Archive of SID

مقاله پژوهشی

مجله سلول و بافت (علمی- پژوهشی)
جلد ٦، شماره ٤، زمستان ١٣٩٤، ٤٩٠-٤٨١

القای التهاب عصبی با فعال‌سازی سلول‌های میکروگلیا و تاثیر آن بر بقای نورون‌های دوپامین‌ساز

مینا رسول نژاد، موسی گردانه .Ph.D[1]★، فرزانه صابونی، .Ph.D[2]★

۱- کارشناس ارشد زیست شناسی سلولی- مولکولی، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری
۲- استادیار، دپارتمان سلولهای بنیادی و پزشکی ترمیمی، پژوهشکده پزشکی، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری
۳- استادیار، دپارتمان پزشکی مولکولی، پژوهشکده پزشکی، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری

* پست الکترونیک نویسندگان مسئول: ۱. mossa65@yahoo.com، و mossa65@nigeb.ac.ir ۲. sabouni@nigeb.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۱۱/۲۰ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۴/۴/۲

چکیده

هدف: هدف از این مطالعه جداسازی سلول‌های میکروگلیا از مغز نوزاد موش صحرائی، فعال کردن آن‌ها با لیپوپلی‌ساکارید (LPS) و بررسی اثر فاکتورهای التهابی تولیدی توسط سلول‌های مزبور، روی سلول‌های نورونی دوپامین‌ساز می‌باشد.

مواد و روش‌ها: سلول‌های مخلوط گلیال از مغز نوزادان موش صحرایی ۱ تا ۳ روزه، تهیه و سپس سلول‌های میکروگلیا از آن‌ها جدا شدند. پس از تیمار میکروگلیا با LPS محیط مشروط آن‌ها جمع‌آوری شد. سلول‌های نورونی دوپامین‌ساز رده SH-SY5Y در پلیت‌های ۹۶ خانه‌ای کشت داده شدند تا با محیط مشروط مزبور تیمار گردند. میزان بقا و مرگ نورون‌ها با تست‌های MTT و آپوپتوزیس ارزیابی شد و داده‌ها آنالیز آماری شدند.

نتایج: سلول‌های مخلوط گلیال پس از گذشت ۱۰ الی ۱۳ روز شامل مخلوطی از سه نوع سلول آستروگلیا، الیگودندروسیت و میکروگلیا بودند. میکروگلیاها به‌صورت شناور و نیمه چسبیده در سطح قرار داشتند. این سلول‌ها ۲۴ ساعت پس از جداسازی و انتقال به ظرف جدید، فرمی دوکی و منشعب به خود گرفتند. در این زمان سلول‌های مزبور با LPS تیمار شدند تا فعال شوند. فعال‌سازی آن‌ها با این ماده، از طریق تغییر مورفولوژیک سلول‌ها از فرم دوکی به آمیبی، مشاهده افزایش تولید NO با کمک تست گریس و القای بیان ژن‌های التهابی (TNF-α , iNOS) به اثبات رسید. همچنین تیمار سلول‌های نورونی دوپامین‌ساز SH-SY5Y با محیط مشروط میکروگلیای فعال شده، منجر به آپوپتوزیس و نکروزیس شد.

نتیجه‌گیری: فعال‌سازی میکروگلیا با LPS منجر به بیان و ترشح فاکتورهای التهابی می‌شود. میزان زیاد فاکتورهای مزبور با ایجاد التهاب عصبی، منجر به مرگ آپوپتوتیک و نکروتیک سلول‌های دوپامین‌ساز می‌شود.

واژگان کلیدی: التهاب عصبی، دوپامینرژیک، میکروگلیا، لیپوپلی‌ساکارید

www.SID.ir

Archive of SID

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

بیماری پارکینسون دومین بیماری مخرب عصبی شایع در جهان است که شاخصه‌ی اصلی آن مرگ نورون‌های دوپامین‌ساز مغز میانی می‌باشد (۱ و ۲). دو عامل مهمی که در روند پیشرفت اکثر بیماری‌های مخرب عصبی دیده می‌شوند استرس اکسیداتیو (ناشی از تولید گونه‌های فعال اکسیژن و نیتروژن) و التهاب عصبی (ناشی از فعالیت بیش از حد سلول‌های میکروگلیا و آستروگلیا در سیستم عصبی مرکزی) می‌باشند (۳).

سلول‌های میکروگلیا یکی از سه دسته سلول گلیال سیستم عصبی مرکزی (CNS) می‌باشند. سلول‌های مزبور که ۱۲ درصد از حجم مغز را به خود اختصاص می‌دهند، در واقع ماکروفاژهای CNS هستند. این سلول‌ها در یک مغز سالم در حالت استراحت بوده و شکلی منشعب و شاخه شاخه دارند و به‌عنوان ناظر ایمنی در مغز عمل می‌کنند. این در حالی‌است که به هنگام حمله‌ی یک عامل بیماری‌زا یا ایجاد جراحت در مغز، سلول‌های مزبور فعال شده و با تغییر مورفولوژیکی از حالت منشعب به‌حالت آمیبی‌شکل عوامل بیماری‌زا و سلول‌های مرده را با فعالیت فاگوسیتوزی خود پاک‌سازی می‌کنند (۴ و ۵). سلول‌های میکروگلیا همچنین با تولید سیتوکین‌ها و کموکین‌های التهابی، سایر سلول‌های سیستم ایمنی اعم از ذاتی و اکتسابی را به ناحیه‌ی آسیب دیده فرا می‌خوانند تا عامل بیماری‌زا هر چه سریع‌تر سرکوب شود (۶-۸).

تصور بر این است که حضور طولانی مدت عامل بیماری‌زا یا آسیب مغزی و نیز از کنترل خارج شدن سیستم تنظیمی سلول‌های میکروگلیا، منجر به تولید و ترشح بیش از حد فاکتورهای التهابی توسط سلول‌های مزبور شده و نه تنها عوامل عفونی بلکه سلول‌های عصبی زنده نیز آسیب دیده و یا کشته می‌شوند، که اصطلاحا به این شرایط التهاب عصبی گفته می‌شود (۳). شناسایی مسیرهای سیگنالینگ درگیر در مرگ نورون‌ها در اثر التهاب عصبی، راه را برای پیشرفت راه‌کارهای درمانی جدید در معالجه‌ی بیماری‌های مخرب عصبی می‌گشاید. بدین منظور کشت سلول‌های میکروگلیا در محیط آزمایشگاه و تیمار رده‌های سلولی نورونی دوپامین‌ساز با فاکتورهای التهابی تولیدی سلول‌های میکروگلیا، می‌تواند مدل مطالعاتی مناسبی برای بررسی مرگ سلولی در اثر التهاب عصبی و نیز شناسایی مسیرهای سیگنالینگ مربوطه باشد. در همین راستا روش‌های متعددی برای جداسازی سلول‌های میکروگلیا ارائه شده است که یکی از پرکاربردترین آن‌ها روشی است که در سال ۱۹۹۶ توسط گیولیان و همکارانش (۹) ارائه شد. وجه مشترک تمامی این روش‌ها، استفاده از مغز نوزادان موش صحرایی یا موش خانگی ۱ تا ۳ روزه است که غنی از سلول‌های میکروگلیا می‌باشد.

با توجه به نقش مهم میکروگلیا در ایجاد التهاب عصبی و به‌دنبال آن نقش مهم التهاب عصبی در روند پیشرفت بیماری‌های مخرب عصبی که در بالا تشریح شد، در مطالعه جاری سلول‌های میکروگلیا در محیط آزمایشگاه تهیه شدند و سپس تاثیر کشنده‌ی آن‌ها بر رده‌های نورونی دوپامین‌ساز که در بیماری مخرب عصبی پارکینسون می‌میرند، مورد ارزیابی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

تهیه‌ی سلول‌های مخلوط گلیال: سلول‌های مخلوط گلیال از مغز نوزادان موش صحرایی ۱ تا ۳ روزه‌ی نژاد ویستار تهیه شد (۱۰). به‌طور مختصر مغز نوزادان موش صحرایی ۱ تا ۳ روزه جدا شد و پس از جداسازی پرده‌ی مننژ، بافت قشر مغز با ضربات مکانیکی و پیپت کردن خرد شده و به‌صورت همگن و یکنواخت درآمد. سپس در فلاسک‌های پلی استیرن مخصوص کشت سلول در حضور محیط Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) حاوی ۱۰ درصد سرم جنین گاوی (FBS) و ۱ درصد آنتی‌بیوتیک Pen/Strep در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد و CO_2، ۵ درصد کشت داده شدند. پس از دو روز انکوبه شدن و چسبیدن توده‌های بافتی به کف فلاسک، کل محیط و بافت‌های معلق دور ریخته شدند و با محیط جدید جایگزین شد. پس از آن هر سه روز یک بار نصف محیط فلاسک با محیط جدید جایگزین شد.

جداسازی سلول‌های میکروگلیا: پس از گذشت ۱۰ الی ۱۳ روز از کشت سلول‌های مخلوط گلیال و پرشدن کف فلاسک‌ها، سلول‌های معلق یا نیمه‌چسبیده که میکروگلیا بودند با تکان دادن مکرر فلاسک‌ها به‌مدت ۱۰ الی ۲۰ دقیقه به‌صورت دستی، از سایر سلول‌ها جدا شده و به‌صورت شناور در محیط

www.SID.ir

Archive of SID

درآمدند. محیط مذکور از فلاسک خارج شد و سلول‌های معلق در آن به تعداد ۸۰۰۰۰ سلول در هر چاهک از پلیت ۲۴ خانه‌ای کشت داده شدند.

تهیه‌ی نورون‌های دوپامینرژیک SH-SY5Y: رده‌ی سلولی دوپامین‌ساز SH-SY5Y از بانک سلولی پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک تهیه شد و طبق شرایط مذکور در بالا در فلاسک کشت داده شد. سلول‌های مزبور ۲۴ ساعت قبل از تیمار با محیط مشروط میکروگلیا، به تعداد ۳۰۰۰ سلول در هر چاهک از پلیت ۹۶ خانه‌ای کشت داده شدند.

فعال‌سازی سلول‌های میکروگلیا با LPS: پودر لیپوپلی‌ساکارید (L8274) از شرکت سیگما خریداری شد و غلظت اولیه‌ی ۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر از آن در بافر نمکی فسفات (PBS) تهیه شد و سپس با فیلتر ۰/۲ میکرومتر به‌صورت استریل درآمد و برای ذخیره‌سازی طولانی‌مدت در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شد. غلظت‌های نهایی ۱ و ۱۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر از LPS ، با هدف فعال‌سازی و تولید فاکتورهای التهابی، ۲۴ ساعت پس از جداسازی میکروگلیا به سلول‌های مزبور اضافه و به‌مدت ۴۸ ساعت با آن انکوبه شدند. سپس محیط مشروط این سلول‌ها جمع‌آوری و با هدف ذخیره‌سازی طولانی‌مدت در ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شد.

تست گریس: برای تایید فعال‌سازی میکروگلیا، میزان نیتریک اکسید (NO) تولیدی با استفاده از تست رنگ‌سنجی گریس مورد سنجش قرار گرفت. به‌طور مختصر مقدار ۵۰ میکرولیتر از محیط مشروط سلول‌های میکروگلیا جدا شده و به یک چاهک از میکروپلیت ۹۶خانه‌ای اضافه شد، سپس محلول‌های مخصوص تست گریس به حجم ۵۰ میکرولیتر به آن اضافه شدند و در آخر میزان نیتریک اکسید موجود در این محیط، از طریق سنجش میزان جذب آن در طول موج ۵۴۰ نانومتر با استفاده از دستگاه ELISA reader تعیین شد.

استخراج RNA و آزمایش RT-PCR: چهل و هشت ساعت پس از تیمار سلول‌های میکروگلیا با LPS و جمع‌آوری محیط سلول‌های مزبور، استخراج کل RNA سلولی با استفاده از کیت استخراج RNA سیناژن (RNX-Plus) طبق دستورالعمل سازنده انجام شد. پس از اطمینان از سلامت RNA روی ژل آگاروز و سنجش غلظت آن با دستگاه نانودراپ، مقدار ۲ میکروگرم از آن برای انجام آزمایش RT-PCR و سنتز cDNA، با استفاده از کیت مربوطه (RevertAidTM First Strand cDNA Synthesis Kit, Fermentase) و طبق دستورالعمل سازنده مورد استفاده قرار گرفت. غلظت cDNA تهیه شده از نمونه‌های کنترل و تیمار شده با LPS، با استفاده از دستگاه نانودراپ تعیین و سپس مقدار ۲ میکروگرم از هر کدام برای تکثیر هر یک از قطعات مربوط به ژن‌های GAPDH (به عنوان کنترل)، TNF-α و iNOS (فاکتورهای التهابی تولیدی توسط میکروگلیای فعال) با استفاده از پرایمرهای اختصاصی که به شرح زیر طراحی و سنتز شده بودند، استفاده شد:

GAPDH:

Forward: 5’-CCCCCAATGTATCCGTTGTG-3’

Reverse: 5’-TAGCCCAGGATGCCCTTTAGT-3’

TNF-α:

Forward: 5’-GCTCCCTCTCATCAGTTCCA-3’

Reverse: 5’-TTGGTGGTTTGCTACGACC-3’

iNOS:

Forward: 5’-GACATCGACCAGAAGCTGTC-3’

Reverse: 5’-GGGCTCTGTTGAGGTCTAAAG-3’

واکنش PCR برای هر یک از ژن‌های مزبور با دماهای اختصاصی که برای پرایمرهای مربوطه تعیین شد، انجام گرفت.

ایجاد التهاب عصبی در رده‌ی سلولی SH-SY5Y و سنجش میزان بقا: سلول‌های SH-SY5Y به تعداد ۳۰۰۰ سلول در هر چاهک از پلیت ۹۶ خانه‌ای کشت داده شدند و پس از ۲۴ ساعت با هدف تعیین LD50، با مقادیر حجمی مختلف از محیط مشروط سلول‌های میکروگلیا به‌مدت ۴۸ ساعت تیمار شدند و در آخر حجمی از محیط مشروط میکروگلیا که در آن نیمی از سلول‌ها کشته شدند به‌عنوان LD50 انتخاب شد. LD50 تعیین شده با اعمال ۱۰۰ میکرولیتر از محیط مشروط میکروگلیای تیمار شده با ۱۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر LPS به‌دست آمد و این مقدار محیط مشروط برای انجام آزمایشات بعدی مورد استفاده قرار گرفت. در آزمایش‌های مزبور، سلول‌ها به سه گروه تقسیم شدند: گروه کنترل که هیچ‌گونه تیماری در آن انجام نشد، گروه تیمار شده با محیط مشروط میکروگلیای طبیعی و گروه تیمار شده با محیط مشروط میکروگلیای فعال شده. عکس‌برداری از

www.SID.ir

Archive of SID

سلول‌های SH-SY5Y قبل و بعد از تیمار با محیط مشروط انجام شد. چهل و هشت ساعت پس از انکوبه شدن سلول‌های مزبور با محیط مشروط، میزان بقای سلولی با استفاده از تست MTT مورد سنجش قرار گرفت. به‌طور مختصر غلظت ۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر از پودر MTT (خریداری شده از شرکت سیگما) در PBS تهیه شد و پس از استریل کردن با فیلتر ۰/۲ میکرومتر، مقدار ۲۰ میکرولیتر از آن به محیط سلول‌های مذکور در پلیت ۹۶ خانه‌ای اضافه شد و به‌مدت ۴ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. سپس کل محیط خارج گردید و با مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از دی متیل سولفوکساید (DMSO) جایگزین شد و به‌مدت ۳۰ دقیقه در تاریکی در انکوباتور شیکردار انکوبه شد و در آخر مقدار کریستال‌های فورمازان MTT از طریق سنجش میزان جذب آن در طول موج‌های ۵۸۰ نانومتر و ۶۲۰ نانومتر تعیین شد.

تست آپوپتوزیس: سلول‌های SH-SY5Y عینا مطابق روشی که برای تست MTT گفته شد، در پلیت ۹۶ خانه‌ای تهیه شدند به‌طوری‌که گروهی از چاهک‌های سلولی به‌مدت ۲۴ ساعت و گروهی دیگر به‌مدت ۴۸ ساعت با مقدار LD50 تعیین شده از محیط مشروط میکروگلیا تیمار شدند. سپس تست آپوپتوزیس با استفاده از کیت Annexin، طبق دستورالعمل سازنده، روی سلول‌ها انجام شد و پس از گذشت ۵ الی ۱۰ دقیقه انکوبه شدن در دمای اتاق، با میکروسکوپ فلورسانس از آن‌ها عکس‌برداری انجام شد. غشای سیتوپلاسمی سلول‌های آپوپتوتیک به‌دلیل حضور FITC متصل شده با آنکسین در کیت مزبور، در عکس‌برداری فلوئورسنت به‌صورت سبز دیده می‌شوند. در حالی‌که هسته‌ی سلول‌های نکروتیک به‌دلیل حضور PI (پروپیدیوم آیوداید) در کیت مزبور، در عکس‌برداری به‌صورت قرمز دیده می‌شوند.

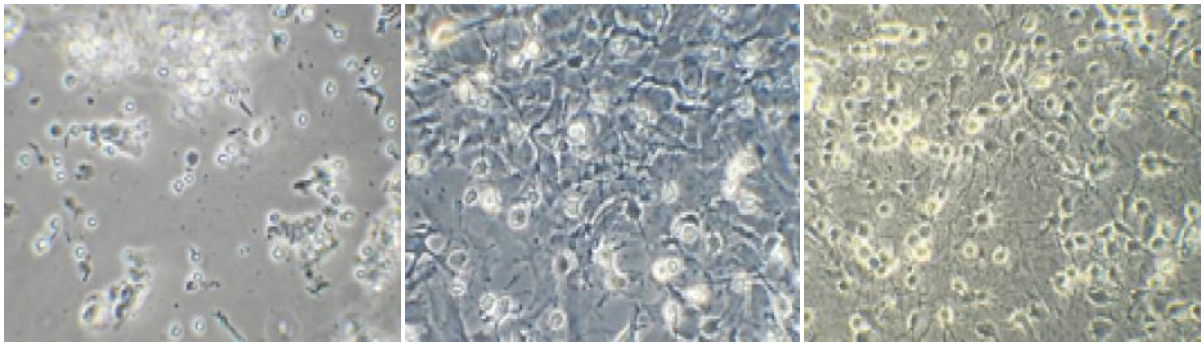
آنالیز آماری: داده‌های مندرج در تصاویر نماینده‌ی متوسط (Mean±SEM) سه آزمایش مجزا است که هر کدام به‌صورت سه بار تکرار انجام شده‌اند. آنالیز آماری داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS version 16 انجام گرفت و برای آنالیز تفاوت بین گروه‌های مختلف سلولی، از آنالیز یک سویه‌ی واریانس (One-way analysis of variance, ANOVA) و سپس تست دانکن (post-hoc Duncan Multiple-comparisons Test) استفاده شد. ارزش$p<۰/۰۵$ به‌صورت معنی‌دار و ارزش $p<۰/۰۱$ به‌صورت بسیار معنی‌دار تفسیر شدند.

نتایج

جداسازی و کشت موفقیت‌آمیز سلول‌های مخلوط گلیال

پس از گذشت ۱۱ روز از کشت سلول‌های مخلوط گلیال و عکس‌برداری متوالی از آن‌ها، نتایج حاصله در شکل ۱ گزارش شده است.

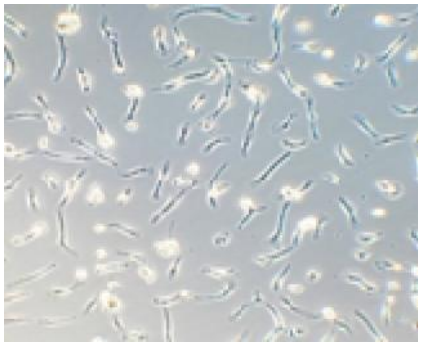
همان‌طور که در بخش مواد و روش‌ها عنوان شد، روز یازدهم پس از پر شدن فلاسک توسط سلول‌های مخلوط گلیال، سلول‌های میکروگلیا با شیک کردن جدا شده و در پلیت ۲۴ خانه‌ای کشت داده شدند. شکل ۲ تصویر سلول‌های مزبور را ۲۴ ساعت پس از جداسازی نشان می‌دهد. فرم دوکی‌شکل و منشعب (ramified) سلول‌ها که حاکی از غیر فعال بودن آن‌هاست، کاملا در شکل مشهود است.



شکل ۱: سلول‌های مخلوط گلیال روز اول (چپ)، روز پنجم (وسط) و روز یازدهم (راست) پس از جداسازی از مغز. بزرگنمایی ۱۰۰×

www.SID.ir

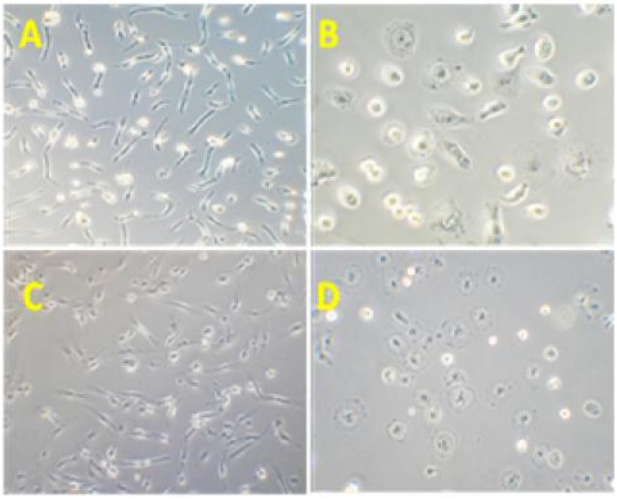
Archive of SID



شکل ۲: سلول‌های میکروگلیا ۲۴ ساعت پس از جداسازی. بزرگنمایی ۲۰۰×

فعال‌سازی و ایجاد تغییر مورفولوژیک در سلول‌های میکروگلیا با تیمار LPS

سلول‌های میکروگلیا ۲۴ ساعت پس از جداسازی، با LPS به‌مدت ۴۸ ساعت تیمار شدند. شکل ۳ تغییر مورفولوژیک سلول‌های مزبور را از فرم دوکی و منشعب به‌فرم آمیبی شکل (ameboid)، ۴۸ ساعت پس از تیمار در هر دو غلظت مورد استفاده از LPS نشان می‌دهد.



شکل ۳: سلول‌های میکروگلیا قبل (A) و بعد از تیمار(B) با ۱ میکروگرم بر میلی‌لیتر LPS . قبل (C) و بعد از تیمار(D) با ۱۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر LPS. بزرگنمایی: ۲۰۰×

تولید نیتریک اکسید(NO) توسط میکروگلیای تیمار شده با LPS

تست گریس طبق دستورالعمل ارائه شده در بخش مواد و روش‌ها انجام شد که نتیجه‌ی آن در شکل ۴ نشان داده می‌شود. این نمودار نشان می‌دهد که میزان نیتریک اکسید (NO) تولیدی از نمونه‌های تیمار شده با LPS، بسیار بیشتر از نمونه‌ی کنترل (تیمار نشده) است که تاییدی بر القای بیان ژن iNOS در سطح پروتئین، در نمونه‌های تیمار شده می‌باشد. همچنین میزان NO تولیدی نمونه‌ی تیمار شده با ۱۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر LPS بیشتر از نمونه‌ی تیمار شده با ۱ میکروگرم بر میلی‌لیتر LPS است.

بیان ژن‌های التهابی توسط سلول‌های میکروگلیای فعال شده

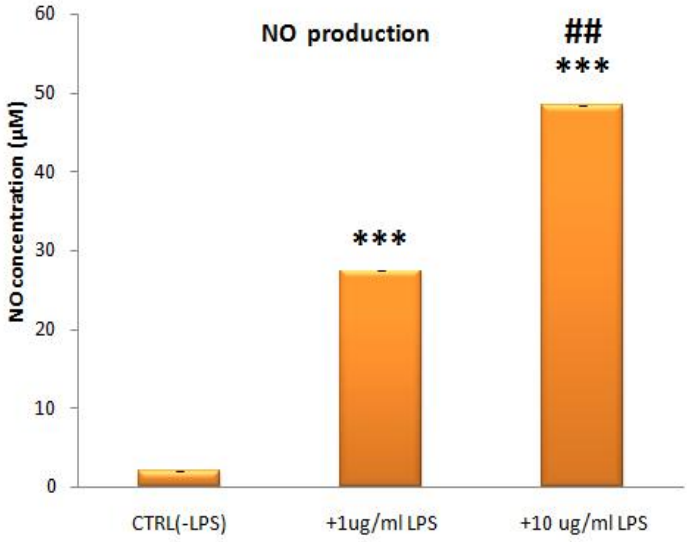
القای بیان ژن‌های کد کننده‌ی فاکتورهای التهابی فرآیندی است که در روند فعال شدن میکروگلیا رخ می‌دهد. در این مطالعه با استفاده از تکنیک RT-PCR، بیان ژنGAPDH (به‌عنوان کنترل) و القای بیان ژن‌های iNOS و TNF-α ،که تولیدکننده‌ی فاکتورهای التهابی مربوطه هستند، ردیابی شدند که نتایج آن در شکل ۵ نشان داده می‌شود.

www.SID.ir

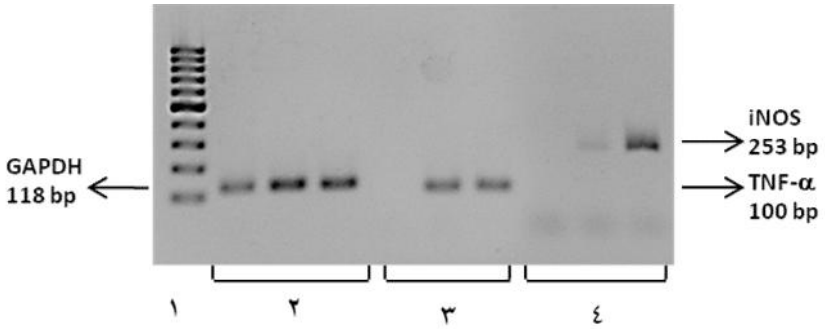
Archive of SID

همان‌طور که از شکل پیداست، بیان ژن GAPDH در هر سه نمونه یکسان می‌باشد که حکایت از یکسان بودن شرایط و صحت انجام واکنش PCR دارد. همچنین القای بیان ژن‌های TNF-α و iNOS در نمونه های تیمار شده با LPS کاملا مشهود است، در حالی‌که بیان ژن‌های مزبور در نمونه‌ی شاهد بسیار پایین و نزدیک به صفر است. همچنین سنجش شدت باندهای مربوطه با نرم‌افزار GelAnalyzer 2010a نشان داد که میزان بیان ژن TNF-α در نمونه‌های تیمار شده با مقادیر ۱ و ۱۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر از LPS نسبت به این میزان در نمونه‌ی کنترل، به‌ترتیب ۹۷ و ۱۰۵ برابر می‌باشد. همچنین میزان بیان ژن iNOS در نمونه‌های تیمار شده با ۱ و ۱۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر از LPS نسبت به این میزان در نمونه‌ی کنترل به‌ترتیب ۲۵ و ۲۰۰ برابر می‌باشد. (شکل ۶) نتایج مربوطه را نشان می‌دهد.

تغییر مورفولوژیک سلول‌های میکروگلیا (شکل۳)، تایید تولید NO بیشتر با تست گریس (شکل ۴) و تایید بیان ژن‌های التهابی با RT-PCR (شکل‌های ۵ و ۶)، همگی فعال‌سازی سلول‌های میکروگلیا توسط تیمار با LPS و تولید و ترشح فاکتورهای التهابی را تایید می‌کنند.



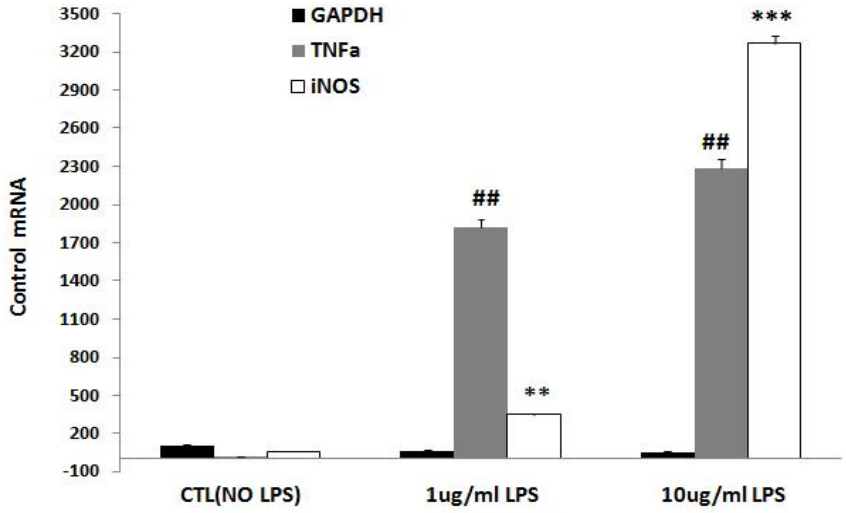
*شکل۴: تست گریس. تیمار سلول‌های میکروگلیا با غلظت‌های۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر (کنترل- ستون چپ)، ۱میکروگرم بر میلی‌لیتر (ستون وسط) و ۱۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر (ستون راست) از LPS و سنجش میزان NO تولید شده توسط سلول‌های مزبور. علامت *** اختلاف بسیار معنی‌دار ($p<۰/۰۱$) نمونه‌های تیمار شده با LPS را با نمونه‌ی کنترل نشان می‌دهد، درحالی‌که اختلاف بسیار معنی‌دار ($p<۰/۰۱$) نمونه ۱۰+ میکروگرم بر میلی‌لیتر LPS با نمونه ۱+ میکروگرم بر میلی‌لیتر LPS با علامت ## نشان داده می‌شود.*



شکل ۵: محصولات PCR ژن‌های GAPDH (۲) ، TNF-α (۳) و iNOS (۴) با پرایمرهای اختصاصی. در هر کدام به ترتیب از چپ به راست: میکروگلیای شاهد (تیمار نشده)، میکروگلیای تیمار شده با ۱ میکروگرم بر میلی‌لیتر LPS و میکروگلیای تیمار شده با ۱۰ میکروگرم بر میلی‌لیترLPS. (۱) مارکر 100 bp.

www.SID.ir

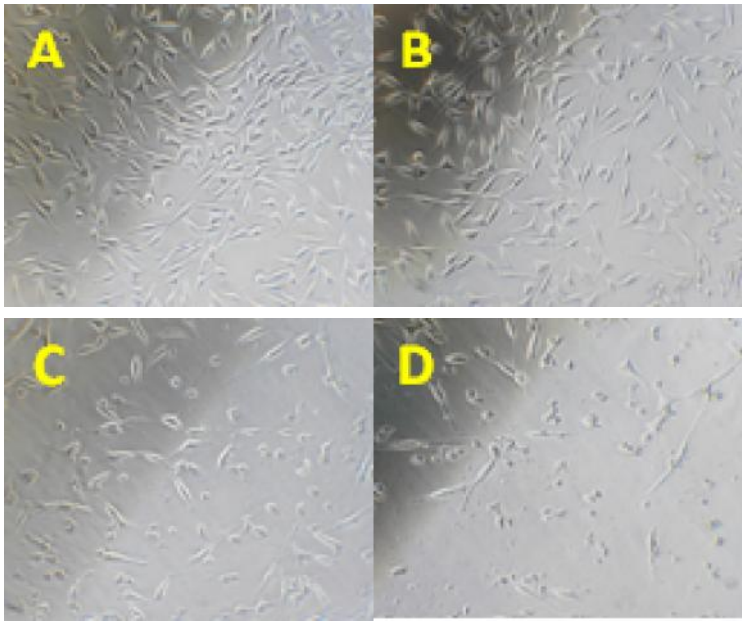
Archive of SID



*شکل ۶: آنالیز کمی میزان بیان ژنهای TNF-a و iNOS در سلول بدون LPS (گروه اول)، سلول تیمار شده با 1 ug/uL از LPS (گروه دوم) و سلول تیمار شده با 10 ug/uL از LPS علامتهای ** و *** اختلاف بسیار معنی دار در میزان بیان iNOS بین گروههای سوم و دوم نسبت به گروه اول را نشان میدهد. همچنین علامت ##اختلاف بسیار معنی دار در TNF-a را بین گروههای سوم و دوم نسبت به گروه اول را نشان میدهد.*

مورفولوژی سلول‌های SH-SY5Y پس از تیمار با محیط مشروط میکروگلیا

۲۴ و ۴۸ ساعت پس از تیمار سلول‌های مزبور با محیط مشروط، از آن‌ها عکس‌برداری انجام شد که نتایج آن در شکل ۷ نشان داده می‌شود. همان‌طور که در شکل دیده می‌شود، سلول‌های شاهد (تیمار نشده) و تیمار شده با محیط میکروگلیای غیرفعال (تیمار نشده با LPS) کاملا سالم و در شرایط مطلوب رشد هستند. در حالی‌که در سلول‌های تیمار شده با مقدار LD50 از محیط مشروط میکروگلیای فعال، مرگ سلولی پیشرونده‌ای پس از گذشت ۲۴ و ۴۸ ساعت قابل مشاهده است.



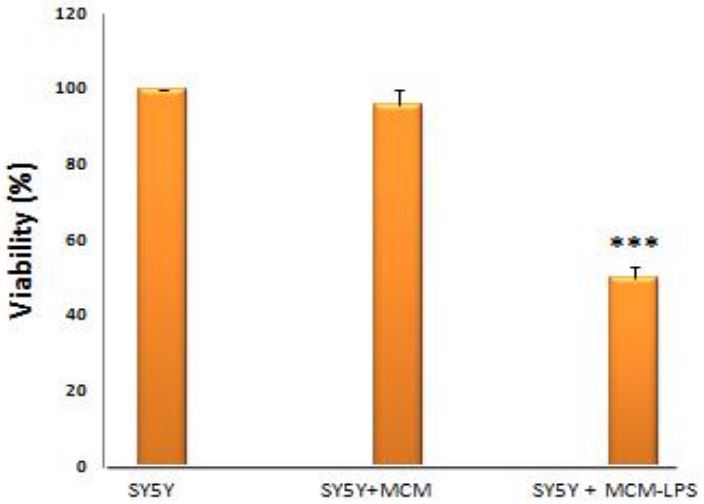
شکل ۷: تیمار سلول‌هایSH-SY5Y با محیط مشروط. سلول شاهد (تیمار نشده) (A). سلول تیمار شده با محیط مشروط میکروگلیای غیرفعال (B). سلول تیمار شده با محیط مشروط میکروگلیای فعال شده با LPS، ۲۴ ساعت بعد از تیمار (C). سلول تیمار شده با محیط مشروط میکروگلیای فعال شده با LPS، ۴۸ ساعت بعد از تیمار (D). بزرگنمایی: ۲۰۰×

www.SID.ir

Archive of SID

تاثیر محیط مشروط میکروگلیای فعال شده بر بقای سلول‌های SH-SY5Y

محیط مشروط سلول‌های میکروگلیای شاهد (تیمار نشده) و تیمار شده با LPS ، برای تیمار سلول‌های SH-SY5Y مورد استفاده قرار گرفت و تست MTT برای سنجش میزان بقا انجام شد که نتایج آن در شکل ۸ گزارش می‌شود. همان‌طور که از نمودار پیداست سلول‌های SH-SY5Y تیمارشده با محیط مشروط میکروگلیای فعال‌شده با LPS (LD50 of MCM-LPS)، در مقایسه با سلول‌های شاهد و سلول‌های تیمارشده با محیط مشروط میکروگلیای غیرفعال (MCM) از بقای بسیار کمتری برخوردارند. این نتایج نشان می‌دهد که فاکتورهای التهابی تولیدی توسط میکروگلیای فعال همچون TNF-α و NO، منجر به راه‌اندازی مسیرهای مرگ سلولی در سلول‌های SH-SY5Y تیمار شده با محیط مزبور شده‌اند.



*شکل ۸: تست MTT. سلول SH-SY5Y شاهد (ستون اول). سلول SH-SY5Y تیمار شده با محیط میکروگلیای غیر فعال (ستون دوم). سلول SH-SY5Y تیمار شده با LD_{50} از محیط مشروط میکروگلیای فعال (ستون سوم). علامت ***اختلاف بسیار معنی‌دار ($p<0/01$) ستون سوم را نسبت به ستون‌های اول و دوم نشان می‌دهد. MCM: محیط مشروط میکروگلیای غیرفعال، MCM-LPS : محیط مشروط میکروگلیای فعال شده با LPS.*

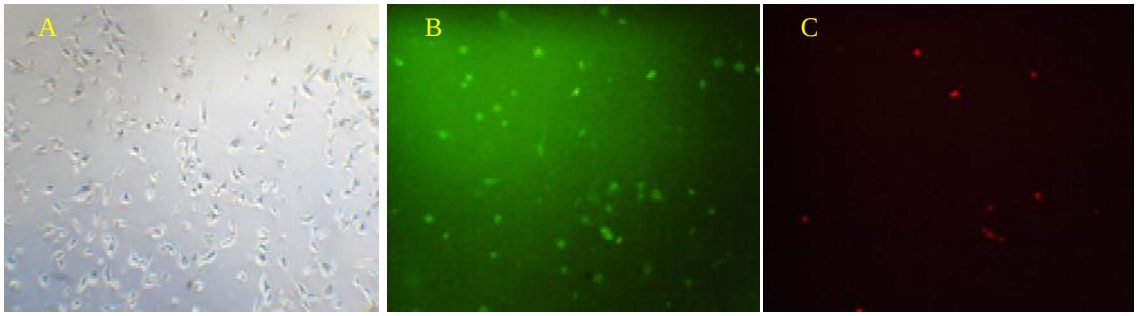
مکانیسم مرگ سلول‌های SH-SY5Y پس از تیمار با محیط مشروط میکروگلیا

طبق دستورالعملی که در بخش مواد و روش‌ها بیان شد روی سلول‌های تیمار شده با محیط مشروط میکروگلیا، ۲۴ و ۴۸ ساعت پس از تیمار، تست آپوپتوزیس با استفاده از کیت انکسین انجام شد. نتایج این تست در شکل‌های ۹ و ۱۰ نشان داده شده است.

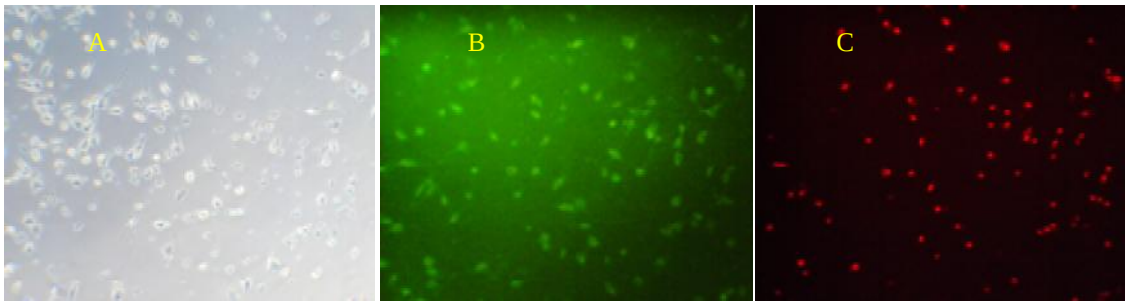
همان‌طور که از شکل‌ها پیداست در ابتدا که ۲۴ ساعت (شکل ۹) از تیمار سلول‌ها با محیط مشروط می‌گذرد، سلول‌ها کم کم به‌سمت آپوپتوزیس می‌روند (غشای سیتوپلاسمی سلول‌ها سبز می‌شود) اما درصد نکروزیس بسیار پایین است (هسته‌های قرمز). ۴۸ ساعت (شکل ۱۰) پس از تیمار هم میزان آپوپتوزیس بسیار بیشتر شده و هم نکروزیس به‌میزان قابل توجهی افزایش پیدا کرده است. این نتایج نشان می‌دهد که فاکتورهای التهابی موجود در محیط مشروط، با گذشت زمان اثر کشندگی بیشتری را روی سلول‌های دوپامین‌ساز اعمال کرده، مسیرهای آپوپتوزیس و نکروزیس سلولی را با هم به راه می‌اندازند و منجر به مرگ سلولی می‌شوند.

www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۹: تست آپوپتوزیس: تصویر فاز کنتراست از سلول SH-SY5Y (چپ). تصویر فلوئورسنت با فیلتر آبی: غشای سیتوپلاسمی سلول در حالت آپوپتوزیس سبز می‌شود (وسط). تصویر فلوئورسنت با فیلتر سبز: هسته‌ی سلول در حالت نکروزیس قرمز می‌شود (راست). ۲۴ ساعت پس از تیمار با مقدار LD50 از محیط مشروط میکروگلیا. بزرگنمایی ۲۰۰×



شکل ۱۰: تست آپوپتوزیس: تصویر فاز کنتراست از سلول SH-SY5Y (چپ). تصویر فلوئورسنت با فیلتر آبی: غشای سیتوپلاسمی سلول در حالت آپوپتوزیس سبز می‌شود (وسط). تصویر فلوئورسنت با فیلتر سبز: هسته‌ی سلول در حالت نکروزیس قرمز می‌شود (راست). ۴۸ ساعت پس از تیمار با مقدار LD50 از محیط مشروط میکروگلیا. بزرگنمایی ۱۰۰×.

بحث

در این مطالعه جداسازی سلول‌های میکروگلیا، فعال‌سازی آن‌ها با لیپوپلی‌ساکارید، تولید فاکتورهای التهابی توسط آن‌ها و پتانسیل کشندگی محیط سلول‌های مزبور روی سلول‌های نورونی دوپامین‌ساز مورد بررسی قرار گرفت. نتایج ما نشان داد که این سلول‌ها با روشی که توسط گیولیان و همکارانش (۹) ارائه شده بود، به‌خوبی قابل جداسازی هستند و مورفولوژی مناسب سلول‌های میکروگلیای غیرفعال و در حال استراحت (resting) را در محیط آزمایشگاه در پلیت نشان می‌دهند. همچنین دیده شد که تیمار سلول‌های مزبور با لیپوپلی‌ساکارید (LPS) که آنتی‌ژن باکتری‌های گرم‌منفی به‌شمار می‌رود، شرایطی معادل حمله‌ی یک عامل بیماری‌زا در محیط *in vivo* را شبیه‌سازی می‌کند و باعث فعال شدن سلول‌های میکروگلیا، از طریق راه‌اندازی مسیرهای سیگنالینگی که منجر به بیان ژن‌های التهابی می‌شوند، می‌گردد.

سلول‌های میکروگلیای مغز در شرایط نامطلوب مانند حمله‌ی یک پاتوژن یا یک جراحت به مغز یا تجمع پروتئین‌های سمی، به سرعت فعال شده و با تغییر مورفولوژی خود سیتوکین‌های التهابی را با هدف از بین بردن پاتوژن‌ها و فعال کردن سایر سلول‌های ایمنی، در جهت ترمیم آسیب، ترشح می‌کنند (۱۱). در صورت تداوم شرایط نامطلوب، سلول‌های میکروگلیا همچنان به تولید و ترشح فاکتورهای التهابی همچنان ادامه می‌دهند. این فاکتورها شامل سیتوکین‌ها، کموکین‌ها و پروستاگلاندین‌ها می‌باشند. سیتوکین‌های التهابی مانند TNF-α, IL-1β هم به‌طور مستقیم و هم از طریق تحریک آستروسیت‌ها و تشدید پاسخ ایمنی ذاتی منجر به مرگ نورون‌ها می‌شوند، در حالی‌که کموکین‌هایی مثل پروتئین کموتاکتیک مونوسیتی مسئول جمع آوری سایر سلول‌های ایمنی از جمله سلول‌های ایمنی اکتسابی (لنفوسیت‌های B و T) به ناحیه‌ی آسیب دیده و به‌دنبال آن تشدید هر چه بیشتر التهاب می‌باشند (۱۲).

www.SID.ir

Archive of SID

نتایج ما نشان داد که تیمار سلول‌های میکروگلیا با LPS، منجر به تغییر مورفولوژیک قابل توجه سلول‌های مزبور از فرم دوکی و منشعب به فرم آمیبی‌شکل (شبه ماکروفاژی) می‌شود. همچنین آزمون RT-PCR القای بیان ژن‌های التهابی از قبیل TNF-α و iNOS را در سطح mRNA آشکار کرد. در همین راستا القای بیان ژن iNOS در سطح پروتئین و تولید آنزیم نیتریک اکسید سنتاز نیز، از طریق سنجش میزان NO تولیدی با کمک تست گریس به اثبات رسید.

تیمار سلول‌های میکروگلیا با غلظت‌های مختلف از LPS (1µg/ml , 10µg/ml)، نشان داد که سلول‌های مزبور به مقادیر کمی از این ماده نیز حساس‌اند و در پاسخ به آن فعال شده، تغییر مورفولوژی داده و فاکتورهای التهابی را تولید و ترشح می‌کنند. در ادامه تیمار نورون‌های دوپامین‌ساز SH-SY5Y با محیط مشروط سلول‌های میکروگلیای فعال و به‌دنبال آن تست MTT آشکار کرد که هر حجمی از محیط مزبور منجر به مرگ نورونی نمی‌شود و فقط حجمی که حاوی مقادیر بیشتری از فاکتورهای التهابی کشنده باشد (LD50=100ul of 10µg/ml LPS-induced MCM)، توانایی ایجاد التهاب عصبی و مرگ نورونی را دارد. همچنین نتایج حاصل از تست آپوپتوزیس نشان داد که فاکتورهای التهابی تولیدی از میکروگلیای فعال شده با LPS، نه تنها مسیر آپوپتوزیس بلکه مسیر نکروزیس را نیز برای کشتن سلول‌های نورونی دوپامین‌ساز SH-SY5Y به راه می‌اندازند.

نتیجه گیری

با تکیه بر این نتایج و نتایج قبلی گزارش شده، بررسی و شناسایی ژن‌هایی که در اثر فاکتورهای التهابی میکروگلیا، فعال شده و با راه‌اندازی مسیرهای آپوپتوزیس و نکروزیس منجر به مرگ سلول‌های نورونی می‌شوند، می‌تواند دریچه‌ی جدیدی را به سوی درمان و معالجه‌ی بیماری‌های مخرب عصبی همچون پارکینسون بگشاید.

تشکر و قدردانی

از همکاری آقای عمران اسماعیل زاده در تهیه این مقاله سپاسگزاری می‌شود.کلیه هزینه های این مقاله توسط پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری در قالب طرح ۴۲۰ تامین گردیده است.

منابع

1. De Lau LM, Breteler MM. Epidemiology of Parkinson's disease. Lancet Neurol. 2006; 5(6): p. 525-35.

2. Anglade P, et al. Apoptosis and autophagy in nigral neurons of patients with Parkinson's disease. 1997; 12(1):25-31.

3. Taylor JM, Main BS ,Crack PJ. Neuroinflammation and oxidative stress: co-conspirators in the pathology of Parkinson's disease. Neurochemistry international. 2013; 62(5): p. 803-819.

4. Napoli I, Neumann H. Microglial clearance function in health and disease. Neuroscience. 2009; 158(3): 1030-8.

5. Neumann H, Kotter M, Franklin R. Debris clearance by microglia: an essential link between degeneration and regeneration. Brain. 2009. 132(2): p. 288-295.

6. Streit WJ, Walter SA,. Pennell NA. Reactive microgliosis. Progress in neurobiology. 1999; 57(6): p. 563-581.

7. Kreutzberg GW. Microglia: a sensor for pathological events in the CNS. Trends in neurosciences. 1996; 19(8): p. 312-318.

8. Streit WJ, Graeber MB, Kreutzberg GW. Kreutzberg, Functional plasticity of microglia: a review. Glia. 1988; 1(5): p.301-307.

9. Giulian D, Baker TJ. Characterization of ameboid microglia isolated from developing mammalian brain. The Journal of neuroscience. 1986; 6(8): p. 2163-2178.

10. Giulian D, Baker TJ. Peptides released by ameboid microglia regulate astroglial proliferation. The Journal of cell biology. 1985; 101(6): p. 2411-2411.

11. Streit WJ, Walter SA, Pennell NA. Reactive microgliosis. Progress in neurobiology. 1999; 57(6): p. 563-581.

12. Taylor JM, , Main BS, Crack PJ. Neuroinflammation and oxidative stress: co-conspirators in the pathology of Parkinson's disease. Neurochemistry international. 2013; 62(5): p. 803-819.

www.SID.ir

Archive of SID

Journal of Cell & Tissue (JCT) *Original Article*
Winter 2016; 6(4): 481-490

Induction of Neuro-Inflammation by Activating Microglial Cells and its Impact on Survival of Dopaminergic Neurons

Rasoolnezhad M[1], Gardaneh M[2*], Sabouni F[3*]

1. Master graduate in cellular and molecular biology, National Institute of Genetic Engineering and Biotechnology, Tehran.

2. Dept of Stem cells and Regenerative Medicine, National Institute of Genetic Engineering and Biotechnology, Tehran.

3. Dept of Molecular Medicine, National Institute of Genetic Engineering and Biotechnology, Tehran.

* Email corresponding authors: mossa65@yahoo.com. Mossa65@nigeb.ac.ir. sabouni@nigeb.ac.ir

Received: 9 Feb. 2015 Accepted: 23 Jun. 2015

Abstract

Aim: The aim of the current study was to isolate microglial cells from neonatal rat brain, activate the cells using lipopolysaccharide (LPS) and examine the effect of the inflammatory factors that they express on dopaminergic (DAergic) neurons.

Materials and Methods: mixed glial cells were isolated from 1-3 day rat neonatal brains and then microglial cells were extracted from them. Upon treatment of the cells with LPS, their conditioned media (CM) were collected. DAergic SH-SY5Y cell line was seeded in 96-well plates and fed with the collected CM. The rate of viability and apoptosis of the neuronal cells was examined using MTT and apoptosis tests and the data were analyzed statistically.

Results: Ten to thirteen days after isolation, mixed glial cells were composed of three types: astroglia, oligodendrocytes and microglia. Microglia were floating while semi-attached to the surface. Twenty four hours post-isolation, these cells were transferred to and cultured in separate dishes where they formed spindled and ramified phenotypes. At this stage, the cells were treated with LPS to be activated. This activation was demonstrated by morphological changes from spindle-like form to amoeboid form, detection of increase in NO expression using Griess test and induction of inflammatory iNOS and TNF-α gene expression. Also teatment of SH-SY5Y cell line with conditioned medium of activated microglia led to both apoptotic and necrotic cell death.

Conclusion: LPS-mediated activation of microglia results in overexpression of neuroinflammatory markers. The overproduction of these markers results in both apoptotic and necrotic cell death amongst DAergic neurons via neuroinflammation.

Keywords: dopaminergic, LPS, microglia, neuroinflammation

www.SID.ir