

«مقاله پژوهشی»

## بررسی تأثیر سولفورافان حاصل از عصاره گیاه *Brassica oleracea* بر بیان دو ژن *NF-κB* و *STAT3*، مؤثر در مسیر التهاب سیستم ایمنی

مهديه شجاعی<sup>۱</sup>، راضیه سرآبادانی تفرش<sup>۲\*</sup>

۱. کارشناس ارشد، گروه بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشگاه پیام نور، تهران، ایران.

۲. استادیار، گروه بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشگاه پیام نور، تهران، ایران.

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۹/۲۱ - تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۳/۱۹)

### Investigation of the Effect of Sulforaphane Content of *Brassica oleracea* Extract on the Expression of *NF-κB* and *STAT3* Genes Contributing Affecting the Inflammatory Response Pathway of Immune System

Mahdiah Shojaei<sup>1</sup>, Razieh Sarabadani Tafresh<sup>2\*</sup>

1. M.Sc., Department of Agricultural Biotechnology, Payame Noor University, Tehran, Iran.

2. Assistant Professor, Department of Agricultural Biotechnology, Payame Noor University, Tehran, Iran.

(Received: Dec. 12, 2020 - Accepted: Jun. 9, 2021)

#### Abstract

Inflammation is a natural response of the body's immune system to disease, protecting the body in the form of a defensive mechanism. The immune system identifies the damaged body cells, stimuli, and pathogens to trigger the healing process – a mechanism that can engage the body with inflammation. In some cases, too long inflammation and excessive immune responses led to side effects and damages that dominate their benefits, leading to chronic inflammation and then engagement with different diseases. In the present research, effect of the broccoli sprouts extract on the expression of the *NF-κB* and *STAT3* genes affecting the inflammatory response pathway of immune system was investigated. Results of gas chromatography – mass spectroscopy (GC-MS) and MTT assay confirmed the presence of the sulforaphane in the extract while rejecting their toxicity to cell lines. Moreover, the *GAPDH* and  $\beta$ -actin genes were used as internal control genes in the 1321N1 neural cell line, with the HFF cell line used as normal cell. The cells were treated with 2 mg of the extract for 3 days, during which time the changes in the immune system in terms of the genes expressions were monitored. The results showed that the sulforaphane attenuate the expressions of the *NF-κB* and *STAT3* genes as two of the most important inflammatory mediating genes. It seems that the use of sulforaphane as active ingredient can effectively attenuate the cause of the disorders faced by the patients with immune system inflammation.

**Keywords:** *Brassica oleracea*., immune system inflammation, *NF-κB*, *STAT3*, sulforaphane.

#### چکیده

التهاب، پاسخ طبیعی سیستم ایمنی بدن در برابر آسیب یا بیماری به عنوان یک مکانیسم دفاعی، در بدن است. سیستم ایمنی بدن سلول‌های آسیب دیده، محرک‌ها و پاتوژن‌ها را شناسایی کرده و روند بهبودی را آغاز می‌کند که این روند ممکن است باعث بروز التهاب در بدن شود. گاهی اوقات التهاب طولانی مدت و پاسخ‌های ایمنی بیش از حد معمول، باعث بروز عوارض و آسیب‌های بیشتر و بروز بیماری‌های مزمن می‌شود. در این پژوهش عصاره *Brassica oleracea* استخراج و وجود سولفورافان با روش GC-MS و MTT در آن تأیید شد. میزان سمیت عصاره استخراج شده بر لاین‌های سلولی، رد شد، بر بیان ژن‌های *STAT3* و *NF-κB* مؤثر در مسیر التهاب سیستم ایمنی مورد بررسی قرار گرفت. از دو ژن *GAPDH* و  $\beta$ -actin به عنوان ژن‌های کنترل داخلی، در لاین سلولی عصبی 1321N1 و لاین سلولی HFF به عنوان سلول نرمال استفاده شد. سلول‌ها با دو میلی‌گرم از عصاره به مدت سه روز تیمار شدند و تغییرات سیستم ایمنی نیز در بیان ژن‌ها، مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که سولفورافان باعث کاهش بیان ژن‌های *NF-κB* و *STAT3* شد و هر دو ژن از مهم‌ترین واسطه‌های التهاب می‌باشند. بر اساس نتایج بدست آمده در این پژوهش، استفاده از ماده مؤثره سولفورافان می‌تواند در کاهش علل ایجاد مشکلات بیماران دارای التهاب سیستم ایمنی مؤثر باشد.

**واژه‌های کلیدی:** التهاب سیستم ایمنی، سولفورافان، *Brassica oleracea*، *NF-κB*، *STAT3*

به بافت می‌شوند (Nathan, Coussens *et al.*, 2002; Nathan, Coussens *et al.*, 2002).

(2002; Balkwill *et al.*, 2005).

پروتئین سه تراساننده پیام و فعال‌کننده رونویسی یا  $STAT3$ <sup>5</sup> عضو خانواده پروتئین  $STAT$  است. در پاسخ به سیتوکین‌ها و فاکتورهای رشد،  $STAT3$  بوسیله  $JAK$  مرتبط با گیرنده فسفوریده می‌شود، به صورت همو<sup>۶</sup> یا هتروداپمر<sup>۷</sup> تشکیل و به هسته سلولی منتقل می‌شود، جایی که به عنوان فعال‌کننده‌های رونویسی عمل می‌کنند.  $STAT3$  بیان یکی از ژن‌های مختلف را در واکنش به محرک‌های سلولی متمرکز می‌کند و در نتیجه نقش کلیدی در بسیاری از فرآیندهای سلولی، مانند رشد سلولی و آپوپتوز دارد (Kane *et al.*, 2014).

بعد از گذشت ۱۵۰ سال از ورود داروهای شیمیایی به چرخه درمان و ایجاد عوارض جانبی زیاد، در سال‌های اخیر، توجه مردم جهان به مصرف گیاهان دارویی بسیار افزایش یافته است. یکی از گیاهانی که در سال‌های اخیر بسیار مورد توجه محققان و دانشمندان در حوزه اختلالات سیستم ایمنی قرار گرفته است، کلم بروکلی (*Brassica oleracea*) است (Singh *et al.*, 2014). عصاره کلم بروکلی به علت دارا بودن سولفورافان که یکی از بهترین مواد کمک‌کننده به بهبود بیماری‌های التهابی سیستم ایمنی انسان، مورد توجه قرار گرفته است. سولفورافان در بهبود کیفیت درمان بسیاری از بیماری‌ها مانند سرطان، دیابت، بیماری‌های کلیوی و آرتریت روماتوئید مؤثر است (Palak *et al.*, 2016). سولفورافان یکی از مفیدترین مواد موجود در کلم بروکلی است که به علت فعالیت آنزیم میروسیناز<sup>۸</sup> در گلوکوراپامین<sup>۹</sup> ایجاد می‌شود (Palak *et al.*, 2016). سولفورافان ( $SFN$ ) یک ایزوتیوسیانات<sup>۱۰</sup> طبیعی است که برای اولین بار در عصاره کلم بروکلی یافت شد

## مقدمه

التهاب در بدن انسان یک واکنش ایمنی فیزیولوژیکی ضروری در مقابل انواع عفونت‌ها، آسیب‌ها و بیماری‌ها است. بی‌شک عدم کارکرد درست این سیستم اثرات زیادی مانند انواع بی‌نظمی در سیستم ایمنی، نبود پاسخ مناسب در برابر عوامل خارجی، فعال‌سازی سیستم ایمنی مزمن در بیماری‌های خودایمنی و تغییرات اساسی از طریق مسیرهای سیگنالینگ پیش التهابی در بدن موجودات بوجود می‌آورد. التهاب در بدن انسان از روش‌های متفاوتی مانند افزایش عروق، جذب سلول‌های ایمنی اضافی از طریق سیگنالینگ پیش التهابی و همچنین شروع فاگوسیتوز ایجاد می‌شود. همه این موارد می‌توانند از عوامل بیماری‌زا باشند. از واسطه‌های شروع التهاب و پاسخ ایمنی بدن می‌توان به عوامل رونویسی مانند،  $NF-\kappa B$  و همچنین  $STAT3$ ، پپتیدها، برخی از سایتوکاین‌ها و کموکاین‌ها، آنزیم‌هایی مثل  $iNOS$ ،  $COX-2$  و برخی از فاکتورهای انعقادی مثل فعال‌کننده پلاکت نام برد (Newcombe *et al.*, 2018).

فاکتور رونویسی  $NF-\kappa B$  در سال ۱۹۸۶ به عنوان عامل هسته‌ای کشف شد که به منطقه تقویت‌کننده زنجیره  $\kappa B$  ایمونوگلوبولین در سلول‌های  $B$  مرتبط می‌شود (Kumar *et al.*, 2004). در اثر فعال‌شدن پروتئین  $NF-\kappa B$ ، مهارکننده  $I\kappa B\alpha$  فسفوریلاسیون و تخریب می‌شود.  $SFN$  (سولفورافان) مانع از فسفوریلاسیون  $I\kappa B\alpha$  می‌شود. عدم فعال‌سازی  $NF-\kappa B$  باعث کاهش بیان ژن‌های  $iNOS$ <sup>۱</sup> و  $COX-2$ <sup>۲</sup> می‌شود (Song *et al.*, 2009). نیتریک اکسید سنتتاز  $iNOS$  (یک آنزیم کلیدی در التهاب ماکروفاژ) و  $COX-2$  سیکلو اکسیژن<sup>۲</sup> (آنزیم مسئول التهاب و درد) هر دو آنزیم‌هایی هستند که زمانی که بیش از حد بیان شوند، باعث آسیب

5. Signal transducer and activator of transcription 3  
6. Homodimers  
7. Heterodimers  
8. Myrosinase  
9. Glucoraphanin  
10. Isothiocyanate

1. Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B  
2. Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, alpha  
3. Inducible nitric oxide synthase  
4. Cyclooxygenase-2

به قطر ۰/۲۵ mm و ضخامت ۰/۲۵ μm تزریق شد. دمای اولیه اون ۴۰ درجه سانتی‌گراد و به مدت ۲ دقیقه در این دما ماند. سپس با سرعت ۱۰ درجه بر دقیقه دمای اون به ۲۷۰ درجه سانتی‌گراد رسید و در این دما به مدت ۱۰ دقیقه قرار گرفت، شرایط تزریق MS Solv: 50→550 inlet: 250 درجه سانتی‌گراد و 3 و درجه سانتی‌گراد و Split: 50 و حجم تزریق ۱ ماکرولیت بود (Tsoi et al., 1998). عصاره به قیف دکانتور منتقل و ۹۰ میلی‌لیتر دی‌کلرومتان در دو مرحله ۶۰ و ۳۰ میلی‌لیتر برای جداسازی فاز آلی و آبی به قیف اضافه شد. بعد از جداسازی فاز آلی به آن مقداری سولفات منیزیم اضافه شد و سپس با کاغذ واتمن ۴۲ نمونه صاف و به کمک روتاری حلال حذف و سپس ۲ میلی‌لیتر استونیتریل به آن اضافه شد.

#### آزمون MTT

غشای سلولی توسط یک حلال مناسب از جمله ایزوپروپانول یا دی‌متیل‌سولفواکساید تخریب و فورمازون حل شد، سپس توسط دستگاه الیزاریدر میزان جذب نوری فورمازون در طول موج ۵۷۸ خوانده شد (Sammani et al., 2014). هدف از انجام این آزمون در آزمایش بررسی تأثیر تیمارهای مورد استفاده از جمله دی‌متیل‌سولفواکساید، رنگ نیل‌ورد و سیلی‌مارین بر روی لاین سلولی مورد نظر در این مطالعه است. کلیه مراحل کار زیر هود لامینار انجام شد و انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، رطوبت ۹۰ درصد، CO<sub>2</sub> به میزان ۵ درصد برای تنظیم pH محیط منظور شد. سلول‌ها داخل فلاسک با محیط کشت ۱۰ درصد که در این محیط کشت برای فراهم کردن ویتامین‌ها از DMSO<sup>۱</sup> و برای اضافه کردن پروتئین‌های لازم از FBS استفاده شد. به منظور انجام این تست، ابتدا تعداد ۱۰ تا ۲۰ هزار سلول (HFF و 1321N) با توجه به بازه زمانی آزمون در هر چاهک از پلیت ۹۶ خانه ریخته شد، بعد از ۸ ساعت انکوبه

(Zhang et al., 1994; Zhang et al., 1992; Higdon et al., 2007). با در نظر گرفتن خواص سولفورافان بر بهبود بیماری‌های التهابی، در تحقیق حاضر تأثیر این ماده بر میزان بیان دو ژن *NF-KB* و *STAT3*، از ژن‌های مهم در سیستم ایمنی و التهاب مورد بررسی قرار گرفت.

#### مواد و روش‌ها

بذرهای هیبرید سنتارو گیاه کلم بروکلی گونه براسیکا اولارسیا از شرکت تاکسیسد<sup>۱</sup> ژاپن تهیه شد. ابتدا بذرها با آب مقطر شسته شد و در محلول ۵ گرم در لیتر هیپوکلریت سدیم به مدت ۱۵ دقیقه ضدعفونی سطحی شد. سپس بذرها تا رسیدن به pH خنثی مجدداً با آب مقطر شسته و به مدت ۲۴ ساعت با آب آشامیدنی در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد خیس شد. بذرها برای ادامه جوانه‌زنی در شرایط ۱۶ ساعت نور و ۸ ساعت تاریکی در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد به مدت یک هفته نگهداری شد. در طول این مدت رطوبت بذرها حفظ شد. در روز هفتم بذرها جوانه زده برای ادامه پژوهش در فریزر با دمای منفی ۲۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت قرار داده شد (Fahey et al., 1997). سپس برای عصاره‌گیری نمونه‌ها به پژوهشکده مواد و انرژی، کرج انتقال یافت. در این مرحله جوانه‌های هفت روزه کلم بروکلی مستقیماً به دستگاه فریزدرایر منتقل و خشک شدند. میزان ۲ گرم از جوانه بروکلی فریزدرای شده با ۳۰ میلی‌لیتر آب مقطر به مدت ۱۹۰ دقیقه به روی شیکر قرارگرفت تا هیدرولیز سولفورافان انجام شود. بعد از این زمان، pH محلول اندازگیری شد که حدود ۵ تا ۶ بود، با کمک اسید کلریدریک pH به حدود ۲ کاهش یافت تا از تخریب سولفورافان جلوگیری شود.

#### آزمون GC-MS

دستگاه GC 6890N Agilent و Mass 5973 و Agilent با ستون RTX-5 Sil MS معادل HP-5 MS

عصبی N1۱۳۲۱ و لاین سلولی HFF به عنوان سلول نرمال استفاده شد. آغازگرها توسط نرم‌افزار Beacon designer طراحی شد و سپس توسط نرم‌افزار NCBI BLAST از اختصاصی بودن آغازگرها اطمینان حاصل شد (جدول ۱).

### کشت سلول‌ها در پلیت‌های شش خانه و تیمار سلول‌ها در دو مرحله

به‌منظور شبیه‌سازی محیط آزمایشگاه با شرایط داخل بدن انسان، زمانی که سیستم ایمنی بیش از حد معمول در بدن فعال است، سلول‌ها تحت القاء سیستم ایمنی قرار گرفتند و تغییرات سیستم ایمنی در بیان ژن‌ها مورد بررسی قرار گرفت. در این مرحله‌ی آزمایش بعد از گذشت ۲۴ ساعت و چسبیدن سلول‌ها به پلیت، برای تحریک سیستم ایمنی تیمار سلول‌ها با ۷۵ نانوگرم بر میلی‌لیتر PMA و یک میلی‌گرم بر میلی‌لیتر ایونومایسین انجام شد. بعد از گذشت ۱۴ ساعت محیط روی سلول‌ها جمع‌آوری شد و با سانتریفیوژ ۲۰۰۰ دور به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ شد.

**آماده‌سازی نمونه برای استخراج RNA و بیان ژن‌ها**  
بعد از کشت سلول N1۱۳۲۱ در فلاسک‌های T25 و تولید آن در سطح بالا بعد از پاساژ ۲، سلول‌ها شمارش شدند. سپس برای بررسی بیان ژن و انجام تیمار بر روی سلول به پلیت‌های شش خانه انتقال داده شدند. داخل هر چاهک از پلیت  $2 \times 10^5$  سلول ریخته شد. بعد از ۲۴ ساعت در یک پلیت سلول‌ها با غلظت دو میلی‌گرم از عصاره کلم بروکلی در سه تکرار تیمار شد. همچنین یک نمونه به عنوان کنترل (بدون تیمار با عصاره) در نظر گرفته شد. بعد از گذشت ۷۲ ساعت، طبق پروتکل استخراج RNA با کیت RNAXplus (سیناژن) و ساخت cDNA (با کیت پارس‌توز) انجام شد.

داخل انکوباتور کشت سلولی، لایه رویی که محتوی سلول‌ها بود، خارج و محیط کشت جدید حاوی درصد سرم و غلظت‌های مختلف از عصاره کلم بروکلی (در بازه بین ۰/۲۵ میلی‌گرم تا ۳ میلی‌گرم) به چاهک‌های مربوطه اضافه شد و به مدت ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت در داخل انکوباتور قرار داده شد. بعد از بازه‌های زمانی آزمون مذکور ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت محیط رویی سلول‌ها حذف شده و به داخل هر چاهک ۱۰۰ میکرولیتر محلول MTT (سیگما آلمان) آماده شده با غلظت ۰/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر اضافه شد و به مدت ۴ ساعت در انکوباتور قرار داده شد، در ادامه محلول رویی چاهک‌ها دور ریخته و به هر یک از چاهک‌ها ۱۵۰ میکرولیتر DMSO افزوده شد. سپس به مدت ۲۰ دقیقه داخل انکوباتور شیک‌ردار با دمای ۳۳ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد، سپس میزان جذب، توسط دستگاه الایزایدر در طول موج ۵۷۰ نانومتر خوانده شد. این آزمون برای هر رده سلولی به طور جداگانه و با سه بار تکرار انجام گرفت، میزان زنده‌مانی سلول‌ها با استفاده از فرمول زیر محاسبه شد (فرمول ۱). در ادامه

$$\text{میزان درصد زنده‌مانی} = \frac{\text{میزان جذب سلول‌های تیمار شده}}{\text{میزان جذب سلول‌های کنترل}} \times 100$$

مطالعات این پژوهش با لاین سلولی 1321N1 Cell line به عنوان لاین سلولی عصبی انجام گرفت، همچنین HFF از سلول فیبروبلاست پوستی انسانی استخراج شده از بافت پوست در آزمایشگاه، به عنوان سلول نرمال برای بررسی آزمون سمیت استفاده شد. لاین‌های سلولی از انستیتو پاستور ایران تهیه شد. در مطالعه حاضر، بیان ژن‌های STAT3 و NF-KB مؤثر در مسیر التهاب سیستم ایمنی مورد بررسی قرار گرفت. از دو ژن GAPDH و  $\beta$ -actin به عنوان ژن کنترل داخلی (Gilliland et al., 1990)، در لاین سلولی

جدول ۱. توالی آغازگرها

اندازه محصول (جفت باز)	توالی (۵'-۳')	دمای اتصال	نام ژن
۱۶۸	ACCCACTCCTCCACCTTTG	۵۸/۹	F-GAPDH
	CTCTTGTGCTCTTGCTGGG	۵۸/۷	R-GAPDH
۱۵۶	AAGGCCAACCGCGAGAAGAT	۵۳/۳	F- $\beta$ -actin
	TGATGACCTGGCCGTCAGG	۵۹/۱	R- $\beta$ -actin
۱۹۰	GGCAGCACTACTTCTTGACC	۵۸/۵۶	F- NF-KB
	GCCTGCCAATGAGATGTTGT	۵۸/۸۲	R- NF-KB
۱۵۰	TCAAGGAGACTGCAAGATCTG	۵۸/۱۳	F- STAT3
	ACGTACTCCATCGCTGACAA	۵۹/۱۱	R- STAT3

GAPDH: Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase

$\beta$ -actin: Beta-actin

NF-KB: Nuclear factor kappa B

STAT3: Signal transducer and activator of transcription 3

برحسب  $\text{ng}/\mu\text{l}$  و آلودگی‌های پروتئینی، DNA و فنول‌ها با استفاده از دستگاه Nanodrop مورد بررسی قرار گرفت. همچنین کیفیت RNA استخراج شده با ژل آگارز یک و نیم درصد (شرکت سیگما) بررسی شد، پس از تأیید کمیت و کیفیت RNA استخراج شده بوسیله کیت سنتز cDNA (شرکت پارس‌توز) و آنزیم رونوشت‌بردار معکوس، cDNA تک‌رشته‌ای ساخته شد. برای بررسی تغییرات بیان ژن‌های دخیل در التهاب سیستم ایمنی، دو ژن *STAT3* و *NF-KB* با توجه به شبکه ژنی سیستم ایمنی انتخاب شد. همچنین از دو ژن *GAPDH*<sup>۱</sup> و  *$\beta$ -actin*<sup>۲</sup> هم به عنوان ژن رفرنس<sup>۳</sup> و کنترل داخلی مورد استفاده قرار گرفت. پرایمر مختص این ۴ ژن (شرکت پیشگام آلمان) و دمای اتصال<sup>۴</sup> پرایمرها از روش TaqMan PCR با تمپلت cDNA تأیید شد. برای بررسی بیان ژن‌ها از دستگاه StepOne ABI و کیت (شرکت پارس‌توز) حاوی رنگ سایبرگرین در استریپ‌های هشت تایی در حجم واکنش ۲۵ میکرولیتری استفاده شد. طبق پروتوکول، cDNA در غلظت ۱۰۰۰  $\text{ng}/\text{reaction}$ ، پرایمرهای رو به جلو<sup>۵</sup> و معکوس<sup>۶</sup> هر کدام در غلظت ۰/۴  $\mu\text{M}$  و مستر میکس Real Time به مقدار ۱۲/۵  $\mu\text{l}$  به اضافه آب مقطر استریل برای حجم ۲۵ تایی از واکنش استفاده شد.

### ایجاد شیب دمایی توسط PCR

از PCR معمولی برای ایجاد شیب دمایی بین محدوده ۵۸ تا ۶۱ درجه سانتی‌گراد با توجه به نوع پرایمر طراحی شده، استفاده شد. در این روش ابتدا از cDNA به مقدار ۱ تا ۲ میکرولیتر با غلظت ۳۰۰ نانوگرم در میکرولیتر برداشته و با ۱۰ میکرولیتر Taq master mix مخلوط شد. پرایمرهای اختصاصی با غلظت ۰/۲  $\mu\text{M}$  بصورت جداگانه در حجم‌های ۰/۵  $\mu\text{l}$  به این ترکیب اضافه شد. مابقی حجم واکنش با آب مقطر استریل به حجم ۲۰ میکرولیتر رسید. تنظیمات دستگاه ترموسایکلر در هر ردیف در دماهای ۵۸، ۵۹، ۶۰، ۶۱ سانتی‌گراد تنظیم شد. با توجه به طول قطعه سنتز شده که در نرم‌افزار Oligo7 بدست آمده بود، محصول نهایی روی ژل آگارز ۲ درصد برده شد و بوسیله DNA ladder با طول ۱۰۰ bp باند تولید شده شناسایی شد. در دمایی که باند پررنگ‌تری ظاهر شود، پرایمر بخوبی با رشته cDNA اتصال برقرار می‌کند و از این دما برای آزمون Real Time استفاده شد.

### بررسی میزان بیان ژن با روش Real time-PCR

کل RNA از سلول‌های تیمار شده و تیمار نشده با استفاده از کیت RNX-PLUS استخراج شد و میزان غلظت آن‌ها

4. Annealing temperature

5. Forward primer

6. Reverse primer

1. Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase

2. Beta-actin

3. Housekeeping gene

درصد انجام گرفت.

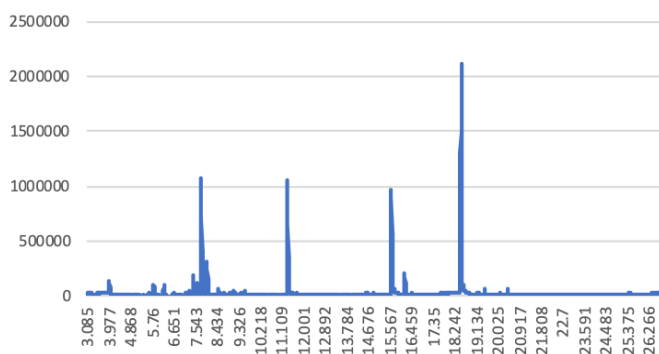
## نتایج و بحث

### نتایج عصاره‌گیری از جوانه فریز درای شده

دو گرم جوانه کلم بروکلی فریز درای شده پس از عصاره‌گیری به دستگاه تزریق شد. نتایج در شکل ۱ و جدول ۲ ارائه شده است.

در این روش مولکول‌های (سولفورافان، نیتریل سولفورافان، بوتن، ۴- ایزوتیوسینواتو، ان‌هیدروکسی ۵- پنتان میدات) بدست آمد. دو مولکول شماره ۳ و ۴، مولکول‌های تخریب شده سولفورافان هستند که در اثر حرارت موجود در دستگاه شکسته شده‌اند و این تاکیدی بر وجود سولفورافان در نمونه مورد آزمایش بود.

پروفایل دمایی در دستگاه شامل واسرشت اولیه ۱۵ دقیقه در ۹۵ درجه سانتی‌گراد، واسرشت ۱۵ ثانیه در ۹۴ درجه سانتی‌گراد و دمای اتصال پرایمر ۳۰ ثانیه در ۶۰ درجه سانتی‌گراد برای همه پرایمرها، گسترش ۳۰ ثانیه در ۷۲ درجه سانتی‌گراد در ۴۰ سیکل اعمال شد. محصول نهایی، منحنی ذوب و مقدار CT پس از پایان ۴۰ سیکل مورد بررسی قرار گرفت. داده‌ها به وسیله میزان بیان *GAPDH* و روش  $\Delta\Delta Ct$  نرمال‌سازی شدند و بیان ژن با استفاده از روش  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ، نرم افزار Rest محاسبه شد (Winer *et al.*, 1999). آنالیزهای آماری با نرم‌افزار LinReg PCR برای بدست آوردن کارایی پرایمرها، نرم‌افزار گراف‌پدپریسم و آنالیز ANOVA و مقایسه میانگین‌ها به روش توکی در سطح معنی‌داری ۵ و ۱



شکل ۱. نمودار GC-MS جوانه فریز درای شده ۴ پیک شارب ایجاد شده نشان دهنده سولفورافان (در زمان ۱۸/۲۴۲ دقیقه) و شکست‌های مولکول سولفورافان در اثر حرارت دستگاه است.

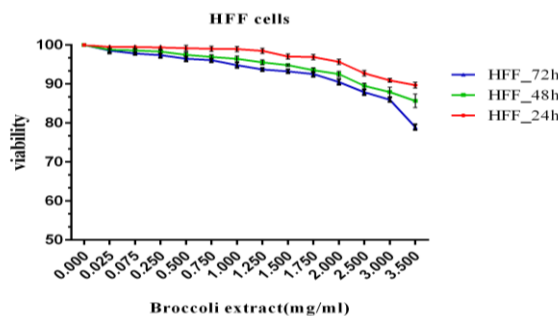
جدول ۲. آنالیز GC-MS جوانه فریزدرای شده و وجود سولفورافان و سولفورافان نیتریل و دو مولکول تخریب‌شده سولفورافان (\*).

PK شماره قله	RT زمان ایجاد قله	Area Pct منطقه قله	Library/ID کتابخانه جی سی مس	Ref منبع	شماره CAS	Qual کیفیت
1	4.00512	0.997712	1,3,5-Triazine	1105	000290-87-9	72
2	5.8283	1.39892	p-Xylene	5030	000106-42-3	95
3	6.2398	1.17455	Benzene, 1,3-dimethyl-	5055	000108-38-3	95
4	7.45717	1.86073	Benzene, 1-ethyl-3-methyl-	9315	000620-14-4	94
5	7.51432	1.58777	Benzene, 1-ethyl-2-methyl-	9314	000611-14-3	86
6	7.63433	2.17435	Dimethyl trisulfide	10826	003658-80-8	83
7	7.80008	13.1286	1-Butene, 4-isothiocyanato-	6852	003386-97-8	78
8	8.04013	3.26553	Benzene, 1,2,3-trimethyl*	9310	000526-73-8	97
9	8.5145	0.753283	Benzene, 1,2,3-trimethyl-	9310	000526-73-8	95
10	11.3664	13.5846	.beta.-D-Glucopyranose, 1-thio-,1-[N-hydroxy-5-(methylthio) pentanimidate]*	165800	077171-29-0	12
11	15.6415	17.003	Sulforaphane nitrile*	21059	061121-66-2	90
12	16.1959	2.45421	4-Methyl-2,5-dimethoxybenzaldehyde	44103	004925-88-6	59
13	18.522	40.6168	Sulforaphane*	42398	004478-93-7	53

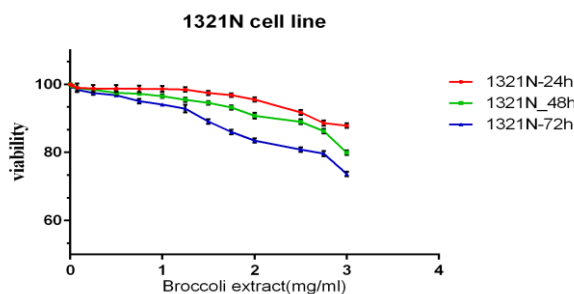
### بررسی نتایج آزمون MTT

باعث از بین رفتن نیمی از سلول‌های نمونه نشد. در نتیجه با نرم‌افزار گراف‌پد نتایج تقریبی مقدار  $IC_{50}$  محاسبه شد. در ادامه پژوهش برای بررسی اثر تیماری عصاره با توجه به نمودارهای MTT که در غلظت‌های ۲ میلی‌گرم تقریباً یک جهش در حرکت نمودار در اثر زنده‌مانی سلول گذاشته و همچنین نمودارهای  $IC_{50}$ ، برای ادامه پژوهش سه غلظت ۱، ۱/۵ و ۲ میلی‌گرم انتخاب شد. بعد از انجام Real Time PCR، آنالیزهای اولیه از جمله زمان بالا آمدن Ct، تفاوت‌های بین سه تکرار از هر نمونه، منحنی‌های ذوب نتایج اولیه مورد بررسی قرار گرفت، که نتایج نشان داد میزان Ct نمونه‌های ژن خانه‌دار از همه ژن‌ها زودتر بالا آمد و از طرفی Ct بالاتر از ۳۴ در بین نمونه وجود نداشت، همچنین Ct تکرارهای مختلف از هر نمونه اختلاف معنی‌داری با هم نداشتند. بررسی اختصاصی بودن محصولات واکنش از طریق منحنی ذوب در نرم افزار دستگاه ABI، با توجه به تک قله‌ای بودن نتایج نشان‌دهنده اختصاصی بودن واکنش می‌باشد.

نتایج تست سمیت‌سنجی بر روی لاین سلولی عصبی N1۱۳۲۱ و سلول نرمال استخراج شده از پوست جنین HFF نشان داد که استفاده از عصاره کلم بروکلی در غلظت‌های مورد استفاده در بازه زمانی ۲۴ الی ۷۲ ساعته میزان سمیت معنی‌داری بر روی سلول‌ها ندارد (شکل‌های ۲ و ۳)، به طوری که تا غلظت‌های ۲ میلی‌گرم درصد زنده‌مانی سلول‌ها تقریباً بالای ۹۰ درصد می‌باشد، همسو با نتایج پژوهش حاضر، در سال ۲۰۱۲ Scott و همکاران نیز در مقاله خود به طور مفصل با جمع‌آوری بیش از ۱۲۰۰ مقاله از ۴ پایگاه داده به بی‌خطر بودن مصرف کلم بروکلی اشاره کرده‌اند Scott *et al.*, (2012). بر این اساس با اطمینان بیشتری می‌توان بر استفاده از عصاره کلم بروکلی به عنوان مکمل غذایی جهت کاهش التهاب سیستم ایمنی، تاکید کرد. همچنین با توجه به اینکه غلظت‌هایی که در این آزمون و با توجه به شرایط تست‌های *in vitro* استفاده شد، هیچکدام



شکل ۲. تیمار لاین سلولی HFF با عصاره کلم بروکلی. محور عمودی درصد زنده بودن سلول‌ها و محور افقی میزان عصاره مورد استفاده در تیمارها.



شکل ۳. تیمار لاین سلولی N1۱۳۲۱ با عصاره کلم بروکلی. محور عمودی درصد زنده بودن سلول‌ها و محور افقی میزان عصاره مورد استفاده در تیمارها.

### آنالیز تغییرات بیان ژن *NF-κB*

نتایج آنالیز تغییرات بیان ژن *NF-κB* در نمونه‌های مورد نظر نشان داد که (زمانی که سلول‌ها تحت القای سیستم ایمنی قرار داشتند تیمار نمونه‌ها با عصاره باعث افزایش بیان ژن *NF-κB* نسبت به زمانی شد که سیستم ایمنی نمونه‌ها تحریک شده بودند ولی تحت تیمار عصاره نبودند و از لحاظ آماری در سطح ۵ درصد اختلاف معنی‌دار نشان داد. در ادامه تیمار سلول‌ها با ۲ میلی‌گرم عصاره کلم بروکلی به مدت سه روز نشان داد که بیان ژن *NF-κB* تقریباً ۱/۵ برابر نسبت به نمونه تحریک شده، سیستم ایمنی بدون تیمار با عصاره کلم بروکلی، کاهش پیدا کرده است (شکل ۴). همچنین از لحاظ آماری اختلاف معنی‌داری را با نمونه کنترل و نمونه تحریک شده سیستم ایمنی طی ۱۴ ساعت نشان داد. در جهت تأیید نتایج مطالعه پیش رو، Song و همکاران (۲۰۰۹) در مطالعه‌ای بیان داشتند که عدم فعال‌سازی ژن *NF-κB* یا به عبارتی کاهش بیان *NF-κB*، باعث کاهش بیان نیتریک‌اکسید سنتتاز (*iNOS*) و سیکلو‌اکسیژن ۲ (*COX-2*) می‌شود (Song et al., 2009). محققان دیگر با تکمیل نظریه Song و همکاران همسو با نتایج پژوهش حاضر، افزودند که نیتریک‌اکسید سنتتاز (یک آنزیم کلیدی در التهاب ماکروفاژ) و سیکلو‌اکسیژن ۲ (آنزیم مسئول التهاب و درد) هر دو آنزیم‌هایی هستند که زمانی که بیش از حد بیان شوند باعث آسیب به بافت می‌شوند (Coussens et al., 2002; Nathan, 2002; Balkwill et al., 2005). مطالعات زیادی مطابق با نتایج به دست آمده در این پژوهش، تأثیر استفاده از گیاهان دارویی بر کاهش اثرات التهاب سیستم ایمنی را نشان می‌دهند. Mohammad و همکاران (۲۰۱۹) نشان دادند که *dhi*، مورینگا اوفیفر، درخت بومی هند، به عنوان گیاه دارویی دارای اثرات قابل توجه محافظتی از نوروں می‌باشد و این نقش از طریق بیوشیمیایی با تعدیل قابل توجه استرس اکسیداتیو ناشی از کبالت مشهود بود. این پیشرفت‌های

بیوشیمیایی علاوه بر ترمیم ساختار سلولی مغز با تنظیم موفقیت‌آمیز بیان mRNA از *HIF-1α* و *EPO* (Mohamed et al., 2019). در تحقیق دیگری به جهت تأثیر و استفاده از عصاره گیاهی در کاهش التهاب ناشی از بیان بیش از حد ژن *NF-κB*، Hsuan و همکاران (۲۰۱۵) به این نتیجه رسیدند که عصاره اتانول گیاه *Glossogyne tenuifolia* دارای فعالیت‌های ضد التهابی و آنتی‌اکسیدانی قوی است، GTE و اجزای زیست‌فعال آن در جلوگیری از چسبندگی مونوسیت‌ها، که به نوبه خود از طریق مسدود کردن فعال‌سازی و واسطه انتقال هسته *NF-κB* است، مؤثر بودند. عصاره *Glossogyne tenuifolia* از طریق مسدود کردن مسیر سیگنالینگ ژن *NF-κB* مانع بیان مولکول‌های چسبندگی ناشی از *TNF-α* در سلول‌های اندوتلیال و ورید ناف انسانی می‌شود. التهاب مزمن زمانی که توسط سایتوکاین پیش التهاب مولکول‌های اندوتلیال و مونوسیت‌ها ایجاد شود، از دلایل مهم در ایجاد تصلب شرایین است. نتایج فعلی پتانسیل درمانی GTE در تصلب شرایین را نشان می‌دهد (Hsuan et al., 2015). محققان دیگری همچون Chiu و همکاران (۲۰۱۵) نیز در تأیید این نتایج این پژوهش نشان دادند که عصاره برگ *Hibiscus sabdariffa* از طریق کاهش تنظیم مسیر *MMP-9 / NF-κB / Akt* از تهاجم سلول‌های سرطانی پروستات در انسان جلوگیری می‌کند. این یافته‌ها نشان می‌دهد که مهار بیان ژن *MMP-9* توسط این عصاره، ممکن است از طریق سرکوب مسیر سیگنالینگ *Akt / NF-κB* عمل کند، که به نوبه خود منجر به کاهش تهاجم سلول‌های سرطانی می‌شود (Chiu et al., 2015). همچنین در شرق آسیا از *Buddleja officinalis* به طور سنتی در درمان حمایتی بیماری‌های التهابی و عصبی استفاده می‌شود. به‌طور خلاصه، مطالعه گروهی از محققان نشان داد که این گیاه با تأثیر بر مسیرهای انتقال سیگنال داخل سلولی در سلول‌های میکروگلیایی *BV-2*، مانند



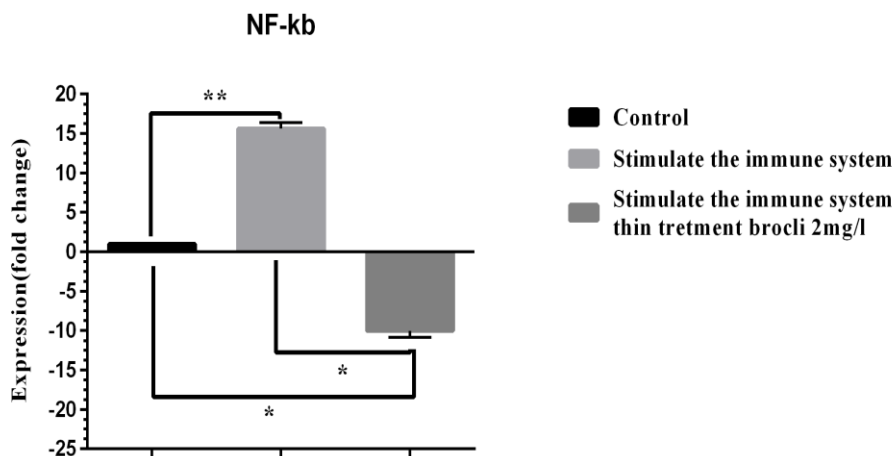
نسبت به نمونه تحریک شده سیستم ایمنی و نمونه کنترل، کاهش معنی داری داشت. به طوری که میزان بیان حدود ۶ برابر کاهش داشت (شکل ۴). همچنین مقایسه بیان ژن *STAT3* بین نمونه‌ای که فقط با عصاره به مدت سه روز تیمار گردیده بود و نمونه کنترل کاهش معنی داری از لحاظ آماری نشان داد ( $P < 0.01$ ) (شکل ۴).

در راستای تحقیق حاضر، Hahm و همکاران (۲۰۱۰) ثابت کردند که فعال شدن بیش از حد فاکتور رونویسی *STAT3* عامل بسیاری از بدخیمی‌های انسانی، از جمله سرطان پروستات است (Hahm et al., 2010). محققان دیگری نیز در تأیید همین موضوع بیان داشتند که افزایش فعالیت *STAT3* باعث، افزایش اینترلوکین ۶ در مغز و در نتیجه باعث بروز مشکلاتی در بدن می‌شوند (Garbett et al., 2008; 2005; Parker et al., 2009; Vargas et al., 2011; Smith et al., 2007; Goines et al., 2011). مطالعات اخیر پتانسیل درمانی داروهای گیاهی سنتی دیگر را نیز مورد بررسی مجدد قرار داده‌اند که با نتایج تحقیق حاضر مطابقت نشان می‌دهد (Wang et al., 2014; Qi et al., 2010).

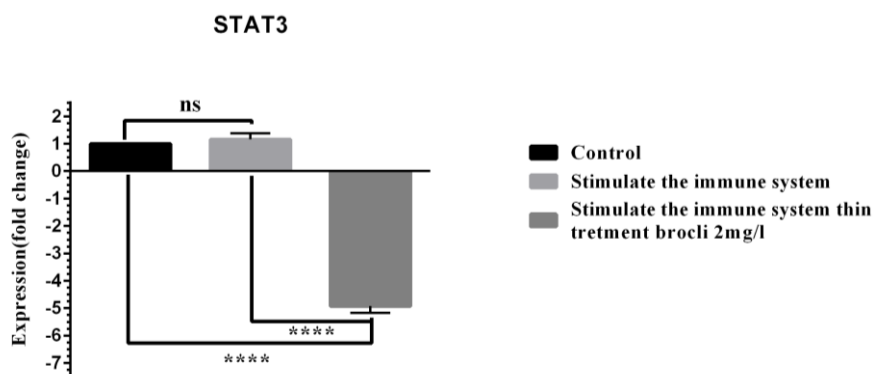
فاکتور رونویسی *NF-kB* بر سنتز و آزادسازی *iNOS* و *NO* عوامل پیش‌التهابی از جمله *IL-6* و *IL-1β* تأثیر می‌گذارد. این یافته‌ها نشان می‌دهد که مطالعات بیشتر در مورد *Buddleja officinalis* به یک استراتژی درمانی بالقوه برای درمان بیماری‌های عصبی که در آن میکروگلیاهای التهاب تحریک شده به تخریب عصب کمک می‌کنند، منجر می‌شود (Oh et al., 2013). تحقیقات Fathy و همکاران (۲۰۱۶) نشان داد که عصاره *Origanum majorana* از طریق سرکوب فعالیت *NF-kB*، می‌تواند از تکثیر HCC جلوگیری کند. سرطان هپاتوسلولار (HCC) یکی از فراوان‌ترین انواع سرطان است که شیوع بالایی دارد و علت اصلی مرگ و میر ناشی از سرطان در سراسر جهان است (Fathy et al., 2016).

#### آنالیز نتایج بیان ژن *STAT3*

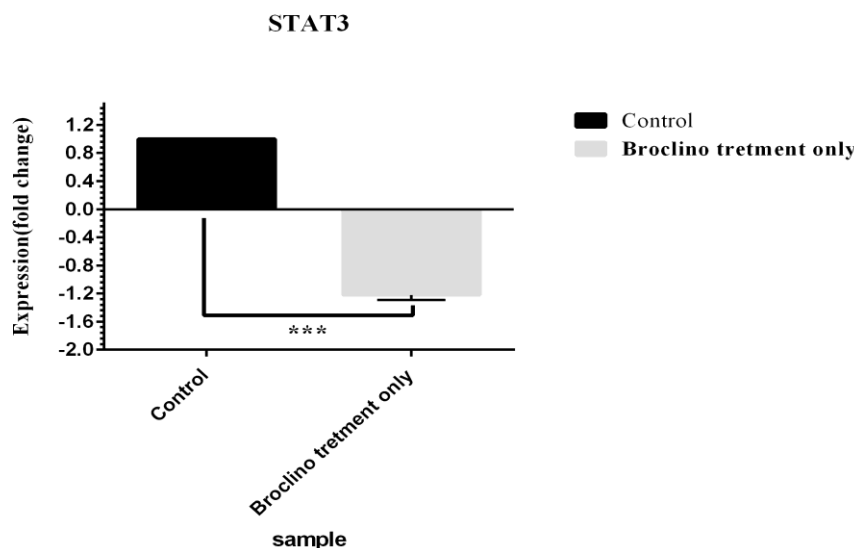
آنالیز نتایج بیان ژن *STAT3* نشان داد که با تحریک سیستم ایمنی سلول‌ها، میزان بیان این ژن تا حدودی افزایش پیدا می‌کند (شکل ۵). در ادامه تیمار سلول‌های تحریک شده سیستم ایمنی با ۲ میلی‌گرم از عصاره به مدت ۳ روز نشان داد که بیان ژن *STAT3*



شکل ۴. ابتدا تحریک سیستم ایمنی با ایونومیسین و سپس تیمار با عصاره کلم بروکلی. ستون سلول تحریک شده سیستم ایمنی که نشانگر افزایش معنی دار بیان *NF-kB* است، ستون سلول تحریک شده سیستم ایمنی و تیمار شده با عصاره بروکلی که نشانگر کاهش معنی دار بیان *NF-kB* پس از تیمار با عصاره می‌باشد.



شکل ۵. تحریک سیستم ایمنی و تأثیر عصاره کلم بروکلی. نمونه کنترل بدون هیچ تیماری، نمونه سلول تحریک شده سیستم ایمنی است که افزایش بیان ژن *STAT3* را به طور جزئی نشان می‌دهد، نمودار آخر، زمانی که نمونه تحریک شده سیستم ایمنی تحت تیمار با عصاره قرار گرفت ۶ برابر کاهش بیان نسبت به زمان تحریک سیستم ایمنی و افزایش بیان *STAT3* را نشان داد. (\*\*\*\* $P < .0001$  و ns: non-significant).



شکل ۶. نمونه کنترل بدون هیچ تیماری و کاهش معنی‌دار بیان ژن *STAT3* فقط با تیمار عصاره کلم بروکلی

سنتی بومی کشور کره و ترکیب مشتق شده از آن، *Cucurbitacin D*، از طریق سرکوب فعالیت *STAT3* باعث آپوپتوز شده و می‌تواند عوامل درمانی قوی برای سرطان پستان باشند و از تکثیر سلول‌های توموری جلوگیری کنند (Kim et al., 2013).

#### نتیجه‌گیری

ژن *NF-KB* که یکی از ژن‌های مهم برای بیان برخی از ژن‌های التهاب‌زا می‌باشد، زمانی که سیستم ایمنی سلول در اثر تحریک مصنوعی دچار فعالیت زیادی شد، میزان بیان این ژن بالا رفت که این امر مسبب

برای مثال *Hedyotis diffusa Willd* یک داروی گیاهی سنتی چینی است که فعالیت‌های ضد سرطانی را نشان می‌دهد (Lin et al., 2012; Cai et al., 2012; Fiandalo et al., 2012). استفاده از داروی گیاهی *Hedyotis diffusa Willd* به صورت وابسته به دوز به طور قابل توجهی باعث کاهش بیان ژن *STAT3* و مهار پروتئین‌های ناشی از *IL-6* می‌شود این داده‌ها نشان می‌دهد که این گیاه یک ماده درمانی مفید برای سرطان کولن است (Lin et al., 2015). نتایج Kim و همکاران (۲۰۱۳) نشان می‌دهد که *Trichosanthes kirilowii tuber*، یک داروی

بیماری‌های اعصاب و روان است، پس می‌توان نتیجه گرفت که کاهش بیان *STAT3* با عصاره بروکلی می‌تواند به کاهش علائم این گروه از بیماران کمک کند. در مجموع این نتایج می‌تواند زمینه‌ساز تحقیقات گستره‌تری در خصوص تأثیر سولفورافان موجود در عصاره کلم بروکلی بر سایر ژن‌های مهم در مسیر التهاب سیستم ایمنی و در نهایت طراحی دارو با در نظر گرفتن تأثیرات مفید و احیاناً عدم تأثیر بر برخی از عوامل ایجاد بیماری‌های التهابی سیستم ایمنی بر پایه گیاه کلم بروکلی باشد.

### سپاسگزاری

این مقاله بخشی از پایان‌نامه کارشناسی ارشد دانشگاه پیام نور می‌باشد. با سپاس فراوان از آقای دکتر شاهسوارانی مسئول آزمایشگاه طب بازساختی و نوآوری‌های پزشکی و جناب آقای مهندس سعدی حسینی، از انستیتو پاستور ایران که بدون مساعدت این همکاران محترم، این پژوهش به نتیجه مطلوب نمی‌رسید.

### REFERENCES

- Auditeau E, Chassagne F, Bourdy G, Bounlu M, Jost J, Luna J, Boumediene F (2019) Herbal medicine for epilepsy seizures in Asia, Africa and Latin America: A systematic review *Journal of ethnopharmacology* 234: 119-153.
- Balkwill F, Charles KA, Mantovani A (2005) Smoldering and polarized inflammation in the initiation and promotion of malignant disease. 211–217.
- Cai Q, Lin J, Wei L, Zhang L, Wang L, Zhan Y, Peng J, (2012) *Hedyotis diffusa* Willd inhibits colorectal cancer growth *in vivo* via inhibition of *STAT3* signaling pathway. *International Journal of Molecular Sciences* 13(5): 6117-6128.
- Coussens LM, Werb Z (2002) Inflammation and cancer. *Nature*. 860–867.
- Chiu CT, Chen JH, Chou FP, Lin HH (2015) *Hibiscus sabdariffa* leaf extract inhibits human prostate cancer cell invasion via down-regulation of Akt/NF- $\kappa$ B/MMP-9 pathway. *Nutrients* 7(7): 5065-5087.
- Fahey J, W Zhang Y, Talalay P (1997) *Broccoli sprouts*: an exceptionally rich source of inducers of enzymes that protect against chemical carcinogens. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 94(19): 10367-10372.
- Fathy SA, Emam MA, Agwa SA, Zahra FA, Youssef FS, Sami RM (2016) The antiproliferative effect of *Origanum majorana* on human hepatocarcinoma cell line: suppression of NF-

ایجاد التهاب در مغز است. اما زمانی که تحت تیمار با عصاره کلم بروکلی قرار گرفت، به طرز معنی‌داری بیان ژن توسط سولفورافان کاهش پیدا کرد. که این امر به نوبه خود از بروز بسیاری از التهابات ایجادشده در مغز به واسطه اختلالات سیستم ایمنی، جلوگیری می‌کند. نتایج پژوهش حاضر و با در نظر گرفتن نظرات و تحقیقات سایر محققان بیان می‌دارد که سولفورافان موجود در عصاره کلم بروکلی می‌تواند در کاهش التهاب که یکی از دلایل مهم در ایجاد بسیاری از بیماری‌های التهابی مزمن است، نقش مؤثری داشته باشد. ژن *STAT3* یکی دیگر از واسطه‌های ایجاد التهاب است و مانند *NF- $\kappa$ B* در زمان تحریک سیستم ایمنی دچار افزایش بیان و در نتیجه ایجاد مشکل در مغز شد. در پژوهش حاضر مشخص شد که این ژن نیز در اثر تیمار با سولفورافان موجود در عصاره کلم بروکلی، دچار کاهش بیان شد. در نتیجه برخی دیگر از مسیرهای ایجاد التهاب در مغز نیز مسدود شد. بر این اساس با در نظر گرفتن تحقیقات همسو و این موضوع که اینترلوکین ۶ یکی از مارکرهای اصلی در

- kB. Cellular and Molecular Biology. 62(10): 80-84.
- Fiandalo MV, Kyprianou N (2012) Caspase control: protagonists of cancer cell apoptosis. *Experimental Oncology*. 34(3): 165.
- Garbett K, Ebert PJ, Mitchell A, Lintas C, Manzi B, Mirnics K, Persico AM (2008) Immune transcriptome alterations in the temporal cortex of subjects with autism. *Neurobiology of Disease*. 30(3): 303-311.
- Gilliland G, Perrin S, Bunn HF (1990) Competitive PCR for quantitation of mRNA. *PCR protocols: A guide to methods and applications*. 60-69.
- Giovannoni SJ, Britschgi TB, Moyer CL, Field KG (1990) Genetic diversity in Sargasso Sea bacterioplankton. *Nature*. 345(6270): 60-63.
- Goines PE, Croen LA, Braunschweig D, Yoshida CK, Grether J, Hansen R, Kharrazi M, Ashwood P, Van de Water J (2011) Increased midgestational IFN- $\gamma$ , IL-4 and IL-5 in women bearing a child with autism: a case-control study. *Mol. Autism*. 2:13.
- Hahn ER, Singh SV (2010) Sulforaphane inhibits constitutive and Interleukin-6-induced activation of Signal Transducer and Activator of Transcription 3 in prostate cancer cells. *Cancer Prevention Research*. 3(4): 484-494.
- Higdon JV, Delage B, Williams DE, Dashwood RH (2007) Cruciferous vegetables and human cancer risk: epidemiologic evidence and mechanistic basis. *Pharmacol Res*. 55(3): 224-236
- Hsuan CF, Hsu HF, Tseng WK, Lee TL, Wei YF, Hsu KL, Hwang JY (2015) *Glossogyne tenuifolia* extract inhibits TNF- $\alpha$ -induced expression of adhesion molecules in human umbilical vein endothelial cells via blocking the NF- $\kappa$ B signaling pathway. *Molecules* 20(9): 16908-16923.
- Kane A, Deenick EK, Ma CS, Cook MC, Uzel G, Tangye SG (2014) STAT3 is a central regulator of lymphocyte differentiation and function. *Curr. Opin. Immunol*. 28:49-57.
- Kumar A, Takada Y, Boriek AM, Aggarwal BB (2004) Nuclear factor- $\kappa$ B: its role in health and disease. *J. Mol. Med*. 434-448
- Kim SR, Seo HS, Choi HS, Cho SG, Kim YK, Hong EH, Ko SG, (2013) *Trichosanthes kirilowii* ethanol extract and cucurbitacin D inhibit cell growth and induce apoptosis through inhibition of STAT3 activity in breast cancer cells. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2013.
- Lin M, Lin J, Wei L, Xu W, Hong Z, Cai Q, Zhu D (2012) *Hedyotis diffusa* Willd extract inhibits HT-29 cell proliferation via cell cycle arrest. *Experimental and Therapeutic Medicine*. 4(2): 307-310.
- Lin J, Li Q, Chen H, Lin H, Lai Z, Peng J, (2015) *Hedyotis diffusa* Willd. extract suppresses proliferation and induces apoptosis via IL-6-inducible STAT3 pathway inactivation in human colorectal cancer cells. *Oncology Letters*. 9(4): 1962-1970.
- Liu W, Ge T, Pan Z, Leng Y, Lv J, Li B (2017) The effects of herbal medicine on epilepsy. *Oncotarget*. 8(29): 48385.
- Mallik BK, Panda T, Padhy RN (2012) Traditional herbal practices by the ethnic people of Kalahandi district of Odisha, India. *Asian Pac. J. Trop. Biomed*. 2, S988-S994.
- Mohamed AAR, Metwally MM, Khalil SR, Salem GA, Ali HA (2019) *Moringa oleifera* extract attenuates the CoCl<sub>2</sub> induced hypoxia of rat's brain: expression pattern of HIF-1 $\alpha$ , NF- $\kappa$ B, MAO and EPO. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 109: 1688-1697.
- Nathan C (2002) Points of control in inflammation. *Nature*. 846-852.
- Newcombe EA, Camats-Perna J, Silva ML, Valmas N, Huat TJ, Medeiros R.

- (2018) Inflammation: the link between comorbidities, genetics, and Alzheimer's disease. *Journal of neuroinflammation*. 15(1): 1-26.
- Oh WJ, Jung U, Eom HS, Shin HJ, Park HR, (2013) Inhibition of lipopolysaccharide-induced proinflammatory responses by *Buddleja officinalis* extract in BV-2 microglial cells via negative regulation of NF- $\kappa$ B and ERK1/2 signaling. *Molecules*. 18(8): 9195-9206.
- Palak, Soni K, Thakur A, Kohli K (2016) Broccoli: An Insight into Formulation and Patentability Aspects. *Drug Des*. 5:139.
- Parker-Athill E, Luo D, Bailey A, Giunta B, Tian J, Shytle RD, Tan J, (2009) Flavonoids, a prenatal prophylaxis via targeting JAK2/STAT3 signaling to oppose IL-6/MIA associated autism. *Journal of neuroimmunology*. 217(1-2): 20-27.
- Qi F, Li A, Inagaki Y, Gao J, Li J, Kokudo N, Tang W (2010) Chinese herbal medicines as adjuvant treatment during chemo or radio-therapy for cancer. *Bioscience trends*. 4(6).
- Sahranavard S, Ghafari S, Mosaddegh M (2014) Medicinal plants used in Iranian traditional medicine to treat epilepsy. *Seizure*. 23(5): 328-332.
- Sammani A, Shammaa E, Chehna F, Rahmo A (2014) The *In-Vitro* toxic effect of the Glyco alkaloids for Some Solanum Species Against The LIM-1863Cell Line. *Pharmacognosy Journal*. 6(4). 23-31
- Scott O, Galicia-Connolly E, Adams D, Surette S, Vohra S, Yager J Y, (2012) The safety of cruciferous plants in humans: a systematic review. *Bio.Med. Research International*, 2012.
- Singh K (2014). Sulforaphane treatment of autism spectrum disorder (ASD). *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 111: 15550-15555.
- Smith SE, Li J, Garbett K, Mirnics K, Patterson PH (2007) Maternal immune activation alters fetal brain development through interleukin-6. *J. Neurosci* 27:10695–10702.
- Song, Mi-Young (2009) Sulforaphane protects against cytokine-and streptozotocin-induced  $\beta$ -cell damage by suppressing the NF- $\kappa$ B pathway. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 57-67.
- Sharma J, Gairola S, Gaur R.D, Painuli R.M, Siddiqi TO (2013) Ethno medicinal plants used for treating epilepsy by indigenous communities of sub-Himalayan region of Uttarakhand, India. *J. Ethnopharmacol*.150:353–370.
- Sharma UK, Pegu S, Hazarika D, Das A, (2012) Medico-religious plants used by the Hajong community of Assam, India. *J.Ethnopharmacol*. 143:787–800.
- Tsoi M, Jansen AGM, Bass J, Chiang WC, Seck M, Tsoi V, Wyder P (1998) Excitation of a magnetic multilayer by an electric current. *Physical Review Letters*, 80(19): 4281.
- Vargas DL, Nascimbene C, Krishnan C, Zimmerman AW, Pardo CA, (2005) Neuroglial activation and neuroinflammation in the brain of patients with autism. *Annals of Neurology: Official Journal of the American Neurological Association and the Child Neurology Society*. 57(1): 67-81.
- Wang SW, Sun YM (2014) The IL-6/JAK/STAT3 pathway: potential therapeutic strategies in treating colorectal cancer. *International Journal of Oncology*. 44(4): 1032-1040.
- Winer J, Jung CKS, Shackel I, Williams PM (1999) Development and validation of real-time quantitative reverse transcriptase–polymerase chain reaction for monitoring gene expression in cardiac myocytes *in vitro*. *Analytical biochemistry*.270(1): 41-49.
- Zhang Y, Cho C, Pooner GH, Talalay P (1992) A major inducer of

anticarcinogenic protective enzymes from broccoli isolation and elucidation of structure. Proc. Natl. Acad. 2399-2403.  
Zhang Y, Kensler TW, Cho CG, Posner GR, Talalay P (1994) Anticarcinogenic

activities of sulforaphane and structurally related synthetic norbornyl isothiocyanates. Proceedings of the National Academy of Sciences, 91(8), 3147-3150.