مقاله پژوهشی

مجله سلول و بافت (علمی - پژوهشی)
جلد۸، شماره ۱، بهار ۱۳۹۶

اثر دو فاکتور Nurr1 و GDNF بر حفاظت نورون‌های دوپامین ساز SH-SY5Yدر مقابل التهاب عصبی و مسمومیت ناشی از 6-OHDA

مینا رسول نژاد .M.Sc[1]، موسی گردانه .Ph.D[2*]، فرزانه صابونی.Ph.D[3]

۱- کارشناس ارشد زیست شناسی گرایش سلولی- مولکولی، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری، تهران، ایران
۲- پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری، ژنتیک مولکولی، پژوهشکده پزشکی،گروه سلول‌های بنیادی و پزشکی ترمیمی، تهران، ایران
۳- پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری، پژوهشکده پزشکی، گروه پزشکی مولکولی، تهران، ایران
* پست الکترونیک نویسنده مسئول: mossabenis65@gmail.com

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۱/۲۳ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۶/۱۴

چکیده

هدف: در این تحقیق از بیش‌بیان فاکتورهای Nurr1 و GDNF، به‌دلیل پتانسیل ضدالتهابی و ترمیمی آن‌ها و نیز نقش Nurr1 در تنظیم بیان ژن گیرنده GDNF(Ret)، با هدف حفاظت سلول‌های دوپامین‌ساز SH-SY5Y در مقابل التهاب عصبی و نیز مسمومیت 6-OHDA استفاده شد.

مواد و روش‌ها: ابتدا لنتی‌ویروس‌های نوترکیب حامل ژن‌های Nurr1 وGDNF تهیه و به‌ترتیب به سلول‌های SH-SY5Y و آستروسیتوما ترانسداکت شدند. همچنین برای تولید بهینه فاکتور GDNF، سلول‌های HEK-293T با ناقل پلاسمیدی مربوطه ترانسفکت و محیط مشروط آن‌ها و نیزسلول‌های آستروسیتوما، حاوی فاکتور GDNF، جمع‌آوری شد. بیش‌بیان ژن‌های مزبور با RT-PCR به اثبات رسید. از سوی دیگرسلول‌های میکروگلیا از مغز نوزاد رت جداسازی و متعاقبا با لیپوپلی ساکارید (LPS) فعال و نهایتا بیان فاکتورهای TNF-α و iNOS در آن‌ها با تستگریسوRT-PCR اثبات شد؛ محیط مشروط میکروگلیا جمع‌آوری و به‌همراه محیط مشروط سلول‌های آستروسیتوما/ HEK-293T به سلول‌های SH-SY5Y افزوده شد. رده‌ی SH-SY5Y به‌صورت جداگانه نیز با محیط مشروط آستروسیتوما / HEK- 293T و توکسین 6-OHDA تیمار شد.

نتایج: آنالیز MTT نشان داد سلول‌های SH-SY5Y با بیان فزاینده Nurr1 و یا در حضور GDNF، مقاومت بیشتری در برابر التهاب عصبی و توکسین6-OHDA نشان می‌دهند. همچنین GDNF و Nurr1 با هم اثر سینرژیک داشته و مقاومت بیشتری را به سلول‌های دوپامین‌ساز عطا می‌کنند.

نتیجه‌گیری: فاکتورهای Nurr1 و GDNF به تنهایی و نیز به‌صورت توام و سینرژیک، اثر حفاظتی بر نورون‌های دوپامین‌ساز در مقابل عوامل التهابی و توکسین 6-OHDA دارند.

واژگان کلیدی: التهاب عصبی، استرس اکسیداتیو، میکروگلیا، GDNF، Nurr1

Archive of SID

www.SID.ir

مقدمه

پارکینسون دومین بیماری مخرب عصبی شایع در جهان است که در ۱درصد از افراد بالای ۶۰ سال و ۴ درصد از افراد بالای ۸۵ سال شیوع دارد (۱). یکی از شاخص‌های اصلی این بیماری مرگ نورون‌های دوپامین‌ساز مغز میانی است(۲). این سلول‌ها با تولید دوپامین، که یک انتقال دهنده عصبی است (۳)، یکی از مهم‌ترین مسیرهای انتقال دوپامین در مغز میانی یعنی مسیر نیگرو- استریاتال را راه اندازی و نقش اصلی را در کنترل و اجرای حرکات بدن ایفا می‌کنند (۴ و ۵). با مرگ این سلول‌ها و عدم تولید دوپامین، علایم پاتولوژیکی این بیماری از جمله: سفت شدن عضلات و انقباض طولانی مدت آن‌ها، کند شدن حرکات و ناتوانی در شروع و طراحی آن‌ها، انقباض و انبساط ریتمیک عضلات و عدم تعادل بدن، در فرد بیمار بروز می‌کند (۶ و ۷).

بیماری پارکینسون به‌عنوان یک بیماری چندعاملی که هم عوامل ژنتیکی و هم عوامل محیطی در آن دخیل هستند، شناخته می‌شود. عوامل محیطی بیشترین نقش را در ایجاد این بیماری ایفا می‌کنند که از مهم‌ترین آن‌ها می‌توان به فاکتورهای محیطی ایجاد کننده استرس اکسیداتیو و التهاب عصبی اشاره کرد. نورون‌های دوپامین‌ساز ناحیه‌ی سابستنشیا نیگرا (SN) بسیار مستعد رویارویی با پدیده‌ی استرس اکسیداتیو هستند. زیرا هم مصرف اکسیژن بالایی دارند و هم سطح آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت در این سلول‌ها پایین است (۸). التهاب مزمن ایجاد شده در مغز التهاب عصبی نامیده می‌شود. در اکثر بیماری‌های مخرب عصبی از جمله پارکینسون هم التهاب مزمن موضعی ناشی از سلول‌های ایمنی ساکن در مغز، میکروگلیاها، و هم التهاب ناشی از نفوذ لوکوسیت‌ها از دیواره‌ی رگ‌ها به داخل بافت مغزی دیده شده است (۹ و ۱۰). انتقال ژن‌های کدکننده‌ی فاکتورهای ضد استرس و ضد التهاب از روش‌های جدید و رو به جلو در تحقیقات روی بیماریهای مخرب عصبی هم‌چون پارکینسون است و بدین منظور انتقال از طریق وکتورهای لنتی ویروسی از پرکاربردترین و مطلوب ترین روش‌ها می‌باشد.

هدف از مطالعه حاضر، بررسی پتانسیل فاکتور Nurr1(Nuclear receptor related protein 1) که قبلا خاصیت ضدالتهابی آن در سلول‌های میکروگلیا و آستروگلیا از طریق سرکوب بیان آن به اثبات رسیده(۱۱) و نیز فاکتور GDNF(Glial cell line derived neurotrophic factor)، که اثر ترمیمی آن بر نورون‌های دوپامین‌ساز در بیماری پارکینسون اثبات شده است (۱۲-۱۵)، به صورت توام بر حفاظت نورون‌های دوپامین ساز می‌باشد. وجود ارتباط بین دو فاکتور Nurr1 و GDNF (تنظیم بیان ژن گیرنده‌ی GDNF (رسپتورRet) توسط Nurr1) (۱۶ و ۱۷)، عدم بررسی اثر بیش‌بیان فاکتور Nurr1 بر نورون‌های دوپامین ساز و نیز عدم کاربرد توام این دو فاکتور برای بررسی التهاب عصبی در نورون‌های دوپامین‌ساز، اهمیت و ضرورت تحقیق حاضر را مشخص می‌سازد. به این منظور فاکتورهای مزبور از طریق وکتورهای لنتی ویروسی، به‌ترتیب در سلول‌های نورونی دوپامین‌ساز و سلول‌های آستروسیتوما بیش بیان شدند و از طرف‌دیگر سلول‌های میکروگلیا جداسازی و به‌عنوان منبع فاکتورهای پیش‌التهابی مورد استفاده قرار گرفتند. همچنین از توکسین 6-OHDA(6-hydroxydopamine) به‌عنوان منبع استرس اکسیداتیو استفاده شد. این توکسین که آنالوگ دوپامین می‌باشد از طریق رسپتور DAT(dopamine transferase) جذب سلول نورونی شده و سپس با تبدیل شدن به رادیکال‌های آزاد و نیز تداخل در زنجیره تنفسی میتوکندری منجر به نارسایی آن و ایجاد استرس اکسیداتیو در سلول می‌شود (۱۸-۲۰). نتایج ما نشان داد که دو فاکتور Nurr1و GDNF هم به تنهایی و هم به‌صورت توأم با اثر هم افزایی، سلول‌های دوپامین‌ساز را در مقابل فاکتورهای التهابی و نیز استرس اکسیداتیو به‌میزان قابل ملاحظه‌ای، در مقایسه با سلول‌های شاهد، محافظت می‌کنند.

Archive of SID

www.SID.ir

مواد و روش‌ها

محلول 2X HBS (HEPES Buffered Saline) برای ترانسفکشن: این محلول طبق روشمذکور در گزارش قبلی گروه ما (۲۱) تهیه و پس از استریل کردن با فیلتر ۰/۲ میکرومتر برای ماندگاری بیشتر در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراندنگه‌داری شد.

محلول 3-(4, 5-dimethylthiazolyl-2)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) MTT: این محلول در غلظت ۵ میلی‌گرم بر میکرولیتربا حل کردن پودر MTT(ساخت شرکت سیگما آلمان) در PBS و سپس استریل کردن با فیلتر ۰/۲ میکرومتر، تهیه و برای ماندگاری طولانی مدت در دمای ۲۰-درجه سانتی‌گراندنگه‌داری شد.

محلول گریس (Griess): شامل دو محلول A و B می‌باشد. محلول A : مقدار ۰/۵ گرم از پودر سولفانیل‌آمید (sulfonyl amide) در ۵۰ میلی‌لیتر اسیدفسفریک ۵ درصد حل و برای ماندگاری طولانی مدت در یخچال نگه‌داری شد.محلول B: مقدار ۵۰ میلی گرم از پودر NED (N-1-naphthylethylenediamine dihydrochloride) در ۵۰ میلی‌لیتر آب تزریقی حل و برای ماندگاری طولانی مدت در یخچال نگه‌داری شد.

LPS (Lipopolysaccaride): پودر لیپوپلی‌ساکارید (L8274) (ساخت شرکت سیگما آلمان)، غلظت اولیه ۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر از آن در بافر نمکی فسفات (PBS) تهیه و از طریق فیلتراسیون با فیلتر ۰/۲ میکرلیتر استریل و برای نگه‌داری طولانی‌مدت در ۲۰- درجه سانتی‌گراندنگه‌داری شد.

روش‌های سلولی و مولکولی

تهیه‌ی سلول‌های مخلوط گلیال و جداسازی سلول‌های میکروگلیا: این کار عینا مطابق گزارش قبلی ما انجام شد (۲۲). به‌طور خلاصه مغز نوزادان رت ۱ تا ۳ روزه جداسازی و پس از برداشتن پرده مننژ و خرد کردن بافت مغز، در محیط DMEMDolbeco Modified (Eagle Medium) حاوی ۱۰ درصد FBS(Fetal Bovine Serum) و ۱ درصد آنتی‌بیوتیک Pen/Strep(Penicillin/Streptomycin)، هر سه ساخت شرکت GIBCOآمریکا، در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد وCO_2،۵ درصد کشت داده شدند.پس از ۱۰ الی ۱۳ روزسلول‌های معلق یا نیمه‌چسبیده، میکروگلیا، با شیک دستی فلاسک‌ها از دیگر سلول‌های گلیال جدا و پس از شمارش به تعداد ۸×۱۰^{۴} سلول در هر چاهک از پلیت ۲۴ خانه‌ای جدید کشت داده شدند.

فعال‌سازی سلول‌های میکروگلیا: سلول‌های میکروگلیا ۲۴ ساعت پس از جداسازی از سلول‌های مخلوط گلیال، در معرض غلظتهای نهایی ۱ و ۱۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر از LPS قرار گرفته و به‌مدت ۴۸ ساعت با آن انکوبه شدند. سپس محیط مشروط این سلول‌ها جمع‌آوری و با هدف ذخیره‌سازی طولانی‌مدت در ۲۰-درجه سانتی‌گراندنگه‌داری شد.

تست گریس: برای تایید فعال‌سازی سلول‌های میکروگلیا، میزان NO (Nitric Oxide) تولیدی با استفاده از تست رنگ‌سنجی گریس مورد سنجش قرار گرفت. ۵۰ میکرولیتر از محیط مشروط سلول‌های میکروگلیا جدا و به‌صورت سه بار تکرار به میکروپلیت ۹۶ خانه‌ای منتقل شد، سپس محلول‌های A و B مخصوص تست گریس به حجم ۵۰ میکرولیتر به آن اضافه و در آخر میزان NO موجود در این محیط، با سنجش میزان جذب آن در طول موج ۵۴۰ نانومتربا دستگاه ELISA reader تعیین شد.

ترانسفورماسیون باکتریهای مستعد با ناقل‌های پلاسمیدی و استخراج پلاسمید در سطح انبوه: باکتری E.coli سویه‌ی DH5α مستعد، به‌عنوان باکتری میزبان جهت تکثیر ناقل‌های پلاسمیدی استفاده شد. باکتری‌های مزبور با استفاده از روش شوک حرارتی، با پلاسمیدهای

Archive of SID

www.SID.ir

ترانسفر (pLV-EGFP ، pLV-hNurr1-EGFP ، pLV-mGDNF-Jred) و پلاسمید پوشش ویروسی (pLTR-G) و نیز پلاسمید بسته بندی (pCDNL-BHDDD) به‌طور جداگانه ترانسفورم شدند.پس از اطمینان از صحت انجام ترانسفورماسیون، پلاسمیدهای مزبور به‌روش استخراج پلاسمید در مقیاس انبوه (Maxi prep) با استفاده از کیتکیاژنطبق دستورالعمل سازنده استخراج و برای نگه‌داری طولانی مدت در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد حفظ شدند(۲۱).

کشت رده های سلولی: رده‌ی سلول‌های نورونی دوپامین‌ساز (SH-SY5Y (ATCC CRL-2266، رده‌ی سلولی آستروسیتوما (Human 1321N1 Astrocytoma cell line.European collection of cell culture) و رده‌ی سلولی (**ATCC** CRL-11268) HEK-293T از بانک سلولی انستیتو پاستور ایران خریداری و طبق شرایط مذکور در کشت سلول‌های مخلوط گلیال، کشت داده شدند.

ترانسفکشن سلول‌های HEK-293T با پلاسمیدهای مربوطه با هدف تولید لنتی‌ویروس‌های نوترکیب: این مرحله مشابه روش مذکور در گزارشات قبلی ما انجام شد (۲۳ و ۲۴). به‌طور خلاصه ۱۶ میکروگرم از هر یک از ناقلین ترانسفر، به‌طور جداگانه، با ۱۲ میکروگرم ناقل بسته‌بندی و ۱۰ میکروگرم ناقل غشایی ترکیب و سپس ۵۰ میکرو لیتر از ۲/۵ مول $CaCL_2$ به آن‌ها اضافه و در نهایت تا حجم نهایی ۵۰۰ میکرولیتر به آن‌ها آب تزریقی اضافه و با ورتکس و اسپین کاملا با هم مخلوط شدند. سپس ۵۰۰ میکرولیتراز محلول 2X HBS به آن اضافه و پس از ۲۰ الی ۳۰ دقیقه انکوبه شدن در دمای اتاق، به سلول‌های HEK-293Tبه‌صورت قطره قطره اضافه شد. پس از ۱۲ الی ۱۵ ساعت محیط سلول‌ها تعویض ودر نهایت۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت پس از آن، عکس‌برداری فلوئورسنت از سلول‌ها انجام و محیط آن‌ها به‌عنوان محیط حاوی ذرات لنتی‌ویروسی نوترکیب جمع‌آوری و در دمای۴ درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شد.

تغلیظ لنتی‌ویروس‌های نوترکیب: محیط حاوی لنتی‌ویروس‌های نوترکیب، در ابتدا به‌منظور ته نشین شدن بقایای سلولی مرده، در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۱۰ دقیقه با دور rpm ۲۰۰۰سانتریفیوژ و سپس از فیلتر ۰/۴۵ میکرومتر عبور داده شد و در آخر به ستون‌های تغلیظ پروتئین آمیکون (ساخت شرکت Millipor، آلمان) با سایز منافذ KD ۱۰۰منتقل و در آن به‌مدت ۱۵ الی ۲۰ دقیقه با دور rpm ۳۵۰۰ در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شد تا زمانی‌که محیط اولیه به‌میزان ۵۰ الی ۶۰ برابر تغلیظ شد.

تعیین تیتر لنتی‌ویروس‌های نوترکیب: سلول‌های HEK-293T به‌دلیل دارا بودن قابلیت بالا برای آلوده شدن به ذرات ویروسی، به‌منظور تعیین واحد ترانسداکسیون در میلی‌لیتر (TU/ml) استفاده شدند. به‌طور خلاصه سلول‌های مزبور به تعداد 3×10^5 در چاهک از پلیت ۶ خانه‌ای کشت و پس از ۲۴ ساعت، استوک تغلیظ شده لنتی‌ویروس نوترکیب pLV-EGFP با نسبت‌های رقیق شده ۲، ۴ ، ۱۰، ۲۰ و ۴۰ برابر در DMEM و با حجم ۱۰۰ میکرولیتر، به محیط آن‌ها اضافه و به‌مدت ۲۴ ساعت با آن انکوبه شدند. پس از گذشت ۴۸ ساعت، عکس‌برداری فلوئورسنت از سلول‌ها صورت گرفت و در آخر میزان فلوئورسنت حاصل از بیان ترانس‌ژن EGFP در نمونه‌ها، با فلوسایتومتری سنجش و با استفاده از فرمول روبرو میزان TU/ml محاسبه شد:

$TU/ml = (F\times N\times D\times 1000)/V$ که F درصد سلول‌های N,GFP^+ تعداد سلول‌ها در لحظه ترانسداکسیون، D ضریب رقت ویروس و V حجم ویروس اضافه شده به هر نمونه می‌باشد(۲۵ و ۲۶). در آخر به‌منظور ترانسداکسیون سلول‌های هدف، از معیار MOI(Multiplicity of infection)که معادل است با تعداد ذرات ویروسی و تعداد سلول‌ها استفاده شد.

Archive of SID

www.SID.ir

ترانسداکسیون سلول‌های هدف با ناقل‌های لنتی‌ویروسی نوترکیب: رده‌ی سلولی SH-SY5Y ۲۴ ساعت قبل از ترانسداکسیون به تعداد ۲×۱۰^{۵} در چاهک در پلیت ۶ خانه‌ای کشت داده شد. سلول‌های کنترل به‌صورت دست نخورده، اما چاهک‌های سلولی دیگر به‌صورت دوبار تکرار به ترتیب با لنتی‌ویروس‌های نوترکیب pLV-EGFP (به‌عنوان کنترل منفی) و pLV-hNurr1-EGFP (به‌منظور افزایش بیان ژن Nurr1) با نسبت MOI =120 ترانسداکت شدند. سلول‌های آستروسیتوما نیز به‌همین روش تهیه و به‌ترتیب با لنتی‌ویروس‌های نوترکیب pLV-EGFP (به‌عنوان کنترل منفی) و pLV-mGDNF-Jred (به‌منظور افزایش بیان فاکتور GDNF) با نسبت MOI = 120 آلوده شدند. ۲۴ ساعت پس از ترانسداکسیون محیط سلول‌ها تعویض و به‌دنبال آن، ۴۸ و ۷۲ ساعت پس از ترانسداکسیون بیان ترانس‌ژن‌های EGFP و Jred با میکروسکوپ فلوئورسنت مورد بررسی قرار گرفت. همچنین ۷۲ ساعت پس از ترانسداکسیون، محیط مشروط سلول‌های آستروسیتوما به‌عنوان محیط حاوی فاکتور GDNF جمع‌آوری و در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شد.

ترانسفکشن سلول‌های HEK-293T با هدف افزایش بیان GDNF: به‌منظور تولید مقادیر انبوهی از فاکتور GDNF، علاوه برترانسدوکسیون سلول‌های آستروسیتوما، از ترانسفکشن سلول‌های HEK-293T نیز استفاده شد. ۲۴ ساعت قبل از ترانسفکشن، سلول‌های مزبور به تعداد $۲/۵\times۱۰^{۶}$ در سه پلیت ۱۰ سانتی‌مترتهیه و سپس به‌ترتیب به‌صورت دست نخورده به‌عنوان کنترل، ترانسفکت با ۲۵ میکروگرم از ناقل pLV-EGFP (به‌عنوان کنترل منفی) و ترانسفکت با ۲۵ میکروگرم از ناقل pLV-mGDNF-Jred (به‌منظور افزایش بیان GDNF) تیمار شدند. ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت پس از ترانسفکشن عکس‌برداری فلوئورسنت انجام و در نهایت محیط مشروط سلول‌ها در روزهای دوم و سوم پس از ترانسفکشن به‌عنوان محیط حاوی GDNF جمع‌آوری و در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شد.

تعیین دوز کشنده‌ی محیط مشروط میکروگلیا و توکسین 6-OHDA: به‌منظور تعیین میزان LD_{50} (Lethal Dose 50)محیط مشروط میکروگلیا و توکسین 6-OHDA، سلول‌های SH-SY5Y به تعداد ۴×۱۰^{۳} در هر چاهکمیکروپلیت ۹۶ خانه‌ای کشت و پس از ۲۴ ساعت با مقادیر حجمی ۱۰، ۲۰، ۴۰، ۶۰، ۸۰ و ۱۰۰ میکرولیتر از محیط مشروط میکروگلیا و نیز به‌طور جداگانه با غلظت‌های ۰/۲۵، ۰/۳۷۵، ۰/۵، ۰/۷۵ و ۱میلی مولار از توکسین6-OHDA تیمار و به‌مدت ۴۸ ساعت با این محیط انکوبه شدند. میزان بقای سلول‌ها با استفاده از تست MTT مورد سنجش قرار گرفت. در این تست،MTT که یک نمک تترازولیوم و محلول در آب است در اثر احیا شدن در میتوکندری فعال یک سلول زنده به کریستال‌های نامحلول فورمازان تبدیل شده و سپس این کریستال‌ها در یک حلال غیر قطبی مانند DMSO(Dimethyl sulfoxide) حل و تولید یک محلول بنفش رنگ می‌کنند. هر چه سلول‌های زنده‌ی بیشتری موجود باشد مقدار بیشتری از MTT احیا و کریستال‌های فورمازان بیشتری تولید و به‌دنبال آن شدت رنگ بنفش حاصل از حل شدن این کریستال‌ها نیز بیشتر خواهد بود. میزان غلظت رنگ مزبور با استفاده از دستگاه ELISA reader در طول موج‌های ۵۸۰ و ۶۲۰ نانومتر تعیین می‌شود.

تیمار سلول‌های SH-SY5Y با محیط مشروط سلول‌های HEK-293T و محیط مشروط میکروگلیا: سلول‌های SH-SY5Y کنترل، آلوده شده با لنتی‌ویروس EGFP و آلوده شده با لنتی‌ویروس Nurr1، به تعداد ۴×۱۰^{۳} در چاهک در میکروپلیت ۹۶ خانه‌ای کشت و پس از ۲۴ ساعت با ۱۰۰ میکرولیتراز محیط مشروط سلول‌های HEK-293T ترانسفکت نشده،

Archive of SID

www.SID.ir

ترانسفکت شده با ناقل پلاسمیدی pLV-EGFP و ترانسفکت شده با ناقل پلاسمیدی pLV-mGDNF-Jred (حاوی فاکتور GDNF) تیمار و ۲۴ ساعت با آن انکوبه و در آخر با دوز کشنده‌ی محیط مشروط میکروگلیا تیمار و به‌مدت ۴۸ ساعت دیگر با آن انکوبه شدند. در آخر میزان بقای سلولی با استفاده از تست MTT سنجیده شد.

تیمار سلول‌های SH-SY5Y با محیط مشروط سلول‌های HEK-293T و توکسین 6-OHDA: این تیمار نیز عینا مطابق روشمذکور در بخش قبل روی سلول‌های SH-SY5Y انجام شد.با این تفاوت که اینجا سلول‌ها به‌جای محیط مشروط میکروگلیا، با دوز کشنده‌ی توکسین 6-OHDA به‌مدت ۲۴ ساعت تیمار شدند.

استخراج RNA و RT-PCR: از تمامی سلول‌های آلوده شده با لنتی‌ویروس‌های مزبور، سلول‌های ترانسفکت شده با هدف تولید فاکتور GDNF و سلول‌های میکروگلیا پس از انجام تیمارهای موردنظر، استخراج RNA با استفاده از کیت RNX-Plus (ساخت شرکت سیناژن) طبق دستورالعمل سازنده انجام گرفت. پس از سنجش غلظت نمونه‌های RNA با دستگاه نانودراپ، مقدار ۲ میکروگرم از هر یک از آن‌ها به‌منظور تهیه‌cDNA، با استفاده از کیت RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis (ساخت شرکت فرمنتاز) طبق دستورالعمل سازنده استفاده شد. در آخر پرایمرهای اختصاصی برای ژن‌های GAPDH(Glycer Aldehyde Phosphate Dehydrogenase) به‌عنوان کنترل، TNF-α (Tumor Necrosis Factor-α)، iNOS (inducible Nitric Oxide Synthase)، Nurr1، GDNF، GPX1 (Gluthatione peroxidase 1)، SOD1 (SuperOxide Dismutase1)، p53 و BCL2 به‌منظور بررسی سطح بیان ژن‌های مزبور در سلول‌های مربوطه، به‌شرح زیر مورد استفاده قرار گرفت:

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'
Nurr1:
Forward: 5'-CGACATTTCTGCCTTCTCCT-3'
Reverse:5'-GAAAGGTAAGGTGTCCAGGA-3'
GDNF:
Forward: 5' -CACCAGATAAACAAATGGCAGTGC-3'
Reverse: 5'-CGACAGGTCATCATCAAAGGCG-3'
GPX1:
Forward: 5'-CTTATCGAGAATGTGGCGTCCC -3'
Reverse: 5'-GCCCACCAGGAACTTCTCAAAG -3'
SOD1:
Forward: 5'- AGGGCATCATCAATTTCGAG -3'
Reverse: 5'- TGCCTCTCTTCATCCTTTGG -3'
P53:
Forward: 5'-CCCCTCCTGGCCCCTGTCATCTTC -3'
Reverse: 5'-GCAGCGCCTCACAACCTCCGTCAT -3'
BCL2:
Forward: 5'- CTGCACCTGACGCCCTTCACC -3'
Reverse: 5'-CACATGACCCCACCGAACTCAAAGA -3

آنالیز آماری:

داده‌های به‌دست آمده نتیجه سه آزمایش مجزا است که هر کدام به‌صورت تریپلیکیت انجام شدند. 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 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 شد.

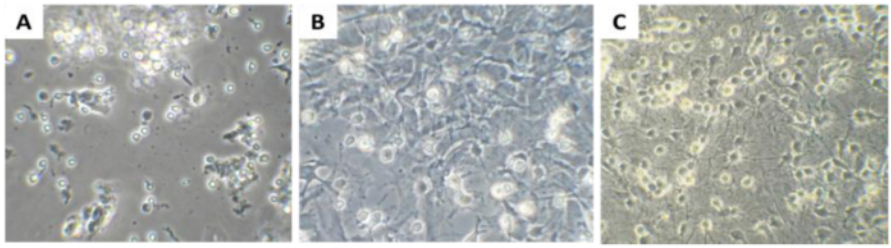
Archive of SID

www.SID.ir

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.بیش از ۸۰ درصد این کشت مخلوط را سلول‌های آستروسیت به‌خود اختصاص می‌دهند که ظاهری مکعبی شکل دارند و بیشترین بخش زمینه عکس را به‌خود اختصاص داده اند. سلول‌های الیگودندروسیت ظاهری ستاره ای شکل دارند و سلول‌های میکروگلیا به‌صورت سلول‌های گرد و شفاف با اتصالات سست در سطحی‌ترین بخش کشت و روی لایه‌های آستروسیت قرار گرفته اندکه با شیک دستی فلاسک‌ها قابل جداسازی هستند.

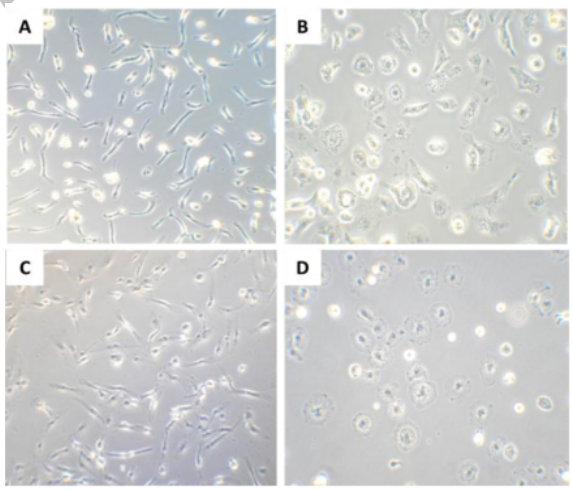


شکل ۱: سلول‌های مخلوط گلیال روز اول (A)، روز پنجم (B) و روز یازدهم (C) پس از جداسازی از مغز.بزرگنمایی : 100X

فعال‌سازی وتغییر مورفولوژیک در سلول‌های میکروگلیا با تیمار LPS

سلول‌های میکروگلیا ۲۴ ساعت پس از جداسازی با استفاده از میکروسکوپ فاز کنتراست مورد تصویربرداری قرار گرفتند. این تصاویر ظاهر دوکی شامل سلول‌های فوق را نشان می‌دهد (شکل ۲، A,C). همچنین تصویر سلول‌های مزبور بعد از تیمار با LPS به مدت ۴۸ ساعت جمع آوری شد که در این فرایند تغییر مورفولوژیک آن‌ها از فرم دوکی به‌فرم آمیبی شکل (ameboid) نمایان می‌باشد.

(شکل ۲، B,D). گرم بر میلی‌لیتر لیپوپلی ساکارید (LPS) نشان می‌دهد (B,D). سلول‌های میکروگلیا در حالت غیرفعال ظاهری دوکی شکل و منشعب دارند اما زمانی که فعال می‌شوند، مثل سلول ماکروفاژی فعال شده به‌روش کلاسیک که توانایی تولید سیتوکین‌های التهابی و ایجاد انفجار تنفسی را دارد، فرمی متورم و تخم مرغی شکل می‌گیرند که این پدیده در شکل ۲ نیز کاملا مشهود است و فعال شدن سلول‌های میکروگلیا را پس از تیمار با لیپوپلی ساکارید (LPS) تایید می‌کند.



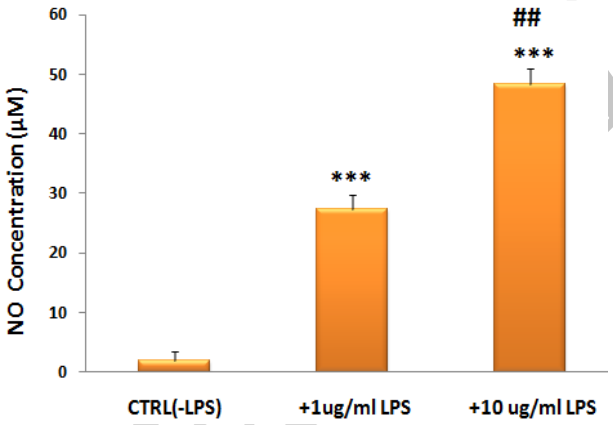
شکل۲: سلول‌های میکروگلیا قبل (A) و بعد از تیمار(B) با ۱ میکروگرم بر میلی‌لیتر لیپوپلی ساکارید (LPS). قبل (C) و بعد از تیمار(D) با ۱۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر LPS به‌مدت ۴۸ ساعت. بزرگنمایی: × ۲۰۰

Archive of SID

www.SID.ir

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 ۳ ارائه شده است. علامت*** اختلاف بسیار معنی‌دار ($p<۰/۰۱$) نمونه‌های تیمار شده با لیپوپلی ساکارید (LPS) را در مقایسه با نمونه کنترل نشان می‌دهد، درحالی‌که اختلاف بسیار معنی‌دار ($p<۰/۰۱$) نمونه تیمار شده با لیپوپلی ساکارید 10µg/ml (LPS) در مقایسه با نمونه تیمار شده با لیپوپلی ساکارید 1µg/ml (LPS)، با علامت ## نشان داده شده است. همان‌طور که از نمودار پیداست 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 از نمونه‌ی تیمار شده با 10µg/ml LPS، بیشتر از نمونه‌ی تیمار شده با 1µg/ml LPS است. پس این تست نیز فعال شدن سلول‌های میکروگلیا را پس از تیمار با LPS اثبات می‌کند.

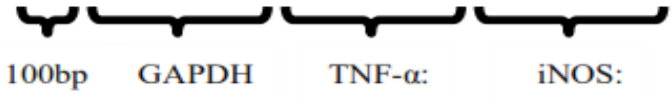


*شکل۳: تست گریس. تیمار سلول‌های میکروگلیا با لیپوپلی ساکارید (LPS) 0µg/ml (کنترل- ستون چپ)، 1µg/ml LPS (ستون وسط) و لیپوپلی ساکارید (LPS) 10µg/ml (ستون راست) و سنجش میزان NO تولیدی توسط سلول‌های مزبور. علامت*** اختلاف بسیار معنی‌دار ($p<۰/۰۱$) نمونه‌های تیمار شده با لیپوپلی ساکارید (LPS) را در مقایسه با نمونه کنترل نشان می‌دهد، درحالی‌که اختلاف بسیار معنی‌دار ($p<۰/۰۱$) نمونه تیمار شده با لیپوپلی ساکارید (LPS) 10µg/ml در مقایسه با نمونه تیمار شده با 1µg/ml LPS، با علامت ## نشان داده شده است.*

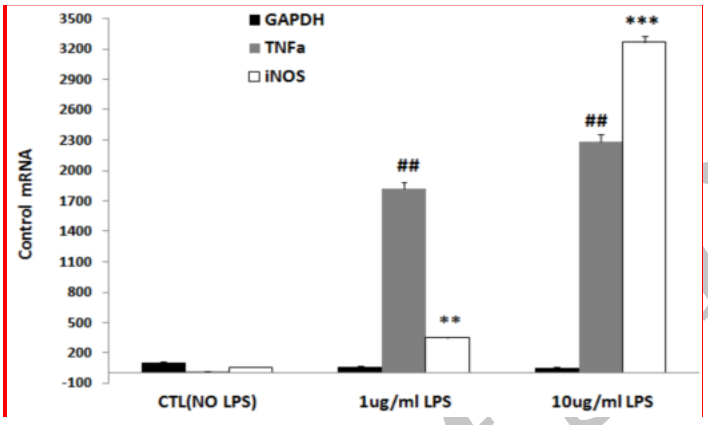
بیان ژن‌های التهابی توسط سلول‌های میکروگلیای فعال شده

در روند فعال شدن میکروگلیا، فاکتورهای التهابی بیان می‌شوند که با استفاده از تکنیک RT-PCR، بیان ژن GAPDH (به‌عنوان کنترل) و ژن‌های التهابی iNOS و TNF-α ردیابی شد که نتیجه آن در شکل ۴ قابل مشاهده است.سنجش کمی شدت باندهای مربوطه با نرم-افزار 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. نتایج مربوطه در شکل ۵ آمده است. علامت‌های ** و *** اختلاف بسیار معنی‌دار ($p<۰/۰۱$) میزان بیان ژن iNOS را در گروه‌های دوم و سوم نسبت به گروه کنترل نشان می‌دهد، در حالی‌که علامت ## اختلاف بسیار معنی‌دار ($p<۰/۰۱$) میزان بیان ژن TNF-a را در گروه‌های دوم و سوم نسبت به گروه کنترل نشان می‌دهد. (این شکل بنا به درخواست داور اول اضافه شد و به این ترتیب به شماره عکسهای پس از آن یک واحد اضافه شد).

www.SID.ir



شکل ۴. محصولات PCR ژن‌های GAPDH ، TNF-α و iNOS با پرایمرهای اختصاصی. در هر کدام به ترتیب از چپ به راست: میکروگلیای شاهد (تیمار نشده)، میکروگلیای تیمار شده با LPS1µg/ml و میکروگلیای تیمار شده با LPS10µg/ml



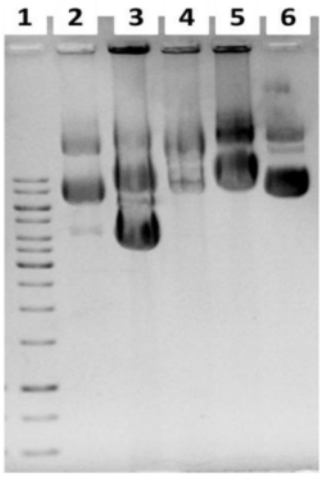
*شکل ۵. آنالیز کمی میزان بیان ژن‌های GAPDH، TNF-α و iNOS در نمونه کنترل (گروه اول- سمت چپ)، نمونه تیمار شده با 1µg/ml از لیپوپلی ساکارید (LPS) (گروه دوم- وسط) و نمونه تیمار شده با 10µg/ml از LPS (گروه سوم- سمت راست). علامت‌های ** و *** اختلاف بسیار معنی‌دار (P<0.01) میزان بیان ژن iNOS را در گروه‌های سوم و دوم نسبت به گروه کنترل نشان می‌دهد، در حالی‌که علامت ## اختلاف بسیار معنی‌دار (P<0.01) میزان بیان ژن TNF-a را در گروه‌های دوم و سوم نسبت به گروه کنترل نشان می‌دهد*

میزان LD_{50} محیط مشروط میکروگلیا و توکسین 6-OHDA

نتایج حاصل از این تست به‌ترتیب ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر برای محیط مشروط میکروگلیای تیمار شده با ۱۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر LPS و غلظت نهایی ۰/۵ میلی‌مول برای توکسین 6-OHDA به‌دست آمد.

تهیه و انبوه سازی ناقل های پلاسمیدی به‌صورت خالص

ناقل‌های پلاسمیدی موردنیاز برای ترانسفکشن و تهیه وکتورهای لنتی ویروسی نوترکیب، تخلیص و انبوه سازی شدند که نتایج آن پس از الکتروفورز نمونه ها روی ژل آگاروز ۰/۷ درصد، در شکل ۶ قابل مشاهده است.



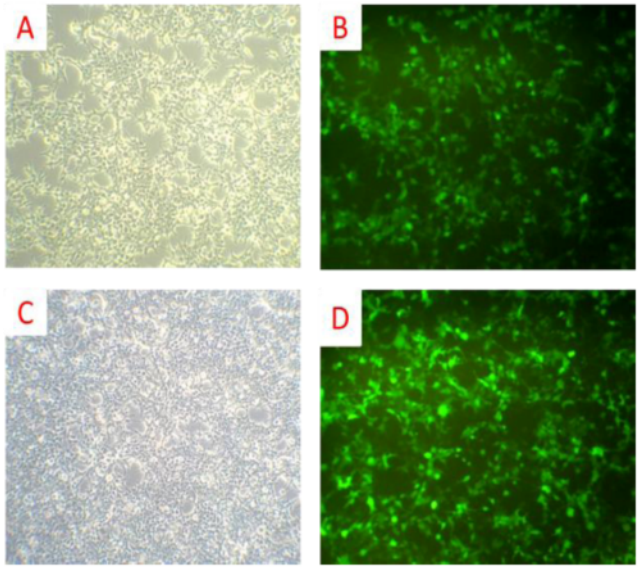
شکل ۶: پلاسمیدهای استخراج شده در مقیاس بالا
۱- مارکر یک کیلو بازی(GeneRuler)
۲- پلاسمید بسته بندی(pCDNL-BHDDD)- 9.6 kb
۳- پلاسمید پوشش ویروسی(pLTR-G)- 6.8 kb
۴- پلاسمید ترانسفر pLV-EGFP– 10.5 kb
۵- پلاسمید ترانسفر pLV-hNurr1-EGFP– 12.9 kb
۶- پلاسمید ترانسفر pLV-mGDNF-Jred - 10.7 kb

Archive of SID

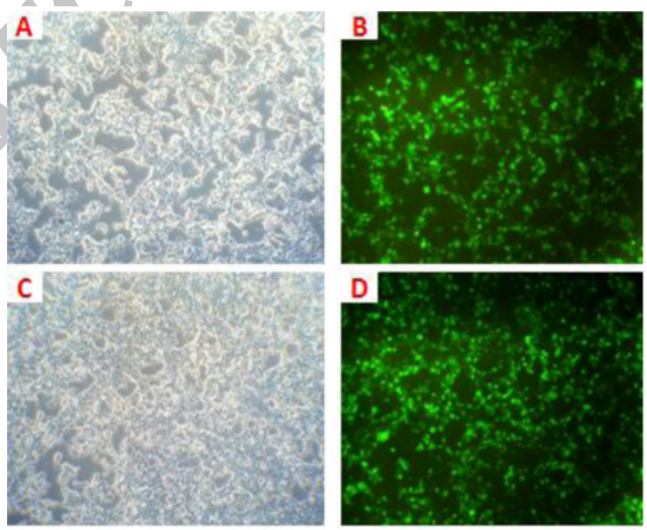
www.SID.ir

تولید لنتی ویروس‌های نوترکیب در سلول‌های HEK-293T

شکل‌های ۷ و ۸ بیان ژن گزارش‌گر EGFP را به‌ترتیب توسط ناقل لنتی‌ویروسی pLV-EGFP و pLV-hNurr1-EGFP در سلول‌های HEK-293T، ۲۴ و ۴۸ ساعت پس از ترانسفکشن نشان می‌دهند. همچنین شکل ۹ نمایانگر بیان ژن گزارش‌گر Jred توسط ناقل لنتی-ویروسی pLV-mGDNF-Jred در ۲۴ و ۴۸ ساعت پس از ترانسفکشن است. با توجه به این‌که ژن گزارش‌گر به‌وسیله توالی IRES در کنار ترانسژن مربوطه در فرودست آن قرار دارد، پس تایید بیان بالای آن توسط میکروسکوپ فلوئورسنس (که در تصاویر B و D از شکلهای ۷ الی ۹ کاملا مشهود است) یقینا نشان از بیان مطلوب ترانسژن و نیز تولید ذرات لنتی ویروسی نوترکیب با کارایی بالا، در سلول‌های مولد ویروس دارد.



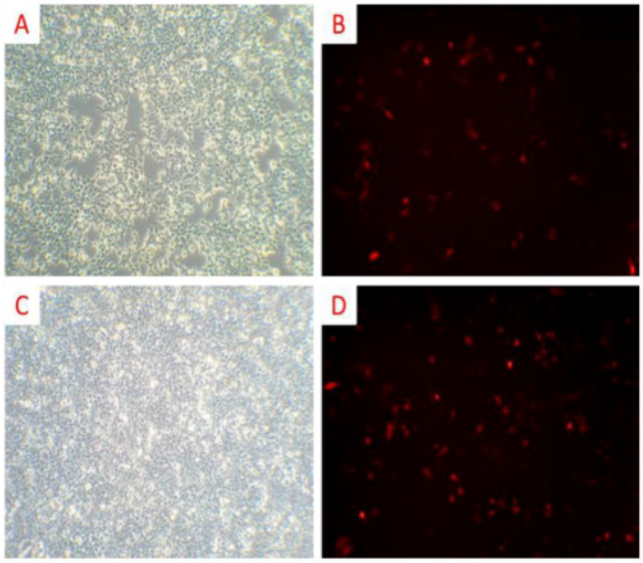
شکل ۷: تصاویر فاز کنتراست و فلوئورسنت از سلول‌های HEK-293T کوترانسفکت شده با پلاسمید ترانسفر pLV-EGFP و پلاسمیدهای بسته‌بندی و پوشش ویروسی: ۲۴ساعت (A,B) و ۴۸ ساعت (C,D) پس از ترانسفکشن. بیان بالای ژن گزارشگر EGFP کاملا در تصاویر B و D مشهود است. بزرگنمایی: ×۱۰۰.



شکل ۸: تصاویر فاز کنتراست و فلوئورسنت از سلول‌های HEK-293T کوترانسفکت شده با پلاسمید ترانسفر pLV-hNurr1-EGFP و پلاسمیدهای بسته بندی و پوشش ویروسی: : ۲۴ساعت (A,B) و ۴۸ ساعت (C,D) پس از ترانسفکشن. بیان بالای ژن گزارشگر EGFP کاملا در تصاویر B و D مشهود است بزرگنمایی: ×۱۰۰.

Archive of SID

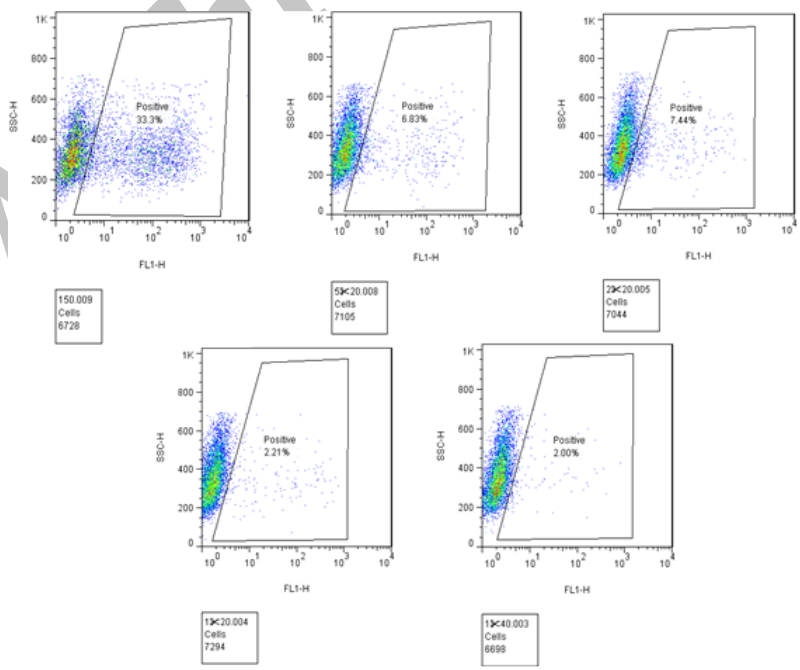
www.SID.ir



شکل ۹: تصاویر فاز کنتراست و فلوئورسنت از سلول‌های HEK-293T کوترانسفکت شده با پلاسمید ترانسفر pLV-mGDNF-Jred و پلاسمیدهای بسته بندی و پوشش ویروسی: ۲۴ساعت (A,B) و ۴۸ ساعت (C,D) پس از ترانسفکشن. . بیان ژن گزارشگر Jred کاملا در تصاویر B و D مشهود است بزرگنمایی: ×۱۰۰

تیتراسیون لنتی ویروس‌های نوترکیب

لنتی‌ویروس‌های نوترکیب طبق روش مذکور در بخش مواد و روشها تعیین غلظت شدند که مقدار میانگین آن، 184×10^6 TU/ml برای لنتی ویروس نوترکیب pLV-EGFP به‌دست آمد. با توجه به یکسان بودن شرایط آزمایش در تولید هر سه نوع لنتی‌ویروس نوترکیب، مقدار مذکور برای لنتی ویروس‌های دیگر نیز مورد استفاده قرار گرفت. نتایج حاصل از فلوسایتومتری در شکل ۱۰ قابل مشاهده است.



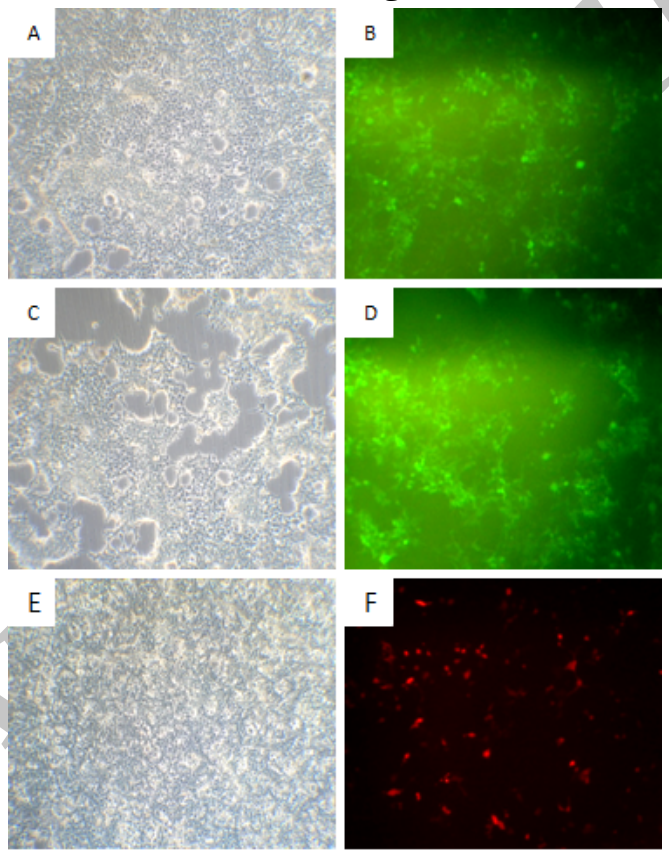
شکل ۱۰ : سنجش میزان فلوئورسنت به روش فلوسایتومتری. به‌ترتیب از چپ به راست: سلول‌های HEK-293T ترانسدوکت شده با نسبت‌های ۲، ۴، ۱۰، ۲۰ و ۴۰ برابر رقت از استوک لنتی ویروس نوترکیب pLV-EGFP

Archive of SID

www.SID.ir

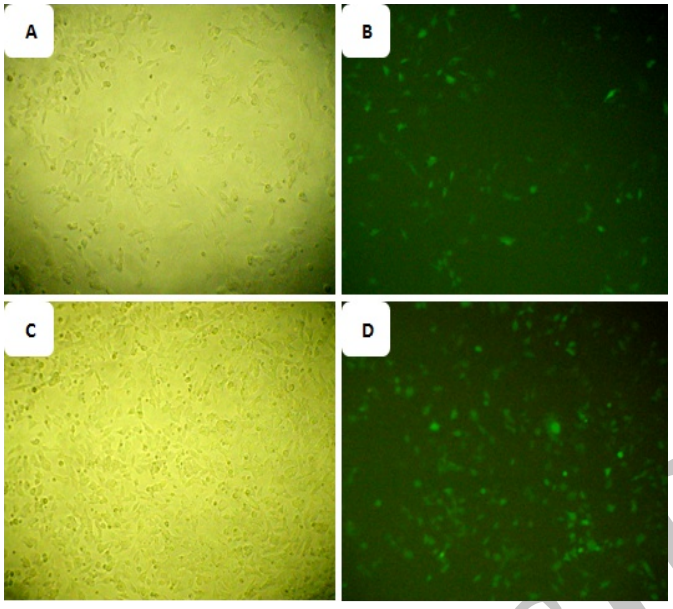
ترانسداکسیون سلول‌های HEK-293T و سلول‌های هدف با لنتی ویروس‌های نوترکیب

بیان ترانسژن‌های گزارش‌گر در سلول‌های ترانسداکت شده، نشان از صحت تولید ویروس‌ها و قابلیت آلوده کنندگی آن‌ها دارد. بدین منظور در بدو امر سلول‌های HEK-293T به‌عنوان سلول‌های کنترل (به‌دلیل قابلیت بالای آن‌ها در آلوده شدن به‌وسیله ویروس‌ها) با لنتی‌ویروس‌های نوترکیب آلوده شدند که نتایج آن همان‌طور که در تصاویر B و D و F از شکل ۱۱ مشهود است، کاملا نشان از صحت تولید لنتی ویروس‌های نوترکیب و قابلیت آن‌ها در آلوده‌سازی سلولهای HEK-293T دارد. پس از اطمینان از صحت تولید لنتی ویروس‌های نوترکیب، اینبار سلول‌های SH-SY5Y و سلول‌های آستروسیتوما با لنتی ویروس‌های مربوطه آلوده شدند که نتایج آن به‌ترتیب در شکل‌های ۱۲، ۱۳ و ۱۴ آمده است. همان‌طور که از شکل‌های ۱۲ و ۱۳ پیداست سلول‌های SH-SY5Y در حد مطلوبی توسط ویروس‌های مربوطه آلوده شده‌اند، در حالی‌که سلول‌های آستروسیتوما پاسخ‌دهی مناسبی به ویروس نداشته‌اند و سطح ترانسداکسیون در آن‌ها بسیار پایین بوده است (شکل ۱۴). به‌همین دلیل پس از آن، از ترانسفکشن مستقیم سلول‌های HEK-293T به منظور تولید انبوه فاکتور GDNF استفاده شد.

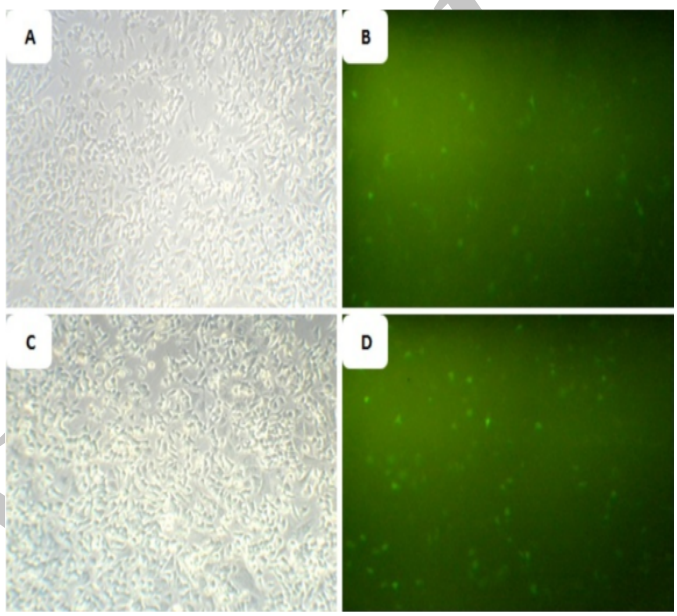


شکل ۱۱: تصاویر فاز کنتراست و فلوئورسنت از سلولهای HEK-293T ترانسدوکت شده با لنتی ویروس‌های نوترکیب pLV-EGFP (A,B) ، pLV-hNurr1-EGFP (C,D) و pLV-mGDNF-Jred (E,F) ۴۸ ساعت پس از ترانسدوکسیون. بیان بالای ژنهای گزارشگر در سلول‌های ترانسدوکت شده کاملا در تصاویر B و D و F مشهود است که نشان از صحت تولید لنتی ویروس‌های نوترکیب و قابلیت آنها در آلوده‌سازی سلولهای HEK-293T دارد. بزرگنمایی: ×۱۰۰.

www.SID.ir



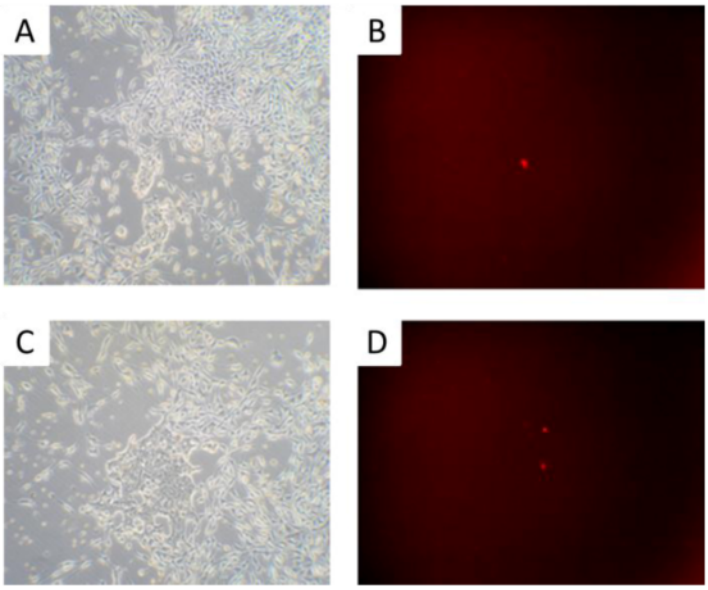
شکل ۱۲: تصاویر فاز کنتراست و فلوئورسنت از سلول‌های SH-SY5Y ترانسدوکت شده با لنتی ویروس نوترکیب pLV-EGFP. ۴۸ (A,B) و ۷۲ ساعت (C,D) پس از ترانسدوکسیون. بیان مطلوب ژن گزارش‌گر EGFP در سلول‌های ترانسدوکت شده کاملا در تصاویر B و D مشهود است. بزرگنمایی: ×۱۰۰.



شکل ۱۳: تصاویر فاز کنتراست و فلوئورسنت از سلول‌های SH-SY5Y ترانسدوکت شده با لنتی‌ویروس نوترکیب pLV-hNurr1-EGFP. ۴۸ساعت(A,B) و ۷۲ ساعت (C,D) پس از ترانسدوکسیون. بیان ژن گزارش‌گر EGFP در سلولهای ترانسدوکت شده، در تصاویر B و D کاملا قابل مشاهده است که نشان از بیان مطلوب ترانسژن hNurr1 دارد. بزرگنمایی: ×۱۰۰.

Archive of SID

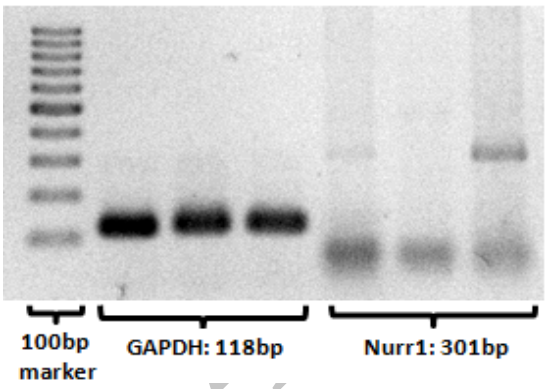
www.SID.ir



شکل ۱۴: تصاویر فاز کنتراست و فلوئورسنت از سلول‌های آستروسیتومای ترانسدوکت شده با لنتی‌ویروس نوترکیب pLV-mGDNF-Jred. ۴۸ساعت (A,B) و ۷۲ ساعت (C,D) پس از ترانسدوکسیون. بیان کم ژن گزارشگر Jred در تصاویر B و D، نشان از بیان کم و نامطلوب ترانسژن mGDNF در سلولهای ترانسدوکت شده دارد. بزرگنمایی: ×۱۰۰.

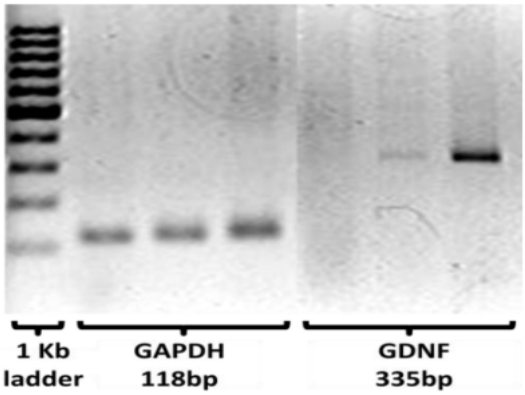
بیش بیان ژن‌های مورد نظر در سلول‌های ترانسدوکت شده و ترانسفکت شده

بیش‌بیان ژنهای Nurr1 و GDNF در سطح mRNA در سلول‌های ترانسدوکت شده، با استفاده از تکنیک RT-PCR بررسی شد که نتایج آن در شکل‌های ۱۵ و ۱۶ آمده است. بیش‌بیان ژن‌های مزبور در سلول‌های ترانسدوکت شده با لنتی ویروس‌های حامل این ژن‌ها، در مقایسه با نمونه های کنترل کاملا مشهود است. همچنین بیش بیان ژن GDNF در سلول‌های HEK-293T ترانسفکت شده با ناقل ژن مزبور، با RT-PCR اثبات شد که نتیجه آن در شکل ۱۷ آمده است. از مقایسه شکل‌های ۱۶ و ۱۷چنین نتیجه‌گیری می‌شود که میزان بیش بیان ژن GDNF در روش ترانسفکشن سلول‌های HEK-293T بیشتر از بیش بیان آن در روش ترانسدوکسیون سلول‌های آستروسیتوما با ناقل لنتی‌ویروسی مربوطه است. از این رو در تیمارهای مدنظر از محیط مشروط سلول‌های HEK-293T ترانسفکت شده با ناقل پلاسمیدی حامل ژن GDNF، به‌عنوان محیط حاوی فاکتور GDNF استفاده شد.

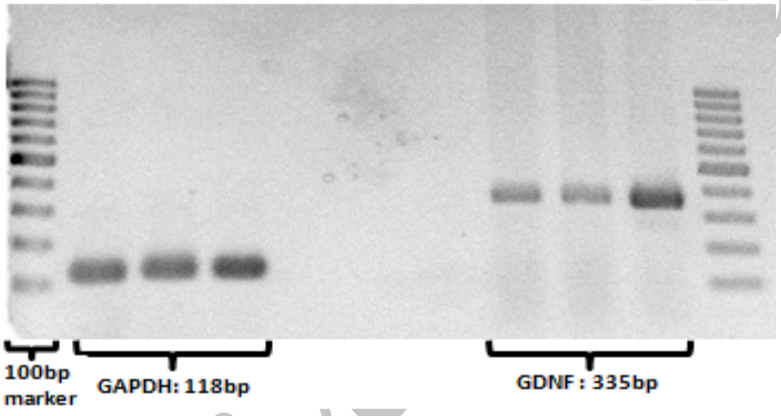


شکل ۱۵: محصولات PCR ژن‌های GAPDH (به‌عنوان کنترل) و Nurr1 با پرایمرهای اختصاصی. در هر گروه به‌ترتیب از چپ به راست: سلول SH-SY5Y کنترل، سلول ترانسدوکت شده با لنتی-ویروس pLV-EGFP و سلول ترانسدوکت شده با لنتی‌ویروس pLV-hNurr1-EGFP (به توضیحات متن مراجعه شود)

www.SID.ir



شکل ۱۶: محصولات PCR ژن‌های GAPDH (به عنوان کنترل) و GDNF با پرایمرهای اختصاصی. در هر گروه به‌ترتیب از چپ به راست: سلول آستروسیتومای کنترل، سلول ترانسدوکت شده با لنتی‌ویروس pLV-EGFP و سلول ترانسدوکت شده با لنتی‌ویروس pLV-mGDNF-Jred. (به توضیحات متن مراجعه شود)



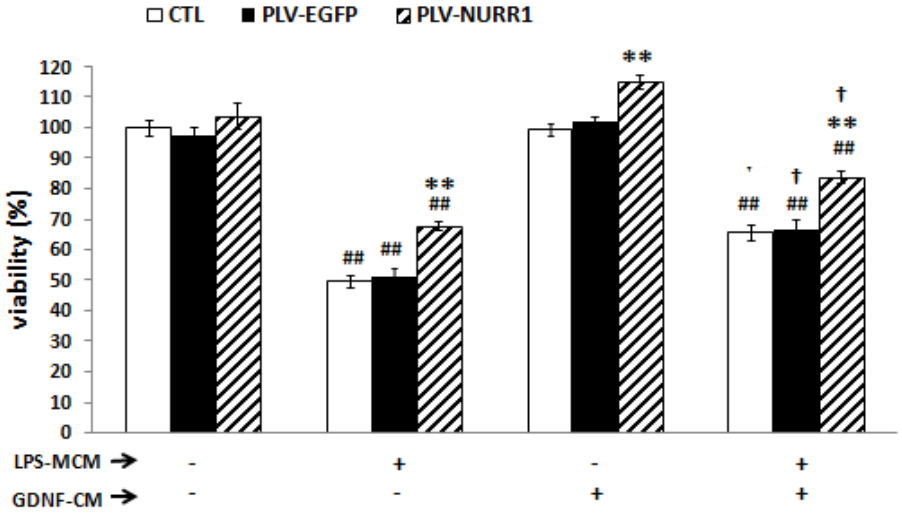
شکل ۱۷: محصولات PCR ژن‌های GAPDH و GDNF با پرایمرهای اختصاصی. در هر کدام به‌ترتیب از چپ به راست: سلول HEK-293T کنترل، سلول ترانسفکت شده با پلاسمید pLV-EGFP و سلول ترانسفکت شده با پلاسمید pLV-mGDNF-Jred. بیان بالای ژن mGDNF در نمونه ترانسفکت شده با پلاسمید حامل ژن mGDNF در مقایسه با نمونه های کنترل، کاملا مشهود است.

حفاظت نورونی توسط فاکتورهای Nurr1 و GDNF

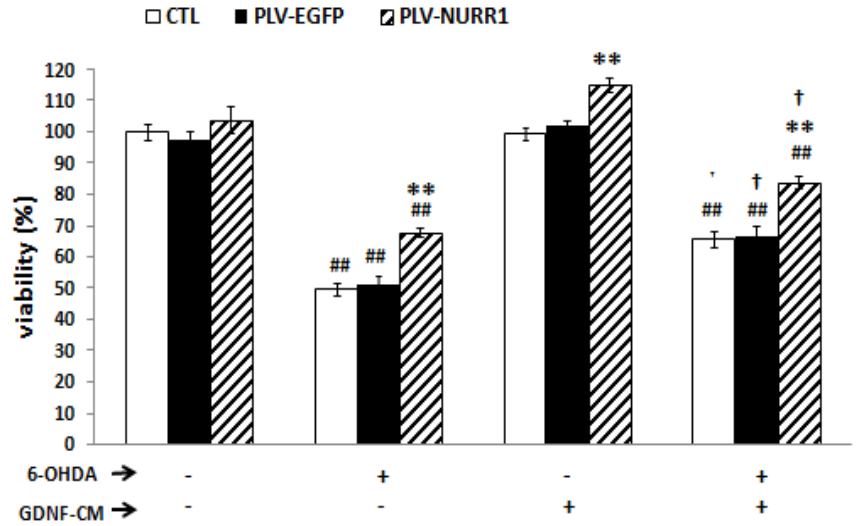
نتایج حاصل از تست MTT ، بیانگر تاثیر مثبت بیش بیان دو فاکتور Nurr1 و GDNF بر حفاظت سلول‌های SH-SY5Y است که در شکل‌های ۱۸ و ۱۹ قابل مشاهده است. علامت ** اختلاف معنی‌دار بین نمونه‌های موجود در هر گروه را نشان می‌دهد. در حالی‌که علامت ## اختلاف معنی‌دار هر گروه با گروه قبلی را نشان می‌دهد. همچنین اختلاف معنی‌دار گروه چهارم با گروه دوم با علامت† نشان داده می‌شود. اختلاف معنی دار به‌صورت $p<۰/۰۵$ تعریف شده است. همان‌طور که از نمودارها پیداست، دو فاکتور Nurr1 و GDNF هر کدام به‌تنهایی در حفاظت سلول‌های SH-SY5Y در مقابل فاکتورهای التهابی میکروگلیا و نیز توکسین 6-OHDA نقش دارند. همچنین این دو فاکتور در حالت توام، به‌صورت سینرژیک عمل کرده و اثر حفاظتی بیشتری را بر این سلول‌ها اعمال می‌کنند.

Archive of SID

www.SID.ir



*شکل ۱۸: تیمار سلول‌های SH-SY5Y شاهد(CTL)، آلوده شده با ویروس pLV-EGFP و آلوده شده با ویروس pLV-hNurr1-EGFP، با دو فاکتور GDNF (GDNF-CM) و محیط مشروط میکروگلیای فعال شده با LPS (LPS-MCM). علامت ** اختلاف معنی‌دار بین نمونه‌های موجود در هر گروه را نشان می‌دهد. در حالی‌که علامت ## اختلاف معنی‌دار هر گروه با گروه قبلی را نشان می‌دهد. همچنین اختلاف معنی‌دار گروه چهارم با گروه دوم با علامت † نشان داده می‌شود. اختلاف معنی دار به‌صورت $p<0.05$ تعریف شده است. همانطور که از نمودار مشهود است، دو فاکتور Nurr1 و GDNF هر کدام به تنهایی و نیز به‌صورت توأم در حفاظت سلول‌های SH-SY5Y در مقابل فاکتورهای التهابی میکروگلیا نقش دارند.*



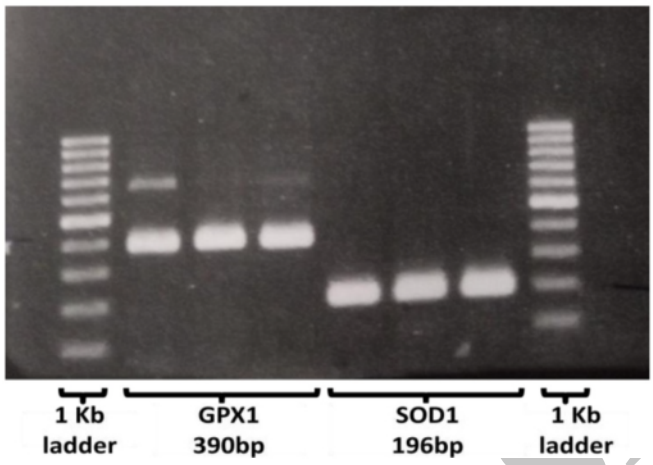
*شکل ۱۹ : تیمار سلول‌های SH-SY5Y شاهد (CTL)، آلوده شده با ویروس pLV-EGFP و آلوده شده با ویروس pLV-hNurr1-EGFP، با دو فاکتور GDNF (GDNF CM) و توکسین 6-OHDA. علامت ** اختلاف معنی‌دار بین نمونه‌های داخل هر گروه را نشان می‌دهد. در حالیکه علامت ## اختلاف معنی‌دار هر گروه با گروه قبلی را نشان می‌دهد. همچنین اختلاف معنی‌دار گروه چهارم با گروه دوم با علامت † نشان داده شده است. اختلاف معنی دار به صورت $p<0.05$ تعریف شده است. همان‌طور که از نمودار مشهود است، دو فاکتور Nurr1 و GDNF هر کدام به‌تنهایی و نیز به‌صورت توأم در حفاظت سلول‌های SH-SY5Y در مقابل توکسین 6-OHDA نقش دارند.*

بررسی تغییرات بیان ژنی برای تشخیص مسیرهای سیگنالینگ حفاظتی مربوطه

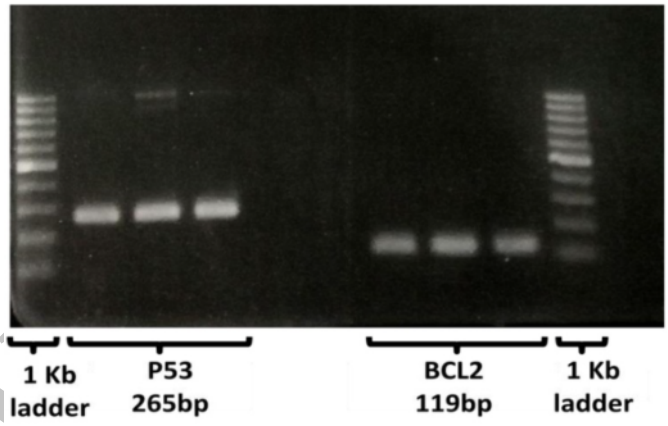
به‌منظور تشخیص مسیرهای سیگنالینگ احتمالی که در اثر بیش بیان فاکتورهای Nurr1 و GDNF، دست‌خوش تغییر شده و منجر به حفاظت سلول‌های نورونی SH-SY5Y در مقابل فاکتورهای التهابی و استرس اکسیداتیو ناشی از توکسین 6-OHDA می‌شوند، RT-PCR برای دو ژن ضد استرس اکسیداتیو شامل GPX1 و SOD1 و

www.SID.ir

نیز دو ژن کنترل کننده آپوپتوزیس شامل P53 و BCL2 انجام شد که نتایج آن به‌ترتیب در شکل‌های ۲۰ و ۲۱ قابل مشاهده است. همان‌طور که از شکل‌ها پیداست، تغییر محسوسی در بیان این ژن‌ها در مقایسه با سلول‌های کنترل مشاهده نمیشود. با توجه به غیرکمی بودن RT-PCR معمولی، این تکنیک روش مناسبی برای سنجش میزان تغییرات بیان ژن‌ها نیست و باید از تکنیک quantitative real time-PCR استفاده شود.



شکل ۲۰: محصولات PCR ژن‌های GPX1 و SOD1 با پرایمرهای اختصاصی. در هر گروه به‌ترتیب از چپ به راست: سلول SH-SY5Y کنترل، ترانسدوکت شده با لنتی‌ویروس pLV-EGFP و ترانسدوکت شده با لنتی‌ویروس pLV-hNurr1-EGFP. تغییر محسوسی در بیان ژنهای مزبور در سلول‌های SH-SY5Y ترانسدوکت شده با لنتی ویروس pLV-hNurr1-EGFP در مقایسه با سلول‌های کنترل مشاهده نمی‌شود.



شکل ۲۱: محصولات PCR ژن‌های P53 و BCL2 با پرایمرهای اختصاصی. در هر گروه به‌ترتیب از چپ به راست: سلول SH-SY5Y کنترل، ترانسدوکت شده با لنتی‌ویروس pLV-EGFP و ترانسدوکت شده با لنتی‌ویروس pLV-hNurr1-EGFP. تغییر محسوسی در بیان ژن‌های مزبور در سلول‌های SH-SY5Y ترانسدوکت شده با لنتی ویروس pLV-hNurr1-EGFP در مقایسه با سلول‌های کنترل مشاهده نمی‌شود.

بحث

حفاظت نورون‌ها در برابر سیگنال‌های مرگ یکی از استراتژی‌های مهم برای مقابله با بروز و پیشرفت بیماری‌های نورودژنراتیو از جمله پارکینسون به‌شمار می‌رود(۲۷). منابع ایجاد سیگنال‌های مرگ را می‌توان در دو گروه التهاب عصبی و استرس اکسیداتیو دسته‌بندی کرد. سلول‌های میکروگلیا، ماکروفاژهای CNS، علاوه بر حفاظت عصبی در تکامل عصبی نیز نقش دارند(۲۸). این سلول‌ها در شرایط نرمال مسئول حفاظت و نظارت بر عمل‌کرد نورون‌ها، در حالی‌که در شرایط التهابیمرتبط با بیماری‌های مخرب عصبی هستند (۲۹). به‌منظور شبیه‌سازی شرایط التهاب نورونی در محیط *in vitro* غالبا از سلول‌های مخلوط گلیال که از مغز نوزادان موش یا رت تهیه شده و غنی از سلول‌های میکروگلیا می‌باشند

www.SID.ir

استفاده می‌شود. در این تحقیق به‌منظور حفاظت نورون‌های دوپامین‌ساز SH-SY5Y در مقابل التهاب عصبی حاصل از میکروگلیای فعال و نیز مسمومیت ناشی از 6-OHDA، از بیش بیان دو فاکتور Nurr1 و GDNF بهرهگرفته شد. زیرا اگرچه به ترتیب پتانسیل ضدالتهابی و ترمیمی آن‌ها قبلاً اثبات شده بود، اما در زمان انجام این تحقیق هنوز هیچ مطالعه‌ای در زمینه تاثیر بیش‌بیان فاکتور Nurr1 بر حفاظت نورون‌های دوپامین ساز و نیز تاثیر هم‌زمان این دو فاکتور روی این نورون‌ها منتشر نشده بود. نتایج تحقیق ما نشان داد که سلول‌های SH-SY5Y با بیان فزاینده فاکتور Nurr1 و یا در حضور فاکتور GDNF، مقاومت قابل ملاحظه ای را در برابر فاکتورهای التهابی میکروگلیا و نیز مسمومیت ناشی از 6-OHDA نشان می‌دهند. همچنین دو فاکتور GDNF و Nurr1 با هم به صورت سینرژیکعمل کرده و مقاومت بیشتری را به سلول‌های نورونی عطا می‌کنند. طبق گزارش‌هایقبلی، سرکوب بیان فاکتور Nurr1 در سلول‌های گلیال منجر به ایجاد التهاب می‌شود که بیانگر نقش ضدالتهابی فاکتور است(۱۱). بیان Nurr1نه تنها برای القای تمایزنورون‌های دوپامین‌ساز در مغز میانی، بلکه برای حفظ بقای آن‌ها نیز ضروری است(۳۰-۳۴). طبق نتایج ما افزایش بیان این فاکتور در سلول‌های دوپامین‌ساز SH-SY5Y، نه تنها اثر منفی ندارد بلکه منجر به حفاظت آن‌ها در مقابل فاکتورهای التهابی و نیز مسمومیت ناشی از توکسین 6-OHDA می‌شود. توکسین 6-OHDA با ایجاد نارسایی میتوکندریایی و استرس اکسیداتیو به مرگ سلولی دامن می‌زند(۳۵) در حالی‌که فاکتور Nurr1 از طریق تنظیم بیان دسته‌ای از پروتئین‌های میتوکندریایی کد شونده توسط هسته، همچون آنزیم SOD1، به حفظ فسفریلاسیون اکسیداتیو در میتوکندری کمک می‌کند (۳۶). احتمالا افزایش بیان Nurr1 در سلول‌های نورونی منجر به افزایش بیان آنزیم مزبور و در نتیجه مقابله با اثرمهاری توکسین 6-OHDA می‌شود. به علاوه Nurr1 در مسیر سیگنالینگ ضداسترس اکسیداتیو وابسته به CREB نیز شرکت دارد(۳۷). احتمالا اثر حفاظتی Nurr1 در مقابل 6-OHDA، از طریق تحریک هر چه بیشتر این مسیر باشد. بدین منظور میزان بیان دو ژن آنتی اکسیدانت SOD1 و GPX1در سلول‌های نورونی با کمک تکنیک RT-PCR ارزیابی شد اما با توجه به غیر کمی بودن این تکنیک، تغییر محسوسی در بیان ژن‌های مزبور در مقایسه با سلول‌های کنترل مشاهده نشد (شکل ۲۰).

از طرف دیگر نتایج RT-PCR و تست گریس روی سلول‌های میکروگلیا، تولید سطح بالاتری از فاکتورهای التهابی (iNOS و TNF-α) را در میکروگلیای تیمار شده با ۱۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر LPS، نسبت به انواع تیمار شده با ۱ میکروگرم بر میلی‌لیتر LPS نشان داد. با توجه به میزان LD_{50} (۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتراز محیط مشروط میکروگلیای تیمار شده با۱۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر LPS)، رابطه مستقیم سطح فاکتورهای التهابی با سطح التهاب عصبی قابل مشاهده است. میکروگلیای فعال انواعی از فاکتورهای التهابی شامل TNF-α، IL-1β، متابولیت‌های اسید چرب و رادیکال‌های آزاد NO و سوپر اکسید (O_2^-) را تولید می‌کند (۳۸ و ۳۹). NO که توسط آنزیم iNOS تولید می‌شود، با مهار سیتوکروم اکسیداز تنفس میتوکندریایی را مختل، و نیز در اثر واکنش با O_2^- گونه رادیکالی پروکسی نیتریت را تولید می‌کند که به‌شدت به مرگ سلولی ناشی از استرس اکسیداتیو دامن می‌زند (۴۰ و ۴۱). احتمالاً اثر حفاظتی Nurr1 در برابر 6-OHDA، اینجا نیز در مقابله با NO تولیدی از میکروگلیا به‌کار رفته و در سلول‌های SH-SY5Y مقاومت ایجاد می‌کند. TNF-α نیز با اثر روی رسپتورش (TNFR1) می‌تواند آپوپتوزیس خارجی را در سلول‌های نورونی القا کند که احتمالا Nurr1 با پتانسیل ضدآپوپتوزیس خود می‌تواند مسیر مزبور را مهار کند. بدین‌منظور میزان بیان دو ژن مرتبط با فرآیند آپوپتوزیس، P53 و BCL2، با استفاده از RT-PCR در سلول‌های مزبور ارزیابی شد (شکل۲۱) . با توجه به

www.SID.ir
Archive of SID

غیرکمی بودن این روش تغییر قابل ملاحظه ای در میزان بیان آن‌ها در سلول‌های تیمار شده در مقایسه با سلول‌های کنترل مشاهده نشد. در این راستا پیشنهاد می‌شود از روش کمی quantitative real time-PCR به‌منظور بررسی دقیق تغییرات بیان ژن‌های مزبور استفاده شود.

فاکتور دیگر استفاده شده در تحقیق جاری به‌منظور ایجاد حفاظت نورونی، GDNF بود. در ابتدا هدف ما استفاده از سلول‌های آستروسیتوما به‌عنوان سلول‌های مولد فاکتور GDNF به‌صورت انبوه بود، زیرا این سلول‌ها در حالت نرمال نیز GDNF را ترشح می‌کنند و نیز با این کار فضای *in vivo* به‌شکل بهتری بازسازی می‌شد. اما همان‌طور که از شکل‌های ۱۴ و ۱۶ پیداست، GDNF در سلول‌های آستروسیتوما بیان قابل ملاحظه‌ای نداشت و نیز تیمار سلول‌های SH-SY5Y با محیط مشروط سلول‌های آستروسیتوما حفاظت قابل توجهی را اعمال نکرد. پس از آستروسیتوما، سلول‌های HEK-293T بهترین کاندید برای تولید انبوه فاکتور GDNF هستند زیرا آن‌ها نیز در حالت نرمال فاکتور مزبور را تولید می‌کنند و از طرف دیگر با داشتن قابلیت ترانسفکشن بالا، توانستند GDNF را حتی به مقدار بیشتری نسبت به سلول‌های آستروسیتوما تولید کنند. بنابراین در تیمارهای بعدی، فقط محیط مشروط سلول‌های HEK-293T به‌عنوان منبع GDNF مورد استفاده قرار گرفت. نتایج ما نشان داد که اثر حفاظتی GDNF بر نورون‌های دوپامین‌ساز هم در مقابل فاکتورهای التهابی میکروگلیا و هم در مقابل توکسین 6-OHDA، تقریبا با اثر حفاظتی Nurr1 قابل مقایسه است. GDNF با اتصال به کمپلکس رسپتوری GFRα1 و Ret روی سلول‌های هدفش، مسیرهای سیگنالینگی همچون Ras/ERK1/2 و PI3K را فعال کرده و در نتیجه منجر به رشد و حفاظت سلولی می‌شود (۴۲ و ۴۳). احتمالا اثر حفاظتی GDNF در مقابل فاکتورهای التهابی میکروگلیا، از طریق تحریک بیشتر مسیرهای رشد و غلبه آن‌ها بر مسیرهای مرگ باشد. تحقیق جاری و نیز گزارش‌های پیشین نشان از اثر حفاظتی فاکتور GDNF روی سلول‌های نورونی، در مقابل توکسین 6-OHDA دارند (۴۴). همچنین نتایج ما نشان داد که حضور هم‌زمان دو فاکتور Nurr1 و GDNF، حفاظت بیشتری را نسبت به حالت تنها به سلول‌های دوپامین‌ساز عطا می‌کند. فاکتور Nurr1 در تنظیم بیان رسپتور GDNF (Ret) نقش دارد (۱۷).. احتمالا افزایش بیان فاکتور Nurr1 منجر به افزایش بیان رسپتور Ret شده و از طرف دیگر حضور GDNF در محیط، منجر به تحریک بیشتر مسیر سیگنالینگ GDNF و به‌دنبال آن تحریک بیشتر مسیرهای رشد و ترمیم سلولی شده و در نهایت حفاظت سلولی بیشتری را در مقابل فاکتورهای التهابی میکروگلیا و توکسین 6-OHDA به سلول‌های نورونی عطا می‌کند. موضوعی که لازم است در سطح مولکولی به‌دقت بررسی شود.

نتیجه‌گیری

نتایج تحقیق ما نشان داد که بیش‌بیان فاکتور Nurr1 در سلول‌های نورونی دوپامین ساز SH-SY5Y و یا تیمار سلول‌های SH-SY5Y با محیط مشروط حاوی فاکتور GDNF به‌طور جداگانه، نورون‌های مزبور را در برابر فاکتورهای التهابی و استرس اکسیداتیو حفاظت می‌کند. همچنین حضور سطوح بالا و توام این دو فاکتور در سلول‌های SH-SY5Y، اثر سینرژیک داشته و حفاظت بسیار بیشتری را به این سلول‌ها عطا می‌کند.

تشکر و قدردانی

کلیه حقوق و مزایای این تحقیق متعلق به پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری می‌باشد و هزینه آن در قالب پروپوزال دانشجویی و توسط این سازمان تامین شده است.

Archive of SID

www.SID.ir

منابع

1. Lau de, Breteler M.M. Epidemiology of Parkinson's disease. Lancet Neurol. 2006; 5(6): 525-35. A.

2. Anglade P, Vyas F, Javoy-Agid MT, Herrero PP, et al. Apoptosis and autophagy in nigral neurons of patients with Parkinson's disease. Histology and Histopathology. 1997; 12(1): 25-31.

3. Carlsson A, Lindqvist M, Magnusson T. 3, 4-Dihydroxyphenylalanine and 5-hydroxytryptophan as reserpine antagonists. Nature. 1957; 180(4596): 1200.

4. Stocco A, Lebiere C, Anderson JR. Conditional routing of information to the cortex: A model of the basal ganglia's role in cognitive coordination. Psychological review. 2010; 117(2): 541.

5. Chakravarthy VS, Joseph D, Bapi RS. What do the basal ganglia do? A modeling perspective. Biological cybernetics. 2010; 103(3): 237-253.

6. Jankovic J, Stacy M. Medical management of levodopa-associated motor complications in patients with Parkinson's disease. CNS drugs. 2007; 21(8): 677-692.

7. Smeyne RJ, Jackson-Lewis dV. The MPTP model of Parkinson's disease. Molecular brain research. 2005; 134(1): 57-66.

8. Floyd RA. Antioxidants, oxidative stress, and degenerative neurological disorders. Experimental Biology and Medicine.1999; 222(3): 236-245.

9.Kurkowska-Jastrzebska I, Wronska A, Kohutnicka M, Czlonkowski A.MHC class II positive microglia and lymphocytic infiltration are present in the substantia nigra and striatum in mouse model of Parkinson's disease. Acta neurobiologiae experimentalis. 1998;59(1):1-8.

10. McGeer P,Akiyama S, Itagaki EG. Immune system response in Alzheimer's disease. The Canadian journal of neurological sciences. Le journal canadien des sciences neurologiques. 1989; 16(4 Suppl): 516-527.

11. Saijo K,Winner B, Carson CT, Collier JG, et al. A Nurr1/CoREST pathway in microglia and astrocytes protects dopaminergic neurons from inflammation-induced death. Cell. 2009; 137(1): 47-59.

12. Kordower JH, Emborg ME, Bloch J, Ma SY,et al. Neurodegeneration prevented by lentiviral vector delivery of GDNF in primate models of Parkinson's disease. Science. 2000; 290(5492): 767-773.

13. Eslamboli A. Assessment of GDNF in primate models of Parkinson's disease: comparison with human studies. Reviews in the Neurosciences. 2005; 16(4): 303-310.

14. Gill SS,Patel NK, Hotton GR, O'Sullivan K, et al. Direct brain infusion of glial cell lineâ€“derived neurotrophic factor in Parkinson disease. Nature medicine. 2003; 9(5): 589-595.

15. Sherer TB,Fiske BK, Svendsen CN, Lang AE, et al. Crossroads in GDNF therapy for Parkinson's disease. Movement disorders. 2006; 21(2): 136-141.

16. Wallen SA, Castro DS, Zetterström RH, Karlén M, et al. Orphan nuclear receptor Nurr1 is essential for Ret expression in midbrain dopamine neurons and in the brain stem. Molecular and Cellular Neuroscience. 2001; 18(6): 649-663.

17. Galleguillos D, Fuentealba JA, Gómez LM, Saver M, et al. Nurr1 regulates RET expression in dopamine neurons of adult rat midbrain. Journal of neurochemistry. 2010; 114(4): 1158-1167.

18. Barnum CJ, Tansey MG. Modeling neuroinflammatory pathogenesis of Parkinsonâ€™s disease. Progress in brain research. 2010; 184: 113-132.

Archive of SID

www.SID.ir

19. Mazzio EA, Reams RR, Soliman KF. The role of oxidative stress, impaired glycolysis and mitochondrial respiratory redox failure in the cytotoxic effects of 6-hydroxydopamine in vitro. Brain research. 2004; 1004(1): 29-44.

20. Glinka Y, Gassen M, Youdim M. Mechanism of 6-hydroxydopamine neurotoxicity, in Advances in Research on Neurodegeneration. 1997; Springer. 55-66.

21. Rahimi A, Gardaneh M,Alipanah M, Gharib A, et al. Transfectability and Transducibility of chicken liver cell line LMH compared to human cell line HEK-293T. Journal of Cell & Tissue. 2011; 1(2): 47-56.

22. Rasoolnezhad M, Gardaneh M. Sabouni Induction of neuro-inflammation by activating microglial cells and its impact on survival of dopaminergic neurons. Journal of Cell & Tissue. 2016; 6(4): 481-490.

23. 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 research. 2011; 14(2): 195-204.

24. Rahimi A, Gardaneh M, Alipakah M, Panahi Y. Recombinant lentivirus-mediated gene transfer into chicken cell line LMH. Modares Biological Science and Technology. 2010; (1): 54-60.

25. Reiser J. Production and concentration of pseudotyped HIV-1-based gene transfer vectors. Gene therapy. 2000; 7(11): 910-913.

26. Zhang XY, Russa La, Reiser J. Transduction of bone-marrow-derived mesenchymal stem cells by using lentivirus vectors pseudotyped with modified RD114 envelope glycoproteins. Journal of virology. 2004; 78(3): 1219-1229.

27. Kitamura Y, Kosaka T, Kakimura JI, Matsuoka Y, et al. Protective effects of the antiparkinsonian drugs talipexole and pramipexole against 1-methyl-4-phenylpyridinium-induced apoptotic death in human neuroblastoma SH-SY5Y cells. Molecular pharmacology. 1998; 54(6): p. 1046-1054.

28. Kofler J, Wiley CA. Microglia Key Innate Immune Cells of the Brain. Toxicologic pathology. 2011; 39(1): 103-114.

29. Lynch MA. The multifaceted profile of activated microglia. Molecular neurobiology. 2009; 40(2): 139-156.

30. Zetterstrom RH,Jansson L, Hoffer BJ, Olson L, et al. Dopamine neuron agenesis in Nurr1-deficient mice. Science. 1997; 276(5310): 248-250.

31. Jiang C,Wan X, He Y, Pan T, et al. Age-dependent dopaminergic dysfunction in Nurr1 knockout mice. Experimental neurology. 2005; 191(1): 154-162.

32. Smidt MP, Burbach JPH. How to make a mesodiencephalic dopaminergic neuron. Nature Reviews Neuroscience. 2007; 8(1): 21-32.

33. Pan T, Zhu W., Zhao H, et al. Nurr1 deficiency predisposes to lactacystin-induced dopaminergic neuron injuryin vitro and in vivo. Brain research. 2008; 1222: 222-229.

34. Wang H, Chen J, Hollister K, Sowers LC,et al. Structure and function of Nurr1 identifies a class of ligand-independent nuclear receptors. Nature. 2003; 423(6939): 555-560.

35. Blum D, Torch S, Lambeng N, Nissou M, et al. Molecular pathways involved in the neurotoxicity of 6-OHDA, dopamine and MPTP: contribution to the apoptotic theory in Parkinson's disease. Progress in neurobiology. 2001; 65(2): p. 135-172.

36. Kadkhodaei B, Alvarsson A, Schintu N, Ramsköld D, et al. Transcription factor Nurr1 maintains fiber integrity and nuclear-encoded mitochondrial gene expression in dopamine neurons. Proceedings of the National

Archive of SID

www.SID.ir

Academy of Sciences. 2013; 110(6): 2360-2365.

37. Volakakis N, Kadkhodaei B, Joodmardi E, et al. NR4A orphan nuclear receptors as mediators of CREB-dependent neuroprotection. Proceedings of the National Academy of Sciences. 2010; 107(27): p. 12317-12322.

38. Minghetti L, Levi G. Microglia as effector cells in brain damage and repair: focus on prostanoids and nitric oxide. Progress in neurobiology. 1998; 54(1): 99-125.

39. Banati RB, Gehrmann J, Schubert P, Kreutzberg GW, et al. Cytotoxicity of microglia. Glia. 1993; 7(1): 111-118.

40. Liu B, Gao HM, Wang JY, Jeohn GH, et al. Role of nitric oxide in inflammation-mediated neurodegeneration. Annals of the New York Academy of Sciences. 2002; 962(1): 318-331.

41. Beckman JS. Oxidative damage and tyrosine nitration from peroxynitrite. Chemical research in toxicology. 1996; 9(5): 836-844.

42. Chen B, Zeng WZ, Yuan PX, et al. Increased hippocampal BDNF immunoreactivity in subjects treated with antidepressant medication. Biological psychiatry. 2001; 50(4): 260-265.

43. Chen Z, Chai Y, Cao K, Huang A, et al. Glial cell line-derived neurotrophic factor promotes survival and induces differentiation through the phosphatidylinositol 3-kinase and mitogen-activated protein kinase pathway respectively in PC12 cells. Neuroscience. 2001; 104(2): 593-598.

44. Sandhu JK, Gardaneh M, Iwasiow R, Lanthier P, et al. Astrocyte-secreted GDNF and glutathione antioxidant system protect neurons against 6OHDA cytotoxicity. Neurobiology of disease. 2009; 33(3): 405-414.

Archive of SID

www.SID.ir

Journal of Cell & Tissue (JCT)
Spring 2017; 8(1)

Original Article

The protective effects of Nurr1 and GDNF on dopaminergic neural SH-SY5Y cell line against neuro-inflammation and toxicity of 6-OHDA

Rasoolnezhad M, M.Sc.[1], Gardaneh M, Ph.D.[2*], Sabouni F, Ph.D.[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 Group, Faculty of Molecular Genetics, National Institute of Genetic Engineering and Biotechnology, Tehran, Iran
3. Dept of Molecular Medicine, Faculty of Biochemistry, National Institute of Genetic Engineering and Biotechnology, Tehran, , Iran

* Email corresponding author: mossabenis65@gmail.com

Received: 12 Apr. 2017 Accepted: 5 Sep. 2017

Abstract

Aim: In this study Nurr1 and GDNF, due to their anti-inflammatory and regenerative effects and Nurr1-mediated regulation of GDNF receptor (Ret) expression, were selected to protect dopaminergic SH-SY5Y cell line against neuroinflammation and toxicity caused by 6-OHDA.

Material and Methods: Recombinant lentiviral vectors carrying Nurr1 and GDNF genes were prepared and transdused to SH-SY5Y and astrocytoma (1321N1) cell lines respectively. Also HEK-293T cells were transfected with plasmid carrying GDNF to overexpress this factor; condition media of transduced astrocytoma and transfected HEK-293T cells were collected and stored. Next, overexpression of mentioned factors was demonstrated by RT-PCR. On the other hand, microglial cells were isolated from neonatal rat brains and induced with LPS to produce neuroinflammatory factors; Inducible expression of them was demonstrated by Griess test and RT-PCR. Condition media of microglia was collected and saved. Finally, SH-SY5Y cells overexpressing Nurr1 were treated with condition media of transduced astrocytoma / transfected HEK-293T and then with condition media of LPS-induced microglia or 6-OHDA toxin.

Results: data from MTT assay showed, SH-SY5Y cells overexpressing Nurr1 or pretreated with GDNF are more resistant to toxicity caused by neuroinflammation and 6-OHDA. Also Nurr1 and GDNF have cooperative effects and give more protection to dopaminergic cells.

Conclusion: Nurr1 and GDNF each have protective effects on dopaminergic neural cells against inflammatory factors or 6-OHDA. Also they synergize with each other leading to more protection for dopaminergic neural cells.

Keywords: GDNF, microglia, neuroinflammation, Nurr1, oxidative stress

Archive of SID

www.SID.ir