اثر β-گلوکان بر تحریک ترشح پرولاکتین و مورفولوژی سلولهای GH3/B6

لادن دلفی[۱]، حوری سپهری[۱]، یاسمن رسولی[۱]، سمیده خویی[۲]

[۱]دانشگاه تهران، پردیس علوم ، دانشکده زیست شناسی

[۲]دانشگاه تهران، مرکز تحقیقات بیوشیمی و بیوفیزیک

تاریخ دریافت: ۸٤/۰۷/۰۳ تاریخ پذیرش: ۸۵/۰۲/۰۳

چکیده

اسید پکتیک و β-گلوکان دو بخش جدا شده از عصاره گیاهان لاکتوژن دار شد. این دو، ماکرومولکول پلی ساکاریدی هستند و پژوهشهای قبلی اثر لاکتوژنیک آنها را بر قطعات هیپوفیز گوسفند با افزایش ترشح پرولاکتین در آنها نشان داده است. در این مطالعه کشت دودمان سلولی GH3/B6 ، تنها سلولهای لاکتوتروپ هیپوفیز قدامی با خصوصیت ترشح پرولاکتین و هورمون رشد مورد استفاده قرار گرفت. اندازه گیری مقدار پرولاکتین مترشحه از این سلولها در تراکمهای مختلف β-گلوکان با روش وسترن بلات و سپس دانسیتومتری باندها انجام شده است. نمونه های تحت تأثیر β-گلوکان با نمونه های شاهد یعنی سلولهای تنها انکوبه شده در محیط کشت و نیزکنترل مثبت یعنی سلولهای تحت تأثیر هورمون رها کننده تیروتروپین (Thyrotropine-Releasing Hormone) با تراکم ۵۰ nM ، مقایسه شد. هورمون رها کننده تیروتروپین یکی از بهترین محرکهای ترشح پرولاکتین در سلولهای لاکتوتروپ هیپوفیز قدامی است. انکوباسیون سلولها بمدت ۲٤ ساعت، افزایش معنی دار ترشح پرولاکتین در تمام تراکمهای β-گلوکان نسبت به محیط شاهد را نشان می دهد. در حالیکه انکوباسیون سلولها بمدت ٤۸ ساعت افزایش معنی دار ترشح پرولاکتین سلولها را فقط در تراکمهای ۱۰۰ ۳۰۰ μg/ml ($p<0.05$) و ۲۰۰ μg/ml ($p<0.01$) نشان می دهد. در این پژوهش سلولها از نظر مورفولوژی نیز بوسیله میکروسکوپ فاز کنتراست مورد بررسی قرار گرفتند. مهمترین تغییر در سلولها افزایش گرانولهای ترشحی است، اما این افزایش در وضعیت بیولوژیکی آنها در محیط کشت تأثیری ندارد.

واژه های کلیدی: پلی ساکارید، اسید پکتیک ، β-گلوکان، سلولهای GH3/B6، پرولاکتین

مقدمه

خواص درمانی پلی سکارید ها از سالها قبل شناخته شده است، بطوریکه اولین گزارش از خواص این مواد به ۳۰۰۰ سال قبل از میلاد مسیح می رسد. در اوایل قرن بیستم پس از شناخت توانایی قارچها در غیر فعال کردن سیستم مکمل (Complement System)، توجه به پلیمرهای قندی موجود در این گیاهان از جمله گلوکانها جلب گردید. در این زمان خانواده ای از اجزای دیواره قارچها بنام زیموزان (Zymosan) معرفی شد. مطالعات نشان داد که تزریق مستقیم داخل وریدی این مواد منجر به فعال شدن سیستم ایمنی می گردد. زیموزان شامل اجزای مختلفی (گلوکانها، مانازها، کیتین، پروتئین و چربی) می باشد اما β- گلوکان بعنوان بخش فعال زیستی آن معرفی شده است (۲).

مطالعات بیشتر، نقش این پلی ساکاریدها را در مقابله با عفونتهای میکروبی نشان داده و حضور این مواد در خون افراد بیمار، ناشی از ترشح آنها توسط غشای میکروبها، مشخص گردیده است. مولکول۱و β۳-گلوکان توسط میکروارگانیزمها بوفور ساخته می شود اما سایر گونه ها قادر به سنتز آن نمی باشند (۱۰). فعالیت این مولکول بستگی به انشعابات جانبی، طول پلیمر و نیز ساختار سوم آن دارد، بطوریکه β- گلوکانهای با وزن مولکولی بالاتر فعالیت بیشتری نشان می دهند (۲ و ٦).

Archive of SID

www.SID.ir

مطالعات "in vitro" نشان می دهد که β- گلوکان می تواند پاسخهای ایمنی را در زمان رشد و نمو تومور (Tumor Development)، آلودگیهای قارچی، ویروسی و باکتریایی القا کند. ممکن است فعالیت β- گلوکان بمدت زمان حضور آن در سلولهای پستانداران بستگی داشته باشد، زیرا این سلولها آنزیم β-۱→۳- گلوکاناز را ندارند، بنابراین نمی توانند آن را به سرعت تجزیه کنند و متابولیسم این مواد در بدن به آرامی از طریق اکسیداسیون صورت می گیرد (۲).

مهمترین عملکرد β-گلوکان از طریق فعال کردن ماکروفاژها، سلولهای دندریتی، اندوتلیالی، نوتروفیلها و منوسیتها می باشد، همانطور که لنفوسیتها و سلولهای کشنده طبیعی را نیز فعال می کنند. این پلی ساکاریدها بجهت بزرگی مولکول نمی توانند از غشای سلول بگذرند و تنها به گیرنده های غشایی خود پیوند می شوند. گیرنده های β- گلوکانها بطور دقیق شناخته نشده اند، اما اتصال β- گلوکان روی سلولهایی مانند ماکروفاژها و نوتروفیلها ثابت شده است (۱۲).

گیرنده های β- گلوکان روی لوکوسیتها شامل ماکروفاژها، نوتروفیلها و نیز سلولهای غیر ایمنی شامل سلولهای اندوتلیالی، سلولهای الوئولار (Alveolar Epithelial Cells)، فیبروبلاستها و حتی سلولهای هیپوفیز قدامی گزارش شده است (۲ و ۱۰). شناخته شده ترین گیرنده β- گلوکان گیرنده های دکتین ۱ (Dectin-1- Receptors) می باشد. این گیرنده ها دارای یک ناحیه(Domain) شناسایی کننده کربوهیدراتی غیر کلاسیک تیپ C- C) (Nonclassical Type Carbohydrate) می باشند که به ناحیه تراغشایی (Transmembrane) آن یک پایه متصل شده و حاوی یک دنباله سیتوپلاسمی بهمراه عامل فعال کننده تیروزین Immunoreceptor Tyrosin-based Activation Motif (ITAM) است. این گیرنده در همه جمعیتهای ماکروفاژ و نیز بیشتر بافتها بیان می شود. بافتهای کبدی، ششها و تیموس بالاترین میزان بیان گیرنده را نشان می دهند. این نوع گیرنده هم در موش و هم در انسان مشخص شده است و تفاوت مولکولی آنها بر اساس فقدان پایه خارج سلولی آن می باشد. اتصال β- گلوکان به گیرنده سبب فسفریله شدن عامل ITAM و بدنبال آن ارسال پیام به سلول است (۱ و ۲). گیرنده های دیگری نیز برای β- گلوکان مشخص شده است که شامل گیرنده های CR3 در سلولهای میلوئیدی و لنفوسیتها، گیرنده لاکتوزیل سرامید (Lactosylceramide) در غشای پلاسمایی اکثر سلولها و گیرنده نکروفاژ در مورد سلولهای ماکروفاژی می باشد (۱، ۲ و ۱۲).

پژوهشهایی نیز در زمینه اثرات لاکتوژنی β- گلوکان انجام شده است. تا سال ۱۹۸۱ تحقیقات در این مورد بسیار اندک است و تنها گزارشات مربوط به مصرف آب جو در اروپا می باشد. در این گزارشات الکل موجود در آب جو را سبب افزایش شیر دانسته اند (۷ و۱٤). ادامه بررسیها مشخص نموده است که این افزایش بدلیل الکل موجود در آب جو نمی باشد، بلکه بخاطر ترکیباتی است که در ساختن آب جو بکار می رود. افزایش شیر در دامهایی که با تفاله های کارخانجات سازنده آب جو تغذیه شده اند، صحت مطلب فوق را تأیید می نماید (۵). ادامه مطالعات روی عصاره گیاهان سازنده آب جو و برخی گیاهانی که در ساختن آب جو بکار می روند انجام شد و اثر لاکتوژنی این عصاره ها با تزریق داخل وریدی و تجویز دهانی نشان داده شده است. پس از استخراج بخش فعال عصاره این گیاهان دو دسته مولکول بطور عمده در آنها دیده شد که هر دو از جنس پلی ساکارید، از جمله β- گلوکان و پکتین می باشد(۱۵ و ۱٦ و۱۷). آزمایشها با تأثیر این پلی ساکاریدها بصورت "in vitro" در قطعات بافت هیپوفیز ادامه پیدا کرد. نتایج این پژوهشها نشان داد که این مواد در مقادیر مختلف می تواند روی سلولهای هیپوفیز قدامی اثر کرده و سبب افزایش ترشح پرولاکتین در این سلولها شود (۱۸). در این پژوهش خواص لاکتوژنی β-گلوکان روی سلولهای GH3/B6، یک دودمان سلولی از هیپوفیز قدامی

Archive of SID
www.SID.ir

موش که ویژه ترشح دو هورمون رشد و پرولاکتین می باشد، بصورت "in vitro" مورد توجه قرار گرفته است.

مواد و روشها

محیط کشت این دودمان سلولی ، Ham's F12 است که به آن ۱۵درصد سرم اسب و ۲/۵ درصد سرم جنین گوساله غیر فعال اضافه می شود. شرایط اتمسفری مناسب برای رشد سلولها شامل رطوبت ۹۵ درصد ، دمای ۳۷ درجه سانتی گراد و ۵ درصد CO_2 می باشد. تحت این شرایط سلولها در محیط شروع به رشد نموده و بصورت تک لایه به سطح فلاسک چسبیده و تکثیر می شوند (۹).

β-گلوکان با منشاء جو از شرکت سیگما (Sigma-Cat.G6513) خریداری شد و از آن محلول مادری با غلظت ۱ mg/ml تهیه گردید. برای این منظور از محلول ۰/۰۷ درصد NaCl استفاده شد و pH محلول در حد ۷/۲ تنظیم گردید. پس از آماده شدن غلظتهای ۵۰، ۱۰۰،۲۰۰ و ۳۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر β-گلوکان اثر آن بر سلولها بررسی شد. برای انجام آزمایش، تعداد ۱×۱۰^{۶} سلول در ٤ میلی لیتر محیط کشت بمدت ۳ روز کشت شد. پس از تشکیل لایه سلولی، محیط رویی سلولها جمع آوری و سلولها به نمونه های زیر تقسیم شدند:

۱. نمونه های شاهد: در این نمونه ها به سلولها تنها محیط کشت اضافه شد.

۲. نمونه های کنترل مثبت(Positive Control) : سلولها در محیط کشت حاوی هورمون رها کننده تیروتروپین Thyrotropin Releasing Hormone(TRH) (Fluka-Cat.831777) با غلظت ۵۰ nM قرارگرفتند. این ماده بعنوان یکی از بهترین هورمونهای تحریک کننده سلولهای لاکتوتروپ جهت ترشح پرولاکتین شناخته شده است (۸).

۳. نمونه های مورد آزمایش : سلولها در محیط کشت حاوی مقادیر مختلف µg/ml ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰ و ۳۰۰ β-گلوکان قرارگرفتند.

نمونه ها بمدت ۲٤ و ٤۸ ساعت در محیطهای فوق انکوبه شدند. پس از پایان زمان انکوباسیون، محیط رویی سلولها برای تعیین مقدار پرولاکتین ترشح شده توسط آنها مورد بررسی قرار گرفت.

برای سنجش پرولاکتین در محیط روش وسترن بلات Western Blottingوسپس دانسیتومتری باندهای حاصل توسط نرم افزار Total lab انجام شد. برای این کار از الکتروفورز یک بعدی پروتئینها در سیستم بافری غیر پیوسته Discontinuous استفاده شد. آماده سازی ژل فوقانی (۵ درصد) و تحتانی (۱۲ درصد) بر اساس مقادیر جدول ۱ انجام شد. پس از تزریق هر نمونه به چاهکهای ژل فوقانی جریان ۸۰ ولت برای ژل فوقانی و ۱۵۰ ولت برای ژل تحتانی ایجاد گردید. پس از انجام الکتروفورز یکی از ژلها توسط کوماسی بلوCoomasi Blue برای مشاهده باندهای پروتئینی رنگ آمیزی شد. از ژل دوم جهت انتقال باندهای پروتئینی آن به کاغذ نیتروسلولز به روش انتقال نیمه خشکSemidry استفاده شد. پس از اندازه گیری طول و عرض ژل یک لایه کاغذ نیتروسلولز چند لایه دستمال کاغذی و کاغذ واتمن با این طول و عرض در بافر انتقال (Transfer buffer) (۲/۹ g گلایسین ۵/۸ g تریس باز ۰/۳۷ g سدیم دودوسیل سولفات (SDS) و ۲۰۰ میلی لیتر متانول) خیسانده شد و بصورت ساندویچ روی هم در تانک انتقال قرار گرفت. برای انتقال باندها از ژل به کاغذ از جریان $۱/۵\ mA/Cm^2$ استفاده شد. مراحل بعدی شامل بلوکه کردن زمینه کاغذ با سرم آلبومین Bovine Serum Albumin (BSA)و انکوباسیون در آنتی بادی اول حاصل از تزریق ۱۰ هفته ای پرولاکتین خالص موش به خرگوش سفید آزمایشگاهی و جداسازی سرم آن، (۱۱) صورت گرفت. در نهایت انکوباسیون در آنتی بادی

Archive of SID
www.SID.ir

ثانویه anti rabbit IgG (Sigma-Cat.A4914) انجام شد. ظهور باندها با سوبسترای آنزیم متصل شده به آنتی بادی ثانویه آنزیم هورس ردیش پراکسیداز Horse Radish Peroxidase انجام گرفت. تصویر حاصل از باندها با نرم افزار Total lab بررسی شد. در این نرم افزار شدت و وسعت باندهای تشکیل شده بصورت سطح زیر منحنی محاسبه بعنوان سطح پرولاکتین Level of Prolactin در نظر گرفته می شود.

جدول ۱ – محلولهای آماده سازی ژل الکتروفورز

ژل فوقانی (۵درصد)	ژل تحتانی (۱۲درصد)	مقادیر بر اساس میلی لیتر
۱/٤	۳/۳	H_2O
۰/۳۳	٤	30% Acrylamid mix
–	۲/۵	1.5M Tris PH 8.8
۰/۲۵	–	1.0M Tris PH 6.8
۰/۰۲	۰/۱	10% SDS
۰/۰۲	۰/۱	10% Ammonium persulfate
۰/۰۰۲	۰/۰۰٤	TEMED

برای بررسی سلولهای زنده، پس از انکوباسیون سلولها در حضور مقادیر مختلف β-گلوکان آنها با تریپان بلو Trypan Blue به نسبت ۱ به ۹ رنگ آمیزی شد و با توجه به اینکه رنگ در سلولهای مرده نفوذ می کند، درصد سلولهای زنده محاسبه با شمارش سلولهای زنده و مرده توسط لام توما Tomaو میکروسکوپ نوری انجام گرفت.

آنالیزهای آماری با استفاده از روش آنووای یک طرفه توسط نرم افزار INSTAT انجام شد.

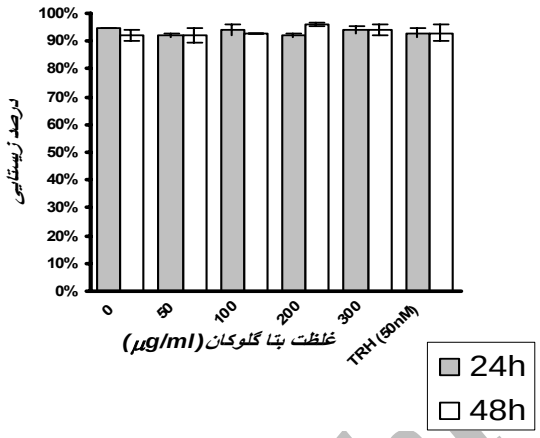
نتایج

نتایج این پژوهش را می توان در دو بخش مورد بررسی قرار داد:

۱. نتایج حاصل از اثر β-گلوکان روی درصد حیات و مورفولوژی سلولها

۲. نتایج حاصل از اثر β-گلوکان بر میزان ترشح پرولاکتین

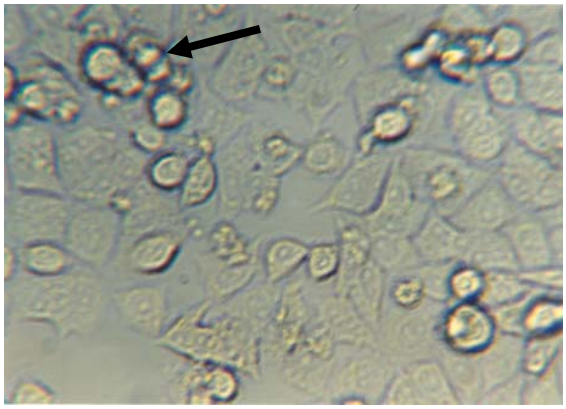
۱- نتایج حاصل از اثر β-گلوکان روی درصد حیات و مورفولوژی سلولها: ابتدا در صد سلولهای زنده در حضور غلظتهای µg/ml ۵۰،۱۰۰، ۲۰۰ و ۳۰۰ β-گلوکان نشان داد که β-گلوکان اثر مخربی بر درصد زیستایی سلولها ندارد، بنابراین تغییری در کاهش یا افزایش درصد زیستایی سلولها مشاهده نمی شود.



شکل ۱ – دیاگرام اثر β – گلوکان بر درصد زیستایی سلولهای GH3/B6

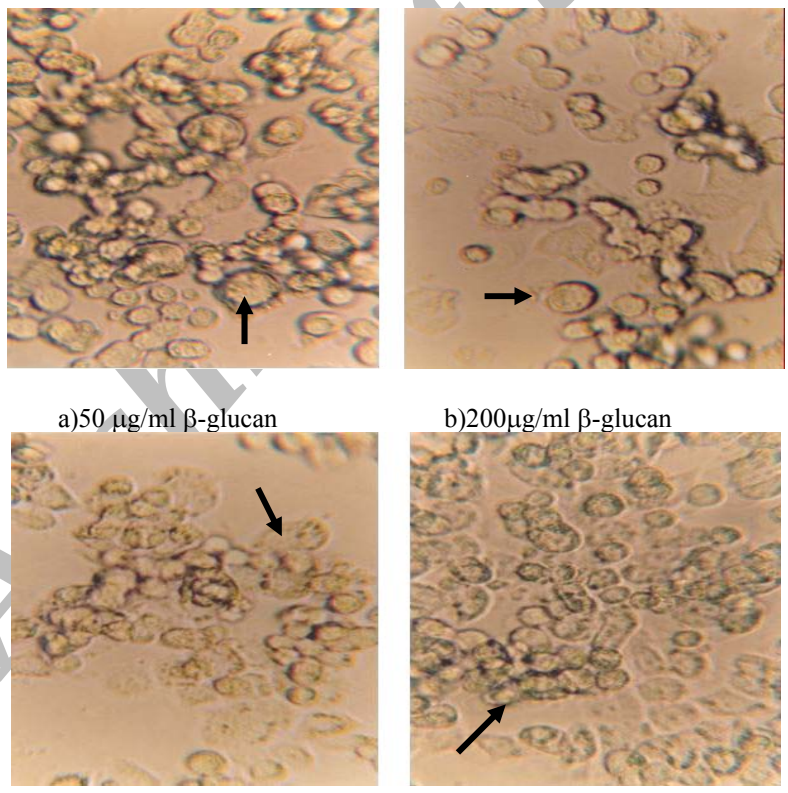
بهمین دلیل سپس تغییرات مورفولوژیکی سلولهای تیمار شده با β-گلوکان مورد بررسی قرار گرفت. تغییرات بوسیله میکروسکوپ اینورت و فازکنتراست مشخص گردید. در شرایط مناسب کشت، بدون افزودن β-گلوکان، سلولهای GH3/B6 پس از ۲٤-۳۰ ساعت به سطح فلاسک چسبیده و شروع به تکثیر می نمایند. در این شرایط ظاهر سلولها کشیده شده و قادرند تا ۳/٤ سطح فلاسک را بپوشانند (۹) (شکل ۲).

Archive of SID
www.SID.ir



شکل ۲ – شکل ظاهری سلولهای GH3/B6 که بصورت کشیده به سطح فلاسک چسبیده اند. در این شکل سلولهای کروی در حال تقسیم نیز مشاهده می شود (25X).

انکوباسیون سلولها در محیط حاوی β-گلوکان سبب تغییراتی در سلولها می گردد. یک تا دو ساعت پس از انکوباسیون دراین محیط سلولها تقریبا کروی شکل شده وبا افزایش حجم وارد فاز ترشحی می شوند. با افزایش زمان انکوباسیون (۲٤ تا ٤۸ ساعت) علاوه بر کروی شدن ، درون سلولها گرانولهای ترشحی نیز مشاهده می شود. بالاترین میزان این تغییرات ظاهری در غلظت ۵۰ µg/ml β-گلوکان پس از ۲٤ ساعت و غلظت ۲۰۰ µg/ml β-گلوکان پس از ٤۸ ساعت قابل مشاهده است (شکل ۳). در نمونه های حاوی TRH نیز ظهور گرانولهای ترشحی و افزایش حجم سلول قابل رؤیت می باشد(شکل ٤). از لحاظ چسبندگی سلولی، مانند نمونه های شاهد (فاقد β-گلوکان) سلولها کاملاً به سطح فلاسک می چسبند.



a)50 µg/ml β-glucan

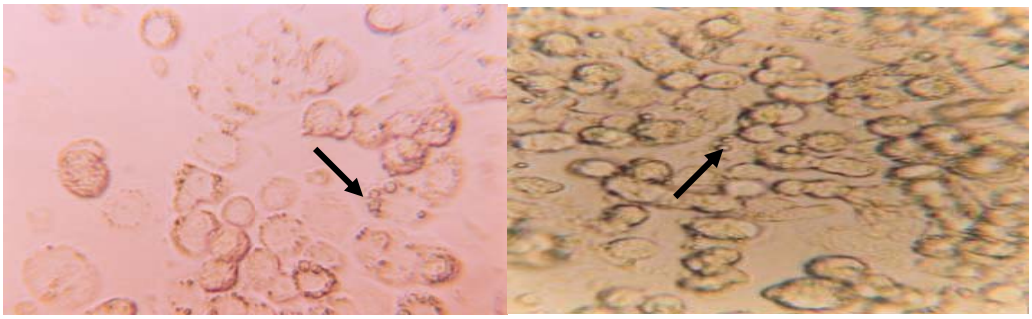
b)200µg/ml β-glucan

c)50 µg/ml β-glucan

d)200µg/ml β-glucan

شکل ۳: تغییر شکل سلولهای تیمار شده با β-گلوکان: a و b انکوباسیون ۲٤ ساعته و شکلهای c و d انکوباسیون ٤۸ ساعته را نشان می دهد. کروی شدن سلولها و گرانولهای ترشحی با فلش نشان داده شده است(25X) .

www.SID.ir

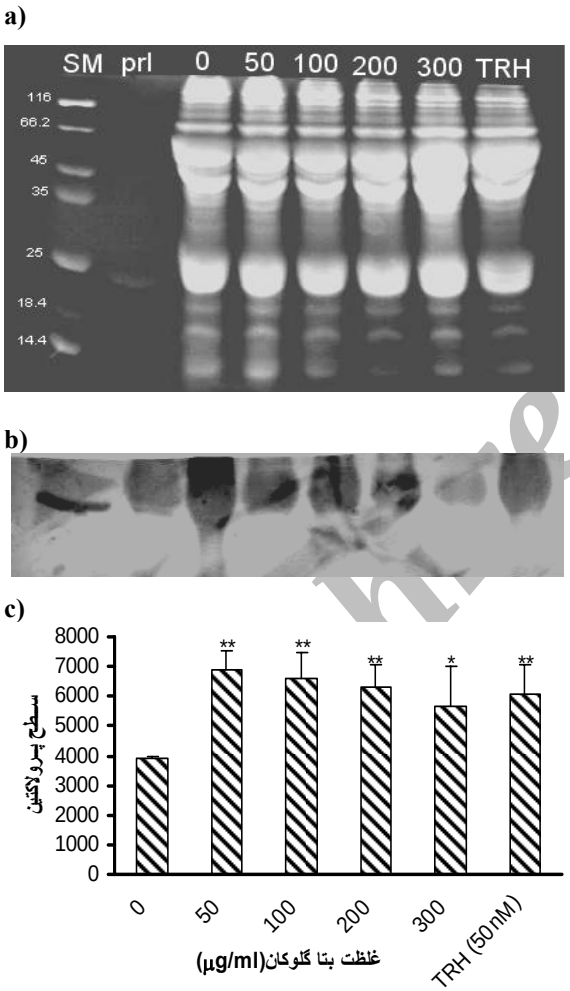


a) 24 hours b) 48 hours

شکل ٤ – ظهور گرانولهای ترشحی در سلولهای تیمار شده با غلظت TRH (۵۰ nM) (25X).

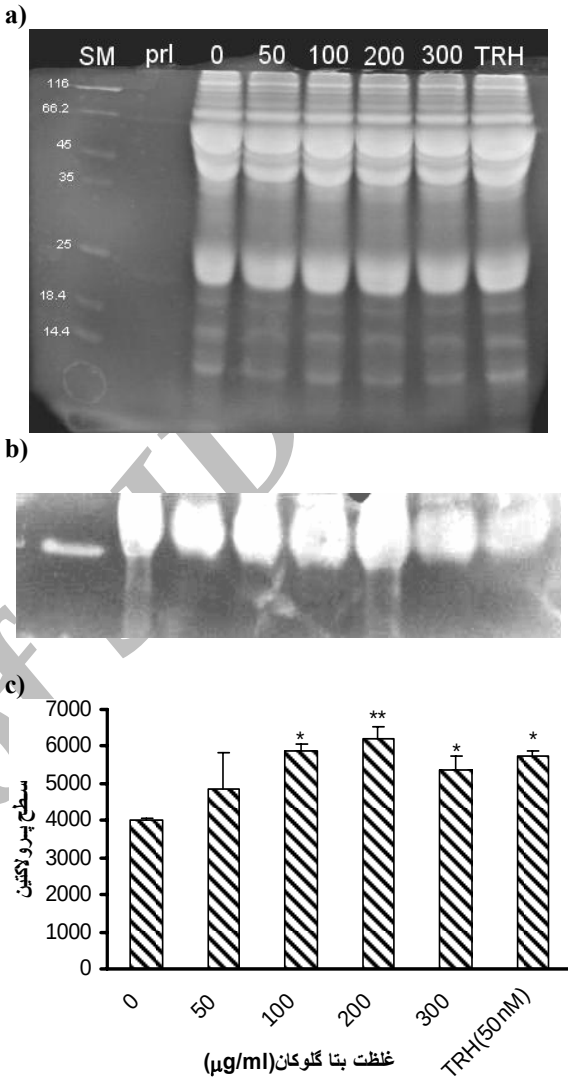
۲- نتایج حاصل از اثر β-گلوکان بر میزان ترشح پرولاکتین در سلولهای GH3/B6 : بررسی تغییر ترشح پرولاکتین توسط سلولها در حضور مقادیر µg/ml ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰ و ۳۰۰ β-گلوکان نسبت به نمونه شاهد (فاقد β-گلوکان) نشان می دهد که انکوباسیون سلولها در محیطهای فوق سبب افزایش ترشح پرولاکتین می شود. انکوباسیون ٢٤ ساعته در غلظتهای µg/ml ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰ و ۳۰۰ β-گلوکان سبب افزایش معنی دار پرولاکتین نسبت به نمونه شاهد می گردد(شکل ۵) و بالاترین میزان این افزایش مربوط به نمونه حاوی µg/ml ۵۰ β-گلوکان می باشد. در حالیکه پس از ٤٨ ساعت (شکل ٦) تنها غلظتهای µg/ml ۱۰۰،۲۰۰ و۳۰۰β-گلوکان قادر به افزایش تحریک ترشح پرولاکتین در سلولهای انکوبه شده است و حداکثر این افزایش در غلظت µg/ml ۲۰۰ اعمال می شود.

نتایج این پژوهش مؤید این نظر است که β-گلوکان محرک ترشح پرولاکتین توسط این سلولها می باشد و در مقایسه با هورمون TRH که یکی از محرکهای مؤثر ترشح پرولاکتین در این سلولها است، حداقل همان اثر تحریکی را نشان می دهد.



شکل ٥ a – تصویر ژل الکتروفورز انکوباسیون ٢٤ ساعته. b – تصویر غشای وسترن آن. c – منحنی تغییرات مقدار ترشح پرولاکتین در سلولهای GH3/B6 در انکوباسیون ٢٤ ساعته $p<0.05^{*}$ و $p<0.05^{**}$ (تعداد سلولها = ۱×۱۰^{٦} و n = ۳)

www.SID.ir



شکل ٦ a – تصویر ژل الکتروفورز انکوباسیون ٤٨ ساعته. b – تصویر غشای وسترن آن. c – منحنی تغییرات مقدار ترشح پرولاکتین در سلولهای GH3/B6 در انکوباسیون ٤٨ ساعته $p<0.05^{*}$ و $p<0.05^{**}$ (تعداد سلولها = ۱×۱۰^{٦} و ۳ = n)

بحث

دودمان سلولی GH از تومور هیپوفیز ماموسوماتوتروپیک Mammosomatotropic MtT/WS جدا شده است. این سلولها بطور ویژه هورمونهای رشد و پرولاکتین را ترشح می کند. بسته به نوع کلونهای جدا شده از این سلولها، قادر به ترشح دو هورمون فوق در نسبتهای مختلف می باشند. سوش سلولی GH3/B6 استفاده شده در این پژوهش هورمون رشد و پرولاکتین را بمیزان ۱ به ۵ ترشح می کند(۹).

در پژوهشهای قبلی بررسی اثرات لاکتوژن در محیط "in vitro" با استفاده از قطعات بافتی هیپوفیز انجام شده است. با توجه به نتایج مثبت حاصل (۱۸) در پژوهش حاضر از سلولهای GH3/B6 استفاده شد تا اثر β-گلوکان بطور مستقیم بر سلولهای لاکتوتروف بررسی گردد. در این آزمایشها کنترل مثبت TRH می باشد که اثر آن بر ترشح پرولاکتین ثابت شده است(۳).

در این مطالعه اضافه نمودن β-گلوکان اثرات مختلفی را از نظر مورفولوژی و ترشح پرولاکتین بر این سلولها نشان می دهد. ضمناً اثر TRH نیز بر ترشح مثبت و معنی دار است.

در محیط حاوی β-گلوکان سلولها شکل ترشحی پیدا کرده و در آنها وزیکولهای ترشحی پدیدار می گردد. این نتایج با مشاهدات ساختاری این سلولها تحت شرایط مختلف محیطی مطابقت دارد و همانطور که در مطالعات دیگر نشان داده شده است افزایش ارگو کریپتین (C_B154) به محیط از تعداد این گرانولها بطور قابل ملاحظه ای می کاهد (۳ و ۱۳).

اندازه گیری میزان پرولاکتین موجود در نمونه ها نشان داد که β-گلوکان بصورت "in vitro" روی سلولهای GH3/B6 مؤثر است، که قابل انطباق با نتایج حاصل از اثر این ماده بر قطعات هیپوفیز گوسفند است (۱۸). نتایج این پژوهش نشان دهنده اتصال این ماده به سلولهای GH3/B6 و افزایش میزان ترشح پرولاکتین در این سلولها است که با نتایج حاصل از اتصال β-گلوکان فسفاته به این سلولها و دودمان سلولی PDSF انسانی مطابقت دارد (٤ و ۱۳). در انکوباسیون ٢٤ ساعته افزایش میزان ترشح β-گلوکان در نمونه های حاوی ۵۰µg/ml، ۱۰۰و ۲۰۰ β-گلوکان نسبت

Archive of SID
www.SID.ir

به نمونه شاهد (فاقد β-گلوکان) و کنترل مثبت قابل ملاحظه است. این نتایج نشان می دهد که افزایش ترشح در محیط حاوی β-گلوکان اثر بیشتری حتی نسبت به TRH یکی از مؤثرترین مولکولها برای سنتز و ترشح پرولاکتین، دارد. در این انکوباسیون مؤثرترین تراکم β-گلوکان برای افزایش پرولاکتین ۵۰µg/ml است.

انکوباسیون ٤٨ ساعته سلولها در محیط حاوی β-گلوکان نشان می دهد که در تراکمهای ۱۰۰µg/ml، ۲۰۰ و ۳۰۰ قدرت ترشحی سلولها بالا می رود و بیشترین مقدار ترشح در تراکم µg/ml ۲۰۰ ملاحظه می گردد. بنابراین می توان نتیجه گرفت که β-گلوکان با تراکمهای بالا در انکوباسیونهای طولانی مدت بر ترشح سلولها اثر می گذارد. این نتایج با بررسیهای انجام شده در مورد اثر گلوکان فسفات بر ترشح پرولاکتین روی سلولهای GH3 مطابقت دارد (٤).

مطالعه این سلولها نشان می دهد که مکانیسمهای دیگر نظیر تزاید سلولها با اضافه شدن β-گلوکان تغییر نمی کند. زیرا اندازه گیری پروتئین و DNA نشان می دهد که افزایشی در این مورد مشاهده نمی شود، در حالیکه افزایش مفدار ترشح پرولاکتین در محیطهای مختلف از نظر تراکم β-گلوکان دیده می شود. بنابراین ماده ای مؤثر برای افزایش ترشح در این سلولها می تواند باشد. مدت زمان نسبتاً طولانی اثر این ماده بر این سلولها با میزان پایداری این ماده در محیط کشت مرتبط می باشد(۱).

گیرنده های β-گلوکان در سلولهای هیپوفیز قدامی مشاهده شده است اما وجود این گیرنده ها روی سلولهای لاکتوتروپ و مسیر فعالیت آن هنوز بخوبی روشن نیست. نظر به اینکه در سلولهای سیستم ایمنی گیرنده β-گلوکان دکتین ۱ می باشد که به گیرنده های تیروزین کینازی شباهت دارد مطالعات بعدی باید در سطح سلولی و مولکولی وجود این گیرنده ها شکل مولکولی آنها و چگونگی فعال شدن آنها در القا ترشح پرولاکتین را مشخص نمایند.

تشکر و قدردانی: این پژوهش با کمکهای ارزنده معاونت های محترم پژوهشی دانشگاه تهران و دانشکده علوم و شوراهای مربوطه انجام شده است که قدردانی می شود. از جناب آقای کاووس قبادیان و خانم هایده قبادیان نیز بواسطه کمکهای بی دریغشان تشکر بعمل می آید. از جناب آقای دکتر بهرام گلیایی جهت فراهم آوردن امکانات در استفاده از آزمایشگاه بیوفیزیک سلولی و مولکولی مرکز تحقیقات بیوشیمی و بیوفیزیک و نیز خانم کاملیا سیامکی جهت همکاری صمیمانه شان تشکر بعمل می آید. در نهایت از خانم دکتر دانیل گرجی که سلولهای GH3/B6 را به آزمایشگاه فیزیولوژی اهدا نموده اند سپاسگزاری می شود.

منابع

1. Brown G.D and Gordon S. (2001). *A new receptor for β-glucan. Nature*; 413
2. Brown G.D and Gordon S. (2003). *Fungal β-glucans and mammalian immunity*. Immunity; 19(3): 311-315
3. Brunet N., Rizzino A., Gourdji D., and Tixier-Vidal A. (1981). *Effects of TRH on cell proliferation and prolactin secretion by GH3\B6 rat pituitary cells: a serum-supplement media*. Journal of Celluar Physioliogy;190 : 363-372
4. Breuel K.F., Kougias P., Rice P.J., Wei D., De Ponti K., Wang J., Laffan J.J., Li C., Kalbfleisch J., and Williams D.L. (2004). *Anterior pituitary cells express pattern recognition receptors for fungal glucans: Implication for neuroendocrine immune involvement in response to fungal infections.* Neuroimmunomodulation; 11: 1-9
5. Carlson H.e, Wasser H.L, Reidelberger R.D.(1985*). Beer induces prolactin secretion*. Journal of Clinical Endocrinal Metabolism; 62: 637

Archive of SID
www.SID.ir

6. Colleoni-Sirghie M., Fulton D.B., and .White P. (2003). *Structural features of water soluble (1,3) (1,4)β-D- glucan from high glucan and traditional oat lines.* Carbohydrate Polymers; 54(2): 237-249.

7. Derosa. G., Corsello S.M., Ruffili M.P., and Della-casa E. (1981). *Prolactin secretion after beer*. Lancet; 2: 934-938

8. Dufy B., Jaken S., and Barker J.L. (1987). *Intra cellular ca $^{++}$ dependent protein kinase C activation mimics delayed effects of TRH on clonal pituitary cell excitability*. Journal of Endocrinology; 121: 793-802

9. Gourdji D., Tougard C., and Tixier-Vidal A. (1982*). Clonal prolactin strains as atool in neuroendocrinology.* Frontiers in Neuroendocrinology; 7: 317-351

10. Gonzalez J.A., Digby J., Rice P.J.,.Breuel K., Deponti W.K., Kalbfleisch J.H., Browder W., and Williams D. (2004). *At low serum glucan and serum cytokine level in paitient with infections*. International Immunopharmacology; 4(8): 1107-1115

11. Hu X., Guo J., Shen L., Chen Y., Zhang Z., and Zhang Z. (2002). *Get effective polyclonal antisera in one month*. Cell Research; 12(2): 157-160

12. Kubala L., Ruzickava J., Nickova K., Sandula J., Ciz M., and Lojek A. (2003). *The effect of (1→3)- β-D-glucan, carboxymethylglucan and schizophyllan on human leukocytes in vitro*. Carbohydrate Research; 338(24): 2835-2840

13. Meuller A., Raptis J., Rice P.J., Kalbfleisch J., Stouth R.D., and Ensley H.E. (2000). *The influence of glucan polymer structures and solution conformation on binding to 1→3β D glucan receptors in human monocyte –like cell line*. Glycobiology; 10: 339-346

14. Przybysz E.A. (1998). *Characterization of the developmental patterns of prolactin and prolactin receptors gene transcriptional in rat small intestinal epithelial cells and intraepithelial lymphocytes.* The Schreyer honors college.

15. Robyc. C., Crosigmani P.G. (1967). *Prolactin and human reproduction*. Academic Press.

16. Sawadogo L., Houdebine L.M., Thibault J.F, Rouau X., and Bousquet M. (1988). *Identification of the lactogenic compound present in beer*. Annual Biological Clinic; 46: 126-134

17. Sawadogo. L., Thibault J.F, Bousquet M., Rouau X., and Houdebine L.M. (1986). *Effects of pectic substance on prolactin and growth hormone secretion in the ewe and on the induction of casein synthesis in rat*. Reproduction Nutrient Development; 28 (2A): 293-301

18. Sepehri. H, Zoraghi. R, Haeri- Rohani .A. (2000). *Effect of pectic acid and β-glucan on prolactin secretion by ovine pituitary explants.* Iranian International Journal Science; 1(2): 99-107

Archive of SID

www.SID.ir

The Stimulating Effect of β-Glucan on Prolactin Secretion and morphology in GH3/B6 Cells

Delphi L.[1], Sepehri H.[1], Rassouli Y.[1], Khoei S.[2]

[1]Biology Dept., Faculty of Science, Tehran University, Tehran, Iran

[2]Institute of Biochemistry and Biophysics, Tehran University, Tehran, Iran

Abstract

The main active compounds of Lactogen herbal extracts are pectin and β-glucan which are polysaccharide structure. Studies on the effect of these substances on hypophysis fragments indicated their potential to increase prolactin secretion. In the present study, we used GH3/B6 cell line which is known to secret prolactin and growth hormone. Western blotting following band densitometry via Total lab software showed prolactin amount in the presence of β-glucan. In our study GH3/B6 cells were treated with various concentration of β-glucan ranging from 50 to 300 μgr/ml for a time period of 24 hours or 48 hours. β-glucan effect on prolactin secretion was compared to control cells (in the absence of β-glucan) and positive control cells treated with 50 nM of Thyrotropine Releasing Hormone (TRH). TRH is one of the best prolactin secretion stimulator in anterior hypophysis cells. These results indicate that 24 hours incubation of these cells in the presence of 50, 100 ,200 μgr/ml ($p<0.01$) and 300 μgr/ml ($p<0.05$) of β-glucan can significantly increase prolactin secretion in comparison with control. In 48 hours incubation with β-glucan, prolactin secretion was significantly increased in 100, 300 ($p<0.05$) and 200 μgr/ml ($p<0.01$) in comparison with the control. In addition, phase contrast microscopy showed increased appearance of secretory granules which could correlate with increased prolactin secretion.

Keywords: Polysaccharide, Pectin, β-glucan, GH3/B6 cells, Prolactin

Archive of SID

www.SID.ir