Archive of SID

القای آپوپتوز و نکروز به وسیله اسید پکتیک در دودمان سلولی هیپوفیزی GH3/B6

فرنوش عطاری[۱]، حوری سپهری[۱*]، سهیلا اژدری[۲]، بهرام گلیایی[۳] و لادن دلفی[۱]

[۱] تهران، دانشگاه تهران، دانشکده زیست شناسی، گروه فیزیولوژی جانوری

[۲] تهران، انستیتو پاستور، گروه ایمونولوژی

[۳] تهران، دانشگاه تهران، مرکز تحقیقات بیوشیمی و بیوفیزیک

تاریخ دریافت: ۸۶/۱۲/٤ تاریخ پذیرش: ۸۷/۱۲/٤

چکیده

مرگ برنامه ریزی شده سلولی یا آپوپتوز یکی از شایع ترین اشکال مرگ در سلولهای یوکاریوتی می باشد. آپوپتوز در واقع یک مکانیسم خودکشی فیزیولوژیکی است که باعث حفظ هوموستازی می شود. اثرات آپوپتوزی مشتقات پکتینی در شرایط in vivo و in vitro مشاهده شده است. در این مطالعه اثر اسید پکتیک بر روی آپوپتوز سلولهای GH3/B6 بررسی شده است. این ماده بخش عمده پلی ساکاریدهای دیواره سلولهای گیاهی را تشکیل می دهد و سبب مهار رشد متاستاز سلولهای سرطانی می گردد. سلولهای GH3/B6 سلولهای لاکتوتروپ هستند و از تومور هیپوفیز موش کلون شده اند و به ویژه دارای قدرت سنتز و ترشح هورمونهای رشد (GH) و پرولاکتین (PRL) می باشند. در این مطالعه، سلولها در محیط کشت Ham's F12 غنی شده با ۱۵ درصد سرم اسب و ۲/۵ درصد سرم جنین گاو کشت داده شدند. پس از ۳ روز پیش انکوباسیون، سلولها تحت تأثیر مقادیر مختلف اسید پکتیک در زمانهای ٦، ۲٤و ٤۸ ساعت قرار گرفتند. کنترل مثبت در این آزمایش بروموکریپتین، عامل شناخته شده القا کننده آپوپتوز در این سلولها انتخاب گردید. درصد زیستایی سلولها در حضور مقادیر مختلف اسید پکتیک و بروموکریپتین توسط تست MTT بررسی شد. سپس با استفاده از رنگ آمیزی آکریدین ارنج (AO) و اتیدیوم برماید (EB) تغییرات هسته سلولها مورد بررسی قرار گرفت. همچنین با استفاده از روش فلوسایتومتری و تست TUNEL میزان آپوپتوز در سلولها مشخص گردید. آزمایشها نشان دادند که در حضور مقادیر مختلف اسید پکتیک درصد زیستایی سلولها بطور معنا داری کاهش می یابد و رنگ آمیزی AO/EB و تست TUNEL نشان داد که انکوباسیون ۲٤ ساعته اسید پکتیک در یک حالت وابسته به دوز از غلظت ۲۵۰ µg/ml تا غلظت ۱ mg/ml سبب القای آپوپتوز در این سلولها می شود. همچنین نتایج رنگ آمیزی فلورسنت مشخص نمود که اسید پکتیک با غلظتهای بالا (۱ mg/ml تا ۵ mg/ml) سبب ایجاد نکروز می شود ($p<0.001$).

واژه های کلیدی: پکتین ، آپوپتوز، سلول GH3/B6 ،هیپوفیز

* نویسنده مسئول، تلفن تماس: ٦۱۱۱۲٦۲٦، پست الکترونیک: hsepehri@khayam.ut.ac.ir

مقدمه

آپوپتوز فرآیندی فیزیولوژیکی است که موجب کنترل تعداد سلولها در بافتها و اندامها می گردد. هر سلول به طور ژنتیکی دارای عواملی است که می تواند آن را به طرف مرگ برنامه ریزی شده هدایت کند. آپوپتوز تمایز سلولی و پاسخهای ایمنی را نیز تنظیم می کند. عوامل خارج سلولی نظیر استرسهای مختلف سلولی و غیره مسیر های مختلف آپوپتوز را فعال می کنند (٦). در طی روند آپوپتوز سلول چروکیده شده و از سلولهای مجاور جدا می شود، سپس هسته قطعه قطعه و اندامکها در وزیکول های غشایی بسته بندی و در نهایت توسط سلولهای اطراف فاگوسیته می شود، بنابراین در فرآیند آپوپتوز التهاب رخ نمی دهد که همین عامل یکی از تفاوتهای آپوپتوز با نکروز می باشد

www.SID.ir

Archive of SID

(٦). پکتین خانواده ای از پلی ساکارید های پیچیده می باشد که در گیاهان به عنوان ماده نگه دارنده شبکه سلولوزی عمل می کند. ساختمان پکتین حاوی حداقل ٦٥ درصد گالاکتورونیک اسید، سه دومین ساختاری هوموگالاکترونان، رامنوگالاکترونان I و II می باشد. مشخص شده که پکتین قادر به کاهش گلوکز و کلسترول سرم خون می باشند (۱۹). استفاده از پکتین در درمان برخی سرطانها به ویژه سرطان پروستات و کولون مشخص شده است (۵ و۱۳). مطالعات نشان می دهند که خاصیت درمانی پکتین در موارد سرطانی به دلیل مهار متاستاز، القای آپوپتوز در سلولهای سرطانی و در مواردی نیز مهار رگزایی در تومور اولیه می باشد (۱۱).

در مطالعات انجام شده روی عصاره گیاهان شیرزا مشخص شده که بخش فعال این گیاهان را دو پلی ساکارید به نامهای اسید پکتیک و β-گلوکان تشکیل می دهند (١٦و١٧). به منظور بررسی اثر تحریکی این مواد برسنتز و ترشح پرولاکتین، سلولهای GH3/B6 به عنوان یک ابزار مناسب در مطالعه اندوکرینولوژی در سطح سلولی استفاده می شوند. سلولهای GH3/B6 یک زیر کلون مشتق از تومور هیپوفیزی MtT/w5 می باشند که ویژگیهای مشترک زیادی با سلولهای لاکتوتروپ و سوماتو لاکتوتروپ طبیعی دارند و بنابراین مدل مناسبی برای مطالعه تنظیم عملکرد سلولهای مترشحه پرولاکتین هستند (٤). بررسی اثر اسید پکتیک بر دودمان سلولی هیپوفیزی GH3/B6 نشان دهنده تحریک ترشح پرولاکتین در انکوباسیون کوتاه مدت به وسیله این پلی ساکارید بوده است (۱)، اما در انکوباسیون طولانی مدت کاهش ترشح پایه پرولاکتین در مقایسه با نمونه های کنترل مشاهده گردیده است (۱۸). از طرف دیگر پژوهشهای اخیر نشان می دهند که پکتین ها اثر ضد متاستازی در سلولهای سرطانی داشته و نیز سبب القای آپوپتوز در سلولهای توموری و سرطانی در محیطهای *vivo in* و *in vitro* می گردد (۵، ۸، ١٤ و ١٥)، لذا درمطالعه حاضر اثر آپوپتوزی اسید پکتیک (گالاکتورونیک اسید) که پکتین سیب می باشد، روی سلولهای GH3/B6 مورد بررسی قرار گرفته است.

مواد و روشها

کشت سلول: سلولهای GH3/B6 (اهدایی از طرف مؤسسه INRA) در محیط Ham's F12 (Gibco، آمریکا) غنی شده با ۱۵ درصد سرم اسب و ۲/۵ درصد سرم جنین گاو (Hi Media، هند) کشت داده شدند. زمان پیش انکوباسیون برای سلولها سه روز در نظر گرفته شد، سپس سلولها با غلظتهای مختلف اسید پکتیک (mg/ml ۵، ۲/۵، ۱ و ۷۵۰ µg/ml، ۵۰۰، ۲۵۰، ۱۰۰) در زمانهای ٦ ، ٢٤ و ٤٨ ساعت تحت تیمار قرار گرفتند. برای اثر دادن اسید پکتیک (Fluka، آمریکا)، این ماده در محیط کشت کامل حل شده و برای استریل شدن آن از فیلتر با منافذ ۰/۲ nm استفاده شد. از بروموکریپتین (Sigma Aldrich، آمریکا) با غلظت ۳۵ µm به عنوان کنترل مثبت جهت القای آپوپتوز در این سلولها استفاده گردید (۹).

سنجش میزان بقای سلولی: رنگ MTT (Sigma Aldrich، آمریکا) در سلولهای زنده به بلور های فورمازان تغییر پیدا می کند که میزان فورمازان تولید شده نشانگر تعداد سلولهای زنده می باشد. در ابتدا تعداد 10^4 سلول در هر خانه از ظروف کشت ٩٦ خانه ای کشت داده شدند و به مدت ۳ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد با مقدار ۰/۵ mg/ml از این رنگ انکوبه شدند. سپس محیط رویی سلولها خارج شده و برای حل شدن بلورها ۱۰۰ ul دی متیل سولفو اکساید (DMSO) به هر خانه اضافه شد و جذب آنها در طول موج ۵۷۰ nm توسط دستگاه الایزا ریدر خوانده شد (۳).

بررسیهای میکروسکوپ فلورسنت: برای رنگ آمیزی هسته سلولها از رنگهای فلورسنت اتیدیوم برماید(EB) و اکریدین ارنج (AO) استفاده گردید. AO (Sigma) به تمامی سلولها (مرده یا زنده) نفوذ کرده و هسته آنها را سبز

www.SID.ir

Archive of SID

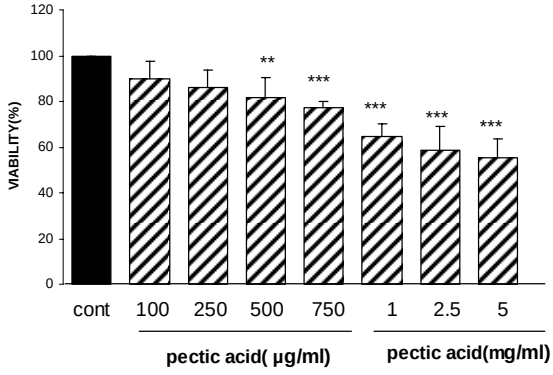
می کند. EB فقط به سلولهایی که استحکام غشای خود را از دست داده باشند جذب شده و هسته را قرمز می کند. سلولهایی با هسته یکنواخت و رنگ سبز، سلولهای زنده هستند، در حالی که سلولهایی با هسته سبز رنگ و قطعه قطعه شده نمایانگر آپوپتوز اولیه می باشند. سلولهایی که در مرحله آپوپتوز ثانویه هستند دارای هسته قطعه قطعه شده و نارنجی رنگ بوده و اگر هسته به صورت یکنواخت، به رنگ نارنجی باشد نشان دهنده نکروز در آنها است (۲۰).

تست TUNEL: سلولهای تیمار شده و سلولهای کنترل بعد از ۲٤ ساعت انکوباسیون جدا شده و۳ بار با PBS شستشو داده شدند، سپس به مدت یک ساعت در محلول ٤ درصد پارافرمالدئید دردمای اتاق انکوبه شدند به منظور نفوذپذیری، سلولها به مدت ۲ دقیقه در محلول Triton x-100 قرار گرفتند. پس از آن محلول واکنش TUNEL (Roche Diagnostics، آلمان) به سلولها اضافه شده و به مدت یک ساعت در دمای ۳۷ درجه ودر تاریکی انکوبه شدند. در این روش آنزیم Terminal deoxynucleotidyl transferase موجود در محلول، باعث اتصال نوکلئوتیدهای متصل به فلورسئین به انتهای آزاد DNA شکسته شده (که از مشخصه های سلول آپوپتوتیک می باشد) می گردد و آن را نشاندار می کند. سپس 10^4 سلول در هر نمونه توسط دستگاه فلوسایتومتری (FACS Calibur) در انستیتو پاستور شمارش گردید.

آنالیز آماری: آنالیزهای آماری با استفاده از نرم افزار INSTAT و تست پارامتریک ANOVA یک طرفه انجام شده است. $P \leq ۰/۰۵$ معنی دار در نظر گرفته شده و نتایج به صورت میانگین ± SEM نشان داده شده است.

نتایج

کاهش بقای سلولهای تیمار شده با اسید پکتیک: نتایج تست MTT نشان داد که در انکوباسیون ٦ ساعته تحت اثر اسید پکتیک، درصد بقای سلولها در مقایسه با گروه کنترل کاهش معنی داری نشان نمی دهد در حالی که انکوباسیون ۲٤ و ٤٨ ساعته نشان دهنده کاهش معنی دار بقای سلولهای تیمار شده با افزایش غلظت اسید پکتیک بود (شکل ۱). از آنجایی که بقای سلولهای تحت تیمار ٤٨ ساعت تفاوت معنا داری با تیمار ۲٤ ساعت نشان نداد، لذا مدت زمان ۲٤ ساعت انکوباسیون زمان بهینه برای مشاهده اثر اسید پکتیک در این سلولها در نظر گرفته شد. در هر آزمایش ٤ تکرار از هر نمونه انجام و هر آزمایش ۳ بار تکرار گردید. میزان درصد بقا توسط فرمول زیر محاسبه و نمودار بقای سلولها با استفاده از نرم افزار Excell ترسیم شد.



شکل۱- درصد بقای سلولهای $GH3/B_6$ پس از ۲٤ ساعت تیمار در غلظت های متفاوت اسید پکتیک. اسید پکتیک از غلظت ۵۰۰µg/ml سبب کاهش معنا دار بقای سلولها در مقایسه با گروه کنترل میشود ($p<0.001$ = *** و $n=3$).

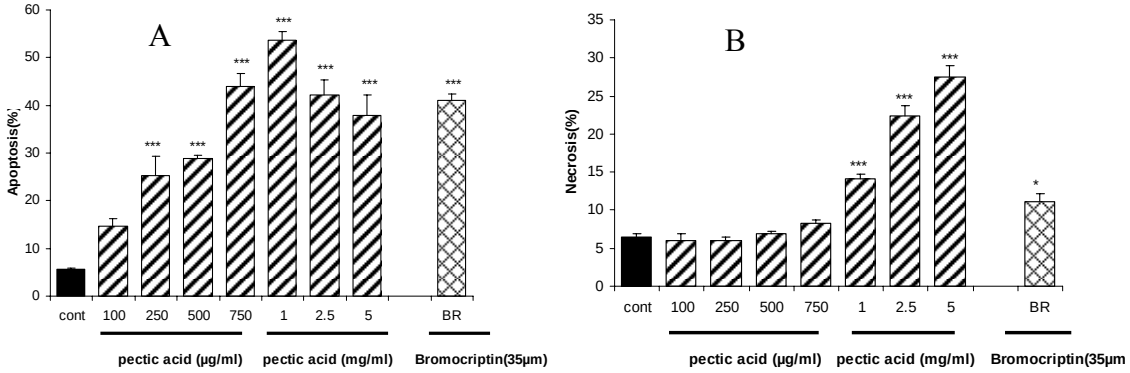
درصد بقا = میانگین جذب نمونه های تیمار شده / میانگین جذب نمونه های کنترل ×۱۰۰

بررسی آپوپتوز و نکروز: در بررسیهای میکروسکوپی با رنگهای فلورسنت AO/EB تعداد سلولهای آپوپتوتیک و نکروتیک و نیز تعداد کل سلولها (حداقل ۳۰۰ سلول) به طور تصادفی در زمینه های مختلف شمارش و هر آزمایش ۳ بار تکرار شد. همان طور که در شکل 2B مشخص است بیشترین درصد آپوپتوز در گروه تیمار شده با اسید پکتیک ۱ mg/ml حاصل گردید که برابر با ۱/۸۲ ± ۵۳/۷ درصد

www.SID.ir

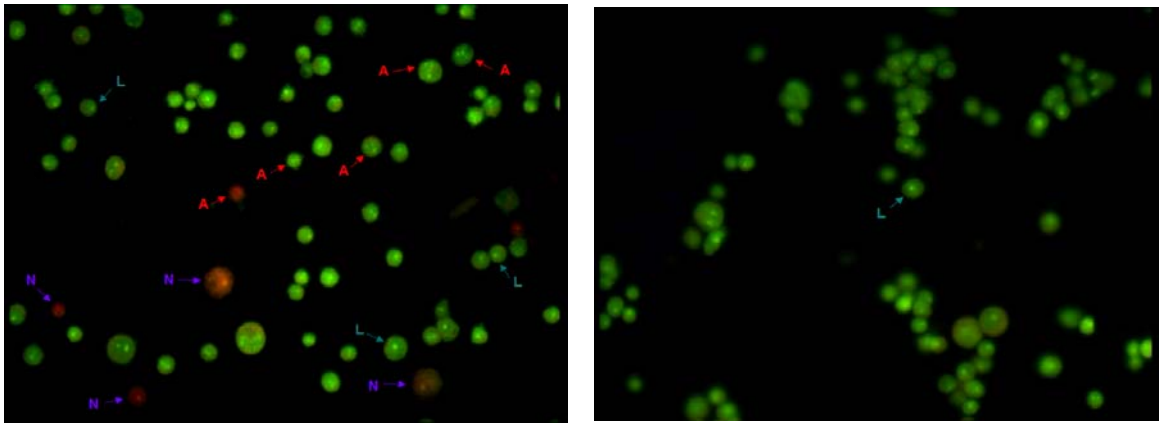
Archive of SID

است ($p < 0.001$). این مقدار در گروه تیمار شده با بروموکریپتین برابر با ۱/۳۳ ± ٤۱/٤۷ درصد ($p < 0.001$) بود. غلظتهای ۱۰۰ µg/ml تا ۵۰۰ µg/ml تأثیری روی ایجاد نکروز در این سلولها نداشت. اما بیشترین درصد نکروز در گروه تیمار شده با اسید پکتیک ۵ mg/ml مشاهده شد که برابر با ۱/٤۹ ± ۲۷/٤۷ درصد می باشد ($p < 0.001$)، (شکل 2A).



شکل۲- A- درصد سلولهای نکروز شده با رنگ امیزی اتیدیوم برماید و اکریدین اورنج. از غلظت mg/ml ۱ اسید پکتیک درصد نکروز به شکل معنا داری در مقایسه با کنترل افزایش می یابد ($p<0.001$ = *** و $p<0.05$ = * و $n=3$).

B- درصد سلولهای آپوپتوز شده با رنگ امیزی اتیدیوم برماید و اکریدین اورنج. افزایش معنی دار آپوپتوز در مقایسه با گروه کنترل در غلظتهای بالاتر از ۲۵۰µg/ml اسید پکتیک مشاهده میشود ($p<0.001$ = *** و $n=3$).



کنترل اسید پکتیک 1mg/ml

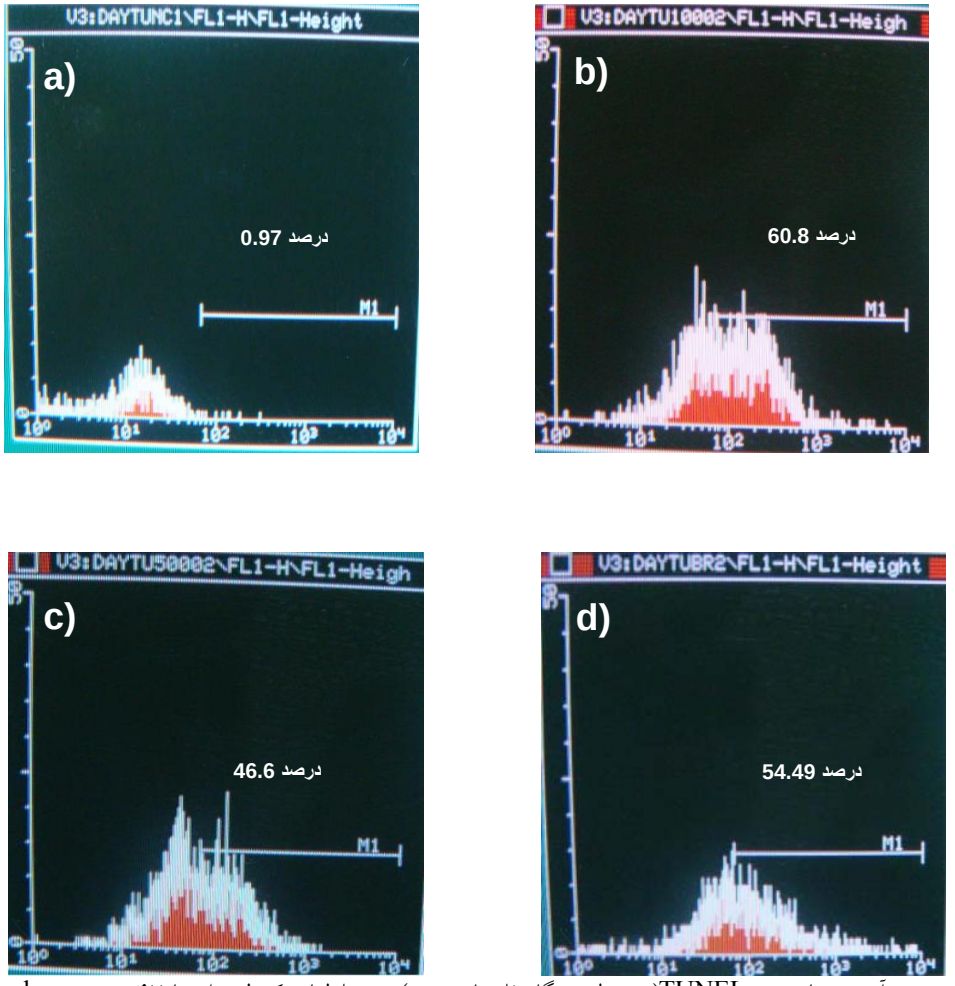
شکل ۳- بررسی آپوپتوز و نکروز به وسیله رنگهای فلورسانت AP/EB با بزرگنمایی ٤۰. L نشان دهنده سلولهای زنده، N سلولهای نکروتیک و A سلولهای آپوپتوتیک می باشد.

تعیین میزان آپوپتوز با تست TUNEL: همان طور که در شکل ٤ مشاهده می شود درصد میزان آپوپتوز محاسبه شده توسط دستگاه در یک حالت وابسته به دوز تا غلظت mg/ml ۱ اسید پکتیک افزایش پیدا کرده است. درصد آپوپتوز در گروه µg/ml ۱۰۰ برابر با ۱۸/٤ درصد در گروه µg/ml ۲۵۰ برابر با ۳۵/۷ درصد در گروه ۷۵۰ برابر با ۵۱/۵ درصد و در غلظت mg/ml ۱ میزان آپوپتوز٦۰ درصد نسبت به نمونه شاهد افزایش یافته است. ولی در بیشترین غلظت اسیدپکتیک یعنی mg/ml ۵ کاهش درصد آپوپتوز نسبت به نمونه mg/ml ۱ مشاهده گردید به طوری که میزان آپوپتوز در غلظت mg/ml ۵ به ٤٦ درصد رسیده است. درصد آپوپتوز در نمونه تحت تیمار با

www.SID.ir

Archive of SID

بروموکریپتین ۳۵ میکرومولاربرابر با ٥٤/٥ درصد بود.



شکل ٤- a - درصد آپوپتوز با تست TUNEL(توسط دستگاه فلوسایتومتری) در سلولهای کنترل برابر با ۰/۹۷ درصد ، b- درصد آپوپتوز در سلولهای تحت تأثیر اسید پکتیک با غلظت mg/ml ۱ برابر با ٦۰/۸ درصد ، c- درصد آپوپتوز در سلولهای تحت تأثیر اسید پکتیک با غلظت mg/ml ٥ برابر با ٤٦/٦ درصد ، d – درصد آپوپتوز در سلولهای تحت تأثیر بروموکریپتین با غلظت µm ۳٥ برابر با ٥٤/٤۹ درصد می باشد

بحث

پکتین پلی ساکارید طبیعی گیاهی است که در دیواره سلولی گیاهان به وفور یافت می شود. مطالعات اخیر نشان می دهند که پکتین می تواند متاستاز سرطانی در سلولهای پروستات و کلون را مهار کند (٥ و۱۳). اکثر تحقیقات پیشین اثر پکتین تغییر یافته مرکبات را بر روی سلولهای سرطانی بررسی کرده اند(۱۰، ۱۱ و۱۳). اثرات مهاری پکتین در مهار متاستاز از طریق اتصال آن به گالکتین ۳ (لکتین متصل شونده به گالاکتوزید) صورت می گیرد (۷). گالکتین پروتئینهای متصل شونده به کربوهیدراتهای ویژه هستند که به وفور روی سطح سلولهای سرطانی وجود دارند. این پروتئینها دارای یک توالی حفاظت شده در دومین متصل شونده به کربوهیدرات خود هستند که تمایل زیادی به اتصال با بتا گالاکتوزیدها را دارند (۲ و ۷).

نتایج مطالعات اثر اسید پکتیک بر دودمان سلولی GH3/B6 مؤید این مطلب است که این ماده قادر به القای افزایش قدرت ترشحی این سلولها در زمانهای انکوباسیون کوتاه مدت (۳۰ دقیقه) می باشد (۱)، اما افزایش زمان انکوباسیون با تراکم بالای اسید پکتیک در این سلولها همراه با تغییرات مورفولوژیکی و نیز کاهش میزان ترشح

www.SID.ir

Archive of SID

پایه پرولاکتین می باشد (۱ و ۱۸)، لذا در مطالعه حاضر نقش اسید پکتیک به عنوان القا کننده مؤثر آپوپتوز روی سلولهای GH3/B6 مورد بررسی قرار گرفت.

نتایج به دست آمده از پژوهش حاضر نشان می دهد که غلظتهای بالای اسید پکتیک در زمانهای انکوباسیون ٢٤ و ٤٨ ساعت سبب کاهش معنی دار درصد سلولهای زنده شده و انکوباسیون کوتاه مدت (٦ ساعت) تغییر زیادی در میزان بقای سلولها ایجاد نمی کند. در مطالعه ای که روی سلولهای آدنوکارسینومای کولون HT29 صورت گرفته، کاهش بقای این سلولها پس از ٤٨ ساعت با پکتین مشاهده شده است (۱۲). بررسی وضعیت سلولها توسط رنگ آمیزی فلورسنت نشان می دهد که اسید پکتیک از غلظت ۲۵۰ µg/ml تا ۱ mg/ml در یک حالت وابسته به دوز سبب افزایش میزان آپوپتوز در مقایسه با گروه کنترل می گردد. به طوری که درصد آپوپتوز در غلظت ۱ mg/ml به بیشترین میزان خود می رسد. در رنگ آمیزی مشابه توسط رنگ فلورسانت در سلولهای سرطانی مالتیپل میلومای تیمار شده با پکتین، تعداد سلولها با هسته قطعه قطعه شده نسبت به گروه کنترل افزایش نشان می دهد. پکتین می تواند سبب افزایش درصد آپوپتوز در سلولهای مالتیپل میلومای مقاوم به شیمی درمانی گردد بدون آنکه کاهش معنی داری در بقای سلولهای عادی ایجاد کند (۳). پژوهشهای تازه نشان داده اند مصرف فیبرهای غذایی مانند پکتین میتواند القای آپوپتوز در سلولهای کولونوسیت موشی که سرطان کولون دارد را موجب گردد (۱۵). همچنین دیده شده است که تیمار سلولهای آدنوکارسینومای کولون HT29 با پکتین افزایش معنی دار فعالیت کاسپاز ۳ و میزان آپوپتوز را به همراه دارد (۱۲). برای تأیید اینکه مرگ ایجاد شده توسط اسید پکتیک بر روی سلولهای GH3/B6 از نوع آپوپتوز می باشد از تست TUNEL استفاده شد و نتایج به دست آمده کاملاً یافته های میکروسکوپ فلورسنت را تایید کرد و نشان داد که اسید پکتیک تا غلظت ۱ mg/ml سبب القای آپوپتوز در این سلولها می گردد. این نتایج نظیر نتایج اثر پکتین تغییر یافته روی سلولهای سرطانی پروستات انسان (LNCaP) می باشد که در این سلولها نیز غلظت mg/ml ۱ پکتین در مدت زمان ٤٨ ساعت سبب القای حداکثر آپوپتوز در آنها شده است (۸).

در بالاترین غلظتهای اسید پکتیک کاهش نسبی آپوپتوز مشاهده گردید. با توجه به نتایج رنگ آمیزی فلورسنت که در آن غلظتهای بالای اسیدپکتیک بیشترین میزان نکروز در سلولها را نشان می دادند، می توان گفت که در غلظت های بالای اسید پکتیک از جمعیت سلولهای آپوپتوتیک کاسته و به جمعیت سلولهای نکروتیک افزوده می شود. با توجه به نتایج به دست آمده در این مطالعه می توان نتیجه گرفت که کاهش میزان ترشح پایه پرولاکتین در سلولهای GH3/B6 پس از افزایش غلظت اسید پکتیک در انکوباسیون ٢٤ ساعت (۱)، در اثر مرگ این سلولها در نتیجه آپوپتوز و نکروز می باشد.

بروموکریپتین القا کننده آپوپتوز در سلولهای GH3/B6 است و در درمان تومورهای هیپوفیزی کاربرد دارد (۹). مطالعه حاضر نشان می دهد که میزان آپوپتوز سلولهایی که در mg/ml ۱ اسید پکتیک انکوبه شده اند به طور معناداری از بروموکریپتین بیشتر است ($p<0.05$). در نتیجه با در نظر داشتن این نکته که پکتینها موادی کاملاً طبیعی بوده و تا به حال هیچگونه عوارض جانبی در استفاده از آنها گزارش نشده است، با مطالعات بیشتر در این زمینه احتمال اینکه اسید پکتیک به عنوان یک جایگزین مواد شیمیایی در درمان تومورهای هیپوفیزی استفاده شود را می توان بررسی کرد.

منابع

۱- اسلیمی، دلارام. سپهری، حوری. گلیایی، بهرام. رسولی، یاسمن. خویی، سمیده. (۱۳۸۵). مقایسه اثر اسید پکتیک و هورمون آزاد

www.SID.ir

Archive of SID

کننده تیروتروپین بر میزان ترشح پرولاکتین توسط سلولهای GH3/B6 هیپوفیز موش صحرایی. مجله علوم دانشگاه تهران. ۳۲ (٤): ۳۵۹- ۳۵۵.

2- Barondes, SH., Cooper, DN., Gitt, MA. & Lefller, H. (1994). Galectins: structure and function of a large family of animal lectins. J Bio Chem. 269: 20807-20810.

3- Chauhan, D., Li, G., Podar, K., Hideshima, T., Neri, P., He, D., Mitsiades, N., Richardson, P., Chang, Y. & Schindler, J. (2005). A novel carbohydratebased therapeutic GCS-100 overcomes bortezomib resistance and enhances dexamethasone-induced apoptosis in multiple myeloma cells. Cancer Res. 65: 8350-8358.

4- Gourdji, D. & Tixier-Vidal, A. (1980). Prolactin secreting cell lines: a tool for the study of the mechanism of action of hypophysiotropic neuropeptides. J.Physiol. 76: 233-241.

5- Hayashi, A., Gillen, A.C. & Lott, J.R. (2000). Effects of Daily Oral Administration of Quercetin Chalcone and Modified Citrus Pectin on Implanted Colon-25 Tumor Growth in Balb-c Mice. Alternative Medicine Review. 5(6): 546-552.

6- Hengartner, M. (2000). The biochemistry of apoptosis Nature. 407: 770-76.

7- Inohara, H. & Raz, A. (1994). Effects of natural complex carbohydrates (citrus pectin) on murine melanoma cell properties related to galectin-3 functions. Glycoconjugate J. 11: 527-532.

8- Jackson, CL., Dreaden, TM., Theobald, LK., Tran, NM., Beal, TL., Eid, M., Gao, M., Shirley, RB., Stoffel, MT., Kumar, MV. & Mohnen, D. (2007). Pectin induces apoptosis in human prostate cancer cells: correlation of apoptotic function with pectin structure. Glycobiology. 17: 805-819.

9- Kanasaki, H., Fukunaga, K., Takahashi, K., Miyazaki, K. & Miyamoto, E. (2000). Involvement of p38 mitogen –activated protein kinase activation in bromocriptine- induced apoptosis in rat pituitary GH3 cells. Biology of Reproduction. 62: 1486-1494.

10- Kidd Parris, M. (1996). A New Approach to Metastatic Cancer Prevention: Modified Citrus Pectin (MCP), A Unique Pectin that Blocks Cell Surface Lectins. Alternative Medicine Review. 1 (1): 4-10.

11- Nangia-Makker, P., Hogan, V., Honjo, Y., Baccarini, S., Tait, L., Bresalier, R. & Raz, A. (2002). Inhibition of human cancer cell growth and metastasis in nude mice by oral intake of modified citrus pectin. J Natl Cancer Inst. 94: 1854-1862.

12- Olano-Martin, E., Rimbach, GH., Gibson, GR. & Rastall, RA. (2003). Pectin and pectic-oligosaccharides induce apoptosis in in vitro human colonic adenocarcinoma cells. Anticancer Res. 23: 341-346.

13- Pienta, KJ., Naik, H., Akhtar, A., Yamazaki, K., Replogle, TS. & Lehr, J. (1995). Inhibition of spontaneous metastasis in a rat prostate cancer model by oral administration of modified citrus pectin. J Natl Cancer Inst. 87: 348-53.

14- Platt, D. & Raz, A. (1992). Modulation of the lung clonization of B16-F1 melanoma cells by citrus pectin. J Natl Cancer Inst. 84: 438-442.

15- Sanders L., Henderson C., Hong M. & Barhoumi R. (2004). An Increase in Reactive Oxygen Species by Dietary Fish Oil Coupled with the Attenuation of Antioxidant Defenses by Dietary Pectin Enhances Rat Colonocyte Apoptosis. J Nutr. 134: 3233-3238.

16- Sawadogo, L., Houdebine, LM., Thibault, JF., Rouau, X. & Ollivier-Bousquet, M.(1988). Effect of pectic substances on prolactin and growth hormone secretion in the ewe and on the induction of casein synthesis in the rat. Reprod.Nutr. 28: 293-301.

17- Sepehri, H., Renard, C., and Houdebine, LM. (1990). Beta-glucan and pectin derivatives stimulate prolactin secretion from hypophysis in vitro. Proc.Soc.Exp.Biol.Med. 194: 193-197.

18- Sepehri, H., Zoraghi, R. and Haeri Rouhani, A. (2000). Effect of Pectic Acid and β-glucan on prolactin secretion by ovine pituitary explants. Iran.Int.J.Sci. 1: 99-109.

19- Willats, W., Knox, P. & Mikkelsen J. (2006) .Pectin: new insights into an old polymer are starting to gel. Trends in Food Science & Technology. 17: 97-104.

20- Zhang, JH., YU, J., Li, WX. & Cheng, CP. (1998). Evaluation of Mn2+ stimulated and Zn2+ inhibited apoptosis in rat corpus luteal cells by flow cytometry and fluorochromes staining. Chin J Physiol. 41(2): 121-6.

www.SID.ir

Archive of SID

Study of apoptosis and necrosis induced by pectic acid in GH3/B6 rat pituitary cell line

Attari F.[1], Sepehri H.[1], Ajdari S.[2], Goliaei B.[3], and Delphi L.[1]

[1]School of Biology, University College of Science, University of Tehran, Tehran, I.R. of IRAN

[2]Immunology Dept., Pasture Institute, Tehran, I.R. of IRAN

[3] Institute of Biochemistry and Biophysics, University of Tehran, Tehran, I.R. of IRAN

Abstract

Two distinct modes of cell death, apoptosis and necrosis can be distinguished based on differences in morphological, biochemical and molecular changes of dying cells. Apoptosis is the most common form of eukaryotic cell death. It is a physiological suicide mechanism that preserves homeostasis. It has been reported that dietary fibers such as pectins causes cell death either in vitro or in vivo. In this study the effects of the pectic acid (derived from apple) on the GH3/B6 cell death is investigated. Materials and methods: GH3/B6 cells were cultured in the Ham's F12 medium enriched with 15% horse serum and 2.5% fetal bovine serum for 3 days. Then they were treated by various amounts of pectic acid in different periods (6, 24, 48 hours). Previous studies showed that bromocriptine is one of the apoptotic agents in these cells, so it was used as positive control. The cell viability was detected by MTT exclusive test. The nuclear morphology of cells was explored by florescent stains including Acridine Orange /Ethidium Bromide (AO/EB). In addition, percentage of necrotic and apoptotic cells were studied with TUNEL kit. MTT test has shown that different concentration of pectic acid in 24 h decreased GH3/B6 cells viability in a dose dependant manner. Furthermore, florescent staining and TUNEL test showed that pectic acid concentration from 100µg/ml up to 1mg/ml concentration can induce apoptosis in a dose dependent manner and in the higher concentration such as 2.5 mg/ml and 5 mg/ml can induce necrosis in these cells ($p<0.001$). According to our results it seems that pectic acid causes apoptosis and necrosis in GH3/B6 cells.

Keywords: pectin, Apoptosis, GH3/B6 cells, nectosis.

www.SID.ir