

Effect of Trehalose on the Expression of Heat Shock Protein 70 Gene in PC12 Cells Treated with Hydrogen Peroxide

Mahdieh Nazari-Robati¹,

Akram Norouzi²,

Roya Nasouti³

¹ Assistant Professor, Department of Clinical Biochemistry, Afzalipour School of Medicine, Kerman University of Medical Sciences, Kerman, Iran

² MSc in Clinical Biochemistry, Afzalipour School of Medicine, Kerman University of Medical Sciences, Kerman, Iran

³ MSc Student in Clinical Biochemistry, Afzalipour School of Medicine, Kerman University of Medical Sciences, Kerman, Iran

(Received October 5, 2018 ; Accepted February 5, 2019)

Abstract

Background and purpose: Oxidative stress is implicated in the pathogenesis of various diseases, including neurological disorders. In such stressful conditions, heat shock protein 70 (HSP70) protects cells, thus its pharmacological induction can be protective. The disaccharide trehalose exhibits various beneficial effects, including antioxidative effect. However, its impact on HSP70 is not obvious. This study was conducted to investigate the effect of trehalose on HSP70 gene expression in rat pheochromocytoma PC12 cells treated with hydrogen peroxide.

Materials and methods: PC12 cells were pretreated with trehalose (12.5, 25, 50 mM) for 24 hours, and then were treated with hydrogen peroxide (100 μ M) for 24 hours. Cell viability was determined via MTT assay and HSP70 gene expression was measured using Real-time polymerase chain reaction.

Results: Trehalose pretreatment increased viability of PC12 cells exposed to hydrogen peroxide in a dose dependent manner. Furthermore, HSP70 gene expression upregulated in cells that were pretreated with trehalose. The highest gene expression was at 50 mM trehalose.

Conclusion: Current study showed that terhalose protects PC12 cells against hydrogen peroxide by increasing the expression of HSP70 gene.

Keywords: trehalose, heat shock protein 70, oxidative stress

J Mazandaran Univ Med Sci 2019; 29 (172): 1-9 (Persian).

* **Corresponding Author: Mahdieh Nazari-Robati**- Afzalipour School of Medicine, Kerman University of Medical Sciences, Kerman, Iran (E-mail: mnazari@kmu.ac.ir)

اثر ترهالوز بر بیان ژن پروتئین شوک حرارتی ۷۰ در سلول های PC12 تیمار شده با پراکسید هیدروژن

مهديه نظری رباطی^۱

اکرم نوروزی^۲

رویا ناسوتی^۳

چکیده

سابقه و هدف: استرس اکسیداتیو در پاتوژنز بیماری های مختلفی از جمله اختلالات عصبی دخیل می باشد. در این شرایط استرس زا، پروتئین شوک حرارتی ۷۰ (HSP70) از سلول ها مراقبت می کند. لذا، القاء فارماکولوژیک آن می تواند اثر محافظتی داشته باشد. دی ساکارید ترهالوز دارای اثرات مفید متعددی از جمله اثر آنتی اکسیدانی است. اما اثر آن بر روی HSP70 مشخص نمی باشد. بنابراین، این مطالعه به منظور بررسی اثر ترهالوز بر بیان ژن HSP70 در سلول های PC12 فئوکروموسیتوما می موش صحرایی که با پراکسید هیدروژن تیمار شدند صورت گرفت.

مواد و روش ها: در این مطالعه، سلول های PC12 با ترهالوز (۱۲/۵، ۲۵ و ۵۰ میلی مولار) به مدت ۲۴ ساعت پیش تیمار شدند. سپس، با پراکسید هیدروژن (۱۰۰ میکرومولار) به مدت ۲۴ ساعت تیمار شدند. سپس، میزان بقای سلول ها به روش MTT بررسی شد. علاوه بر این، بیان ژن HSP70 به روش Real-time polymerase chain reaction اندازه گیری شد.

یافته ها: نتایج نشان داد که پیش تیمار با ترهالوز به صورت وابسته به دوز، بقای سلول های PC12 را که با پراکسید هیدروژن مواجهه یافتند افزایش می دهد. علاوه بر این، بیان ژن HSP70 در این سلول ها که با ترهالوز پیش تیمار شدند افزایش یافت. همچنین، حداکثر مقدار بیان این ژن در غلظت ۵۰ میلی مولار ترهالوز به دست آمد.

استنتاج: مطالعه حاضر نشان داد که ترهالوز از طریق افزایش بیان ژن HSP70، از سلول های PC12 در برابر پراکسید هیدروژن محافظت می کند.

واژه های کلیدی: ترهالوز، پروتئین شوک حرارتی ۷۰، استرس اکسیداتیو

مقدمه

علائم مشترکی مثل نقص سیناپسی، سطح بالای استرس اکسیداتیو و التهاب می باشند. استرس اکسیداتیو به دنبال افزایش تولید گونه های فعال اکسیژن دار (ROS) یا Reactive oxygen species (مثل پراکسید هیدروژن، رادیکال های سوپراکسید و هیدروکسیل و کاهش دفاع

بیماری های نورودژنراتیو مانند آلزایمر و پارکینسون، بیماری های دژنراتیو مزمن سیستم عصبی مرکزی هستند. ویژگی مهم این بیماری ها، آسیب پیشرونده نورون ها است که باعث کاهش عملکرد مغز می شود. با وجود تظاهرات بالینی متفاوت، بیماری های نورودژنراتیو دارای

E-mail: mnazari@kmu.ac.ir

مؤلف مسئول: مهديه نظری رباطی - کرمان: انتهای بلوار ۲۲ بهمن، دانشگاه شهید باهنر، دانشکده پزشکی افضلی پور

۱. استادیار، گروه بیوشیمی بالینی، دانشکده پزشکی افضلی پور، دانشگاه علوم پزشکی کرمان، کرمان، ایران

۲. کارشناس ارشد بیوشیمی بالینی، دانشکده پزشکی افضلی پور، دانشگاه علوم پزشکی کرمان، کرمان، ایران

۳. دانشجوی کارشناسی ارشد بیوشیمی بالینی، دانشکده پزشکی افضلی پور، دانشگاه علوم پزشکی کرمان، کرمان، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۱۳/۱۳ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات: ۱۳۹۷/۹/۵ تاریخ تصویب: ۱۳۹۷/۱۱/۱۷

آنتی‌اکسیدانی ایجاد می‌شود. این گونه‌ها می‌توانند باعث آسیب به DNA، اکسیداسیون پروتئین‌ها، پراکسیداسیون لیپیدها و در نهایت آپوپتوز سلول‌های عصبی گردند (۲،۱). H_2O_2 یکی از گونه‌های فعال اکسیژن‌دار است که به عنوان یک محصول جانبی در فرایندهایی مثل اکسیداسیون دوپامین، تجمع آمیلوئید و ایسکمی مغزی ایجاد می‌شود. این ترکیب باعث القای استرس اکسیداتیو و آپوپتوز در سلول‌های مختلف از جمله نورون‌ها می‌شود (۴،۳).

تحت شرایط استرس زا مانند شوک حرارتی، التهاب، استرس اکسیداتیو، هیپوکسی و عفونت، بیان پروتئین‌های شوک حرارتی (Heat shock protein, HSP) افزایش پیدا می‌کند. به طور کلی، HSPها در پستانداران براساس وزن مولکولی به شش خانواده تقسیم می‌شوند. در بین آن‌ها، خانواده HSP70 از نظر تکاملی بسیار حفظ شده و معروف می‌باشد. این خانواده به صورت وابسته به ATP به عنوان چاپرون در تا خوردن، تخریب، ایجاد کمپلکس و جابجایی پروتئین‌ها نقش ایفا می‌کند و مانع از تجمع پروتئین‌ها می‌شود (۵).

نوع قابل‌القا این خانواده که به HSP70i و HSP72 یا به طور کلی HSP70 معروف است توسط انواعی از محرک‌های استرس زا القا می‌شود. در سیستم عصبی، بیان HSP70 در انواعی از شرایط پاتولوژیک مثل بیماری‌های نورودژنراتیو، ایسکمی مغزی، ضربه و صرع افزایش می‌یابد (۷،۶). مطالعات نشان می‌دهند که افزایش HSP70 در این شرایط از طریق دو مکانیسم باعث محافظت از سلول‌های عصبی می‌شود. اول این که، به علت داشتن خاصیت چاپرونی مانع از تجمع پروتئین‌های آسیب دیده در سلول می‌شود. دوم این که، باعث کاهش التهاب و مهار آپوپتوز در سلول‌های عصبی می‌گردد. بنابراین، استراتژی‌های درمانی که باعث افزایش HSP70 شوند می‌توانند برای بهبود آسیب‌های عصبی به کار برده شوند (۹۸).

ترهالوز، یک دی‌ساکارید غیراحیا کننده است که از دو مولکول گلوکز تشکیل شده است. این ترکیب در

بسیاری از ارگانسیم‌ها مثل مخمرها، قارچ‌ها، باکتری‌ها و گیاهان وجود دارد و از آن‌ها در برابر استرس‌های محیطی محافظت می‌کند (۱۰). مطالعات نشان دادند که ترهالوز به عنوان چاپرون شیمیایی عمل می‌کند و با پایدار کردن پروتئین‌ها در برابر عوامل دنا توره کننده مثل شوک حرارتی و استرس اکسیداتیو، مانع از تجمع آن‌ها می‌شود (۱۱). از طرف دیگر، ترهالوز دارای اثرات ضد التهابی است. به عنوان مثال، ترهالوز می‌تواند پاسخ‌های التهابی و به دنبال آن آسیب اکسیداتیو را در سلول‌های ماکروفاژ تحریک شده با لیپوبلی ساکارید کاهش دهد (۱۲). همچنین، بررسی اثر ترهالوز بر سطح آپوپتوز در سلول‌های عصبی PC12 نشان داد که ترهالوز در شرایط نورو توکسیک ایجاد شده توسط برخی از فاکتورهای التهابی، مرگ سلول‌ها را کاهش می‌دهد (۱۳).

گرچه، مطالعات حاکی از اثرات محافظتی ترهالوز از سلول در شرایط استرس زا هستند اما اثر ترهالوز بر HSP70 که یک فاکتور تنظیم کننده پاسخ سلول به استرس‌های محیطی می‌باشد مشخص نشده است. بنابراین، این مطالعه با هدف بررسی اثر ترهالوز بر بیان ژن HSP70 در شرایط نورو توکسیک ایجاد شده بوسیله پراکسید هیدروژن در سلول‌های PC12، به عنوان مدلی از سلول‌های عصبی، انجام شد.

مواد و روش‌ها

کشت سلول

سلول‌های فئوکروموسیتوما‌ی موش صحرایی (PC12) به شماره ATCC CRL-1721 از بانک سلولی انستیتو پاستور ایران تهیه شد. سلول‌ها در محیط کشت DMEM دارای ۱۰ درصد FBS و ۱ درصد آنتی‌بیوتیک‌های پنی سیلین و استرپتومایسین، در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد و ۵ درصد دی‌اکسید کربن کشت داده شدند. محیط کشت سلول‌ها هر دو روز یک بار عوض شد تا سلول‌ها از نظر تعداد به تراکم مناسب (Confluent) حدود ۸۰ درصد برسند.

سپس، سلول‌ها از کف فلاسک توسط آنزیم Trypsin/EDTA ۱ درصد جدا و پاساژ داده شدند. از این سلول‌ها برای مراحل بعدی مطالعه استفاده شد.

سنجش بقای سلولی

برای تعیین غلظت‌های سیتوتوکسیک مواد به کار رفته جهت تیمار سلول‌ها از روش MTT (3,4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5 diphenyltetrazolium bromide) استفاده شد. در این روش، نمک تترازولیوم توسط آنزیم سوکسینات دهیدروژناز میتوکندری در سلول‌های زنده به بلورهای نامحلول فورمازان تبدیل می‌شود که پس از افزودن حلال DMSO حل شده و رنگ ارغوانی ایجاد می‌کند. با سنجش جذب نوری می‌توان میزان سلول‌های زنده را تعیین کرد. برای انجام این آزمایش، محلول ذخیره MTT با حل کردن ۵۰ میلی‌گرم پودر آن در ۱۰ میلی‌لیتر بافر فسفات سالین (Phosphate buffer saline, PBS) تهیه شد. سپس، محلول کاری با رقیق کردن ۱ میلی‌لیتر از محلول ذخیره با ۹ میلی‌لیتر محیط کشت آماده شد. تعداد 5×10^3 سلول در هر چاهک از پلیت ۹۶ خانه کشت داده شد. سپس، تیمار سلول‌ها با غلظت‌های مختلف ترهالوز و پراکسید هیدروژن به صورت جداگانه و همزمان صورت گرفت. پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون، محیط کشت سلول‌ها تخلیه شد و ۲۰۰ میکرولیتر از محلول کاری MTT به هر چاهک اضافه شد. سپس، پلیت به مدت ۲ ساعت در ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. پس از برداشتن محلول رویی، ۲۰۰ میکرولیتر DMSO اضافه شد تا بلورهای فورمازان حل شوند. جذب محلول در طول موج ۴۹۰ نانومتر قرائت و درصد بقای سلول‌ها نسبت به شاهد محاسبه شد.

تیمار سلول‌ها

جهت بررسی بیان ژن HSP70، تعداد 2×10^5 سلول در هر چاهک از پلیت ۶ خانه کشت داده شد. پس از ۱۶ ساعت انکوباسیون در انکوباتور، سلول‌ها با

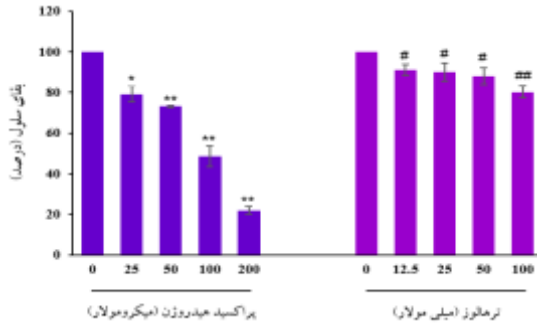
غلظت‌های مختلف ترهالوز (۵۰، ۲۵، ۱۲/۵ و ۰ میلی‌مولار) به مدت ۲۴ ساعت تیمار شدند. سپس، سلول‌ها در معرض پراکسید هیدروژن با غلظت ۱۰۰ میکرومولار به مدت ۲۴ ساعت قرار گرفتند. پس از جدا کردن سلول‌ها از کف پلیت و سانتریفیوژ، سلول‌ها برای انجام مراحل بعدی جمع‌آوری شدند.

استخراج RNA، سنتز cDNA و انجام Real-time PCR استخراج RNA از سلول‌های جمع‌آوری شده با استفاده از معرف ترایزول (Geneall و Korea) صورت گرفت (۱۴). پس از بررسی کمی و کیفی RNA استخراج شده، با استفاده از کیت سنتز cDNA (Takara و Japan) و براساس دستورالعمل موجود در کیت، سنتز cDNA از روی RNA انجام گرفت. پرایمرها با استفاده از نرم افزار Oligo Analyzer طراحی شدند و برای اطمینان از اختصاصی بودن پرایمرها BLAST صورت گرفت. پرایمرها از شرکت پیشگام تهیه شدند. توالی پرایمرها برای ژن HSP70 و ژن گلیسرآلدئید ۳-فسفات دهیدروژناز (GAPDH) که به عنوان ژن کنترل داخلی مورد استفاده قرار گرفت به صورت زیر بود:

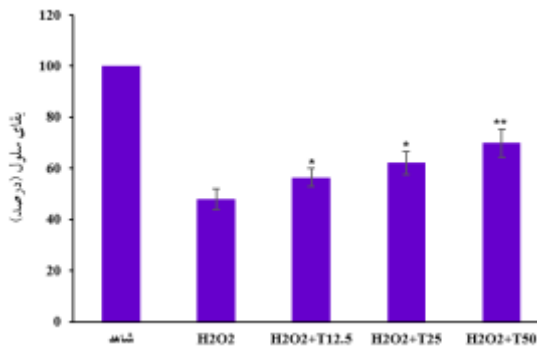
توالی رفت ژن HSP70: 5'-TCAAGGGCAAGATCAGCGAG-3'
توالی برگشت ژن HSP70: 5'-TCAGCCAGCGTGTAGATC-3'
توالی رفت ژن GAPDH: 5'-AACCCATCACCATCTCCAG-3'
توالی برگشت ژن GAPDH: 5'-GTGGTTCACCCATCACAA-3'

سپس، واکنش‌ها با استفاده از کیت Master mix SYBR green (Amplicon و Denmark) و دستگاه Mic Real-time PCR انجام گرفت. سیکل دمایی به کار برده شده برای انجام Real-time PCR شامل یک مرحله دناتوراسیون اولیه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه و ۴۰ سیکل شامل مراحل دناتوراسیون در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۰ ثانیه، اتصال پرایمر در دمای ۶۶ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۵ ثانیه و طولیل شدن در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به

ترهالوز به ترتیب ۵۶، ۶۲ و ۷۰ درصد نسبت به گروه شاهد بود (نمودار شماره ۲).



نمودار شماره ۱: میزان بقای سلول های PC12 پس از تیمار با پراکسید هیدروژن (سمت چپ) و ترهالوز (سمت راست) به مدت ۲۴ ساعت. * $P < 0.05$ و ** $P < 0.01$ در گروه تیمار شده با پراکسید هیدروژن نسبت به گروه شاهد (غلظت صفر). # $P < 0.05$ و ### $P < 0.01$ در گروه تیمار شده با ترهالوز در مقایسه با گروه شاهد (غلظت صفر).



نمودار شماره ۲: اثر غلظت های مختلف ترهالوز (۱۲/۵، ۲۵ و ۵۰ میلی مولار) بر میزان بقای سلول های PC12 تیمار شده با پراکسید هیدروژن (۱۰۰ میکرومولار) به مدت ۲۴ ساعت. * $P < 0.05$ و ** $P < 0.01$ نسبت به گروهی که فقط با پراکسید هیدروژن تیمار شده است.

بررسی بیان ژن HSP70

نتایج نشان داد که میزان بیان ژن HSP70 در گروه تیمار شده با پراکسید هیدروژن به غلظت ۱۰۰ میکرومولار به ۲/۱ برابر گروه شاهد افزایش یافت ($P < 0.01$). همچنین، در گروه های تیمار شده با ترهالوز و پراکسید هیدروژن، بیان نسبی ژن HSP70 افزایش معنی داری نسبت به گروه های شاهد و پراکسید هیدروژن

مدت ۱۵ ثانیه بود. نتایج هم با استفاده از فرمول $2^{-\Delta\Delta CT}$ به منظور تعیین میزان تغییر بیان ژن HSP70 در گروه تیمار شده با ترهالوز نسبت به گروه شاهد آنالیز شد.

بررسی آماری

داده ها با استفاده از نرم افزار SPSS نسخه ۱۶ و آزمون های آماری One-way ANOVA و Tukey's Post-hoc مورد بررسی قرار گرفت. مقدار P کمتر از ۰/۰۵ معنی دار در نظر گرفته شد. نتایج به صورت میانگین \pm انحراف معیار گزارش شد.

یافته ها

بررسی بقای سلولی

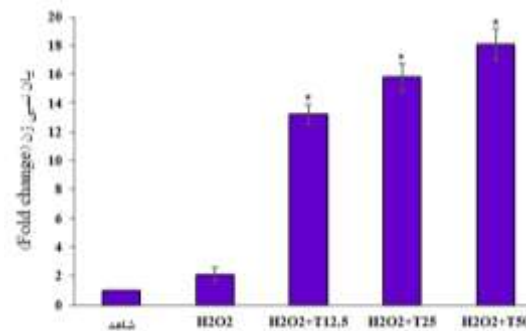
نتایج نشان داد که بقای سلول ها پس از ۲۴ ساعت تیمار با ترهالوز به غلظت ۱۰۰ میلی مولار حدود ۸۰ درصد گروه شاهد بود. همچنین، با کاهش غلظت ترهالوز به ۵۰ میلی مولار، درصد سلول های زنده افزایش یافت. اما تفاوت قابل توجهی در بقای سلول ها بین غلظت های ۵۰، ۲۵ و ۱۲/۵ میلی مولار که به ترتیب ۸۸، ۹۰ و ۹۱ درصد بود مشاهده نشد ($P > 0.05$). از طرف دیگر، میزان بقای سلول های PC12 که به مدت ۲۴ ساعت با پراکسید هیدروژن تیمار شدند نسبت به گروه شاهد کاهش یافت. این کاهش وابسته به غلظت پراکسید هیدروژن بود. به طوری که در غلظت های ۲۵، ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میکرومولار پراکسید هیدروژن به ترتیب ۷۹، ۷۳، ۴۹ و ۲۲ درصد سلول ها باقی مانده بود (نمودار شماره ۱). برای بررسی بقای سلول ها که با ترهالوز پیش تیمار شده و سپس در معرض پراکسید هیدروژن قرار گرفتند از غلظت ۱۰۰ میکرومولار پراکسید هیدروژن استفاده شد. نتایج نشان داد که ترهالوز باعث افزایش بقای سلول ها در حضور پراکسید هیدروژن می شود. همچنین، درصد سلول های زنده با افزایش غلظت ترهالوز افزایش می یابد. به طوری که میزان بقای سلول ها در غلظت های ۱۲/۵، ۲۵ و ۵۰ میلی مولار

و افزایش فعالیت عوامل مسیر آپوپتوز سلولی باعث کاهش بقای سلول‌ها شود. بنابراین، از این ترکیب اغلب به عنوان مدل تجربی برای مطالعه آسیب‌های سلولی مثل استرس اکسیداتیو و یا برای بررسی اثر درمانی ترکیبات جدید استفاده می‌شود (۱۷، ۱۸).

در بررسی حاضر، میزان بقای سلول‌های PC12 تیمار شده با ترهالوز به غلظت ۱۰۰ میلی مولار، ۸۰ درصد و غلظت ۵۰ میلی مولار، ۸۸ درصد به دست آمد. Lan و همکاران هم در مطالعه خود نتایج مشابهی را گزارش کردند و احتمال دادند که غلظت‌های بالای ترهالوز از طریق تغییر اسمولالیتیه محیط باعث کاهش بقای سلول‌ها شده است (۱۹).

در این مطالعه مشخص شد که ترکیب ترهالوز دارای اثر نوروپروتکتیو است و باعث افزایش بقای سلول‌های عصبی PC12 در برابر پراکسید هیدروژن می‌شود. این در حالی است که ترهالوز به تنهایی در غلظت‌های ۱۲/۵، ۲۵ و ۵۰ میلی مولار میزان بقای سلول‌ها را به حدود ۹۰ درصد کاهش داد. ممکن است این تفاوت، مربوط به اثر آنتی اکسیدانی ترهالوز باشد که به صورت وابسته به دوز باعث کاهش اثر پراکسید هیدروژن شده است. ترهالوز، یک قند دی ساکارید است اما به علت داشتن عملکردهای متعدد مثل اثر محافظتی در برابر استرس‌ها از جمله استرس اکسیداتیو از سایر دی ساکاریدها متمایز می‌باشد. همچنین، این ترکیب باعث کاهش پاسخ‌های التهابی شده و می‌تواند در درمان بیماری‌های التهابی به کار رود. اخیراً، ما در مطالعه‌ای نشان دادیم که ترهالوز می‌تواند استرس اکسیداتیو و التهاب ناشی از ضربه نخاعی را در محل آسیب کاهش دهد (۲۰). همچنین ترهالوز از طریق فعال کردن پروتئازم مانع از تجمع پروتئین‌ها در سلول‌های عصبی پس از ایسکمی می‌شود (۲۱). علاوه بر این، ترهالوز برای حفظ ساختار و فعالیت ماکرومولکول‌های بیولوژیکی، ویتامین‌ها، واکسن‌ها و سلول‌های زنده در غلظت مناسب استفاده می‌شود (۱۲).

نشان داد ($p < 0.001$). به طوری که مقدار بیان ژن HSP70 در گروه‌های تیمار شده با غلظت‌های ۱۲/۵، ۲۵ و ۵۰ میلی مولار از ترهالوز به ترتیب ۱۳/۲، ۱۵/۸ و ۱۸/۱ برابر آن در گروه شاهد بود. همچنین تفاوت معنی‌داری در بیان ژن HSP70 بین سه گروه تیمار شده با ترهالوز در حضور پراکسید هیدروژن مشاهده شد ($p < 0.001$) که نشان داد ترهالوز به صورت وابسته به غلظت باعث القای بیان ژن HSP70 شده است (نمودار شماره ۳).



نمودار شماره ۳: اثر غلظت‌های مختلف ترهالوز (۱۲/۵، ۲۵ و ۵۰ میلی مولار) بر میزان بیان ژن HSP70 در سلول‌های PC12 تیمار شده با پراکسید هیدروژن (۱۰۰ میکرومولار) به مدت ۲۴ ساعت که به روش Real-time polymerase chain reaction اندازه‌گیری شد. $P < 0.001$ نسبت به گروهی که فقط با پراکسید هیدروژن تیمار شده است.

بحث

نتایج این مطالعه نشان داد که پراکسید هیدروژن در غلظت‌های به کار رفته دارای اثرات سیتوتوکسیک بوده و باعث کاهش بقای سلول‌های رده PC12 شده است. این ترکیب در غلظت ۱۰۰ میکرومولار باعث مهار رشد سلول تا میزان ۴۹ درصد نسبت به گروه شاهد شد. اثر سیتوتوکسیک پراکسید هیدروژن در این غلظت‌ها در مطالعات دیگر هم تایید شده است (۱۵، ۱۶). به‌طور طبیعی، مقدار اندکی پراکسید هیدروژن در سلول از منابع مختلف تولید می‌شود. اما، افزایش غلظت آن می‌تواند از طریق آسیب به غشای سلول و هسته، کاهش پتانسیل غشا میتوکندری، کاهش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان

و افزایش بقای سلول شده باشد. برای توجیه این مطلب می توان به نقش دیگر HSP70 اشاره کرد که می تواند آپوپتوز یا مرگ برنامه ریزی شده سلولی را مهار کند. مطالعات نشان می دهند که افزایش بیان HSP70 در انواعی از مدل های استرس سلولی مانع از فعال شدن کاسپازها (Caspases) و آپوپتوز می شود. در حالی که، کاهش سطح HSP70 باعث افزایش حساسیت سلول ها به عوامل تحریک کننده آپوپتوز می گردد (۲۴، ۲۵).

علاوه بر این، نتایج این مطالعه نشان داد که اثر ترهالوز بر بیان ژن HSP70 و بقای سلول هایی که در معرض پراکسید هیدروژن قرار گرفتند وابسته به غلظت ترهالوز است. He و همکاران هم نشان دادند که ترهالوز به صورت وابسته به دوز باعث افزایش بقای سلول های BV-2 که در معرض لیپوپلی ساکارید قرار گرفته اند می شود (۱۳).

به طور کلی، در این مطالعه مشخص شد که ترهالوز باعث افزایش بیان ژن HSP70 و بقای سلول های PC12 که در معرض پراکسید هیدروژن قرار گرفتند می شود. اثرات مشاهده شده وابسته به غلظت ترهالوز می باشد، اما تعیین مکانیسم اثر ترهالوز بر بیان ژن HSP70 و آپوپتوز سلول های عصبی مشخص نیست و بررسی آن ها در مطالعات بعدی پیشنهاد می شود.

سپاسگزاری

مقاله حاضر از طرح تحقیقاتی مصوب دانشگاه علوم پزشکی کرمان به شماره ۹۳/۶۳ استخراج شده است. بدین وسیله از همکاری تمام افرادی که در اجرای این مطالعه همکاری داشته اند سپاسگزاری می کنیم.

References

- Halliwell B. Oxidative stress and neurodegeneration: where are we now? *J Neurochem* 2006; 97(6): 1634-1658.
- Jellinger KA. Basic mechanisms of neurodegeneration: a critical update. *J Cell*

بررسی بیان ژن HSP70 در این مطالعه نشان داد که بیان این ژن در گروه مواجهه یافته با پراکسید هیدروژن افزایش یافته است. HSP ها نقش مهمی در دفاع سلول در برابر استرس های مختلف ایفا می کنند. این پروتئین ها بر اساس وزن مولکولی به انواع HSP90، HSP100، HSP70، HSP60، HSP40 و HSP های کوچک تقسیم می شوند (۲۲). خانواده HSP70 از اعضای مهمی شامل HSP70 یا HSP73 که دارای بیان پایه است، GRP78/Bip که در شبکه اندوپلاسمی قرار دارد، mtHSP70 که در میتوکندری وجود دارد و HSP72 یا به طور کلی HSP70 که نوع قابل القا می باشد تشکیل شده است. تحت شرایط استرس زا مثل استرس اکسیداتیو مقدار HSP70 افزایش می یابد. HSP70 به عنوان چاپرون مولکولی عمل می کند و مانع از بد تا خوردن پروتئین ها و تجمع آن ها می شود (۲۳). احتمالاً افزایش بیان ژن HSP70 پس از تیمار سلول ها با پراکسید هیدروژن به منظور مقابله با استرس ایجاد شده و تجمع پروتئین های آسیب دیده صورت گرفته است.

در مطالعه حاضر مشخص شد که پیش تیمار سلول ها با غلظت های مختلف ترهالوز و سپس مواجهه آن ها با غلظت ثابتی از پراکسید هیدروژن هم باعث افزایش قابل توجهی در بیان ژن HSP70 به صورت وابسته به دوز ترهالوز می شود که نشان می دهد ترهالوز باعث القای بیان ژن HSP70 شده است. علاوه بر این، نتایج آزمایش MTT نشان داد که میزان بقای سلولی در این گروه ها افزایش یافته است. بنابراین، احتمال دارد که ترهالوز از طریق افزایش سطح HSP70 باعث کاهش آسیب سلولی القا شده توسط پراکسید هیدروژن

Mol Med 2010; 14(3): 457-487.

- Hu XL, Niu YX, Zhang Q, Tian X, Gao LY, Guo LP, et al. Neuroprotective effects of Kukoamine B against hydrogen peroxide-induced apoptosis and potential mechanisms

- in SH-SY5Y cells. *Environ Toxicol Pharmacol* 2015; 40(1): 230-240.
4. Chen B, Yue R, Yang Y, Zeng H, Chang W, Gao N, et al. Protective effects of (E)-2-(1-hydroxyl-4-oxocyclohexyl) ethyl caffeine against hydrogen peroxide-induced injury in PC12 cells. *Neurochem Res* 2015; 40(3): 531-541.
 5. He L, Deng T, Luo Hs. Heat shock protein 70 gene polymorphisms and cancer risk: a meta-analysis. *Scientific World J* 2014; 2014: 540309.
 6. Turturici G, Sconzo G, Geraci F. Hsp70 and its molecular role in nervous system diseases. *Biochem Res Int.* 2011; 2011: 618127.
 7. Kim JY, Yenari MA. The immune modulating properties of the heat shock proteins after brain injury. *Anat Cell Biol* 2013; 46(1): 1-7.
 8. Franklin TB, Krueger-Naug A, Clarke D, Arrigo AP, Currie R. The role of heat shock proteins Hsp70 and Hsp27 in cellular protection of the central nervous system. *Int J Hyperthermia* 2005; 21(5): 379-392.
 9. Evans CG, Chang L, Gestwicki JE. Heat shock protein 70 (hsp70) as an emerging drug target. *J Med Chem* 2010; 53(12): 4585-4602.
 10. De Virgilio C, Hottiger T, Dominguez J, Boller T, Wiemken A. The role of trehalose synthesis for the acquisition of thermotolerance in yeast: I. Genetic evidence that trehalose is a thermoprotectant. *Eur J Biochem* 1994; 219(1-2): 179-186.
 11. Benaroudj N, Lee DH, Goldberg AL. Trehalose accumulation during cellular stress protects cells and cellular proteins from damage by oxygen radicals. *J Biol Chem* 2001; 276(26): 24261-24267.
 12. Minutoli L, Altavilla D, Bitto A, Polito F, Bellocco E, Laganà G, et al. The disaccharide trehalose inhibits proinflammatory phenotype activation in macrophages and prevents mortality in experimental septic shock. *Shock* 2007; 27(1): 91-96.
 13. He Q, Wang Y, Lin W, Zhang Q, Zhao J, Liu FT, et al. Trehalose alleviates PC12 neuronal death mediated by lipopolysaccharide-stimulated BV-2 cells via inhibiting nuclear transcription factor NF- κ B and AP-1 activation. *Neurotox Res* 2014; 26(4): 430-439.
 14. Chomczynski P. A reagent for the single-step simultaneous isolation of RNA, DNA and proteins from cell and tissue samples. *Biotechniques* 1993; 15(3): 532-534.
 15. Jiang B, Liu J, Bao Y, An L. Hydrogen peroxide-induced apoptosis in pc12 cells and the protective effect of puerarin. *Cell Biol Int* 2003; 27(12): 1025-1031.
 16. Lin P, Tian XH, Yi YS, Jiang WS, Zhou YJ, Cheng WJ. Luteolin-induced protection of H2O2-induced apoptosis in PC12 cells and the associated pathway. *Mol Med Rep* 2015; 12(5): 7699-7704.
 17. Clementi ME, Pani G, Sampaolese B, Tringali G. Punicalagin reduces H2O2-induced cytotoxicity and apoptosis in PC12 cells by modulating the levels of reactive oxygen species. *Nutr Neurosci* 2018; 21(6): 447-454.
 18. Lv R, Du L, Lu C, Wu J, Ding M, Wang C, et al. Allicin protects against H2O2-induced apoptosis of PC12 cells via the mitochondrial pathway. *Exp Ther Med* 2017; 14(3): 2053-2059.
 19. Lan DM, Liu FT, Zhao J, Chen Y, Wu JJ, Ding ZT, et al. Effect of trehalose on PC12 cells overexpressing wild-type or A53T mutant α -synuclein. *Neurochem Res* 2012; 37(9): 2025-2032.
 20. Nazari-Robati M, Akbari M, Khaksari M, Mirzaee M. Trehalose attenuates spinal cord

- injury through the regulation of oxidative stress, inflammation and GFAP expression in rats. *J Spinal Cord Med* 2018; 4:1-8.
21. Li Y, Luo Y, Luo T, Lu B, Wang C, Zhang Y, et al. Trehalose Inhibits Protein Aggregation Caused by Transient Ischemic Insults Through Preservation of Proteasome Activity, Not via Induction of Autophagy. *Mol Neurobiol* 2017; 54(9): 6857-6869.
22. San Gil R, Ooi L, Yerbury JJ, Ecroyd H. The heat shock response in neurons and astroglia and its role in neurodegenerative diseases. *Mol Neurodegener* 2017; 12(1): 65-85.
23. Wang X, Chen M, Zhou J, Zhang X. HSP27, 70 and 90, anti-apoptotic proteins, in clinical cancer therapy. *Int J Oncol* 2014; 45(1): 18-30.
24. Sverchinsky D, Nikotina A, Komarova E, Mikhaylova E, Aksenov N, Lazarev V, et al. Etoposide-Induced Apoptosis in Cancer Cells Can Be Reinforced by an Uncoupled Link between Hsp70 and Caspase-3. *Int J Mol Sci* 2018; 19(9): 2519-2534.
25. Lanneau D, Brunet M, Frisan E, Solary E, Fontenay M, Garrido C. Heat shock proteins: essential proteins for apoptosis regulation. *J Cell Mol Med* 2008; 12(3): 743-761.