

## بررسی بیان کموکین‌های CXC [SDF-1 $\alpha$ و Gro/KC] در سلول‌های هیپاتوما H4 موش صحرایی در پاسخ به محرک‌های محیطی

غلامحسین حسن شاهی\* (Ph.D.)<sup>+</sup> محمد رضا حاجی زاده\*\* (M.Sc.) نازنین ضیا اسلام\*\*\* (M.D.)  
عبدالله جعفرزاده\*\*\*\* (Ph.D.) محمد رضا میرزایی\*\* (M.Sc.) عباس صادقی\*\*\*\* (B.Sc.)  
زهره قرشی\*\*\*\*\* (M.Sc.) علی گلشیری اصفهانی\*\*\*\*\* (M.D.) آلن دیکسون\*\*\*\*\* (Ph.D.)

### چکیده

**سابقه و هدف:** امروزه به درستی محقق گردیده که عوامل تنش زای محیطی باعث فعالیت مسیر MAPK و P53 و JNK در انواع سلول‌ها و متعاقباتولید کموکین‌ها می‌گردد. این مطالعه به منظور بیان ژن‌های کموکین‌های CXC در سلول‌های تومور کبدی (Hepatoma) موش صحرایی (H4) در پاسخ به شوک حرارتی، افزایش اسمولاریته و اکسیداتیو انجام شد.

**مواد و روش‌ها:** سلول‌های تومور کبدی را در محیط کشت (MEM (Minimal essential medium) نگهداری نموده و از تنش‌زاهای مختلف از جمله آب اکسیژنه ۰/۱۵ درصد، مانیتول، نمک ۱۶۰ میلی‌مولار و شوک حرارتی ۴۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۰ دقیقه استفاده شد. سلول‌های تومور کبدی جمع‌آوری گردید و RNA آنها استخراج و خالص‌سازی شد و بیان ژن‌ها با روش RT-PCR آنالیز گردید. cDNA بروی ژل آگارز ۱ درصد جداسازی و با نور ماورای بنفش مشاهده گردید.

**یافته‌ها:** برطبق نتایج باوجود سطح قابل قبول بیان کموکین‌ها توسط سلول‌های تومور کبدی، شوک حرارتی، افزایش اسمولاریته و استرس اکسیداتیو تغییر قابل قبولی در بیان ژن‌های SDF-1 $\alpha$  و Gro/KC ایجاد نموده است. به هر حال گرچه این کموکین‌ها بیان شده‌اند، مکانیزم تنظیم گسترده‌ای مبنی بر تولید این کموکین‌ها در سلول‌های تومور کبدی مشاهده نگردیده است.

**استنتاج:** بسیاری از آسیب‌های شناخته شده باعث فراخوان سلول‌های سیستم ایمنی از جمله ماکروفاژها، نوتروفیل‌ها و سایر سلول‌های ایمنی به کبد می‌گردد. این روند از طریق تولید کموکین‌ها در سلول‌های آسیب دیده به کانون آسیب سلول‌های کبدی تسهیل می‌گردد. نتایج در مجموع نشان داد که نقص در تولید کموکین‌ها متعاقب تنش در سلول‌های تومور کبدی راهی برای گریز از سیستم ایمنی توسط این سلول‌ها می‌باشد.

**واژه‌های کلیدی:** کموکین‌ها، استرسورها، هیپاتوما

\* دکترای هماتولوژی، عضو هیئت علمی (استادیار) دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان

Email: ghassanshahi@gmail.com

<sup>+</sup> مؤلف مسئول: رفسنجان- میدان انقلاب، دانشکده پزشکی

\*\* عضو هیئت علمی گروه بیوشیمی (مربی) دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان

\*\*\* دکترای ایمونولوژی، عضو هیئت علمی (دانشیار) دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان

\*\*\*\* کارشناس آزمایشگاه گروه بیوشیمی دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان

\*\*\*\*\* عضو هیئت علمی (مربی) دانشکده پرستاری و مامایی دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان

\*\*\*\*\* متخصص گوش، حلق و بینی، عضو هیئت علمی دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان

\*\*\*\*\* پروفیسور بیوشیمی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه منچستر

تاریخ دریافت: ۸۵/۳/۲۹ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات: ۸۵/۸/۶ تاریخ تصویب: ۸۵/۱۱/۲۳

## مقدمه

قسمتی از راه مهمی است که برای انتقال اثر تحریکی عوامل محرک خارجی به درون هسته سلول مورد نیاز می باشد. اعضاء خانواده MAPK شامل ERK1, ERK2, c-Jun kinase (JNK) و  $P^{38}$  می باشد (۵). تأثیر شوک اسمزی در اثر موادی مانند کلروسدیم به میزان بیان ژن IL-8 (ایترلوکین شماره ۸) در سلول های منوسیت انسانی و سلول های برونشیا اپی تلیوم از مسیر فعالیت  $P^{38}$  به اثبات رسیده است (۹-۶). به علاوه در سلول های اپی تلیال روده انسان نقش p44/42 و NFκB در بیان IL-8, Gro/Kc بارز است (۱۰). تأثیر استرس اکسیداتیو بر بسیاری از اختلالات کبدی از قبیل عفونت باکتریال و ویروسی کبد، سمیت کبد، مصرف اتانل و کارسینوم هیپاتوسلولار نشان داده شده است (۱۱). در سلول های کبدی موش صحرایی و سلول های انسانی HePG<sub>2</sub> (۱۲) این اختلالات با پاسخ التهابی مزمن و افزایش بیان ژن های کموکین هایی از قبیل Gro/KC, MIP-2 و IL-8 توأم است. در سلول های سایر بافت ها از قبیل سلول های اپی تلیال ریه نیز آب اکسیژنه مسیر NFκB را فعال و منجر به بیان IL-8 می گردد (۹). چون در آسیب های کبدی مثل کبدبرداری مقطعی (۱۳)، اختلالات کبدی ناشی از مصرف الکل (۱۴) و عفونت های کبدی (۱۵) افزایش محسوسی در بیان کموکین ها در سلول های کبدی مشاهده می شود. در این تحقیق Gro/KC که یک کموکین  $ELR^+$  و SDF-1α که یک کموکین  $ELR^-$  است، جهت بررسی انتخاب و در سلول های تومور کبدی H4 موش صحرایی در شرایط شوک حرارتی، افزایش اسمولاریته و استرس اکسیداتیو بررسی شد و میزان پاسخ سلول های تومور کبدی و تولید کموکین های CXC مورد ارزیابی قرار گرفت.

کموکین ها گروه بزرگی از خانواده سیتوکین ها می باشند که دارای عملکردهای متنوعی هستند و عمده ترین نقش آنها بسیج و فراخوان سلول های مهاجر و عمدتاً "سلول های سیستم ایمنی به سمت محل عفونت و آسیب های بافتی می باشد (۲۰۱). این گروه از سیتوکین ها از نظر ساختمانی و بر اساس نحوه قرار گرفتن مولکول آمینواسید سیستین در ساختمانشان به چهار گروه مجزا تقسیم می گردند که عبارتند از: الف) CC یا بتا که در آن ها دو مولکول سیستین در زنجیره پروتئینی کموکین، مجاور یکدیگر می باشند مانند Eotaxin یا CCL11 (ب) نوع CXC یا آلفا که در آنها بین مولکول های سیستین، زنجیره یک آمینواسید دیگر واقع شده است (X) مانند SDF-1α, Gro/KC و IP-10 (ج) نوع C یا گاما که از چهار ملکول سیستین موجود در کموکین ها، فاقد سیستین اول و سوم می باشند مانند CX3C یا دلتا که در آنها بین مولکول های سیستین، زنجیره سه مولکول از دیگر آمینو اسیدها واقع گردیده است. مانند CX3CLI (۳،۲) گروه CXC خود بر اساس وجود یا عدم وجود گروهی به نام ELR (حاوی گلوتامین - لوسین - آرژنین) در قسمت ابتدائی زنجیره آمینو اسیدی خود به گروه های  $ELR^+$  و  $ELR^-$  تقسیم می شوند. اهمیت بررسی کموکین ها در کبد و بیماری های کبدی نظیر هپاتیت های مزمن نوع B و C و اتوایمیون است؛ به طوری که سلول های کبدی، کموکین هایی نظیر IP<sub>10</sub> و سایر کموکین ها را تولید می نمایند (۴). امروزه به درستی دریافت شده است که تنش های محیطی از قبیل اشعه فرابنفش، آسیب DNA سلولی، سیتوکین های فاز التهاب، شوک گرمایی، استرس اکسیداتیو و اسمولاریته می توانند باعث فعالیت مسیر MAPK (Mitogen Activated Protein Kinase) ویژه  $P^{38}$  و JNK (Janus Kinase) شوند.

## مواد و روش ها

### الف) کشت سلول‌های تومور کبدی H4

سلول‌های تومور کبدی H4 از طریق ECACC تهیه شدند. برای انجام کشت سلول‌ها از محیط نیتروژن مایع برداشته و ویال‌های حاوی سلول با دمای دست به درجه حرارت آزمایشگاه رسیدند. محتوی ویال سلولی به ۲۰ میلی‌لیتر محیط کشت (Minimal Essential Medium) MEM حاوی گلوتامین و سرم ۱۰ درصد جنین گوساله (FCS) که از قبل داخل فلاسک T75 گرم شده بود، منتقل گردید. سلول‌ها در  $37^{\circ}\text{C}$  و محیط (5%  $\text{CO}_2$  و 95%  $\text{O}_2$ ) به مدت ۲۴ ساعت انکوبه شدند و پس از ۲۴ ساعت کلیه سلول‌های غوطه‌ور در محیط کشت که به سطح فلاسک چسبیده نبودند، برداشته و ۲۰ میلی‌لیتر محیط کشت تازه جایگزین محیط قبلی گردید. برای نگهداری سلول‌ها در محیط کشت در مراحل بعد، محیط کشت قدیمی برداشته شده و سلول‌ها با ۱۰ میلی‌لیتر بافر فسفات شسته شدند. و در مرحله بعد سلول‌ها با افزودن ۲ میلی‌لیتر تریپسین (200mg/ml) و حرکت دادن ملایم در سطح فلاسک جدا شده و برای توقف فعالیت بیش از حد تریپسین به آنها ۱۰ میلی‌لیتر محیط کشت تازه اضافه و با سانتریفوژ کردن شسته شدند. قسمت بالایی (محیط کشت) به دور ریخته و به توده سلولی پایین لوله ۲۰ میلی‌لیتر محیط کشت تازه اضافه و سلول‌ها با دانسیته‌ای در محدوده  $10^5 \times 3-5$  سلول در میلی‌متر مکعب در یک فلاسک T75 جدید کاشته و انکوباسیون سلول‌ها در  $37^{\circ}\text{C}$  جهت انجام آزمایش‌ها ادامه پیدا کرد.

### ب) استخراج RNA

برای استخراج RNA به ازای هر پلیت ۳ سانتی‌متری مقدار یک میلی‌لیتر تریزول (Gibco BRL) Trizol™ اضافه گردیده و سپس سلول‌ها جمع‌آوری و به داخل

لوله سانتریفوژ منتقل گردیده و در دمای  $80^{\circ}\text{C}$  تا زمان آزمایش نگهداری و یا مستقیماً برای استخراج RNA مصرف شد. برای استخراج RNA ابتدا RNA با افزودن کلروفورم رسوب داده شد و در مرحله بعد به وسیله کیت MessagClean (USA) از آلودگی با DNA پاک گردید.

### ج) تولید cDNA (به وسیله واکنش RT)

جهت ساخت cDNA مکمل (cDNA) واکنش RT (نسخه برداری معکوس) به قرار زیر انجام شد: مقدار ۴ میکرولیتر از بافر واکنش (۱۲۵ میلی مولار تریس- کلرید هیدروژن (Tris-HCL) pH 8.3، ۱۸۸ میلی مولار کلرور پتاسیم (KCl)، ۷.۶ میلی مولار کلرور منیزیم (MgCl<sub>2</sub>) و ۲۵ میلی مولار دی اتیل تری تیول (DTT). ۱ میکرولیتر از هر نوع (dNTP, dGTP, dATP, dCTP)، ۴ میکرو لیتر اولیگو- دی تی، ۱ میکرو لیتر RNA استخراج شده ۴ میکرو لیتر آب محتوی DEPC و ۱/۵ میکرو لیتر آنزیم مخصوص واکنش RT (M-MLV) درون یک لوله میکرو سانتریفوژ با هم مخلوط و به مدت ۶۰ دقیقه در  $37^{\circ}\text{C}$  انکوبه شد. پس از انقضای مدت انکوباسیون cDNA تولید شده تا زمان انجام PCR و موارد نیاز بعدی در  $20^{\circ}\text{C}$  نگهداری شد. برای انجام PCR بر روی cDNA تولیدی محلول واکنش با افزودن مواد ذیل در یک لوله میکرو سانتریفوژ روی یخ انجام شد.

- ۱۰ میکرو لیتر بافر آنزیم تک پلیمراز (Taq Polymerase)، ۳ میکرو لیتر کلرور منیزیم (MgCl<sub>2</sub>)، ۲ میکرو لیتر در هر (dNTP, dATP, dCTP, dGTP)، ۲ میکرو لیتر از هر پرایمر طراحی شده برای کمو کین‌ها (جدول شماره ۱) و ۴ میکرو لیتر از cDNA تولیدی توسط RT-PCR مخلوط فوق پس از

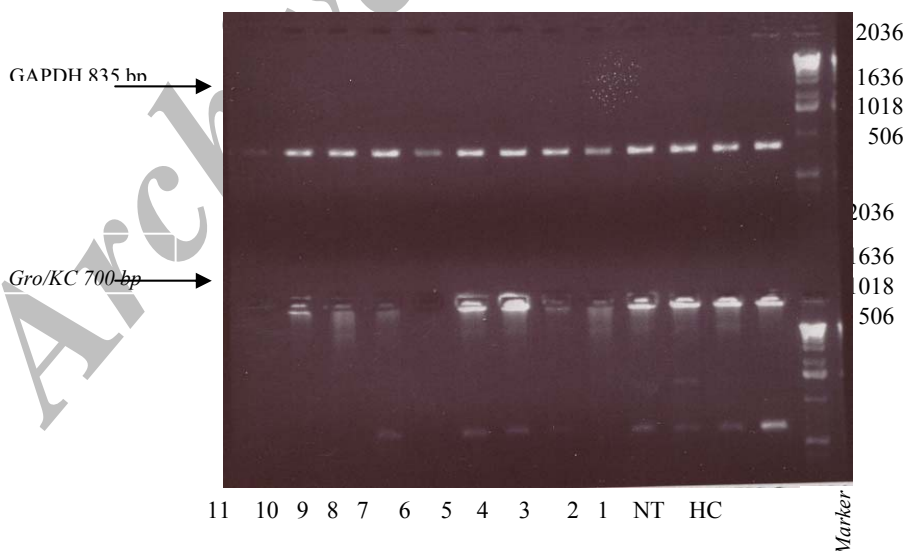
## یافته ها

سلول های تومور کبیدی کشت شده در محیط کشت MEM تحت عوامل تنش زای مختلف (غلظت ۱/۵ درصد آب اکسیژنه، مانتیول، کلرور سدیم و شوک حرارتی) قرار گرفته در ساعات مختلف پس از اعمال تنش ذکر شده جمع آوری و محتوی RNA آنها استخراج و خالص گردید. با روش RT-PCR میزان بیان Gro/KC آنالیز گردیده است. mRNA آنزیم GAPDH (گلوکز = ۶ فسفات - دهیدروژناز) توأم با Gro/KC به عنوان کنترل به کار رفته است. cDNA تولید شده در واکنش RT روی ژل آگارز ۱ درصد الکتروفورز و جداسازی گردیده و با ترانس ایلیمینا تور اشعه ای عکس برداری گردید (تصویر شماره ۱).

رسانیدن حجم آن به ۹۹ میکرولیتر با آب مقطر استریل با ۴۰ تا ۶۰ میکرولیتر روغن معدنی پوشیده شده و در ترموسایکلر PCR انجام شد. نتایج با نرم افزار SPSS مورد بررسی قرار گرفتند و از روش آماری T-Test برای مقایسه نتایج استفاده شد.

جدول شماره ۱: پرایمرهایی را که برای اندازه گیری کموکین ها در این تحقیق به کار رفته، نشان می دهد. پرایمر جلوپر = F پرایمر برگردان = R، گلیسر آلدئید-۶- فسفات دهیدروژناز GAPDH، درجه ذوب = MT، درجه حرارت انیلینگ = AT

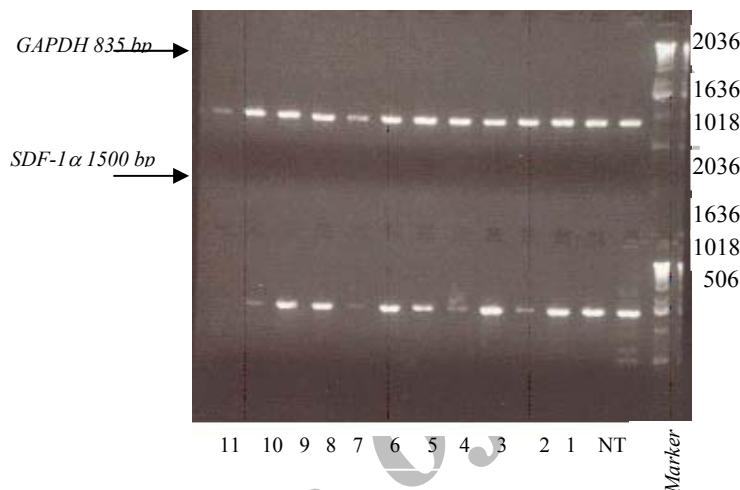
نام ژن	پرایمر (۳'-۵')	AT(°C)	درجه ذوب	اندازه قطعه
GAPDH	F: aagtcggtgtgaacggatt R: gagacaacctgtctcagtgtag	۵۷	۶۲	۸۳۵
Gro/KC	F: ttcaactcaagaacatcca R: gagcattggttaagaataataa	۵۱	۵۶	۶۸۰
SDF-1 $\alpha$	F: agtgtcattgaccgaaatta R: ttacagcacgaaacagttggc	۶۰	۶۵	۱۵۰۰



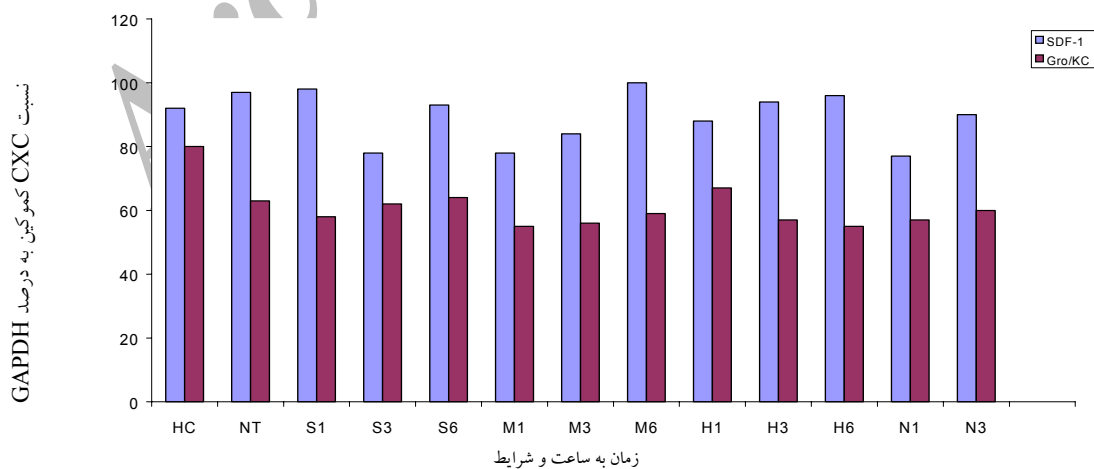
تصویر شماره ۱: آنالیز بیان Gro/KC تحت شرایط شوک حرارتی، افزایش اسمزیه و استرس اکسیداتیو در سلول های هیپاتوما H4 شماره های سمت راست بیانگر وزن مولکولی باندها می باشد.  
 HC = سلول های کبیدی اولیه به عنوان کنترل، NT = کنترل (بدون اعمال استرس)، ۱ = یک ساعت شوک حرارتی، ۲ = سه ساعت شوک حرارتی، ۳ = شش ساعت شوک حرارتی، ۴ = یک ساعت مانتیول، ۵ = سه ساعت مانتیول، ۶ = شش ساعت مانتیول، ۷ = یک ساعت آب اکسیژنه، ۸ = سه ساعت آب اکسیژنه، ۹ = شش ساعت آب اکسیژنه، ۱۰ = یک ساعت NaCl، ۱۱ = سه ساعت NaCl

مانند شوک حرارتی، شوک اسمزی و یا آب اکسیژنه قادر به افزایش قابل توجه تولید کموکاین های مورد نظر در سلول های تومور کبدی نگردیده است (تصویر ۱ و ۲ و نمودار ۳).

همچنین با روش RT-PCR میزان بیان SDF-1 $\alpha$  آنالیز گردیده است (تصویر شماره ۲). نتایج به دست آمده از این تحقیق نشان داد اگرچه مقادیری کموکاین در سلول های تومور کبدی H4 موش تولید شده است، هیچکدام از استرس های ایجاد شده



**تصویر شماره ۲:** آنالیز بیان SDF-1 $\alpha$  تحت شرایط شوک حرارتی، افزایش اسمولالیه و استرس اکسیداتیو در سلول های هیپاتومی H4 (mRNA) آنزیم GAPDH (گلوکز=۶ فسفات - دهیدروژناز) توأم با SDF-1 $\alpha$  به عنوان کنترل به کار رفته است. cDNA تولید شده در واکنش RT روی ژل آگارز ۱٪ الکتروفورز و جداسازی گردیده و با ترانس ایلیمینیا تور اشعه ای عکس برداری گردیده است. شماره های سمت راست بیانگر وزن مولکولی باندها می باشد. HC = سلول های کبدی اولیه به عنوان کنترل، NT = کنترل (بدون اعمال استرس)، ۱ = یک ساعت شوک حرارتی، ۲ = سه ساعت شوک حرارتی، ۳ = شش ساعت شوک حرارتی، ۴ = یک ساعت مانیئول، ۵ = سه ساعت مانیئول، ۶ = شش ساعت مانیئول، ۷ = یک ساعت آب اکسیژنه، ۸ = سه ساعت آب اکسیژنه، ۹ = شش ساعت آب اکسیژنه، ۱۰ = یک ساعت NaCl، ۱۱ = سه ساعت NaCl



**نمودار شماره ۱:** بررسی و مقایسه بیان ژن های کموکاین های SDF-1 $\alpha$  و Gro/KC در سلول های هیپاتومی H4 موش صحرایی در تحت شرایط تحریکی و استرس زای مختلف داده های نمودار بر گرفته از آنالیز داده های دانسیتومتری باندهای تصاویر ۱ و ۲ می باشد

## بحث

با توجه به این که سلول های کبدی اولیه پس از قرار گرفتن در محیط کشت غیر متمایز گردیده و پس از ۴۸ ساعت کاملاً از بین می روند، سلول های تومور کبدی H4 سلول های تمایز یافته ای هستند، ما از سلول های متمایز جهت بررسی الگوی بیان ژن کموکین ها استفاده نموده ایم ضمن این که الگوی بیان ژن های کموکین ها در سرطان های کبدی را در شرایط تنش زا و طبیعی مقایسه نمودیم.

بسیاری از عوامل شناخته شده نظیر هیپاتیت، ایسکمی، عفونت و داروهای سمی و سموم شناخته شده از طریق فراخوان ماکروفاژها، نوتروفیل ها و سایر سلول های ایمنی به کبد کمک می کنند (۱۲). متعاقب آزرده گی و آسیب های کبدی (۱۲،۳) و یا در معرض سیتوکین های فاز التهاب قرار گرفتن این ارگان، تولید کموکین های نوع CXC در کبد افزایش می یابد و نوتروفیل ها به کانون آسیب مهاجرت می نمایند (۲،۱). علی رغم این که نوتروفیل ها و سلول های کوپفر به عنوان مدافعین کبد عمل می نمایند، پاسخ ایمنی کبد در بست در اختیار این سلول ها نیست و سایر سلول های ایمنی از قبیل لنفوسیت های T و سلول های کشنده طبیعی نیز مداخله می نمایند که این فرآیند نیز از طریق تأثیر گذاری کموکین ها بر این سلول ها است (۴). دخالت کموکین های CC ای نظیر MCP-1 و کموکین های CXC دارای ELR گروهی مانند اینترلوکین-۸ و فاقد گروه ELR ی مانند IP-10/Mob-1 نیز در کبد مبتلا به سمیت استامینوفن و در آسیب های کبدی ناشی از استامینوفن و فرآیند بازسازی کبد گزارش شده است (۱۶-۱۹). افزایش سطح Gro/KC با بسیاری از آسیب های کبدی مانند ایسکمی (در موش)، عفونت، سمیت با پاراستامول و متعاقب سموم لیپوپلی ساکاریدی مشاهده شده است (۲۱،۲۰). نتایجی که از این تحقیق به دست آمده نشان می دهد که اگرچه کموکین های مورد مطالعه

در سلول های تومور کبدی H4 (Gro/KC, SDF-1 $\alpha$ ) در سلول های تومور کبدی بیان و تولید می شوند، میزان آنها زیاد نمی باشد. ما در این تحقیق سلول های تومور کبدی H4 را به این دلیل انتخاب نموده ایم که این سلول ها، سلول هایی شناخته شده اند که تا حدودی بر خلاف سلول های اولیه که تمایز خود را در محیط کشت بافت از دست می دهند (۲۲)، این سلول ها تمایز بوده و ژن های ویژه سلول های کبدی را بیان می نمایند. بر خلاف سلول های کبدی اولیه که به شوک حرارتی پاسخ داده و در آنها تولید کموکین ها افزایش می یابد (۲۳)، استرس شوک حرارتی نتوانسته است تولید و بیان کموکین های SDF-1 $\alpha$  و Gro/KC را در سلول های تومور کبدی افزایش دهد. در حالی که شوک حرارتی باعث افزایش کموکین دیگری (IP-10) در سلول های کبدی گردیده است (۲۴) از طرفی افزایش فشار اسمزی نیز قادر به افزایش تولید کموکین ها در سلول های تومور کبدی نشده است و در نهایت این مطالعه نشان داد که هیچ کدام از تنش های فوق که در محیط آزمایشگاه ایجاد شده است قادر به ایجاد تغییر چشمگیری در تولید کموکین های مورد مطالعه نشده است. در مجموع علی رغم این که در سلول های تومور کبدی H4 قابل شناسایی است، پاسخ های تنظیم کننده در این سلول ها در این سری از آزمایش های مشاهده نگردیده است. نتایج این آزمایش نشان می دهد که مسیرهای سیگنالینگ منتج به تولید کموکین ها در این سلول های بی پاسخ باشند و این اتفاق می تواند مربوط به تمایز این سلول ها باشد. برای این که بر خلاف سلول های کبدی اولیه که در محیط کشت قابل تمایز نبوده و پس از مدت کوتاهی پس از کشت (۷۲-۲۴ ساعت) ژن های اختصاصی خود را از دست داده و به فاز غیر متمایز بر می گردند، سلول های تومور کبدی H4 سلول هایی تمایز یافته اند. همان طور که در تحقیقی که توسط محققین این گروه

است که دو کموکین مورد مطالعه یعنی SDF-1 و Gro/KC اگرچه در سلول‌های تومور کبدی H4 قابل اندازه‌گیری بوده‌اند، میزان آنها مانند سایر رده‌های سلولی و یا ازردگی‌های کبد افزایش داشته است. در مجموع نتایج این تحقیق نشان می‌دهد که علی‌رغم مقادیر قابل اندازه‌گیری این کموکین‌ها پاسخ‌های تنظیم‌کننده‌ای در رابطه با بیان این ژن‌ها در سلول‌های تومور کبدی H4 قابل درک نیست. این نوع نتیجه‌های به دست آمده نشان می‌دهد که پاسخ سلول‌های تومور کبدی H4 به مسیرهای سیگنالینگ ممکن است از سلول‌های کبدی اولیه متمایز باشد که این ویژگی مربوط به حالت دیفرانسیل و تمایز یافته این سلول‌ها نسبت به سلول‌های کبدی اولیه می‌باشد. از طرفی نیز شاید این نوع پاسخ سلول‌های تومور کبدی به آنها کمک می‌کند که از سیستم مراقبت ایمنی فرار نمایند و همین ویژگی آنها است که با وجود بدخیم بودن، از مراقبت ایمنی فرار نموده و بی‌رویه تکثیر می‌یابند.

### سیاسگزاری

نویسندگان از مسؤولین وزارت بهداشت و درمان جمهوری اسلامی ایران که حمایت مالی این پروژه را به عهده داشته و از کارکنان و دانشجویان آزمایشگاه شماره ۲۰۳ دانشکده علوم زیستی دانشگاه منچستر که در مراحل انجام آزمایش‌ها رهنمودهایی ارائه نموده‌اند، کمال سپاس و تقدیر را دارند.

صورت گرفته است، میزان بیان انواع کموکین‌ها من جمله IP-10 تحت تأثیر شوک حرارتی و سایر تنش‌ها از قبل سیتوکین‌های فاز التهاب نظیر IF- $\gamma$  و TNF- $\alpha$  در سطح پروتئینی و mRNA افزایش می‌یابد که این بیانگر اثر تنظیم عوامل محیط بر تولید و بیان کموکین‌ها در سلول‌های کبدی می‌باشد (۲۴). تا کنون هیچ گزارشی مبنی بر بیان ژن کموکین‌ها به وسیله این سلول‌ها چاپ نشده است. اگر چه گزارش‌هایی دال بر بیان ژن کموکین‌ها در سلول‌های تومور کبدی انسانی نوع HePG2 توسط همکاران گزارش گردیده است، با توجه به تحقیقات و جستجوهای الکترونیکی انجام شده در سایت‌های مختلف علمی این اولین گزارشی است که بیان کموکین‌ها را در سلول‌های تومور کبدی H4 که یک رده سلولی متمایز یافته کبدی موش صحرايي است را گزارش می‌کند. منتها بیان یکی از این کموکین‌ها که ما مورد مطالعه قرار داده‌ایم یعنی SDF-1 در اپی‌تلیوم غیر عفونی کبد به صورت خود انگیزه نشان داده شده است (۲۵) که این بیان به همراه بیان گیرنده این کموکین (۹) در لئوسیت‌های مهاجر این ناحیه همراه بوده است (۲۶، ۲۷). مطالعات ایمنی-بافتی-شیمیایی کاهش سطح SDF-1 $\alpha$  در سرطان سلول کبدی و نیز افزایش این پروتئین در هپاتیت نوع C را نشان داده است (۲۸). دیگر کموکین بررسی شده یعنی Gro/KC نیز نشان داده شده است که در موش‌های کبد برداری شده افزایش می‌یابد که شاید با بازسازی کبد (ری ژنراسیون) مرتبط باشد (۲۹). نتایج به دست آمده از این تحقیق نشان داده

### فهرست منابع

1. Lawson JA, Farhood A, Hopper RD, Bajt ML, Jaeschke H. The Hepatic Inflammatory Response after Acetaminophen Overdose: Role of Neutrophils. *Toxicol. Sci.* 2000; 54: 509-516.
2. Maher JJ, Lozier JS, Scott MK. Rat hepatic stellate cells produce cytokine-induced neutrophil chemoattractant in culture and in vivo. *Am. J. Physiol. Gastro. Liv. Physiol.* 1998; 275: G847-G853.

3. Jaeschke H, Fisher MA, Lawson JA, Simmons CA, Farhood A, Jones DA. Activation of caspase 3 (CPP32)- like proteases is essential for TNF- alpha-induced hepatic parenchymal cell apoptosis and neutrophil-mediated necrosis in a murine endotoxin shock model. *J. Immunol.* 1998; 160: 3480-3486.
4. Bone-Larson CL, Simpson KJ, Colletti LM, Lukacs NW, Chen SC, Lira S, Kunkel SL, Hogaboam CM. The role of chemokines in the immunopathology of the liver. *Immunol. Reviews.* 2000; 177: 8-20.
5. Matthias P, Wymann Marketa Z, Muriel L. Phosphoinositide 3-kinase signalling- which way to target? *Trends Pharmacol. Sci.* 2003 Jul; 24 (7): 366-76.
6. Hashimoto S, Matsumoto K, Gon Y, Nakayama T, Takeshita I, Horie T. Hyperosmolarity-induced interleukin-8 expression in human bronchial epithelial cells through p38 mitogen-activated protein kinase. *Am. J. Resp. Crit Care Med.* 1999; 159: 634-640.
7. Shapiro L, Dinarello CA. Osmotic regulation of cytokine synthesis in vitro. Proceeding of *Na. Acad. Sci. USA.* 1995; 92: 12230-12234.
8. Nèmeth ZH, Deitch EA, Szabó C, Haskó G. Hyperosmotic stress induces nuclear factor-kappaB activation and interleukin-8 production in human intestinal epithelial cells. *Am.J.Pathol.* 2002; 161(3): 987-996.
9. Schmelz M, Schmid VJ, Parrish AR. Selective disruption of cadherin/catenin complexes by oxidative stress in precision-cut mouse liver slices. *Toxicol. Sci.* 2001; 61: 389-394.
10. Dong W, Simeonova PP, Gallucci R, Matheson J, Flood L, Wang S, Hubbs A, Luster MI. Toxic metals stimulate inflammatory cytokines in hepatocytes through oxidative stress mechanisms. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 1998; 151: 359-66.
11. Luster A. Chemokines- chemotactic cytokines that mediate inflammation. *N. Eng. J. Med.* 1998; 338: 436-445.
12. Jaschke H. Oxidative and nitrosative stress induces peroxiredoxins in pancreatic beta cells. *Alcohol.* 2002; 27: 23-27.
13. Koniaris LG, Koniaris TZ, Hsiao EC, Chavin K, Stizmann J, Farber JM. Cytokine-responsive gene-2/IFN-inducible protein-10 expression in multiple models of liver and bile duct injury suggests a role in tissue regeneration. *J. Immunol.* 2001; 167: 399-406.
14. Nanji AA, Jokelainen K, Fotouhinia M, Rahematulla A, Thomas P, Tipoe GL, Su, GL, Dannenberg AJ. Increased severity of alcoholic liver injury in female rats: role of oxidative stress, endotoxin, and chemokines. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 2001 Dec; 281 (6): G1348-56.



15. Salkowski CA, Detore G, Franks A, Falk MC, Vogel SN. Pulmonary and hepatic gene expression following cecal ligation and puncture: monophosphoryl lipid A prophylaxis attenuates sepsis-induced cytokine and chemokine expression and neutrophil infiltration. *Infect. Immunity*. 1998; 66: 3569-78.
16. Koniaris LG, Koniaris TZ, Hsiao EC, Chavin K, Stizmann J, Farber JM. Cytokine-responsive gene-2/IFN-inducible protein-10 expression in multiple models of liver and bile duct injury suggests a role in tissue regeneration. *J. Immunol*. 2001; 167: 399-406.
17. Ishida Y, Kondo T, Ohshima T, Fujiwara H, Iwakura MN. A pivotal involvement of IFN-gamma in the pathogenesis of acetaminophen-induced acute liver injury. *FASEB J*. 2002; 16: 1227-1236.
18. Hogaboam CM, Bone-Larson CL, Steinhauser ML, Lukacs NW, Colletti LM, Simpson KJ, Strieter RM, Kunkel SL. Novel CXCR2-dependent liver regenerative qualities of ELR-containing CXC chemokines. *FASEB J*. 1999; 13: 1565-74.
19. Ren X, Carpenter A, Hogaboam C, Colletti L. Mitogenic properties of endogenous and pharmacological doses of macrophage inflammatory protein-2 after 70% hepatectomy in the mouse. *Am. J. Pathol*. 2003; 163: 563-570.
20. Hisama N, Yamaguchi Y, Ishiko T, Miyanari N, Ichiguchi O, Goto M, Mori K, Watanabe K, Kawamura K, Tsurufuji S, Ogawa M. Kupffer cell production of cytokine-induced neutrophil chemoattractant following ischemia/reperfusion injury in rats. *Hepatology*. 1996; 24: 1193-98.
21. Salkowski CA, Detore G, Franks A, Falk MC, Vogel SN. Pulmonary and hepatic gene expression following cecal ligation and puncture: monophosphoryl lipid A prophylaxis attenuates sepsis-induced cytokine and chemokine expression and neutrophil infiltration. *Infect. Immunity*. 1998; 66: 3569-78.
22. Varley CL, Armitage S, Hassanshahiraviz G, Dickson AJ. Regulation of the C-X-C chemokine, mob-1, gene expression in primary rat hepatocytes. *Cytokine*. 2003; 23: 640-75.
23. Coulomb-L'Hermine A, Amra A, Schiff C, Durand-Gasselini I, Foussat A, Delaunay T, Chaouat G, Capron F, Ledee N, Galanaud P, Arenzana-Sesdedos F, Emilie D. Stromal cell-derived factor 1 (SDF-1) and antenatal human B cell lymphopoiesis: Expression of SDF-1 by mesothelial cells and biliary ductal plate epithelial cells. *Proc. in Nat. Acad. Sci. of USA*. 1999; 96: 8585-8590.
24. Hassanshahi G, Patel S, Jafarzadeh A, Alan J. Dickson, Expression of CXC Chemokine IP-10/Mob-1 by Primary

- Hepatocytes Following, Heat Shock, *Sau. Med. J.* 2007 April; 28 (4): 514-8.
25. Terada R, Yamamoto K, Hakoda T, Shimada N, Okano N, Baba N, Ninomiya Y, Gershwin ME, Shiratori Y. Stromal cell-derived factor-1 from biliary epithelial cells recruits CXCR4-positive cells: implications for inflammatory liver diseases. *Lab. Invest. Laborat. Inves.* 2003; 83: 665-672.
26. Goddard S, Williams A, Morland C, Gladue R, Hubscher SG, Adams DH. Differential expression of chemokines and chemokine receptors shapes the inflammatory response in rejecting human liver transplants. *Transplantation.* 2001; 72: 1957-1967.
27. Mitra P, De A, Ethier MF, Mimori K, Kodys K, Shibuta K, Mori M, Madison JM, Miller-Graziano C, Barnard GF. Loss of chemokine SDF-1alpha-mediated CXCR4 signalling and receptor internalization in human hepatoma cell line HepG2. *Cell. Signall.* 2001; 13: 311-319.
28. Su AI, Guidotti LG, Pezacki JP, Chisari FV, Schultz PG. Gene expression during the priming phase of liver regeneration after partial hepatectomy. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 2002; 99: 11181-11186.
29. Bone-Larson CL, Hogaboam CM, Evanhoff H, Strieter RM, Kunkel SL. IFN-gamma-inducible protein-10 (CXCL10) is hepatoprotective during acute liver injury through the induction of CXCR2 on hepatocytes. *J. Immunol.* 2001; 167: 7077-7083.