فصلنامه (علمی – پژوهشی)

زیست شناسی تکوینی

سال سیزدهم، شماره ۱، زمستان ۱۳۹۹ ص. ۷۰-۶۳

مقاله پژوهشی

اثر عصاره دانه خربزه (*Cucumis melo*) بر بیان کلیوی ژن‌های کد کننده استئوپونتین و لیتواستاتین در موش‌های صحرایی مبتلا به سنگ کلیه

مونا منوچهرمیرزا[۱]، مریم عیدی[۲،*]، مهدی ابراهیمی[۳]

[۱] کارشناسی ارشد سلولی مولکولی، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم زیستی، واحد ورامین - پیشوا، دانشگاه آزاد اسلامی، ورامین - پیشوا، ایران

[۲] استاد فیزیولوژی جانوری، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم زیستی، واحد ورامین - پیشوا، دانشگاه آزاد اسلامی، ورامین - پیشوا، ایران

[۳] استادیار بیوشیمی، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم زیستی، واحد ورامین - پیشوا، دانشگاه آزاد اسلامی، ورامین - پیشوا، ایران

*Email: maryameidi@gmail.com

تاریخ دریافت: آبان ۱۳۹۹ تاریخ پذیرش: دی ۱۳۹۹

چکیده

سنگ کلیه یکی از مهم ترین بیماری‌های دستگاه ادراری و مهم‌ترین دلیل مرگ و میر ناشی از بیماری‌های مجاری ادراری است. شیوع بیماری سنگ کلیه در حال افزایش بوده و بنابراین نیاز به روش‌های درمانی موثرتر و کم خطرتر برای درمان وجود دارد. دانه خربزه برای درمان بیماری‌های کلیوی مانند سنگ‌های کلیوی و مثانه پیشنهاد شده است. هدف از مطالعه حاضر بررسی اثر عصاره هیدرواتانلی دانه خربزه بر بیان کلیوی ژن‌های کدکننده استئوپونتین و لیتواستاتین در موش‌های صحرایی نر مبتلا به سنگ کلیه می باشد. القاء سنگ کلیه اگزالات کلسیمی با تیمار خوراکی کلرید آمونیوم ۱% (۳ روز) و اتیلن گلیکول ۰/۷۵% (۳۸ روز) در موش‌های صحرایی نر انجام شد. سیترات پتاسیم (۲/۵ گرم/کیلوگرم) و عصاره هیدرواتانلی دانه خربزه (۱۵۰، ۳۰۰ و ۶۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم) بطور همزمان با تیمار اتیلن گلیکول به مدت ۳۸ روز بطور خوراکی تیمار شدند. پس از ۳۸ روز، حیوانات بیهوش شده و کلیه سمت راست آن‌ها برای بررسی بیان کلیوی ژن کدکننده استئوپونتین و لیتواستاتین به روش real-time PCR نمونه برداری شدند بیان ژن‌ها با استفاده از نرم‌افزار Rest و آنالیز داده‌ها با روش آماری آنالیز واریانس یک طرفه بررسی شدند. داده ها نتایج نشان داد تیمار روزانه خوراکی سیترات پتاسیم و عصاره دانه خربزه موجب افزایش معنی‌دار بیان ژن کدکننده استئوپونتین و لیتواستاتین در موش های صحرایی بیمار تجربی در مقایسه با گروه کنترل بیمار می‌شود ($p<0.001$). عصاره دانه خربزه احتمالا بیماری سنگ کلیه را توسط افزایش بیان ژن‌های کد کننده استئوپونتین و لیتوستاتین بهبود می دهد و موثرتر از سیترات پتاسیم در درمان این بیماری می‌باشد.

کلیدواژه‌ها: سنگ کلیه، دانه خربزه، استئوپونتین، لیتواستاتین، موش صحرایی.

مقدمه

بیماری سنگ کلیه ناشی از فوق اشباع شدن مواد محلول موجود در ادرار و تشکیل کریستال در ادرار است [۳]. میزان شیوع سنگ کلیه در مردان نسبت به زنان در تمامی انواع سنگ کلیه بیشتر است. بیماری سنگ کلیه یک بیماری متداول با شیوع جهانی ۲ تا ۲۰ درصد می‌باشد و کشور ایران جزء کشورهایی است که در کمربند بیماری سنگ کلیه قرار گرفته است و شیوع آن در ایران به ۲ تا ۳ درصد می‌رسد [۵]. شیوع بیماری در بین مردان ۷ تا ۱۵ درصد و بین زنان ۳ تا ۶ درصد است [۴]. علاوه بر این، میزان عود بیماری سنگ کلیه در طی ۵ سال به ۳۰ تا ۵۰ درصد می‌رسد [۱۱]. سنگ کلیه یکی از شایع‌ترین علل وجود خون در ادرار، بروز دردهای شکمی، درد پهلوها و درد منطقه کشاله ران محسوب شده و باعث افزایش خطر ابتلا به عفونت‌های ادراری وحتی نارسایی کلیه می‌شود [۱]. انواع مختلفی از سنگ‌های کلیوی شامل اگزالات کلسیم، فسفات کلسیم، اسید اوریک، سیستئین و استروایت وجود دارند. اکثر سنگ‌های کلیوی از نوع اگزالات کلسیم هستند. اگزالات فرآورده متابولیسم طبیعی گلی‌سین و اسید آسکوربیک است. هنگامی که دفع اگزالات در ادرار بیشتر از ۲۵ میلی‌گرم در روز باشد، خطر تشکیل سنگ افزایش چشم‌گیری می‌یابد. میزان بالای کلسیم و اگزالات در ادرار، مقدار کم سیترات و حجم کم ادرار عوامل خطرساز در تشکیل سنگ‌های کلسیمی هستند [۱۸]. تشکیل سنگ معمولا وابسته به عدم تعادل بین مهارکننده‌ها و براه اندازنده‌ها در ادرار است. استئوپونتین و لیتوستاتین از مهم ترین مهارکننده های تشکیل سنگ کلیه هستند.

استئوپونتین یک پروتئین ماتریکس خارج سلولی است و در حدود ۳۰۰ اسیدآمینه داشته و بار منفی روی سطح آن وجود دارد. ژن استئوپونتین (*spp1*) در موش صحرایی روی بازوی کوتاه کروموزوم ۱۴ قرار داشته (14p22)، دارای ۷ اگزون است. استئوپونتین غنی از اسید آمینه‌های اسیدی مانند سرین، گلوتامیک اسید است و بطور معمول در پروتئین‌های در حال معدنی شدن یافت می‌شود. پروتئین کد شده توسط این ژن در چسبیدن استئوکلاست‌ها به ماتریکس معدنی استخوان نقش دارد. همچنین، یک سیتوکین است که موجب تنظیم افزایشی بیان اینترفرون - گاما و اینترلوکین -۲ می‌شود. استئوپونتین مهار کننده قوی کریستالیزاسیون فسفات و اگزالات کلسیم در ادرار است [۶].

لیتوستاتین یک پروتئین پانکراسی است که در موش صحرایی توسط ژن reg1 که روی کروموزوم ۴ قرار دارد، بیان می‌شود. لیتوستاتین یک گلیکوپروتئین محلول بوده و دارای ۱۴۴ اسید آمینه و سه پیوند دی‌سولفید و ۱۱ ایزوفرم است. لیتوستاتین نقش مهمی بعنوان مهار کننده رشد کریستال‌های کلسیم ایفاء می‌کند. بخش N - ترمینال لیتوستاتین و غلظت آن نقش مهمی در عملکرد این پروتئین دارد [۱۵].

امروزه با روشن شدن عوارض جانبی و آثار زیان‌بخش داروهای شیمیایی، استفاده از داروهای گیاهی و طبیعی مورد توجه پژوهشگران معاصر قرار گرفته است و در مطالعات متعدد اثرات داروهای گیاهی مختلف در درمان سنگ کلیه مورد بررسی قرار گرفته است.

خربزه گیاهی از خانواده Cucurbitaceae با نام علمی *Cucumis melo* var. *inodorus* است. دانه خربزه دارای مشتقات کرومون (chromone)، گلیکوزید فنلی، آرژینین، اسیدهای آسپارتیک و گلوتامیک، گالاکتوزیدازها، دی‌هیدروکسی تری‌ترپن‌ها و سیتوسترول می‌باشد [۱۳].

خربزه اثر مدر داشته و از این نظر در دفع مواد زائد و رسوبات ادراری مؤثر واقع می‌شود [۲۶]. عیدی و همکاران اثر عصاره هیدرومتانلی پوست میوه خربزه را در موش‌های صحرایی مبتلا به سنگ کلیه بررسی کردند. نتایج آنها نشان داد تیمار عصاره موجب کاهش تعداد کریستال‌های بزرگ و افزایش کریستال های کوچک اگزالات کلسیم در ادرار شده و احتمالا دفع آنها را توسط ادرار آسان‌تر می‌کند [۲]. Srikaran و Dulanjali (۲۰۱۹) اثر عصاره متانولی دانه‌های خربزه بر تشکیل کریستال‌های اگزالات کلسیم را بصورت *in vitro* مورد بررسی قرار دادند. نتایج این بررسی نشان داد که عصاره متانولی دانه خربزه مانع تشکیل کریستال‌های اگزالات کلسیم می‌شود [۲۲]. اثر دانه خربزه

بر آسیب و التهاب بافتی ناشی از حضور کریستال های اگزالات کلسیم در بافت کلیه موش‌های صحرایی نر مدل سنگ کلیه تاکنون بررسی نشده است. لذا، در پژوهش حاضر اثر عصاره هیدرواتانلی دانه خربزه بر بیان ژن کلیوی کد کننده استئوپونتین و لیتواستاتین در موش‌های صحرایی مدل سنگ کلیه مورد بررسی قرار می‌گیرد.

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری گیاه و تهیه عصاره هیدرواتانلی دانه خربزه

ابتدا دانه خربزه (*Cucumis melo* var. *inodorus*) از منطقه ورامین خریداری شده، دانه‌ها جداسازی شد و پس از تایید توسط متخصص گیاه‌شناسی (کد هرباریومی ۳۵۷۱۱ موسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر) در سایه و دمای ۲۴ درجه سانتی‌گراد خشک شده و بوسیله آسیاب برقی خرد و پودر شد. سپس،۳۰۰ گرم پودر با ۲۵۰۰ میلی‌لیتر اتانل ۸۰ درصد مخلوط شده و به مدت ۷۲ ساعت در ظرف دربسته و در تاریکی نگهداری و روزانه مخلوط شد. مخلوط به دست آمده با استفاده از فیلتر کاغذی (کاغذ واتمن) صاف شده و حلال توسط دستگاه روتاری جدا شد. برای خشک شدن کامل، عصاره در بن ماری $50^{\circ}C$ قرار داده شد. عصاره به دست آمده تا زمان شروع تیمارها در دمای $4^{\circ}C$- نگهداری شد و برای تیمار حیوانات در آب مقطر حل شده و غلظت های ۱۵۰، ۳۰۰ و ۶۰۰ میلی گرم/کیلوگرم از آن تهیه شد.

حیوانات آزمایشگاهی

در این مطالعه از ۳۶ سر موش صحرایی نر نژاد ویستار wistar با وزن ۲۰±۱۸۰ گرم مورد استفاده قرار گرفت. موش‌ها از انستیتو پاستور کرج تهیه شدند و برای سازگاری با شرایط به مدت یک هفته قبل از شروع آزمایشات در محیط آزمایشگاه تحقیقاتی دانشگاه آزاد اسلامی واحد ورامین – پیشوا نگهداری شدند. در تمام مدت آزمایش، موش‌های صحرایی در گروه های سه تایی و جداگانه با رعایت شرایط استاندارد (دمای $24\pm2^{\circ}C$، چرخه روشنایی و تاریکی ۱۲ ساعته) نگهداری شده و به غذای استاندارد و آب دسترسی داشتند. تمامی مراحل آزمایش پس از دریافت مجوز مورد نیاز از کمیته ملی اخلاق در پژوهش‌های زیست پزشکی (IR.IAU.VARAMIN.REC.1398.021) اجرا شدند.

القاء سنگ کلیه

به منظور القاء سنگ کلیه، کلرید آمونیوم (۱ درصد) به مدت ۳ روز و اتیلن گلیکول (۰/۷۵ درصد) به مدت ۳۸ روز در آب آشامیدنی اضافه شد [۱۰].

گروه‌های مورد مطالعه

موش‌های صحرایی مورد مطالعه بصورت تصادفی در ۶ گروه ۶ تایی تقسیم بندی شدند:

گروه کنترل سالم: موش‌های صحرایی نر که هیچ تیماری دریافت نکردند (n=6).

گروه کنترل بیمار: موش‌های صحرایی نر به مدت ۳ روز کلرید آمونیوم (۱ درصد) و به مدت ۳۸ روز اتیلن گلیکول (۰/۷۵ درصد) در آب آشامیدنی دریافت کردند (n=6).

گروه کنترل مثبت: موش‌های صحرایی نر علاوه بر کلرید آمونیوم و اتیلن‌گلیکول، مقدار ۲/۵ گرم بر کیلوگرم وزن بدن سیترات پتاسیم به مدت ۳۸ روز بصورت خوراکی دریافت نمودند (n=6).

گروه‌های تجربی: موش‌های صحرایی علاوه بر کلرید آمونیوم و اتیلن‌گلیکول، غلظت‌های ۱۵۰، ۳۰۰ و ۶۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن عصاره هیدرواتانلی دانه خربزه به مدت ۳۸ روز بصورت خوراکی دریافت کردند (n=6).

نمونه‌گیری از حیوانات

پس از اتمام دوره تیمار، ابتدا موش های صحرایی با استفاده از اتر بیهوش شدند. سپس کلیه سمت راست آنها جداشده، بافت اضافی حذف شده و در فریزر ۸۰- درجه سانتی‌گراد تا زمان شروع آزمایش قرار داده شد.

Real time PCR

۰/۰۸ میلی‌گرم از بافت کلیه سمت راست نمونه‌برداری شد. سپس مراحل استخراج RNA با استفاده از کیت

استخراج RNA (شرکت Geneall، کره) به روش ستونی انجام شد. با استفاده از تکنیک اسپکتروفتومتری نانودراپ از کمیت و کیفیت RNA استخراج شده و از استخراج صحیح آن با استفاده از جذب نوری در طول موج های ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر اطمینان حاصل شد و غلظت نمونه مورد نظر را در طول موج مربوطه، بر حسب میکروگرم بر میکرولیتر، محاسبه شد. همچنین، جهت اطمینان از کنترل کیفیت مقدار RNA استخراج شده، RNA روی ژل آگارز ۱/۵ درصد قرار داده شد. بسته به غلظت RNA که برای هر نمونه در نانودراپ مشخص شده، بین ۲ تا ۳/۵ میکرولیتر از هر یک از نمونه های RNA برداشته شد و با استفاده از کیت سنتز cDNA (شرکت پارس توس، ایران) و آنزیم رونویسی معکوس و پرایمرهای dt Oligo طبق دستورالعمل شرکت سازنده به cDNA تبدیل شد. توالی نوکلئوتیدی پرایمر Forwardو توالی نوکلئوتیدی پرایمر Reverse مکمل ژن های *spp1*، reg1 و GAPDH بعنوان ژن خانه دار در رت از طریق نرم افزار الیگو ۷ (سایت NCBI) مورد بررسی قرار گرفت تا از اختصاصی بودن محل جفت شدن پرایمرها اطمینان حاصل شود (جدول ۱). تکنیک Real time PCR با استفاده از پرایمر اختصاصی ژن‌های GAPDH بعنوان ژن خانه دار و ژن‌های ژن‌های *spp1* و reg1 استفاده شد و طبق پروتکل پیشنهادی کیت شرکت پارس توس انجام پذیرفت.

آنالیز آماری

به‌منظور آنالیز بیان از نرم‌افزار Rest و فرمول ذیل استفاده شد.

$$\text{Fold change} = 2^{-\Delta\Delta t}$$

داده‌ها به صورت Mean ± SD نشان داده شده و برای بررسی تغییر معنی‌دار بین گروه‌ها و رسم نمودارها از نرم‌افزارهای SPSS و برنامه آماری آنالیز واریانس یک طرفه (one way ANOVA) و Excel استفاده شد. سطح معنی داری $p<0.05$ درنظر گرفته شد.

نتایج

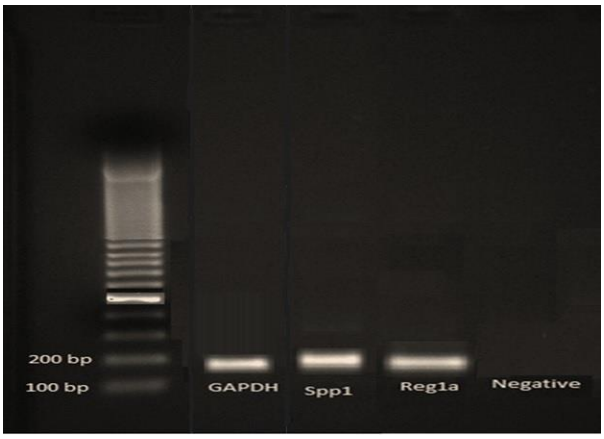
باندهای PCR در شکل ۱ نشان داده شده است. حضور یک باند منفرد در محدوده مورد پیش بینی و عدم وجود باندهای اضافی و کامل بودن باندها دلالت بر انجام صحیح پرایمر شرایط استفاده شده در PCR دارد.

بررسی تغییرات بیان کلیوی ژن *spp1* (ژن کد کننده استئوپونتین)

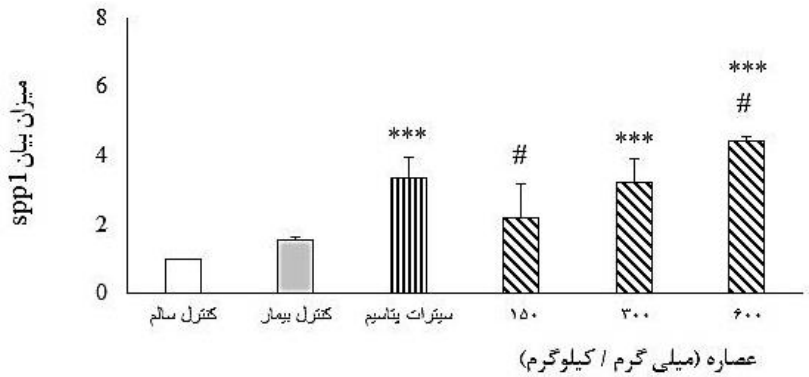
نتایج تحقیق حاضر نشان داد تیمار روزانه سیترات پتاسیم (۲/۵ گرم بر کیلوگرم وزن بدن) و عصاره هیدرواتانلی دانه خربزه در غلظت‌های ۱۵۰، ۳۰۰ و ۶۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن بطور موثری بیان کلیوی ژن کد کننده استئوپونتین (*spp1*) را در موش‌های صحرایی بیمار تیمار شده در مقایسه با موش‌های صحرایی بیمار کنترل افزایش داد ($p<0.001$). اثر غلظت ۶۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم عصاره بطور موثری قوی‌تر از سیترات پتاسیم بود ($p<0.05$) (شکل ۲).

جدول ۱ - ترادف پرایمرهای *reg1a*, *spp1* و GAPDH.

Gene		Sequence (5'→3')	Primer (bp)	Product size (bp)
reg1a	Forward	5′-TCTCTACAAATCCTGGGACACT-3′	22	191
	Reverse	5′-AGTATTTTCTTGTCTGGCTCTGT-3′	23	
spp1	Forward	5′-CTTGGCTTACGGACTGAGGT-3	20	199
	Reverse	5′-CTTGGCTTACGGACTGAGGT-3′	20	
GAPDH	Forward	5'-TGCCAGCCTCGTCTCATAG-3'	19	197
	Reverse	5'-ACTGTGCCGTTGAACTTGC-3'	19	



شکل ۱ - تصویر ژل الکتروفورز محصول PCR از ژن‌های مورد بررسی.



شکل ۲ - اثر تیمار خوراکی و روزانه سیترات پتاسیم و عصاره هیدرو اتانلی دانه خربزه در غلظت های ۱۵۰، ۳۰۰ و ۶۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن به مدت ۳۸ روز بر بیان ژن کدکننده استئوپونتین (spp1) در موش های صحرایی مبتلا به سنگ کلیه. هر ستون از می‌باشد.

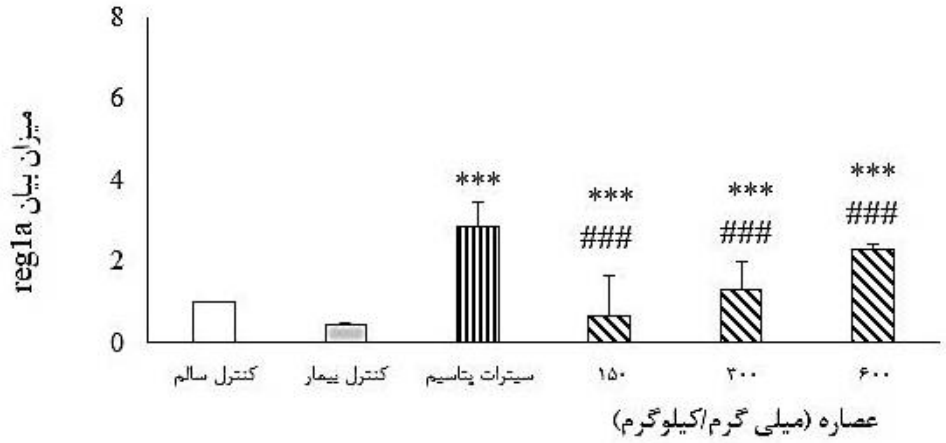
بررسی تغییرات بیان کلیوی ژن *reg1a* (ژن کد کننده لیتوستاتین)

نتایج تحقیق حاضر نشان داد تیمار روزانه سیترات پتاسیم (۲/۵ گرم بر کیلوگرم وزن بدن) و عصاره هیدرواتانلی دانه خربزه در غلظت‌های ۱۵۰، ۳۰۰ و ۶۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن بطور موثری بیان کلیوی ژن کد کننده لیتوستاتین (*reg1a*) را در موش‌های صحرایی بیمار تیمار شده در مقایسه با موش‌های صحرایی بیمار کنترل افزایش داد ($p<0.001$). اثر سیترات پتاسیم بطور موثری قوی تر از عصاره بود ($p<0.001$) (شکل ۳).

در مشاهدات میکروسکوپ نوری دو نوع کرک بر روی ساقه غافث مشاهده شد. کرک‌های ترشحی با پایه ۲-۳ سلولی و انتهای حجیم ۳-۴ سلولی، دارای مواد سلولی هستند و طولی در حدود ۰/۲-۰/۳ میلی متر در گیاه طبیعی و ۰/۱۵-۰/۰۵ میلی متر در گیاه باززایی شده، داشتند (تصویر۴، A,C). همچنین کرکهای تک سلولی و محافظ (نوک تیز و باریک) به طول تقریبی۰/۷ -۱ میلی‌متر در گیاه طبیعی و ۰/۴-۰/۶ میلی متر در گیاه باززایی شده، دیده شد (تصویر۴، B,D).

بحث

تشکیل سنگ در کلیه ها و مجاری ادراری سنگ‌های کلیوی نامیده می‌شود که یکی از مهم‌ترین بیماری‌های مجاری ادراری و مهم‌ترین عامل مرگ به سبب بیماری سیستم ادراری است [۹]. روش‌های متداول برای درمان بیماری سنگ کلیه بسیار گران است و یا دارای عوارض جانبی است (سیترات پتاسیم). گیاهان دارویی معمولا بخاطر در دسترس بودن و داشتن عوارض جانبی کمتر نسبت به داروهای شیمیایی و یا سایر روش‌ها بیشتر مورد توجه هستند.



شکل ۳ - اثر تیمار خوراکی و روزانه سیترات پتاسیم و عصاره هیدرو اتانلی دانه خربزه در غلظت های ۱۵۰، ۳۰۰ و ۶۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن به مدت ۳۸ روز بر بیان ژن کدکننده لیتوستاتین (*reg1a*) در موش های صحرایی مبتلا به سنگ کلیه. هر ستون Mean ± SD را نشان می‌دهد. * نشان دهنده اختلاف از گروه کنترل بیمار و ### نشان دهنده اختلاف از گروه سیترات پتاسیم می‌باشد.**

دانه خربزه برای درمان بیماری‌های کلیوی مانند سنگ‌های کلیه و مثانه مورد استفاده قرار می‌گیرند. اثر آنها به سبب فعالیت زیستی آنها از جمله اثرات آنتی‌اکسیدان، آنالزژیک (ضددردی)، ضدالتهابی و ضدمیکروبی می‌باشد [۸]. اثر عصاره متانلی دانه خربزه بر ممانعت از تشکیل کریستال‌های اگزالات کلسیم در شرایط in vitro مورد بررسی قرار گرفته است [۲۲]. همچنین، عصاره دانه خربزه یک اثر دیورتیک قوی داشته و از این رو در ممانعت از تغلیظ ادرار نقش دارد. این اثر از تشکیل و رشد هسته اولیه سنگ کلیه جلوگیری می‌کند. بعلاوه، با دفع هسته اولیه و سنگ‌های کوچک، این گیاه اثر محافظتی روی برگشت بیماری سنگ کلیه دارد [۲۳]. Guntupalli و همکاران (۲۰۱۸) نشان دادند عصاره کلروفرمی دانه و پوست میوه خربزه موجب بهبود هیپراگزالوری، کلسیم و اسید اوریک و عملکرد کلیه می‌گردد. علاوه بر این، سطح بالای اسید اوریک سرم بطور موثری توسط عصاره کاهش می‌یابد [۱۲].

نتایج تحقیق حاضر نشان داد تیمار خوراکی عصاره دانه خربزه در غلظت‌های ۱۵۰، ۳۰۰ و ۶۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن و سیترات پتاسیم در غلظت ۲/۵ گرم بر کیلوگرم وزن بدن به مدت ۳۸ روز بطور موثری بیان کلیوی ژن های کد کننده استئوپونتین و لیتوستاتین (بترتیب *spp1* و *reg1a*) را در موش‌های صحرایی نر بیمار در مقایسه با گروه بیمار کنترل افزایش می دهد.

عدم تعادل مهارکننده‌ها و شروع کننده‌های تشکیل سنگ کلیه نقش بسیار مهمی در تشکیل سنگ های کلیوی دارد. استئوپونتین و لیتوستاتین مهارکننده‌های مهم تشکیل سنگ کلیه هستند، ولی مکانیسم عمل آنها هنوز بدرستی شناخته نشده است. لیتوستاتین با چسبیدن به سطح کریستال مهارکننده تشکیل سنگ کلیه است. Okada و همکاران (۲۰۰۸) نشان دادند استئوپونتین یک نقش کلیدی در مهار تبدیل کریستال‌های اگزالات کلسیم به سنگ کلیه در موش‌های صحرایی دارد [۲۰].

Wesson و همکاران (۲۰۰۳) گزارش کردند بیان ژن استئوپونتین در موش‌های سالم ۲ تا ۴ برابر بیشتر از موش‌های با کمبود استئوپونتین بعد از ۴ هفته تیمار اتیلن گلیکول است. همچمین، نتایج آنها نشان داد توده‌های کریستالی اگزالات کلسیم داخل سلولی بطور موثر بیشتری در موش‌های با کمبود استئوپونتین در مقایسه با موش‌های سالم وجود دارند. این نتایج دلالت بر آن دارند استئوپونتین نقش مهمی به عنوان مهارکننده تشکیل و بقاء کریستال‌های اگزالات کلسیم در توبول‌های کلیوی دارد [۲۴]. استئوپونتین نقش مهمی در التهاب مزمن داشته و مانع رشد کریستال و تشکیل سنگ کلیوی شده و نیز به عنوان مهار کننده معدنی شدن عمل می‌کند [۱۵]. بعد از آسیب کلیه‌ها، بیان ژن استئوپونتین بطور موثری در همه بخش‌های گلومرولوس و توبول‌های نفرون کاهش می‌یابد. استئوپونتین تجمع ماکروفاژها را تسهیل کرده و نقش مهمی در توقف آسیب

کلیوی دارد. از طرف دیگر، استئوپونتین اثر محافظتی علیه آسیب کلیوی داشته و هسته‌گذاری، رشد، انباشته شدن کریستال‌های اگزالات کلسیم و چسبیدن آنها به سلول‌های اپی-تلیالی توبول‌های کلیوی را مهار می‌کند [۱۵]. استئوپونتین بهنوان مهارکننده تشکیل سنگ کلیه از طریق مکانیسم‌های زیر عمل می‌کند: اول، استئوپونتین به عنوان یک عامل دیورتیک قوی عمل کرده و مانع تشکیل و رشد هسته اولیه سنگ کلیه می‌شود. دوم، استئوپونتین مانند سیترات رشد کریستال‌های موجود را مهار می‌کند [۲۳].

بنابراین، فاکتورهایی که می‌توانند تولید استئوپونتین را افزایش دهند، قدرت مهار تشکیل و رشد سنگ کلیه را نیز دارند. بعلاوه، نوع رژیم غذایی نیز می‌تواند میزان استئوپونتین ادراری را تغییر دهد [۱۴].

Alex و همکاران (۲۰۱۳) نشان دادند تیمار آستاگزانتین (astaxanthin) تجمع کریستال‌های گزالات کلسیم را با واسطه سیستم رنین - آنژیوتانسین کلیوی کاهش داده و از این رو بیان استئوپونتین و TGF- 1 را کاهش می‌دهد. تیمار آستاگزانتین در کاهش تجمع کریستال و تنظیم کاهشی بیان استئوپونتین و TGF- 1 موثرتر از تیمار سیترات است [۷].

Li و همکاران (۲۰۱۵) نشان دادند عصاره آبی *Fructus aurantii* بیان استئوپونتین را در سلول‌های توبول‌های کلیوی در موش‌های صحرایی مدل اتیلن گلیکول کاهش می‌دهد [۱۷].

Yang و همکاران (۲۰۱۹) نشان دادند قرص Huashi (یک داروی جدید در طب سنتی چین متشکل از Desmodium styracifolium, Ventriculi galli mucosa, Alisma orientalis, Sand cattle, (Astragalus, Plantago, Corydalis corydalis تشکیل سنگ کلیه را توسط تنظیم افزایشی بیان استئوپونتین در بافت کلیه در موش های صحرایی مدل سنگ کلیه مهار می کند [۲۵].

Mi و همکاران (۲۰۱۲) اثرات مهاری *Desmodium styracifolium* و *Pyrrosiae petiolosa* را روی تشکیل سنگ در رت های مدل سنگ کلیه بررسی کردند. نتایج آنها نشان دادند که این گیاهان بطور موثری بیان استئوپونتین و پارامترهای آنتی اکسیدان را تغییر دادند [۱۹].

اثر لیتوستاتین بر سنگ کلیه بسیار کم شناخته شده و تحقیقات اندکی روی اثر لیتوستاتین بر تشکیل سنگ کلیه وجود دارد. Saito و همکاران (۲۰۱۷) میزان بیان لیتوستاتین در لوله پیچیده نزدیک در بیماری کلیه پلی‌کیستیک در موش هومولوگ AQP11-null بررسی کردند. نتایج نشان داد بیان ژن reg1 در حدود ۵ برابر در لوله نزدیک افزایش می‌یابد. تیمار لیتوستاتین بطور موثری تشکیل سنگ‌های کلیوی کربنات کلسیمی را به تاخیر می‌اندازد [۲۱]. همچنین، Lee و همکاران (۲۰۰۳) قدرت لیتوستاتین برای اتصال به یون‌های کلسیم را در نسبت ۱:۱ بررسی کردند. این توانایی لیتوستاتین بعنوان پایه و اساس عملکرد آن در مهار تولید سنگ‌های کلیوی شناخته شده است. لیتوستاتین تشکیل و رشد کریستال‌های کلسیم را توسط اتصال به یون‌های کلسیم و کاهش غلظت کلسیم آزاد مهار می‌کند [۱۶].

در نتیجه، عصاره هیدرواتانلی دانه خربزه قادر به افزایش موثر بیان ژن های کد کننده استئوپونتین و لیتوستاتین بوده و از این رو تشکیل سنگ کلیه را در سیستم ادراری مهار می نماید.

تقدیر و تشکر

این تحقیق مستخرج از پایان نامه کارشناسی ارشد سلولی مولکولی دانشگاه آزاد اسلامی واحد ورامین - پیشوا می‌باشد.

منابع

[۱] شفایی پور، ا.، محرابی، ص.، ملک زاده، ج. م.، جان نثار، ر.، صادقی، ه.، وحدانی، ر.، محمدی، ر. ۱۳۹۱، تاثیرعصاره آبی گیاه خارشتر بر سنگ اگزالات کلسیم در کلیه موش صحرایی نرنژاد ویستار دریافت کننده اتیلن گلیکول، مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی یاسوج، دوره ۱۷، شماره ۲، صفحه ۱۳۸-۱۲۹.

[۲] عیدی، م.، بهار، م.، عیدی، ا.، پویان، ا.، شاه‌محمدی، پ. **۱۳۸۸، ت**اثیر عصاره هیدروالکلی پوست میوه خربزه (*Cucumis melo* L.) بر جلوگیری از کریستالیزاسیون اگزالات کلسیم در in vitro. مجله گیاهان دارویی، سال ۸، شماره ۳۲، صفحه ۵۲-۴۶.

[۳] مبینی، م.، مخلوق، ع.، نمدچیان، ز.، نیک صولت، ف.، فیض زاده، ب.، علی محمدپور، ر. ۱۳۹۶، مقایسه دانسیته معدنی استخوان در زنان با و بدون سنگ کلیه. مجله دانشگاه علوم پزشکی مازندران، دوره۲۷، شماره۱۵۰، صفحه ۵۳-۴۶.

[۴] مرتضوی، م.، روحی، ل. ۱۳۹۴، اثر عصاره هیدروالکلي پوست انار بر پیشگیري از سنگ کلیه القاء شده توسط اتیلن گلیکول در رت نژاد ویستار. فصلنامه داروهاي گیاهي، سال ششم، شماره ۳ (ویژه نامه فارسی)، ص ۱۵۳-۱۴۹.

[۵] مروتی شریف آباد، م.، پیروزه، ر.، حمایتی، ر.، عسگری شاهی، م. ۱۳۹۳، رفتارهاي پیشگیري کننده از عود سنگ کلیه و ارتباط آن با میزان آگاهي در این زمینه و منابع دریافت آن در بیماران. ماهنامه علمي پژوهشي دانشکده بهداشت یزد، دوره ۱۳، شماره ۲، صفحه ۹۸-۸۵.

[6] Aggarwal K.P., Narula S., Kakkar M., Tandon C. 2013, Nephrolithiasis: molecular mechanism of renal stone formation and the critical role played by modulators. Biomed Res Int. 292953.

[7] Alex M., Paul M.V.S., Abhilash M., Mathews V.V., Anilkumar T.V., Harikumaran Nair R. 2014, Astaxanthin modulates osteopontin and transforming growth factor β1 expression levels in a rat model of nephrolithiasis: a comparison with citrate administration. BJU Int. 114: 458-466.

[8] da Cunha Baia L., Baxmann A.C., Moreira S.R., Holmes R.P., Heilberg I.P. 2012, Noncitrus alkaline fruit: a dietary alternative for the treatment of hypocitraturic stone formers. J Endourol. 26(9): 1221-1226.

[9] Dhole A.R., Yeligar V.C. 2018. Urolithiasis and its herbal remedies. Int J Sci Res Sci Technol. 4(11): 150-156.

[10] Divakar K., Pawar A.T., Chandrasekhar S.B., Dighe S.B., Divakar G. 2010, Protective effect of the hydro-alcoholic extract of Rubia cordifolia roots against ethylene glycol induced urolithiasis in rats. Food Chem Toxicol. 48:1013-1018.

[11] Gul Z., Monga M. 2014, Medical and dietary therapy for kidney stone prevention. Korean J Urol. 55: 775.

[12] Guntupalli V., Siva Lakshmi Durga M., Naga Varalakshmi T., Sai Sri Lakshmi G., Sakinala P. 2018, Evaluation of anti-urolithiatic activity of chloform and methanolic extract of *Cucumis melo* seeds and fruit peel on rats. International Journal of Current Advanced Research. 7(5): 12315-12318.

[13] Ibrahim S.R.M., Mohamed G.A. 2015, Natural occurring 2-(2-phenylethyl) chromones, structure elucidation and biological activities. Nat Prod Res. 29: 1489-1520.

[14] Icer M.A., Gezmen-Karadag M., Sozen S. 2018. Can urine osteopontin levels, which may be correlated with nutrition intake and body composition, be used as a new biomarker in the diagnosis of nephrolithiasis? Clin Biochem. 60: 38-43.

[15] Kahles F., Findeisen H.M., Bruemmer D. 2014, Osteopontin: A novel regulator at the cross roads of inflammation, obesity and diabetes. Mol Metab. 3(4): 384-393.

[16] Lee B.I., Mustafi D., Cho W., Nakagawa Y. 2003, Characterization of calcium binding properties of litostathine. JBIC J Biol Inorg Chem. 8: 341-347.

[17] Li X., Liang Q., Sun Y., Diao L., Qin Z., Wang W., Lu J., Fu S., Ma B., Yue Z. 2015, Potential mechanisms responsible for the antinephrolithic effects of an aqueous extract of *Fructus aurantii*. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine. 2015: 491409.

[18] Mani M., Mitchel R. 2007, Urinary lithiasis: Etiology, diagnosis and medical management. 8 th ed. In Campbell's Urology: Philadelphia: Saunders; 2007. pp: 3229-305.

[19] Mi J., Duan J., Zhang J., Lu J., Wang H., Wang Z. 2012, Evaluation of antiurolithic effect and the possible mechanisms of *Desmodium styracifolium* and *Pyrrosiae petiolosa* in rats. Urol Res. 40(2): 151-161.

[20] Okada A., Nomura S., Saeki Y., Higashibata Y., Hamamoto S., Hirose M., Itoh Y., Yasui T., Tozawa K., Kohri, K. 2008, Morphological conversion of calcium oxalate crystals into stones is regulated by osteopontin in mouse kidney. J Bone Miner Res. 23: 1629-1637.

[21] Saito T., Tanaka Y., Morishita Y., Ishibashi K. 2018, Proteomic analysis of AQP11-null kidney: Proximal tubular type polycystic kidney disease. Biochem Biophys Rep. 13: 17-21.

[22] Srikaran R., Dulanjali S.S. 2019. Evaluation of in vitro anti-urolithiatic activity of methanolic extract of *Cucumis melo* seeds on calcium oxalate crystals. Int J Curr Pharm Res. 11(1): 18-20.

[23] Zeng X., Xi Y., Jiang W. 2019, Protective roles of flavonoids and flavonoid-rich plant extracts against urolithiasis: A review. Critical Reviews in Food Science and Nutrition. 59(13): 2125-2135.

[24] Wesson J.A., Johnson R.J., Mazzali M., Beshensky A.M., Stietz S., Giachelli C., Liaw L., Alpers C.E., Couser W.G., Kleinman J.G., Hughes J. 2003, Osteopontin is a critical inhibitor of calcium oxalate crystal formation and retention in renal tubules. J Am Soc Nephrol. 14(1): 139-47.

[25] Yang A., Guo H., Fu M., Liu M. 2019, Inhibitive effects of Huashi pill on formation of renal stones by modulating urine biochemical indexes and osteopontin in renal stone rat models. Med Sci Monit. 6(25): 8335-8344.

[26] Zargari A., 1997, Medicinal plants. Vol. 2, Tehran University Press, pp: 385-387.

Journal of Developmental Biology
Vol. 13, No. 1, Winter 2021

Effect of melon seed extract (*Cucumis melo* var. *inodorous*) on renal expression of osteopontin and lithostathin coding genes in urolithiatic male rats

Manouchehr-Mirza M. [1], Eidi M. [2, *], Ebrahimi M. [3]

[1] MSc Cellular and Molecular Biology, Department of Biology, Biological Science College, Varamin-Pishva Branch, Islamic Azad University, Varamin-Pishva, Iran
[2] Full Prof. in Animal Physiology, Department of Biology, Biological Science College, Varamin-Pishva Branch, Islamic Azad University, Varamin-Pishva, Iran
[3] Assistant Prof. in Biochemistry, Department of Biology, Biological Science College, Varamin-Pishva Branch, Islamic Azad University, Varamin-Pishva, Iran

[*] Email: maryameidi@gmail.com, eidi@iauvaramin.ac.ir

Received: December 2020 Accepted: January 2020

Abstract

Kidney stone is one of the most important diseases of the urinary tract and the most important cause of death due to urinary tract disease. The prevalence of urinary tract disease is increasing and therefore more effective and low-risk therapies are needed for treatment. Melon seeds have been suggested for the treatment of kidney diseases such as kidney stones. The aim of the present study was to investigate the effect of hydro-ethanolic extract of melon seed on renal expression of osteopontin and lithostathin coding genes in male rats with kidney stones. Induction of calcium oxalate kidney stone was performed by oral treatment of ammonium chloride (3 days) and ethylene glycol (38 days) in male rats. Potassium citrate (2.5 g/Kg) and hydro-ethanolic extract of melon seed (150, 300 and 600 mg/kg body weight) were treated orally with ethylene glycol for 38 days. After 41 days, the animals were anesthetized and their right kidney was removed for evaluation of renal expression of osteopontin and lithostathin coding genes by real-time PCR. Results showed that daily oral administration of potassium citrate and extract (150, 300 and 600 mg/kg body weight) significantly increased the expression of osteopontin coding gene (*spp1*) in experimental rats compared to control group ($p < 0.001$). Also, daily oral administration of potassium citrate and extract (concentrations of 150, 300 and 600 mg/kg body weight) significantly increased lithostathin coding gene (*reg1a*) expression in experimental rats compared to control group ($p<0.001$). In conclusion, melon seed extract can improve kidney stone disease by enhancing the expression of osteopontin and lithostathin-encoding genes and is more effective than potassium citrate in treating the disease.

Keywords: Kidney stone, Melon seed, Osteopontin, Lithostathin, *spp1*, *reg1a*, Rat.