*مقاله پژوهشی*

*مجله سلول و بافت (علمی - پژوهشی)*
*جلد ۳، شماره۲، تابستان ۱۳۹۱، ۱۶۰-۱۵۳*

# تاثیر همزمان شیکونین و گلوتاتیون پروکسیداز-۱ بر افزایش بقا نورون‌های دوپامین ساز در برابر مسمومیت پارکینسونی

**عمران اسماعیل زاده دانشجوی .M.Sc[۱و۲]، موسی گردانه .Ph.D [۱*]، حمیدرضا وزیری .Ph.D [۲]**

۱- دپارتمان ژنتیک مولکولی، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری
۲- دانشگاه گیلان، دانشکده علوم پایه
* پست الکترونیک نویسنده مسئول: mossa65@nigeb.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۳۹۰/۱۰/۱۲ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۰/۱۲/۱

## چکیده

**هدف:** هدف از این مطالعه بررسی تاثیر آنزیم گلوتاتیون پراکسیداز-۱ و شیکونین بر افزایش بقاء نورونهای دوپامین ساز در برابر مسمومیت پارکینسونی بود.

**مواد و روش ها**: برای افزایش بیان ژن گلوتاتیون پراکسیداز-۱ (GPX-1) در نورونهای دوپامین ساز، لنتی ویروس‌های نوترکیب ناقل این ژن همراه با ژن گزارشگر GFP ساخته شد و برای آلوده سازی نورونها استفاده گردید. بدنبال افزایش بیان GPX-1 در نورونهای آلوده شده به ویروس، میزان بقاء این نورونها در برابر مسمومیت پارکینسونی و نیز تیمار آن‌ها با شیکونین، اندازه گیری شد.

**نتایج:** به دنبال بیان ژن GFP که در زیر میکروسکوپ فلورسنس مشاهده شد، افزایش بیان ژن GPX-1 نیز با تکنیک RT-PCR به اثبات رسید. نتایج این آزمایشات نشان داد که هم افزایش بیان ژن GPX-1 و هم تیمار نورون ها با شیکونین بطور جداگانه ای باعث افزایش معنی داری در بقاء این نورونها در برابر مسمومیت پارکینسونی نسبت به نورونهای طبیعی و نورونهای کنترل (آلوده شده با pLV-EGFP) گردید. درصد بقاء پس از افزایش بیان GPX-1 در حدود ۱۴ درصد و پس از افزایش شیکونین ۱۱ درصد بیشتر از حالت بدون تیمار برآورد گردید. مهم‌تر آنکه حضور توام این دو عامل درصد بقاء را تا ۲۹ درصد افزایش داد.

**نتیجه گیری**: نتایج حاصله نشان داد که افزایش بیان ژن GPX-1 و تیمار سلول‌ها با شیکونین علاوه برآن‌که بطور جداگانه بر بقاء سلول‌ها در برابر توکسین پارکینسونی تاثیر فزاینده دارند، در صورت حضور همزمان، یک تاثیر هم افزایی داشته و احتمالا بطور سینرژیک عمل می‌نمایند.

**واژگان کلیدی**: پارکینسون، گلوتاتیون پراکسیداز ، شیکونین، نورون دوپامین ساز

Archive of SID


www.SID.ir

## مقدمه

مرگ نورون ها مهم‌ترین مشخصه‌ی بیماری‌های نورودژنراتیو به شمار می رود (۱). سیگنال‌های مرگ و به خصوص افزایش سطح رادیکال‌های آزاد در مغز باعث پدیده‌ی مرگ نورونی می‌گردند (۲). مولکول‌های شدیدا واکنش‌گر که اصطلاحا Reactive Species نامیده می‌شوند، احتمالا در مرگ نورون‌ها نقش ایفا می کنند وحتی عامل اصلی بیماری‌های نورودژنراتیو مانند هانتینگتون، پارکینسون، ALS (Amyotrophic lateral sclerosis) و غیره می‌باشند (۲و۳).

گونه‌های واکنش‌گر اکسیژن (Reactive oxygen species, ROS) انواعی از رادیکال‌های آزاد اکسیژن از قبیل سوپراکسید، هیدروکسیل و مولکول‌های غیر رادیکالی مثل پراکسید هیدروژن را شامل می‌شوند (۴). در مقابل استرس نیتراتیو، ناشی از تولید گونه‌های واکنش‌گر نیتروژن مانند نیتریک اکسید، نیتروژن دی اکسید و واسطه‌های واکنش‌گر آنها می باشد (۴). این مولکول‌ها به ماکرومولکول‌های حیاتی از قبیل پروتئین‌ها، لیپیدها واسیدهای چرب حمله کرده و باعث آغاز آسیب استرس اکسیداتیو در بدن می‌شوند. در این میان، یک سیستم دفاعی بر علیه این آسیب در بدن شکل می گیرد که با تخریب‌های ناشی از این استرس‌ها در بدن مقابله می‌کند. گلوتاتیون احیا شده (GSH) بخش مهمی از این سیستم دفاعی در بسیاری از بافت‌های بدن از جمله مغز به شمار می رود و فعالیت آن دارای نقش اساسی در حفاظت نورون‌ها در برابر تخریب میتوکندریایی می باشد (۵، ۶و ۷).

گلوتاتیون پروکسیداز-۱ (GPX-1) یک آنزیم ضد اکسیدان وابسته به سلنیوم است که $H_2O_2$ را به آب تبدیل و در طی این عمل GSH را به فرم دی سولفید آن (GSSG) تبدیل می‌کند (۸). GPX-1 باعث حفظ تعادل در حالت احیا سلولی شده و با اکسیداسیون لیپیدها، پروتئین‌ها، NADPH و NADH مقابله می‌نماید (۹). مطالعات نشان داده است که مدل‌های حیوانی که بیان ژن GPX-1 در آن‌ها افزایش پیدا کرده است، مقاومت بیشتری در مقابل استرس اکسیداتیو دارند در حالی‌که موش های تراریخته فاقد ژن GPX1-1 آسیب پذیری بسیار بیش‌تری نشان می دهند (۱۰). مطالعه قبلی ما مشخصا تاثیر این آنزیم در حفاظت نورون‌های دوپامین ساز را به اثبات رسانده است (۱۱).

شیکونین یک رنگدانه نفتوکوئینون از ریشه گیاه Lithospermum erythrorhizon است که سالیان دراز به‌عنوان یک ترکیب ضد التهابی و ضد زخم بکار برده شده است (۱۲). شیکونین قادر است تاثیرات ضد میکروبی، ضد سرطانی و ضد التهابی بر جای بگذارد (۱۲-۱۵). به‌نظر می‌رسد که کلیه این فعالیت‌های شیکونین به‌نحوی با قدرت آن در پاکسازی رادیکال‌های اکسیژنی مرتبط باشد (۱۶). با توجه به اینکه طبق گزارشات موجود شیکونین فعالیت ضد اکسیدانی موثری بر علیه چندین نوع گونه واکنش‌گر اکسیژن از جمله رادیکال آنیون سوپراکسید، رادیکال هیدروکسیل و غیره نشان می‌دهد (۱۷)، بررسی نقش این ترکیب گیاهی در کاهش آسیب‌های اکسیداتیو بر نورون‌ها می‌تواند دامنه کاربرد آنرا به درمان بیماری‌های مرگ نورونی گسترش دهد.

باتوجه به اهمیت نقش استرس اکسیداتیو در آسیب رساندن به مغز این سوال مطرح است که آیا مقابله با استرس اکسیداتیو می‌تواند از مرگ نورون‌ها و آغاز یا پیشرفت بیماری‌های نورودژنراتیو مقابله کند؟ پاسخ به این سوال وابسته به اینست که آیا می‌توان از طریق تقویت دفاع ضد اکسیدان با مرگ نورون‌ها در مدل سلولی بیماری پارکینسون مقابله کرد؟ در مطالعه جاری، نقش گلوتاتیون پروکسیداز-۱ بعنوان یک آنزیم آنتی اکسیدان مهم و نیز نقش شیکونین به‌عنوان یک ترکیب حمایت کننده در افزایش مقاومت نورون‌های دوپامین‌ساز در برابر مسمومیت پارکینسونی بررسی شده و تاثیر هم افزائی آن‌ها نیز مورد مطالعه قرار می گیرد.

## مواد و روش‌ها

***بیولوژی مولکولی:*** ناقل‌های ویروسی شامل ناقل بسته بندی (pCD/NL-BH*ΔΔΔ) ناقل پوششی (LTR-G) و ناقل انتقالی (PLV-GPX1) با استفاده از کیت Maxiprep از کیاژن خالص سازی شدند. مراحل مربوط به خالص سازی DNA مطابق دستور سازنده انجام شد (۱۸).

***کشت سلول:*** سلول‌های HEK-293T به عنوان مولد ویروس در محیط Dulbecco's Modified Eagle (DMEM) Medium به همراه FBS ۱۰ درصد در دمای ۳۷ درجه و $CO_2$ ۵ درصد کشت و پاساژ داده شدند. ۲ میلیون سلول در پتری دیش‌های ۱۰ سانتی‌متری مخصوص کشت سلول، ۲۴ ساعت قبل از ترانسفکشن کشت داده شدند تا در روز بعد ۵۰ تا ۶۰ درصد پتری دیش را پر کنند. همچنین سلول‌های نورونی رده‌ی PC12 به عنوان سلول های هدف، در دمای ۳۷ درجه و $CO_2$ ۵



Archive of SID
www.SID.ir

درصد کشت و پاساژ داده شدند. برای آلوده سازی ویروسی تعداد ۵۰ هزار سلول PC12 در پلیت ۲۴ خانه، ۲۴ ساعت قبل از آلوده سازی کشت داده شدند.

***تولید ویروس:*** برای تولید لنتی ویروس‌های نوترکیب و فعال، سلول‌های مولد ویروس (HEK-293T) همزمان با سه ناقل لنتی ویروسی به مقدار ۱۵ میکرو گرم از ناقل ترانسفر و ۱۰ میکرو گرم از هریک از ناقلین بسته بندی و غشایی، با روش رسوب DNA-فسفات کلسیم ترانسفکت شد. برای تشکیل این رسوب، DNA های مذکور همراه با ۵۰ میکرو لیتر از کلرید کلسیم ۲/۵ میلی مولار، با آب استریل به حجم ۵۰۰ میکرو لیتر رسید و هم حجم آن HEPES اضافه شد. محلول حاصل ۲۰ دقیقه در زیر هود انکوبه تا رسوب مطلوب به دست آید. سپس این رسوب به آرامی و قطره قطره به محیط سلول‌های هدف اضافه شد. سلول‌ها به مدت ۸ ساعت انکوبه و سپس محیط آن‌ها با محیط جدید تعویض شد. پس از این مراحل سلول ها تا زمان تولید ویروس و رها سازی آن به محیط کشت، در شرایط انکوباتوری ذکر شده نگهداری شدند.

***تغلیظ ویروس و آلوده سازی سلول های هدف:*** محیط کشت سلول‌های ترانسفکت شده پس از ۲۴ و۴۸ ساعت جمع آوری و از فیلتر ۰/۴۵ میکرون عبور داده شد. سپس محیط فیلتر شده به درون ستون‌های آمیکون MW ۱۰۰ ریخته ومدت ۱۰ دقیقه در دور rpm ۴۰۰۰ سانتریفیوژ شد. محلول باقی‌مانده پشت فیلتر که پر از ذرات ویریونی بود جمع آوری شد. حجم های مختلف از این محلول برای آلوده سازی سلول‌های هدف (PC12) استفاده شد و سپس سلول‌ها در شرایط انکوباتوری ذکر شده قرار داده شدند تا بیان ژن GFP موجود در ناقل انتقالی، در زیر میکروسکوپ فلورسنس مشاهده شود. پس از این مرحله با استفاده از تکنیک RT-PCR از افزایش بیان ترانسژن GPX1 اطمینان حاصل گردید.

***استخراج RNA و آزمایش RT-PCR:*** ۹۶ ساعت پس از ترانسدوکشن سلولی، کل RNA سلولی با استفاده از کیت مربوطه (High Pure RNA Isolation Kit, Roche) استخراج شده و پس از اطمینان از سلامت کامل آن در روی ژل، ۲ میکرو گرم از آن برای سنتز cDNA تحت شرایط گزارش شده بکار برده شد (۱۹). ساخت cDNA به کمک ترانسکریپتاز معکوس از (Fermentas, Lithuania) و در حضور هگزامرهای راندوم و RNase Inhibitor صورت گرفت. برای تکثیر یک قطعه ۳۸۷ جفت بازی از cDNA مربوط به GPX-1 انسانی، جفت پرایمر زیر بر اساس توالی کد کننده آن بشرح زیر طراحی و سنتز شد (۲۰)(*GenBank accession no. M83094*):

Forward: 5'-CTTATCGAGAATGTGGCGTCCC-3',
Reverse: 5'-GCCCACCAGGAACTTCTCAAAG-3'.

مقادیر یکسان از هر نمونه cDNA برای آزمایش PCR مورد استفاده قرار گرفت. پس از ۲ دقیقه دناتوراسیون نمونه‌ها در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد، واکنش PCR با ۳۰ سیکل دناتوراسیون در ۹۴ درجه سانتی‌گراد، ۴۵ ثانیه، Annealing در ۵۹ درجه سانتی‌گراد، ۱ دقیقه و مرحله Extension در ۷۲ درجه سانتی گراد، ۴۵ ثانیه به انجام رسید. محصولات PCR با استفاده از ژل آگاروز ۱/۲ درصد آنالیز و تصویر برداری شد. شدت باندهای این تصاویر با استفاده از نرم افزار US-Scan-It Gel Analysis Software (Skill Scientific Inc. Orem, Utah) اندازه‌گیری گردید.

***تیمار سلول ها با شیکونین:*** سلول‌های PC12 و PC12-GPX-1، ۲۴ ساعت قبل از ایجاد مسمومیت پارکینسونی در پلیت ۹۶ خانه، تحت تیمار با غلظت ۴ میکرو گرو بر میلی لیتر از شیکونین قرار گرفتند و در شرایط انکوباتوری مذکور نگهداری شدند. همچنین یک گروه از سلولهای PC12 طبیعی (Wild-type, WT) و فاقد هرگونه آلودگی ویروسی نیز به عنوان سلولهای کنترل برای این تیمار، استفاده گردیدند.

***ایجاد مسمومیت پارکینسونی و سنجش بقا***: ۲۴ ساعت پس از تیمار با شیکونین، سلول‌ها در معرض غلظت ۷۵ میکرومولار توکسین 6-OHDA بعنوان $LD_{50}$ این سلول‌ها قرار گرفتند و پس از ۳۰ ساعت میزان بقا آن‌ها با روش 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide (MTT) اندازه‌گیری شد. جزئیات مربوط به طرز تهیه محلول 6-OHDA، تعیین دوز $LD_{50}$ و سنجش MTT قبلا گزارش شده است (۲۰). به طور مختصر، استوک ۵ میلی مولار 6-OHDA (سیگما) حاوی ۰/۹ درصد سالین (Phosphate buffered saline)، ۰/۱ درصد آسکوربات و ۱۰ میلی (DETAPAC) diethylenetriaminepentaacetic acid در نیتروژن حل شده و قبل از ذخیره سازی در دمای ۲۰- درجه سانتی گراد توسط فیلتراسیون، استریل گردید. برای تعیین $LD_{50}$ توکسین، سلول‌ها توسط رقت‌های سریالی از 6-OHDA برای مدت ۲۴ ساعت

Archive of SID


www.SID.ir

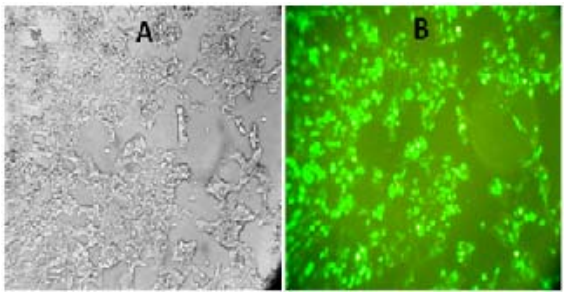
تیمار شدند و غلظتی از توکسین که در آن نیمی از سلول‌ها از بین رفتند به عنوان $LD_{50}$ انتخاب گردید. همچنین برای سنجش MTT، با حل کردن استوک این ماده در سالین، غلظت ۵ میلی گرم در میلی لیتر از آن تهیه شد و پس از استریل کردن آن توسط فیلتراسیون، ۲۰ میکرو لیتر از آن به ۱۸۰ میکرو لیتر محیط DMEM فاقد FBS در هر چاهک اضافه گردید و به مدت ۳ ساعت در شرایط انکوباتوری فوق نگهداری شد. سپس این محیط با ۲۰۰ میکرو لیتر Dimethyl Sulfoxide (DMSO) جایگزین شد وپس از ۵ دقیقه انکوبه شدن، میزان جذب در طول موج ۵۸۰ نانومتر اندازه گیری شد.

***آنالیز آماری:*** داده‌های آماری به‌صورت mean±SEM بیان و حاصل سه آزمایش مجزا است که هرکدام به‌صورت تریپلیکیت تکرار شده اند. آنالیزهای آماری این داده ها با استفاده از نرم افزار SPSS, version 17.0 انجام پذیرفت. برای آنالیز تفاوت بین گروه‌های مختلف سلولی از آنالیز یکسویه واریانس (One-way analysis of variance, ANOVA) و سپس با تست دانکن (*post-hoc* Duncan Multiple-comparisons Test) استفاده گردید. مقادیر $p< ۰/۰۱$ و $p< ۰/۰۰۱$ به عنوان اختلاف بسیار معنی دار تفسیر شد.

## نتایج

### موفقیت مرحله ی ترانسفکشن:

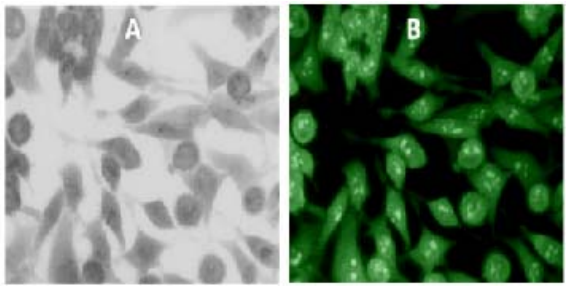
مشاهده‌ی سلول‌ها با میکروسکوپ فلورسنس در فواصل زمانی متوالی پس از ترانسفکشن، آغاز بیان ژن GFP را در سلول‌های HEK-293T، ۹ ساعت پس از ترانسفکشن نشان داد و در ساعات بعدی بیان این ژن تشدید گردید تا نهایتا در ۲۴ ساعت پس از ترانسفکشن این بیان به ۱۰۰ درصد رسید (شکل ۱).




*شکل۱: بیان ژن GFP در سلول‌های HEK 293T. این تصاویر بیست و چهار ساعت پس از ترانسفکشن سلول‌های HEK 293T، با استفاده از میکروسکوپ فلورسنت و با فیلتر FITC تهیه شده است (A= سلول های طبیعی، B= سلول ها پس از ترانسفکشن). بزرگنمائی: ×۱۰۰*

### ترانسداکشن نورون های هدف و بیان ژن گزارش‌گر:

حدود ۳۶ ساعت پس از افزودن استوک ویروسی به سلول‌های PC12 اولین نشانه‌های بیان GFP با استفاده از میکروسکوپ فلورسنس مشاهده شد و موفقیت آمیز بودن ترانسدوکشن را به اثبات رساند. بیان GFP در فاصله زمانی ۷۲ ساعت به حداکثر خود رسید (شکل ۲).




*شکل۲: بیان ژن GFP در سلول‌هایPC12 . این تصاویر بیست و چهار ساعت پس از آلوده‌سازی ویروسی (ترانسدوکشن) سلول‌های PC12 که با استفاده از میکروسکوپ فلورسنت و با فیلتر FITC تهیه شده است (A= سلول های طبیعی، B= سلول ها پس از ترانسدوکشن). بزرگنمائی: ۲۰۰x*

### افزایش بیان ژن GPX-1:

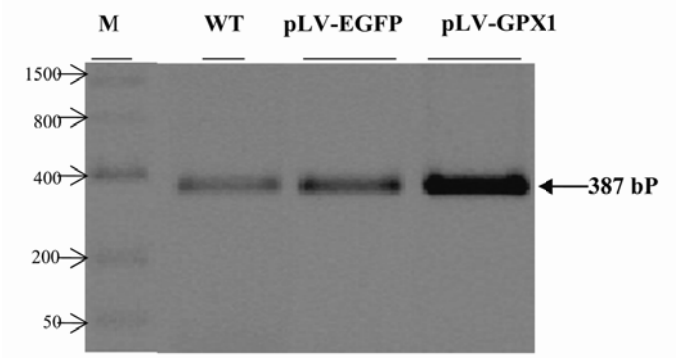
دو هفته پس از آلوده شدن سلول‌های PC12 به ویروس‌های هدف و اطمینان از بیان ترانسژن، RNA این سلول‌ها استخراج شد و با استفاده از تکنیک RT-PCR میزان بیان ژن GPX-1 قبل و بعد از ترانسداکسیون مشاهده گردید (شکل۳). این آزمایشات نشان داد که میزان بیان GPX-1 در سلول‌های آلوده شده به ویروس pLV-GPX1 نسبت به سلول های طبیعی افزایش یافته است. پس از سه بار تکرار آزمایش بطور مستقل و با استفاده از نرم افزار ذکر شده در بخش روشها محاسبات لازم انجام گردید و در نتیجه میزان این افزایش را بطور متوسط ۲/۸ برابر برآورد نمود. همانطور که انتظار می رفت بیان GPX-1 در سلول‌های آلوده به ویروس pLV-EGFP نیز افزایش نشان داد که میزان آن بطور متوسط ۱/۳ برابر سلولهای طبیعی (WT) بود (شکل ۳).

### تاثیر شیکونین و گلوتاتیون پروکسیداز بر افزایش بقا نورون‌ها:

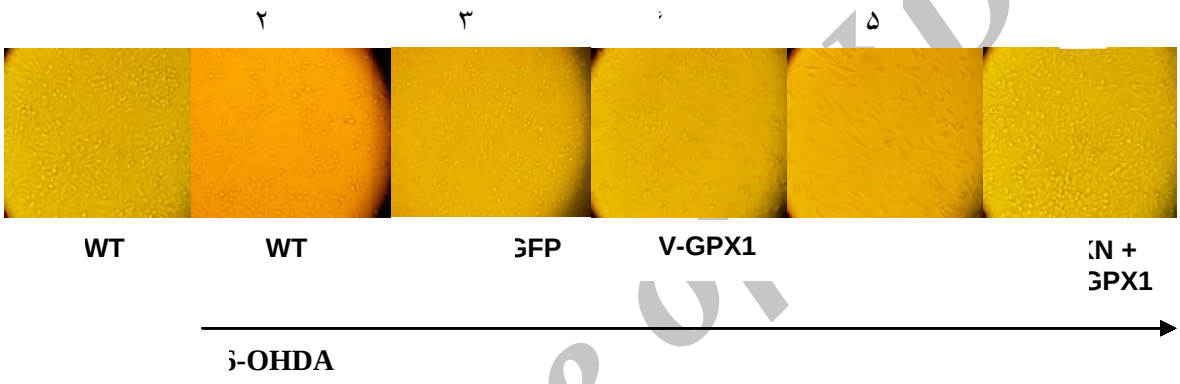
سلول‌های PC12 که افزایش بیان GPX-1 را به وضوح نشان دادند با شیکونین نیز تیمار شدند. پس از آن توکسین 6-OHDA به گروه‌های مختلف سلولی اضافه گردید تا میزان مقاومت آن‌ها در برابر مسمومیت پارکینسونی تعیین شود. شکل ۴ تصویری از سلول‌ها را ۲۴ ساعت پس از مسمومیت پارکینسونی نشان می‌دهد.

Archive of SID

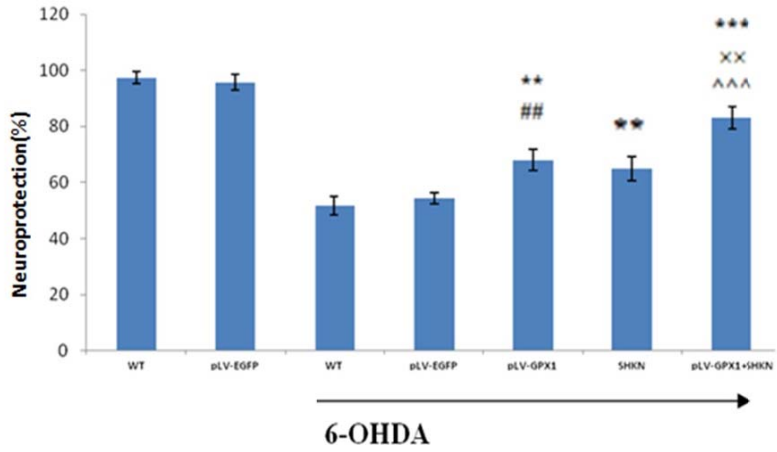

www.SID.ir




*شکل۳: نتایج حاصل از واکنش RT-PCR. این تصویر ژل الکتروفورز، از نمونه های واکنش مزبور بر روی قطعه ۳۸۷ جفت بازی در ناحیه کد کننده ژن GPX-1 تهیه شده است. اندازه باندها بر اساس جفت باز مشخص شده است. M (مارکر ۱۵۰۰ جفت بازی RNA)، WT (Wild-type سلول‌های طبیعی PC12)، pLV-EGFP (سلول PC12 آلوده شده با ویروس حاوی ژن GFP)، pLV-GPX1 (سلول PC12 آلوده شده با ویروس حاوی ژن GPX1)*




*شکل ۴: بقاء نورون‌های PC12 در برابر مسمومیت پارکینسونی. این تصاویر میکروسکوپی بیست و چهار ساعت پس از تیمار سلول‌ها با توکسین 6-OHDA تهیه شده است. فلش بزرگ سلول‌های تیمار شده با توکسین را نشان می‌دهد. ۱= سلول‌های طبیعی، ۲= سلول های طبیعی به همراه توکسین، ۳= نورونهای حاوی ژن GFP، ۴= نورون های دارای ژن GPX1، ۵= نورون های تیمارشده با شیکونین، ۶= نورونهای دارای ژن GPX1 و تیمار شده با شیکونین. بزرگنمائی: ×۱۰۰*




*شکل ۵: میزان بقاء سلولها. این نمودار درصد بقاء سلولهای PC12 را پس از افزایش بیان ژن GPX-1 وتیمار باشیکونین نشان میدهد که از سنجش MTT بدست آمده است. سلولهای که از نقطه آغازین فلش بزرگ به بعد قرار دارند سلول‌های تیمار شده با توکسین میباشند در حالیکه سلولهای دو ستون اول توکسین دریافت نکرده اند. هر ستون نماینده ۳ آزمایش مستقل است که بصورت تریپلیکیت انجام شده است. اختلافات آماری داده ها بین گروههای مختلف و گروه طبیعی (WT) با علامت (P<0.01) ** یا (P<0.001) ***، بین گروه pLV-GPX1 و pLV-EGFP با علامت ## (P<0.01)، بین گروه pLV-GPX1+ SHKN و گروه pLV-GPX1 با علامت (P<0.01) ×× و بین گروه pLV-GPX1+ SHKN و گروه WT+ SHKN با علامت ^^^ (P<0.001) نشان داده می‌شود. SHKN، شیکونین و WT، سلول‌های طبیعی (Wild-type).*



www.SID.ir

**سنجش افزایش بقا نورون‌ها در حضور GPX-1 و شیکونین:** داده‌های حاصل از سنجش MTT در شکل ۵ نشان داده شده است. درصد بقا سلول‌های گروه pLV-EGFP (۵۴±۲) نسبت به درصد بقا سلول‌های طبیعی(۵۲±۲) (WT) از نظر آماری معنی‌دار نبود. از سوی دیگر درصد بقا سلول‌های گروه pLV-GPX1 در برابر مسمومیت مقاومت نشان دادند که این رقم نسبت به درصد بقا سلول‌های کنترل (pLV-EGFP) ۱۴ درصد افزایش نشان داد و از نظر آماری معنی دار بود ($p< ۰/۰۱$ ). افزایش درصد بقا سلول‌های گروه شیکونین به سلول‌های طبیعی (WT) میزان بقاء این سلولها را به 4% ±65 رسانید که نسبت به سلول‌های طبیعی و کنترل افزایش بسیارمعنی داری را نشان داد ($P<۰/۰۱$). نهایتا آنکه افزایش شیکونین به سلولهای گروه pLV-GPX1 میزان بقاء این سلول‌ها را تا ۴±۸۳ درصد افزایش داد که در مقایسه با درصد بقاء همین گروه سلولی در غیاب شیکونین ۱۵ درصد افزایش نشان می‌دهد ($P<۰/۰۱$). همچنین سلول‌های مزبور در مقایسه با سلول‌های طبیعی که در معرض شیکونین بودند ۱۸ درصد افزایش بقا نشان می‌دهند ($P<۰/۰۰۱$).

## بحث

در این مطالعه، ویروس‌های نوترکیب ناقل ژن GPX-1 با موفقیت تولید شده و برای ترانسدوکشن سلول‌های PC12 که مدلی مناسب برای نورون های دوپامین ساز بشمار می‌روند بکار گرفته شدند. همچنین از ماده شیکونین که نقش حمایتی از سلول‌های پستانداران ایفا می‌کند برای تیمار سلول‌های دوپامین ساز مزبور استفاده گردید. پس از ایجاد مسمومیت سلولی توسط توکسین 6-OHDA میزان بقا سلول‌ها به‌روش MTT اندازه گیری شد. نتایج حاصله نشان داد که هم گلوتاتیون پروکسیداز و هم شیکونین به‌عنوان عوامل حفاظت نورونی عمل می‌کنند. بر اساس نتایج این مطالعه هر یک از دو عامل مزبور به تنهایی می‌توانند میزان مقاومت سلول‌ها را در برابر مسمومیت پارکینسونی افزایش دهند. بعلاوه، فعالیت همزمان آندو بصورت هم افزایی عمل کرده و مقاومت را باز هم بطور معنی داری افزایش می‌دهد.

گلوتاتیون پروکسیداز یک آنزیم ضد اکسیدانت بوده و باعث مصرف و کاهش رادیکال‌های آزاد درون سلولی به‌خصوص پروکسید هیدروژن می‌شود (۸). مطالعه قبلی ما بر روی یک رده نورون دوپامین‌ساز فعالیت ضد اکسیدانی آنزیم فوق را به‌خوبی اثبات کرده است (۱۱). گزارش‌هایی نیز از فعالیت ضد مرگ شیکونین در دست است (۲۱ و ۲۲). در عین حال گزارش روشنی از تاثیر ضد مرگ شیکونین اختصاصا در نورون‌های دوپامین ساز در دست نیست. به این ترتیب مطالعه حاضر در صدد پاسخ به این دوسوال برآمد: ۱) آیا شیکونین نیز همانند GPX-1 می‌تواند مانع مرگ نورون‌های دوپامین‌ساز در برابر آسیب‌های اکسیداتیو شود؟ ۲) آیا حضور و فعالیت هم‌زمان دو عامل حفاظتی فوق در یک سلول دوپامین‌ساز می‌تواند شانس بقا آن را در برابر مسمومیت پارکینسونی افزایش دهد و این افزایش نسبت به افزایش ناشی از فعالیت هر یک از دو عامل بتنهایی تفاوت آماری محسوسی دارد؟ داده‌های این مطالعه نشان میدهد که نه تنها هر یک از دو عامل GPX-1 و شیکونین بر بقا سلول‌های دوپامین‌ساز بطور مثبت و معنی دار موثر است، بلکه فعالیت توام آن‌ها درصد بقا را باز هم به‌طور معنی دار بالا برده و با تاثیرکشنده توکسین 6-OHDA بیش از پیش مقابله می‌کند. بر اساس نتایج بدست آمده، این فعالیت توام به‌صورت هم افزایی بروز می‌کند به‌طوری‌که تاثیر آن بر بقا نسبت به تاثیر انفرادی هر یک از دو عامل حفاظتی تفاوت چشم‌گیر و از نظر آماری بسیار معنی دار بود.

مطالعات انجام شده روی GPX-1 وابستگی این آنزیم را به گلوتاتیون درون سلولی برای انجام وظیفه خود بخوبی نشان می‌دهد (۸). تیمار نورون‌های غیر دوپامینرژیکی با شیکونین نیز نشانگر تاثیر این ترکیب بر رادیکال‌های آزاد می‌باشد (۲۱). اما مکانیسم هم افزایی مشاده شده در مطالعه جاری چیست و این دو عامل در کدام نقطه از شاه‌راه‌های بقا به یکدیگر می‌رسند و یا چه تاثیری برهم دارند؟ مطالعات پیش روی ما درصدد یافتن پاسخ به این سوالات می‌باشد.

مرگ نورون‌های دوپامین‌ساز مهمترین شاخصه بیماری پارکینسون در مقیاس سلولی است. سم 6-OHDA از جمله توکسین‌هایی است که در صد بالایی از علائم سلولی پارکینسون را در لوله آزمایش و نیز در مدل‌های حیوانی باز تولید می‌کند. به این دلیل مطالعات آزمایشگاهی که جوانب مختلف پارکینسون را هدف قرار می‌دهد بر اساس مدل 6-OHDA و دیگر مدل‌ها استوار است. چنین مطالعاتی در مقیاس سلولی قابل پیگیری در مدل‌های حیوانی 6-OHDA بوده و می‌توانند برتعیین استراتژی‌های حفاظت نورونی تاثیر گذار باشد.


www.SID.ir
Archive of SID

## نتیجه گیری

نهایتا نتایج این مطالعه نشـان داد کـه هـم افـزایش بیـان آنـزیم GPX-1 و هم تیمار سلول‌هـا بـا شـیکونین بصـورت انفـرادی و به‌خصوص بطور توام بر کاهش آسیب‌های ناشی از رادیکـال‌هـای آزاد بر سلول‌ها موثر است. آیا این تاثیر توام نتیجـه همکـاری دو عامل بصورت هم افزایی یـا سـینرژیک اسـت؟ مکانیسـم چنـین واکنش‌هایی چیست و چه شاه‌راه‌های درون سلولی را تحت تـاثیر قرار می‌دهد؟ آیا مـی‌تـوان ایـن تـاثیر را در مـدل‌هـای حیـوانی بیماری نیز مشاهده و اثبات کرد؟ مطالعـات آینـده مـی‌توانـد بـا دادن پاسخ به این سوالات در بهینه سازی مقامت نورونی در برابر مسمومیت‌هـای پارکینسـونی و تعیـین اسـتراتژی‌هـای حفاظـت نورونی موثر واقع شود.

## تشکر و قدردانی

از همکاری تکنیکـی خـانم سـحر شـجاعی در تولیـد ایـن مقالـه سپاسگزاری می‌شود.

## منابع

1. Wolozin B, Behl C. Mechanisms of neurodegenerative disorders: Part 2: control of cell death. Arch Neurol. 2000; 57(6): 801-4.

2. Culmsee C, Landshamer S. Molecular insights into mechanisms of the cell death program: role in the progression of neurodegenerative disorders. Curr Alzheimer Res. 2006; 3(4): 269-83.

3. Poon HF, Butterfield DA. Free radicals and brain aging. Clin Geriatr Med. 2004; 20(2): 329-59.

4. Halliwell B. Oxidative stress and neurodegeneration : where are we now. J Neurochem. 2006; 97: 1634–1658.

5. Dringen R. Metabolism and functions of glutathione in brain. Prog Neurobiol. 2000; 62(6): 649-71.

6. Wullner U, Klockgether T. Glutathione depletion potentiates MPTP and MPPtoxicity in nigraldopaminergic neurons. Neuroreport. 1996; 7: 921-923.

7. Zeevalk GD, Nicklas WJ. Role of oxidative stress and the glutathione system in loss of dopamine neurons due to impairment of energy metabolism, J Neurochem. 1998; 70: 1421-1430.

8. Halliwell B, Gutteridge JM. Biologically relevant metal ion-dependent hydroxyl radical generation. An update. Febs Lett. 1992; 307(1): 108-112.

9. Cheng W, Fu YX, Porres JM, Ross DA, et al. Selenium-dependent cellular glutathione peroxidase protects mice against a pro-oxidant-induced oxidation of NADPH, NADH, lipids, and protein. FASEB J. 1999; 13(11): 1467-1475.

10. Cheng WH, Ho YS, Valentine BA, Ross DA, et al. Cellular glutathione peroxidase is the mediator of body selenium to protect against paraquat lethality in transgenic mice. J Nutr. 1998; 128: 1070–76.

11. Gardaneh M, Gholami M, Maghsoudi N. Synergy between glutathione peroxidase-1 and astrocytic growth factors suppresses free radical generation and protects dopaminergic neurons against 6-hydroxydopamine, Rejuvenation Res. 2011; 14(2): 195-204.

12. Papageorgiou VP, Assimopoulou, AN, Couladouros, EA, Hepworth D, et al. The chemistry and biology of alkannin, shikonin, and related naphthazarin natural products. Angew. Chem. Int. Ed. 1999; 38: 270–300.

13. Yoshimi N, Wang A, Morishita Y, Tanaka T, et al. Modifying effects of fungal and herb metabolites on azoxymethane- induced intestinal carcinogenesis in rats. Jpn. J. Cancer Res. 1992; 83(12): 1273–1278.

14. Hisa T, Kimura Y, Takada K, Suzuki F, et al. Shikonin, an ingredient of Lithospermum erythrorhizon, inhibits angiogenesis in vivo and in vitro. Anticancer Res. 1998; 18: 783–790.

15. Tanaka S, Tajima M, Tsukada M, Tabata M. A comparative study on antiinflammatory activities of the enantiomers, shikonin and alkannin. J. Nat. Prod. 1986; 49: 466–469.

16. Kourounakis AP, Assimopoulou AP, Papageorgiou VP, Gavalas A, et al. Alkannin and shikonin: effect on free radical processes and on inflammation - a preliminary pharmacochemical investigation. Arch. Pharm. (Weinheim). 2002; 335, 262-266.

17. Gao D, Kakuma M, Oka S, Sugino K. et al. Reaction of beta-alkannin (shikonin) with reactive oxygen species: detection of beta-alkannin free radicals. Bioorg Med Chem. 2000; 8, 2561-2569.

18. Rahimi ShamAbadi A, Gardaneh M, Alipanah M, Gharib E. Transfectability and Transducibility of chicken liver cell line LMH compared to human cell line HEK-293T. J Cell Tissue. 2011; 1(2): 47-56][Persian].

19. Gharib E, Gardaneh M, Montasser Kouhsari Sh. Cooperative effects of glutathione peroxidase-1 and glial cell line-derived neurotrophic factor on dopaminergic neuron resistance against 6-OHDA and $H_2O_2$ toxicities, J Neurosci Res. 2012 (submitted).

Archive of SID



www.SID.ir

20. Moscow JA, Morrow CS, He R, Mullenbach GT, et al. Structure and function of the 5'-flanking sequence of the human cytosolic selenium-dependent glutathione peroxidase gene (hgpx1). J Biol Chem. 1992; 267(9): 5949.

21. Wang Z, Liu T, Gan L, Wang T, et al. Shikonin protects mouse brain against cerebral ischemia/reperfusion injury through its antioxidant activity, Eur J Pharmacol. 2010; 643(2-3): 211-7.

22. Nam KN, Son MS, Park JH, Lee EH. Shikonin attenuate microglial inflammatory responses by inhibition of ERK, Akt, and NF-kappaB: neuroprotective implications, Neuropharmacol. 2008; (5):819-25.

Archive of SID



www.SID.ir

Journal of Cell & Tissue (JCT)
Summer 2012; 3(2): 153-160

*Research Article*

# The Concomitant Effect of Shikonin and Glutathione Peroxidase-1 on Enhanced Survival of Dopaminergic Neurons against Parkinsonian Toxicity

Esmaeilzadeh E. M.Sc.[1, 2], Gardaneh M. Ph.D.[*1], Vaziri HR. Ph.D.[2]

1. National Institute of Genetic Engineering and Biotechnology (NIGEB)
2. University of Guilan, Faculty of Science

* Email corresponding author: mossa65@nigeb.ac.ir

Received: 2 Jan. 2012 Accepted: 20 Feb. 2012

**Abstract**

**Aim:** the aim of this study was to examine the effect of glutathione peroxidase-1 (GPX-1) and shikonin on enhanced survival of dopaminergic neurons PC12 against parkinsonian toxicity.

**Material and methods:** in order to overexpress GPX-1 in PC12 neurons, recombinant lentiviruses carrying both GPX-1 and reporter GFP genes were generated and used to infect target cells. The survival rate of the transduced neurons in the presence or absence of shikonin was then quantified.

**Results:** following GFP gene expression observed under the fluorescent microscope, the overexpression of GPX-1 was determined using the RT-PCR analysis. Changes in cell survival against parkinsonian toxicity were examined in the presence of two factors: GPX-1 overexpression and shikonin treatment. The results indicated that both GPX-1 overexpression and shikonin treatment of the PC12 cells increased significantly cell survival against parkinsonian toxicity. Survival increased by 14% after GPX-1 overexpression and by 11% following shikonin treatment. More importantly, when the two factors were applied simultaneously (by shikonin treatment of GPX-1-overexpressing cells) they saved 83% of the neuronal cells that was up by 29%. This increase of survival rate was significant compared to the increase achieved by each factor alone.

**Conclusion:** our data showed that GPX-1 gene overexpression and shikonin treatment not only individually increase PC12 cell survival against oxidative stress caused by the parkinonian toxin 6-OHDA, but also will function additively and/ or synergistically if they are applied together.

**Keywords:** Pakinson, Glutathione peroxidase, Shikonin, Dopaminergic neuron

Archive of SID



www.SID.ir