

مقایسه اثر عصاره آبی سنجد با ایبوپروفن بر بیان ژن های COX2 و iNOS در بافت غضروف مدل روماتوئید آرتریتی موش صحرایی

عبدالله مرادی (MSc)^۱، محسن کرانی (PhD)^{۲*}، غلامحسین علیشری (MD)^۳

۱- گروه بیوشیمی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله، تهران، ایران

۲- مرکز تحقیقات آسیبهای شیمیایی، پژوهشکده سیستم بیولوژی و مسمومیت ها، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله، تهران، ایران

۳- گروه داخلی، بخش روماتولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله، تهران، ایران

دریافت: ۹۶/۱۲/۱۲، اصلاح: ۹۷/۲/۳۰، پذیرش: ۹۷/۳/۷

خلاصه

سابقه و هدف: آرتریت روماتوئید بیماری خودایمنی است که توسط داروهای ضد التهاب غیر استروئیدی درمان میشود. گیاهان دارویی خطرات کمتری نسبت به داروهای شیمیایی دارند یکی از گیاهان مورد استفاده در طب سنتی گیاه سنجد می باشد در مطالعه حاضر جهت تأیید خاصیت ضد التهابی این گیاه تأثیر عصاره سنجد بر بیان ژنهای COX2 و iNOS در بافت روماتوئید در موش صحرایی بررسی قرار گرفت.

مواد و روش ها: این مطالعه تجربی بر روی ۳۵ موش صحرایی نر نژاد ویستار در ۵ گروه ۷ تایی انجام شد. ۷ موش به عنوان کنترل در نظر گرفته شد و بقیه طبق پروتکل CIA با تزریق کلاژن تیپ ۲ به آرتریت روماتوئید مبتلا شدند. یک گروه به عنوان شاهد تحت درمان قرار نگرفته و سه گروه دیگر به مدت ۳۰ روز به صورت خوراکی با داروی ایبوپروفن با غلظت ۱۵mg/kg و عصاره آبی سنجد با غلظت ۳۵۰ mg/kg و ترکیب این دو به صورت روزانه تحت درمان قرار گرفتند. سپس بیان ژن های COX2 و iNOS به روش Real time PCR اندازه گیری شد.

یافته ها: تیمار با ایبوپروفن و عصاره آبی بیان ژن ها را کاهش داد، طوری که بیان iNOS در گروه ایبوپروفن (۶/۳۴±۰/۴۹) نسبت به گروه سنجد (۷/۷۱±۰/۶۱) کاهش بیشتر (p<۰/۰۰۱) و بیان COX2 در گروه سنجد (۷/۷۰±۰/۷۷) نسبت به گروه ایبوپروفن (۹/۹۳±۰/۶۸) کاهش بیشتری داشت (p<۰/۰۰۱)

نتیجه گیری: براساس نتایج این مطالعه به نظر می رسد عصاره آبی سنجد می تواند به صورت ترکیبی یا همراه ایبوپروفن در درمان آرتریت روماتوئید استفاده شود.

واژه های کلیدی: آرتریت روماتوئید، سنجد، ایبوپروفن، سیکلواکسیژناز-۲، نیتریک اکساید سنتاز نوع ۲.

مقدمه

می تواند آنزیمهای مسئول واسطه التهابی، مانند آنزیمهای سیکلواکسیژناز و نیتریک اکساید سنتاز را مهار کند (۳) نشان داده شده است که عصاره میوه سنجد اثرات ضد التهابی مهمی بر روی ادم حاد و مزمن القاء شده توسط فرمالین به صورت وابسته به دوز نشان می دهد و با داروی سدیم سالیسیلات قابل مقایسه است (۴). همچنین عصاره آبی سنجد اثر درمانی مشابهی بر آستو آرتریت زانو با داروی ایبوپروفن دارد (۵). NO و PGE2 دو واسطه بسیار مهم در فرآیند التهاب هستند که توسط آنزیمهای قابل القاء iNOS (Inducible nitric oxide synthase) و COX2 (Cyclooxygenase2) تولید می شوند و موجب تشدید التهاب در مفصل می گردند (۶). بین این دو مسیر تعامل وجود دارد به نحوی که NO می تواند سبب افزایش تولید PGE2 از طریق افزایش فعالیت یا پروتئین COX2 شود (۷) از طرفی PGE2 هم میتواند بیان ژن iNOS را افزایش دهد (۸). پروستاگلاندین شواهد متعددی در خصوص حضور و نقش NO و آنزیم تولیدکننده آن (iNOS)

آرتریت روماتوئید (RA) یک بیماری التهابی سیستمیک خودایمن چند ژنی است که یک درصد از جمعیت جهان به آن مبتلا هستند (۱) در این بیماری التهاب سینوویوم، فرسایش پیشرفته استخوانی، جابجایی غیرطبیعی مفاصل و تخریب و ضعف عضلات اطراف آن اتفاق می افتد. درمان این بیماری توسط داروهای ضد التهاب غیراستروئیدی انجام میشود که مشکلات قلبی عروقی و گوارشی از عوارض جانبی مصرف طولانی مدت آنها میباشد، بنابراین دستیابی به داروهای جدیدتر با عوارض جانبی کمتر از اهداف درمان است. گیاهان دارویی با توجه به ماهیت طبیعی شان و به علت دارا بودن تعادل بیولوژیکی دارای عوارض جانبی کمتری نسبت به داروهای شیمیایی هستند. یکی از گیاهانی که در طب سنتی ایران کاربرد فراوانی دارد، گیاه سنجد (Elaeagnus angustifolia) است (۲). مطالعات نشان داده که عصاره آبی میوه سنجد حاوی ترکیبات مختلف از جمله فلاونوئیدها می باشد که دارای خصوصیات آنتی اکسیدانی، ضد ویروس، ضد آلرژی و ضد التهاب می باشد و

این مقاله حاصل طرح تحقیقاتی به شماره ۳۷۸۲۴۲ دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله تهران می باشد

*مسئول مقاله: دکتر محسن کرانی

آدرس: تهران، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله، پژوهشکده سیستم بیولوژی و مسمومیت ها. تلفن: ۸۲۴۸۳۴۱۷ - ۰۲۱

E-mail: mohsenkorani@gmail.com

ایجاد مدل مقادیر قطر مفصل، CBC و ESR قبل و بعد از ایجاد مدل مورد بررسی قرار گرفت.

همچنین از بافت غضروف پنجه پای آنها لام بافت شناسی گرفته شد و با گروه کنترل مقایسه شد. سپس به صورت تصادفی به چهار گروه تقسیم شدند؛ گروه اول به عنوان گروه شاهد که هیچ درمانی را دریافت نکردند، گروه دوم عصاره آبی سنجید، گروه سوم داروی ایبوپروفن و گروه چهارم که هم عصاره آبی سنجید و هم داروی ایبوپروفن را دریافت نمودند.

جهت تهیه عصاره آبی سنجید، میوه تازه و خشک شده سنجید آسیاب شد. ۸۰ گرم از پودر به ۴۰۰ میلی لیتر آب مقطر در حال جوش اضافه شد و جوشش ۱۵ دقیقه ادامه یافت، پس از سرد شدن محتویات بشر با کاغذ صافی صاف گردید. سپس درون بن ماری با دمای ۴۰ درجه قرار داده و آبگیری گردید سپس پودر عصاره در یخچال ۱۰- نگهداری گردید (۲۱).

یک هفته بعد از ایمونیزاسیون، گروههای تحت تیمار علاوه بر آب و غذا به مدت ۳۰ روز ایبوپروفن (۱۵ mg/kg)، عصاره آبی (۲۵۰ mg/kg) یا ترکیب این دو (ایبوپروفن ۱۵ mg/kg و عصاره آبی ۳۵۰ mg/kg) را به صورت تک دوز و به صورت گاوژ دریافت کردند. برای آنالیز ژن های مورد نظر پس از بیهوشی موشها بافت غضروف از پای آنها جداسازی و با ازت مایع سریع فریز شد و جهت انجام استخراج RNA در یخچال ۷۰- درجه سانتی گراد نگهداری شد. مراحل استخراج RNA توسط TRIZOL (Invitrogen) انجام شد. سپس از روی RNA توسط QuantiTect Rev transcriptase (محصول شرکت Qiagen) cDNA ساخته شد. سپس با استفاده از کیت Quanti Fast SYBR Green PCR (Qiagen) و پرایمرهای اختصاصی ژن های COX2، iNOS و β -actin توسط تکنیک Real Time PCR تکثیر و مورد بررسی قرار گرفت. پرایمر ها توسط برنامه genscript real time taqman طراحی شدند و سپس در NCBI بلاست شدند. همچنین با استفاده از نرم افزار oligo نظر تشکیل لوپ و دایمر آنالیز شدند. توالی پرایمر ها در جدول ۱ نشان داده شده است.

در این مطالعه از ژن β -actin به عنوان ژن کنترل داخلی و از روش $\Delta\Delta C_t$ ۲ برای بررسی بیان نسبی ژن های COX2 و iNOS در گروه های مختلف استفاده شد. محاسبات آماری با استفاده از نرم افزار SPSS ۱۸ و آزمونهای آماری One-way ANOVA و Tukey multiple comparison انجام پذیرفت و $p < 0.05$ معنی دار در نظر گرفته شد.

در پاتوژنز آرتریت روماتوئید وجود دارد (۹،۱۰). افزایش شدید غلظت نیتريت ها درون مایع مفصلي بیماران مبتلا به آرتریت روماتوئید گزارش شده است (۱۱). براساس مطالعات پروستاگلاندین ها نیز نقش مهمی را در پاتوفیزیولوژی سرطان و التهاب بازی می کنند (۱۲) شواهد واطلاعات کافی بر بیان آنزیم COX2 در التهاب های مزمن انسانی مانند RA و حتی التهاب های مشابه در مدل حیوانی وجود دارد (۱۳ و ۱۲). مهار تولید پروستاگلاندین از طریق مهار انتخابی تولید COX2 روشی امیدبخش و عملی برای درمان بیماری ها می شود.

برای این کار از مهارکننده های اختصاصی مثل سلکوکسیب و غیراختصاصی مانند ایبوپروفن استفاده می شود مطالعات مختلف نشان داده اند که ایبوپروفن علاوه بر مهار فعالیت COX2 می تواند بر میزان mRNA و پروتئین آن هم اثر بگذارد (۱۵ و ۱۴). همچنین این دارو باعث کاهش mRNA مربوط به iNOS می شوند (۱۶ و ۱۵). فلاونوئید ها که از اجزا گیاهان مختلف از جمله سنجید می باشند، می توانند سطوح mRNA مربوط به COX2 و iNOS را کاهش دهند (۱۷). باتوجه به این که تاکنون مطالعه ای که اثر عصاره آبی میوه سنجید بر بیان مولکولهای دخیل در التهاب همانند ژن های COX2 و iNOS در بیماری آرتریت روماتوئید بررسی کرده باشد در دسترس نمی باشد. این مطالعه به منظور مقایسه اثر ایبوپروفن و عصاره آبی میوه سنجید بر بیان ژنهای COX2 و iNOS در مدل آرتریت روماتوئیدی موش صحرایی به عنوان مکمل یا جایگزینی احتمالی برای ایبوپروفن در درمان آرتریت روماتوئید انجام شد.

مواد و روش ها

این مطالعه تجربی پس از تصویب در کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله تهران با کد IR.BMSU.REC.۱۳۹۶.۵۶۳ بر روی ۳۵ سر موش صحرایی نر بالغ از نژاد ویستار (۲۰۰ تا ۲۵۰ گرم) انجام شد. تمامی آزمایشها منطبق با دستورالعمل مراقبت و استفاده از حیوانات آزمایشگاهی انجام شد. بعد از گذشت یک هفته که موش ها به محیط عادت کردند ۷ سر موش به عنوان گروه کنترل انتخاب شدند و بقیه موش ها با تزریق امولسیون کلاژن تیپ ۲ و ادجوانت کامل فروند به آرتریت روماتوئید مبتلا شدند. برای ایجاد مدل آرتریت روماتوئید نسبت مساوی از کلاژن تیپ ۲ گاوی شرکت سیگما با غلظت ۲ mg/ml با ادجوانت کامل فروند (CFA) مخلوط و سپس ۲۰۰ میکرو لیتر در روز صفر و ۱۰۰ میکرو لیتر در روز چهارده به صورت زیر جلدی به انتهای دم موشها تزریق شد (۲۰-۱۸). برای تایید

جدول ۱. توالی پرایمر ژنهای مورد مطالعه

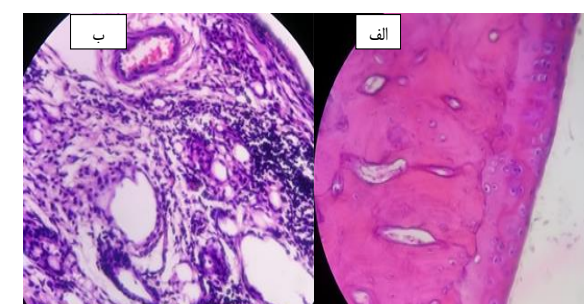
ژن	توالی پرایمر	جفت باز
iNOS	Forward: TCCCAGCACAAAGGGCTCAA Reverse: TGCGGACCATCTCCTGCATT	۱۰۶
COX2	Forward: AGCTTCACTTGCCACCAACG Reverse: TCGGAAGAGCATCGCAGAGG	۷۰
β -actine	Forward: AGCCATGTACGTAGCCATCC Reverse: CTCTCAGCTGTGGTGGTGAA	۱۴۱

یافته ها

میزان سرعت رسوب گلبولهای قرمز (ESR) در گروه شاهد $(76 \pm 0/77)$ / میلی متر بر ساعت) نسبت به گروه کنترل $(3/85 \pm 0/52)$ افزایش معنی داری یافت $(P < 0/01)$. همچنین تعداد گلبولهای سفید خون در گروه شاهد $(16710 \pm 2117/28)$ بر میکرولیتر) نسبت به گروه کنترل $(7415 \pm 327/51)$ افزایش یافت $(P < 0/01)$. علاوه بر این مفصل پنجه پای گروه شاهد نسبت به گروه کنترل متورم شد (شکل ۱). همچنین تراکم شدید سلولهای التهابی و سلولهای غیرطبیعی سینوویوم در لام تهیه شده از مفصل پنجه پای موشها مشاهده شد (شکل ۲) که همگی نشان دهنده موفقیت آمیز بودن ایجاد مدل است.



شکل ۱. افزایش قطر مفصل گروه شاهد (الف) نسبت به گروه کنترل (ب) در روز ۲۱

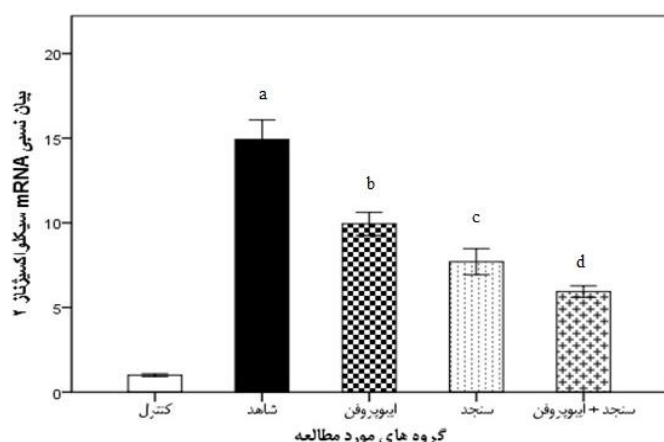


شکل ۲. بافت غضروف گروه کنترل که لایه سینوویوم و کندروسیت نرمال دیده می شود (الف). بافت غضروف گروه شاهد که تراکم شدید سلولهای التهابی دیده می شود (ب).

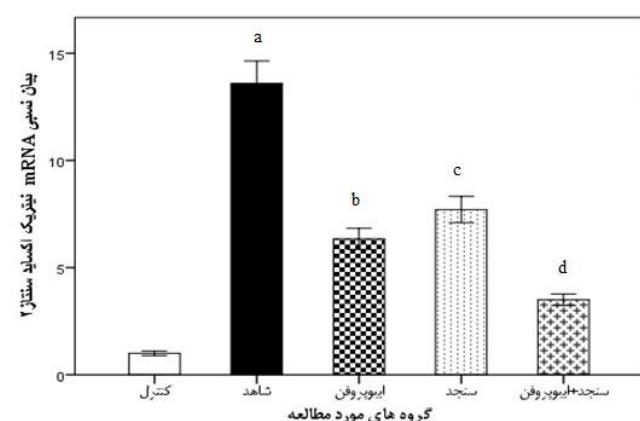
بیان نسبی ژن COX2 در گروه شاهد $1/16 \pm 0/92$ ، در گروه داروی ایبوپروفن $0/68 \pm 0/93$ ، در گروه عصاره آبی سنجد $0/77 \pm 0/70$ و در گروه ترکیب داروی ایبوپروفن و عصاره آبی سنجد $0/34 \pm 0/94$ برابر گروه کنترل بوده است (نمودار ۱). همانطور که مشخص است درمان های مختلف توسط دارو و عصاره آبی توانسته است بیان ژن COX2 را نسبت به گروه شاهد کاهش دهد $(P < 0/01)$. این کاهش برای گروه سنجد بیشتر از گروه ایبوپروفن بوده است $(P < 0/01)$. ترکیب این دو دارو نسبت به هر کدام از تیمارها به تنهایی باعث کاهش بیشتری در بیان ژن COX2 شده است $(P < 0/01)$.

بیان نسبی ژن iNOS در گروه شاهد $1/05 \pm 0/59$ ، در گروه ایبوپروفن $0/49 \pm 0/34$ ، در گروه عصاره آبی سنجد $0/61 \pm 0/71$ و در گروه ترکیبی $0/27 \pm 0/50$ برابر گروه کنترل بوده است (نمودار ۲). همانطور که دیده می شود ایجاد التهاب آرتریت روماتوئید باعث افزایش بیان ژن iNOS در تمامی گروهها شده است از طرفی تیمار با دارو و عصاره آبی سنجد توانسته است بیان ژن iNOS را نسبت به گروه شاهد کاهش دهد $(P < 0/01)$. کاهش بیان در گروه ایبوپروفن

بیشتر از گروه عصاره آبی سنجد بوده است $(P < 0/01)$. ترکیب ایبوپروفن و عصاره آبی نسبت به هر کدام از تیمارها به تنهایی باعث کاهش بیشتری در بیان ژن iNOS شده است $(P < 0/01)$.



نمودار ۱. مقایسه بیان نسبی ژن سیکلواکسیژناز ۲ در گروه های مورد مطالعه. a, b, c, d نسبت به همه گروه ها معنی دار $(P < 0/01)$



نمودار ۲. مقایسه بیان نسبی ژن نیتریک اکساید سنتاز ۲ در گروه های مورد مطالعه. a, b, c, d نسبت به همه گروه ها معنی دار $(P < 0/01)$

بحث و نتیجه گیری

در مطالعه حاضر ایبوپروفن و عصاره آبی سنجد بیان ژنهای iNOS و COX2 را در غضروف مفصل پنجه پای موشهای مدل آرتریت روماتوئید کاهش دادند. نتایج حاصل از تحقیقات Motevalian و همکاران نشان داد که عصاره میوه سنجد اثرات ضدالتهابی قابل مقایسه ای با داروی سدیم سالیسیات دارد (۴). نتایج مطالعه Panahi و همکاران نشان دهنده مؤثر بودن عصاره آبی سنجد در درمان التهاب های مزمن است (۵). Liu و همکاران اثر توتال فلاونوئید های گیاه کاملیا را بر روی عوامل پیش التهابی مثل TNFα، iNOS، COX2 و MIP-1α بررسی کردند، نتایج این مطالعه نشان داد که توتال فلاونوئید این گیاه میتواند mRNA مربوط به ژن های TNFα، iNOS، COX2 و MIP-1α که توسط LPS در سلول های RAW264/7 القاء شده بود را کاهش دهد. (۲۲) نتایج مطالعه Liu و همکاران مؤثر بودن خانواده فلاونوئید ها بر کاهش پیش سازهای التهابی را نشان داده است. در مطالعه Chai و همکاران ایبوپروفن بیان

شاهد کاهش یافته بود که حاکی از مؤثر بودن فرآیند تیمار بوده است که روند پیشرفت التهاب را کاهش داده است، اما کاهش بیان ژن iNOS توسط ایبوپروفن مقداری محسوس تر از عصاره آبی سنجد و کاهش بیان ژن COX2 توسط عصاره آبی سنجد بیشتر از ایبوپروفن بود. همچنین ترکیب داروی ایبوپروفن و عصاره آبی سنجد باعث کاهش بیشتری در بیان این ژنها شده که نشان می دهد اگر عصاره آبی سنجد و ایبوپروفن همزمان باهم مصرف شوند اثر همدیگر بر کاهش بیان این ژنهای التهابی را تقویت می کنند. پیشنهاد می شود که سنجد به عنوان یک کاندید مناسب جهت فرموله کردن در یک ترکیب دارویی به عنوان جایگزین ایبوپروفن و یا همزمان با آن در درمان بیماران مبتلا به آرتریت روماتوئید مصرف شود که البته این امر نیازمند مطالعات بیشتر در زمینه استخراج ماده مؤثره و شناخت کامل مکانیسم عمل و بررسی عوارض و سمیت آن است.

تقدیر و تشکر

بدینوسیله از معاونت پژوهشی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله جهت حمایت مالی از این تحقیق و همچنین از آقای دکتر جواد رئوف که در مطالعات بافت شناسی و ایجاد مدل کمک فراوانی انجام دادند، تقدیر و تشکر می گردد.

ژن COX2 را هم در سطح mRNA و هم در سطح پروتئین در سلول های مئانه رده Urotsa افزایش داد (۲۳) که با نتایج مطالعه ما هم خوانی ندارد که احتمالاً دلیل آن مربوط به دوز و دوره داروی مصرفی و رده سلولی مورد استفاده در آن مطالعه می باشد. از طرفی Liu و همکاران که اثر ایبوپروفن بر روی آنسفالوپاتی دیابتی را مورد بررسی قرار دادند نشان دادند که درمان مزمن با ایبوپروفن به طور چشمگیری فعالیت پروتئین و mRNA ژن COX2 و iNOS را در مغز کاهش می دهد اما پروتئین و mRNA مربوط به PPAR γ را در مغز موش های دیابتی افزایش می دهد PPAR γ بیان ژن های پیش التهابی را مهار می کند (۲۴).

مطالعه Crofford نشان داد که در بافت سینوویال بیماران آرتریت روماتوئید بیان ژن COX2 افزایش می یابد، این افزایش توسط فعال شدن فاکتورهای رونویسی NF κ B توسط سایتوکاین IL-1 و TNF α انجام می شود (۲۵). از طرفی مطالعه D'Acquisto نشان داد که ایبوپروفن با مهار NF κ B بیان COX2 و PGE2 را در سلول های T و ماکروفاژهای چوندگان مهار می کند (۲۶). در مطالعه حاضر بیان ژنهای iNOS و COX2 در تمامی گروه های تحت تیمار و همچنین گروه شاهد نسبت به گروه کنترل افزایش پیدا کرده بود که نشان دهنده این است که این ژنها در پروسه التهاب نقش داشته و بیان آنها در آرتریت روماتوئید افزایش می یابد. از طرفی بیان این ژنها توسط عصاره آبی سنجد و ایبوپروفن نسبت به گروه

The Comparison of the Effect of the Aqueous Extract of the *Elaeagnus Angustifolia* with Ibuprofen on the Expression of the iNOS and COX2 Genes in the Cartilage Tissue of Rat Rheumatoid Arthritis Model

A. Moradi (MSc)¹, M. Korani (PhD)^{*2}, G.H. Alishiri (MD)³

1.Department of Biochemistry, Faculty of Medicine, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, I.R.Iran

2.Chemical Injuries Research Center, System Biology and Poisoning Institute, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, I.R.Iran

3.Department of Internal Medicine, Rheumatology Ward, Faculty of Medicine, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, I.R.Iran

J Babol Univ Med Sci; 20(11); Nov 2018; PP: 27-33

Received: Mar 3rd 2018, Revised: May 20th 2018, Accepted: May 28th 2018.

ABSTRACT

BACKGROUND AND OBJECTIVE: Rheumatoid Arthritis (RA) is a chronic autoimmune disease is treated by non-steroidal anti-inflammatory drugs. Considering that use of medicinal plants has lower side effects than chemical drugs and *Elaeagnus angustifolia* is one of the plants used in the traditional medicine is, the present study was conducted to investigate the anti-inflammatory property of the aqueous extract of the *Elaeagnus angustifolia* by assessing the expression of the iNOS and COX2 as inflammatory genes.

METHODS: This experimental study was performed on 35 male Wistar rats in 5 groups of 7. Seven rats were considered as control group, and in the rest of rats, rheumatoid arthritis was induced according to the CIA protocol with collagen type 2 injection. One group was not treated as the control group and three groups were treated orally for a period of 30 days by ibuprofen with the concentration 15 mg/kg and the aqueous extract of the *Elaeagnus angustifolia* with the concentration 350 mg/kg and their combination, then expression of the COX2 and iNOS genes was measured by real-time PCR technique.

FINDINGS: Treatment with ibuprofen and the aqueous extract reduced the genes expression. In other words, the expression of the iNOS gene decreased more in the ibuprofen group (6.34 ± 0.49) than the *Elaeagnus angustifolia* (7.71 ± 0.61 ; $p < 0.001$) and the expression of the COX2 gene decreased more in *Elaeagnus angustifolia* (7.70 ± 0.77) than ibuprofen group (9.93 ± 0.68 ; $p < 0.001$).

CONCLUSION: It seems that the aqueous extract of the *Elaeagnus angustifolia* can be used independently or together with ibuprofen to treatment the rheumatoid arthritis.

KEY WORDS: Rheumatoid Arthritis, *Elaeagnaceae*, Ibuprofen, Cyclooxygenase-2, Nitric oxide synthase type II.

Please cite this article as follows:

Moradi A, Korani M, Alishiri GH. The Comparison of the Effect of the Aqueous Extract of the *Elaeagnus Angustifolia* with Ibuprofen on the Expression of the iNOS and COX2 Genes in the Cartilage Tissue of Rat Rheumatoid Arthritis Model. J Babol Univ Med Sci. 2018;20(11):27-33.

*Corresponding Author: M. Korani (PhD)

Address: System Biology and Poisoning Institute, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, I.R.Iran

Tel: +98 21 82483417

E-mail: mohsenkorani@gmail.com

References

1. Kannan K, Ortmann RA, Kimpel D. Animal models of rheumatoid arthritis and their relevance to human disease. *Pathophysiology*. 2005; 12(3):167–81.
2. Naghibi F, Mosaddegh M, Mohammadi Motamed M, Ghorbani A. Labiatae family in folk medicine in Iran: from ethnobotany to pharmacology. *Iranian J Pharm Res*. 2005;4(2): 63-79.
3. Hajhashemi V, Ghanadi AR, Mousavi D. analgesic and antiinflammatory effects of total extract, flavonoid fraction and volatile oil of salvia hydrangea. *J Res Med Sci*. 2000;5(2);10-14.
- 4.4. Motevalian M, Shiri M, Shiri S, Shiri Z, Shiri H. Anti-inflammatory activity of *Elaeagnus angustifolia* fruit extract on rat paw edema. *J Basic Clin Physiol Pharmacol*. 2017; 28(4):377-81.
5. Panahi Y, Alishiri GH, Bayat N, Hosseini SM, Sahebkar A. Efficacy of *Elaeagnus Angustifolia* extract in the treatment of knee osteoarthritis: a randomized controlled trial. *EXCLI J*. 2016; 15:203-10.
6. Goldring MB. The role of the chondrocyte in osteoarthritis. *Arthritis Rheum*. 2000; 43(9):1916-26.
7. ZhuaY, Zhua M, Lance P. iNOS signaling interacts with COX-2 pathway in colonic fibroblasts. *Exp Cell Res*. 2012;318:2116-2.
8. Hori M, Kita M, Torihashi Sh, Miyamoto S, Won KJ, Sato K, et al. Upregulation of iNOS by COX-2 in muscularis resident macrophage of rat intestine stimulated with LPS. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2001; 280(5): G930-8.
9. Clancy RM, Amin AR, Abramson SB. The role of nitric oxide in inflammation and immunity. *Arthritis Rheum*. 1998; 41(7):1141-51.
10. Borderie D, Hilliquin P, Hervann A, Kahan A, Menkes C, Ekindjian O. Nitric oxide synthase is expressed in the lymphomononuclear cells of synovial fluid in patients with rheumatoid arthritis. *J Rheumatol*. 1999; 26(10):2083-8.
11. Kröncke K, Fehsel K, Kolb-Bachofen V. Inducible nitric oxide synthase in human diseases. *Clin Exp Immunol*. 1998; 113(2):147-56.
12. Kang R, Freire-Moar J, Sigal E, Chu CQ. Expression of cyclooxygenase-2 in human and an animal model of rheumatoid arthritis. *Rheumatology*. 1996; 35(8):711-8
13. Anderson GD, Hauser SD, McGarity KL, Bremer ME, Isakson PC, Gregory SA. Selective inhibition of cyclooxygenase (COX)-2 reverses inflammation and expression of COX-2 and interleukin 6 in rat adjuvant arthritis. *J Clin Invest*. 1996; 97(11):2672-9.
14. Gallego-Sandín S, Novalbos J, Rosado A, Gisbert JP, Gálvez-Múgica MA, García AG, et al. Effect of ibuprofen on cyclooxygenase and nitric oxide synthase of gastric mucosa: correlation with endoscopic lesions and adverse reactions. *Dig Dis Sci*. 2004; 49(9):1538-44.
15. Heneka MT, Sastre M, Dumitrescu-Ozimek L, Hanke A, Dewachter I, Kuiperi C, et al. Acute treatment with the PPARgamma agonist pioglitazone and ibuprofen reduces glial inflammation and Abeta1-42 levels in APPV7171 transgenic mice. *Brain*. 2005;128(6):1442-53.
16. Stratman NC, Carter DB, Sethy VH. Ibuprofen: effect on inducible nitric oxide synthase. *Brain Res Mol Brain Res*. 1997; 50 (1 - 2 :) 107 - 12.
17. García-Mediavilla V, Crespo I, Collado PS, Esteller A, Sánchez-Campos S, Tuñón MJ, et al. The anti-inflammatory flavones quercetin and kaempferol cause inhibition of inducible nitric oxide synthase, cyclooxygenase-2 and reactive C-protein, and down-regulation of the nuclear factor kappaB pathway in Chang Liver cells. *Eur J Clin Pharmacol*. 2007; 557(2-3):221-9.
18. Earp JC, DuBois DC, Molano DS, Pyszczynski NA, Keller CE, Almon RR, et al. Modeling corticosteroid effects in a rat model of rheumatoid arthritis I: mechanistic disease progression model for the time course of collagen-induced arthritis in Lewis rats. *J Pharmacol Exp Ther*. 2008; 326(2):532-45.

- 19.Soto H, Hevezi P, Roth RB, Pahuja A, Alleva D, Acosta HM, et al. Gene Array Analysis Comparison between Rat Collagen-induced Arthritis and Human Rheumatoid Arthritis. *Scand J Immunol*. 2008; 68(1):43-57.
- 20.Stuart JM, Cremer MA, Townes AS, Kang AH. Type II collagen-induced arthritis in rats. Passive transfer with serum and evidence that IgG anticollagen antibodies can cause arthritis. *J Exp Med*. 1982; 155(1):1-16.
- 21.Soofiabadi M, Esmaeili MH, Haghdoost H, Gheibi N. The effect of aqueous extract of *Elaeagnus angustifolia* on pain in male rats. *Yafteh*. 2008;10(1)23-9.
- 22.Liu X, Jia L, Gao Y, Li B, Tu Y. Anti-inflammatory activity of total flavonoids from seeds of *Camellia oleifera* Abel. *Acta Biochim Biophys Sin*. 2014; 46(10):920-2.
- 23.Chai AC, Robinson AL, Chai KX, Chen LM. Ibuprofen regulates the expression and function of membrane-associated serine proteases prostasin and matriptase. *BMC Cancer*. 2015; 15(1):1025.
- 24.Liu Y-W, Zhu X, Zhang L, Lu Q, Zhang F, Guo H, et al. Cerebroprotective effects of ibuprofen on diabetic encephalopathy in rats. *Pharmacol Biochem Behav*. 2014; 117:128-36.
- 25.Crofford LJ. The role of COX-2 in rheumatoid arthritis synovial tissues. *Arthritis Res Ther*. 1999; 1(Suppl 1):S30.
- 26.D'Acquisto F, May MJ, Ghosh S. Inhibition of nuclear factor kappa B (NF- κ B). *Mol Interv*. 2002; 2(1):22-35.