



اثر تاراکساسترول بر مسیرهای التهابی و میوزنیک وابسته به Akt1 در سلول‌های عضلانی اسکلتی انسان تحت التهاب القا شده با لیپوپلی ساکارید

زهرا رشیدی^۱، مونا پژوهی^۱، علی قنبری^۱، محمدرضا غلامی^{۱*}، زهرا گذاری^۲

۱- گروه علوم تشریح، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه، کرمانشاه، ایران.

۲- کمیته تحقیقات دانشجویی، دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه، کرمانشاه، ایران.

تاریخ دریافت: ۱۴۰۴/۰۱/۲۹، تاریخ پذیرش: ۱۴۰۴/۰۷/۰۶

چکیده

مقدمه: هدف این مطالعه بررسی اثرات تاراکساسترول بر تکثیر و مسیرهای التهابی و میوزنیک مرتبط با سیگنالینگ Akt1 در سلول‌های عضلانی اسکلتی انسان، با استفاده از مدل آزمایشگاهی التهاب القا شده با لیپوپلی ساکارید بود.

مواد و روش‌ها: رده سلولی عضله اسکلتی انسان (C436) در شرایط آزمایشگاهی در محیط پایه یا محیط حاوی لیپوپلی ساکارید (غلظت ۰/۱ میکروگرم/میلی‌لیتر) و/یا تاراکساسترول (غلظت‌های ۵، ۱۰ و ۱۵ میکرومولار) کشت داده شدند. بعد از ۲۴ ساعت آزمون MTT برای اندازه‌گیری تکثیر سلولی استفاده شد. سپس غلظت بهینه تاراکساسترول و زمان تیمار انتخاب شد. تجزیه و تحلیل Real time PCR برای تشخیص سطوح فاکتورهای التهابی، فاکتور میوزنیک و بیان Akt1 استفاده شد.

نتایج: تاراکساسترول تکثیر سلول‌ها را در غلظت‌های ۵، ۱۰ و ۱۵ میکروگرم/میلی‌لیتر بعد از ۲۴ ساعت به‌صورت معنی‌دار به میزان ۱/۰۵، ۱/۰۷ و ۱/۰۵ برابر افزایش داد ($P \leq 0/05$). لیپوپلی ساکارید بیان ژن‌های $TNF-\alpha$ ، $IL-1\beta$ و $IL-6$ را به‌صورت معنی‌دار به میزان ۴/۳۲، ۳/۳۵ و ۳/۹۹ برابر افزایش داد ($P \leq 0/05$). در حالی که تاراکساسترول در هر سه غلظت بیان هر ژن را به‌صورت معنی‌دار در مقایسه با گروه لیپوپلی ساکارید کاهش داد ($P \leq 0/05$). لیپوپلی ساکارید بیان ژن‌های Akt1، myogenin و MyoD1 را به‌صورت معنی‌دار به میزان ۱۵، ۶۸ و ۶۵ درصد کاهش داد ($P \leq 0/05$). در حالی که تاراکساسترول در هر سه غلظت بیان آن ژن‌ها را به‌صورت معنی‌دار در مقایسه با گروه لیپوپلی ساکارید افزایش داد ($P \leq 0/05$).

نتیجه‌گیری: تاراکساسترول می‌تواند تکثیر سلول‌های عضلانی اسکلتی را افزایش دهد و همچنین می‌تواند بیان سایتوکاین‌های التهابی $IL-1\beta$ ، $IL-6$ و $TNF-\alpha$ را مهار کند و بیان سایتوکاین‌های میوزنیک myogenin و MyoD1 را تقویت کند، که نشان می‌دهد تاراکساسترول ممکن است یک اثر برای ترویج تکثیر سلولی و کاهش پاسخ التهابی در روند تسکین درد عضلانی تأخیری داشته باشد.

واژه‌های کلیدی: تاراکساسترول، التهاب، فاکتور میوزنیک، سلول‌های عضلانی.

*نویسنده مسئول: دانشکده پزشکی-گروه علوم تشریح، دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه، کرمانشاه، ایران، تلفن: ۰۹۱۸۹۲۴۷۲۴۳، نمابر: ۰۸۳۳۴۲۷۹۹۲۰-۰۲۱، Email: rezagholami57@gmail.com

ارجاع: رشیدی زهرا، پژوهی مونا، قنبری علی، غلامی محمدرضا، گذاری زهرا. اثر تاراکساسترول بر مسیرهای التهابی و میوزنیک وابسته به Akt1 در سلول‌های عضلانی اسکلتی انسان تحت التهاب القا شده با لیپوپلی ساکارید. مجله دانش و تندرستی در علوم پایه پزشکی ۱۴۰۴؛ ۲۰(۳): ۳۶-۴۲.



مقدمه

ریتم سیرکادین (Circadian Rhythm) التهاب یک فرآیند پاتوفیزیولوژیکی پیچیده است که توسط مولکول‌های سیگنال‌دهنده مختلف تولید شده توسط لکوسیت‌ها، ماکروفاژها و ماست سل‌ها انجام می‌شود. آسیب به بافت همبند فیبرهای عضلانی ناشی از ورزش غیرعادی می‌تواند منجر به تجمع برادی کینین، هیستامین و پروستاگلاندین شود که مونوسیت‌ها و نوتروفیل‌ها را از رگ‌های خونی کوچک به محل آسیب جذب می‌کند. مونوسیت‌ها، نوتروفیل‌ها و محصولات آن آزاد می‌کنند می‌توانند پایه‌های عصبی نوع III و IV را تحریک کنند و در نتیجه درد عضلانی با شروع تأخیری (DOMS) ایجاد شود (۱).

التهاب می‌تواند باعث آزاد شدن سیتوکین‌های مختلف مانند اینترفرون-گاما، اینترلوکین 1-IL (IL-1)، IL-6، IL-8 و فاکتور نکروز تومور آلفا (TNF- α) شود. هدف از پاسخ التهابی ترویج بهبود بافت آسیب دیده است (۲ و ۳). فاگوسیتوز ناشی از التهاب می‌تواند بافت عضلانی نکروزه را تمیز کند، که نقش مهمی در روند ترمیم عضله ایفا می‌کند و در نهایت باعث بهبود بافت می‌شود. با این حال، التهاب بیش از حد می‌تواند باعث آسیب ثانویه به عضلات اسکلتی شود. بنابراین، پاسخ التهابی در بازیابی عضلانی یک "شمشیر دولبه" است و کنترل پاسخ‌های التهابی به یک هدف درمانی بالقوه برای کاهش DOMS تبدیل شده است. در حال حاضر، گزینه‌های درمانی برای DOMS شامل داروهای ضدالتهابی، استفاده از کمپرس گرم، فیزیوتراپی و طب سوزنی است. با این حال، اثرات آنها بحث برانگیز است. پاسخ التهابی برای روند بهبودی ضروری است و نمی‌توان آن را به‌طور کامل مهار کرد. بنابراین، درمان مؤثر برای DOMS باید اطمینان حاصل کند که یک پاسخ التهابی مناسب حفظ می‌شود و در عین حال التهاب بیش از حد را محدود می‌کند تا از آسیب ثانویه جلوگیری شود. اکثر داروهای ضدالتهابی نسبتاً قوی هستند و می‌توانند منجر به سرکوب بیش از حد التهاب شوند (۲ و ۳).

چندین پروتئین تنظیمی myogenic، فاکتورهای رونویسی از خانواده ژن تعیین myogenic (MyoD)، اخیراً شناسایی شده‌اند. اینها در تعهد سلول‌های پیش‌ساز مزانشیمی به دودمان میوژنیک و در تمایز و حفظ فنوتیپ عضله اسکلتی نقش دارند. آنتی‌بادی‌های مونوکلونال جدید موجود برای myogenin و MyoD1، دو پروتئین تنظیم‌کننده میوژنیک، نشان‌دهنده‌های بسیار حساس و اختصاصی برای رابدومیوسارکوم در بافت‌های منجمد و ثابت شده با فرمالین و پارافین هستند، حتی با تومورهای با تمایز ضعیف که میوفیلامنت‌ها را تشکیل نمی‌دهند. توسط ایمونوهیستوشیمی بیان Myogenin و MyoD1 نیز اخیراً در هسته‌های عضله اسکلتی جنین با تکنیک‌های بازیابی اپی توپ ناشی از گرما ثبت

شده است. بنابراین پروتئین‌های تنظیمی میوژنیک نشانگرهای بالقوه مناسبی برای تمایز عضلات اسکلتی هستند (۴).

تاراکساسترول (Urs-20(30)-en-3-ol β , 18 α , 18 α) یک تری‌ترین پنتا سایکلیک است و از گیاهان مختلفی از جمله قاصدک جدا شده است. قاصدک در طب سنتی به‌عنوان یک داروی سنتی با فعالیت‌های افزایش شیر، ادرارآور و ضد التهابی است. تاراکساسترول به‌عنوان یک ترکیب فعال زیستی مهم در قاصدک، دارای فعالیت ضد التهابی و ضد اکسیدانی قوی است (۵). قاصدک حاوی کلسترول گیاهی است که به دلیل خواص دیورتیک و ضدالتهابی آن از دیرباز به‌صورت بالینی مورد استفاده قرار گرفته است (۶). مطالعه نشان داده است که قاصدک دارای فعالیت‌های ضد التهابی حاد است و از پانکراتیت حاد ناشی از کوله سیستوکینین در موش‌ها محافظت می‌کند (۷). ترکیبات دارویی که در عصاره قاصدک شناسایی شده‌اند شامل اسیدهای فنولیک و فلاونوئیدها هستند (۸-۱۰). مطالعات نشان داده‌اند که برخی از این ترکیبات دارای اثرات درمانی بالقوه در التهاب هستند (۱۱-۱۲). تری‌ترین‌ها به‌طور گسترده در گیاهان توزیع می‌شوند و معمولاً به‌عنوان اجزای اصلی مسئول اثرات ضدالتهابی شناخته می‌شوند (۱۳-۱۸). استرول‌ها نیز به‌عنوان مهارکننده‌های خوبی از التهاب نشان داده شده‌اند (۱۹-۲۰).

با این حال، نقش تاراکساسترول بر DOMS عضلات اسکلتی ناشناخته باقی‌مانده است. در این مطالعه، ما اثرات تاراکساسترول را بر تکثیر سلول‌های عضلانی اسکلتی و همچنین توانایی آن در مهار پاسخ التهابی برای جلوگیری از التهاب ثانویه بررسی می‌کنیم.

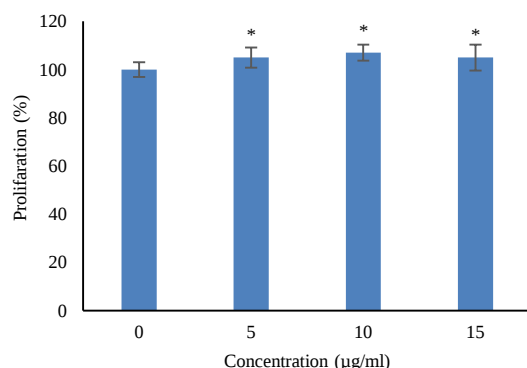
مواد و روش‌ها

رده سلولی عضلانی انسانی (C436) از بانک سلولی انستیتو پاستور ایران تهیه شد و در DMEM حاوی سرم جنین گاو ۱۰٪ و آنتی‌بیوتیک‌ها (۱/۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر استرپتومایسین و ۱۰۰ واحد در میلی‌لیتر پنی‌سیلین) در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در دی اکسید کربن ۵٪ کشت شدند. سلول‌ها در پاساژ چهارم برای تیمار استفاده شدند.

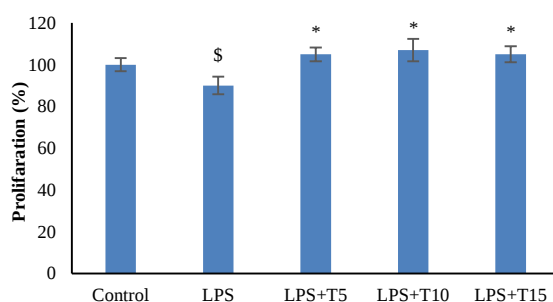
سلول‌ها تریپسینه و از فلاسک‌ها جمع‌آوری و با استفاده از لام نئوبار شمارش تعداد کل سلول‌ها انجام شد. تعداد ۱۵ هزار عدد سلول در هر کدام از چاهک پلیت‌های ۹۶ چاهکی حاوی میزان ۲۰۰ میکرولیتر محیط کشت منتقل شد. سلول‌ها با غلظت‌های ۵، ۱۰ و ۱۵ میکرومولار تاراکساسترول تیمار شدند. همچنین در پلیت دیگر سلول‌ها با غلظت ۰/۱ میکروگرم/میلی‌لیتر لیپوپلی ساکارید به تنهایی و در ترکیب با غلظت‌های ۵، ۱۰ و ۱۵ میکرومولار تاراکساسترول تیمار شدند. چاهک‌های فاقد تیمار به‌عنوان کنترل در نظر گرفته شد. پلیت‌ها در بازه زمانی ۲۴ ساعت در انکوباتور انکوبه شدند. سپس ۲۰ میکرولیتر محلول MTT به هر چاهک

دارای اثرات سمیت معنی‌دار می‌باشد ($P \leq 0.05$) (نمودار B۱). در حالی که تاراکساسترول به‌طور قابل توجهی سمیت ناشی از لیپوپلی ساکارید را مهار کرد، که منجر به افزایش معنی‌دار تعداد سلول‌های زنده در مقایسه با گروه لیپوپلی ساکارید شد ($P \leq 0.05$) (نمودار B۱).

A



B



نمودار ۱- اثر تاراکساسترول و/یا لیپوپلی ساکارید بر تکثیر سلول‌های عضلانی
تکثیر سلول‌ها بعد از ۲۴ ساعت تیمار با غلظت‌های مختلف به‌وسیله آزمون MTT مورد بررسی قرار گرفت، سلول‌های گروه کنترل حجم یکسانی از محیط بدون دارو دریافت کردند. * نشان‌دهنده $P < 0.05$ در مقایسه با لیپوپلی ساکارید و \$ نشان‌دهنده $P < 0.05$ در مقایسه با کنترل می‌باشد.

لیپوپلی ساکارید بیان ژن‌های $TNF-\alpha$ ، $IL-1\beta$ و $IL-6$ را به‌صورت معنی‌دار به میزان ۴/۳۲، ۳/۳۵ و ۳/۹۹ برابر افزایش داد ($P \leq 0.05$)، در حالی که تاراکساسترول بیان هر ژن را به‌صورت معنی‌دار در مقایسه با گروه لیپوپلی ساکارید کاهش داد ($P \leq 0.05$) (نمودار ۲).

بیان ژن بعد از ۲۴ ساعت تیمار با غلظت‌های مختلف به‌وسیله Real-time PCR مورد بررسی قرار گرفت، سلول‌های گروه کنترل حجم یکسانی از محیط بدون دارو دریافت کردند. *** نشان‌دهنده $P < 0.001$ در مقایسه با لیپوپلی ساکارید و \$\$\$ نشان‌دهنده $P < 0.001$ در مقایسه با کنترل می‌باشد.

اضافه و به مدت یک ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. پس از انکوباسیون، محیط کشت درون چاهک‌ها تخلیه شد و به میزان ۱۰۰ میکرولیتر حلال DMSO به هر چاهک اضافه گردید. پس از پنج دقیقه انکوباسیون در دمای اتاق میزان جذب نوری آن‌ها به‌عنوان معیاری از زنده‌مانی سلول‌ها سنجیده شد. درصد زنده‌مانی از فرمول زیر محاسبه گردید.

$$(\text{Abs test cells} / \text{Abs control cells} \times 100) = \text{cell viability (\%)}$$

تجزیه و تحلیل بیان ژن با روش Real-time PCR انجام شد. پس از تیمار به مدت ۲۴ ساعت با غلظت ۰/۱ میکروگرم/میلی لیتر لیپوپلی ساکارید به تنهایی و در ترکیب با غلظت‌های ۵، ۱۰ و ۱۵ میکرومولار تاراکساسترول، RNA با استفاده از 1×10^6 سلول کنترل و گروه تیمار شده با معرف TRIZol جدا شد. خلوص و یکپارچگی RNA با استفاده از نانودراپ ارزیابی شد. DNA مکمل (cDNA) طبق روش کیت سنتز شد. Real-time PCR توسط SYBR Premix Ex Taq Technology طبق پروتکل سازنده انجام شد. تغییرات بر اساس روش مقایسه‌ای $2^{-\Delta\Delta Ct}$ به‌دست آمد. β اکتین به‌عنوان یک کنترل داخلی استفاده شد. پرایمرها با استفاده از نرم‌افزار GeneRunner طراحی، از طریق NCBI Primer-BLAST تأیید و از شرکت پیشگام (تهران، جمهوری اسلامی ایران) تهیه شدند. توالی‌های پرایمر در جدول ۱ لیست شده است.

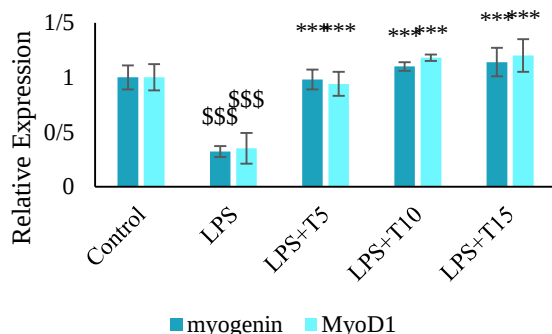
جدول ۱- توالی پرایمرهای مورد استفاده در این مطالعه

نام ژن	توالی پرایمر
TNF- α	Forward: CGAGTGACAAGCCTGTAGCC Reverse: TGAAGAGGACCTGGGAGTAGAT
IL-1 β	Forward: TTACAGTGGCAATGAGGATG Reverse: TGTAGTGGTGGTCGGAGATT
IL-6	Forward: CCTTCGGTCCAGTTGCCTTCT Reverse: CAGTGCCTCTTTGCTGCTTTC
Akt1	Forward: ACTTCCCCAGTCTCTCTACTCG Reverse: CCCACAGCACAAAACGCTTTTC
Myogenin	Forward: ATGAACCCCAACCAGAGGCTGC Reverse: GAGATCTCTGACGTCTATAGTG
myoD1	Forward: TGGGCATGCAAGCCTGCAAG Reverse: CAGTCCGAGATCCAAGTCTC
GAPDH	Forward: TGTTCACAGTATGACTCCACTC Reverse: TCC ACC ACC CTG TTG CTG TA

جهت بررسی آماری داده‌ها از نرم‌افزار آماری SPSS و روش تحلیل واریانس یکطرفه (one way ANOVA) و آزمون tukey استفاده شد. ضریب معنی‌دار بودن داده‌ها نیز در سطح ۹۵٪ مشخص گردید.

نتایج

در مطالعه حاضر، نقش تاراکساسترول را بر تکثیر پایه و همچنین سمیت ناشی از لیپوپلی ساکارید در سلول‌های عضلانی بررسی شد. تاراکساسترول تکثیر سلول‌ها را در غلظت‌های ۵، ۱۰ و ۱۵ میکروگرم/میلی لیتر بعد از ۲۴ ساعت به‌صورت معنی‌دار به میزان ۱/۰۵، ۱/۰۷ و ۱/۰۵ برابر افزایش داد افزایش داد ($P \leq 0.05$) (شکل A۱). همچنین نتایج نشان داد که لیپوپلی ساکارید (۰/۱ میکروگرم/میلی لیتر)



نمودار ۴- اثر تاراکاسترول و/یا لیپوپلی ساکارید بر بیان ژن های myogenin و MyoD1 در سلول های عضلانی انسان

بیان ژن بعد از ۲۴ ساعت تیمار با غلظت های مختلف به وسیله Real-time PCR مورد بررسی قرار گرفت، سلول های گروه کنترل حجم یکسانی از محیط بدون دارو دریافت کردند. *** نشان دهنده $P < 0.001$ در مقایسه با لیپوپلی ساکارید و \$\$\$ نشان دهنده $P < 0.001$ در مقایسه با کنترل می باشد.

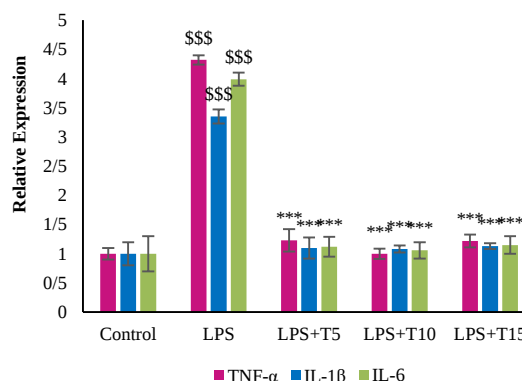
بحث

DOMS معمولاً با تغییرات ساختاری، فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی در بافت عضله همراه است. التهاب ثانویه می تواند علایم بالینی DOMS مانند درد، ضعف و تورم عضله را تشدید کرده و عملکرد ورزشی را کاهش دهد (۲۱-۲۳). در مراحل اولیه DOMS، آسیب مکانیکی به سارکومرها، لوله های T و شبکه سارکوپلاسمی منجر به فعال شدن پاسخ های التهابی می شود. این پاسخ ها ظرف یک ساعت پس از آسیب آغاز و تا ۴۸ ساعت به اوج می رسند و نفوذ مونوسیت ها و ماکروفاژها تا چند روز ادامه دارد (۲۴). این سلول های التهابی علاوه بر پاکسازی بقایای سلولی، می توانند با آزادسازی سایتوکاین ها به تخریب ساختارهای عضلانی کمک کند (۲۵).

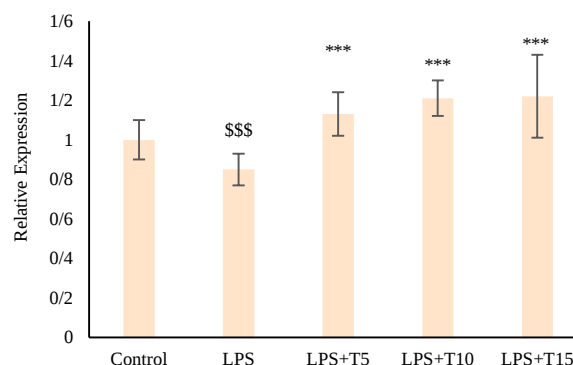
برای شبیه سازی این شرایط در محیط آزمایشگاهی، در مطالعه حاضر از مدل التهاب القاشده با لیپوپلی ساکارید استفاده شد. لیپوپلی ساکارید به عنوان یک جزء دیواره سلولی باکتری های گرم منفی، محرک قوی پاسخ ایمنی ذاتی است و با فعال سازی مسیرهای التهابی در سلول های عضلانی اسکلتی، بیان سایتوکاین هایی مانند IL-1 β ، IL-6 و TNF- α را افزایش می دهد (۲۶). نتایج ما نیز نشان داد که لیپوپلی ساکارید تکثیر سلول های عضلانی را مهار کرده و بیان سایتوکاین های التهابی را به طور معنی داری افزایش می دهد.

تأثیر تاراکاسترول در این مدل، مهار معنی دار سایتوکاین های التهابی و بهبود تکثیر سلولی بود. این ترکیب که از گیاه قاصدک استخراج می شود، پیش تر نیز به عنوان یک عامل ضدالتهابی قوی در مطالعات بافتی و سلولی معرفی شده است (۲۷-۳۳). در مطالعه ما، تاراکاسترول علاوه بر کاهش

لیپوپلی ساکارید بیان ژن های Akt1 را به صورت معنی دار به میزان ۱۵ درصد کاهش داد ($P \leq 0.05$)، در حالی که تاراکاسترول بیان آن ژن را به صورت معنی دار در مقایسه با گروه تیمار شده با لیپوپلی ساکارید افزایش داد ($P \leq 0.05$) (نمودار ۳).



نمودار ۲- اثر تاراکاسترول و/یا لیپوپلی ساکارید بر بیان ژن های مارکرهای التهابی سلول های عضلانی انسان



نمودار ۳- اثر تاراکاسترول و/یا لیپوپلی ساکارید بر بیان ژن Akt1 در سلول های عضلانی انسان

بیان ژن بعد از ۲۴ ساعت تیمار با غلظت های مختلف به وسیله Real-time PCR مورد بررسی قرار گرفت، سلول های گروه کنترل حجم یکسانی از محیط بدون دارو دریافت کردند. *** نشان دهنده $P < 0.001$ در مقایسه با لیپوپلی ساکارید و \$\$\$ نشان دهنده $P < 0.001$ در مقایسه با کنترل می باشد.

لیپوپلی ساکارید بیان ژن های myogenin و MyoD1 را به صورت معنی دار به میزان ۶۸ و ۶۵ درصد کاهش داد ($P \leq 0.05$)، در حالی که تاراکاسترول بیان آن ژن ها را به صورت معنی دار در مقایسه با گروه لیپوپلی ساکارید افزایش داد ($P \leq 0.05$) (نمودار ۴).

نویسندگان این مقاله نهایت تشکر و قدردانی خود را از معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه اعلام می دارند.

ملاحظات اخلاقی

پژوهش فوق حاصل طرح تحقیقاتی مصوب دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه با کد ۴۰۳۰۴۳۲ است که در دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه انجام گرفته است. کد اخلاق طرح IR.KUMS.MED.REC.1403.179 می باشد.

تعارض منافع

هیچ گونه تعارض منافع بین نویسندگان وجود ندارد.

مشارکت نویسندگان

زهرار رشیدی: طراحی آزمایش ها و نظارت بر تحقیق.

محمدرضا غلامی: تجزیه و تحلیل داده ها.

مونا پژوهی و آریتا فرامرزی: انجام آزمایشات کشت سلولی و سنجش مولکولی.

علی قنبری: نوشتن مقاله.

زهرار گداری: ویرایش مقاله.

همه نویسندگان نسخه نهایی را خوانده و تأیید کردند.

حمایت مالی

دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه حامی مالی این مقاله می باشد.

کد اخلاق

این پژوهش دارای کد اخلاق IR.KUMS.MED.REC.1403.179 است.

References

- Guastadisegni C, Nicolini A, Balduzzi M, Ajmone-Cat MA, Minghetti L. Modulation of PGE2 and TNF- α by nitric oxide in resting and LPS-activated RAW 264.7 cells. *Cytokine* 2002;19:175-80. doi: 10.1006/cyto.2002.1955
- Dunster JL. The macrophage and its role in inflammation and tissue repair: mathematical and systems biology approaches. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med* 2016;8:87-99. doi: 10.1002/wsbm.1320
- Molofsky AB, Savage AK, Locksley RM. Interleukin-33 in tissue homeostasis, injury, and inflammation. *Immunity* 2015;42:1005-19. doi: 10.1016/j.immuni.2015.06.006
- Gómez JA, Amin MB, Ro JY, Linden MD, Lee MW, Zarbo RJ. Immunohistochemical profile of myogenin and MyoD1 does not support skeletal muscle lineage in alveolar soft part sarcoma. *Arch Pathol Lab Med* 1999;123:503-7. doi: 10.5858/1999-123-0503-IPOMAM. PMID: 10383802
- Sigstedt SC, Hooten CJ, Callewaert MC, Jenkins AR, Romero AE, Pullin MJ, Kornienko A, Lowrey TK, Slambrouch SV, Steelant WF. Evaluation of aqueous extracts of Taraxacum officinale on growth and invasion of breast and prostate cancer cells. *Int J Oncol* 2008; 32:1085-90.
- Ahmad VU, Yasmeen S, Ali Z, Khan MA, Choudhary MI, Akhtar F, et al. Taraxacin, a new guaianolide from Taraxacum wallichii. *J Nat Prod* 2000;63:1010-1. doi: 10.1021/np990495

IL-1 β , IL-6 و TNF- α . بیان فاکتورهای میوژنیک مانند myogenin و MyoD1 و همچنین Akt1 را افزایش داد. این اثرات نشان می دهد که تاراکساسترول می تواند علاوه بر کنترل التهاب، فرآیندهای بازسازی عضله را نیز تقویت کند.

TNF- α به عنوان یک سایتوکاین کلیدی، نقش دوگانه ای در بازسازی عضله دارد. در غلظت های پایین، می تواند تکثیر سلول های ماهوارهای و آغاز بازسازی را تحریک کند، اما در غلظت های بالا، بیان MyoD1 و myogenin را مهار کرده و میوژن را سرکوب می کند (۳۷-۳۴). یافته های ما نشان می دهد که مهار نسبی TNF- α توسط تاراکساسترول ممکن است تعادل مطلوبی بین کنترل التهاب و حفظ فرآیند بازسازی ایجاد کند.

یافته های جانبی ما در مورد اثرات ضدالتهابی تاراکساسترول با گزارش های دیگر هم راستا است. به عنوان نمونه، در مدل های آرتریت روماتوئید، تاراکساسترول با مهار مسیرهای NF- κ B و NLRP3، پیشرفت بیماری و تخریب بافت مفصلی را کاهش داده است (۳۸). این شواهد از پتانسیل درمانی تاراکساسترول در بیماری های التهابی فراتر از عضله نیز حمایت می کند.

به طور کلی، این مطالعه نشان داد که تاراکساسترول قادر است در مدل لیپوپلی ساکارید، تکثیر سلول های عضلانی اسکلتی را افزایش داده، بیان فاکتورهای میوژنیک را تقویت و پاسخ های التهابی را تعدیل کند. این یافته ها جایگاه بالقوه تاراکساسترول را به عنوان یک عامل درمانی برای بهبود DOMS و سایر اختلالات التهابی عضله تقویت می کند.

در مجموع، یافته های ما نشان داد که تاراکساسترول می تواند تکثیر و فعالیت سلول های عضلانی اسکلتی را افزایش دهد و لیپوپلی ساکارید می تواند فعالیت و تکثیر سلولی را مهار کند. همان طور که قبلاً ذکر شد، تاراکساسترول می تواند بیان سایتوکاین های التهابی، از جمله IL-1 β ، IL-6 و TNF- α را مهار کند و بیان سایتوکاین های میوژنیک مانند myogenin و MyoD1 را تقویت کند، که نشان می دهد تاراکساسترول ممکن است یک اثر هم افزایی برای ترویج تکثیر سلولی و کاهش پاسخ التهابی در روند تسکین DOMS داشته باشد. TNF- α ممکن است سیتوکین کلیدی در این اثر هم افزایی باشد. یافته های این مطالعه نشان می دهد که تاراکساسترول دارای پتانسیل درمانی برای بهبود آسیب های عضله اسکلتی از طریق افزایش تکثیر سلولی و تعدیل التهاب است. با این حال، برای تأیید این اثرات، انجام مطالعات تکمیلی در مدل های in vivo و کارآزمایی های بالینی ضروری است.

تشکر و قدردانی



7. Seo SW, Koo HN, An HJ, Kwon KB, Lim BC, Seo EA, et al. Taraxacum officinale protects against cholecystokinin-induced acute pancreatitis in rats. *World J Gastroenterol* 2005;11:597-9. doi: 10.3748/wjg.v11.i4.597
8. Williams CA, Goldstone F, Greenham J. Flavonoids, cinnamic acids and coumarins from the different tissues and medicinal preparations of Taraxacum officinale. *Phytochemistry* 1996;42:121-7. doi: 10.1016/0031-9422(95)00865-9.
9. Koh YJ, Cha DS, Ko JS, Park HJ, Choi HD. Anti-inflammatory effect of Taraxacum officinale leaves on lipopolysaccharide-induced inflammatory responses in RAW 264.7 cells. *J Med Food* 2010;13:870-8. doi: 10.1089/jmf.2009.1249
10. Park CM, Ji YP, Song YS. Luteolin and chicoric acid, two major constituents of dandelion leaf, inhibit nitric oxide and lipid peroxide formation in lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7 cells. *J Food Sci Nutr* 2010;15:92-7. doi: 10.3746/jfn.2010.15.2.092.
11. Budzianowski J. Coumarins, caffeoyltartaric acids and their artifactual methyl esters from Taraxacum officinale leaves. *Planta Med* 1997;63:288. doi: 10.1055/s-2006-957681.
12. Hoult JR, Payá M. Pharmacological and biochemical actions of simple coumarins: Natural products with therapeutic potential. *Gen Pharmacol* 1996;27:713-22. doi: 10.1016/0306-3623(95)02112-4.
13. Leal LK, Ferreira AA, Bezerra GA, Matos FJ, Viana GS. Antinociceptive, anti-inflammatory and bronchodilator activities of Brazilian medicinal plants containing coumarin: A comparative study. *J Ethnopharmacol* 2000;70:151-9. doi: 10.1016/S0378-8741(99)00165-8.
14. Cheng JF, Chen M, Wallace D, Tith S, Arrhenius T, Kashiwagi H, et al. Discovery and structure-activity relationship of coumarin derivatives as TNF-alpha inhibitors. *Bioorg Med Chem Lett* 2004;14:2411-5. doi: 10.1016/S0960-894X(04)00355-5.
15. Shan J, Fu J, Zhao Z, Kong X, Huang H, Luo L, et al. Chlorogenic acid inhibits lipopolysaccharide-induced cyclooxygenase-2 expression in RAW264.7 cells through suppressing NF-kappaB and JNK/AP-1 activation. *Int Immunopharmacol* 2009;9:1042-8. doi: 10.1016/j.intimp.2009.04.011.
16. Ríos JL, Recio MC, Mániz S, Giner RM. Natural triterpenoids as anti-inflammatory agents. *Stud Nat Prod Chem* 2000;22:93-143. doi: 10.1016/S1572-5995(00)80024-1.
17. Siqueira JM Jr, Peters RR, Gazola AC, Krepsky PB, Farias MR, Rae GA, et al. Anti-inflammatory effects of a triterpenoid isolated from Wilbrandia ebracteata cogn. *Life Sci* 2007;80:1382-7. doi: 10.1016/j.lfs.2006.12.021.
18. Banno N, Akihisa T, Yasukawa K, Tokuda H, Tabata K, Nakamura Y, et al. Anti-inflammatory activities of the triterpene acids from the resin of Boswellia carteri. *J Ethnopharmacol* 2006;107:249-53. doi: 10.1016/j.jep.2006.03.006.
19. Ammar S, Edziri H, Mahjoub MA, Chatter R, Bouraoui A, Mighri Z, et al. Spasmolytic and anti-inflammatory effects of constituents from Hertia cheirifolia. *Phytomedicine* 2009;16:1156-61. doi: 10.1016/j.phymed.2009.03.012.
20. Akihisa T, Yasukawa K. Antitumor-promoting and anti-inflammatory activities of triterpenoids and sterols from plants and fungi. *Stud Nat Prod Chem* 2001;25:43-87. doi: 10.1016/S1572-5995(01)80005-3.
21. Torres R, Ribeiro F, Alberto Duarte J, Cabri JM. Evidence of the physiotherapeutic interventions used currently after exercise-induced muscle damage: Systematic review and meta-analysis. *Phys Ther Sport* 2012;13:101-14. doi: 10.1016/j.ptsp.2011.07.005.
22. Lavender AP, Nosaka K. Changes in fluctuation of isometric force following eccentric and concentric exercise of the elbow flexors. *Eur J Appl Physiol* 2006;96:235-40. doi: 10.1007/s00421-005-0069-5.
23. Graven-Nielsen T, Arendt-Nielsen L. Induction and assessment of muscle pain, referred pain, and muscular hyperalgesia. *Curr Pain Headache Rep* 2003;7:443-51. doi: 10.1007/s11916-003-0060-y.
24. Grounds MD. Reasons for the degeneration of ageing skeletal muscle: A central role for IGF-1 signalling. *Biogerontology*. 2002;3:19-24. doi: 10.1023/A:1015234709314
25. Armstrong RB, Ogilvie RW, Schwane JA. Eccentric exercise-induced injury to rat skeletal muscle. *J Appl Physiol Respir Environ Exerc Physiol*. 1983;54:80-93. doi: 10.1152/jappl.1983.54.1.80
26. Meng F, Lowell CA. Lipopolysaccharide (LPS)-induced macrophage activation and signal transduction in the absence of Src-family kinases Hck, Fgr, and Lyn. *J Exp Med*. 1997;185:1661-70. doi: 10.1084/jem.185.9.1661.
27. Gargouri M, Magné C, Ben Amara I, Ben Saad H, El Feki A. Dandelion-enriched diet of mothers alleviates lead-induced damages in liver of newborn rats. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* 2017;63:67-75. doi: 10.14715/cmb/2017.63.2.10.
28. Wirngo FE, Lambert MN, Jeppesen PB. The physiological effects of dandelion (Taraxacum officinale) in type 2 diabetes. *Rev Diabet Stud*. 2016;13:113-31. doi: 10.1900/RDS.2016.13.113.
29. Zhang X, Xiong H, Li H, Cheng Y. Protective effect of taraxasterol against LPS-induced endotoxin shock by modulating inflammatory responses in mice. *Immunopharmacol Immunotoxicol*. 2014;36:11-6. doi: 10.3109/08923973.2013.861482.
30. Ma C, Zhu L, Wang J, He H, Chang X, Gao J, et al. Anti-inflammatory effects of water extract of Taraxacum mongolicum hand.-Mazz on lipopolysaccharide-induced inflammation in acute lung injury by suppressing PI3K/Akt/mTOR signaling pathway. *J Ethnopharmacol*. 2015;168:349-55. doi: 10.1016/j.jep.2015.03.068.
31. Yang N, Li C, Tian G, Zhu M, Bu W, Chen J, et al. Organic acid component from taraxacum mongolicum hand.-Mazz alleviates inflammatory injury in lipopolysaccharide-induced acute tracheobronchitis of ICR mice through TLR4/NF-kB signaling pathway. *Int Immunopharmacol*. 2016;34:92-100. doi: 10.1016/j.intimp.2016.02.028.
32. Yang N, Dong Z, Tian G, Zhu M, Li C, Bu W, et al. Protective effects of organic acid component from Taraxacum mongolicum hand.-Mazz against LPS-induced inflammation: Regulating the TLR4/IKK/NF-kB signal pathway. *J Ethnopharmacol*. 2016;194:395-402. doi: 10.1016/j.jep.2016.08.044.
33. Xueshibojie L, Duo Y, Tiejun W. Taraxasterol inhibits cigarette smoke-induced lung inflammation by inhibiting reactive oxygen species-induced TLR4 trafficking to lipid rafts. *Eur J Pharmacol*. 2016;789:301-7. doi: 10.1016/j.ejphar.2016.07.047.
34. Chen SE, Gerken E, Zhang Y, Zhan M, Mohan RK, Li AS, et al. Role of TNF- α signaling in regeneration of cardiotoxin-injured muscle. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2005;289:C1179-87. doi: 10.1152/ajpcell.00062.2005.
35. Chen SE, Jin B, Li YP. TNF-alpha regulates myogenesis and muscle regeneration by activating p38 MAPK. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2007;292:C1660-71. doi: 10.1152/ajpcell.00486.2006.
36. Acharyya S, Ladner KJ, Nelsen LL, Damrauer J, Reiser PJ, Swoap S, et al. Cancer cachexia is regulated by selective targeting of skeletal muscle gene products. *J Clin Invest*. 2004;114:370-8. doi: 10.1172/JCI200420174.
37. Guttridge DC, Mayo MW, Madrid LV, Wang CY, Baldwin AS, Jr. NF-kappaB-induced loss of myoD messenger RNA: Possible role in muscle decay and cachexia. *Science*. 2000;289:2363-6. doi: 10.1126/science.289.5488.2363.
38. Chen J, Wu W, Zhang M, Chen C. Taraxasterol suppresses inflammation in IL-1 β -induced rheumatoid arthritis fibroblast-like synoviocytes and rheumatoid arthritis progression in mice. *Int Immunopharmacol*. 2019 May;70:274-283. doi: 10.1016/j.intimp.2019.02.029



Effect of Taraxasterol on Akt1-Dependent Inflammatory and Myogenic Pathways in Human Skeletal Muscle Cells Under Lipopolysaccharide-Induced Inflammation

Zahra Rashidi (Ph.D.)¹, Mona Pazhouhi (Ph.D.)¹, Ali Ghanbari (Ph.D.)¹, Mohammadreza Gholami (Ph.D.)^{1*}, Zahra Godari (M.D.)²

1- Department of Anatomical Sciences, School of Medicine, Kermanshah University of Medical Sciences, Kermanshah, Iran.

2- Student Research Committee, Kermanshah University of Medical Sciences, Kermanshah, Iran.

Received: 18 April 2025, Accepted: 28 September 2025

Abstract:

Introduction: This study aimed to investigate the effects of Taraxasterol on proliferation and inflammatory and myogenic pathways related to Akt1 signaling in human skeletal muscle cells, using an in vitro model of lipopolysaccharide-induced inflammation.

Methods: Human skeletal muscle cell line (C436) was cultured in vitro in basal medium or medium containing lipopolysaccharide (concentration 0.1 µg/ml) and/or taraxasterol (concentrations 5, 10, and 15 µM). After 24 hours, the MTT test was used to measure cell proliferation. Then, the optimal concentration of taraxasterol and treatment time were selected. Real-time PCR analysis was used to detect the levels of inflammatory factors, myogenic factor, and Akt1 expression. **Results:** Taraxasterol significantly increased cell proliferation at concentrations of 5, 10, and 15 µg/mL after 24 hours by 1.05, 1.07, and 1.05-fold ($P \leq 0.05$). Lipopolysaccharide significantly increased the expression of TNF- α , IL-1 β , and IL-6 genes by 4.32, 3.35, and 3.99-fold ($P \leq 0.05$), while taraxasterol significantly decreased the expression of each gene at all three concentrations compared to the lipopolysaccharide group ($P \leq 0.05$). Lipopolysaccharide significantly reduced the expression of Akt1, myogenin, and MyoD1 genes by 15, 68, and 65% ($P \leq 0.05$), while taraxasterol significantly increased the expression of those genes in all three concentrations compared with the lipopolysaccharide group ($P \leq 0.05$).

Conclusion: Taraxasterol can increase the proliferation of skeletal muscle cells and can also inhibit the expression of inflammatory cytokines IL-1 β , IL-6, and TNF- α and enhance the expression of myogenic cytokines myogenin and MyoD1, indicating that taraxasterol may have an effect to promote cell proliferation and reduce inflammatory response in the process of relieving delayed onset muscle pain.

Keywords: Taraxasterol, Inflammation, Myogenic factor, Muscle cells.

Conflict of Interest: No

*Corresponding author: M.R Gholami, Email: rezagholami57@gmail.com

Citation: Rashidi Z, Pazhouhi M, Ghanbari A, Gholami MR, Godari Z. Investigation of the effect of circadian rhythm disruption on the efficacy of metformin treatment in liver tissue and hepatic enzyme activity in diabetic rats. Journal of Knowledge & Health in Basic Medical Sciences 2025;20(3):36-42.

