(DOI): 10.22034/AEJ.2020.131594

مقاله پژوهشی

تاثیر عصاره میکروجلبک *Chlorella vulgaris* در مقایسه با ویتامین C بر بیان ژن‌های کلاژن I و MMP-1 در سلول‌های فیبروبلاست پوست انسان

- **سودابه عبدالباقیان:** گروه زیست‌شناسی دریا، دانشکده منابع طبیعی و محیط‌زیست، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران
- **شهلا جمیلی *:** موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تهران، ایران
- **آزاده منائی:** مرکز تحقیقات گیاهان دارویی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران
- **علی ماشینچیان مرادی:** گروه زیست‌شناسی دریا، دانشکده منابع طبیعی و محیط‌زیست، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

تاریخ دریافت: آبان ۱۳۹۸ تاریخ پذیرش: بهمن ۱۳۹۸

چکیده

پوست به‌عنوان یکی از اندام‌های بدن، نقش مهمی در بسیاری از عملکردهای فیزیکی دارد. در فرآیند پیری پوست باید از تجزیه کلاژن و افزایش آنزیم‌های چندگانه شامل ماتریکس متالوپروتئینازها (MMPS) جلوگیری شود. جلبک *Chlorella vulgaris* یک جلبک دریایی می‌باشد و اثرات مفیدش بر پوست، آن را به یک ماده مناسب برای استفاده در محصولات ضد پیری تبدیل کرده است. در این تحقیق، تاثیرعصاره جلبک *C. vulgaris* و ویتامین C در تولید کلاژن نوع I و MMP-1 در سلول‌های فیبروبلاست پوست(Hu02) بررسی شد. عصاره‌گیری ازجلبک به‌روش ترکیبی اولتراسونیک و هیدرولیز آنزیمی انجام و عصاره حاصل در غلظت‌های مختلف برای تاثیر آن بر بیان ژن کلاژن‌های نوع I و MMP-1 بر سلول‌های Hu02 اثر داده شد. در ابتدا اثر سمیت سلولی آن آزمایش و با تست MTT مشخص شد که عصاره فاقد اثر سمی برای سلول‌های Hu02 است. هم‌چنین با استفاده از qPCR تایید شد که عصاره باعث افزایش بیان ژن کلاژن نوع I و کاهش بیان ژن MMP-1 در مقایسه با گروه شاهد می‌شود. عصاره جلبک و ویتامین C با viability یکسان (۹۷٪) برای بررسی تاثیر عصاره بر بیان ژن‌های مربوطه در مقایسه با ویتامین C استفاده شد. بیان ژن کلاژن نوع I در هر دو گروه جلبک و ویتامین C افزایش یافت. هم‌چنین بیان ژن MMP-1 در هر دو گروه عصاره جلبک ویتامین C به‌طور معنی‌دار کم‌تر از گروه شاهد بود ($p<0/05$). این یافته‌ها نشان داد که عصاره جلبک *C. vulgaris* باعث تحریک سنتز کلاژن و مهار آنزیم MMP-1 در سلول‌های Hu02 می‌شود.

کلمات کلیدی: عصاره کلرلا، ویتامین C، کلاژن، ماتریکس متالوپروتئیناز، سلول‌های فیبروبلاست

* پست الکترونیکی نویسنده مسئول: shahlajamili45@yahoo.com

(DOI): 10.22034/AEJ.2020.131594

مقدمه

میکروجلبک‌ها،میکروارگانیسم‌های فتوسنتزکننده‌ای هستند که انرژی‌نورانی،آب ودی‌اکسیدکربن رابه‌زیست توده‌جلبک تبدیل می‌کنند (Dejoye وهمکاران، ۲۰۱۱) وبسیارمتنوع می‌باشند. جلبک *Chlorella vulgaris* یک جلبک سبز تک‌سلولی، یوکاریوت وساکن آب‌شیرین است که توسط Martinus Willem Beijerinek در سال ۱۸۹۰ به‌عنوان اولین میکروجلبک با هسته مشخص کشف شد. دانشمندان آلمانی در ابتدای سال ۱۹۹۰ متوجه محتوای بالای پروتئین در این جلبک شده و آن را به‌عنوان یک منبع غذایی جدید معرفی کردند. به‌علت خواص دارویی این میکروجلبک کشور ژاپن از بزرگ‌ترین مصرف‌کنندگان آن می‌باشد (Safi و همکاران، ۲۰۱۴) و به‌عنوان مکمل غذایی، افزودنی‌وامولسیون غذایی به‌شکل کپسول، قرص، پودر و عصاره عرضه شده‌وبرای درمان‌های پزشکی استفاده می‌شود (Fermandes و همکاران، ۲۰۱۲). این میکرو جلبک یک اثر محافظتی برسلول‌های فیبروبلاست پوست‌داشته و باعث کاهش فاکتورهای موثر در پیری از طریق‌افزایش‌و تولید کلاژن در سلول‌های فیبروبلاست پوست می‌شود (Saberbaghi و همکاران، ۲۰۱۳). بنابراین از این جلبک و مواد فعال زیستی موجود در آن می‌توان به عنوان‌فاکتوری‌برای ترمیم‌وجوان‌سازی پوست استفاده کرد. در سال‌های اخیر توجه زیادی به‌سلامت و زیبایی پوست شده است. پوست، بدن را از عوامل بیرونی به‌عنوان یک سد محافظت کرده و نقش مهمی در زیبایی دارد. پیری پوست یک فرآیند طبیعی است که به‌تغییرات در اجزای‌ماتریکس‌خارج‌سلولی (ECM) مانند کلاژن مربوط می‌شود (Duan و Zhang، ۲۰۱۸)، بنابراین حفظ سطوح کلاژن در درمیس برای حفظ سلامتی پوست مهم است. کلاژن در ماتریکس خارج سلولی توسط فیبروبلاست‌های درمی ساخته می‌شود. از بین انواع مختلف کلاژن، کلاژن نوع I در پوست بسیار مهم بوده (Yoon و همکاران، ۲۰۱۲) و از فراوان‌ترین پروتئین‌ها در بافت همبند پوست می‌باشد که ۸۵٪ کل کلاژن را تشکیل داده و به‌پوست خاصیت ارتجاعی، کشش و انعطاف پذیری می‌دهد (Chen و همکاران، ۲۰۱۱). در طول فرآیند پیری مقدار برخی از آنزیم‌ها مانند ماتریکس متالوپروتئینازها (MMPs) افزایش یافته و سطوح اجزای ماتریکس خارج‌سلولی از جمله کلاژن کاهش می‌یابد که باعث کاهش خاصیت ارتجاعی پوست می‌شود. برخی از منابع دریایی ازجمله جلبک‌های دریایی سنتز کلاژن را افزایش داده و برای‌مبارزه با پیری‌پوست به‌عنوان یک‌ماده‌طبیعی استفاده می‌شوند. ویتامین C (اسیدآسکوربیک)و مشتقات آن نیز در سنتز کلاژن، تقویت بافت پوست و زیبایی نقش مهمی دارند. ویتامین C به‌عنوان یک ویتامین محلول در آب به‌طور گسترده‌ای به شکل محلول در آب یا سایر مشتقات مانند سدیم‌آسکوربات و آسکوربیل‌پالمیتات در محصولات آرایشی و زیبایی به‌عنوان یک ماده ضدپیری درنظر گرفته می‌شود (Tournas و همکاران، ۲۰۰۶؛ Darr و همکاران، ۱۹۹۶). نظر به‌این‌که گزارشی‌مبنی بر تاثیر عصاره میکروجلبک *C. vulgaris* بر بیان ژن‌های کلاژن نوع I و MMP-1 موجود نیست، بنابراین پژوهش حاضر با هدف بررسی اثرات‌عصاره میکروجلبک ذکر شده در مقایسه با ویتامین C بر بیان ژن‌کلاژن و MMP-1 در سلول‌های فیبروبلاست پوست انجام شد.

مواد و روش‌ها

تهیه‌عصاره‌جلبک‌به‌روش‌ترکیبی‌اولتراسونیک‌و‌هیدرولیز آنزیمی:

۴ گرم پودر خشک شده جلبک (شرکت ریزجلبکی پارسیان) به ۱۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر اضافه شد و به‌مدت ۳۰ دقیقه در دستگاه اولتراسونیک (Elmasonic S 40 H) در معرض امواج فراصوتی قرار گرفت. سپس ۲ میلی‌لیتر از آنزیم پروتئاز همراه با ۲ میلی‌لیتر آنزیم B-(1-3)-D-Glucanase به‌آن اضافه و عمل هیدرولیز آنزیمی در ۵۰ درجه سانتی گراد به‌مدت ۳ ساعت انجام شد. عصاره به‌مدت ۳۰ دقیقه با دور ۱۰۰۰۰×rpm به‌منظور جمع‌آوری سطح رویی، سانتریفیوژ و سطح رویی (supernatant) لیوفیلیزه شد (Wang و همکاران، ۲۰۱۵).

کشت سلول: مراحل انجام کار در بخش‌های مربوط به‌سلول (تست MTT، کشت سلول و Real-Time PCR) در بانک‌سلولی‌مرکز ملی ذخایر ژنتیکی و زیستی ایران انجام شد. سلول‌های Hu02 (مرکز ملی‌ذخایر ژنتیکی‌وزیستی‌ایران) درمحیط DMEM(Sigma-Aldrich, USA) همراه با ۱۰٪ سرم جنین گاوی (FBS: Sigma-Aldrich, USA)، ۲ میلی‌مولارگلوتامین و ۱۰۰ واحد بر میلی‌لیتر پنی‌سیلین در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و ۵٪ CO_2 انکوبه شدند. پس از رسیدن تراکم سلولی به ۸۰-۷۰٪ سلول‌ها مورد استفاده قرار گرفتند (Chen و همکاران، ۲۰۱۱).

تست MTT: سلول‌ها با چگالی 10^4 cells/well درون‌هر چاهک ظرف ۹۶ خانه‌ای کاشته شدند و توسط عصاره جلبک با غلظت‌های ۲۰۰، ۴۰۰ و ۸۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر(هر غلظت با سه تکرار)، ویتامین C با غلظت‌های ۰/۵۴، ۰/۲۸ و ۰/۱۴ میلی‌مولار (هر غلظت سه تکرار) کنترل مثبت با ۱۰٪ DMSO و کنترل منفی بدون هیچ ماده‌ای به‌مدت ۲۴ ساعت تیمار شدند. از دلایل انتخاب غلظت‌های مورد نظر، بیش‌ترین و کم‌ترین درصد رشد و زنده‌مانی سلول‌ها در این غلظت‌ها بود. سپس سلول‌ها با ۱۰ میکرولیتر از معرف MTT به‌مدت ۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. سپس حضور رسوبات ارغوانی رنگ بامیکروسکوپ مورد بررسی قرار گرفت و محتویات خانه‌ها تخلیه و ۱۰۰ میکرولیترمحلول DMSO به‌عنوان حلال بلورهای فورمازون (محصول حاصل از متابولیزه شدن MTT) به‌هر چاهک ریخته شد. جذب خانه‌ها درطول موج ۵۹۰ نانومتر توسط دستگاه

(DOI): 10.22034/AEJ.2020.131594

میکروپلیت ریدر (Elx808, BioTek) اندازه‌گیری شد.زنده‌مانی سلول‌ها (viability) با نسبت جذب سلول‌های تیمارشده به جذب سلول‌های تیمار نشده محاسبه گشت (Wachesk و همکاران، ۲۰۱۳).

تیمار سلول‌های فیبروبلاست پوست با عصاره و ویتامین C: سلول‌ها به‌مدت ۲۴ ساعت با غلظت‌های مختلف عصاره جلبک (۲۰۰، ۴۰۰ و ۸۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) انکوبه شدند.جهت بررسی تاثیر عصاره‌جلبک‌در مقایسه با ویتامین C در تولید کلاژن‌و MMP-1، سلول‌ها با ویتامین‌C با غلظت ۰/۱۴ میلی‌مولار (۹۷٪ viability) و عصاره با غلظت ۴۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر (۹۷٪ viability) تیمار شدند (Kim و همکاران، ۲۰۱۶).

واکنش Real-Time PCR: جداسازی RNA از سلول‌ها با معرف TRIzol (Sigma-Aldrich, USA) انجام و به‌عنوان الگو برای سنتز cDNA با استفاده از پرایمر oligo(dT) (Takara Bio Inc, Japan) استفاده شد. برای بررسی بیان ژن‌ها، واکنش PCR در حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر متشکل از ۱۰ میکرولیتر از مسترمیکس کیت، ۲ میکرولیتر محلول cDNA، ۰/۸ میکرولیتر پرایمرهای پیش‌رو و پس‌رو و ۶/۴ میکرولیتر آب انجام شد. آماده‌سازی مخلوط واکنش PCR به روی یخ انجام و نمونه‌ها در دستگاه ABI مدل Step one قرار داده شد. برنامه استفاده شده برای انجام qPCR به‌صورت دناتوراسیون اولیه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۳۰ ثانیه، ۴۰ چرخه تکثیری متشکل از ۵ ثانیه دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد، آنیلینگ در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۱۵ ثانیه و طویل‌سازی (elongation) در ۷۲ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۱۵ ثانیه انتخاب شد (دو بار تکرار ریل تایم برای هر نمونه). در هر بار انجام فرایند PCR، برای هر جفت پرایمر یک نمونه فاقد cDNA درون دستگاه قرار داده شد تا از عملکرد صحیح واکنش اطمینان حاصل شود (Kim و همکاران، ۲۰۱۶). توالی پرایمرهای مورد بررسی در جدول ۱ نشان داده شده است.

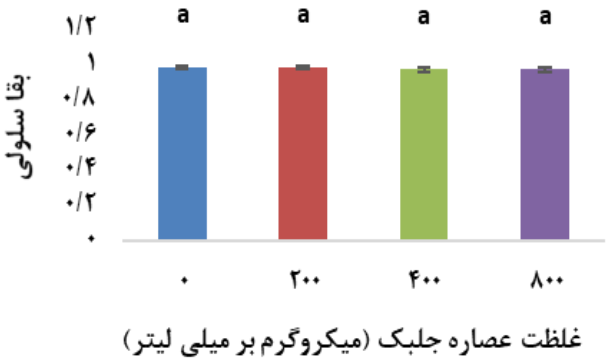
جدول۱: توالی پرایمرهای مورد بررسی در Real-Time PCR (۵'→۳')

Gene	forward primer	reverse primer
Type I collagen	CTCCCCAGCCACAAAGAGTC	CCGTTCTGTACGCAGGCAGGTGAT
MMP-1	TGGTGTCTCACAGCTTCCCA	TCTCCGCTTTTCAACTTGCCT
GAPDH	CATGAGAAGTATGACAACAGCCT	AGTCCTTCCACGATACCAAAGT

آنالیز آماری ANOVA و تست LSD با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۲ انجام و مقدار $p<۰/۰۵$ به‌عنوان تفاوت آماری‌معنی‌دار درنظر گرفته شد (سطح معنی‌دار ۹۵٪ درنظر گرفته شد).

نتایج

تست MTT جهت بررسی اثرات سایتوتوکسیتی عصاره جلبک بر سلول‌های Hu02 استفاده شد.در شکل ۱ نتایج تاثیر غلظت‌های مختلف عصاره‌بر زنده‌مانی سلول‌های Hu02 نمایش داده شده است. سلول‌های تیمارشده با عصاره جلبک در غلظت‌های ۲۰۰، ۴۰۰ و ۸۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر تاثیر مشابهی بر زنده‌مانی سلول‌ها با سلول‌های تیمار نشده (بدون عصاره) داشت و اثر سایتوتوکسیتی معنی‌داری بین سلول‌های تیمارشده با عصاره‌جلبک‌در غلظت‌های مختلف با سلول‌های تیمار نشده، مشاهده نشد ($p>۰/۰۵$) که نشان‌دهنده غیرسمی‌بودن عصاره بر سلول‌های Hu02 می‌باشد. کلاژن یکی از اجزای مهم بافت همبند پوست می‌باشد که با افزایش سن تجزیه شده و منجر به پیری پوست می‌شود. برای بررسی اثر عصاره جلبک بر بیان ژن کلاژن I در سلول‌های Hu02، qPCR انجام شد و نتایج نشان داد که بیان ژن کلاژن نوع I پس از تیمار سلول‌ها با عصاره جلبک در غلظت‌های مختلف ۲۰۰، ۴۰۰ و ۸۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر در مقایسه با گروه شاهد (بدون عصاره) به‌طور معنی‌داری افزایش یافت ($p<۰/۰۵$).



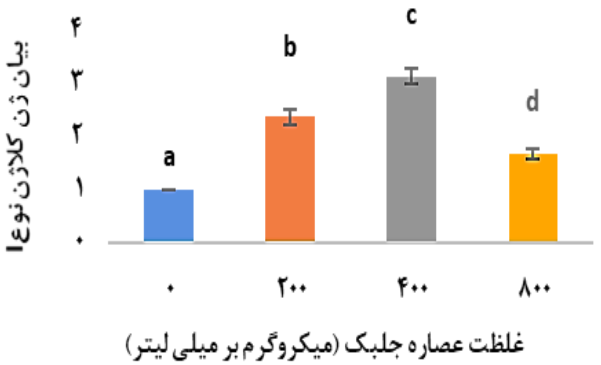
شکل ۱: اثر سمیت سلولی عصاره جلبک بر سلول‌های Hu02 میزان زنده‌مانی سلول‌ها با تست MTT تعیین شد

حروف یکسان نشان‌دهنده عدم وجود اختلاف معنی‌دار بین گروه‌ها می‌باشد

MMP-1 توسط فیبروبلاست‌ها تولید و به‌عنوان کلاژناز شناخته می‌شود. پس از تیمار سلول‌های Hu02 با عصاره جلبک به‌مدت ۲۴ ساعت، بیان ژن MMP-1 کاهش یافت. بیان این ژن در تمام تیمارها در مقایسه با گروه شاهد به‌طور معنی‌داری کاهش یافت. با توجه به‌شکل

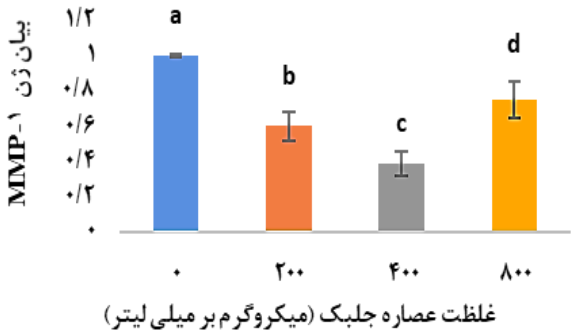
(DOI): 10.22034/AEJ.2020.131594

۳و نتایج حاصل از این تیمارها، مشخص شد که بیان ژن MMP-1 در تیمار غلظتی ۴۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر (۳۹/۰۷±۰/۰) نسبت به‌سایر تیمارها (غلظت ۲۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر با مقدار ۰/۰۸±۰/۶۰ و غلظت ۸۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر با مقدار ۰/۱±۰/۷۵ کم‌تر و بیش‌ترین بیان ژن MMP-1 مربوط به گروه شاهد بود (۰/۰۱±۱). این نتایج نشان‌دهنده تاثیر مثبت عصاره جلبک بر مهار آنزیم MMP-1 و جلوگیری از تخریب کلاژن به‌ویژه با غلظت ۴۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر می‌باشد.



شکل ۲: بررسی بیان ژن کلاژن نوع I با qPCR

حروف متفاوت نشان‌دهنده وجود اختلاف معنی‌دار می‌باشد (p<۰/۰۵)

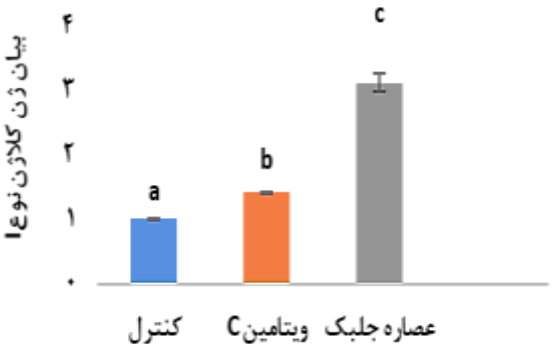


شکل ۳ : تاثیر عصاره جلبک بر بیان ژن MMP-1 در سلول‌های Hu02.

بیان ژن MMP-1 با qPCR بررسی شد.

حروف متفاوت نشان‌دهنده وجود اختلاف معنی‌داری می‌باشد.

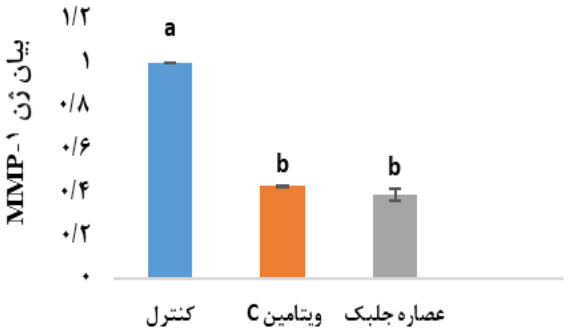
عصاره جلبک با غلظت ۴۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر (viability ٪۹۷) و ویتامین C با غلظت ۰/۱۴ میلی‌مولار (viability ٪۹۷) برای بررسی تاثیر عصاره در مقایسه با ویتامین C بر بیان ژن‌های کلاژن و MMP-1 استفاده شد (غلظتی از عصاره و ویتامین C جهت مقایسه تاثیر آن‌ها در بیان ژن‌های مربوطه انتخاب شد که viability یا اثر سایتوتوکسیتی یکسانی بر سلول داشته باشند). بیان ژن کلاژن I در تیمار سلول‌ها با ویتامین C و عصاره جلبک، به‌طور معنی‌داری در مقایسه با گروه شاهد افزایش یافت. ویتامین C و عصاره جلبک باعث افزایش بیان ژن کلاژن نوع I به‌ترتیب به‌میزان ۰/۰۱±۱/۴۲ برابر (۰/۴۲ برابر بیش‌تر در مقایسه با گروه شاهد) و ۰/۱۵±۳/۱۴ برابر (۲/۱۴ برابر بیش‌تر در مقایسه با گروه شاهد) شدند. با توجه به شکل ۴، عصاره جلبک تاثیر بیش‌تری در مقایسه با ویتامین C بر بیان ژن کلاژن نوع I داشت.



شکل ۴ : تاثیر عصاره جلبک در مقایسه با ویتامین C در بیان ژن کلاژن I در سلول‌های Hu02

حروف متفاوت نشان‌دهنده وجود اختلاف معنی‌دار بین گروه‌ها می‌باشد.

نتایج حاصل از تیمارها نشان داد که عصاره جلبک با غلظت ۴۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر بیان ژن MMP-1 را به‌میزان ۰/۰۳±۰/۳۹ برابر افزایش داد که ۰/۶۱ برابر کم‌تر از گروه شاهد بود و نشان‌دهنده اثر مثبت عصاره بر مهار آنزیم MMP-1 و جلوگیری از تخریب کلاژن توسط عصاره در مقایسه با گروه شاهد می‌باشد. بین گروه ویتامین C و عصاره جلبک در مهار MMP-1 تفاوت معنی‌داری وجود نداشت و مشابه یکدیگر اثر کردند، اما هر دو گروه در مقایسه با گروه شاهد اثر مهاری معنی‌داری بر آنزیم داشتند (شکل ۵).



شکل ۵ : تاثیر عصاره جلبک در مقایسه با ویتامین C بر بیان ژن MMP-1 در سلول‌های Hu02

حروف متفاوت نشان‌دهنده وجود اختلاف معنی‌داری می‌باشد.

(DOI): 10.22034/AEJ.2020.131594

بحث

مطالعات اخیر نشان داده است که جلبک‌های دریایی مانند جلبک‌های قرمز، قهوه‌ای و سبز غنی از مواد مغذی با انواع عملکردهای فعال زیستی هستند (Kim و همکاران، ۲۰۱۶). در این تحقیق تاثیر عصاره جلبک *C. vulgaris* بربیان ژن‌های کلاژن I و MMP-1 در سلول‌های فیبروبلاست پوست در مقایسه با ویتامین C مورد بررسی قرار گرفت. ابتدا بررسی‌شد که آیا عصاره جلبک در غلظت‌های مختلف (۲۰۰، ۴۰۰و ۸۰۰ میکروگرم برمیلی‌لیتر) باعث ایجاد سمیت در سلول Hu02 می‌شود. نتایج نشان داد که عصاره فاقد اثر سایتوتوکسیتی بر سلول‌های Hu02 بوده، در نتیجه برای سلول‌های پوستی مورد نظر غیرسمی می‌باشد.

پوست به‌عنوان یک سد باعث‌حفاظت بدن از فاکتورهای خارجی شده‌و نقش مهمی در زیبایی پوست دارد. پیری پوست ناشی از تخریب کلاژن و افزایش آنزیم‌های چندگانه شامل ماتریکس متالوپروتئیناز (MMPs) است که این آنزیم‌ها نیز باعث تخریب کلاژن شده و موجب تغییرات زیادی مانند نازک‌شدن، خشکی، شکنندگی و تشکیل خطوط ظریف و چین و چروک می‌شود (Wang و همکاران، ۲۰۱۵). برای جلوگیری از فرآیند پیری پوست باید از تجزیه کلاژن که ترکیب غالب در درمیس است، جلوگیری شود. مکانیسم‌های مولکولی پیری پوست می‌تواند منجر به تحریک پروتئین AP-1 (activator protein 1) شود که‌در نتیجه بیان متالوپروتئیناز (MMPs: MMP-1, MMP-3, MMP-9) افزایش یافته و کلاژن تخریب می‌شود (Chen و همکاران، ۲۰۱۱). موادبیولوژیکی‌متعددی‌دربسیاری‌ازگونه‌های جلبک دریایی شناسایی شده است که تعدادی از آن‌ها برای اثرات ضدپیری بر پوست شامل ضدپیری زودرس، ضدرادیکال‌های آزاد و سنتز کلاژن مورد بررسی قرار گرفته‌اند. در ارتباط با اثر عصاره جلبک گونه *C. vulgaris* برتولید کلاژن I و MMP-1 در سلول‌های پوستی مطالعات محدودی وجود دارد و بیش‌تر مطالعات درباره گونه‌های مختلف *Chlorella* و دیگر جلبک‌های دریایی می‌باشد. Porphyra-334استخراجی‌از *P. yezoensis* که یک ترکیب طبیعی موجود در انواع مختلف ارگانیسم‌ها می‌باشد، باعث افزایش سطوح پروکلاژن و کلاژن نوع I شده و بیان MMPs را پس از تابش اشعه UVA مهار می‌کند (Ryu و همکاران، ۲۰۱۴). تیمار فوکسترول بر HaCaT (ترکیب استرولی طبیعی از جلبک‌های قهوه‌ای) باعث افزایش تولید پروکلاژن نوع I می‌شود و هم‌چنین تولید MMPs را کاهش می‌دهد (Kim و همکاران، ۲۰۱۳).

یکی از مهم‌ترین جلبک‌هایی که دارای خصوصیات ضدپیری بوده و نقش قابل‌توجهی‌در تولید کلاژن دارد گونه‌های مختلف *Chlorella* می‌باشد. *Chlorella* باعث سنتز کلاژن شده و از تشکیل چروک‌های پوست با تاثیر بر اپیدرمیس و رفع عیوب انسدادی جلوگیری می‌کند (Berthon و همکاران، ۲۰۱۷).علاوه بر این کلرلاحاوی B-1, 3-glucan بوده که یک ترکیب ضدرادیکال آزاد می‌باشد (Iwamoto و همکاران، ۲۰۰۴). در مطالعه انجام شده توسط Chen و همکاران (۲۰۱۱) مشخص شد که پپتید استخراجی از کلرلا دارای یک اثر محافظتی در برابر اشعه UVB بر فیبروبلاست‌های پوست انسان می‌باشد. در این تحقیق عملکرد ضدپیری عصاره جلبک *C. vulgaris* با تحریک تولید کلاژن در سلول‌های فیبروبلاست پوست مورد بررسی قرار گرفت. ابتدا بررسی شد که آیا عصاره جلبک در غلظت‌های مختلف (۲۰۰، ۴۰۰ و ۸۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) باعث ایجاد سمیت در سلول Hu02 می‌شود.نتایج‌نشان داد که عصاره فاقد اثر سایتوتوکسیتی بر سلول‌های Hu02 بوده، در نتیجه برای سلول‌های مورد نظر غیرسمی می‌باشد.

تجزیه کلاژن که به‌علت عوامل مختلفی روی می‌دهد منجر به تشکیل چین‌وچروک و پیر شدن پوست می‌شود (Varani و همکاران، ۲۰۰۰). در این تحقیق عصاره جلبک باعث افزایش بیان ژن کلاژن نوع I‌شد. آنزیم‌های MMP-1 که توسط فیبروبلاست‌ها ترشح می‌شوند، قادر به تجزیه‌کلاژن هستند. پیری پوست نیز از طریق افزایش تولید آنزیم‌های MMP-1 اتفاق‌می‌افتد که موجب عدم تعادل در سنتز کلاژن می‌شود. در این تحقیق عصاره جلبک باعث سرکوب و مهار MMP-1 شد و سطح بیان ژن MMP-1 کاهش یافت. این یافته‌ها نشان می‌دهد که عصاره جلبک از طریق کاهش MMP-1 از تخریب کلاژن جلوگیری می‌کند.

از یافته‌های تحقیق حاضر نتیجه‌گیری می‌شود که عصاره حاصل از جلبک *C. vulgaris* با توجه به‌افزایش بیان ژن کلاژن I که از مهم‌ترین کلاژن‌های‌موجوددر پوست‌بوده‌وبرای‌حفظ خاصیت ارتجاعی پوست لازم می‌باشد و مهار آنزیم MMP-1 (کلاژناز) می‌تواند اثرات مفیدی بر جلوگیری از روند پیری پوست داشته باشد، هم‌چنین به علت اثرغیر سمی عصاره جلبک بر سلول‌ها می‌تواند به‌عنوان یک ماده جایگزین طبیعی برای محصولات ضدپیری شیمیایی باشد.

در پایان پیشنهاد می‌شود با شناسایی دقیق ترکیبات عصاره میکروجلبک *C. vulgaris* به‌منظور بررسی اثرات آن بر پوست و بیماری‌های مرتبط با آن به‌عنوان یک ماده طبیعی تحقیقات بیش‌تری صورت گیرد.

منابع

1. **Berthon, J.Y.; Nachat-kappes, R.; Bey, M.; Cadoret, J.P.; Renimel, I. and Filaire, E., 2017.** Marine algae as attractive source to skin care. Free Radical Research. Vol. 51, No. 6, pp: 555-567.

(DOI): 10.22034/AEJ.2020.131594

2. **Chen, C.; Liou, S.; Chen, S. and Shih, M., 2011.** Protective effects of Chlorella -derived peptide on UVB- induced Production of MMP-1 and degradation of procollagen genes in human skin fibroblasts. Regulatory Toxicology and pharmacology. Vol. 60, No. 1, pp: 112-119.
3. **Darr, D.; Dunston, S.; Faust, H. and Pinnell, S., 1996.** Effectiveness of antioxidants (vitamin C and E) with and without sunscreens as topical photoporotectants. Acta Derm Venereol. Vol. 76, No. 4, pp: 264-268.
4. **Dejoye, C.; Vian, M.A.; Lumia, G.; Bouscarle, C.; chartan, F. and Chemat, F., 2011.** Combined extraction processes of lipid from *Chlorella vulgaris* Microalgae: Microwavw prior supercritical carbon dioxide extraction. International Journal of molecular science. Vol. 12, No. 12, pp: 9332-9341.
5. **Fermandes, B.; Dragone, G.; Abreu, A.P.; Geada, P.; Theixeire, J. and Vicent, A., 2012.** Starch determination in *Chlorella vulgaris*-a comparison between acid and enzymatic methods. Journal of applied phycology. Vol. 24, No. 5, pp: 1203-1208.
6. **Iwamoto, H., 2004.** Industrial production of microalgae cell mass and secondary product major industrial species. Hand book of microalgal culture: Biotechnology and Applied Phycology, Blackwell, Australia. pp: 270-281.
7. **Kim, C.R.; Kim, Y.M.; Lee, M.K.; Kim, I.H.; Choi, Y.H. and Nam, T.J., 2016.** *Pyropia yezeonsis* peptide promotes collagen synthesis by activating the TGF-B/Smad signaling pathway in the human dermal fibroblast cell line Hs27. International Journal Molecular Medicine. Vol. 39, pp: 31-38.
8. **Kim, M.S.; Oh, G.H.; Kim, M.J. and Hwang, J.K., 2013.** Fucosterol inhibits matrix metalloproteinase expression and promotes type-1 procollagen production in UVB-induced HaCaT cells. Photochemistry and photobiology. Vol. 89, pp: 911-918.
9. **Ryu, J.; Park, S.J.; Kim, I.H.; Choi, Y.H. and Nam, T.J., 2014.** Protective effect of porphyra-334 on UVA-induced photoaging in human skin fibroblasts. International journal of Molecular Medicine. Vol. 34, pp: 796-80.
10. **Saberbaghi, T.; Abbasian, F.; Mohdyusof, Y. and Makpols, S., 2013.** Modulation of cell cycle profile by *Chlorella vulgaris* Prevents Replicative Senescence of human Diploid Fibroblasts. Evidence Based comple mentary and alternative medicine. DOI: 10.1155/2013/780504.
11. **Safi, C.; Zebib, B.; Merah, O.; pontalier, P.Y. and Vaca Garcia, C., 2014.** Morphology, Composition, Production and applications of *Chlorella vulgaris*: A review. Renewable & Sustainable energy reviews. Vol 35, pp: 265-278.
12. **Tournas, J.A.; Lin, F.H.; Burch, J.A.; Selim, M.A.; Monteiro-Riviere, N.A.; Zielinski, J.E. and Pinnel, S.R., 2006.** Ubiquinone, idebenone, and kinetin provide ineffective photoprotection to skin when compared to a topical antioxidant combination of vitamin C and E with ferulic acid. J Invest Dermatol. Vol. 126, pp: 1185-1187.
13. **Varani, J.; Warner, R.L.; Gharaee- Kermani, M.; Phan, S.H.; Kang, S.; Chung, J.H.; Wang, Z.Q.; Datta, S.C.; Fisheri, G.J. and Voorhees, J.J., 2000.** Vitamin A antagonized decreased cell growth and elevated matrix metalloproteinases and stimulates collagen accumulation naturally aged human skin. Journal Investigative of Dermatology. Vol. 114, No. 3, pp: 480-486.
14. **Wachesk, C.C.; Pires, C.A.F.; Ramos, B.C.; Trava Airoldi, V.J.; Lobo, A.O.; Pacheco-Soares, C.; Marciano, F.R. and Da-Silva, N.S., 2013.** Cell viability and adhesion on diamond-like carbon films containing titanium dioxide nanoparticles. Applied Surface Science. Vol. 266, pp: 176-181.
15. **Wang, H.M.D.; Chen, C.; Huych, P. and Chang, J., 2015.** Exploring the potential of using algae in cometics. Bioresource Technology. Vol. 184, pp: 355-362.
16. **Wang, D.; Li, Y.; Hu, X.; Su, W. and Zhong, M., 2015.** Combinedenzymatic and mechanical cell disruption and lipid extraction of green algae *Neochloris oleoabundans*. Int J Mol Sci. Vol. 16, No. 4, pp: 7707-7722.
17. **Yoon, JH.; Kim, J.; Lee, H.; Kim, SY.; Jang, HH.; Ryu, SH.; Kim, BJ. and Lee, TG., 2012.** Laminin peptide YIGSR induces collagen synthesis in Hs27 human dermal fibroblasts. Biochemical and Biophysical Research Communication. Vol. 428, pp: 416-421.
18. **Zhang, S. and Duan, E., 2018.** Fighting against Skin Aging. Cell Transplantation. Vol. 27, No. 5, pp: 729-738.

(DOI): 10.22034/AEJ.2020.131594

Effect of microalga *Chlorella vulgaris* extract compared to vitamin C on collagen I and MMP-1 genes expression in human skin fibroblast cells

- **Sodabeh Abdolbaghian:** Department of Marine Biology, Faculty of Natural Resources and Environment, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran
- **Shahla Jamili*:** Iranian Fisheries Research Organization, Agricultural Research, Education and Extension Organization, Tehran, Iran
- **Azadeh Manayi:** Medicinal Plants Research Center, Faculty of Pharmacy, Tehran University of Medical Science, Tehran, Iran
- **Ali Mashinchian Moradi:** Department of Marine Biology, Faculty of Natural Resources and Environment, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

Received: November 2019 Accepted: February 2020

Key words: *Chlorella* extract, Vitamin C, Collagen, Matrix metalloproteinase, Fibroblast cells

Abstract

Skin as one of the organ, plays an important role in many physical functions. In skin aging process, should be prevented collagen degradation and multiple enzymes increasing, including matrix metalloproteinase (MMPs). *Chlorella vulgaris* is a marine alga and its beneficial effects on skin make it a proper ingredient to be used in anti-aging products. In this study, the effect of *C. vulgaris* extract and vitamin C on type I collagen and MMP-1 production in the human cell line Hu02 was investigated. *Chlorella* was extracted using ultrasonication plus enzymatic hydrolysis, and *Chlorella* extract at different concentration was investigated for its effect on gene expression of collagen I and MMP-1 in Hu02 cells. First, it was investigated whether alga extract induced cytotoxicity in Hu02 cells. MTT assay showed that extract was non-toxic to Hu02 cells. Using quantitative PCR, it was confirmed that extract increased the gene expression of types I collagen and decreased the MMP-1 expression, comparing to the control group. *Chlorella* extract and vitamin C with a similar viability (97%) was used to investigate the effect of extract on mentioned genes expression, compared to vitamin C. Type I collagen increased in both alga and vitamin C groups. The gene expression of MMP-1 in both alga and vitamin C groups was significantly lower than the control group ($p<0.05$). These findings indicate that *C. vulgaris* extract induces collagen synthesis and MMP-1 enzyme inhibition in Hu02 cells.

* Corresponding Author's email: shahlajamili45@yahoo.com