مجله دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد/ دوره ۱۶، شماره ۲/ خرداد و تیر ۱۳۹۳/۱۰۳-۹۷

مقاله پژوهشی

کاهش بیان ژن استئونکتین توسط اسید گالیک در سلول های عضله صاف دیواره رگ ها

ندا مهندس سامانی[۱]، کیهان قطره سامانی[۲*]، حسین فتح پور[۱]، عفت فرخی[۳]، مهسا صالحیان دهکردی[۱]

[۱]گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه آزاد اسلامی شهرکرد، شهرکرد، ایران؛ [۲]مرکز تحقیقات بیوشیمی بالینی، دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد، شهرکرد، ایران؛ [۳]مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد، شهرکرد، ایران.

تاریخ دریافت: ۹۲/۶/۱۸ تاریخ پذیرش: ۹۲/۱۱/۶

چکیده:

زمینه و هدف: **در کلسیفیه شدن دیواره رگ ها یک از عوامل مهم در پاتوژنز آترواسکلروز است و پروتئین های ماتریکس استخوان و فاکتورهای تنظیمی از جمله استئونکتین نقش اساسی در تشکیل آتروم و پیشرفت آترواسکلروز به عهده دارند. مطالعات نشان داده اند که مصرف آنتی اکسیدان ها سبب کاهش کلسیفیه شدن عروق و کاهش بروز بیماری های قلبی عروقی می گردند. در این مطالعه تاثیر اسید گالیک بر بیان ژن استئونکتین مورد بررسی قرار گرفت.**

روش بررسی: **در این مطالعه تجربی، میزان مهارکنندگی ۵۰٪ (IC50) اسید گالیک بر سلول های عضله صاف دیواره رگ ها در سلول های کشت شده تعیین گردید؛ سپس این سلول ها با غلظت های ۱۶۰، ۱۸۰ و ۲۰۰ میکرومولار اسید گالیک به مدت ۴۸ ساعت در برابر گروه کنترل تیمار شدند. بعد از استخراج RNA و سنتز cDNA، میزان بیان ژن استئونکتین با روش Real Time PCR مورد سنجش قرار گرفت.**

یافته ها: **اسید گالیک در غلظت های ۱۶۰، ۱۸۰ و ۲۰۰ میزان بیان ژن استئونکتین را در مقایسه با گروه کنترل به ترتیب ۱/۳۷، ۲/۹۳ و ۷/۳ برابر کاهش داد (P<۰/۰۵).**

نتیجه گیری: **اسید گالیک بیان ژن استئو نکتین را کاهش می دهد؛ لذا به نظر می رسد با کاهش بیان ژن استئونکتین بتواند کلسیفیه شدن رگ ها را کاهش داده و روند تشکیل آتروم در دیواره رگ ها را کند نماید و بنابراین ریسک ابتلا به بیماری های قلبی- عروقی را تقلیل دهد.**

واژه های کلیدی: سلول های عضله صاف دیواره رگ ها، اسید گالیک، استئونکتین، آترو اسکلروز.

مقدمه:

آترواسکلروز یک بیماری التهابی، مزمن و چند علتی است که عامل مرگ و میر در اکثر کشورها می باشد (۱). کلسیفیه شدن دیواره رگ ها در آترواسکلروز همواره به عنوان یک فاکتور خطرساز برای پارگی پلاک آتروم (Plaque rupture) مطرح می باشد (۲،۱). مدت ها تصور می شد کلسیفیه شدن دیواره رگ ها مرحله نهایی آترواسکلروز است. اما مطالعات نشان می دهد کلسیفیه شدن آتروم از همان ابتدا و در دهه دوم زندگی پس از تشکیل رگه های لیپیدی آغاز می شود (۳). همچنین مطالعات اخیر نشان می دهند که کلسیفیه شدن دیواره رگ ها یک فرآیند فعال و تنظیم شده است (۴). علت تشکیل کلسیفیه عروق، تمایز سلول های عروقی به دنبال تحریک با سایتوکاین ها، فاکتورهای التهابی و لیپوپروتئین های تغییر یافته در پلاک های آتروم می باشد (۵). کلسیفیه شدن آترواسکلروتیک با کلسیفیه شدن و تشکیل استخوان مشابه است (۷،۶). مطالعات نشان می دهند عروق کلسیفیه شده و سلول های عروقی در محیط کشت، پروتئین های ماتریکس استخوان و فاکتورهای تنظیمی از جمله استئونکتین (Osteonectin) را بیان می کنند (۸،۶)؛ در واقع با پیشرفت آترواسکلروز، بیان استئونکتین که نوعی پروتئین ماتریکس سلولی غنی از سیستئین است (Secreted protein acidic and rich in cysteine= SPARC) در سلول های دیواره عروق افزایش می یابد (۹).

تری هیدروکسی بنزوئیک اسید که به اسید گالیک معروف است یک اسید فنولی می باشد که در

*نویسنده مسئول: شهرکرد- رحمتیه- دانشکده پزشکی- مرکز تحقیقات بیوشیمی بالینی- تلفن: ۰۳۸۱-۳۳۴۶۶۹۲، E-mail:kgsamani@yahoo.com

گیاهان مختلف از جمله بلوط، چای، سماق، دانه انگور و سیب وجود دارد (۱۱،۱۰). اسید گالیک دارای خاصیت آنتی اکسیدانی و ضد قارچی و آنتی ویروسی می باشد. همچنین اسید گالیک بخش مهمی از طب سنتی در بعضی کشورها می باشد. استر موجود در اسید گالیک با کاهش استرس اکسیداتیو از آسیب های سلولی جلوگیری می کند (۱۳،۱۲)؛ خواص آنتی اکسیدانی آن باعث حفاظت سلول ها در برابر آسیب های اکسیداتیو می گردد و با اثر ضد تکثیری خود مانع از سرطانی شدن سلول ها می شود (۱۴،۱۰). مطالعات اخیر نیز نشان داده اند که ترکیبات پلی فنولی مثل اتیل گالات در انگور (۱۵) و همچنین ترکیبات پلی فنولی از جمله اسیدگالیک در عصاره برگ نیلوفر (۱۶) باعث مهار مهاجرت سلول های صاف عضلات رگ ها می گردند و احتمالاً در پیشگیری از آترواسکلروز موثر می باشند. نتایج دیگر مطالعه که در آن اثر آنتی اکسیدان ها بر بیان فاکتور رونویسی $RUNX_2$ (یک فاکتور رونویسی مربوط به معدنی شدن استخوان ها و عروق می باشد) مورد بررسی قرار گرفته است نیز نشان می دهد آنتی اکسیدان های گیاهی منجر به کاهش معدنی شدن در شرایط آزمایشگاهی به میزان ۳۰٪ و ۳۵٪ می شوند (۱۷)؛ از این رو انتظار می رود اسید گالیک با کاهش بیان ژن استئونکتین خطر ابتلا به بیماری های قلبی عروقی را کاهش دهد؛ لذا این مطالعه با هدف بررسی اثر اسیدگالیک بر بیان ژن استئونکتین به منظور ارائه راهکار جهت معرفی این ترکیب به عنوان یک عامل کاهش دهنده ریسک بیماری های قلبی عروقی طراحی و اجرا شد.

روش بررسی:

در این مطالعه تجربی به منظور بررسی اثر اسیدگالیک بر بیان ژن استئونکتین، ابتدا کشت رده سلول های ماهیچه صاف عروق آئورت انسانی (Human aorta vascular smooth muscle cell= HA/VSMC) انجام شد (تهیه شده از انستیتو پاستور ایران). محیط کشت این سلول ها F12K است که حاوی mg/ml ۰/۰۵ اسکوربیک اسید، mg/ml ۰/۰۱ انسولین، ۰/۰۵mg/ml ترانسفرین، ng/ml ۱۰ سدیم سلنیت، ۰/۰۳mg/ml مکمل های رشد سلول های اندوتلیال، سرم جنین گاوی ۱۰٪، بافر HEPES ۱۰ mM، u/ml ۱۰۰ پنی سیلین ۱۰۰، u/ml ۱۰۰ استرپتو مایسین و ۰/۰۱٪ آمفو تریسین می باشد. سلول ها در فلاسک مناسب در انکوباتور ۳۷ درجه و CO_2 ۵ درصد کشت داده شدند. بعد از رشد و تکثیر سلول ها، از پاساژ ۷-۴ برای انجام مراحل بعدی انجام شد.

برای مشخص نمودن غلظت مهار کنندگی ۵۰٪ اسید گالیک بر روی سلول ها از آزمون MTT استفاده شد؛ بدین منظور در پلیت ۹۶ خانه ای حدود ۸۰۰۰ سلول در حجم ۱۵۰ میکرولیتر در هر چاهک توزیع گردید. پس از مدت ۲۴ ساعت انکوبه شدن، سلول ها با غلظت های مختلف اسید گالیک (۴۰ تا ۶۰۰ میلی مولار) در کنار نمونه کنترل مدت ۴۸ ساعت تیمار شدند. برای هر غلظت سه تکرار در نظر گرفته شد. پس از این مدت MTT {3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide} با غلظت ۱۲ میلی مولار به هر چاهک اضافه شد. در نهایت با افزودن دی متیل سولفوکساید (Dimethyl sulfoxide)، پس از ۱۰ دقیقه میزان جذب نوری ایجاد شده در طول موج nm ۴۹۲ با مشاهده گر الایزا (Elisa Reader, Awareness USA) قرائت گردید.

برای تیمار سلول ها با اسیدگالیک، ابتدا سلول ها توسط لام نئوبار شمارش شدند و سپس حدود ۱۵۰۰۰ سلول در هر چاهک در پلیت ۱۲ خانه توزیع گردید. پس از مدت زمان ۴۸ ساعت و رسیدن سلول ها به تراکم ۸۰٪، سلول ها با غلظت های ۱۶۰، ۱۸۰ و ۲۰۰ میکرومولار اسیدگالیک شدند. برای هر غلظت ۳ تکرار در نظرگرفته شد. سپس سلول های تیمار شده به مدت ۴۸ ساعت در ۳۷ درجه سانتی گراد با رطوبت ۹۵٪ و ۵٪

دی اکسید کربن انکوبه شدند. گروه کنترل نیز که حاوی تمام ترکیبات موجود در گروه های تیمار شده به جز اسید گالیک بود لحاظ گردید. با توجه به حساس بودن اسید گالیک به نور، تهیه غلظت های مختلف اسیدگالیک و افزودن آنها به محیط کشت در تاریکی انجام شد.

استخراج RNA با استفاده از کیت بیوزول (BIOZOL) خریداری شده از شرکت Bioflux (ساخت کشور مالزی) و طبق دستور العمل مربوطه انجام و سپس غلظت و کیفیت آن توسط نانو دراپ تعیین شد. همچنین به منظور تهیه cDNA از روی RNA از کیت cDNA (ساخت شرکت Thermo کانادا) و طبق دستور العمل شرکت سازنده کیت استفاده شد. در حدود ۲ میکروگرم از هر نمونه برای سنتز cDNA استفاده گردید.

بیان ژن استئونکتین با روش Real Time PCR و با استفاده از سایبر گرین (SYBR green) و توسط دستگاه Rotor-Gene (Corbett-Australia) بررسی گردید. از ژن گلیسرآلدهید-۳-فسفاتات دهیدروژناز Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) نیز به عنوان ژن مرجع تکثیر استفاده شد (جدول شماره ۱). شرایط انجام آزمایش شامل: ۵ دقیقه فعال شدن آنزیم در دمای ۹۵ درجه، ۴۰ سیکل شامل ۹۵ درجه به مدت ۱۵ ثانیه، ۵۹ درجه به مدت ۲۰ ثانیه و ۷۲ درجه به مدت ۳۰ ثانیه بود (۱۸، ۱۹).

جدول شماره ۱: توالی پرایمرهای مورد استفاده و طول محصول

ژن	توالی پرایمر ('5-'3)	طول محصول
GAPDH	Forward: ACACCCACTCCTCCACCTTTG Reverse: TCCACCACCCTGTTGCTGTAG	۱۱۲
استئونکتین	Forward: CTTCCCTGTACACTGGCAGTTC Reverse: AGCTCGGTGTGGGAGAGGTA	۷۳

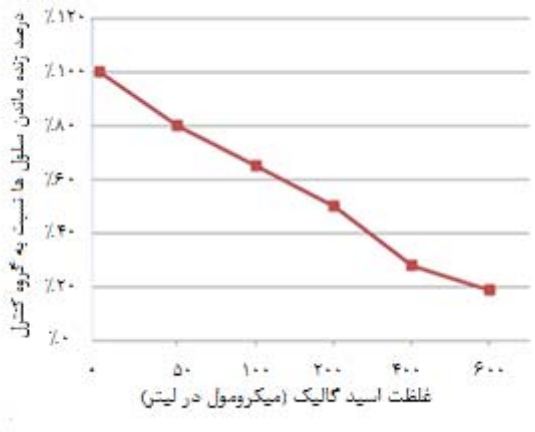
GAPDH. (Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase)

میزان بیان ژن استئونکتین در گروه های تیمار شده و کنترل مورد اندازه گیری 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 ژن های مورد نظر و عدم جفت شدن پرایمرها را نشان داد.در نهایت میزان بیان ژن استئونکتین با روش کمی نسبی و تعیین $\Delta\Delta C_T$ ارزیابی گردید. داده ها با نرم افزار SPSS13 و آزمون آماری Kruskal wallis آنالیز و تفسیر شدند.

یافته ها:

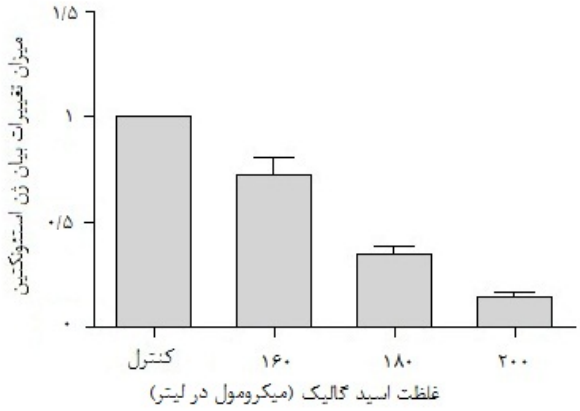
با توجه به نتایج حاصل از آزمون MTT، غلظتی از اسید گالیک بر روی VSMS که در آن ۵۰٪ سلول ها از نظر بیولوژیک متوقف شوند (IC50)، غلظت ۲۰۰ میکرو مولار بدست آمد (نمودار شماره ۱) و سلول ها با ۳ غلظت مختلف اسید گالیک که شامل غلظت IC50 و دو غلظت پایین تر آن بود به مدت ۴۸ ساعت تیمار شدند.

پس از تعیین اختلاف C_T (Cycle threshold) ژن استئونکتین با ژن مرجع (ΔCT) برای هر نمونه و محاسبه اختلاف آن در گروه های تیمار شده با گروه کنترل ($\Delta\Delta C_T$)، میزان تغییرات (Fold change) با استفاده از فرمول ($2^{-\Delta\Delta CT}$) محاسبه شد و نتایج نشان داد که اسید گالیک در غلظت های ۱۶۰، ۱۸۰ و ۲۰۰ میکرومول، میزان بیان ژن استئونکتین را در مقایسه با گروه کنترل به ترتیب ۱/۳۷، ۲/۹۳ و ۷/۳ برابر کاهش داده است ($P<0/05$) (نمودار شماره ۲).



نمودار شماره ۲: نتایج تعیین MTT غلظت های مختلف اسید گالیک به مدت ٤٨ ساعت بر روی سلول های VSMCتیمار شده

درصد زنده ماندن سلول ها بر اساس میزان جذب توسط دستگاه الایزا ریدر مورد ارزیابی قرار گرفت.



نمودار شماره ۲: نتایج آزمایش Real Time PCR بیان ژن استئونکتین در رده سلولی VSMC

بحث:

در این مطالعه اثر غلظت های ۱۶۰، ۱۸۰ و ۲۰۰ میکرومولار اسید گالیک بر روی بیان ژن استئونکتین مورد بررسی قرار گرفت و نتایج حاصل نشان دادند که اسید گالیک در هر ۳ غلظت، بیان ژن استئونکتین را در مقایسه با گروه کنترل کاهش می دهد. استئونکتین پتانسیل القاء استخوان سازی را دارد و شاخصی برای سلول های استرومال محسوب می شود و نقش مهمی در تولید ضایعات آتروم دارد. همچنین به عنوان یک نشانه تنگی و کلسینوز (calcinosis) عروق کرونر مطرح است (۲۰).

ترکیبات پلی فنولی به علت خاصیت آنتی اکسیدانی مانع از فعالیت آلکالین فسفاتاز که نقش مهمی در معدنی شدن استخوان ها و همچنین کلسیفیه شدن عروق در انسان دارد می شوند (۱۱)؛ لذا با توجه به تأثیر آنتی اکسیدان های پلی فنلی بر بیان ژن عوامل رونویسی، تأثیر اسید گالیک نیز که از ترکیبات فنلی است بر بیان ژن های درگیر در تنظیم استخوان که در این مطالعه دیده شده دور از انتظار نبوده است. مطالعات متعددی نیز اثر آنتی اکسیدانی اسیدگالیک را تأیید نموده اند؛ به عنوان مثال در یک مطالعه اثر چای سبز به عنوان یک ترکیب حاوی اسید گالیک بر کلسیفیه شدن عروق مورد مطالعه قرار گرفته است. در مطالعه مذکور رگ های موش های مورد آزمایش با تزریق ماهیچه ای ویتامین D3 و مصرف دهانی نیکوتین در معرض کلسیفیه شدن قرار گرفت و نتایج افزایش میزان آلکالین فسفاتاز فعال در پلاسما و استئوکلسین را نشان داد. مقدار

آلکالین فسفاتاز و استئو کلسین در گروه کلسیفیه شده نسبت به گروه کنترل بسیار بیشتر بوده و کلسیفیه شدن آئورت با مصرف چای سبز به میزان قابل توجهی کاهش یافته بود (۲۱). در مطالعه حاضر نیز اسید گالیک بیان ژن استئونکتین را کاهش داد که بانتایج مطالعه فوق همسو می باشد.

در برخی از مطالعات خواص آنتی آتروژنیک ترکیبات پلی فنلی از جمله اسید گالیک بر مهار تکثیر و مهاجرت سلول های VSMC نشان داده شده است (۱۶). به نظر می رسد پلی فنل ها از مسیرهای دیگری نیز بر کاهش خطر ابتلا به آترو اسکلروز موثرند و ظرفیت استفاده برای اهداف درمانی در کاهش بیماری قلبی عروقی را دارند (۲۰).

در مطالعه حاضر به طور واضح اسید گالیک بیان ژن استئونکتین را در الگویی وابسته به دوز کاهش داد. این کاهش یا به دلیل کاهش استرس اکسیداتیو و به دنبال آن کاهش اکسید کننده های محیطی (ROS) بوده است که قبلاً به عنوان ویژگی ترکیبات پلی فنلی از جمله اسید گالیک در بیماران مبتلابه آلزایمر و همچنین سلول های سرطان پروستات نشان داده شده است (۲۲،۱۴) و یا به دلیل کاهش از طریق فاکتورهای رونویسی عمومی نظیر $RUNX_2$ بوده (۲۳) که کاهش بیان این فاکتور رونویسی، منجر به کم شدن بیان استئو نکتین شده است.

نتیجه گیری:

از آنجایی که کاهش بیان فاکتورهای مربوط به استخوان سازی در دیواره رگ ها ریسک آترواسکلروز را کاهش می دهد؛ لذا نتایج این مطالعه مبنی بر کاهش بیان استئونکتین، در کاهش بیماری آترو اسکلروز موثر خواهد بود. با این حال از آنجایی که تاکنون مطالعات وسیعی در مورد اثر اسید گالیک بر بیان ژن استئونکتین یا سایر فاکتورهای تنظیمی تولید استخوان در سلول های HA/VSMC صورت نگرفته است، انجام مطالعات تکمیلی برای تکمیل یافته های این مطالعه ضروری به نظر می رسد.

تشکر و قدردانی:

این مطالعه برگرفته از پایان نامه تصویب شده در شهریور ۱۳۹۲ می باشد که در دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد انجام شده است. بدینوسیله نویسندگان از کلیه کسانی که ما را در انجام این مطالعه یاری رساندند تشکر و قدردانی می نمایند.

منابع:

1. Insull JRW. The pathology of atherosclerosis: plaque development and plaque responses to medical treatment. Am J Med. 2009; 122(1): S3-S14.
2. Wu M, Rementer C, Giachelli CM. Vascular calcification: an update on mechanisms and challenges in treatment. Calcif Tissue Int. 2013; 93(4): 365-73.
3. Demer LL, Tintut Y. Vascular calcification: pathobiology of a multifaceted disease. Circulation. 2008; 117(22): 2938-48.
4. Zhu D, Mackenzie NC, Farquharson C, Macrae VE. Mechanisms and clinical consequences of vascular calcification. Front Endocrinol (Lausanne). 2012; 3: 95.
5. 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): 226-9.
6. 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): 485-94.

7. Dhore CR, Cleutjens JP, Lutgens 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.
8. 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): 613-22.
9. Gadeau AP, Chaulet H, Daret D, Kockx M, Daniel-Lamaziere JM, Desgranges C. Time course of osteopontin, osteocalcin, and osteonectin accumulation and calcification after acute vessel wall injury. J Histochem Cytochem. 2001; 49(1): 79-86.
10. 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): 90-9.
11. Negrao 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 cells. J Agric Food Chem. 2006; 54(14): 4982-8.
12. Ji B-C, Hsu W-H, Yang J-S, Hsia T-C, Lu C-C, Chiang J-H, 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): 7596-604.
13. Negrao 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 cells. J Agric Food Chem. 2006; 54(14): 4982-8.
14. Russell LH, Jr., Mazzio E, Badisa RB, Zhu ZP, Agharahimi M, Oriaku ET, et al. Autoxidation of gallic acid induces ROS-dependent death in human prostate cancer LNCaP cells. Anticancer Res. 2012; 32(5): 1595-602.
15. 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(08): 772-8.
16. 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): 159-68.
17. 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;24:669-72.
18. Safshekan F, Tafazzoli-Shadpour M, Shokrgozar MA, Haghighipour N, Mahdian R, Hemmati A. Intermittent hydrostatic pressure enhances growth factor-induced chondroinduction of human adipose-derived mesenchymal stem cells. Artificial organs. 2012; 36(12): 1065-71.
19. Brabender J, Lord RV, Metzger R, Park J, Salonga D, Danenberg KD, et al. Differential SPARC mRNA expression in Barrett's oesophagus. Br J Cancer. 2003; 89(8): 1508-12.
20. 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): 370-3.
21. Xu H, Wan D, Yang X, Li Gui, Wang T,Wu H. The Attenuating Effect of Geen Tea on Vascular Calcification in Rats. J Ning Med Col. 2008; 57: 97-107.
22. Darvesh AS, Carroll RT, Bishayee A, Geldenhuys WJ, Van der Schyf CJ. Oxidative stress and Alzheimer's disease: dietary polyphenols as potential therapeutic agents. Expert Rev Neurother. 2010; 10(5): 729-45.
23. Cheluvaraju C. Characterization of anti-proteolytic and anti-proliferative activities of pentagalloylglucose; its potential application as a therapeutic agent in vascular diseases. Tehran: Clemson University; 2010.

Journal of Shahrekord University of Medical Sciences
(J Shahrekord Univ Med Sci) 2014 May, Jun; 16(2):97-103 **Original article**

Decreases of osteonectin gene expression by gallic acid in vascular smooth muscle cells

Mohandes-Samani N[1], Ghatreh-Samani K[2*], Fathpour H[1], Farrokhi E[3], Salehian Dehkordi M[1]
[1]Biology Department, Science Faculty, Islamic Azad University of Shahrekord, Shahrekord, I.R. Iran; [2]Clinical Biochemistry Research Center, Shahrekord University of Medical Science, Shahrekord, I.R. Iran; [3]Cellular and Molecular Research Center, Shahrekord University of Medical Science, Shahrekord, I.R. Iran.
Received: 9/Sep/2013 Accepted: 26/Jan/2014

Background and aims: Vascular calcification is important factor in atherosclerosis pathogenesis and osteonectin with others bone matrix proteins have regulatory function in atheroma formation and atherosclerosis progression. Studies showed that antioxidant compounds cause to decrease vascular calcification and prevent cardiovascular disease. The aim of this study was to investigate effects of gallic acid on osteonectin gene expression.
Methods: In this experimental study, it was determined gallic acid half maximal inhibitory concentration (IC50) on vascular smooth muscle cells (VSMC). These cells were treated by 160,180 and 200 µM concentration of gallic acid for 48h and the control group also was considered. The total RNA was extracted and its cDNA was synthesized and then the quantity of osteonectin gene expression was measured by real time PCR.
Results: Overall،160,180 and 200µM concentration of gallic acid decreased osteonectin gene expression in vascular smooth muscle cell by 1/37, 2/93 and 7/3 folds compared with the control group, respectively.
Conclusion: Gallic acid reduces osteonectin gene expression; therefore could reduce vascular calcification. Gallic acid could have prevented atheroma formation therefore could decrease the risk of cardiovascular diseases.

Keywords: **Vascular smooth muscle cells, Gallic acid, Osteonectin, Atherosclerosis.**

Cite this article as: 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.

[*]**Corresponding author:**
Clinical Biochemistry Research Center, Shahrekord University of Medical Sciences. Rahmatieh, Shahrekord, Iran. Tel: 00983813346692, E-mail: kgsamani@yahoo.com