.

Conclusion: Our results showed that gallic acid decreased the expression and activity of alkaline phosphatase suggesting that this antioxidant compound may attenuate vascular calcification.

Keywords: Atherosclerosis, gallic acid, alkaline phosphatase, vascular smooth muscle cells

J Mazandaran Univ Med Sci 2015; 25(129): 17-25 (Persian).

تاثیر اسید گالیک بر بیان ژن آلکالین فسفاتاز در سلول های عضلانی صاف دیواره رگ ها

طیبه قنواتی^۱
کیهان قطره سامانی^۲
عفت فرخی^۳
اسفندیار حیدریان^۴
مرتضی نیکوکار^۵

چکیده

سابقه و هدف: کلسیفیه شدن رگ ها یکی از عوامل مهم در پاتوژنز آترواسکلروز محسوب می شود. مطالعات نشان داده است آنزیم آلکالین فسفاتاز فرآیند کلسیفیه شدن رگ ها را افزایش می دهد. در این مطالعه اثر اسید گالیک بر بیان ژن آلکالین فسفاتاز در سلول های عضلات صاف عروق مورد بررسی قرار گرفته است.

مواد و روش ها: در این مطالعه تجربی، سلول های عضله صاف عروق آئورت انسانی جهت القا کلسیفیه شدن، با بتاگلیسرول فسفات مجاور گردید. سپس این سلول ها با غلظت های ۱۸۰، ۱۶۰ و ۲۰۰ میکرومولار اسید گالیک به مدت ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت تیمار شدند. بعد از استخراج RNA و سنتز cDNA، میزان بیان ژن آلکالین فسفاتاز با روش Real Time PCR مورد سنجش قرار گرفت. هم چنین فعالیت ویژه آلکالین فسفاتاز در نمونه های مورد مطالعه به روش رنگ سنجی اندازه گیری شد. داده ها با نرم افزار SPSS و آزمون آماری نان پارامتریک Mann-whitney آنالیز و مقایسه شدند.

یافته ها: نتایج نشان داد که اسید گالیک در غلظت های ۱۶۰ و ۱۸۰ و ۲۰۰ میکرومول پس از ۷۲ ساعت میزان بیان ژن آلکالین فسفاتاز القا شده با بتاگلیسرول را در مقایسه با گروه کنترل به ترتیب ۱/۹۸، ۲/۰۳ و ۳/۱۶ بار کاهش داده است. فعالیت ویژه آلکالین فسفاتاز نیز پس از تیمار سلول ها نسبت به گروه کنترل کاهش نشان داده است.

استنتاج: نتایج ما نشان داد، اسید گالیک بیان ژن و فعالیت ویژه آلکالین فسفاتاز را کاهش می دهد. لذا به نظر می رسد این ترکیب آنتی اکسیدانی احتمالاً با کاهش بیان آلکالین فسفاتاز باعث کاهش کلسیفیه شدن رگ ها می گردد.

واژه های کلیدی: آترواسکلروز، اسید گالیک، آلکالین فسفاتاز، سلول عضلانی صاف دیواره رگ ها

مقدمه

این بیماری یکی از دلایل عمده مرگ و میر در بزرگسالان است و هزینه های هنگفتی را به جوامع تحمیل می کند (۲). کلسیفیه شدن دیواره عروق به عنوان یک ریسک

آترواسکلروز یک بیماری التهابی مزمن و چند علتی است که در این بیماری رگ ها حالت ارتجاعی خود را از دست می دهند و قطر رگ ها تغییر می کند (۳-۱).

Email: kgsamani@yahoo.com

مؤلف مسئول: کیهان قطره سامانی - شهر کرد، رحمتیه، دانشکده پزشکی، گروه بیوشیمی

۱. دانشجوی کارشناسی ارشد بیوشیمی بالینی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهر کرد، شهر کرد، ایران
۲. دانشیار، گروه بیوشیمی، مرکز تحقیقات بیوشیمی بالینی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهر کرد، شهر کرد، ایران
۳. استادیار، گروه ژنتیک، مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهر کرد، شهر کرد، ایران
۴. استاد، گروه بیوشیمی، مرکز تحقیقات بیوشیمی بالینی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهر کرد، شهر کرد، ایران
۵. مربی، گروه بیوشیمی، مرکز تحقیقات گیاهان دارویی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهر کرد، شهر کرد، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۲/۲۵ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات: ۱۳۹۴/۴/۱۱ تاریخ تصویب: ۱۳۹۴/۶/۲

به دنبال راه‌هایی برای برگشت آتروم هستند (۱۴). بنابراین با توجه به نقش آلکالین فسفاتاز در آترواسکلروز و توجه به نقش ضد آتروژنیک اسید گالیک، احتمالاً اسید گالیک می‌تواند مانع از بیان ژن آلکالین فسفاتاز در سلول‌های دیواره عروق شود. هدف از انجام این مطالعه بررسی تاثیر اسید گالیک بر بیان ژن آلکالین فسفاتاز در سلول‌های عضلات صاف عروق می‌باشد.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه تجربی، سلول‌های عضلات صاف عرق آئورت انسانی (HA/VSMC=Human Aorta Vascular Smooth Muscle Cell) از بانک سلولی انستیتو پاستور ایران تهیه شدند. سلول‌ها در محیط کشت F12k کشت داده شدند. ترکیبات این محیط کشت شامل: ۰/۵۰ mg/ml اسکوربیک اسید، ۰/۰۱ mg/ml انسولین، ۰/۰۵ mg/ml ترانسفرین، ۱۰ mg/ml سدیم سلنیت، ۰/۰۳ mg/ml مکمل‌های رشد سلول‌های اندوتلیال، سرم جنین گاوی ۰/۱۰، بافر ۱۰ mm HEPES، U/ml، ۱۰۰ پنی سیلین ۱۰۰ μg/ml، استرپتومایسین و ۰/۰۱ آمفوتریسین می‌باشد. جهت القاء کلسیفیه شدن، به محیط کشت بتاگلیسرول فسفات (۱۰ میلی مولار) اضافه گردید (۲۲).

سلول‌ها در فلاسک مناسب در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد و ۵ درصد CO₂ و رطوبت مناسب کشت داده شد. کنترل روزانه سلول‌های در حال کشت از نظر شرایط رشد و تقسیم سلولی و غیره انجام شد و بر حسب نیاز پاساژ داده شدند. بعد از رشد و تکثیر سلول‌ها، از پاساژ ۴ تا ۶ برای انجام آزمایشات استفاده گردید. برای مشخص نمودن غلظت مهارکنندگی ۵۰ درصد اسید گالیک بر روی سلول‌ها از آزمون MTT {2,5-diphenyltetrazolium bromide 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)} استفاده شد، بدین منظور در پلیت ۹۶ خانه‌ای حدود ۸۰۰۰ سلول در حجم ۱۵۰ میکرولیتر در هر چاهک توزیع گردید. پس از مدت ۲۴

فاکتور پارگی آتروم در آترواسکلروز مطرح می‌باشد (۵،۴). مطالعات نشان می‌دهد کلسیفیه شدن دیواره رگ‌ها یک فرآیند فعال و تنظیم شده است (۶). علت تشکیل کلسیفیه رگ‌ها، تمایز سلول‌های عروقی به دنبال تحریک با سایتوکاین‌ها، فاکتورهای التهابی و لیپوپروتئین‌های تغییر یافته در پلاک‌های آتروم می‌باشد (۷). کلسیفیه شدن آترواسکروتیک با تشکیل استخوان مشابه است (۹،۸). مطالعات نشان می‌دهد عروق کلسیفیه شده و سلول‌های عروقی در محیط کشت، پروتئین‌های ماتریکس استخوان و فاکتورهای تنظیمی از جمله استئوپوننتین (OPN)، استئونکتین (ON)، سیالوپروتئین استخوانی (BSP) و آلکالین فسفاتاز را بیان می‌کنند (۱۰،۸). آلکالین فسفاتاز آنزیمی از دسته هیدرولازها می‌باشد (۱۱). این آنزیم فسفات به این دلیل آلکالین نام گرفته است که در محیط‌های قلیایی فعالیتش زیاد می‌شود (۱۲). آلکالین فسفاتاز عمدتاً به غشای سلولی متصل است (۱۳) و مطالعات نشان داده است که سطح بالای غلظت آلکالین فسفاتاز با بیماری آترواسکلروز مرتبط است (۱۱). در واقع آلکالین فسفاتاز فرآیند کلسیفیه شدن رگ‌ها را افزایش می‌دهد (۱۴). گالیک اسید Gallic acid با فرمول شیمیایی C₇H₆O₅ و نام شیمیایی تری هیدروکسی بنزوئیک اسید (۱۵) در گیاهان مختلف از جمله بلوط، چای، سماق، دانه انگور و سیب وجود دارد (۱۶،۱۷). اسید گالیک دارای خاصیت آنتی‌اکسیدانی و ضد قارچی و آنتی‌ویروسی می‌باشد. هم‌چنین استر موجود در اسید گالیک با کاهش استرس اکسیداتیو از آسیب‌های سلولی جلوگیری می‌کند (۱۷،۱۸). مطالعات نشان داده ترکیبات پلی‌فنولی مثل اتیل گالات در انگور (۱۹) و هم‌چنین ترکیبات پلی‌فنولی از جمله اسید گالیک در عصاره برگ نیلوفر (۲۰) باعث مهار مهاجرت سلول‌های صاف عضلات رگ‌ها می‌گردند و احتمالاً در پیشگیری از آترواسکلروز موثر می‌باشند (۲۱). درمان‌های رایج در بیماران با گرفتگی عروق، باعث کند شدن فرآیند تشکیل آتروم می‌گردند، در حالی که در مطالعات اخیر،

ساعت، سلول‌ها با غلظت‌های مختلف اسید گالیک (۴۰ تا ۶۰۰ میکرومولار) در کنار نمونه کنترل به مدت ۴۸ ساعت تیمار شدند. برای هر غلظت سه تکرار در نظر گرفته شد. پس از این مدت، MTT با غلظت ۱۲ میلی‌مولار به هر چاهک اضافه شد. در نهایت با افزودن دی میتل سولفو کساید پس از ۱۰ دقیقه میزان جذب نوری ایجاد شده در طول موج ۴۹۲ nm با مشاهده گر ایزا (ELISA Reader, Awareness-USA) قرائت گردید. سلول‌ها در پلیت ۱۲ خانه ای مخصوص کشت به میزان ۲۰ هزار در هر چاهک در محیط کشت حاوی بتا گلیسرول فسفات تقسیم گردید. پس از رسیدن تراکم سلول‌ها به حدود ۸۰ درصد، سلول‌ها را با غلظت‌های ۱۸۰، ۱۶۰ و ۲۰۰ میکرومولار اسید گالیک در مقابل گروه کنترل تیمار شدند. برای هر غلظت ۳ تکرار در نظر گرفته شد. سپس سلول‌های تیمار شده پس از ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت در ۳۷ درجه سانتی‌گراد با رطوبت ۹۵ درصد و ۵ درصد دی‌اکسید کربن انکوبه شدند. دو گروه کنترل در نظر گرفته شد. یکی فاقد بتا گلیسرول فسفات و اسید گالیک و دیگری حاوی تمام ترکیبات موجود در گروه‌های تیمار شده، به جز اسید گالیک بود. پلیت‌های مشابهی جهت تعیین فعالیت ویژه آلکالین فسفاتاز در نظر گرفته شد. با توجه به حساس بودن اسید گالیک به نور، تهیه غلظت‌های مختلف اسید گالیک و افزودن آن‌ها به محیط کشت در تاریکی انجام شد. استخراج RNA با استفاده از کیت ترایزول Bioflux (Malaysia-Triazol) و طبق دستورالعمل کیت مربوطه انجام گردید و غلظت آن با نانودراپ تعیین شد. هم‌چنین کیفیت RNA با محاسبه A_{260}/A_{280} بررسی و تأیید گردید. هم‌چنین به منظور تهیه cDNA از روی RNA از کیت Thermo-Canada طبق دستورالعمل کیت استفاده شد و در حدود ۳ میکروگرم از هر نمونه RNA حاصله برای ساختن cDNA به کار رفت. بیان ژن آلکالین فسفاتاز با روش Real time PCR و با استفاده از SYBR green و توسط دستگاه

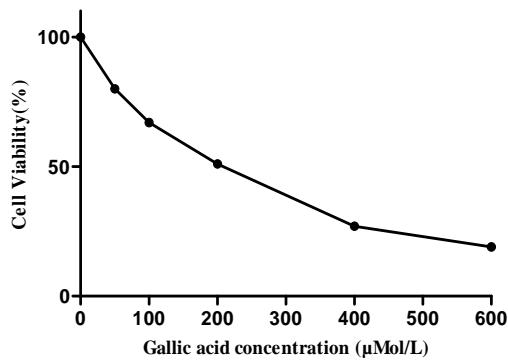
Rotor-Gene (Corbett3000-Australia) بررسی گردید. مقادیر مواد مورد استفاده در هر واکنش شامل ۰/۲ میکرولیتر از هر پرایمر (با غلظت ۱۰ میکرومول)، ۵۰ نانوگرم cDNA و ۵ میکرولیتر Master mix که با آب مقطر فاقد نوکلئاز به حجم ۱۰ میکرولیتر رسید، بود. از ژن GAPDH به عنوان ژن مرجع استفاده گردید و میزان بیان ژن آلکالین فسفاتاز در گروه‌های تیمار شده و کنترل مورد اندازه‌گیری قرار گرفت. شرایط انجام آزمایش شامل: ۱۰ دقیقه فعال شدن آنزیم در ۹۵ درجه سانتی‌گراد، ۴۰ سیکل شامل ۹۵ درجه در ۱۵ ثانیه، ۵۹ درجه سانتی‌گراد در ۲۰ ثانیه و ۷۲ درجه سانتی‌گراد در ۲۵ ثانیه بوده است. توالی پرایمرهای مورد استفاده در جدول شماره ۱ آورده شده است.

جدول شماره ۱: توالی پرایمرهای مورد استفاده و طول محصول

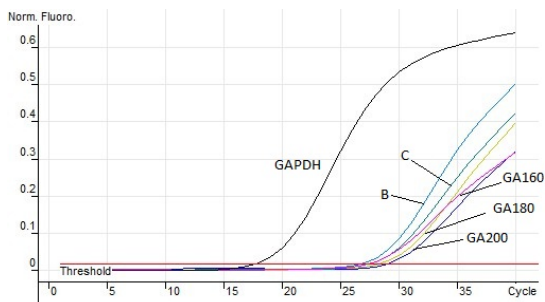
منبع	طول محصول (bp)	توالی پرایمر	ژن
GAPDH	۱۱۲	Forward: 5'ACACCCACTCCTCCACCTTTG 3'	۳۳
		Reverse: 5'TCCACCCACCTGTGCTGTAG 3'	
ALP	۱۶۲	Forward: 5'ACCATTCCCACGICTTCACATTTG 3'	۲۴
		Reverse: 5'AGACATTCTCTCGTTCACCGCC 3'	

میزان بیان ژن آلکالین فسفاتاز در گروه‌های تیمار شده و کنترل مورد اندازه‌گیری قرار گرفت و پس از انجام آزمایش به منظور تأیید تکثیر قطعات اختصاصی هر ژن و عدم حضور محصولات غیر اختصاصی و پرایمر دایمر نمودار منحنی ذوب (Melting Curve) برای هر ژن مورد بررسی قرار گرفت و نمودار حاصل از منحنی ذوب تکثیر اختصاصی ژن‌های مورد نظر و عدم جفت شدن پرایمرها را نشان داد. در نهایت میزان ژن آلکالین فسفاتاز با روش کمی مبنی بر تعیین $\Delta\Delta C_T$ ارزیابی گردید. (گروه تیمار نشده) ΔC_T - (گروه تیمار شده) $\Delta\Delta C_T = (\Delta C_T)$

جهت بررسی میزان بازدهی واکنش نمودار استاندارد رسم گردید. به این منظور رقت‌های مختلفی از cDNA تهیه شد و برای آن‌ها واکنش Real time PCR



نمودار شماره ۱: نتایج MTT غلظت های مختلف اسید گالیک به مدت ۷۲ ساعت بر روی سلول های VSMC تیمار شده



نمودار شماره ۲: میزان افزایش فلورسانس ژن های ALP و GAPDH در واکنش Real Time PCR
C: کنترل، B: القا شده با بتاگلیسرول فسفات، گروه های تیمار شده با غلظت های مختلف اسید گالیک

نتایج بررسی بیان ژن نشان داد در ابتدا بیان آلکالین فسفاتاز با بتاگلیسرول فسفات پس از ۷۲ ساعت القا گردید و نسبت به گروه کنترل فاقد بتاگلیسرول فسفات، افزایش یافت. سپس اسید گالیک در غلظت های ۱۶۰ و ۱۸۰ میکرومول میزان بیان ژن آلکالین فسفاتاز القا شده با بتاگلیسرول فسفات را در مقایسه با گروه کنترل فاقد بتاگلیسرول فسفات، به ترتیب ۱/۹۸، ۲/۰۳ و ۳/۱۶ بار کاهش داده است ($p < 0.05$) (نمودار شماره ۲).

فعالیت ویژه آلکالین فسفاتاز نیز در گروه القا شده با بتاگلیسرول فسفات نسبت به گروه کنترل (فاقد بتاگلیسرول فسفات) از $58/83 \pm 5/9$ IU/mg به $38/6 \pm 2/4$ IU/mg کاهش یافت.

انجام گردید. سپس منحنی استاندارد بر حسب غلظت های مختلف cDNA و میزان C_T (Cycle Threshold) آن ها، توسط دستگاه Real time PCR رسم گردید و بازدهی و واکنش تعیین شد. در نهایت داده ها با نرم افزار SPSS و آزمون آماری نان پارامتریک Mann-whitney آنالیز و مقایسه شدند. جهت اندازه گیری فعالیت آلکالین فسفاتاز بر روی سلول های تیمار شده و کنترل از روش رنگ سنجی استفاده شد. سلول های تیمار شده و کنترل با بافر لیزکننده شامل شامل تریتون X100 و ۱ درصد NaCl ۰/۹ درصد مجاور گردید و پس از لیز کامل به وسیله هموژنایزر بر روی یخ، به مدت ۱۵ دقیقه با دور ۱۲۰۰۰ rpm در دمای ۴ درجه سانتی گراد سانتریفوژ شدند (۲۵). فاز رویی به یک میکروتیوب منتقل شدند و با استفاده از کیت اندازه گیری فعالیت آلکالین فسفاتاز توسط دستگاه اتوآنالیز (BT 3000-Italy) اندازه گیری شد. جهت همسان سازی فعالیت آلکالین فسفاتاز در هر نمونه بر حسب میزان غلظت پروتئین، غلظت پروتئین در هر نمونه نیز با استفاده از دستگاه نانودراپ اندازه گیری شد و با تقسیم فعالیت آنزیم بر غلظت پروتئین، فعالیت ویژه آلکالین فسفاتاز بر حسب IU/mg protein به دست آمد.

یافته ها

با توجه به نتایج حاصل از آزمون MTT، غلظتی از اسید گالیک بر روی VSMC که در آن ۵۰ درصد سلول ها از نظر بیولوژیک متوقف شوند (IC_{50})، غلظت ۲۰۰ میکرومولار به دست آمده (نمودار شماره ۱) و سلول ها با ۳ غلظت مختلف اسید گالیک که شامل غلظت IC_{50} و دو غلظت پائین تر آن بود، به مدت ۷۲ ساعت تیمار شدند.

تغییرات افزایش فلورسانس ژن های آلکالین فسفاتاز و GAPDH در واکنش Real Time PCR در نمودار شماره ۲ نشان داده شده است.

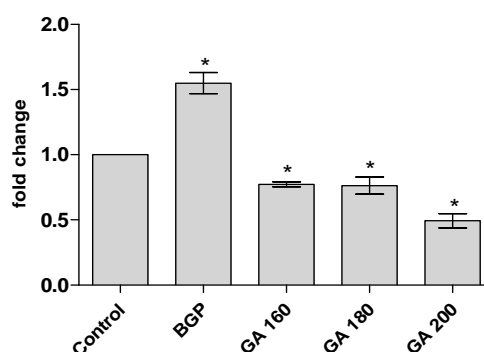
بحث

کلسیفیه شدن مدیال عروقی یک واکنش پاتولوژیک بوده که منجر به سختی رگ ها و در نتیجه نارسایی و بیماری قلبی می شود. این پدیده با افزایش سن تشدید می شود. هم چنین دیابت، بیماری های مزمن کلیوی و چاقی نیز در تشدید آن دخالت دارند. در تمام موارد فوق، آلكالین فسفاتاز موجود در دیواره عروق افزایش بیان و فعالیت دارد (۸).

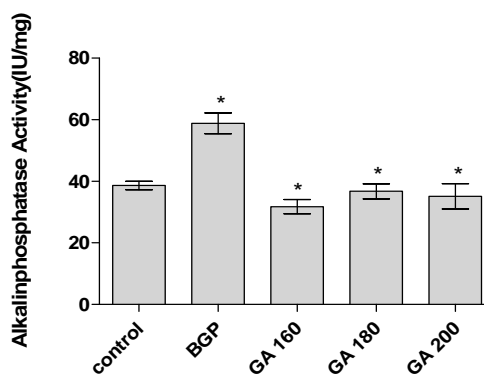
در این مطالعه اثر غلظت های ۱۶۰، ۱۸۰ و ۲۰۰ میکرومولار اسید گالیک بر روی بیان ژن آلكالین فسفاتاز و فعالیت ویژه آلكالین فسفاتاز مورد بررسی قرار گرفت و نتایج حاصل نشان دادند که اسید گالیک در هر سه غلظت، بیان ژن و فعالیت ویژه آنزیم را پس از ۷۲ ساعت در سلول های دیواره عروق در محیط کشت کاهش می دهد. آلكالین فسفاتاز یکی از اولین عوامل شناخته شده در کلسیفیه شدن عروق است. کلسیفیه شدن به عنوان یک ریسک برای پارگی آتروم و افزایش ریسک بیماری عروق کرونر در افراد مسن مطرح است (۲۶). لذا طبق یافته های این مطالعه به نظر می رسد اسید گالیک با کاهش فعالیت این آنزیم در دیواره عروق بتواند اثر مہاری بر روند کلسیفیه شدن عروق داشته باشد. هم چنین به نظر می رسد گالیک اسید آنتی اکسیدان موثری در برابر القا کننده های کلسیفیه شدن در عروق می باشد.

مطالعات اخیر نشان داده ترکیبات پلی فنولی مثل اتیل گالات موجود در انگور از مهاجرت سلول های صاف عروق کرونر جلوگیری می کند و احتمالاً در پیشگیری از آترواسکلروز موثر است (۱۹). هم چنین مطالعات نشان داده ترکیبات پلی فنولی در عصاره برگ نیلوفر که غنی از گالیک اسید و پلی فنول های دیگر است، باعث مهار مهاجرت سلول های صاف عضلات عروق می گردد (۲۰). ترکیبات پلی فنولی مانع از فعالیت آلكالین فسفاتاز که نقش مهمی در کلسیفیه شدن عروق در انسان دارد، می شوند (۱۷). قبلاً نشان داده شده ترکیباتی که بتوانند آلكالین فسفاتاز را مهار نمایند،

($p < 0.05$). پس از تیمار سلول ها با اسید گالیک در حضور بتاگلیسرول فسفات به مدت ۷۲ ساعت، نتایج ما نشان داد غلظت های ۱۶۰، ۱۸۰ و ۲۰۰ میکرومولار اسید گالیک فعالیت ویژه آلكالین فسفاتاز را به ترتیب به 4.07 ± 31.76 ، 4.2 ± 36.76 و 7.1 ± 35.12 واحد بین المللی بر میلی گرم پروتئین (IU/mg) کاهش داده است که این تغییرات نسبت به گروه کنترل القا شده بتاگلیسرول فسفات معنی دار می باشد ($p < 0.05$) (نمودار شماره ۳).



نمودار شماره ۲: تغییرات بیان ژن آلكالین فسفاتاز به دنبال تیمار سلول های VSMC با غلظت های مختلف اسید (GA) (میکرومول در لیتر) پس از القا با بتاگلیسرول فسفات (BGP). * $p < 0.05$ در مقایسه با کنترل



نمودار شماره ۳: تغییرات فعالیت ویژه آلكالین فسفاتاز پس از ۷۲ ساعت در حضور بتاگلیسرول فسفات (BGP) و غلظت های مختلف اسید گالیک (GA) (میکرومول در لیتر). * $p < 0.05$ در مقایسه با کنترل

تغییرات بیان و فعالیت ویژه آلكالین فسفاتاز پس از ۲۴ و ۴۸ ساعت تغییرات معناداری را نشان نداد.

کاهش داد که با نتایج مطالعه فوق هم سو می باشد. در مطالعه ای تاثیر گالیک اسید بر BMP2 بررسی شده و تاثیر کاهشی آن بر این پروتئین از مسیر پیام رسانی BMP2-Smad1/5/8 نشان داده شده که حاکی از اثر محافظتی آن بر کلسیفیه شدن سلول های عضلات صاف دارد (۳۰). این یافته ها با نتایج مطالعه ما که آلکالین فسفاتاز را بررسی کردیم، همسو است و هر دو مطالعه نشان دهنده اثر کاهشی گالیک اسید بر پروتئین های درگیر در کلسیفیه شدن رگ ها است.

در پایان می توان نتیجه گیری کرد که اسید گالیک با کاهش میزان آلکالین فسفاتاز در سلول های عضلات صاف دیواره عروق شده احتمالاً می تواند در کاهش کلسیفیه شدن رگ ها موثر باشد.

سپاسگزاری

هزینه طرح پژوهشی مربوط به این مطالعه در قالب پایان نامه کارشناسی ارشد مربوط به خانم طیبه قنواتی توسط معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد تامین گردیده است که بدین وسیله تشکر می گردد.

References

1. Viles-González JF, Fuster V, Badimon JJ. Atherothrombosis: a widespread disease with unpredictable and life-threatening consequences. *Eur Heart J* 2004; 25(14): 1197-1207.
2. Sary HC, Chandler AB, Dinsmore RE, Fuster V, Glagov S, Insull W Jr, et al. A definition of advanced types of atherosclerotic lesions and a histological classification of atherosclerosis. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association. *Circulation* 1995; 92(5): 1355-1374.
3. Heart Protection Study Collaborative Group. MRC/BHF Heart Protection Study of cholesterol lowering with simvastatin in 20,536 high-risk individuals: a randomised placebo-controlled trial. *Lancet* 2002; 360(9326): 7-22.
4. Insull W Jr. The pathology of atherosclerosis: plaque development and plaque responses to medical treatment. *Am J Med* 2009; 122(1 Suppl): S3-S14
5. Wu M, Rementer C, Giachelli CM. Vascular calcification: an update on mechanisms and challenges in treatment. *Calcif Tissue Int* 2013; 93(4): 365-373.
6. Zhu D, Mackenzie NC, Farquharson C, Macrae VE. Mechanisms and clinical consequences of vascular calcification. *Front Endocrinol*

-
- (Lausanne) 2012; 3: 95.
7. Jenny NS, Brown ER, Detrano R, Folsom AR, Saad MF, Shea S, et al. Associations of inflammatory markers with coronary artery calcification: results from the Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis. *Atherosclerosis* 2010; 209(1): 226-229.
 8. Yao Y, Bennett BJ, Wang X, Rosenfeld ME, Giachelli C, Lusis AJ, et al. Inhibition of bone morphogenetic proteins protects against Atherosclerosis and vascular calcification. *Circ Res* 2010; 107(4): 485-494.
 9. Dhore CR, Cleutjens JP, Lutqens E, Cleutjens KB, Geusens PP, Kitslaar PJ, et al. Differential expression of bone matrix regulatory proteins in human atherosclerotic plaques. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001; 21(12): 1998-2003.
 10. Derwall M, Malhotra R, Lai CS, Beppu Y, Aikawa E, Seehra JS, et al. Inhibition of bone morphogenetic protein signaling reduces vascular calcification and atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2012; 32(3): 613-622.
 11. Yan J, Stringer SE, Hamilton A, Charlton-Menys V, Götting C, Müller B, et al. Decorin GAG synthesis and TGF- β signaling mediate Ox-LDL-induced mineralization of human vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2011; 31(3): 608-615.
 12. Gadeau AP, Chaulet H, Daret D, Kockx M, Daniel-Lamaziere JM, Desgranques C. Time course of osteopontin, osteocalcin, and osteonectin accumulation and calcification after acute vessel wall injury. *J Histochem Cytochem* 2001; 49(1): 79-86.
 13. Ragino YI, Kashtanova EV, Chernjavski AM, Volkov AM, Polonskaya YV, Tsimbal SY, et al. Blood level of osteonectin in stenosing atherosclerosis and calcinosis of coronary arteries. *Bull Exp Biol Med* 2011; 151(3): 370-373.
 14. Zapolska-Downar D, Kosmider A, Naruszewicz M. Trans fatty acids induce apoptosis in human endothelial cells. *J Physiol Pharmacol* 2005; 56(4): 611-625.
 15. Yamauchi T, Karmon J, Waki H, Terauchi Y, Kubota N, Hara K, et al. The fat-derived hormone adiponectin reverses insulin resistance associated with both lipodystrophy and obesity. *Nature Medicine* 2001; 7: 941-946.
 16. Qiu X, Takemura G, Koshiji M, Hayakawa Y, Kanoh M, Maruyama R, et al. Gallic acid induces vascular smooth muscle cell death via hydroxyl radical production. *Heart Vessels* 2000; 15(2): 90-99.
 17. Negrro MR, Keating E, Faria A, Azevedo I, Martins MJ. Acute effect of tea, wine, beer, and polyphenols on ecto-alkaline phosphatase activity in human vascular smooth muscle cell. *J Agric Food Chem* 2006; 54(14): 4982-4988.
 18. Ji BC, Hsu WH, Yang JS, Hsia TC, Lu CC, Chiang JH, et al. Gallic acid induces apoptosis via caspase-3 and mitochondrion-dependent pathways in vitro and suppresses lung xenograft tumor growth in vivo. *J Agric Food Chem* 2009; 57(16): 7596-7604.
 19. Kurin E, Atanasov AG, Donath O, Heiss EH, Dirsch VM, Nagy M. Synergy study of the inhibitory potential of red wine polyphenols on vascular smooth muscle cell proliferation. *Planta Med* 2012; 78(8): 772-778.
 20. Ho HH, Hsu LS, Chan KC, Chen HM, Wu CH, Wang CJ. Extract from the leaf of *Nucifera* reduced the development of atherosclerosis via inhibition of vascular smooth muscle cell proliferation and migration. *Food Chem Toxicol* 2010; 48(1): 159-168.
-

21. Roman-Garcia P, Barrio-Vazquez S, Fernandez-Martin JL, Ruiz-Torres MP, Cannata-Andia JB. Natural antioxidants and vascular calcification: a possible benefit. *J Nephrol* 2011; 24(6): 669-672.
22. Shioi A, Nishizawa Y, Jono S, Koyama H, Hosoi M, Morii H. Beta-glycerophosphate accelerates calcification in cultured bovine vascular smooth muscle cells *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1995; 15(11): 2003-2009.
23. Farrokhi E, Samani KG, Chaleshtori MH. Oxidized Low-Density Lipoprotein Increases Bone Sialoprotein Expression in Vascular Smooth Muscle Cells Via Runt-Related Transcription Factore2. *Am J Med Sci* 2015; 349(3): 240-243.
24. Lee HL, Woo KM, Ryoo HM, Baek JH. Tumor necrosis factor-alpha increases alkaline phosphatase expression in vascular smooth muscle cells via MSX2 induction. *Biochem Biophys Res Commun* 2010; 391(1): 1087-1092.
25. Kato Y, Iwamoto M, Koike T, Suzuki F, Takano Y. Terminal differentiation and calcification in rabbit chondrocyte cultures grown in centrifuge tubes: regulation by transforming growth factor beta and serum factors. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988; 85(24): 9552-9556.
26. Wannamethee SG, Sattar N, Papcosta O, Lennon L, Whincup PH. Alkaline phosphatase, serum phosphate, and incident cardiovascular disease and total mortality in older men. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2013; 33(5): 1070-1076.
27. Narisawa S, Harmey D, Yadav MC, O'Neill WC, Hoylaerts MF, Millán JL. Novel inhibitors of alkaline phosphatase suppress vascular smooth muscle cell calcification. *J Bone Miner Res* 2007; 22(11): 1700-1710
28. Mohandes-Samani N, Ghatreh-Samani K, Fathpour H, Farrokhi E, Salehian-Dehkordi M. Decreases of osteonectin gene expression by gallic acid in vascular smooth muscle cells. *J Shahrekord Univ Med Sci* 2014; 16(2): 97-103(Persian).
29. Hua X, Ding W, Xiao-Ming Y, Xiao-ling Y, Gui-zhong L, Tian W, et al. The Attenuating Effect of Geen Tea on vascular calcification in Rats. *J Ning Med Col* 2008.
30. Kee HJ, Cho SN, Kim GR, Choi SY, Ryu Y, Kim IK, et al. Gallic acid inhibits vascular calcification through the blockade of BMP2-Smad1/5/8 signaling pathway. *Vascul Pharmacol* 2014; 63(2): 71-78.