

اثر محافظتی سیتوکین SCF در مهار آپوپتوز ناشی از اشعه X در سلول‌های HL60

سیدجلال حسینی مهر (Ph.D.)^{*} اسامو اینانامی (Ph.D.)^{**} میکینوری کووآبارا (Ph.D.)^{**}

چکیده

سابقه و هدف: آپوپتوز با مرگ برنامه ریزی شده سلول، فرایندی از خود کشتی سلول است و پرتوهای یونیزان با صدمه به DNA سلول، موجب تحریک و سوق دادن آن به آپوپتوز می‌شوند. در تحقیق حاضر تاثیر اشعه X روی القاء آپوپتوز در سلول‌های لوکمی انسان (HL60) و همچنین مکانیسم اثر محافظتی سیتوکین SCF در مهار آپوپتوز ناشی از اشعه X مورد بررسی قرار گرفته است.

مواد و روش‌ها: سلول‌های HL60 در معرض ۵ گری اشعه X قرار گرفته و تاثیر زمان در افزایش درصد آپوپتوز در سلول‌ها مورد بررسی قرار گرفت و سپس گروهی از سلول‌ها یکساعت قبل از پرتوگیری سیتوکین SCF و همچنین گروه‌های دیگری از سلول همراه با SCF مهارکننده‌های مسیرهای داخل سلولی MAPK، PI3K و PKC را دریافت کردند و سپس تغییر در روند آپوپتوز در سلول‌ها مورد ارزیابی قرار گرفت.

یافته‌ها: نتایج نشان می‌دهد که اشعه X موجب القاء آپوپتوز در سلول‌ها می‌شود؛ به طوری که با افزایش زمان از ۱۲ تا ۶۰ ساعت بعد از پرتودهی به تدریج درصد آپوپتوز در سلول‌ها افزایش می‌یابد. انگوبه گردن سلول‌ها با SCF قبل از پرتو دهی موجب کاهش آپوپتوز می‌شود، این اثر کاهش آپوپتوز، توسط مهارکننده ERK سرکوب می‌گردد، در صورتی که مهارکننده های PKC و PI3K قادر به مهار مسیر داخل سلولی القاء شده توسط SCF نمی‌باشند.

استنتاج: نتایج این مطالعه نشان می‌دهد که SCF با اثر تحریک فعال‌سازی پروتئین‌های مسیر MAPK موجب افزایش مقاومت و همچنین بقا سلول در برابر عوارض سوء ناشی از اشعه X در سلول‌های HL60 می‌شود و سلول‌ها را در برابر اشعه با مکانیسم داخل سلولی و مرتبط با پروتئین‌های MAPK محافظت می‌کند.

واژه‌های کلیدی: آپوپتوز، سیتوکین، عامل پیش ساز سلول نخونی، اشعه

مقدمه

در چند سال اخیر، محققین تلاش فراوانی در جهت کسب دانش مربوط به اهمیت عملکرد مرگ سلولی که به عنوان آپوپتوز (Apoptosis) یا مرگ برنامه ریزی شده سلول در پاسخ به اشعه می‌باشد را آغاز کرده‌اند؛

* متخصص داروسازی هسته ای، استاد یار دانشکده داروسازی ساری، دانشگاه علوم پزشکی مازندران
** آزمایشگاه رادیوبیولوژی، دانشگاه موگادبو، ژاپن
☞ تاریخ دریافت: ۸۴/۵/۱۴ تاریخ اصلاحات: ۸۴/۷/۴ تاریخ تصویب: ۸۴/۸/۱۴
☞ ساری؛ خیابان سلطان فارسی- فلکه دوم- دانشگاه داروسازی

موجب محافظت سلول‌ها در برابر عوارض مرگ‌آور ناشی از اشعه می‌شود (۹). هر چند تاثیر SCF در فعال‌سازی مسرهای داخلی سلول‌های پیش‌ساز خونی مشخص است (۸)، مکانیسم اثر محافظتی SCF روی سلول‌های پرتو دیده، نامشخص است. لذا در این تحقیق تاثیر اشعه X روی القاء آپتوز در سلول‌های HL60 (Human Leukemia Cell Line) و همچنین اثر محافظتی سیتوکین SCF در مهار آپتوز ناشی از اشعه X و مکانیسم اثر محافظت پرتوی SCF مورد بررسی قرار گرفته است.

مواد و روش‌ها

کشت سلولی:

سلول‌های لوکمی انسان HL60 از RIKEN ژاپن تهیه شده است. محیط کشت RPMI 1640 (GIBCO/BRL) با اضافه کردن ۱۰/۴ گرم پودر RPMI 1640، پن‌سیلین G پناسیم (۱۰۰U به هر ml محیط کشت)، استرپتومایسین (۱mg/۱۰ به هر محیط کشت) و ۲ گرم سدیم بی‌کربنات در یک لیتر آب دو بار تقطیر تهیه شده است. PH محیط کشت با ۱N HCl در ۷/۴ تنظیم شد. سپس محیط کشت را تحت شرایط سترون پالایش کرده و در شیشه‌های سر بسته در یخچال برای انجام آزمایش‌ها نگهداری شدند. سلول‌های HL60 در محیط کشت RPMI 1640 حاوی ۱۰ درصد سرم جنین گوساله در دمای ۳۷°C در ۵ درصد CO₂ رشد کرده است.

گروه‌های مورد آزمایش:

گروه‌های مورد تجربه عبارت بوده‌اند از: سلول‌های شاهد که دارو و اشعه دریافت نکرده بوده‌اند، سلول‌هایی

به طوری که پرتوهای یونیزان با صدمه به DNA سلول موجب مهار تکثیر و القاء آپتوز می‌شود (۳۷۱). آپتوز توسط سلول تنظیم می‌شود و از لحاظ ساختاری با تراکم کروماتین، کاهش حجم سلول و تورم غشاء و اجسام آپتوز شناسایی می‌شود که تحت شرایط فیزیولوژیکی در سلول‌های توموری و طبیعی در پاسخ به پرتوهای یونیزان، افزایش درجه حرارت، داروهای شیمی درمانی سرطان و عدم تعادل هورمون‌ها اتفاق می‌افتد (۴). پرتوگیری سلول‌ها به اشعه منجر به فعال شدن مسرهای داخل سلولی می‌شود. این مسرهای داخل سلولی عمدتاً مرتبط با پروتئین کیناز می‌باشد که پاسخ آن در ارتباط با مرگ سلول یا بقا سلول می‌باشد. مسرهای پاسخ محافظت سلولی مرتبط با (MAPK)^۱ و (PI3 kinase)^۲ می‌باشد که موجب فعال‌سازی و پیوستن پروتئین‌های مرتبط با بقا سلول می‌شود. سیتوکین‌ها در تنظیم آپتوز از طریق فعال‌سازی پروتئین‌های مختلف مشارکت دارند (۵، ۴). گمبود سیتوکین‌ها مانند عامل پیش‌ساز سلول خونی (SCF)^۳، عامل محرک کلنی ماکروفاژ (M-CSF)، عامل محرک کلنی گرانولوسیت (G-CSF) منجر به آپتوز می‌شود؛ به طوری که SCF به گیرنده‌اش در سطح سلول متصل شده و موجب فعال‌سازی پروتئین‌های داخل سلولی موثر در القاء آپتوز می‌شود و بدین ترتیب روند القاء آپتوزیز کاهش پیدا می‌کند (۶). مسر MAPK یکی از مسرهای داخل سلولی است که در کاهش آپتوز موثر است؛ به طوری که فعال‌سازی این مسر موجب تکثیر و بقا سلول می‌شود (۷۸).

SCF موجب تحریک رشد سلول‌های پیش‌ساز خونی و افزایش خون‌سازی همچنین بقا سلول‌ها می‌شود؛ به طوری که تجویز SCF قبل از پرتودهی

1. Mitogen-activated protein kinase
2. Phosphatidylinositol-3-phosphate kinase
3. Stem Cell Factor

Olympus IX70 (Tokyo, Japan) بررسی شدند، سلول‌ها به رنگ قرمز جگری مشاهده شدند.

روش آماری:

میانگین درصد میزان آپوپتوز در گروه اشعه تنها و گروه SCF+ اشعه با آزمون آماری Student's t-test تحلیل شد. مقایسه میانگین درصد میزان آپوپتوز در گروه‌های مختلف مهارکننده با استفاده از ANOVA انجام پذیرفت. از Tukey's test به عنوان آزمون post Hoc استفاده شد. P.value کمتر از ۰/۰۵ به عنوان سطح معنی‌دار در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

اثر SCF در مهار آپوپتوز ناشی از اشعه X در سلول‌های HL60:

زمانی که سلول‌های HL60 در معرض ۵ گری اشعه X قرار گرفتند، تغییرات ساختاری که مشخصات بارز آپوپتوز هستند شامل متراکم شدن کروماتین و تکه تکه شدن هسته مشاهده شده است. تعداد سلول‌های آپوپتوز از ۱۲ ساعت تا ۴۸ ساعت بعد از پرتودهی به تدریج افزایش یافته است؛ به طوری که میزان درصد آپوپتوز از ۳/۳ درصد در گروه اشعه تنها در زمان ۱۲ ساعت انکوباسیون به ۳۴/۳ درصد در زمان ۴۸ ساعت افزایش یافته است که بیانگر تاثیر زمان بعد از پرتودهی در افزایش آپوپتوز است. انکوبه کردن سلول‌ها با SCF هیچ تاثیر سمی روی سلول‌های H₂O₂ نداشته است. اضافه کردن SCF به محیط کشت سلولی یکساعت قبل از پرتودهی موجب کاهش درصد سلول‌های آپوپتوتیک شده است (نمودار شماره ۱)؛ به طوری که میزان آپوپتوز را از ۳۴ درصد در گروه اشعه به ۲۸ درصد در گروه اشعه+SCF کاهش یافته است و این کاهش از لحاظ آماری معنی‌دار بوده است (p<۰/۰۵).

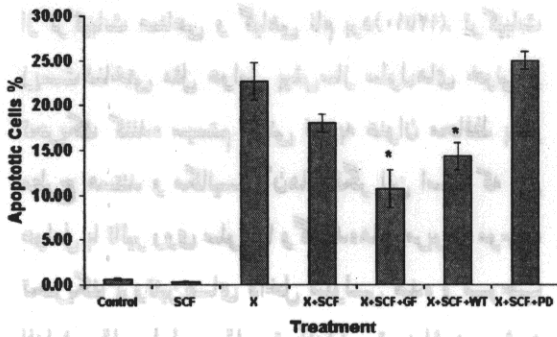
که فقط SCF دریافت کرده‌اند، سلول‌هایی که فقط اشعه دریافت کرده‌اند، سلول‌هایی که SCF و اشعه دریافت کرده‌اند، سلول‌هایی که SCF و اشعه و مهارکننده‌های مختلف دریافت کرده‌اند.

تیمار سلول‌ها با دارو و اشعه X:

پرتو دهی اشعه X با دستگاه X-ray Shimadzu HF-320 Kyoto, Japan, 20mA, (200KVP, 2.0 mm Al filter) در تندی دز ۳/۰۳ گری اشعه در درجه حرارت اتاق صورت گرفته است. برای بررسی آپوپتوز ناشی از اشعه X، سلول‌ها در محیط کشت حاوی ۱۰۰ ng/ml SCF (KIRIN Brewery, Tokyo, Japan) ۲۵ μm، PD98059 (مهارکننده ERK) ۱۰۰ μm، Wormanin (مهارکننده PKC) ۱۰۰ μm و GF109203 (Calbiochem, La Jolla, Ca, USA) (PI3K)، در دمای ۳۷^o C و یک ساعت قبل از پرتودهی X-ray انکوبه شده‌اند (۹).

مشاهده سلول‌های آپوپتوتیک با میکروسکوپ فلورسانس:

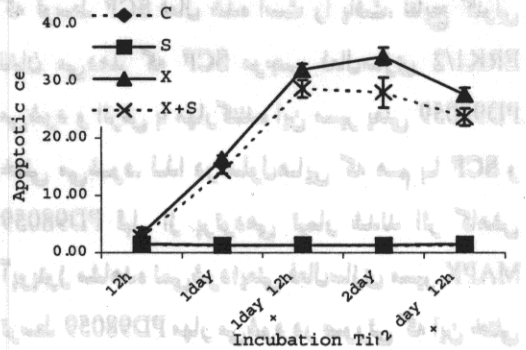
سلول‌ها بعد از پرتودهی با اشعه X در زمان‌های مشخص (۱۲ تا ۶۰ ساعت) توسط سانتریفوژ در دور ۱۰۰۰ rpm برای ۵ دقیقه در دمای ۴^o C جمع‌آوری شدند. رسوب با بافر سالین- فسفات عاری از کلسیم و منیزیم (PBS(-)) شست و شو داده و در محلول ۱ درصد گلو تار آلدهید تثبیت شده و سپس سلول‌های تثبیت شده با PBS(-) شسته و در آن سوسپانسیون شدند. به مقدار کمی از سوسپانسیون سلولی، PI (Sigma, Propidium Iodid) با غلظت ۴۰ μg/ml اضافه شده و سلول‌ها برای ۱۵ دقیقه در تاریکی رنگ آمیزی شدند. لابه‌ای از سلول‌ها روی لام تهیه شده و در زیر میکروسکوپ فلورسانس با مدل



نمودار شماره ۲: تاثیر مهارکننده‌های *MAPK*، *PI3K* و *PKC* روی القاء یا مهار آپوپتوز در دو روز بعد از ۵ گری پرتو دهی با اشعه X سلول‌ها با SCF ۱۰۰ ng/ml ، GF109203 ۱۰۰ nm ، Wortmanin ۱۰۰ nm (WT) PD98059 ۲۵ μm یکساعت قبل از پرتو دهی تیمار شدند. تعداد سلول‌های آپوپتوتیک با رنگ‌آمیزی PI ارزیابی شدند. در هر آزمایش حداقل ۵۰۰ سلول شمارش شدند. داده‌ها بیانگر میانگین سه آزمایش است. تفاوت معنی‌داری بین گروه X+SCF+PD با X مشاهده نشده است ولی تفاوت بین گروه‌های X+SCF+WT و X+SCF+GF با X مشاهده شده است ($p < 0.05$). اختصارات GF، WT، PD در قسمت مواد و روش‌ها توضیح داده شده است.

بحث

در بررسی حاضر اثر SCF در محافظت سلول‌های HL60 در برابر آپوپتوز ناشی از اشعه X بررسی شد. یافته مهم این پژوهش آن است که اگر SCF به محیط کشت سلول قبل از پرتو دهی با اشعه X اضافه شود موجب کاهش در صد آپوپتوز از طریق فعال‌سازی مسیر داخل سلولی *MAPK* می‌شود و مسیرهای دیگر داخل سلولی یعنی *PKC* و *PI3K* در این امر نقش کم‌تری دارند. ترکیبات زیادی وجود دارند که وقتی قبل از پرتو دهی تجویز شوند موجب کاهش اثر سوء اشعه روی سیستم زیست‌شناختی می‌شوند که آنها را به عنوان



نمودار شماره ۱: روند افزایش سلول‌های آپوپتوز بعد از پرتو دهی با اشعه X پس از انکوباسیون سلول‌های HL60 با SCF. یکساعت قبل از ۵ گری پرتو دهی با اشعه X ، با SCF ۱۰۰ ng/ml تیمار شدند. در هر شرایط آزمایش حداقل ۵۰۰ سلول شمارش شدند. نقاط رسم شده میانگین سه آزمایش هستند. تفاوت معنی‌داری بین گروه‌های X+S و X در زمان‌های 1 day+12h و 2day+12h مشاهده شده است ($p < 0.05$). گروه C شاهد، سلول‌هایی هستند که در محیط کشت رشد کرده و SCF اشعه ایکس دریافت نکرده‌اند. X گروهی از سلول‌ها هستند که فقط اشعه ایکس دریافت کردند، S سلول‌هایی هستند که فقط سیتوکین SCF دریافت کردند، X+SCF گروهی از سلول‌ها هستند که قبل از اشعه ایکس، سیتوکین SCF دریافت کرده‌اند.

تاثیر SCF همراه با مهارکننده‌های *MAPK*، *PI3K*، *PKC* روی القاء آپوپتوز در سلول‌های HL60: مهار کننده‌های *PKC*، *PI3K*، *ERK1/2* به سلول‌های HL60 در محیط کشت حاوی SCF ، اضافه شده است و دو روز بعد از پرتو دهی سلول‌ها، درصد آپوپتوز در سلول‌های HL60 تعیین شده است. آپوپتوز در محیط کشت سلولی حاوی SCF ، GF109203 یا Wortmanin زمانی که یکساعت قبل از پرتو دهی به سلول‌ها اضافه شود به ترتیب به میزان ۴۴ درصد و ۲۲ درصد کاهش پیدا می‌کند ($p < 0.05$)، در صورتی که این اثر کاهنده در سلول‌های حاوی SCF و PD98059 مشاهده نمی‌شود (نمودار شماره ۲).

که توسط SCF فعال شده است را یافت. نتایج گتونی نشان می‌دهد که SCF موجب فعال‌سازی ERK1/2 می‌شود و اثرش با مهارکننده این مسیر یعنی PD98059 خنثی می‌شود. لذا در سلول‌هایی که هم با SCF و PD98059 قبل از پرتودهی تیمار شدند اثر کاهش آپوپتوز مشاهده نمی‌شود؛ یعنی فعال‌سازی مسیر MAPK توسط PD98059 مهار می‌شود در صورتی که این خنثی شدن اثر SCF با مهارکننده‌های PKC و PI3K مشاهده نشد. ترکیباتی که موجب مهار ERK1/2 می‌شوند منجر به مهار فعال‌سازی MAPK شده و حساسیت پرتوی سلول‌های HL60 را افزایش می‌دهد و توانایی این سلول‌ها برای ترمیم در سیکل سلولی ناشی از اشعه را کاهش می‌دهد (۱۷۸). پس مسیر داخل سلولی MAPK یک مسیر اساسی محافظت سلولی است که در پاسخ به عوامل مختلف فعال می‌شود. اگر چه آپوپتوز توسط مسیرهای مولکولی مختلف داخل سلولی توسط سیتوکین‌های مختلف تنظیم می‌شود (۸)، در این مطالعه معلوم شد که SCF موجب بقا سلول با فعال‌سازی MAPK در سلول‌های پرتو دیده با اشعه X می‌شود و این مسیر داخل سلولی با اهمیت‌تر از مسیرهای PKC, PI3K است.

پس ترکیباتی که موجب فعال‌سازی ERK1/2 شوند، مرتبط با بقا سلول، و ترکیباتی که آن را مهار می‌کنند موجب القاء آپوپتوز سلول می‌شوند. در نتیجه، SCF با تحریک فعال‌سازی پروتئین‌های مسیر MAPK موجب افزایش مقاومت و همچنین بقا سلول در برابر عوارض سوء ناشی از اشعه X در سلول‌های HL60 می‌شود و سلول‌ها را در برابر اشعه با مکانیسم داخل سلولی و مرتبط با پروتئین‌های MAPK محافظت می‌کند.

محافظ پرتو (Radioprotector) می‌شناسند که می‌توان از ترکیبات صنعتی و گیاهی نام برد (۱۲۷۱۰). ترکیبات زیست‌شناختی مثل عوامل پیش‌ساز سلول‌های خونی و تحریک‌کننده سیستم ایمنی نیز به عنوان محافظ پرتو مطرح هستند و مکانیسم آن‌ها بیانگر این است که این عوامل با تاثیر روی سلول‌ها و گیرنده‌های مربوطه موجب تحریک پروتئین‌های داخل سلولی شده و موجب افزایش بقا سلول و مقاومت آن‌ها نسبت به اشعه می‌شود (۱۴،۱۳) به طوری که اینترلوکین-۵ با تاثیر روی پروتئین آنتی‌آپوپتوز Mel-1 موجب مهار آپوپتوز می‌شود (۸).

نتایج حاضر نشان می‌دهد که سلول‌های لوکمی پیش‌ساز خونی انسانی (HL60) زمانی که تحت پرتودهی قرار گیرند به سوی آپوپتوز سوق پیدا می‌کنند که این منطبق با یافته‌های دیگر محققین برای انتخاب مناسب این نوع سلول‌ها برای بررسی آپوپتوز می‌باشد (۱۵،۷،۳). اشعه X آپوپتوز را به تدریج با افزایش زمان بعد از پرتوگیری ۵ گری اشعه X افزایش می‌دهد. SCF وقتی یک ساعت قبل از پرتودهی به گشت سلولی اضافه می‌شود موجب کاهش آپوپتوز در سلول‌های HL60 می‌شود. سیتوکین SCF یک عامل مهم در کاهش آپوپتوز و افزایش بقای سلول می‌باشد (۱۶). مسیرهای داخل سلولی MAPK و PKC و PI3 kinase وقتی فعال شوند موجب بیوسنتز پروتئین‌هایی می‌شوند که تکثیر و بقا سلول را افزایش می‌دهند که این مسیرها به عنوان پاسخ‌های محافظت سلولی مطرح هستند (۴،۱). در مطالعه حاضر برای دستیابی به مکانیسم عمل SCF در مهار آپوپتوز ناشی از اشعه X از مهارکننده‌های اختصاصی مسیرهای داخل سلول MAPK، PI3K و PKC استفاده شده است تا بتوان به طور اختصاصی مسیر داخل سلولی

فهرست منابع

1. Schmidt-Ullrich R, Dent P, Grant S. Signal transduction and cellular radiation

responses. *Radiation Res.* 2000; 153: 245-257.

2. Langley R, Palayoor S, Norman C, Bump E.A. Modifiers of radiation-induced apoptosis. *Radiation Res.* 1993; 136: 320-326.
3. Witenberg B, Kletter Y, Kalir H, Fenig E. Ascorbic acid inhibits apoptosis induced by X irradiation in HL60 myeloid leukemia cells. *Radiation Res.* 1999; 152: 468-478.
4. Meyn R, Stephens L.C, Voehringer D.W. Biochemical modulation of radiation-induced apoptosis in murine lymphoma cells. *Radiation Res.* 1993; 136: 327-334.
5. Schimer A, Hedley D.W, Penn L. Receptor- and mitochondrial- mediated apoptosis in acute leukemia: a transduction view. *Blood.* 2001; 98: 3541-3553.
6. Dalmau S.R, Freitas C.S, Savina W. Radio- and chemoprotection of bone marrow cells by opposite cell cycle-acting cytokines. *Leukemia Res.* 1997; 21: 93-99.
7. Hopcia K.L, McCarey Y.L, Sylvester F.C. Radiation-induced apoptosis in HL60 cells: oxygen effect, relationship between apoptosis and loss of clonogenicity, and dependence of time to apoptosis on radiation dose. *Radiation Res.* 1996; 145: 315-323.
8. Huang H.M, Huang C.J, Yen J.J. Mel-1 is a common target of stem cell factor and interleukin-5 for apoptosis prevention activity via MEK/MAPK and PI-3K/Akt pathways. *Blood.* 2000; 96: 1764-1771.
9. Cui Y.D, Inanami O, Yamamori T, Niwa K, Nagahata H, Kuwabara M. FMLP-induced formation of F-actin in HL60 cells is dependent on PI3-K but not on intracellular Ca^{2+} , PKC, ERK or p38 MAPK. *Inflammation Res.* 2000; 49: 684-691.
10. Hosseinimehr S.J, Tavakoli H. Radioprotective effects of citrus extract against gamma irradiation in mouse bone marrow cell. *J. Radiat. Res. (Tokyo).* 2003; 44: 237-341.
11. Hosseinimehr S.J, Shafiee A. Radioprotective effects of 2-imino-3-((chromone-2-yl)carbonyl) thiazolidine against gamma irradiation in mice. *J. Radiat. Res. (Tokyo).* 2002; 43: 292-300.
12. Hosseinimehr S.J, Shafiee A. Radioprotective effects of 2-iminothiazolidine derivatives against lethal dose of gamma radiation in mice. *J. Radiat. Res. (Tokyo).* 2001; 42: 401-408.
13. Malsin J.R. Baeq and Alexander award lecture, chemical radioprotection: past, present and future prospects. *Int. J. Radiat. Biol.* 1998; 4: 443-450.
14. Patchen M.L, MacVittie T, Solberg B.D, Souza L.M. Survival enhancement and hemopoietic regeneration following radiation exposure: therapeutic approach using glucan and granulocyte colony-stimulating factor. *Exp. Hematol.* 1990; 18: 1042-1048.

15. Kam P.C.A, Ferch N.I. Apoptosis: mechanisms and clinical implications. *Anesthesia*. 2000; 55: 1081-1093.
16. Lotem J, Sachs L. Cytokines as suppressors of apoptosis. *Apoptosis*. 1999; 4: 187-196.
17. Lee Y, Soh J, Dean N.M. Protein kinase C δ overexpression enhances radiation sensitivity via extracellular regulated protein kinase $\frac{1}{2}$ activation abolishing the radiation-induced G2-M arrest. *Cell Grow. Diff.* 2002; 13: 237-246.