Archive of SID

تأثیر تراکمهای مختلف β- گلوکان برسنتز پرولاکتین در یاخته های GH3/B6 و بررسی گیرنده β- گلوکان در این یاخته ها

فاطمه شاعرزاده[۱]، حوری سپهری[۱*]، قمرتاج حسین[۱]، بهرام گلیایی[۲]، لادن دلفی[۱] و یاسمن رسولی[۱]

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

[۲] تهران، دانشگاه تهران، مرکز تحقیقات بیوفیزیک- بیوشیمی

تاریخ دریافت: ۸۶/۶/۲۶ تاریخ پذیرش: ۸۸/۱۱/۱۴

چکیده

پرولاکتین هورمونی پلی پپتیدی است که از هیپوفیز پیشین ترشح می شود و عملکرد اصلی آن، تحریک سنتز شیر(لاکتاسیون) است. اخیراً نقش پرولاکتین در سیستم ایمنی توجه پژوهشگران را به خود جلب کرده است. در بخش اول این مطالعه، اثر β- گلوکان بر سنتز پرولاکتین بررسی شده است . نقش β- گلوکان که یک پلیمر گلوکز است در تحریک سیستم ایمنی نیز در مطالعات متعددی گزارش شده است. در این بررسی از سلولهای GH3/B6 که هورمونهای پرولاکتین و رشد را سنتز و ترشح می کنند استفاده گردیده است. در بخش دوم، هدف شناسایی گیرنده این پلی ساکاریدها، دکتین-۱، در این سلولها بوده است. گیرنده دکتین-۱ در انواع مختلفی از سلولهای ایمنی و غیر ایمنی بیان می شود. مقدار پرولاکتین داخل سلولی با استفاده از لیز سلولها و توسط کیت الیزا سنجیده شد. سلولها با غلظتهای ۵، ۱۵۰ و۲۵۰ میکروگرم بر میلی لیتر β- گلوکان به مدت ۴۸ ساعت تیمار شدند. از TRH (۵۰نانومولار) به عنوان کنترل مثبت و دکستران (۱۵۰ میکروگرم بر میلی لیتر) به عنوان کنترل منفی استفاده گردید. به منظور شناسایی گیرنده، RNA سلولهای GH3/B6 تحت تأثیر محرک و بدون محرک استخراج شد. از بافت طحال که بیان این گیرنده در آن گزارش شده است به عنوان بافت کنترل استفاده گردید. بیان گیرنده دکتین-۱ در این سلولها با استفاده از روش RT-PCR و PCR مطالعه شد. نتایج به دست آمده نشانگر آن است که غلظتهای ۱۵۰و ۲۵۰ میکروگرم بر میلی لیتر β- گلوکان میزان پرولاکتین داخل سلولی را به طور معنی داری نسبت به نمونه کنترل افزایش می دهند($P<0/001$ و$P<0/05$). نتایج حاصل همچنین نشان می دهند که β- گلوکان از طریق گیرنده اختصاصی خود، دکتین-۱ اثر تحریکی خود را بر سلولهای GH3/B6 اعمال می کند به گونه ای که بیان این گیرنده در حضور β- گلوکان به میزان چشمگیری افزایش می یابد .

واژه های کلیدی: سلولهای GH3/B6، پرولاکتین، β - گلوکان، دکتین-۱

*نویسندهٔ مسئول، تلفن تماس: ۶۱۱۱۲۶۲۶ ، پست الکترونیکی: hsepehri@khayam.ut.ac.ir

مقدمه

پرولاکتین هورمونی پلی پپتیدی است که نزدیک به ۸۰ سال از زمان شناسایی آن می گذرد. این هورمون در انسان از ۱۹۹ و در موش صحرایی از ۱۹۷ اسیدآمینه تشکیل شده است. ژن کد کننده پرولاکتین به صورت منفرد بر روی کروموزوم شماره ۶ قرار گرفته است (۹). در ابتدا هورمون پرولاکتین بر اساس خصوصیات لاکتوژنیک و تحریک رشد غدد پستانی خرگوش شناسایی گردید (نامگذاری بر این اساس بوده است). پس از آن اعمال و اثرات متنوعی در رابطه با این هورمون شناسایی گردید به طوری که امروزه مجموع اعمال بیولوژیک پرولاکتین به بیش از ۳۰۰ عملکرد مختلف می رسد که در ۶ گروه شامل : تنظیم تعادل آب و الکترولیتها، رشد ونمو، اندوکرین و

www.SID.ir

Archive of SID

متابولیسم، رفتار و مغز، تولید مثل و تنظیم ایمنی و محافظت طبقه بندی می شود (۱۱).

بررسیهای انجام گرفته در سالهای اخیر عملکرد این هورمون در سیستم ایمنی را نشان می دهند، به طوری که پرولاکتین پاسخهای ایمنی مختلف را با اثر بر سلولهای سیستم ایمنی نظیر سلولهای T، سلولهای B، سلولهای کشنده طبیعی (NK) ،ماکروفاژها، نوتروفیلها، سلولهای هماتوپویتیک $CD34^+$ و سلولهای دندریتیک ارائه دهنده آنتی ژن میانجی گری می کند. افزایش ترشح این هورمون در اغلب بیماریهای خودایمن از جمله SLE (لوپوس سیستمیک)، MS(مالتیپل اسکلروزیس) و روماتوئید آرتریت گزارش شده است (۱۸). همچنین پرولاکتین و استروژن دو فاکتور مهم حفاظتی در مقابل التهاب به شمار می روند (۸).

سلولهای لاکتوتروف موجود در هیپوفیز پیشین مهمترین منشأ سنتز هورمون پرولاکتین می باشند، اما این هورمون در نواحی دیگربدن نظیر هیپوتالاموس مغز، دسیدوآ، میومتریوم رحم، جفت، سلولهای اپیتلیالی غدد پستانی، طحال، تیموس و لنفوسیتها نیز ساخته می شود(۶).

عوامل متعددی ترشح پرولاکتین در سلولهای لاکتوتروف را متأثر می کنند که از جمله این موارد β- گلوکان می باشد (۱۳،۱۴). گلوکانها ترکیبات اصلی دیواره سلولی قارچها، گیاهان و برخی باکتریها را تشکیل می دهند. این پلیمرهای قندی علاوه بر تنظیم فعالیت ایمنی قادر به فعال کردن ماکروفاژها و نوتروفیلها و تحریک تولید سیتوکاینهای التهابی را از طریق فعال کردن NF-κB (یک فاکتور هسته ای) می باشند. حضور β-گلوکان برای ایجاد پاسخهای میزبان در مقابل طیف وسیعی از شرایط شامل نمو تومورها، عفونتهای قارچی، ویروسی، باکتریایی و پاتوژنهای پروتوزوآیی الزامی است (۳).

چهار گیرنده برای این پلی ساکاریدها شناسایی شده است: گیرنده کمپلمان نوع۳ یا CR3 که اولین گیرنده اختصاصی شناسایی شده است (۱۷)، دکتین-۱ (۴) ،لاکتوزیل سرامید (۲۰)و گیرنده های زباله خوار (۱۰). از میان این چهار گیرنده، گیرنده دکتین-۱ دارای بیان وسیع در بافتهای مختلف می باشد.

دکتین-۱ یک پروتئین ۲۸ کیلو دالتونی می باشد که به گیرنده‌های غشائی نوع۲ تعلق دارد. در ساختار این گیرنده یک ناحیه سیتوپلاسمی شامل(یک موتیف فعال شونده توسط تیروزین گیرنده های ایمنی)، یک ناحیه تراغشائی، یک پایه و یک دمین شبیه لکتینی نوع C که احتمالاً حاوی دو محل اتصال برای گلیکوزیلاسیون نوع N می باشد وجود دارد. ناحیه لکتینی دکتین-۱ فاقد توالی لازم برای همکاری با کلسیم است. این ساختار به طور طبیعی، جهت اتصال کربوهیدراتها در لکتینهای نوع C ضروری می باشد. علی رغم شباهتهای ساختاری زیاد میان دکتین-۱ و لکتینهای نوع C ، عملکرد آنها کاملاً متفاوت است. دکتین-۱ که متعلق به خانواده گیرنده های شناساگر الگوست، گلوکان های با اتصالات β(۱→۶) و β(۱→۳) را از هر منبعی شناسایی می کند (۷).

دو گروه عمده دودمان سلولی ترشح کننده هورمونهای هیپوفیزی در موش وجود دارد یکی گروه سلولهای GH در موش صحرایی که هورمونهای رشد و پرولاکتین را به نسبتهای مختلف ترشح می کنند و گروه دوم سلولهای ACT20/D16 موش سوری که هورمونهای پرواپیوملانوکورتین راترشح می کنند. تاشجیان در سال ۱۹۷۰ سه کلون از سلولهای GH را معرفی کرد GH1، GH2C1 و GH3 . از هر یک از این کلونها چندین زیر کلون تهیه شده است (۱۵). در این مطالعه، سلولهای GH3/B6 یک زیر کلون که هورمون پرولاکتین و هورمون رشد را به نسبت ۵ به ۱ ترشح می کند مورد استفاده قرار گرفته است و اثر غلظتهای مختلف β-گلوکان بر سنتز پرولاکتین و تأثیر آن بر بیان گیرنده دکتین-۱ مورد بررسی قرار گرفته است.

www.SID.ir

Archive of SID

مواد و روشها

سلولهای GH3/B6، در محیط کشت Ham's F12 (Gibco) حاوی ۱۵درصد سرم اسب (HIMEDIA) و ۲/۵ درصد سرم جنین گوساله (HIMEDIA) غیر فعال در شرایط اتمسفری مناسب شامل رطوبت۹۵ درصد، درجه حرارت ۳۷ درجه سانتی گراد و ۵ درصد Co_2 کشت داده شدند. این سلولها در این شرایط به صورت تک لایه به سطح فلاسک می چسبند وتکثیر می یابند.

β-گلوکان (Sigma) مورد استفاده از دانه جو استخراج شده است. محلول ۱ درصد β-گلوکان در ۹۰ میلی لیترآب مقطر و ۶ میلی لیتر اتانل ۹۶ درصد تهیه گردید و سپس محلول حاصل به دمای ۱۰۰ درجه سانتی گراد رسانده شد به طوری که β-گلوکان در آن حل شد. محلول حاصل در دمای اتاق سرد و به حجم ۱۰۰ میلی لیتر رسانده شد. غلظتهای ۵، ۱۵۰ و ۲۵۰ میکروگرم برمیلی لیتر β-گلوکان در این بررسی مورد استفاده قرار گرفت.

تعداد ۱×۱۰^{۶} سلول در ۱/۵ میلی لیتر محیط کشت کامل به مدت ۲۴ ساعت(زمان پیش انکوباسیون) کشت داده شد به طوری که سلولها به صورت یک لایه به کف ظرف می چسبند. انکوباسیون سلولها در زمان ۴۸ و به صورت زیر انجام گرفت:

۱- نمونه شاهد(کنترل): در این نمونه، سلولها فقط در محیط کشت کامل قرار داده شدند.

۲- نمونه کنترل مثبت: سلولها در محیط کشت حاوی هورمون رها کننده تیروتروپین(TRH) با غلظت ۵۰ نانومولار قرار گرفتند. این هورمون اثر تحریکی بر ترشح هورمون پرولاکتین دارد(۵).

۳- نمونه کنترل منفی: سلولها در محیط کشت حاوی دکستران (یک پلیمر قندی) با غلظت ۱۵۰ میکروگرم بر میلی لیتر قرار گرفتند.

۴- نمونه های مورد آزمایش: سلولها در محیطهای کشت حاوی غلظتهای مختلف ۵، ۱۵۰ و ۲۵۰ میکروگرم برمیلی لیتر β-گلوکان قرار گرفتند.

پس از پایان زمان انکوباسیون، سلولها با استفاده از تریپسین جدا وپس از شمارش و تعیین درصد زیستایی، با محلول PBS شسته و با استفاده از بافر لیز کننده لیز شدند و در دمای ۷۰- درجه سانتی گراد نگهداری شدند. برای تعیین درصد زیستایی، سلولها توسط رنگ تریپان بلو (Trypan Blue) به نسبت ۱ به ۹ رنگ آمیزی شدند و با توجه به نفوذ این رنگ در سلولهای مرده، درصد سلولهای زنده با استفاده از لام توما محاسبه گردید. بافر لیزکننده، شامل کلرید منیزیم۱/۵ میلی مولار، کلرید کلسیم ۰/۱۴ مولار و Tris-HCl ۱۰ میکرومولار و PMSF (فنیل متان سولفونید فلوراید) که در زمان مصرف به آن اضافه می گردد، می باشد.

برای سنجش مقدار پرولاکتین داخل سلولی از کیت ELISA(MD Biosciences) استفاده گردید. اساس سنجش در این کیت رقابت بین پرولاکتین موش نشان دار نشده(پرولاکتین آزاد) و استیل کولین استراز(AchE) متصل به پرولاکتین موش (ردیاب) است. دیواره چاهکها با آنتی بادی مونوکلونال ضد خرگوش تولید شده در موش پوشیده شده است. پرولاکتین آزاد و پرولاکتین ردیاب تمایل به اتصال با این آنتی بادی را دارند. معرف المان (Ellman's Reagent) یک ماده آنزیماتیک کروموژن برای استیل کولین استراز است که با استیل کولین استراز ترکیب زرد رنگی را تولید می کند. شدت رنگ مناسب با مقدار AchE متصل شده به دیواره چاهک یا مقدار پرولاکتین آزاد موش است. چاهکها با محلول شستشو، شسته شدند و به آنها محلولهای استاندارد و نمونه های تست، همراه با بافر ELISA، ردیاب و آنتی سرم اضافه و به مدت یک شب در دمای اتاق انکوبه شدند. پس از ۲۰-۱۶ ساعت محلول رویی خارج و چاهکها شستشو داده شدند. سپس معرف

www.SID.ir

Archive of SID

المان در اتاق تاریک به چاهکها اضافه و پس از مدت ۱/۵ ساعت، با استفاده از دستگاه ELISA reader جذب نمونه ها خوانده شد. نتایج حاصل توسط تست آماری ANOVA یک طرفه آنالیز شدند.

دربخش دوم مطالعه، بیان گیرنده دکتین-۱ در این سلولها بررسی شد. به این منظور از طحال موش صحرایی که حاوی مقادیر بالای سلولهای دندریتیک بیان کننده گیرنده دکتین-۱ است به عنوان کنترل مثبت استفاده گردید. توالی پرایمرهای مورد استفاده بر اساس توالی ژنی پیش بینی شده دکتین-۱ در موش صحرایی موجود در سایت NCBI و تشابه ژنوم موش صحرایی و موش سوری به صورت زیر طراحی شد:

Dectin Forward Primer: 5' GGA TGG ATC AGC ATT TAC CC 3'

Dectin Reverse Primer: 5' TCT GCA TCC AAC TTC TCA GC 3'

ابتدا RNA طحال، سلولهای GH3/B6 و سلولهای GH3/B6 تحت تأثیر β- گلوکان با غلظت ۲۵۰ میکروگرم بر میلی لیتر (بالاترین دُز مؤثر β- گلوکان) استخراج و صحت RNA بر روی ژل ۰/۸ درصد آگارز مشاهده گردید (۱ میکروگرم RNA برروی ژل برده شد). با استفاده از کیت RT-PCR (ژن فن آوران) cDNA آن ساخته شد. به این صورت که RNA به مدت ۵ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد در دستگاه ترموسایکلر انکوبه شد. در مرحله بعد، به منظور اتصال پرایمر به RNA، میکروتیوپها به مدت ۱ ساعت در ۴۲ درجه سانتی گراد ودر مرحله آخر ۵ دقیقه در ۹۵ درجه سانتی گراد قرار گرفتند.

برای انجام PCR ، ۱µl از محصول RT-PCR با آب، بافر PCR، $MgCl_2$، dNTP، آنزیم Taq پلی مراز، پرایمرها، BSA و DMSO مخلوط شد و سپس در دستگاه ترموسایکلر مطابق برنامه زیر قرار گرفت. برنامه PCR شامل مراحل: دناتوره اولیه در دمای ۹۴ درجه سانتی گراد به مدت ۵ دقیقه و سپس ۴۰ سیکل به ترتیب با دمای دناتوره ۹۴ درجه سانتی گراد به مدت ۱ دقیقه و دمای چسبیدن ۵۶ درجه سانتی گراد به مدت ۱ دقیقه و دمای تکثیر ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۱ دقیقه و در انتها، تکثیر نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۱۰ دقیقه است. از RNA ریبوزومی 18S به عنوان کنترل داخلی استفاده شد (۱۶).

cDNA حاصل بر روی ژل پلی آکریل آمید ۱۰ درصد قرار گرفت به طوری که ۱۰میکرولیتر از cDNA با ۲ میکرولیتر بافر راهنما مخلوط و در چاهکها ریخته شد و پس از انجام الکتروفورز، ژل توسط نیترات نقره به صورت زیر رنگ آمیزی شد:

۱- به ۰.۱ گرم نیترات نقره ۵۰۰ میلی لیتر اسید نیتریک و ۱۲.۵ میلی لیتر اتانل اضافه کرده و با آب مقطر حجم آن به ۵۰ میلی لیتر رسید. ژل به مدت ۱۰ دقیقه در این محلول روی شیکر قرار گرفت.

۲- پس از این مدت، ژل به مدت سه دقیقه در آب مقطر گذاشته شد.

۳- به محلول کربنات سدیم ۱۰۰ میلی لیتر فرمالدئید در آخرین مرحله اضافه شد. ژل تا ظهور باندها در این محلول قرار داشت.

۴- پس از ظهور باندها، ژل به مدت دو دقیقه در محلول فیکساتیو(۵ میلی لیتر اسید استیک + ۴۵ میلی لیتر آب) تثبیت گردید.

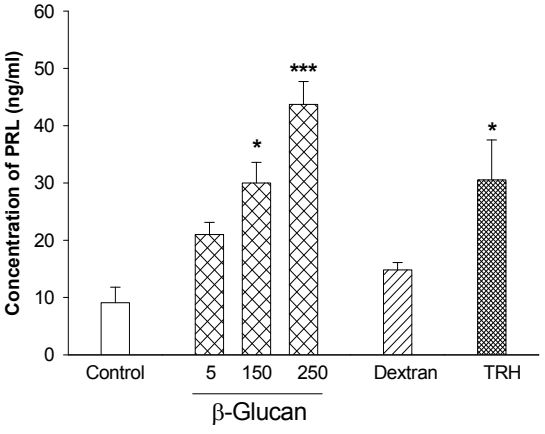
نتایج

β-گلوکان باعث افزایش سنتز پرولاکتین در سلولهای GH3/B6 می شود: به منظور تعیین مقدار پرولاکتین داخل سلولی، ابتدا بر اساس جذبهای حاصل از نمونه های استاندارد و غلظت آنها، منحنی استاندارد رسم گردید. سپس با استفاده از این منحنی، غلظت پرولاکتین در نمونه های مورد آزمایش مشخص گردید. غلظتهای به دست آمده نشان می دهد که مقدار پرولاکتین درون سلولی سلولهای

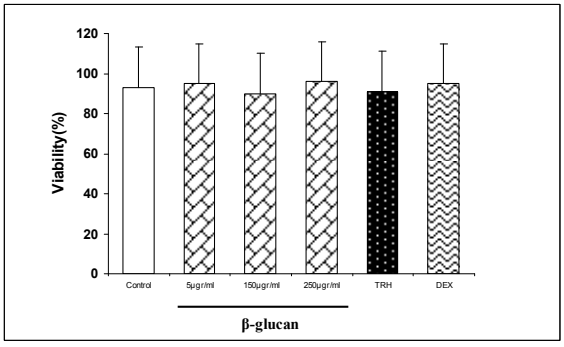
www.SID.ir

Archive of SID

GH3/B6 تحت تأثیر غلظتهای مختلف β-گلوکان نسبت به نمونه های کنترل یعنی نمونه های فاقد هر نوع ماده محرک، تغییر می کند. در این سلولها، مقدار پرولاکتین پس از ۴۸ ساعت در غلظتهای ۱۵۰و ۲۵۰ میکروگرم بر میلی لیتر β-گلوکان به طور معنی داری نسبت به نمونه شاهد افزایش داشت(P<0/001 وP<0/05). افزایش میزان پرولاکتین در نمونه های حاوی غلظت ۱۵۰ میکروگرم بر میلی لیتر β-گلوکان قابل مقایسه با نمونه های تحت تأثیر TRH (نمونه های کنترل مثبت) است (P<0/05) این در حالی است که این افزایش در نمونه های با غلظت ۲۵۰ میکروگرم بر میلی لیتر به طور قابل توجهی بیشتر می باشد(P<0/001). در نمونه های تحت تأثیر غلظت ۵ میکروگرم بر میلی لیترβ - گلوکان، میزان پرولاکتین داخل سلولی نسبت به نمونه شاهد افزایش یافته است اما این افزایش معنی دار نیست. غلظت پرولاکتین در نمونه های تحت تأثیر دکستران تقریباً در حد نمونه های شاهد است و تغییر چندانی در میزان پرولاکتین مشاهده نمی شود. این نتایج نشان می دهد که β-گلوکان می تواند به طور اختصاصی محرک سنتز پرولاکتین باشد به طوری که اثر تحریکی غلظتهای بالای آن از TRH که یکی از محرکهای شناخته شده سنتز و ترشح پرولاکتین است نیز بیشتر می باشد(نمودار۱). این یافته ها همچنین نشانگر آن است که دکستران اثری بر میزان پرولاکتین داخل سلولی ندارد.



نمودار ۱ – مقایسه میزان پرولاکتین داخل سلولی در سلولهای GH3/B6 تحت تأثیر غلظتهای مختلف β- گلوکان در محیط کشت کامل، TRHو دکستران. β- گلوکان در غلظتهای ۱۵۰ و ۲۵۰ میکروگرم بر میلی لیتر باعث افزایش معنی دار پرولاکتین درون سلولی در مقایسه با کنترل می گردد. (P<0.05 *و P<0.001 ***)، (n=3)



نمودار ۲- درصد زیستایی سلولهای GH3/B6 تحت تأثیر غلظتهای مختلف β- گلوکان، TRH و دکستران به مدت ۴۸ ساعت. همان طور که در شکل مشخص است β- گلوکان، TRH و دکستران اثری بر درصد زیستایی سلولها ندارند (n=۵).

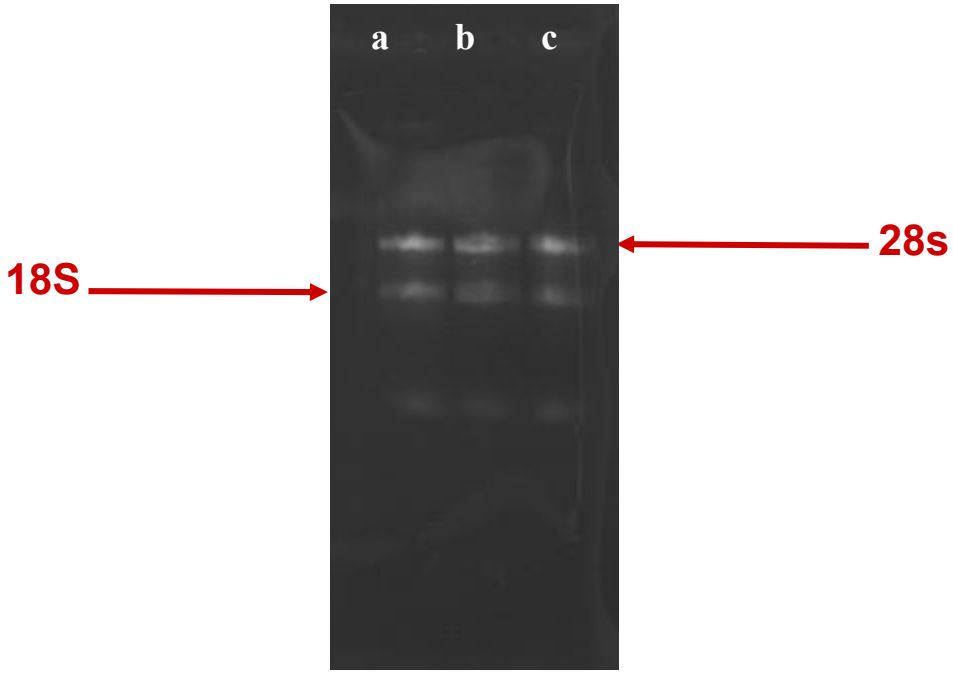
اثر β-گلوکان بر رشد و تکثیر سلولهای GH3/B6 : به منظور بررسی درصد زیستایی سلولها در حضور β-گلوکان، سلولهای GH3/B6 به مدت ۴۸ ساعت با غلظتهای مختلف (۵،۱۵۰،۲۵۰ میکروگرم بر میلی لیتر) β-گلوکان کشت داده شدند و درصد زیستایی آنها مورد بررسی قرار گرفت. نتایج حاصل نشان داد که غلظتهای مختلفβ - گلوکان بررسی شده در این تحقیق اثری بر درصد زیستایی این سلولها ندارد(نمودار۲). همچنین بررسی مقدار پروتئین حاصل از لیز این سلولها به روش برادفورد نیز مؤید افزایش این هورمون در حضور β-گلوکان می باشد زیرا تغییری در میزان پروتئینهای نمونه های مختلف مشاهده نشد (نتایج آورده نشده است).

β-گلوکان موجب القای بیان گیرنده دکتین-۱ در سلولهای GH3/B6 می شود: به منظور بررسی بیان دکتین-۱، ابتدا از صحت RNA استخراج گردیده از سلولهای GH3/B6 در حضور یا عدم حضور β-گلوکان با غلظت ۲۵۰ میکروگرم بر میلی لیتر به مدت ۴۸ ساعت و طحال اطمینان حاصل گردید. شکل شماره ۳ نشانگر وجود

www.SID.ir

Archive of SID

دو باند 18S و 28S و سالم بودن RNA استخراج شده است.



شکل۳- ۱ ماکروگرم RNA استخراج شده از: a – سلولهای GH3/B6 تحت تأثیر β- گلوکان با غلظت ۲۵۰µg/ml b – سلولهای c GH3/B6 – طحال روی ژل آگارز(۰/۸ درصد). دو باند ۲۸S و ۱۸S به خوبی مشخص است.

پس از سنتز cDNA، با استفاده از پرایمر طراحی شده واکنش PCR انجام شده و پس از انجام این واکنش به منظور مشاهده بیان ژن دکتین-۱، محصول PCR بر روی ژل پلی آکریل آمید رانده شد و با استفاده از نیترات نقره رنگ آمیزی گردید. نتایج نشان می دهند که بیان دکتین-۱ در طحال به وضوح دیده می شود (شکل ۴- باندb). سلولهای GH3/B6 دارای بیان ضعیف دکتین-۱ می باشند (شکل ۴- باندc) اما در حضور تراکم بالای β-گلوکان بیان گیرنده به طور قابل توجهی افزایش می یابد (شکل ۴- باند d). اختصاصی بودن باند مشاهده شده با حذف پرایمرها در واکنش تأیید گردیده است (شکل۴- باند f).

بحث

نتایج حاصل از این مطالعه نشانگر تأثیر ویژه β-گلوکان بر سنتز پرولاکتین و القای گیرنده دکتین-۱ در سلولهای GH3/B6 است. این نتایج اولین گزارش از حضور این گیرنده در موش صحرایی است. همچنین حضور دکتین-۱ برای اولین بار در سلولهای لاکتوتروپ مشتق از هیپوفیز پیشین گزارش می شود.

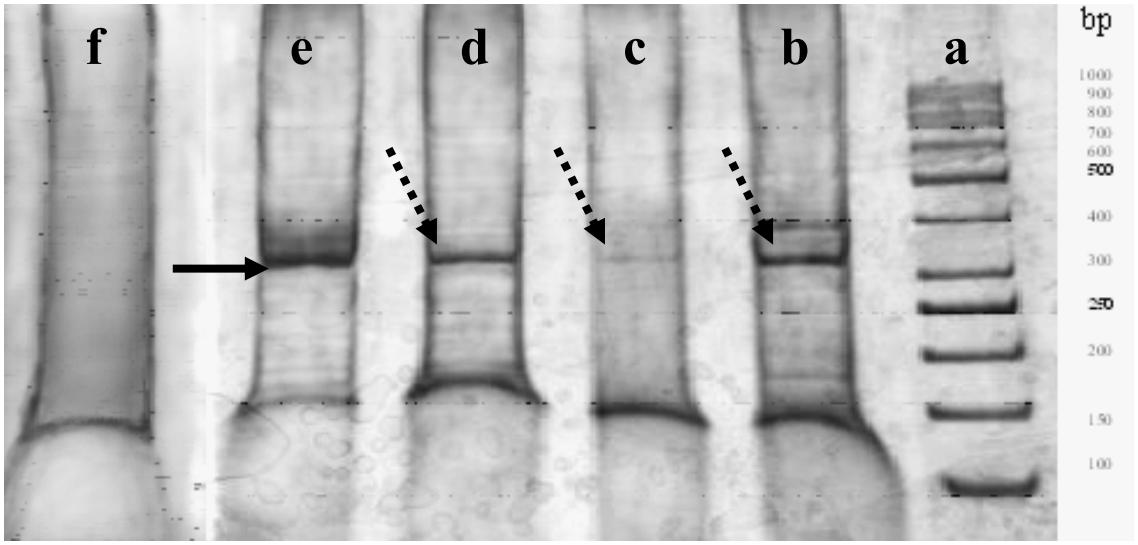
مطالعات اولیه نشان داده اند که پلی ساکاریدهای موجود در دیواره سلولی گیاهان نظیر گلوکانها و پکتینها خواص لاکتوژنی دارند به گونه ای که تزریق مستقیم و داخل وریدی این پلی ساکاریدها در حیوانات آزمایشگاهی سبب تحریک ترشح پرولاکتین و هورمون رشد می گردد(۱۲).

اثر مستقیم این پلی ساکاریدها در افزایش ترشح پرولاکتین توسط Sepehri و همکارانش در سال ۱۹۹۰ ثابت گردید. این پژوهشگران تأثیر این پلیمرهای قندی را بر قطعات هیپوفیز پیشین که دارای سلولهای اصلی سنتز کننده پرولاکتین در بدن می باشند مطالعه کردند و نشان دادند که β-گلوکان و اسید پکتیک با غلظتهای مختلف و زمانهای انکوباسیون متفاوت بر ترشح و سنتز پرولاکتین اثر مستقیم دارند(۱۳،۱۴). دلفی و همکاران افزایش ترشح این هورمون از سلولهای GH3/B6 تحت تأثیر β-گلوکان را در زمانهای

www.SID.ir

Archive of SID

انکوباسیون ۲۴ و ۴۸ ساعت گزارش کرده‌اند(۱). اخیراً Breuel و همکارانش نیز در مطالعه ای دیگر افزایش بیان پرولاکتین در این سلولها تحت تأثیر گلوکان فسفات را در انکوباسیون ۷۲ ساعت نشان داده اند(۲).



شکل ۴ - محصول PCR طحال و سلولهای GH3/B6 روی ژل پلی آکریل آمید. Ladder – a b – طحال c – سلولهای GH3/B6 d – سلولهای GH3/B6 تحت تأثیر β- گلوکان e – 18S f – پرایمر دکتین-۱ طحال و سلولهای GH3/B6 تحت تأثیر β- گلوکان، ژن گیرنده دکتین-۱ را بیان می کنند(فلش خط چین نشانگر محل باند مورد نظر است) سلولهای GH3/B6 بدون حضور محرک، این ژن را به طور پایه ای بیان می کنند. 18S، کنترل داخلی است که طول قطعه آن ۳۱۴bp است (فلش).

نتایج به دست آمده در این مطالعه علاوه بر تأیید یافته های قبلی نشانگر آن است که β-گلوکان در غلظتهای بالا و پس از ۴۸ ساعت علاوه بر ترشح ذخایر پرولاکتین موجود در این سلولها سبب افزایش سنتز پرولاکتین در این سلولها نیز می شود. Breuel و همکارانش همچنین گزارش کرده اند که اتصال گلوکان به غشای سلولهای GH3/B6 اختصاصی است(۲) و استفاده از دکستران و عدم تأثیر آن بر سنتز پرولاکتین نیز ثابت می کند که عمل β-گلوکان بر سنتز و ترشح پرولاکتین اختصاصی و منحصر به این پلی ساکارید است.

عملکرد β-گلوکان در تحریک سیستم ایمنی از طریق گیرنده های اختصاصی مشخص شده است (۴، ۱۰، ۱۷ و ۲۰). این گیرنده ها که شامل گیرنده کمپلمان نوع ۳ (CR3)، لاکتوزیل سرامید، گیرنده های زباله خوار و دکتین-۱ هستند پراکنش وسیعی در بدن داشته و در بافتهای ایمنی و غیر ایمنی بیان می شوند. طبیعت این گیرنده‌ها اخیراً مورد توجه قرار گرفته‌است.

از آنجا که سلولهای دندریتیک که گیرنده دکتین-۱ را به میزان بالایی بیان می کنند در طحال به وفور یافت می شوند در این پژوهش از بافت طحال به عنوان کنترل مثبت استفاده گردید. یافته‌های به دست آمده نشان دادند که سلولهای طحال موش صحرایی در حالت طبیعی و سلولهای GH3/B6 در حضور β-گلوکان، گیرنده دکتین-۱ را به میزان بالایی بیان می کنند بنابراین می توان نتیجه گرفت که β-گلوکان تحریک خود بر ترشح پرولاکتین را از طریق گیرنده دکتین-۱ انجام می‌دهد. بیان پایه ای گیرنده در سلولها نیز مؤید وجود این گیرنده می باشد.

نقش هورمون پرولاکتین در رابطه با سیستم ایمنی زمانی ثابت شد که مطالعات نشان دادند کاهش مقادیر پرولاکتین

www.SID.ir

Archive of SID

با استفاده از بروموکریپتین (مهار کننده ترشح پرولاکتین از هیپوفیز پیشین)، میزان مرگ و میر ناشی از عفونتهای *Listeria monocytogenes* را افزایش می‌دهد در حالی که استفاده از پرولاکتین خارجی بر حساسیت القاء شده بر بروموکریپتین غلبه می کند. Zellweger و همکارانش نشان داده اند که استفاده از پرولاکتین به طور معنی داری درصد زنده ماندن موشهای عفونی شده را افزایش می دهد (۱۹).

.بنابراین می توان نتیجه گرفت که β-گلوکان به عنوان یک محرک سیستم ایمنی که ترکیب اصلی دیواره قارچها را تشکیل می دهد باعث افزایش سنتز و ترشح پرولاکتین می‌شود و با افزایش ترشح پرولاکتین، مکانیسمهای ایمنی دیگر فعال می‌شوند و به حفظ و بهبود هموستازی کمک می کنند.

تشکر و قدردانی: این پژوهش با کمکهای ارزنده معاونتهای محترم پژوهشی دانشگاه تهران و پردیس علوم انجام شده است که از همکاری آنها تشکر به عمل می آید.

منابع

۱- دلفی ل، سپهری ح، رسولی ی، خویی س. (۱۳۸۵). اثر β- گلوکان بر تحریک ترشح پرولاکتین و مورفولوژی سلولهای GH3/B6. مجله زیست شناسی ایران. جلد ۱۹: شماره ۳ (۲۸۱-۲۷۲)

2-Breuel KF, Kougias P, Rice PJ, Wei D, De Ponti K, Wang J, Laffan JJ, Li C, Kalbfleisch J, Williams DL .(2004) Anterior pituitary cells express pattern recognition receptors for fungal glucans: imolications for neuroendocrine immune involvement in response to fungal infections. Neuroimmunomodulation. 11: 1-9

3- Brown GD and Gordon S. (2003). Fungal β-glucans and mammalian immunity. Immunity. 19(3): 311-31

4- Brown GD, Gordon S.(2001). Immune recognition: A new receptor for beta-glucans. Nature. 413: 36-37

5-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 cellular physiology. 190: 363-372

6-Freeman ME, Kanyicska B, Lerant A, Nagy G. (2000). Prolactin: structure, function, and regulation of secretion. Physiol. Rev. 80:1523–631

7- Gordon D. Brown. (2006). Dectin-1: a signaling non-TLR pattern-recognition receptor. Nature. 6: 33-43

8-Ogle CK, Kong F, Guo X, Wells DA, Aosasa S, Noel G, Horseman ND. (2000). The effect of burn injury on suppressors of cytokine signaling. Shock. 14:392-398

9-Owerbach D, Rutter WJ, Cooke NE, Martial JA, Shows TB.(1981).The prolactin gene is located on chromosome 6 in humans. Science. 212: 815–816

10- Rice PJ, Kelley JL, Kogan G, Ensley HE, Kalbfleisch JH, Browder IW, Williams DL. (2002). Human monocyte scavenger receptors are pattern recognition receptors for (1 → 3)-beta-d-glucans. J. Leukoc Biol. 72: 140–146.

11-Riddle O, Bates RW, Dykshorn SW.(1933). The preparation, identification and assay of prolactin—a hormone of the anterior pituitary. American Journal of Physiology. 105:191–216

12-Sawadogo L, Sepehri H, Houdebine LM .(1989). Evidence for a stimulating factor of prolactin and growth hormone secretion present in brewery draff. Reprod Nutr Dev. 29: 139-146

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

14-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

15-Tashjian AH, Bancroft FC, Levine L. (1970) production of both prolactin and growth hormone by clonal strains of rat pituitary tumor cells. Journal of Cellular Biology. 47: 61-70

16-Thellin O, Zorzi W, Lakaye B, DeBorman B, Coumans B, Hennen G, Grisar T, Igout A, Heinen E. (1999). Housekeeping genes as

www.SID.ir

Archive of SID

internal standards: use and limits. Journals of Biotechnology. 75(2-3): 291-295

17-Xia Y, Ross GD.(1999). Generation of recombinant fragments of CD11b expressing the functional β-glucan-binding lectin site of CR3(CD11b/CD18). Journal of Immunology. 162: 7285-729

18-Yu-Lee LY. (2002). Prolactin modulation of immune and inflammatory responses. Recent Progress in Hormone Research. 57: 435-455

19- Zellweger. R, Zhu. XH, Wichmann. MW, Ayala A, DeMaso CM, Chaudry IH, (1996). Prolactin administration following hemorrhage shock improves macrophage cytokine release capacity and decrease mortality from subsequent sepsis. Journal of Immunology. 157: 5748-5754

20- Zimmerman JW, Lindermuth J, Fish PA, Palace G.P, Stevenson TT, DeMong DE, (1998). A novel carbohydrate–glycosphingolipid interaction between a beta-(1-3)-glucan immunomodulator, PGGglucan, and lactosylceramide of human leukocytes. J. Biol. Chem. 273: 22014–22020

The effect of different concentrations of β- glucan on intracellular prolactin synthesis in GH3/B6 cells and its receptor, Dectin-1,

Shaerzadeh F.[1], Sepehri H.[1], Hossein Gh.[1], Goliaei B.[2], Delphi L.[1] and Rassouli Y.[1]

[1]School of Biology, University College of Science, University of Tehran

[2] Institute of Biophysics-Biochemistry

Abstract

Prolactin is a polypeptide hormone of the anterior pituitary gland that was originally named for its ability to promote lactation. Today we know that it has over 300 different function in vertebrates including osmoregulation, growth and development, metabolism, behavior, reproduction and immunoregulation. Recently, the role of Prolactin in immune system is investigated. Glucans are glucose polymers that are major constituents of the cell wall of fungi, plant and certain bacteria. In the present study, we used GH3/B6 cell line which is known to secrete Prolactin and growth hormone. We also studied the expression of β-glucan receptor, dectin-1, on this cells. Intracellular Prolactin levels were assayed by ELISA. Cells were treated with 5,150 and 250μgr/ml concentrations of β-glucan for incubation time of 48 hours. TRH (50 nM) was used as positive control and dextran (50nM), was our negative control. Therefore, Total RNA was extracted from spleen and GH3/B6 cells in the presence of β-glucan (250μgr/ml). Then, RT-PCR and PCR methods were done for verifying the expression of Dectin-1. Our result showed that 150 and 250 μgr/ml concentrations of β-glucan are capable to stimulation Prolactin synthesis significantly from GH3/B6 cells in comparison with control($P<0.05$). The results showed that spleen, the positive control, expressed Dectin-1 as expected. Our results also showed that Dectin-1 was expressed in GH3/B6 cells at very low level, and this expression was increased under the effect of β-glucan. Therefore, β-glucan may induce GH3/B6 cells throughout Dectin-1 which lead increasing prolactin secretion from these cells.

Keywords: GH3/B6 cells**,** Prolactin**,** β-glucan**,** Dectin-1

www.SID.ir