مقاله تحقیقی

مطالعه اثر رتینوئیک اسید و میتوژنها بر رشد وزیکول چشمی و لنزی جنین موش و بیان پروتئین Fos در محیط کشت

مرتضی حسین زاده M.Sc.*، ✎ دکتر علی امینی Ph.D.*، دکتر محمد حسین میر مومنی Ph.D.*، مجید چراغی M.Sc.*

* گروه زیست‌شناسی دانشگاه رازی کرمانشاه

تاریخ وصول: اردیبهشت‌ماه ۸۵، تاریخ پذیرش: تیرماه ۸۵

چکیده

هدف: تعیین اثر رتینوئیک اسید ومیتوژنها وبیان پرو تئین Fos بر رشد وزیکول چشمی در موش

مواد و روشها: رتینوئیک اسید(RA) از مشتقات سنتتیک ویتامین A بوده و مصرف زیاد آن باعث ایجاد ناهنجاریهای مادرزادی ونیز افزایش رادیکالهای آزاد ونتیجتاً پراکسیداسیون لیپیدها دربدن می‌شود . میتوژنها به ترکیباتی نظیر Bombesin ,Serum و انسولین که تعداد دفعات تقسیم سلولی را افزایش می‌دهند گفته می‌شود. این ترکیبات یک سری فاکتورهای رشد خارجی هستند که باعث القاء ساخت G1cdk شده و موجب پیشبرد تقسیم سلولی می‌شوند و پرو تئین Fos یکی از عناصر ضروری در پیشبرد تنظیم سیگنالهای میتوژنی است که با بیان ژنهای ثانویه در نهایت موجب تقسیم سلول می‌شود. در این مطالعه از موشهای نژاد Albino- NMRI با عمر متوسط شش هفته و وزن۲±۲٦ گرم استفاده شد. موشها را به صورت یک نر و دو ماده در یک قفس قرار داده و با مشخص شدن روز صفر بارداری در روز ۹/۵ جنینی موشها تشریح و جنینها از رحم خارج شد. سپس در محیط استریل چشم جنینها (وزیکول چشمی و لنزی) را خارج کرده و در ظروف ۲٤Well حاوی محیطهای زیر کشت داده شد: محیط کشتDMEM ,s Dulbecc) (Modified Eagle Medium به عنوان محیط کنترل و انسولین ۲/۵ درصد، سرم ۱۰ درصد و رتینوئیک اسید ۲۵ n M به عنوان گروه‌های تیمار در نظر گرفته شد. سپس ظرف حاوی محیط کشت در انکوباتور شامل Co2 ۵ درصد و دمای ۳۷ درجه قرار داده شد. پس از ۲٤ ساعت با میکروسکوپ Invert قطر ثانویه وزیکولها را اندازه گیری کرده و از روش SDS PAGE (Sodium Doclesyle Sulfate Polyacryle Qmideged electerophoresis) و ژل ۹ درصد برای استخراج پروتئین وزیکولهای محیطهای مختلف استفاده شد . برای ارزیابی داده‌ها از روش آنالیز واریانس یکطرفه (One-way ANOVA) و Tukey's test استفاده شد.

یافته‌ها: رتینوئیک اسید از رشد وزیکولها در تمامی گروه‌های مورد آزمایش جلوگیری می‌کند و میزان پروتئین به طور معنی داری در این محیطها کاهش می یابد.

نتیجه‌گیری: همچنین می‌توان نتیجه گرفت که تنها وجود Fos برای رشد کافی نیست، بلکه وجود میتوژنها نیز ضروری است.

کلیدواژه‌ها: رتینوئیک اسید، پروتئینFos، میتوژن، وزیکول چشمی، لنز

✎ **آدرس مکاتبه:** کرمانشاه، دانشگاه رازی، گروه زیست‌شناسی
کد پستی: ٦٧١٤٩٦٧٣٤٦ E-mail: aamini@razi.ac.ir

مقدمه

رتینوئیک اسید یکی از مشتقات ویتامین A است که مصرف زیاد آن باعث افزایش رادیکالهای آزاد ودر نتیجه پراکسیداسیون لیپیدها در بدن می‌شود[۱]. رتینوئیک اسید و ایزومرهای آن همانند هورمونها در بیان ژن اثر گذاشته و سبب شروع یک سری آثار فیزیولوژیک در سلولها می‌شود. (All ATRA Trans Retinoic Acid) در داخل هسته، به گیرنده پروتئینی (Retinoic Acid Receptor) RAR و 9-Cis RA به RXR (Retinoid X Receptor) متصل می‌شود. بعد از اتصال هر کدام از آنها به رسپتور خود، هترودیمر RAR / RXR تشکیل می‌شود که به ناحیه تنظیمی ژن یعنی (Retinoic Acid RARE Response Element)متصل می‌شود. اتصال هترودیمر RAR / RXR به RARE در روی ژنها کمپلکسی را تشکیل می‌دهد که میزان نسخه برداری را تحت تاثیر قرار می‌دهد[۲]. رتینوئیک اسید به طور معمول وارد هسته شده و به RAR متصل می‌شود، اما در صورت وجود (Cellular Retinoic CRABPs Acid Binding Protein) به آن متصل شده و از وارد شدن به هسته باز می‌ماند و به این ترتیب، غلظتهای متفاوت رتینوئیک اسید در بافتها نقش کنترلی خود را نشان می‌دهد[۳]. وجود رتینوئیک اسید اضافی در بافتهایی که دارای RAR و CRABP I هستند نقش تراتوژنی نشان می‌دهد[٤].

پروتوانکوژنها دسته‌ای از پروتئینهای درون سلولی اند که به طور طبیعی برای رشد سلول ضروری بوده و در راستای تکامل، کد ژنتیکی آنها حفظ شده است، اما میزان و زمان بیان آنها به وسیله هورمونها و سیگنالهای مختلف کنترل می‌شود. هرگاه بیان آنها کنترل شده باشد، فقط سبب رشد سلولی می‌شوند، ولی اگر به دلایلی از کنترل خارج شوند به پروتئینهای انکوژن تبدیل شده، سبب تکثیر بیش از حد سلولها و ایجاد تومورهای سلولی می‌شوند. پروتو انکوژن c-fos یکی از ژنهایی است که از نظر تکاملی در تمامی مهره داران حفظ شده است پروتئین Fos یکی از عناصر ضروری در پیشبرد تنظیم سیگنالهای میتوژنی می‌باشد که با بیان ژنهای ثانویه نهایتا موجب تقسیم سلول می‌گردد[۵]

پروتو انکوژن c-fos و c-jun پروتئینهایی را به رمز در می‌آورد که با همدیگر تشکیل هترودیمری را می‌دهند که به نام فاکتور نسخه برداری AP1 شناخته می‌شود که به توالی کوتاه درون پروموتور و enhancer متصل شده و تعداد رونوشتهای مربوط به RNA پلیمراز II را کاهش یا افزایش می‌دهند. Fos و jun به تنهایی نیز به عنوان فاکتور نسخه برداری عمل می‌کنند c-fos و c-myc نسخه برداری ژنهایی را که موجب پیشبرد سلول از فاز G1 به فاز S در تقسیم سلولی می‌شود را تحریک می‌کند. در سلولهای سرطانی این فاکتورهای نسخه برداری در غلظت بالایی در درون سلول بیان می‌شوند. پروتو انکوژنها به توالی enhancer و Fos به جایگاه اتصالی AP1 که در پروموتور اکثر ژنها یافت می‌شود متصل می‌گردد. رتینوئیک اسید با جلوگیری از فعال شدن AP-1 تقسیم عادی سلولی را مهار میکند [٦].

میتوژنها به ترکیباتی نظیر Bombesin, Serum و انسولین که تعداد دفعات تقسیم سلولی را افزایش میدهند گفته می‌شود. این ترکیبات یک سری فاکتورهای رشد خارجی هستند که باعث القاء ساخت(Cycline Dependent kKinase) G1cdk شده و موجب پیشبرد تقسیم سلولی می‌گردند[٦]. نقش انسولین و سرم در پیشبرد تکثیر سلولی در آزمایشهای متفاوت اثبات شده است. البته نقش میتوژنی انسولین بیشتر در فراهم کردن شرایط مناسب برای رشد سلولها و آماده شدن برای تقسیم است. با اتصال انسولین به رسپتورش و فعال شدن آن، یک مسیر سیگنالی خاصی راه می‌افتد که موجب فعال شدنMAPK (Mitogen Activated Protein Kinase) می‌شود که وجود این پروتئین برای پاسخ میتوژنیک ضروری است[۷].

مواد و روشها

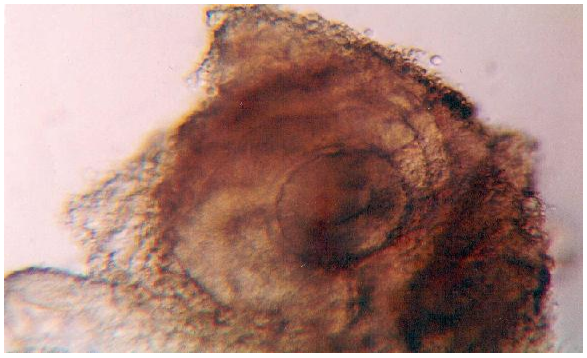
در این مطالعه از موشهای نژاد Albino- NMRI با عمر متوسط شش هفته و وزن۲±۲٦ گرم که در دمای۲± ۲۲ سانتی گراد نگهداری می‌شد، استفاده گردید. این موشها در شرایط ۱۲

ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی قرار گرفتند. موشها را به صورت یک نر و دو ماده در یک قفس قرار داده و مشاهده پلاک واژینال روز صفر بارداری در نظر گرفته شد و در روز جنینی ۹/۵ موشها تشریح و جنینها را از رحم خارج شدند. سپس در محیط استریل با استفاده از تیغ لانست و پنس ظریف چشم جنینها (وزیکول چشمی و لنزی) را خارج کرده و در ظروف ۲٤ Well حاوی محیطهای زیر کشت داده شد. محیط کشت DMEM به همراه آنتی بیوتیک (peneciline/streptomicine) ۱ درصد به عنوان محیط کنترل در نظر گرفته شد و این ترکیبات به اضافه انسولین ۲/۵ درصد، سرم ۱۰ درصد و رتینوئیک اسید ۲۵ nM به عنوان گروههای تیمار در نظر گرفته شد. سپس ظرف حاوی محیط کشت در انکوباتور شامل Co2 ۵ درصد و دمای ۳۷ درجه در شرایط مرطوب قرار داده شد. پس از گذشت ۲٤ ساعت با استفاده از میکروسکوپ Invert قطر ثانویه وزیکولها رادردو جهت بلند ترین قطر وزیکول با گراتیکولیس اندازه گیری کرده و پروتئین وزیکولهای محیطهای مختلف برای الکتروفورز استخراج شد. برای جدا کردن پروتئینها از روش SDS PAGE و ژل ۹ درصد استفاده شد. برای ارزیابی دادهها از روش آنالیز واریانس یکطرفه (One-way ANOVA) و Tukey's test استفاده شد. سپس پروتئین وزیکولهای چشمی تیمارهای مورد آزمایش استخراج و به منظور الکتروفورز از آن استفاده شد.

یافتهها

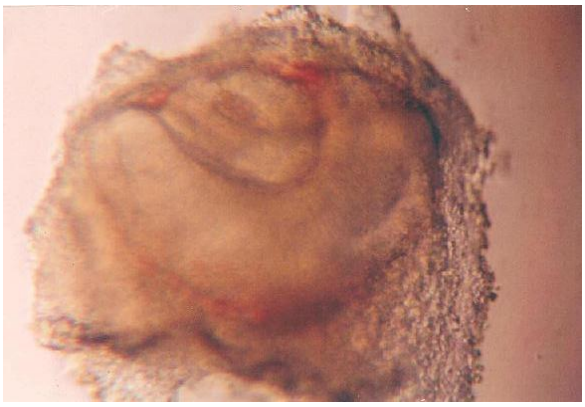
بین قطر اولیه وزیکولهای واقع شده در محیطهای مختلف با همدیگر تفاوت معنی داری دیده نشد. بنابراین در مطالعات محققین حاضر تنها قطر ثانویه وزیکولهای تیمارهای مختلف با قطر ثانویه وزیکولهای کنترل مقایسه شد. آنالیز آماری بین گروههای این آزمایش نشانگر اختلاف بین وزیکولهای کشت شده در محیط حاوی انسولین (شکل۲) و وزیکولهای کشت شده در محیط حاوی سرم (شکل ۳) و وزیکولهای کشت شده در محیط دارای سرم و انسولین (شکل ٤) با وزیکولهای کشت شده در محیط کنترل (شکل ۱) است {F(4,25)=17.64 ،{p<0.0001 . همچنین بررسی post hoc نشان داد که اختلاف بین وزیکولهای کشت شده در محیط حاوی انسولین با وزیکولهای کشت شده در محیط کنترل دارای تفاوت معنی داری در سطح p<0.05 است. وزیکولهای کشت شده در محیط سرم و وزیکولهای کشت شده در محیط سرم و انسولین با کنترل در سطح p<0.01 دارای اختلاف معنی دار بودند (نمودار ۱).

شکل ۱. وزیکول چشمی ۹/۵ روزه در محیط کنترل (DMEM + آنتی بیوتیک)، بزرگنمایی: ۱۰۰×

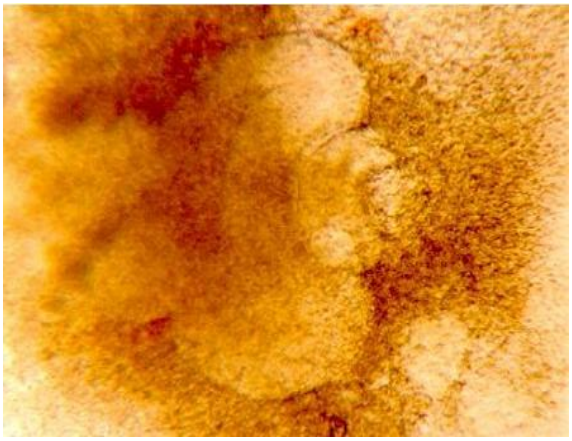


شکل۲. وزیکول چشمی ۹/۵ روزه در محیط انسولین، بزرگنمایی: ۱۰۰×

مقایسه وزیکولهای کشت شده در محیط انسولین و سرم با وزیکولهای کشت شده در محیط انسولین و سرم به اضافه رتینوئیک اسید، نشان داد که این دو گروه دارای تفاوت معنی داری در سطح p<0.01 هستند. از تفاوت بین این دو گروه میتوان نتیجه گیری کرد که RA سبب کاهش رشد وزیکولهای چشمی در روز نه و نیم جنینی شده است.

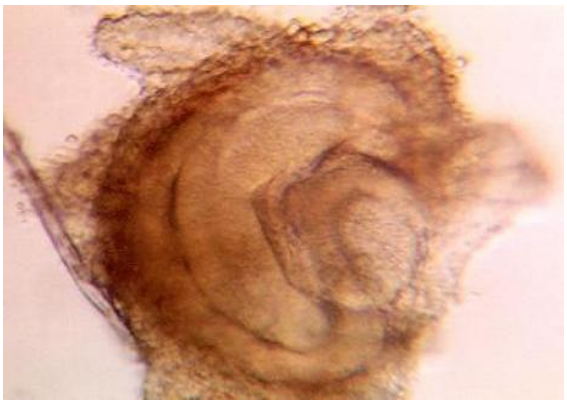


شکل ۳. وزیکول چشمی ۹/۵ روزه در محیط سرم، بزرگنمایی: ۱۰۰×

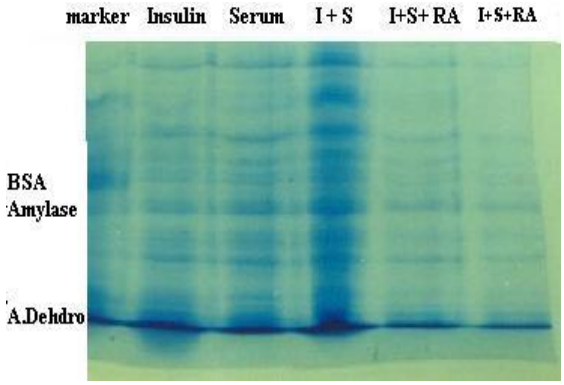


شکل۴. وزیکول ۹/۵ روزه در محیط حاوی سرم و انسولین: بزرگنمایی:۱۰۰ ×

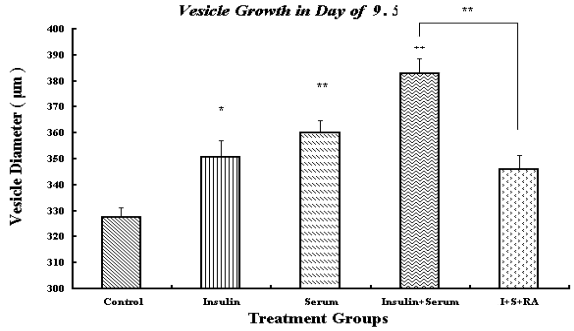
در قسمت دوم کار پروتئیهای وزیکولهای تیمارهای مختلف برای الکتروفورز و SDS-PAGE استخراج شد (شکل ٦) و چون وزن مولکولی Fos بین ٦٢ –٥٥ کیلو دالتون است بنابراین ا از ژل ۹ درصد و مارکرهای آمیلاز با وزن ٤٢ کیلودالتون و BSA با ٦٨ کیلو دالتون به عنوان نشانگر برای شناسایی Fos استفاده شد. نتیجه الکتروفورز نشان داد که میزان بیان پروتئین در محیط انسولین و سرم بیشتر از سایر محیطها بود. همچنین تفاوت معنی داری بین تیمار انسولین سرم با تیمار انسولین سرم به علاوه رتینوئیک اسید و سرم و انسولین به تنهایی دیده می‌شد که میزان پروتئین به طور معنی داری در این محیطها کم می‌شد.



شکل۵. وزیکول ۹/۵ روزه در محیط حاوی سرم, انسولین و رتینوئیک اسید، بزرگنمایی: ۱۰۰×



شکل ۶. الکتروفورز پروتئینهای استخراج شده از وزیکول ۹/۵ روزه روی ژل ۹ درصد SDS-PAGE



نمودار ۱. مقایسه قطر وزیکولها چشمی روز ۹/۵ در تیمارهای مختلف

بحث

رتینوئیک اسید، می‌تواند سبب مهار ژنهایی شود که به وسیله فاکتور نسخه برداری متصل به تشدید کننده AP-1 فعال

می‌شوند. AP-1 برای فعال کردن ژنهایی که مسئول تقسیم سلولی و بیان آنزیم Metalloproteinase, که اجازه مهاجرت سلولی را می‌دهد لازم است [۸].

بیان Fos در وزیکولهای گوش جدا شده از جوجه درمحیط کشت حاوی سرم و انسولین که توانایی میتوژنی دارند، در طی ۲٤ ساعت افزایش نشان می‌دهد بیان Fos به وسیله میتوژنهایی نظیرSerum Bombesin القاء و اثر آنها به وسیله غلظت 25nM رتینوئیک اسید مهار می‌گردد [۹].

آنتی سنس c-fos رشد وزیکولهای گوشی را همراه با کاهش بیان پروتئین Fos مهار می‌کند. غلظت زیاد پروتئین Fos برای حفظ رشد وزیکولهای جدا شده در محیط فاقد میتوژنها کافی نیست. نتایج نشان می‌دهد که بیان پروتئین Fos به صورت تکوینی تنظیم شده است. سطح پروتئین Fos در جنین جوجه بین مرحله هیجده و بیست شدیدا" تغییر می‌کند. در مرحله هیجده کمترین و در مرحله بیست به بیشترین حد خود می‌رسد. اگر در ابتدای آزمایش سطح پروتئین Fos بالا باشد حتی با وجود فقدان سرم و فاکتورهای رشد، غلظت آن به مدت ٢٤ ساعت همچنان بالا نگهداشته می‌شود [۱۰].

درمطالعه حاضر نیز در محیط کنترل همین نتیجه به دست آمد. در شکل مربوط به الکتروفورز پروتئین هریک از تیمارها می‌توان مشاهده نمود که در حضور سرم و انسولین افزایش پروتئین وجود دارد، در حالی که درمحیط دارای رتینوئیک اسید این اثر مهارشده است و در محیط کنترل نیز میزان Fos بالاست، اما با رشد وزیکول روبرو نیستیم این امر می‌تواند ناشی از عدم وجود میتوژنها باشد، پس می‌توان نتیجه گرفت که تنها وجود Fos برای رشد کافی نیست، بلکه وجود میتوژنها نیز ضروری است القای Fos درمحیط دارای سرم و انسولین توسط انکوباسیون وزیکولها در حضور غلظتهای پایین RA مهار می‌گردد [۱۱].

References

1. **Hurnanen D, Chan HM, Kubow S.** The protective effect of metallothionein against lipid peroxidation caused by retinoic acid in human breast cancer cells.j pharmacol Exp Ther 1997; 283: 1520-25.
2. **Semba RD.** The role of vitamin A and related retinoids in immune function. Nutrition Reviews 1998; 56(2): 38-48.
3. **Denker L, Annerwall E, Busch C, Eriksson U.** Localization of specific retinoid-binding sites and expression of cellular retinoic-acid-binding protein (CRABP) in the early mouse embryo. Development 1990; 110: 343-52.
4. **Maden M, Hunt P, Eriksson U, Kuroiwa A, Krumlauf R, Summerbell D.** Retinoic acid-binding protein, rhombomeres, and the neural crest. Development 1991; 140: 25-32.
5. **Krujier W, Cooper J, Hunter T, Verma IM.** Platelate derived growth factor induces rapid but transient expression of the c-fosgene and protein. Nature 1984; 312: 711-6.
6. **Lodish H, Baltimore D, Beer A, Lawrence S, Zipursky Matsudaria P, Darnell J.** Mol Cell Biol 2000, 4thed, New York freeman and Company.
7. **Siddle KRJ, Haigh AC, Hayward AC, Navé BT, Shepherd PR.** Clinical Biochemistry, University of Cambridge. The insulin receptor and its signalling pathways. Exp Biol 2001; 8:93-9
8. **Desbois C, Aubert D, Legrand C, Pain B, Samarut J.** A novel mechanism of action for v-ErbA: Abrogation of the inactivation of transcription factor AP-1 by retinoic acid and

thyroid hormone receptors. Cell 1991; 67: 731-40.

9. **Represa J, Miner C, Barbosa E, Giraldez F.** Bombesin and other growth factors activate cell proliferation in chick embryo Otic Vesicles in culture. Development 1988;103: 187-96.
10. **Leon Y, Sanchez JA, Miner C, Ariza-McNaughton L, Represa J, Giraldes J.** Developmental - Regulation - of - Fos - protein-during Proliferative Growth of the otic vesicle and its Relation to Differentiation induced by Retinoic Acid. Dev Biol 1995; 167: 75-86.
11. **Represa J, Sanchez A, Miner C, Lewis J, Giraldez, F.** Retinoic Acid Modulation of the early development of the inner ear is associated with the control of c-fos expression. Development 1999; 110: 1081-90.