مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد
دوره ۲۵، شماره ۸، آبان ۱۳۹۶
صفحه: ۶۴۰-۶۲۹

Journal of Shahid Sadoughi University of Medical Sciences
Vol. 25, No.8, Nov 2017
Pages:629-640

بررسی اثر عصاره‌های آبی و الکلی برگ ریحان *(OcimumBasilicum)* بر تغییرات بیان ژن VEGF در مسیر آنژیوژنز پرده کوریوآلانتوئیک جنین جوجه

فاطمه نیازی[۱]، خدیجه شاهرخ آبادی*[۲]، مریم طهرانی پور[۳]

چکیده

مقدمه: آنژیوژنز از مهم‌ترین فرایندهای زیستی است که هرگونه اختلال در آن، به بیماری منجر می‌شود. نقطه اصلی در هدایت مولکولی این فرایند، فاکتور رشد اندوتلیال عروقی (VEGF) است که از طریق رسپتورهای خود اعمال اثر می‌کند و یکی از تنظیم‌کننده‌های اختصاصی رگ‌زایی است. این پژوهش با هدف بررسی اثر عصاره‌های آبی و الکلی برگ گیاه ریحان بر تغییرات بیان ژن VEGF در مسیر آنژیوژنز پرده کوریوآلانتوئیک جنین جوجه انجام گرفت.

روش بررسی: در این تحقیق تجربی ۶۰ عدد تخم‌مرغ نطفه‌دار نژاد Ross به‌طور تصادفی به ۶ گروه، شامل گروه‌های شاهد، شاهد آزمایشگاهی و چهار گروه تجربی تقسیم شد. پس از انکوباسیون در روز دوم پنجره‌هایی روی تخم‌مرغ‌ها ایجاد و در روز هشتم عصاره‌های آبی و الکلی گیاه ریحان با دوزهای ۵۰ و ۱۵۰ (mg/kg) بر روی پرده کوریوآلانتوئیک جنین جوجه تزریق شد. روز دوازدهم،جهت استخراج RNA و بررسی بیان ژن VEGF، از پرده کوریوآلانتوئیک نمونه‌برداری شد. سپس با ساخت cDNA تغییرات بیان ژن VEGFبه روش کمی و با آنالیز داده‌ها، در تمام گروه‌ها مورد بررسی قرار گرفت.

نتایج: نتایج نشان دادبیان ژن VEGFتحت تأثیر عصاره‌های آبی و الکلی گیاه ریحان در تمام گروه‌های تجربی نسبت به شاهد آزمایشگاهی افزایش یافته است، اما این افزایش در هر دو تیمار گروه آبی بیشتر از دوزهای تیمار شده گروه الکلی بود.

نتیجه‌گیری: هر دوعصاره آبیو الکلی گیاه ریحان بیان ژن VEGFرا افزایشداد. بررسی‌های صورت گرفته روی تعداد و طول عروق نیز این افزایش را نشان می‌دهد. با توجه به این اثر افزایشی می‌توان گفت عصاره‌های آبی و الکلی گیاه ریحان می‌توانند بر فرآیندهای مولکولی رشد و نمو و تکثیر و فرایندهای وابسته به آن‌هامؤثر باشند.

واژه‌های کلیدی:آنژیوژنز، VEGF، گیاه ریحان (*Ocimumbasilicum*)، پردهکوریوآلانتوئیک

۱- کارشناس ارشد تکوین جانوری، گروه زیست‌شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد مشهد
۲- استادیار ژنتیک مولکولی، گروه زیست‌شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد مشهد
۳- دانشیار فیزیولوژی جانوری، گروه زیست‌شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد مشهد
***(نویسنده مسئول)؛تلفن: ۰۵۱۳۸۴۳۵۰۵۰ ، پست الکترونیکی:** shahrokhabady@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۲/۲۴ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۳/۱۱

مقدمه

تکوین سیستم عروقی مهره‌داران فراتر از منشعب شدن ساده رگ‌های خونی بوده و نیازمند یک کنترل دقیق است. پژوهش‌های اخیر نقش مهم برنامه‌های ژنتیکی، به ویژه ضرورت حضور برخی خانواده‌های مولکولی را در سلول‌های اندوتلیالی رأس عروق در پدیده آنژیوژنز نشان می‌دهد (۱). مهم‌ترین فاکتورهای مؤثر بر آنژیوژنز شامل فاکتورسلول بنیادی (SCF) Stem Cell Factor، فاکتوررشداپیتلیال (EGF) Epithelial Growth Factor، فاکتور اساسی رشد فیبروبلاستی Basic Fibroblast Growth Factor(BFGF) و فاکتور رشد مشتق از پلاکت‌ها Platlet Derivative Growth (PDGF) Factor و همچنین خانواده ژنی Transforming(TGFβ) Growth Factor β بوده که فعالیت آنژیوژنیک سلول‌های اندوتلیال را تنظیم می‌کنند. یکی دیگر از مهم‌ترین فاکتورهای آنژیوژنیک فاکتور رشد عروقی اندوتلیالی (VEGF) Vasculo- Endothelial Growth Factor است (۲،۳) که به کمک دو رسپتور ویژه که فقط در سلول‌های اندوتلیالی بیان می‌شوند، مهاجرت سلول‌های اندوتلیالی و نیز تکثیر و نفوذپذیری آن‌ها را تنظیم می‌کندکه همچنین یک فاکتور ضد مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی در سلول‌های اندوتلیالی نیز محسوب می‌شود (۴). همچنین VEGF، یک گلیکوپروتئین ۴۵ کیلو دالتونی استکه به عنوان یک خانواده از فاکتورهای رشد پپتیدی مؤثر بر عروق خونیاز سلول‌های توموری (۵،۶) و سلول‌های اندوتلیالی (۷) ترشح می‌شود (۸).این گلیکوپروتئین از طریق اتصال به گیرنده‌های VEGFR-1 و VEGFR-2 واقع در سلول‌های اندوتلیال پیام‌دهی خود را انجام داده(۹)و در ادامهاز طریق تنظیم افزایشی مؤلفه‌های آنتی آپوپتوتیک (۱۰)، سنتز DNA(۱۱،۱۲)، تخریب غشاپایه (۱۳) و فسفریله شدن اجزاء چسبنده اندوتلیالی بین سلولی و اتصالات محکم (۱۴،۱۵) به ترتیب زمینه بقا، تکثیر، مهاجرت و نفوذپذیری سلول اندوتلیال را موجب می‌شود. ژن VEGFانسانی، پنج ایزوفرم مختلف پروتئینی با نام ایزوفرم‌های ۱۲۱، ۱۴۵، ۱۶۵، ۱۸۹ و ۲۰۶ تولید می‌کند که بسته به بافت مترشحه، به نام‌های VEGF-A تا VEGF-E نام‌گذاری شده‌اند (۱۶). بنابراین رگ‌زایی طبیعی وابسته به هماهنگی چندین فرآیند مستقل است. برای تشکیل عروق خونی جدید، ابتدا سلول‌های مورال از شاخه رگ موجود حرکت می‌کنند. بی‌ثبات شدن عروق توسط آنژیوپویتین-۲، سلول‌های اندوتلیال را از یک وضعیت پایدار بدون رشد به یک فنوتیپ تکثیری تغییر می‌دهد. پس از آن VEGF سبب افزایش نفوذپذیری عروق شده در این مرحله پروتئازهاو ترکیبات ماتریکس از جدار رگ نشت یافته و سلول‌های اندوتلیال شروع به تکثیر می‌کنند. به دنبال تکثیر، مهاجرت سلول‌های اندوتلیال اتفاق می‌افتد سپس ساختارهای لوله مانند، تشکیل‌شدهو خون می‌تواند جریان یابد. سلول‌های مزانشیال نیز تکثیر پیدا کرده و در طول عروق جدید مهاجرت می‌کنند پس از آن به سلول‌های پریسیت بالغ تمایز می‌یابند. تقویت برهمکنش‌های سلول-سلول و ساخت دقیق ماتریکس جدید سبب پایداری رگ جدید می‌گردد (۱۷). طبق بررسی‌های محققین، VEGF باعث افزایش نفوذپذیری عروق می‌شود که این افزایش منجر به رگ‌زایی شده و می‌تواند در بهبود زخم‌هامؤثر باشد (۱۸). البته سطح بالای VEGF به‌عنوان عامل اصلی در رگ زایی پاتولوژی از جمله رشد تومورهای بدخیم و تخریب عضلات نیز شناخته شده است (۱۹). امروزه باتوجه به اثرات جانبی برخی داروهای شیمیایی، استفاده از گیاهان دارویی با حداقل اثرات جانبی و تداخل دارویی مورد توجه گرفته است (۲۰).

ریحان گیاهی است خوشبو و معطر که برگ و سرشاخه‌های جوان آن به مصرف تغذیه می‌رسد. برای مصارف درمانی نیز برگ و سرشاخه‌های گل‌دار آن کاربرد دارد. دارای میوه فندقه، بیضوی و صاف است. به‌طور کلی ریحان گیاهی است علفی، یک‌ساله، دارای ساقه‌ای نیمه چوبی، منشعب از قاعده، دارای برگ‌های بیضوی نوک‌تیز و گل‌هایی معطر به رنگسفید، گلی و گاهی بنفش و مجتمع در قسمت انتهایی ساقه.ریحان از تیره نعناعیان (Lammiaceae) است و امروزه در غالب نواحی پرورش می‌یابد (۲۱). برگ ریحان دارای ماده‌ای به نام اوسیمن (Ocimene) استکه دارای ایزوفرم‌های α و β است که هریک

دارای فرم‌های سیس و ترانس می‌باشند. اوسیمن حالت روغنی و بوی مطبوعی دارد و مخلوطی از ایزومرها است،عملاً در آب غیر محلول است اما در الکل، کلروفرم، اتر و اسید استیک گلاسیال محلول می‌باشد (۲۱). به طور کلی اجزای مهم ریحان شاملسینئول،لینالولوژرانیول، سینامات متیل، اوژنول، سیترال و کامفور می‌باشد (۲۲،۲۳). با توجه به اهمیت فرایند آنژیوژنز در فرایندهای بیولوژیکی و همچنین وجود فاکتورهای دخیل در آن، به ویژه فاکتور رشد اندوتلیال عروقی (VEGF) این مطالعه تجربی طراحی گردید تا اثر ژن VEGF بر آنژیوژنز پرده کوریوآلانتوئیک جنین جوجه مورد بررسی قرار گردید. از جمله کاستی‌های تحقیق وجود ایزوفورم‌های مختلف ژن VEGF و گیرنده‌های متفاوت آن در سلول‌های آندوتلیالی است که در این تحقیق مطالعه بر روی یک واریانت آن صورت گرفت.

افزایش تمایل به مطالعه جنین جوجه به عنوان یک مدل آزمایشگاهی در پژوهش‌های فارماکولوژیک و بیولوژیک به دلیل سادگی و هزینه پایین آن نسبت به مدل‌های پستانداران است. قوانین فعلی کنترل حیوانات آزمایشگاهی در USA، اتحادیه اروپایی و سوئیس، آزمایش با جنین جوجه را بدون مجوز از انجمن‌های حیوانات اجازه می‌دهد بر این اساس که آزمایش‌های قبل از hatching شروع و پایان یابد ولی با این حال آزمایش با جنین جوجه باید در شرایط استریل باشد و تعداد جنین‌های مورد استفاده نیز حتی‌الامکان کاهش یابد (۲۴،۴۰).

روش بررسی

برای انجام این تحقیق تجربی از تخم‌مرغ‌های نطفه دار نژاد Ross، تهیه از مرغداری جهاد کشاورزی مشهد، استفاده گردید.تعداد ۶۰ عدد تخم‌مرغ نطفه‌دار (بدون احتساب تلفات) به طور تصادفی به ۶ گروه آزمایشگاهی تقسیم شد که شامل گروه شاهد (بدون تیمار)، گروه شاهد آزمایشگاهی (تیمار با نرمال سالین)، گروه‌های تجربی ۱ و ۲ (تیمار با عصاره آبی دوز ۵۰ و ۱۵۰mg/kg)، گروه‌های تجربی ۳ و ۴ (تیمار با عصاره الکلی دوز ۵۰ و ۱۵۰mg/kg) بود. سرشاخه‌های گیاه ریحان پس از جمع‌آوری، ابتدا توسط مرکز هرباریوم دانشکده علوم پایه دانشگاه آزاد اسلامی واحد مشهد (IAUM) به شماره هرباریومی ۹۷۲۵ تایید شد. سپس گیاه شسته، در سایه خشک و سپس کاملاً آسیاب گردید. عصاره آبی و الکلی توسط روش سوکسله (Soxhlet Extractor) که یک روش متداول علمی آزمایشگاهی است،تهیه گردید.مزیت این سیستم این است که به جای استفاده از مقدار زیادی از حلال، همان مقدار حلال اولیه که داخل نمونه عبور کرده کافی است. پس از استخراج،حلال حذف‌شده و حاصل ترکیب مورد نظر است. در این روش مقدار ۳۵ گرم از پودر سرشاخه‌های آسیاب شده داخل کاغذ صافی ریخته و به دستگاه سوکسله که شامل یک بالن ته گرد در بخش پایینی و یک مبرد در بخش فوقانی است انتقال داده شد. به منظور تهیه عصاره الکلی ریحان، حدود ۳۰۰ سی‌سی اتانول ۹۷ درصدو برای تهیه عصاره آبی نیز حدود ۳۰۰ سی‌سی آب مقطر جداگانه در محفظه مخصوص ریخته شد و عصاره گیری انجام گردید. عصاره‌گیری در طی دو روز متوالی انجام شدتا تمام عصاره قابل حل از گیاه استخراج و جدا گردد. سپس از هر یک از عصاره‌ها حذف حلال (آب و الکل) صورت گرفت (۲۴،۲۵). بازده نهایی عصاره‌گیری به این روش برای عصاره آبی ریحان مقدار ۱۳/۰۲ گرم و برای عصاره الکلی ریحانمقدار ۱۳/۱۷ گرم بود. در مرحله بعدی پس از ضدعفونی کردن پوسته تخم‌مرغ‌های تهیه شده با الکل ۷۰ درصد، در دستگاه جوجه‌کشی (ایران- درنا سیستم پارس) با دمای ۳۸ درجه سانتی‌گراد و رطوبت ۵۵ تا ۶۰ درصد قرار داده شد و دستگاه در وضعیت روشن و در حالت چرخش خودکار قرار گرفت. دستگاه جوجه‌کشی برای تبدیل اتوماتیک و خودکار تخم‌مرغ نطفه‌دار به جوجه یک روزه استفاده می‌شود، در واقع تخم نطفه‌دار در داخل دستگاه قرار گرفته و جوجه یک روزه از آن خارج می‌گردد. فرآیند تبدیل تخم به جوجه به صورت اتوماتیک صورت می‌گیرد. روز دوم انکوباسیون در شرایط استریل و زیر هود لامینار به کمک پنس استریل در سمت پهن تخم‌مرغ سوراخ کوچکی ایجاد و سپس در سمت پهلویی آن پنجره ایجاد شد و محل نیز به وسیله لامل، چسب و

پارافین استریل پوشانده و تخم‌مرغ‌ها به دستگاه جوجه‌کشی برگردانده شد (۲۵،۲۶). روز هشتم انکوباسیون پنجره در زیر هود لامینار باز شد و روی پرده کوریوآلانتوئیک جوجه یک اسفنج ژلاتینی، به ابعاد ۱×۴×۴ میلی‌مترقرار دادهشد تا تیمارها در آن ناحیه صورت گیرد. در نمونه شاهد آزمایشگاهی تیمار با نرمال سالین انجام شد و در نمونه‌های تحت تیمار با عصاره آبی و عصاره الکلی ریحان به اسفنج ژلاتینی مقدار ۱۰ میکرولیتر ازعصاره‌های آبی و الکلی ریحان با دوزهای ۵۰ و ۱۵۰ (mg/kg) اضافه گردید، سپس پنجره‌ها مجدداً بسته شدند و تخم‌مرغ‌ها به دستگاه جوجه‌کشی برگردانده شدند. روز دوازدهم تمامی نمونه‌ها از دستگاه خارج شده و پس از باز کردن محل پنجره و عکس‌برداری از پرده کوریوآلانتوئیک، پردهCAM جدا و به درون‌هاون چینی استریل انتقال داده شد و با استفاده از ازت مایع کوبیده و پودر شد.مراحل استخراج RNA طبق پروتکل کیت استخراج RNA (شرکت دنا زیست آسیا- S-1020-1) انجام شد. سپس RNA استخراج‌شدهالکواته و به فریزر^{o}C ۲۰- انتقال داده شد. برای اطمینان از درستی استخراج RNA، کیفیت و کمیت آن توسط ژل الکتروفورز و تکنیک اسپکتروفتومتری نانودراپ بررسی گردید و در مرحله بعد از نمونه‌های استخراج شده، cDNA سنتز گردید. کیت مخصوص سنتز cDNA از شرکت پارس توس تهیه گردید و در پایان سنتز cDNA ها به فریزر ^{o}C۲۰- بازگردانده شدند. برای بررسی بیان ژن VEGF پرایمرهای اختصاصی به کمک نرم‌افزار الیگو ۷ تهیه و سپس جهت اطمینان از درستی آن BLAST گردید. همچنین توالی پرایمر ژن GAPDH به عنوان هوس کیپینگ ژن تعیین و طراحی گردید. جدول ۱، توالی پرایمرهای مورد استفاده در این تحقیق را نشان می‌دهد. در نهایت برای دست‌یابی به پاسخ بیان ژن تحت تأثیر عصاره‌های مورد نظر، واکنش Real Time PCRانجام گردید. جدول ۲ مقدار و مواد مورد استفاده در واکنش PCR را نشان می‌دهد. نمونه‌ها در میکروتیوب‌های مخصوص و مطابق جاگذاری در پلیت ۹۶ خانه‌ای آماده و در دستگاه Real Time (BioRad) قرار گرفت. نتایج با استفاده از آنالیز آماری ΔΔCt مورد بررسی قرار گرفت.تمامی اصول و واکنش‌گرهایی که برای یک RT-PCR معمولی نیاز است در دستگاه Real Time PCR هم بکار می‌رود؛ اما یک گزارشگر فلورسنت (مثل سایبرگرین در این آزمایش) نیز در واکنش حضور دارد. این گزارش‌گرها به گونه‌ای طراحی می‌شوند که در صورت تکثیر DNA نور تولید کنند. لذا افزایش شدت نور ثبت شده در دستگاه با میزان محصول به دست آمده نسبت مستقیم دارد که با ادامه PCRشدت فلورسنت رو به افزایش می‌گذارد.

جدول ۱:اطلاعات مربوط به طراحی ژن اختصاصی و هوس کیپینگ ژن

Seq	Mer	Tm	%CG	Product
VEGF				
Forward: AGA AAA TCA CTG TGA GCC TTG CT	23	60.75	43.48	201
Reverse: TGC AAC GTG AGT CTG TGA ATT TG	23	60.24	43.48	
GAPDH				
Forward: CGG GAA CCA AAT GCA CTT CGT	21	61.75	52.38	210
Reverse: CGC TGC CGT AGA GGT ATG GGA	21	63.73	61.90	

جدول ۲: مواد مورد استفاده در واکنشReal time PCR. (سایبرگرین از شرکت بتاژن)

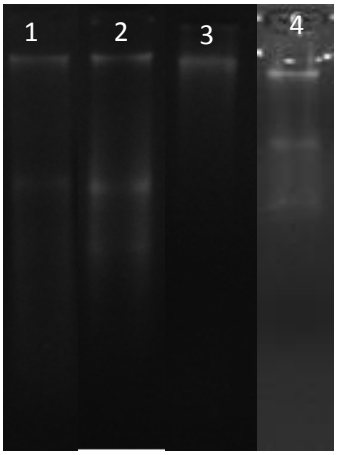
Component	Volume	Final Con
SYBR Green PCR Master Mix(2x)	10µl	1x
50x ROX dye	0.4µl	1x
Forward Primer	1µl	100µM
Reverse Primer	1µl	100µM
Template **cDNA**	3µl	0.5-1µg
Sterilized DW	4.6µl	-
Total Volume	20µl	-

نتایج

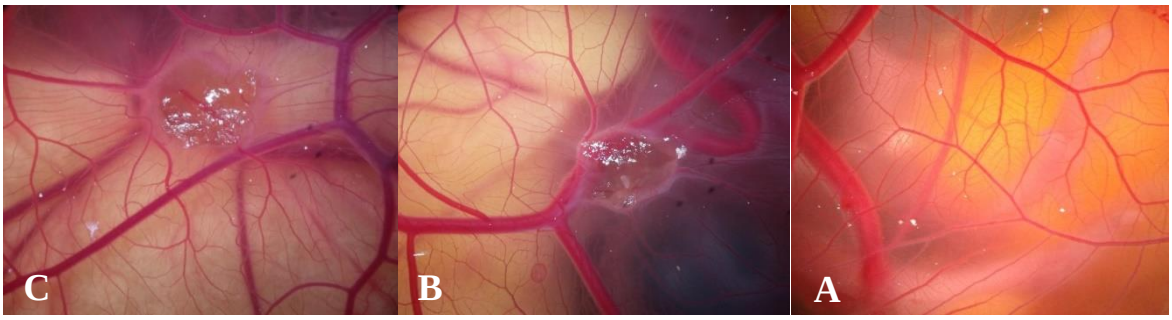
این تحقیق با هدف بررسی میزان تغییرات بیان ژن VEGF تحت تیمار با عصاره‌های الکلی و آبی گیاه ریحان در مدل آزمایشگاهی پرده CAM در جنین جوجه صورت گرفت. عصاره‌گیری به روش سوکسله از سرشاخه‌های گیاه ریحان نشان داد که بازده عمل برای عصاره آبی ۳۷/۲٪ و برای عصاره الکلی ۳۷/۶٪ بود. پس از استخراج کل RNA برای تعیین کیفیت و کمیت محصول از ژل الکتروفورز و نانودراپ استفاده گردید. جدول ۳ نتایج حاصل از نانودراپ را برای بعضی از نمونه‌های استخراج شده نشان می‌دهد. مقدار کمی هر نمونه بر حسب میکروگرم بر میکرولیتر گزارش شده است. شکل ۱ باندهای ایجاد شده در الکتروفورز بر روی ژل آگارز ۱/۵٪ را نشان می‌دهد. برای بررسی تغییرات بیان ژن از نمونه RNAهای با کیفیت و کمیت مناسب در روش Real Time PCR استفاده گردید. نمودار ۱ مطالعات انجام شده بر روی میزان بیان ژن VEGF را تحت تأثیر عصاره‌های آبی و الکلی نشان می‌دهد. با توجه به نمودار و در نظر گرفتن نمونه شاهد، در گروه‌های آبی و الکلی ۵۰ و ۱۵۰ بیان ژن VEGF افزایش قابل‌توجهی داشته استکه این افزایش در گروه آبی دوز ۵۰ و ۱۵۰ بیشتر از گروه الکلی ۵۰ و ۱۵۰ می‌باشد. در بررسی سطح پرده کوریوآلانتوئیک نیز افزایش آنژیوژنز در تعداد و طول عروق مشاهده شد (نتایج گزارش نشده است) که این افزایش در گروه‌های آبی مشخص‌تر است. شکل ۲ آنژیوژنز در پرده CAM را تحت تأثیر عصاره آبی که بیشترین بیان ژن را داشته‌اند، نشان می‌دهد؛ بنابراین به نظر می‌رسد که در تیمار با عصاره‌های آبی بیان ژن VEGF افزایش بیشتری نسبت به عصاره الکلی از خود نشان داده است.

جدول ۳: نتایج به دست آمده از نانودراپ

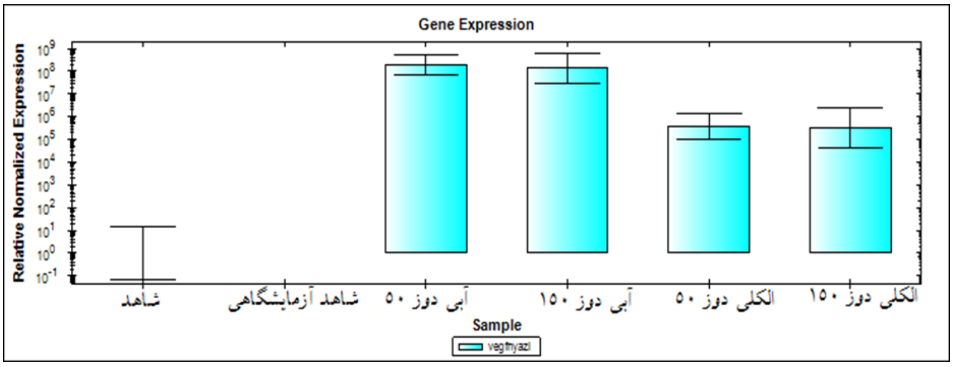
گروه‌های مورد آزمایش	مقدار کمی(µg/µl)
نمونه کنترل (شاهد)	۰/۰۲۲
شاهد آزمایشگاهی	۰/۱۵۶
نمونه آبی دوز ۵۰	۰/۲۳۵
نمونه آبی دوز ۱۵۰	۰/۰۴۸
نمونه الکلی دوز ۵۰	۰/۰۱
نمونه الکلی دوز ۱۵۰	۰/۰۴۸



شکل ۱: باندهای حاصل از الکتروفورز نمونه‌هایی ازRNA بر روی ژل آگارز. ستون ۱ نمونه شاهد، ستون ۲ نمونه آبی دوز ۵۰، ستون ۳ نمونه آبی دوز ۱۵۰. ستون ۴ نمونه الکلی دوز ۱۵۰.



شکل ۲: نمونه‌های تحت تیمار با عصاره آبی ریحان که بیشترین بیان ژن را نشان دادند.A: نمونه شاهد (بدون تیمار)، B: نمونه تیمار با عصاره آبی دوز ۵۰، C:نمونه تیمار با عصاره آبی دوز ۱۵۰. افزایش طول و تعداد عروق خونی مشاهده می‌شود.



نمودار۱: مقایسه میزان بیان ژن VEGF در گروه‌های مورد مطالعه

بحث

در این تحقیق اثر عصاره آبی و الکلی گیاه ریحان بر آنژیوژنز پرده کوریوآلانتوئیک جنین جوجه مورد بررسی قرار گرفت. دلیل انتخاب گیاه ریحان مربوط به اهمیت تأثیرات دارویی و درمانی گیاه و همچنین مواد مؤثره موجود در گیاه بود و همچنین دلیل انتخاب دو غلظت ۵۰ و ۱۵۰ انجام مطالعات قبلی و نتایج مؤثر بر این دو غلظت بود. نتایج نشان داد که عصاره‌های آبی استخراج شده از سرشاخه‌های گیاه ریحان نسبت به عصاره‌های الکلی تأثیر بیشتری بر بیان ژن و در نتیجه

آنژیوژنز داشتند که می‌توان احتمال داد مواد مؤثره گیاه در عصاره آبی بیشتر از عصاره الکلی حل‌شده است؛ یعنی میزان بیان ژن VEGF در گروه‌های آبی نسبت به گروه‌های الکلی دوز ۵۰ و ۱۵۰ (mg/kg) و شاهد آزمایشگاهی افزایش بیشتری نشان داد. با توجه به شکل ۲ افزایش طول و تعداد عروق خونی، نیز مشهود بود که بیانگر افزایش آنژیوژنز در گروه‌های تیمار بود (۲۶،۲۷). با بررسی نتایج می‌توان گفت که عصاره ریحان آنژیوژنز و بنابراین بیان ژن VEGF را افزایش داده و از این نظر می‌تواند در روندهای ترمیم و رشد مؤثر باشد.با توجه به اینکه از دیرباز معالجه و درمان بیماری‌ها با گیاهان دارویی به علت منابع طبیعی فراوان و سالم آن، معمول بوده است و نیز با توجه به اثرات جانبی داروهای شیمیایی، استفاده از گیاهان دارویی با حداقل اثرات جانبی و تداخل دارویی مورد توجه قرار گرفته است (۲۰). عصاره گیاه ریحان حاوی ترکیباتی است که قادر به تحریک VEGF بوده و درنتیجه افزایش این ژن و همچنین افزایش رگ‌زایی را به دنبال دارد. با توجه بهپژوهش‌های متعددی که در زمینه اثر گیاهان بر روی بیان ژن VEGF صورت گرفته، اهمیت بیان این ژن در فرایندهای رشد و ترمیم به وضوح مشخص می‌شود. در پژوهشی که اثر آلوئه ورا را بر روی ترمیم زخم نشان می‌دهد، مشخص شد که یکی از اجزاء موسیلاژ آلوئه‌ورا، بتاسیتوسترول (β-sitosterol) است که از طریق افزایش میزان بیان VEGF و رسپتور آن در محل زخم، باعث افزایش آنژیوژنز و بنابراین باعث ترمیم هر چه بهتر بافت‌های آسیب دیده می‌شود (۲۷،۲۸). در تحقیقی Yoo و همکاران اظهار نمودند که VEGF بهترین فاکتور جهت تنظیم آنژیوژنز می‌باشد (۲۸،۲۹). همچنین Lieb و همکاران نشان دادند که افزایش سطح VEGF، باعث افزایش سطح آنژیوژنز در مفاصل می‌شود و می‌تواند در روند ترمیم استخوان‌ها مورد استفاده قرار گیرد (۲۹،۳۰). در برخی گزارش‌ها از VEGF به عنوانی که دفع مدهدر درمان تومورهای جامد نام برده شده است (۳۰،۳۱). Ferté و همکاران اظهار نمودندکه VEGF باعث رگ‌زایی می‌شود و اینرگ زایی می‌تواند در بهبود زخم‌ها مؤثر باشد (۳۱،۳۲). تحقیقات سایر پژوهشگران نشان می‌دهد که VEGF در شرایط آزمایشگاهی، تبدیل سلول‌های آندوتلیال را به شریان، ورید و حتی عروق لنفاوی تحریک می‌کند (۳۲،۳۳). با توجه به کاربرد عصاره گیاه ریحان در طب سنتی باید یادآور شد که اینگیاه دارای ترکیبات مختلفی است که از آن جمله می‌توان به ترکیبات فنولی یافلاونوئیدهای آن اشاره کرد (۳۳،۳۴). بر این اساس می‌توان گفت فعالیت ترکیبات فنولی مربوط به خواص اکسیداسیون–احیاء آن‌هاست که نقش مهمی در جذب و خنثی‌سازی رادیکال‌های آزاد، فرو نشانی اکسیژن‌های فعال و یا پراکسیدازهای تجزیه‌کننده دارد (۳۴،۳۵)، فلاونوئید یکی از همین ترکیبات استو دارای خاصیت آنتی اکسیدانی می‌باشد.با توجه به پژوهش اخیر، مشخص شد عصاره آبی و الکلی برگ ریحان دارای خاصیت تحریکیمی‌باشد که بر طبق تحقیقات می‌توان این اثر را به فلاونوئیدهای موجود در ریحان نسبت داد (۳۵،۳۶). بر این اساس و با توجه به بررسی‌هایی که روی پدیده ترمیم صورت گرفته است مهم‌ترین عامل در پدیده ترمیم افزایش بیان ژن VEGF می‌باشد (۲۹،۳۰)؛ به عبارت دیگر تمام عوامل مؤثر در آنژیوژنز به نحوی با VEGF در ارتباط هستند (۳۶،۳۷)، VEGF با اتصال به گیرنده خود بر سطح سلول‌های اندوتلیال موجب تکثیر و مهاجرت این سلول‌ها می‌گردد (۳۷،۳۸). در این پژوهش نشان داده شد که افزایش بیان ژن VEGF و در نتیجه آن افزایش آنژیوژنز اتفاق افتاده است که می‌توان آن رابه فلاونوئیدهای فراوان موجود در عصاره این گیاه نسبت داد. البته ترکیبات دیگری از جمله لینالول، اوژنول و سینئول در عصاره‌های متفاوت آبی و الکلی ریحان نیز وجود دارد اما برای مشخص شدن اثر بخشی هر یک از این ترکیبات بر روی بیان ژن VEGF نیاز به جداسازی این ترکیبات از گیاه ریحان و اثر دادن آن‌ها بر پرده کوریوآلانتوئیک جنین جوجه به صورت جداگانه می‌باشد. در میان ترکیبات ریحان نیز اوسیمن ترکیبی است که حالت روغنی و بوی مطبوعی دارد و چون مخلوطی از ایزومرهای مختلف است عملاً در آب غیر محلول است (۳۸،۳۹) اما در الکل، اتر، کلروفورم و اسید استیک گلاسیال محلول می‌باشد. سایر ترکیبات در اسانس گیاه ریحان ترکیبی از

ترپنوئیدها و فلاونوئیدهای قابل حل در آب و همچنین الکل است (۳۹،۴۰)؛ بنابراین اکنون که اثرات جداگانه عصاره آبی و الکلی به اثبات رسیده است، پیشنهاد می‌شود عصاره هیدروالکلی (مخلوط آب و الکل) گیاه مقایسه گردد که به نظر می‌رسد اثرات مشابهی داشته باشد. پیشنهاد می‌شود با استخراج ترکیبات مؤثر گیاه ریحان، فعالیت‌های آنژیوژنیکی و ضدآنژیوژنیکی وبیولوژیکی آن بررسی گردد تا برخی از ترکیبات مؤثر و مهم دارویی آن نیز شناسایی گردد.

نتیجه‌گیری

در بررسی‌های صورت گرفته بر روی میزان بیان ژن VEGF در این تحقیق می‌توان گفت در گروه‌های آبی و الکلی ۵۰ و ۱۵۰ بیان ژن VEGF افزایش قابل توجهی داشته است که این افزایش در گروه آبی بیشتر از گروه الکلی بوده است. به بیان دیگر در تمام تیمارها بیان ژن VEGF نسبت به شاهد آزمایشگاهی افزایش یافته است که این نشانه‌ای از اثربخشی عصاره تام گیاه ریحان هم به‌صورت آبی و هم به‌صورت الکلی است؛ بنابراین احتمالاًمی‌توان از مواد مؤثر در گیاه ریحان جهت افزایش رگ‌زایی ونیز تحریک بیان ژنVEGFاستفاده نمود، همچنین در فرایندهای ترمیمی می‌توان از عصاره ریحان استفاده کرد.

سپاسگزاری

از کلیه دوستان و همکاران محترم در گروه زیست‌شناسیکه در پیشبرد این پژوهش همکاری نموده‌اند تشکر و قدردانی می‌شود.

References:

1- Suchting S, Bicknell R, Eichmann A. ***Neuronal clues to vascular guidance.*** Exp CellRes 2006; 312(5): 668-75.

2- Hiromatsu Y, Toda Sh. ***Mast cells and angiogenesis.*** Micros Res Tech 2003; 60: 64-69.

3- Lioyd R, Vidal S, Horvath E, Kavacs K. ***Angiogenesis in normal and neoplastic pituitary tissues***. Micros Res Tech 2003; 69(2): 244-250.

4- Breier G, Unsicker K, Kriegistein K. ***Cellsignaling and growth factors in development***. Weinheim. WILLEY-VCH verlaggmbH 2006: 909-917.

5- Korpanty G, Sullivan LA, Smyth E, Carney DN, Brekken RA. **Molecular and Clinical Aspects of Targeting the VEGF Pathway in Tumors.**J Oncology 2010; 652320: 12pages.

6- Villaume K, Blanc M, Gouysse G, Walter T, Couderc C, Nejjari M, and et al. ***VEGF Secretion by Neuroendocrine Tumor Cells Is Inhibited by Octreotide and by Inhibitors of the PI3K/AKT/mTOR Pathway.*** Neuroendocrinology 2010; 91(3): 268-78.

7- Adams RH, Alitalo K. ***Molecular regulation of angiogenesis and lymphangiogenesis.*** Nature Reviews Molecular Cell Biology 2007; 8(6): 464- 78.

8- Gavin TP, Stallings HW, Zwetsloot KA, Westerkamp LM, Ryan NA, Moore RA, and et al. ***Lower capillary density but no difference in VEGF expression in obese vs lean young skeletal muscle in humans.*** J ApplPhysiol 2005; 98(1): 315–21.

9- Gavin TP, Westerkamp M, Zwetsloot KA. ***Soleus Plantaris and gastro cnemius VEGF mRNA responses to hypoxia and exercise are preserved in aged compared with young female C57BL/6 mice.*** ActaPhysiol 2006; 188(2): 113–21.

10- CAI J, Ahmad S, Jiang WG, Huang J, Kontos CD, Boulton M, Ahmed A. ***Activation of Vascular Endothelial Growth Factor Receptor-1 Sustains Angiogenesis and Bcl-2 Expression Via the Phosphatidylinositol 3- Kinase Pathway in Endothelial Cells.*** Diabetes 2003; 52(12): 2959–68.

11- Bhattacharya R, Kwon J, Li X, Wang E, Patra S, Bida JP, et al. ***Distinct role of PLCβ3 in VEGF-mediated directional migration and vascular sprouting.*** J Cell Science 2009; 122(7): 1025-34.

12- Sulpice E, Ding S, Muscatelli-Groux BA, Berge M, Han ZC, Plouet J, et al. ***Cross-talk between the VEGF-A and HGF signalling pathways in endothelial cells.***BiolCell 2009 ;101(9): 525–39.

13- Chang SH, Kanasaki K, Gocheva V, Blum G, Harper J, Moses MA, et al. ***VEGF-A Induces Angiogenesis by Perturbing the Cathepsin-Cysteine Protease Inhibitor Balance in Venules Causing Basement Membrane Degradation and Mother Vessel Formation.*** Cancer Res 2009; 69(10): 4537–44.

14- Aghajanian A, Wittchen ES, Allingham MJ, Garrett TA, Burridge K. ***Endothelial cell junctions and the regulation of vascular permeability and leukocyte transmigration.*** J ThrombHaemost 2008; 6(9): 1453–60.

15- Bates DO. ***Vascular endothelial growth factors and vascular permeability.*** Cardiovascular Research 2010; 87(2): 262–271.

16- Nagy JA, Vasile E, Feng D, Sundberg C, Brown LF, Detmar MJ, et al. ***Vascular Permeability Factor/Vascular Endothelial Growth Factor Induces Lymphangiogenesis as well as Angiogenesis.***J ExpMed 2002; 196(11): 1497-506.

17- Folkman J, Shing Y. Angiogenesis.J BiolChem 1992; 267:27-30.

18- Ferté C, Massard C, Moldovan C, Desruennes E, Loriot Y, Soria JC. ***Wound healing delay after central venous access following DCF/VEGF-trap therapy.***Invest New Drugs 2009; 27(6): 583-5.

19- Kieser A, Weich HA, Brandner G, Marmé D, KolchW. ***Mutant p53 potentiates protein kinase C induction of vascular endothelial growth factor expression.*** Oncogene 1994; 9(3): 963-9.

20- Kaefer C, Milner J. ***The role of herbs and spices in cancer prevention.*** J NutrBiochem 2008; 19(6): 347-61.

21- Zargari A. Medicinal Plants. 5th ed. Vol. 2. ***Tehran: Tehran University Publication.*** 1991.

22- Ozek T, Beis S, Demircakmak B and Baser KHC.***Composition of the essential oil of OcimumbasilicumL. cultivated in Turkey.*** J Essential oilRes. 1995; 7: 203 - 5.

23- Akgül A.***Volatile oil composition of sweetBasil (OcimumbasilicumL.)*** cultivating in Turkey.Nahrung 1989; 33: 87 - 8.

24- Vargas A, Zeisser-Labouebe M, Lange N, Curny R, Delie F. ***The chick embryo and its chorioallantoic membrane (CAM) for the in vivo evaluation of drug delivery system.*** Advanced Drug Delivery Reviews 2007; 59(11): 1162-76.

25- Brewer M. S. ***Naturalantioxidant: Sources, compounds, mechanisms of action, and potemtial applications.*** Comperhencive Reviews in Food Scienceand Food Safety 2011; 10: 221-247.

26- Baharara J, Zafar-Balannezhad S, ShahrokhAbadi KH, Hesami Z. ***The effects of different doses of atorvastatin on angiogenesis of chorioallantoic membrane of chick embryo*** .J SharekordUniv Med Sci 2012; 14(2): 82-9.

27- Niazi F, Tehranipour M, Shahrokhabadi Kh. ***The effects of alcoholic leaf extract Ocimumbasilicumon angiogenesis in chick chorioallantoic membrane.*** Arak Medical University J (AMUJ) 2016; 19 (7): 91-8.

28- Moon EJ, Lee YM, Lee OH, Lee MJ, Lee SK, Chung MH, et al. ***A novel angiogenicfactorderived from Aloe vera gel: beta-sitosterol, a plant sterol.*** Angiogenesis. 1999; 3(2): 117-23.

29- Yoo SA, Kwok SK, Kim WU. ***Proinflammatory role of vascular endothelial growth factor in thepathogenesis of rheumatoid arthritis: prospects for therapeutic intervention.*** Mediators Inflamm. 2008:129873.

30- Lieb W, Safa R, Benjamin EJ, Xanthakis V, Yin X, Sullivan LM, et al. ***Vascular endothelial growth factor, its soluble receptor, and hepatocyte growth factor: clinical and genetic correlates and association with vascular function.*** Eur Heart J. [Epubahead of print]. 2009; 30(9): 1121-7

31- Jain RK. ***Lessons from multidisciplinary translational trials on anti-angiogenic therapy of cancer.*** Nature Reviews Cancer. 2008; 8(4):309-16.

32- Ferté C, Massard C, Moldovan C, Desruennes E, Loriot Y, Soria JC. ***Wound healing delay after central venous access following DCF/VEGF-trap therapy.*** Invest New Drugs 2009 27(6):583-5

33- Ferrara N, Davis-Smyth T. ***The biology of vascular endothelial growth factor.*** Endocr Rev 1997; 18(1): 4-25.

34- Inbaneson SJ, Sundaram R, Suganthi P. ***In vitro antiplasmodial effect of ethanolic extracts of traditional medicinal plant Ocimumspecies against Plasmodium falciparum.*** Asian Pacific J Tropical Medicine 2012; 5(2): 103-106.

35- Javanmardi J, Khalighi A, Khashi A, Bais HP, Vivanco JM. ***Chemichalcharacterisation of Basil (OcimumbasilicumL.) found in localaccessions and used in traditional medicins in Iran***. *J* Agric and Food Chem 2002; 50(21): 5878 -83.[persion]

36- Ziaei M, Sharifi M, Naghdi Badi H, Tahsili J, Ghorbani Nohooji M. ***A Review on Ocimumbasilicum L. Medicinal Plant with a Focus on the most Important Secondary Compounds and its Medicinal and Agronomic Properties*** .JMP 2014; 4(52) :26-40.

37- Forooghian F, Das B. ***Anti angiogenic effect of ribonucleic acid interference targeting vascular endothelial growth factor and hipoxia inducible factor alpha.*** Am J Ophthalmol 2007; 144(5): 761-8.

38- Zadhoush F, Panjehpour M. ***Physiological role of adenosine and its receptors in tissue hypoxia-induced Angiogenesis*** .Physiology and Pharmacology 2012; 16(3): 209-221. [Persian]

39- Chiang LC, Ng LT, Cheng PW, Chiang W and Lin CC. ***Antiviral activities of extracts and selected pure constituents of Ocimumbasilicum.***ClinExpPharmacol Physiol 2005; 32(10): 811- 6.

40- TaherriShirazi M, Gholami H, KavoosiGh, Rowshan V, Tafsiry A. ***Chemical composition, antioxidant, antimicrobial and cytotoxic activities of targets minuta and Ocimumbasiilcum essential oils.*** Food Sci & Nutrition J 2014; 2(2): 146–155.

41- Copy & Peast in 24. Please Delete This. Vargas A, Zeisser-Labouebe M, Lange N, Curny R, Delie F. ***The chick embryo and its chorioallantoic membrane (CAM) for the in vivo evaluation of drug delivery system.***Advanced Drug Delivery Reviews 2007; 59(11): 1162-76.

The Effects of Total Extract *Ocimumbasilicum*on VEGF Gene Expression Changes in Chick Embryo Chorioallantoic Membrane Angiogenesis

Fateme Niazi[1], Khadije Shahrokh abadi[*2], Maryam Tehranipour[3]

[1,2,3] Department of Biology, Mashhad Branch, Islamic Azad University, Mashhad, Iran.

Received: 14 May 2017 **Accepted:** 1 Jun 2017

Abstract

Introduction: Angiogenesis is one of the most important biological processes that any disruption of it can cause diseases. The main point of the molecular guidance in this process is the vascular endothelial growth factor (VEGF) that acts through its receptors and is one of the angiogenesis specific regulators. This study aimed to investigate the effect of *Ocimumbasilicum* aqueous and alcoholic extract on VEGF gene expression changes in chick chorioallantoic membrane.

Methods: In this empirical study, 60 Ross fertilized eggs were randomly divided into 6 groups, including control group, sham-exposed group, and 4 experimental groups. On the second day of incubation, a window was opened on the eggs and on the eighth day 50 and 150 mg/kg of basil aqueous and alcoholic extracts were injected into the chick chorioallantoic membrane (CAM). On the twelfth day, for RNA extraction and VEGF gene expression examination the chorioallantoic membrane was sampled, then cDNA was synthesized and VEGF gene expression changes were studied using quantitative data analysis in all groups.

Results: The results showed that VEGF gene expression- under the influence of aqueous and alcoholic extracts of basil- increased in all experimental groups compared to the sham group, but the rise was more in those groups, which were treated with aqueous extract, in both dosages, than alcoholic extract-treated groups.

Conclusion: Both aqueous and alcoholic extracts of basil increased VEGF gene expression. The study showed an increase in the number and length of vessels. According to the increasing effects, basil aqueous and alcoholic extracts can affect the molecular processes of growth and dependent processes.

Keywords: Angiogenesis, VEGF, *Ocimumbasilicum*, Chorioallantoic Membrane

This paper should be cited as:

Niazi F, Shahrokh abadi Kh, Tehranipour M. **The Effects of Total Extract *Ocimumbasilicum*on VEGF Gene Expression Changes in Chick Embryo Chorioallantoic Membrane Angiogenesis.** J Shahid Sadoughi Univ Med Sci 2017; 25(8): 629-40.

***Corresponding author: Tel: +98 5138435050, email: shahrokhabady@yahoo.com**