مقاله تحقیقی

القای هم‌اکسیژنازI توسط لیپوکالین۲ به واسطه فاکتور رونویسی NF-κB

پریسا بهمنی .M.Sc*، راحله حلبیان .M.Sc، ناصرمسروری .M.Sc** ، مهدی روحبخش .M.Sc** ، مجید ابراهیمی .M.Sc*****

محمد رضا نورانی .Ph.D ***محمد علی شکرگزار .Ph.D **، مهریارحبیبی رودکنار .Ph.D****

* گروه بیوشیمی دانشگاه آزاداسلامی واحدعلوم وتحقیقات، تهران، ایران

** گروه بیوتکنولوژی و بیولوژی سلولی مولکولی مرکز تحقیقات سازمان انتقال خون ایران، تهران، ایران

*** گروه سلولی مولکولی دانشگاه بقیۀ الله (عج) تهران ، ایران

**** بانک سلولی انستیتو پاستور تهران ، ایران

تاریخ وصول: اسفندماه ۸۷،تاریخ پذیرش: اردیبهشت ماه ۸۸

چکیده

هدف: بررسی اثر لیپوکالین۲ بر بیان آنزیم هم‌اکسیژنازI وII و فاکتور رونویسیNF-κB

مواد وروش‌ها: در این مطالعه ابتدا با استفاده از پلاسمید $PcDNA_{3.1}$ و از طریق مهندسی ژنتیک، رده‌های سلولی پایدار مولد لیپوکالین۲ ایجاد شد (HEK293-V-Lcn2 و CHO-V-Lcn2). سلول‌هایCHO و HEK293 فاقد ژن لیپوکالین۲ هستند بنابراین پس از انجام ترانسفکشن با بررسی بیان ژن لیپوکالین۲ ورود ژن به درون این سلول‌ها تأیید شد.

آن‌گاه پس از استخراج RNA ازسلول‌های حاوی ژن لیپوکالین نوترکیب ازنمونه‌های RNA استخراج شده، cDNA ساخته شده و بیان هم‌اکسیژناز I، II وNF-κB (Nuclear factor kappa B) توسط روش‌های وسترن بلات و RT-PCR بررسی شد.

درمرحله بعد بیان لیپوکالین۲ توسط SiRNA دررده سلولی A549 کاهش یافت و تأثیر خاموش سازی ژن لیپوکالین۲ بر بیان آنزیم هم‌اکسیژناز I،II و NF-κB با روش PCR–RT مطالعه شد.

یافته‌ها: تا یج حاصل از آزمون PCR و وسترن بلات بیانگر افزایش بیان آنزیم هم‌اکسیژناز I و فاکتور NF-κB درسلول‌های حاوی وکتور بیان کننده لیپوکالین۲ در مقایسه با سلول‌های کنترل است. همچنین خاموش‌سازی ژن لیپوکالین۲ توسط SiRNA منجر به کاهش بیان هم‌اکسیژناز I و NF-κB در رده سلولی A549 شد .

نتیجه‌گیری:مشاهدات فوق نشان داد که لیپوکالین۲ باعث افزایش بیان آنزیم هم‌اکسیژنازI می‌شود و با توجه به نتایج به‌دست آمده در این مطالعه، احتمال می‌رود که لیپوکالین۲ بتواند با فعال کردن هم‌اکسیژنازI از طریق مسیرNF-κB، با استرس اکسیداتیو مقابله کرده و سبب تعدیل التهابات سلولی ناشی از ROS (Reactive oxygen species) شود.

کلید واژه‌ها: لیپوکالین۲، هم‌اکسیژنازI، NF-κB، استرس اکسیداتیو

آدرس مکاتبه: تهران، مرکز تحقیقات سازمان انتقال خون،

صندوق پستی۱۱۵۷-۱٤٦٦٥ E-mail: roudkenar@ibto.ir

مقدمه

لیپوکالین۲ به خانواده بزرگ و متنوعی ازپروتئین‌های محلول و اغلب ترشحی لیپوکالین‌ها تعلق دارد که دارای عملکردهایی همچون انتقال رتینول‌ها و فرمون‌ها، سنتز پروستاگلاندین‌ها، تعدیل پاسخ‌های ایمنی بوده و در هموستاز سلولی و حس بویایی دخیل هستند [۱ و۲].

لیپوکالین۲ (24P3) که برای اولین بار در سال ۱۹۸۹ در سلول‌های ابتدایی کلیوی آلوده شده با SV40 در موش شناسایی شده [۳] در بسیاری از بافت‌ها بیان می‌شود و سنتز آن در سلول‌های اپی تلیالی‌ای که با التهاب مواجه شده‌اند افزایش می‌یابد [٤ و٥].

تا کنون عملکردهای متنوعی برای لیپوکالین۲، مانند انتقال آهن و اسیدهای چرب، القای آپوپتوز، مهار رشد باکتریایی و تعدیل پاسخ‌های التهابی [٦] گزارش شده است. با توجه به نتایج برخی مطالعات به‌نظر می‌رسد که لیپوکالین۲ یکی از پروتئین‌های فاز حاد (acute phase) نیز باشد چرا که بیان آن به‌صورت تیپیک در انواع شرایط التهابی مانند آپاندیس، بیماری‌های التهابی روده، التهاب کولون و آرتریت روماتوئید افزایش می‌یابد [۹-۷]. به‌عنوان مثال واسانتی (vasanthi) در بررسی خود روی ماکروفاژهای تیمار شده با لیپوپلی ساکارید (LPS: Lipopolysaccharide) و افزایش پایداری را در بیان لیپوکالین۲ در ماکروفاژهای کبد وریه گزارش کرده است و پیشنهاد می‌کند که افزایش لیپوکالین۲ اولین پاسخی است که این سلول‌ها در برابر این شرایط بحرانی نشان می‌دهند [۱۰]. همچنین بیان بالایی از لیپوکالین۲ را در سرطان‌های انسانی مانند سرطان سینه، کولورکتال، آپاندیس، مری و تخمدان شاهد هستیم [۷، ۸، ۱۱ و۱۲]. اما یکی از نکات قابل توجه افزایش لیپوکالین۲ در سلول‌هایی است که در معرض شرایط مضر ناشی از تولید رادیکال‌های آزاد هستند مانند مواردی همچون التهابات، مسمومیت‌ها، صدمات کلیوی، بیماری‌های قلبی، آسیب‌های ناشی از سوختگی، عفونت‌های سلولی، التهابات روده و سرطان [۸ و ١٤-١٢].

آسیب اکسیداتیو به ماکرومولکول‌های سلولی به‌وسیله انواع مختلف اکسیژن‌های غیرفعال (ROS) مانند هیدروژن پراکسید، رادیکال‌های آزاد اکسیژن، اکسیژن واحد (Singlet oxygen)، آنیون هیپوکلریت، نیتریک اکسید و آنیون پراکسی نیتریت اعمال می‌شود [۱۵]. از آنجایی‌که رادیکال‌های آزاد تولید شده در استرس اکسیداتیو ناشی از تابش اشعه (IR) باعث القای Lcn2 در سلول‌های کبد می‌شود، احتمال می‌رود که لیپوکالین ۲ به‌عنوان یک پروتئین پاک کننده رادیکال‌های آزاد عمل کرده و باعث محافظت سلول از آسیب به‌وسیله ROS شود [١٤]. همچنین تحقیقات نشان می‌دهند که لیپوکالین۲ دارای یک عملکرد محافظتی در برابر توکسیسیتی (سمیت) ناشی از H_2O_2 و Cisplatin است [١٦ و١٧]. اما عملکرد دقیق لیپوکالین۲ در محافظت در برابر استرس اکسیداتیو و چگونگی انجام این مأموریت هنوز روشن نیست.

از سوی دیگر، استرس‌ها و التهابات سلولی همراه با افزایش در سطح هم اکسیژنازI (HO-1) است [۱۸]. این آنتی‌اکسیدان نه تنها با استرس ناشی از تولید Heme مقابله می‌کند، بلکه بیان آن توسط هیپوکسیا و عواملی همچون فلزات سنگین، اشعه UV، پراکسید هیدروژن و لیپوپلی‌ساکارید که باعث افزایش ROS سلولی می‌شوند القا می‌شود [۱۹و۲۰]. به‌طوری‌که پاک کننده‌های ROS نظیر N-acetyl cysteine القای هم‌اکسیژنازI توسط استرس اکسیداتیو را مهار می‌کنند [۲۰].

HO-1 و HO-2 دو ایزوزیم آنزیم هم‌اکسیژناز، دارای الگوی بیان بافتی متفاوت هستند و در حالی‌که HO-2 یک آنزیم پایدار و غیرقابل القا است، در مقابل بیان HO-1 توسط عوامل استرس‌زا القا می‌شود و به‌نظر می‌رسد که فعالیت ژن HO-1

یک مکانیسم دفاعی تطبیقی در کشت‌های سلولی و مدل‌های حیوانی است [۲۰].

برای پی بردن به عملکرد لیپوکالین۲ در مقابله با استرس اکسیداتیو این مطالعه بر پایه این سئوال طراحی شد که آیا لیپوکالین۲ می‌تواند از طریق القای هم‌اکسیژناز بخشی از اثر محافظتی خود در برابر استرس اکسیداتیو را اعمال کند؟

استراتژی درمانی برای بافت‌ها یا سلول‌هایی که با استرس اکسیداتیو مواجه شده‌اند نیازمند دست‌یابی به روش‌های مطمئن برای مشخص کردن مکانیزم سلولی و مولکولی‌ای است که لیپوکالین۲ از طریق آن باعث مقاومت سلول‌ها به نکروز و آپوپتوز ناشی از رادیکال‌های آزاد می‌شود، استرس اکسیداتیو ناشی از این رادیکال‌های آزاد مسئول آسیب‌های ایجاد شده در بسیاری بیماری‌ها همچون آلزایمر، بیماری‌های التهابی، تالاسمی و... است. بنابراین با شناخت تاثیر لیپوکالین۲ بر آنزیم هم‌اکسیژناز می‌توان از عملکرد تنظیمی لیپوکالین۲ بر این آنزیم در پروژه‌های درمانی سود برد.

همچنین با توجه به اینکه پروموتور ژن HO-1 هم در انسان و هم در جوندگان (موش) دارای توالی‌ای برای اتصال NF-κB است و بسیاری از تأثیرات استرس اکسیداتیو توسط القای ژنی از طریق فاکتورهای رونویسی‌ای همچون NF-κB تعدیل می‌شود [۱۵] ، در تحقیق حاضر بررسی شد که آیا لیپوکالین ۲ می‌تواند از طریق مسیر NF-κB بر بیان ژن HO-1 تأثیر بگذارد؟

برای روشن کردن این فرضیه، دو رده سلولی دستکاری شده با روش‌های مهندسی ژنتیک که مولد لیپوکالین۲ هستند ایجاد شد و بیان آنزیم هم‌اکسیژنازI, II وNF-κB در آن‌ها مطالعه شد. همچنین در مرحله دوم بیان این ژن در سلول‌های A549 از طریق siRNA خاموش شد و بیان ژن‌های مذکور نیز در آن‌ها مطالعه شد.

مواد و روش‌ها

کشت سلولی

رده سلولی کبد انسان (HepG2) ، تخمدان هامستر چینی (CHO)، سلول‌های سرطانی ریه (A549) و سلول‌های جنینی کلیه انسان (HEK293T) از بانک سلولی ایران (NCBI) تهیه در محیط (Gibco-Brl,Eggnestein,Germany) RPMI-16040 با FBS ۱۰ درصدکشت داده شدند.

ایجاد رده سلولی پایدار مولد لیپوکالین۲

برای ایجاد پلاسمید بیانی لیپوکالین۲، ابتدا cDNA ژن لیپوکالین۲ از رده سلولی کبد انسان (HepG2) جداسازی شد. ابتدا مکان و آنزیم‌های مناسب برای برش ژن لیپوکالین۲ به‌منظور ورود ژن به درون وکتور یوکاریوتی شناسایی شدند و ژن توسط آنزیم‌های محدود کننده EcoR I ,NOT I در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد برش داده شد و در همان راستا وکتور PCDNA3.1(+) هم با همان آنزیم‌ها برش خورد. سپس ژن لیپوکالین۲ و وکتور PCDNA3.1(+) توسط آنزیم لیگاز در مکان مناسب به یکدیگر متصل شدند. آنگاه حضور ژن و صحت توالی ژن توسط توالی‌یابی DNA (DNA Sequencing)ثابت شد (۱۶ و۱۷).

سلول‌های CHO و HEK293T با ۱µg از PcDNA3.1–Lcn2 و توسط Fugene6 (Roche.Mannheim Germany) ترا آلوده شدند. PcDNA3.1 نیز برای کنترل به درون سلول‌های CHO وHEK293T ترا آلوده شد. سلول‌های CHO و HEK293T ای که به‌صورت پایدار لیپوکالین۲ را بیان می‌کنند در محیط کشت حاوی Geneticin ٦٠٠ µg /ml (Roche) برای حداقل ١٤ روز کشت داده شدند که منجر به ایجاد رده پایدار مولد لیپوکالین۲ شد.

سلول‌های CHO و HEK293T به‌صورت ذاتی فاقد ژن

لیپوکالین۲ هستند، بنابراین پس از انجام ترانسفکشن (تراآلودگی) با بررسی بیان ژن لیپوکالین۲ ، ورود ژن به درون این سلول‌ها تأیید شد. به همین دلیل میزان بیان لیپوکالین۲ در CHO-Lcn2 و HEK-Lcn2 به وسیله RT- PCRاندازه‌گیری شد.

بررسی بیان ژن‌ها به روش نسخه‌برداری معکوس واکنش زنجیره‌ای پلیمراز

در ابتدا با استفاده از کیت (Invitrogen Carlsbad .CA) RNA کل از محیط کشت استخراج شد سپس خلوص و غلظت RNA استخراج شده با جداسازی بر روی ژل یک درصد آگارز و دستگاه نانودراپ سنجیده شد. ۱۰۰۰ نانوگرم از RNA استخراج شده با استفاده از پرایمر Random Hexamer و آنزیم ترنس کریپتاز III (cDNA synthesise kit,Invitrogen) نسخه‌برداری معکوس شد، سپس از cDNA تولید شده به‌عنوان الگو برای PCR استفاده شد.

برای پی بردن به میزان بیان ژن‌های مورد مطالعه در این تحقیق از پرایمرهای جدول ۱ استفاده شد و به‌منظور نرمال‌سازی بیان ژن‌ها، بیان β-actin به‌عنوان یک ژن خانه‌دار (House keeping gene) استفاده شد.

محصولات PCR روی ژل آگارز ۲ درصد جدا و با اتیدیوم بروماید قابل مشاهده شدند؛ سپس با دستگاه ترانس لومینوتور UV (uvidoc) ارزیابی شدند.

بررسی بیان پروتئین با روش وسترن بلات

برای بررسی بیان ژن در سطح پروتئین، با استفاده از روش SDS- PAGE نمونه محیط کشت پس از طی مراحل لازم روی ژل‌آکریلامید الکتروفورز شد و سپس با روش وسترن بلات به غشای PVDF (Roche-آلمان) منتقل و با استفاده از آنتی‌بادی‌های اختصاصی (Santa cruz biothecnology) بررسی شد.

همچنین برای بررسی بیان فاکتور رونویسی NF-κB در سطح پروتئین، کل پروتئین سلولی استخراج شد به‌طوری‌که میزان این پروتئین در کل سلول (هم در هسته و هم در سیتوپلاسم) ارزیابی شد.

جدول ۱. پرایمر های طراحی شده برای بررسی بیان ژن های مورد مطالعه

GENES	Primer sequences (5-3)	Annealing Tempreture	Size (bp)
NGAL	Forward: 5□-TCA CCT CCG TCC TGT TTA GG-3´ Reverse: 5□-CGA AGT CAG CTC CTT GGT TC-3´	٦٠ ºC	٢٤٠
Bactin	Forward: 5□-TTC TAC AAT GAG CTG CGT GTG G-3´ Reverse: 5□-GTG TTG AAG GTC TCA AAC ATG AT-3´	٥٩ ºC	١١٥
HO-1	Forward:5□ -ATG ACA CCA AGG ACC AGA GC-3´ Reverse:5□-GTG TAA GGA CCC ATC GGA GA-3´	٥٥ ºC	١٥٣
HO-2	Forward:5□-GGA AAC CTC AGA GGG GGT AG-3´ Reverse:5□-GTG GCC AGC TTA AAC AGC TC-3´	٥٥ ºC	١٩٨
NF-κB	Forward:5□-TGG GAA TGG TGA GGT CAC TC-3´ Reverse:5□-TCT CAT CCT GCA CAG CAG TG- 3´	٥٥ ºC	١٩٧

فاکتور رونویسی NF-κB دارای زیر واحدهای مختلف p50، p65 و RelB است که به‌صورت کمپلکس‌های همودایمر و هترودایمر وجود دارند، با توجه به اینکه در این بررسی اندازه‌گیری میزان تغییردر بیان این فاکتور رونویسی مد نظر محققان بود، بنابراین برای شناسایی این فاکتور از یک آنتی‌بادی پلی کلونال برای زیر واحد NF-κB p65 استفاده شد (Santa cruz biothecnology).

خاموش کردن ژن لیپوکالین۲ به‌وسیله siRNA

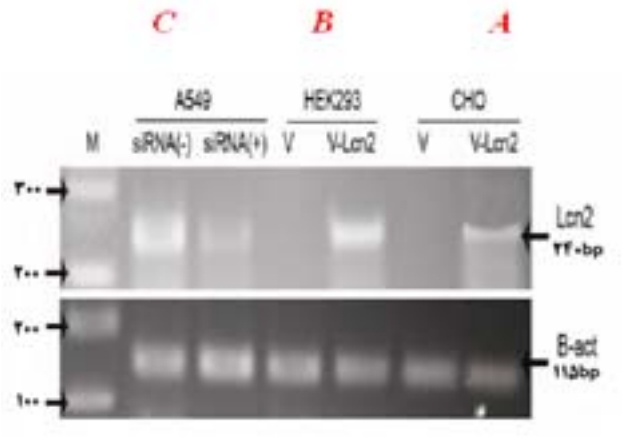
در این مرحله بیان RNA مربوط به لیپوکالین۲ توسط siRNA اختصاصی لیپوکالین۲ (Qia gene,Germany) در سلول‌های A549 (که لیپوکالین۲ را به‌میزان بالایی بیان می‌کنند)، طبق دستورالعمل شرکت سازنده کاهش یافت [۱۶ و۱۷]. ۷۲ ساعت بعد خاموش‌سازی ژن لیپوکالین۲ به‌وسیله PCR و اندازه‌گیری میزان پروتئین ترشح شده به محیط کشت ثابت شد.

یافته‌ها

بیان لیپوکالین۲ در سلول‌های CHO و HEK293T

برای اطمینان از این موضوع که سلول‌هایی که ترانسفکت شده قادر به بیان لیپوکالین۲ هستند، آزمایش RT-PCR انجام شد که نشان‌دهنده بیان لیپوکالین۲ در سلول‌های ترانسفکت شده با PcDNA3.1--Lcn2 و عدم بیان آن در سلول‌های ترانسفکت شده با PcDNA3.1 بود (شکل A ۱ و B ۱).

وجود باند ۲۴۰ جفت بازی دررده های سلولی CHO و HEK293T حاوی ژن لیپوکالین۲ نوترکیب و عدم حضور این باند در رده‌های سلولی فاقد ژن نوترکیب لیپوکالین۲ نشان‌دهنده بیان ژن لیپوکالین۲ درسلول‌های ترانسفکت شده است.



شکل۱. بیان ژن لیپوکالین۲ در رده‌های سلولی ترانسفکت شده با Lcn2 وخاموش‌سازی این ژن در رده سلولی A549 ازطریق SiRNA

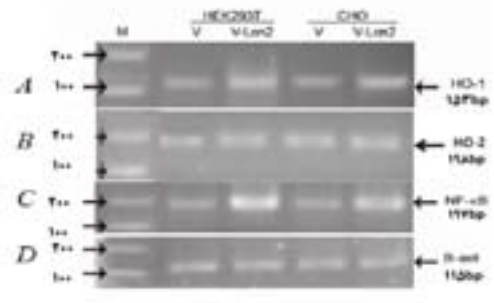
A و B در شکل۱: پس از استخراج RNA از سلول‌های ترانسفکت شده با PCDNA3.1–Lcn2 وسلول‌های ترانسفکت شده با PCDNA3.1، CDNA مربوط به آن‌ها سنتز شده و با استفاده از پرایمرهای اختصاصی برای Lcn2 آزمایش PCR انجام شد، حضور باند ۲۴۰ جفت بازی در سلول‌های ترانسفکت شده با وکتور حاوی ژن Lcn2 (v-Lcn2) نشانگر بیان ژن لیپوکالین۲ در این سلول‌هاست.

C: برای اطمینان ازخاموش‌سازی ژن لیپوکالین۲ در رده سلولی A549 آزمایش‌های RT-PCR و انجام شد و محصولات PCR روی ژل آگارز ۲ درصد توسط الکتروفورز جداسازی و ارزیابی شد. کاهش بیان لیپوکالین۲ درسلول‌های ترانسفکت شده با SiRNA (SiRNA+) در مقایسه با سلول‌های کنترل (SiRNA-) نشان‌دهنده خاموش‌سازی صحیح بیان لیپوکالین۲ توسط SiRNA است.

باندهای ردیف پایین نشان‌دهنده بیان یکسان Bactin در سلول‌های ترانسفکت شده با وکتور pcDNA و-pcDNA Lcn2 است.و M؛ نشانگر ۱۰۰ جفت باز است.

افـزایش بیـان HO-1 در رده‌هـای سـلولی مولـد لیپوکالین ۲

برای روشن شدن تاثیر لیپوکالین۲ بر بیان آنزیم‌های HO-1 و HO-2 آزمـایش RT- PCR بـا پرایمرهـای اختـصاصی هم‌اکسیژنازI و II صورت گرفت و از B-actin نیـز بـه‌عنـوان کنترل استفاده شد. نتایج RT-PCR روی ژل آگـارز ۲ درصـد نشان‌دهنده افزایش RNA مربوط به HO-1 در HEK-Lcn2 و CHO-Lcn2 در مقایسه با سلول‌های کنترل است (شکل A ۲). اما میزان بیان RNA مربـوط بـه HO-2 در سـلول‌هـای مولـد لیپوکالین۲ هیچ تفاوتی را نسبت به سـلول‌هـای کنتـرل نـشان نمی‌دهد زیرا HO-2 یک آنزیم پایدار و غیرقابل القـا اسـت و بیان آن نسبت بـه سـلول‌هـای کنتـرل تغییـری نکـرده اسـت (شکلB ۲). همچنین نتایج وسترن بلات نشان‌دهنـده افـزایش HO-1 درسطح پروتئین در سلول‌هـای HEK-Lcn2 و CHO-Lcn2 در مقایسه باسلول‌های کنترل اسـت در حـالی‌کـه بیـان پـروتئین هـم‌اکـسیژنازII در سـلول‌هـای مولـد لیپوکـالین۲ و سلول‌های کنترل یکسان است (شکل‌های A ۳ و B ۳).



شـکل۲. افـزایش بیـان HO-1 و NF-κB در رده‌هـای سـلولی مولـد لیپوکالین۲

A در شکل ۲: نتایج PCR با استفاده ازپرایمرهای اختـصاصی آنزیم هم‌اکسیژنازI افزایش بیان ایـن آنـزیم را در سـلول‌هـای مولـد لیپوکـالین۲ (HEK-V-Lcn2 , CHO-V-Lcn2) نـشان می‌دهد.

B: ژن HO-2 غیرقابـل القـا بـوده وبیـان آن درسـلول‌هـای ترانـسفکت شـده بـا وکتـور نوترکیـب حـاوی ژن Lcn2 (VECTOR-Lcn2) تفاوتی با سلول‌های ترانـسفکت شـده بـا وکتور خالی (V) ندارد.

C: افـزایش بیـان NF-κB در سـلول‌هـای مولـد لیپوکـالین۲ (HEK-V-Lcn2 ,CHO-V-Lcn2) نـشانگر اثـر القـا کننـدگی لیپوکالین۲ بر این فاکتور رونویسی است.

D: بیان یکسان بتا اکتین در سلول‌های ترانسفکت شده با وکتور pcDNA و pcDNA-Lcn2 وM؛ نشانگر ۱۰۰ جفت باز است

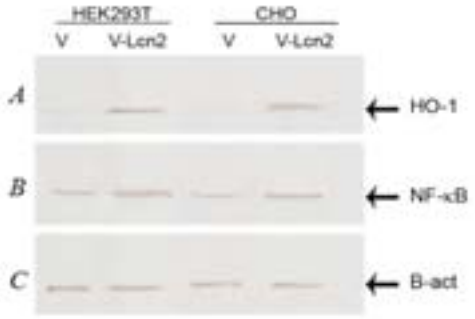
افـزایش بیـانNF-κB در رده‌هـای سـلولی مولـد لیپوکالین۲

برای اثبات این فرضیه که لیپوکالین۲ قادر به فعال‌سازی فاکتور رونویسی NF-κB است، آزمـایش‌هـای RT- PCR و وسـترن بلات طراحی شد. نتایج PCR نشان‌دهنـده افـزایش در میـزان RNA مربوط به NF-κB در سلول‌هـای مولـد لیپوکـالین۲ در مقایسه با سلول‌های کنترل است (شکلC ۲). همچنـین نتـایج وسترن بلات افزایشNF-κB در سـطح پـروتئین را نیـز تأییـد می‌کند (شکل C ۳).

کاهش بیان HO-1 در اثرخاموش‌سازی لیپوکالین۲ توسط siRNA

بـرای بررسـی تـاثیر خـاموش‌سـازی لیپوکـالین۲ روی بیـان هم‌اکسیژنازI , II و NF-κB از SiRNA استفاده شـد. بـه ایـن منظور siRNA در سلول‌های A549 ترانسفکت شد که پس از انجام RT-PCR، خاموش‌سازی ژن لیپوکالین۲ توسط siRNA تأیید شد (شکلc-1)

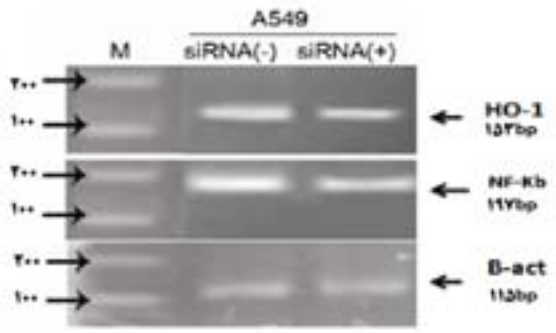
نتایج PCR، کاهش هم‌اکسیژنازI و NF-κB را در سـلول‌هـایی که خاموش‌سازی لیپوکالین۲ در آن‌ها صورت گرفته نسبت بـه سلول‌هایی کـه siRNA کنتـرل در آن‌هـا اسـتفاده شـده نـشان می‌دهد (شکل٤).



شکل۳. نتایج حاصل از وسترن بلات نشان‌دهنده افزایش HO-1, NF-κB در سطح پروتئین است.

در شکل ۳، A وB: وجود باند قویترNF-κB و HO-1 در سلول‌های ترانسفکت شده با وکتور حاوی ژن Lcn2 (HEK-V-Lcn2, CHO-V-Lcn2)، نشانگر افزایش بیان هم‌اکسیژناز Iو NF-κB در حضور لیپوکالین۲ است.

C: بتا اکتین که به‌عنوان کنترل استفاده شده است درسلول‌های ترانسفکت شده با لیپوکالین۲ و سلول‌های کنترل بیان یکسانی را نشان می‌دهد.



شکل٤. خاموش‌سازی لیپوکالین۲ توسط siRNA منجر به کاهش بیان HO-1 وNF-κB می‌شود.

کاهش RNA مربوط به هم‌اکسیژنازI و NF-κB درسلول‌هایی که بیان لیپوکالین۲ در آن‌ها کاهش یافته نشان‌دهنده نقش لیپوکالین۲ در فعال‌سازی بیان هم‌اکسیژنازI از طریق مسیر NF-κB است. بیان هم‌اکسیژنازII پایدار بوده و تغییری در میزان RNA آن مشاهده نشد.

پس از خاموش‌سازی ژن لیپوکالین۲ توسط SiRNA، به‌منظور بررسی بیان آنزیم هم‌اکسیژنازI و فاکتور NF-κB آزمایش‌های RTPCR وPCR انجام شد. نتایج PCR کاهش بیان آنزیم هم‌اکسیژنازI و فاکتور NF-κB را در سلول‌های siRNA(+) در مقایسه با سلول‌های SiRNA(-) نشان می‌دهد.

بحث

نتایج بسیاری از مطالعات بر دخالت لیپوکالین‌ها در روند التهابات سلولی دلالت دارند و ثابت شده است که لیپوکالین‌ها به لیگاندهای مختلفی که در هموستاز و التهاب دخیل هستند، متصل می‌شوند [۱، ۹، ۲۱، ۲۲ و۲۳]. همچنین در بسیاری از بیماری‌ها که تولید رادیکال‌های آزاد افزایش یافته است (سرطان، صدمات کلیوی و...) نیز افزایشی را در لیپوکالین۲ شاهد هستیم. بنابراین احتمال می‌رود که لیپوکالین۲ در برابر استرس اکسیداتیو ناشی از ROS نقش داشته باشد.

به‌عنوان مثال ری یانو (Rie yano) و همکارانش در بررسی آسیب حاد ریوی ایجاد شده توسط LPS و DEP به افزایش قابل توجهی در بیان 24p3 اشاره می‌کنند، DEP شامل انواع مختلفی از فلزات سنگین همچون آهن و مس است که قادر است از طریق یک کاتالیز وابسته به آهن، سوپراکسید و H2O2 را به رادیکال‌های هیدروکسیل مبدل سازد [۲۲]. بنابراین به‌نظر می‌رسد بیان 24P3 در آسیب حاد ریوی وابسته به تولید رادیکال‌های آزادی باشد که توسطLPS و DEP ایجاد شده‌اند، ژن لیپوکالین۲ انسانی دارای ۹۶ درصد همولوژی با ژن 24P3 است و احتمالاً دارای نقشی مشابه 24p3 در التهاب وابسته به LPS و DEP است.

همچنین نتایج یک بررسی نشان می‌دهد که استرس ناشی از هیپوکسیا و ایسکمی حاد قلبی بیان لیپوکالین۲ را افزایش می‌دهد و در واقع ترشح لیپوکالین۲ پاسخی است

که این سلول‌ها به استرس ناشی از هیپوکسیا نشان می‌دهند [۲۳ و۲٤]. به‌علاوه رودکنار (Roudkenar) و همکارانش در سال ۲۰۰۸ ثابت کردند که لیپوکالین۲ یک فاکتور محافظتی در برابر سیتوتوکسیتی H2O2 و رادیکال‌های آزاد ناشی از آن است [۱۷].

از سوی دیگر، مطالعات گسترده‌ای نیز بر نقش مفید HO-1 در محافظت بسیاری بافت‌ها از جراحات التهابی و اکسیداتیو متمرکز شده است. هم‌اکسیژناز حساسترین آنزیم آنتی‌اکسیدان در برابر استرس سلولی است [۲۵]. این آنزیم دارای عملکردهای متنوعی است اما مهمترین وظیفه هم‌اکسیژناز دفاع در برابر استرس اکسیداتیو است. هم اکسیژناز از یک سو با تخریب Heme از تولید ROS و تخریب لیپیدها، پروتئین‌ها و DNA جلوگیری می‌کند [۱۹] و از سوی دیگر با تبدیل Heme به بیلی‌روبین، بیلی‌وردین و مونوکسیدکربن که دارای نقش آنتی‌اکسیدان هستند و گاهی به‌عنوان پاک کننده رادیکال‌های آزاد اکسیژن عمل می‌کنند، با آثار سیتوتوکسیک ناشی از استرس‌های سلولی مقابله می‌کند [۲٦].

نتایج این یافته‌ها وتمرکز بر عملکرد هم‌اکسیژناز به‌عنوان حساس‌ترین آنزیم آنتی‌اکسیدان، محققان حاضر را به این نکته رهنمون کرد که احتمالاً لیپوکالین۲ دارای اثرهای مثبت بر بیان آنزیم هم‌اکسیژناز است. برای این منظور وکتور PcDNA3.1 حاوی ژن لیپوکالین۲ به سلول‌های CHO و HEK293T ترانسفکت شد، سلول‌های CHO و HEK293T فاقد لیپوکالین۲ هستند؛ بنابراین پس از انجام ترانسفکشن با بررسی بیان lcn2 ورود ژن به درون سلول تأیید و رده پایدار مولد لیپوکالین۲ ایجاد شد.

مشاهده افزایش بیان HO-1 در سلول‌های حاوی ژن نوترکیب لیپوکالین۲ در مقایسه با سلول‌های کنترل نشان‌دهنده نقش لیپوکالین۲ در القای هم اکسیژنازI است. همچنین برای تأیید این فرضیه بیان لیپوکالین۲ در سلول‌های A549 به‌وسیله SiRNA خاموش شد که نتایج یافته‌های حاضر در مرحله قبل را تأیید نمود.

بررسی نمونه‌های بافتی موش‌هایی که در بیان آنزیم HO-1 نقص دارند، حساسیت بالایی را به اندوتوکسین و هیپوکسیا نشان می‌دهد. این شواهد بیان‌کننده نقش محافظتی آنزیم هم‌اکسیژناز در بیماری‌های مرتبط با استرس اکسیداتیو است [۲۰]. همچنین در بسیاری عوارض و بیماری‌هایی که رادیکال‌های آزاد و استرس ناشی از آن‌ها نقش قابل توجهی دارد بیان القا یافته‌ای هم در هم‌اکسیژنازI وهم در لیپوکالین۲ دیده می‌شود. بنابراین به‌نظر می‌رسد آنزیم هم‌اکسیژنازI و لیپوکالین۲ در تعدیل این شرایط استرس‌زا با یکدیگر همکاری می‌کنند.

تعداد زیادی از تعدیل کننده‌های التهاب مانند IL10، Rapamycin، Statin ها، 15-PDGJ2 و... از طریق عملکرد HO-1 تأثیرات ضد التهابی خود را اعمال می‌کنند. برای مثال IL10 برای القای تأثیر خود در ماکروفاژها به عملکرد تقویتی هم‌اکسیژنازI نیازمند است و در صورت بلوکه شدن هم‌اکسیژنازI، IL10 نمی‌تواند خصوصیات ضد التهابی خود را آشکار کند [۲۷]. بنابراین چندان دور از ذهن نخواهد بود که لیپو کالین۲ نیز از طریق هم‌اکسیژناز اثرهای خنثی کننده خود را بر استرس اکسیداتیو اعمال کند.

کیوشی موری (Kiyoshi mori) در آزمایش‌های خود روی موش‌هایی که دچار نکروز حاد ریوی (Acute tubular necrosis) شده بودند انباشتگی فراوانی از لیپوکالین۲ را در لوله‌های پیچیده نزدیک کلیه تشخیص داد. همچنین نتایج این آزمایش‌ها نشان داد که درمان با ۱۰-۱۰۰µg لیپوکالین۲ سبب افزایش بیان HO-1 (Fold 10-5) در ایسکمی بافتی می‌شود، در این مورد به‌خصوص درحالی‌که لیپوکالین۲ باعث محافظت کلیه از Ischemia reperfusion damage می‌شود، تزریق مهار کننده هم‌اکسیژناز سبب بلوکه شدن این اثر محافظتی می‌شود این

مسئله نشان می‌دهد که فعالیت هم‌اکسیژناز برای عملکرد محافظتی لیپوکالین۲ در این نوع آسیب ضروری است [۲۸].

نتایج آزمایش‌ها PCR و western blot نشان داد که بیان آنزیم هم‌اکسیژنازII در سلول‌های حاوی لیپوکالین۲ نوترکیب هیچ تفاوتی با سلول‌های کنترل ندارد. این نتیجه بر این مسئله تأکید می‌کند که درحالی‌که بیان HO-1 قابل القا بوده و نشانه‌ای برای استرس اکسیداتیو در سلول‌های پستانداران است بیان HO-2 غیرقابل القاء بوده و در سطح پایه باقی می‌ماند [۲۹].

مطالعات متعددی نیز روی نقش لیپوکالین ۲ به‌عنوان یک ضد آپوپتوز صورت گرفته است. یک آنتی‌بادی پلی‌کلونال طراحی شده برای لیپوکالین۲ می‌تواند آپوپتوز را در سلول‌های A549 تا ٢٤ ساعت القا کند. همچنین در همین بررسی استفاده از siRNA برای لیپوکالین۲ باعث افزایش فعالیت آپوپتوزیک داروی ضد التهاب Celecoxib شد [۷]. بررسی‌های مختلف دیگری نیز بر نقش لیپوکالین۲ به‌عنوان یک عامل ضد آپوپتوز دلالت دارند [٤، ۸ و۳۲-۳۰]. با این وجود عملکرد دقیق لیپوکالین۲ در برابر آپوپتوز مشخص نیست.

دویردی (Devireddy) و همکارانش در نتیجه بررسی‌های خود این پیشنهاد را مطرح می‌کنند که فعالیت پیش حیاتی (Pro survival) در مورد لیپوکالین۲ به‌علت توانایی آن برای اتصال به آهن و انتقال آن به درون سلول است، به‌طوری‌که احتمالاً لیپوکالین۲ با حمل آهن و وارد کردن آن به درون سلول سبب جلوگیری از آپوپتوز می‌شود [۳۳]. اما با توجه به نتایج آزمایش‌های تحقیق حاضر می‌توان احتمال دیگری را مطرح نمود؛ از آنجایی‌که هم‌اکسیژناز نیز مرگ سلولی آپوپتوتیک را کاهش می‌دهد [٣٤]، ممکن است لیپوکالین۲ از طریق القای هم‌اکسیژناز قادر به تعدیل آپوپتوز باشد. از سوی دیگر به‌نظر می‌رسد لیپوکالین۲ برای مخابره پیام‌های خود به هم‌اکسیژناز وفعال کردن آن به سیگنال‌های سلولی و فاکتورهای ترجمه نیازمند باشد. نتایج بررسی حاضر حکایت از افزایش NF-κB در حضور لیپوکالین۲ هم در سلول‌های CHO و هم HEK293T دارد. همچنین با خاموش کردن ژن لیپوکالین۲ توسط siRNA، کاهش NF-κB و به تبع آن کاهش هم‌اکسیژنازI در سطح پروتئین و RNA مشاهده شد. ناحیه ٥َ فرادست ژن هم‌اکسیژنازI دارای بایندینگ سایت برای NF-κB و AP2 است و این فاکتورهای رونویسی در تنظیم بیان هم‌اکسیژنازI مؤثرند. همچنین NF-κB در تنظیم بسیاری از فعالیت‌های سلولی همچون استرس، آسیب‌های سلولی و پاسخ‌های التهابی دخالت دارد [۳۵]، بنابراین احتمال می‌رود که لیپوکالین۲ بتواند از طریق NF-κB بر بیان هم‌اکسیژناز I اثرگذار باشد.

به‌طور کلی با توجه به نتایج آزمایش‌هایی که توسط گروه تحقیقاتی حاضر انجام شد، به‌نظر می‌رسد که لیپوکالین۲ بتواند با فعال کردن هم‌اکسیژنازI از طریق مسیر NF-κB با استرس اکسیداتیو و احتمالاً آپوپتوز مقابله کرده و سبب تعدیل التهابات سلولی ناشی از ROS شود. شاید خصوصیات منحصر به فرد لیپوکالین۲، مربوط به فعال کردن واسطه‌ها و آنزیم‌هایی همچون HO-1 است که آثار حفاظتی لیپوکالین۲ در برابر ROS را اعمال می‌کنند.

References

1. **Flower DR**. Beyond the superfamily: the lipocalin receptors. Biochim Biophys Acta 2000; 1482: 327-36.
2. **Flower DR.** The lipocalin protein family: structure and function. Biochem J 1996;318 (Pt 1):1-14.
3. **hraba renevey S, Turler H, kress M, Salomon C, Weil R.** Sv40 induced expression of mouse gene 24p3 involves a post transcriptional mechanism. Oncogene 1989; 4: 601-8.
4. **Kjeldsen L, Cowland JB, Borregaard N.** Human

neutrophil gelatinase-associated lipocalin and homologous proteins in rat and mouse Biochimica et Biophysica Acta (BBA) 2000;1482:272-83

5. **Triebel S, Blaser J, Reinke H, Tschesche H, Harrison PM, Arosio P.** The ferritins:molecular proper- kDa -2-microglobulin-related protein is a component of the 125 kDa ties, iron storage function and cellular regulation. Biochim. Biophys. Form of human gelatinase. FEBS Lett 1996; 3: 386–8.
6. **Cowland JB, Sørensen DE, Sehested M, Borregaard N.** Neutrophil gelatinase-associated lipocalin is up-regulated in human epithelial cells by IL-1 but not by TNF-a. J Immnunol 2003; 171: 6630–9.
7. **Tong Z, Wu X, Ovcharenko D, Zhu J, Chen C-S, Kehrer JP.** Neutrophil gelatinase-associated lipocalin as a survival factor. Biochem J 2005;391:441–8.
8. **Lannetti A, Pacifico F, Acquaviva R, Lavorgna A, Crescenzi E, Vascotto C, et al.** The neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL),a NF-B-regulated gene, is a survival factor for thyroid neoplastic cells. PNAS 2008; 37: 14058–63.
9. **Katano M, Okamoto K, Arito M, Kawakami Y, Kurokawa MS, Suematsu N, et al.** Implication of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor induced neutrophil gelatinase-associated lipocalin in pathogenesis of rheumatoid arthritis revealed by proteome analysis. Arthritis Res Ther 2009;11:in press.
10. **Sunil VR, Patel KJ, Nilsen-Hamilton M, Heck DE, Laskin JD, Laskin DL.** Acute endotoxemia is associated with upregulation of lipocalin 24p3/Lcn2 in lung and liver. Exp Mol Pathol 2007;83:177-87.
11. **Zhang H, Xu L, Xiao D, Xie J, Zeng H , Wang Z et al**. Upregulation of neutrophil gelatinase-associated lipocalin in oesophageal squamous cell carcinoma:significant correlation with cell differentiation and tumour invasion. J Clin Pathol 2007;60:555–61
12. **Seth P, Porter D, Lahti-Domenici J, Geng Y, Richardson A, Polyak K.** Cellular and Molecular Targets of Estrogen in Normal Human Breast Tissue. Cancer Res 2002;62:4540-4.
13. **Cho H, Kim J-H.** Lipocalin2 Expressions Correlate Significantly With Tumor Differentiation in Epithelial Ovarian Cancer. J. Histochem. Cytochem 2009;57:513-21.
14. **Roudkenar MH, Kuwahara Y, Baba T, Roushandeh, A. M, Ebishima, S, Abe, S, et al.** Oxidative stress induced lipocalin 2 gene expression: addressing its expression under the harmful conditions. J Radiat Res (Tokyo) 2007;48:39-44.
15. **Lavrovsky Y, Song CS, Chatterjee B, Roy AK.** Age-dependent increase of heme oxygenase–1 gene expression in the liver mediated by NFkB. Mech Ageing Dev 2000;114:49–60.
16. **Roudkenar MH, Ghasemipour Z, Halabian R, Roushandeh, A. M, Yaghmai P, Gharehbaghian A ,et al.** Lipocalin 2 acts as a cytoprotective factor against cisplatin toxicity, an in vitro study. Daru 2008;16:106-11.
17. **Roudkenar M, Halabian R, Ghasemipour Z, Roushandeh A, Rouhbakhsh M, Nekogoftar M, et al.** Neutrophil Gelatinase-associated Lipocalin Acts as a Protective Factor against H2O2 Toxicity. Arch Med Res 2008; 39: 560-6.
18. **Katori M, Dean M. Anselmo, Ronald WB, Jerzy WK.** A novel strategy against ischemia and reperfusion injury: cytoprotection with heme oxygenase system, Transpl Immunol 2002; 9: 227–33.
19. **Kumar S, Bandyopadhyay U.** Free heme toxicity and its detoxification systems in human. Toxicol Lett 2005; 157: 175-88.
20. **Immenschuh S, Ramadori G.** Gene Regulation of Heme Oxygenase-1 as a Therapeutic Target. Biochem Pharmacol 2000; 60: 1121–8.
21. **Canteli MC, Medina RL, SanCristobal MS, Barrientos AA, Santos A, Castillo AP**. CCAAT/enhancer binding protein β deficiency provides cerebral protection following excitotoxic injury. J Cell Sci 2008; 121: 1224-34.

22. **Yanagisawa R, Takano H, Inoue K-I, Ichinose T, Yoshida Si, Sadakane K, et al**. Complementary DNA Microarray Analysis in Acute Lung Injury Induced by Lipopolysaccharide and Diesel Exhaust Particles. Exp Biol Med 2004;229:1081-7.

23. **Hemdahl AL, Gabrielsen A, Zhu C, Eriksson P, Hedin U, Kastrup J, et al.** Expression of neutrophil gelatinase-associated lipocalin in atherosclerosis and myocardial infarction. Arterioscler Thromb Vasc Biol 2006; 26: 136–42.

24. **Wenlei J, Marco C, Manuela MS.** Anemia upregulates lipocalin2 in the liver and serum. Blood Cells Mol Dis 2008; 41: 169-74.

25. **Hayashi K, Haneda M, Koya D, Maeda S, Isshiki K, Kikkawa R.** Enhancement of glomerular heme oxygenase-1 expression indiabetic rats. Diabet Res Clin Pract 2001; 52: 85–96.

26. **Kikuchi G, Yoshida T, Noguchi M.** Heme oxygenase and heme degradation. Biochem Biophys Res Commun 2005; 338: 558–67.

27. **Bach FH.** Heme oxygenase-1 and transplantation tolerance. Hum Immunol 2006;67:430-2.

28. **Mori K, Lee HT, Rapoport D, Drexler IR, Foster K, Yang J, et al.** Endocytic delivery of lipocalin-siderophoreiron complex rescues the kidney from ischemia-reperfusion injury .Citation for this article: J Clin Invest 2005; 115: 610–21.

29 **Ryter S, kvam E, Richman L, Hartmann F, Tyrrell RM.** A chromatographic assay for heme oxygenase activity in cultured human cells: application to artificial heme oxygenase overexpression . Free Radical Biol Med 1998; 24: 959–71.

30. **Bratt T.** Lipocalins and cancer. Biochem Biophys Acta 2000; 1482: 318-26.

31. **Kehrer JP.** Lipocalin-2: pro- or anti-apoptotic? Cell Biol Toxicol 2009.

32. **Gentili C, Tutolo G, Zerega B, Di Marco E, Cancedda R, Cancedda FD.** Acute phase lipocalin Ex-FABP is involved in heart development and cell survival. J Cell Physiol 2005;202:683-9.

33. **Devireddy LR, Gazin C, Zhu X, Green MR.** A cell-surfacereceptor for lipocalin 24p3 selectively mediates apoptosis and iron uptake. Cell 2005; 123: 1293–305.

34. **Bussolati B, Ahmed A, Pemberton H, Landis R. C, Di Carlo F, Haskard D. O,et al.** Bifunctional role for VEGF-induced heme oxygenase-1 in vivo: induction of angiogenesis and inhibition of leukocytic infiltration. Blood 2004;103:761-6.

35. **Lavrovsky Y, Schwartzman ML, Levere RD, Kappas A, Abraham NG.** Identification of binding sites for transcription factors NFkB and AP-2 in the promoter region of the human heme oxygenase 1 gene. Proc Natl Acad Sci USA 1994; 91, 5987–91.

Original Article

Induction of Heme Oxygenase -1 by Lipocalin 2 Mediated by NF-κB Transcription Factor

Bahmani P., M.Sc., Halabian R., M.Sc., Masroori N., M.Sc., Rouhbakhsh M., M.Sc., Ebrahimi M., M.Sc., Nourani M.R., Ph.D., Shokrgozar M.A., Ph.D., Habibi Roudkenar M., Ph.D*.

** P.O.Box: 14665-1157, Research Center, Iranian Blood Transfusion Organization, Tehran, Iran*

Abstract

Purpose: Effect of lipocalin 2 on the expression of heme oxygenase I , II and NF-κB transcription factor was the purpose of this survey.

Materials and Methods : Lcn2 was cloned to $pcDNA_{3.1}$ plasmid by using genetic engineering method. The recombinant vector was transfected to CHO and HEK293T to establish stable cell expressing lipocalin 2. The presence of lipocalin 2 gene in these cells was confirmed by using through RT-PCR and western blot analysis. Expression of Lcn2 was also down-regulated by siRNA in A549 cell line. Expression of of heme oxygenase I , II and NF-κB transcription factor were determined in both ectopic expression Lcn2 cells and Lcn2 down regulated cells by using of RT-PCR and western blot analysis.

Results: The results showed that the expression of heme oxygenase I and those of NF-κB were higher in cells expressing recombinant lipocalin2 compared with the control cells. On the other hand, expression of heme oxygenase I and NF-κB in siRNA transfected cells was down-regulated.

Conclusion: These findings indicate that lipocalin2 induces the expression of HO-1 and suggest Lcn2 through NF-κB induces HO-1 expression

Key words : Lipocalin2 , Heme oxygenase I,II , NF-κB , Oxidative stress