پژوهشی

مجله دانشگاه علوم پزشکی مازندران
دوره هفدهم شماره ۶۰ مهر و آبان سال ۱۳۸۶ (۷۸-۶۹)

کلونینگ، بررسی توالی و بیان کموکین SDF-1α در سلول های کبدی موش صحرایی

غلامحسین حسن شاهی (Ph.D.) *+ الن دیکسون (Ph.D.)** سیدضیاء طباطبایی (M.Sc.)***

چکیده

سابقه و هدف : مقادیر بالایی از پروتئین کموکین SDF-1α (پروتئین مشتق شده از سلول‌های استرومایی) در بافت‌های غیر آماسی اپی‌تلیوم کبد گزارش شده است. ازطرفی ظهور وتولید SDF-1α نیز به وسیله سلول‌های صفحات مجرایی (Ductal Plates) که نوعی سلول پیش‌ساز برای اپی‌تلیوم کبد است، گزارش گردیده است. این پروتئین در لانه‌گزینی سلول‌های لنفوسیت B در بافت کبد، موثر و لازم است. بنابراین می‌تواند در سیستم ایمنی و مصونیت کبد نقش ایفا کند. با توجه به ظهور و تولید این پروتئین در سایر سلول‌های کبدی، مراجع علمی و مقالات کمی، بروز این ژن را در سلول‌های هپاتوسیت که سلول‌های اصلی کبدی می‌باشند، مورد بررسی قرار داده‌اند. لذا موضوع این تحقیق بررسی ظهور SDF-1α در سطح MRNA توسط سلول‌های هپاتوسیت بوده است.

مواد و روش‌ها : در این پژوهش از روش‌های تولید مثل غیرجنسی (cloning) استفاده نموده و ظهور این ژن در سلول‌های هپاتوسیت بررسی شده است. در این راستا در اولین مرحله با خواندن توالی ژن در سلول‌های هپاتوسیت موش صحرایی و مقایسه صحت اطلاعات خود با داده‌های پایه (Data Base) ثابت شد که ژن مورد بررسی همان SDF-1α بوده است و در مرحله بعد، میزان ظهور ژن با روش خشک کردن شمالی (Northern Blotting) پردازش شد.

یافته‌ها : نتایج نشان داد که متعاقب جداسازی هپاتوسیت‌ها از کبد و کشت اولیه آن‌ها این ژن در هپاتوسیت ظهور می‌یابد.

استنتاج : بیان این کموکین احتمالا در پاسخ تنشی سلول‌های هپاتوسیت به جداسازی و کشت اولیه موثر است.

واژه های کلیدی : هپاتوسیت، کبد، SDF-1α ، کموکین

مقدمه

عامل شماره ۱ مشق از استروما (SDF-1) اولین بار در ردهٔ سلول‌های استرومای مغز استخوان به نام ST-2 شناسایی شد و سپس به عنوان عامل محرک سلول‌های پیش "ب" (Pre-B) در محیط آزمایشگاهی (in Vitro)

* دکترای هماتولوژی، عضو هئیت علمی (استادیار) دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان
+ ✉ **مولف مسئول :** رفسنجان- میدان انقلاب، دانشگاه علوم پزشکی- دانشکده پزشکی
E-mail: ghassanshahi@gmail.com or ghassanshahi@yahoo.co.uk
** پروفسور بیوشیمی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه منچستر
*** کارشناسی ارشد مدیریت خدمات بهداشتی و درمانی ، عضو هئیت علمی(مربی) دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان
تاریخ دریافت : ۸۵/۸/۲۰ تاریخ تصویب: ۸۶/۲/۱۶

www.SID.ir

معرفی گردید(۲،۱). مقادیر بالایی از SDF-1α در اپی‌تلیوم غیرالتهابی صفراوی کبد مشاهده شده است(۳) و گزارش شده است که این عامل در ارتباط با بیان CXCR4 باعث به کارگیری لنفوسیت‌ها می‌شود(۵،۴). به علت عدم وجود اطلاعات درباره "پیش محرک" (Promotor) ژن SDF-1α، مکانیسم دقیق بیان آن مشخص نیست(۴). لنفوسیت‌هایی که در کبد ارتشاح می‌یابند، CXCR4 را بیان می‌کنند و تصور می‌شود که سلول‌هایی که وارد کبد غیر التهابی می‌شوند ممکن است توسط SDF-1α جذب شده وسپس به اپی‌تلیوم مجاری صفراوی وارد شوند. این لنفوسیت‌ها بدن را در مقابل عوامل بیماری زایی که از طریق مجاری صفراوی وارد می‌شوند، محافظت می‌کنند(۶). مطالعات ایمنی- بافتی- شیمیایی نشان داده است‌که میزان ظهور SDF-1α در سرطان سلول کبدی در مقایسه با دیگر بیماری‌های مزمن کبدی از قبیل هپاتیت C کاهش می‌یابد(۶،۷،۸). SDF-1α توسط پیش‌سازهای سلول‌های اپی‌تلیال مجاری صفراوی نیز تولید می‌شود و در بلوغ و لانه‌گزینی سلول‌های B به داخل کبد جنینی نقش دارد(۳). بر اساس مطالعات مذکور، در این مطالعه میزان تحریک ظهور mRNA در پاسخ به جداسازی سلول‌های کبدی احتمالاً نمایانگر تفاوت‌هایی درسطح عناصر تنظیم‌کننده "پیش محرک" و تنظیم الگوبرداری است. بنابراین مطالعه عناصر تنظیم کننده "پیش محرک" در این مورد جالب است. نشان داده شده است که ژن SDF-1α حاوی نواحی اتصال برای عوامل الگوبرداری به نام SPI و CTF می‌باشد(۸). علاوه بر این ژن SDF-1α حاوی جزایر CPG نیز می‌باشد. بنابراین به‌نظر می‌رسد ظهور ثابت ژن SDF-1α وابسته به عوامل الگوبرداری است و "پیش محرک" ژن SDF-1α فاقد نواحی اتصالی برای عوامل القاءکننده از قبیل NF-KB و AP-1 است(۷،۹،۱۴). با توجه به شیوع نسبتا بالای بیماری‌های کبدی نظیر سیروز و انواع هپاتیت‌ها و فیبروز به نظر می‌رسد کموکین‌ها نقش اساسی در ایمنی کبد و مقابله با عفونت و آسیب‌های کبدی ایفا می‌کنند. بنابراین این مدل جهت بررسی ظهور این مولکول‌های حیاتی که نقشی عمده در آسیب‌های بافتی و جذب سلول‌های ایمنی و خونی به محل آسیب دیده دارند، طراحی شده است تا با بهره‌گیری از مدل‌های حیوانی به زوایای مبهم دیواره کبدی در رابطه با ایمنی‌شناسی کبد پاسخ داده شود. بر این اساس در این مطالعه، ژن SDF-1α را که تحقیقات نشان داده است نقش اساسی‌تری در مقابله با عفونت‌ها و بالاخص عفونت‌های ویروسی نظیر ایدز (HIV) دارد، انتخاب شد و میزان ظهور این ژن با روش دقیق خشک کردن شمالی (Northern Blotting) بررسی شد.

مواد و روش ها

الف) جداسازی هپاتوسیت‌ها

در این تحقیق سلول‌های کبدی مورد مطالعه از کبد موش‌های صحرایی نر از نژاد Sprague-Dawley (واحد BSU دانشگاه منچستر) با وزن تقریبی ۲۰۰g جداسازی شده و با استفاده از بافر کربس- هنسه‌لیت (Krebs-Henseleit) که محتوی ۲۵ میلی‌مولار سدیم، ۵ میلی‌مولار پتاسیم، یک میلی مولار فسفات هیدروژن- پتاسیم و ۱ میلی‌مولار سولفات منیزیم ۲۵ میلی‌مولار کربنات هیدروژن سدیم، ۲۰۵ میلی‌مولار کلرور سدیم است در شرایط استریل از کبد حیوان جدا شده‌اند(۹). پس از ۱۰- ۸ دقیقه، کبد برداشته شده و در شرایطی کاملاً استریل به همراه بافر کربس- هنسه‌لیت (Krebs-Henseleit) خرد شده و از میان یک قطعه گاز استریل به داخل یک بشر غربال شده است. سلول‌ها برای سه بار با محلول فوق شسته شده؛ به طوری که در هر شست و شو ته لوله با محلول رقیق گردیده و دوباره سانتریفوژ گردیده است. تودهٔ نهایی سلول‌های

Archive of SID

www.SID.ir

کبدی در داخل محلول محرک (محتوی محیط کشت Waymouth MD 1721 ساخت شرکت اینوییروژن انگلستان) منتقل و میزان (درصد) زنده بودن سلول‌ها با استفاده از تریپان بلو مشخص شده است. سلول‌های کبدیی مورد استفاده قرار گرفته‌اند که میزان (درصد) سلول‌های زنده آن‌ها بیش از ۸۵ درصد و اکثرا در محدوده ۹۵-۹۰ درصد بوده است. جمعیت هپاتوسیت‌ها در زیر ریزبین نوری کنترل گردیده و خلوص سلول‌های کبدی در بهترین حالت بوده و حضور سلول‌های اندوتلیال در محیط کشت از ۱ درصد تجاوز نمی‌کرده است. در هر صفحه (۳ سانتی‌متری برای RNA و ۶ سانتی‌متری برای پروتئین) که از کلاژن نوع - I پوشیده شده بوده است، تعداد $۵-۲ \times ۱۰^{۶}$ سلول در هر میلی‌لیتر محلول القاء کاشته شده است و پس از آن به دستگاه پرورش (Incubator) (Co_2 (۵ درصد) ، (O_2 (۹۵ درصد) در دمای ۳۷°C منتقل گردیده است. پس از گذشت ۳ ساعت از کشت، محیط کشت حاوی محلول محرک یا محیط کشت نگهدارنده (محیط کشت به اضافه BSA و سدیم اولئات 0.0005% W/V) تعویض گردیده و نهایتا" سلول‌ها با روشی که در زیرنویس تصاویر آمده است، تیمار شده اند.

ب)استخراج RNA

برای‌استخراج RNA به ازای هرصفحه۳ سانتی‌متری، مقدار یک میلی لیتر تریزول ™ Trizol (Gibco BRL) اضافه گردیده و سپس سلول‌ها جمع‌آوری و به داخل لوله سانتریفوژ منتقل گردیده و در دمای ۸۰°c- تا زمان آزمایش نگهداری و یا مستقیما" برای استخراج RNA مصرف شده است. برای استخراج RNA ابتدا RNA با افزودن کلروفرم رسوب داده شده است و در مرحله بعد به وسیله اسباب MessagClean تمیز شده و از آلودگی با DNA پاک گردیده است .

ج) تولید cDNA (به وسیله واکنش RT)

جهت ساخت DNAی مکمل (cDNA) واکنش الگوبرداری معکوس (Reverse Transcription) به قرار زیر انجام شده است:

مقدار ۴ میکرولیتر از بافر واکنش (۱۲۵ میلی‌مولار تریس- کلرید هیدروژن pH 8.3، 188 میلی‌مولار کلرور پتاسیم (KCl)، 7.6 میلی‌مولار کلرور منیزیم (Mg Cl2) و ۲۵ میلی مولار دی اتیل تری تیول(DTT). ۱ میکرو لیتر از هر نوع dNTP (dTTP, dGTP, dCTP, dATP) ، ۴ میکرو لیتر اولیگو- دی تی، ۱ میکرولیتر RNA استخراج شده،۴ میکرولیتر آب محتوی DEPC و ۱/۵ میکرولیتر آنزیم مخصوص واکنش RT(M-MLV) درون یک لوله میکروسانتریفوژ با هم مخلوط و به مدت ۶۰ دقیقه دربن ماری ۳۷°c پرورانده شده است. پس از انقضای مدت پرورش، cDNA تولید شده تا زمان انجام PCR و موارد نیاز بعدی در ۲۰°c- نگهداری شده است. برای انجام PCR بر روی cDNA تولیدی محلول واکنش با افزودن مواد ذیل در یک لوله میکروسانتریفوژ روی یخ انجام شده است.

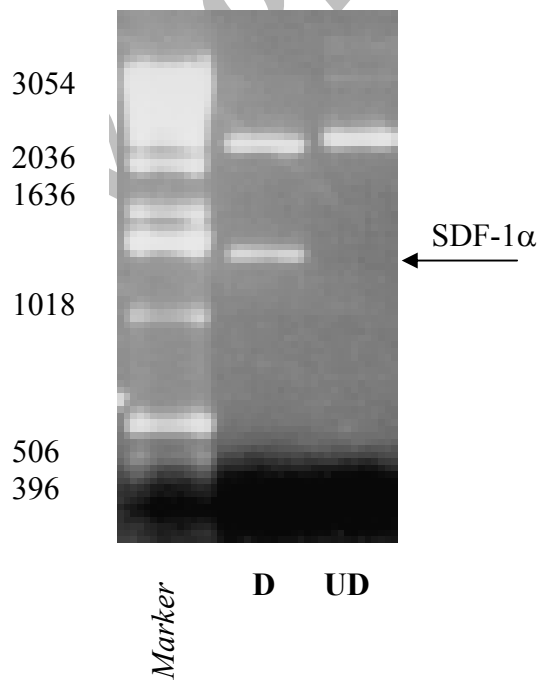
- ۱۰ میکرولیتر بافر آنزیم تک پلیمراز (Taq Polymerase) ، ۳ میکرولیتر کلرورمنیزیم ، ۲ میکرو لیتر از هر dNTP (dATP, dCTP, dTTP dGTP)، ۲ میکرولیتر از هر پرایمر طراحی شده برای کموکین‌ها (جدول شماره ۱) و ۴ میکرولیتر از cDNA تولیدی مخلوط شده و مخلوط فوق پس از رسانیدن حجم آن به ۹۹ میکرولیتر با آب مقطر استریل با ۴۰ تا ۶۰ میکرولیتر روغن معدنی پوشیده شده و در موتور حرارتی PCR انجام شده است.

د)تولید مثل غیرجنسی (Clone) ژن SDF-1

برای تولید مثل غیرجنسی این ژن حدود 50mg از قطعه DNAی به دست آمده در فرآیند RT-PCR به

Archive of SID
www.SID.ir

داخل حامل(Vector) به وسیلهٔ پرورش (Incubation) با آنزیم T_4 لیگاز واردشده است. برای انجام این واکنش، علاوه بر آنزیم از بافر فعالیت لیگاز (حاوی ۳۰ میلی مولار Tris- HCL با pH= 7.8 محتوی ۱۰ میلی مولار کلرورمنیزیم (MgCL2)، ۱۰ میلی‌مولار دی اتیل تری تیول (DTT) و یک میلی مولار ATP) اضافه و نهایتا" حجم به ۱۰ میکرولیتر رسیده و به مدت ۱۶ ساعت در $4^{\circ}c$ پرورانده شده گردیده است. حامل‌ها با روش دگرگونی (Transformation) به باکتری اشرشیا کولی آبی سوش XL-1 منتقل و به محیط کشت LB محتوی 50µg/ml آمپی سیلین منتقل و در طول شب در $37^{\circ}c$ کشت شده است. صبح روز بعد، کلونی‌های رشد کرده در سطح صفحه، انتخاب و به محیط کشت مایع LB محتوی 50µg/ml آمپی‌سیلین منتقل و دو باره در طول شب در $37^{\circ}c$ در دستگاه پرورش (Incubator) متحرک باسرعت بالا کشت داده شده است. از محیط کشت نهایی در روز بعد به وسیله اسباب Midi-Preparation (شرکت کیا ژن) پلاسمید محتوی قطعه cDNA ژن SDF-1 جداسازی گردیده و در مرحله بعد با کمک آنزیم های محدود کننده و با پرورش یک ساعته در $37^{\circ}c$ قطعه جدا شده است. قسمت بریده شده cDNA ژن نهایتاً روی ژل ۱ درصد آگارز به مدت یک ساعت با ولتاژ 70 ولت الکتروفورز گردیده است. در مرحله نهایی قطعه cDNA از ژن بریده و به وسیله اسباب Gel Extration (شرکت کیاژن) از آگار پالایش و خالص گردیده و مرتب شده است (تصویرشماره ۱).



تصویر شماره ۱: هضم با آنزیم های محدود کننده پلاسمید pCR® 2.1 حاوی cDNAی طراحی شده با پرایمرهای SDF-1 توسط PCR

این تصویر هضم (به وسیله آنزیم *ECORI*) پلاسمید وکتور pCR® 2.1 را که حاوی DNA ای که با پرایمرهای طراحی شده ی ژن SDF-1 بوده و به وسیله PCR تولید شده است را نشان می دهد. برای انجام این کار از کیت اینویتروژن TAcloning استفاده و محصول PCR به داخل وکتور پلاسمیدی منتقل گردیده است. و سپس پلاسمید به سلول های One-Shot® (TOPO10) منتقل و به وسیلهٔ Mini-Preparation ارزیابی شده اند و قطعهٔ DNAی تولیدی روی ژل الکتروفورز گردیده و سپس تصویربرداری شده است. D نشان دهندهٔ قسمت هضم شده و UD نشان دهندهٔ قسمت دست نخورده و بدون افزایش آنزیم یا هضم نشده است. شماره های سمت چپ نشان دهندهٔ اندازهٔ باندهای مارکر مولکولی استاندارد است.

Archive of SID

www.SID.ir

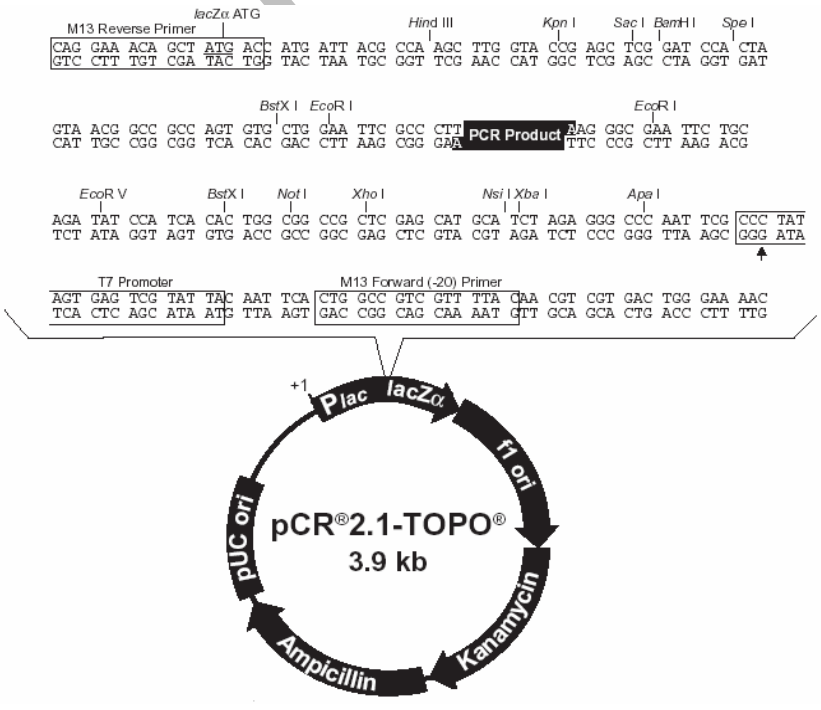
ر) بررسی ژن توسط *Northern Blotting*

مقدار ۲۰ میکروگرم RNA بر روی ژن محتوی ۱ درصد آگارز و ۱۷ درصد فرمالید الکتروفورز گردیده و به غشاء نیتروسلو لز Hybond-N^{tm} منتقل گردیده است. قسمتی از RNA ژن SDF-1 به طور تصادفی با ۵۰ میکروکیوری از dATP [α-^{32}P] نشان‌دار گردیده و برای استاندارد کردن و حصول اطمینان از هم اندازه بودن مقدار RNA موجود در حفرات rRNA ی S 18 نیز با ۲۰ میکروکیوری dATP α–^{32}P نشان‌دار و مطالعه گردیده است. پس از الکتروفورزغشاءهای نیتروسلولزی محتوی RNA در محلول هیبرید شامل (V/V) درصد 50 فرمالید در SSPE در دنهارد 0.1 mg/ml از DNA خنثی شده اسپرم ماهی سالمون و ۱/۵ درصد SDS در دمای ۴۲°c پری هیبرید شده است. غشاءهای پس از پری هیبرید شدن باcDNA نشاندار، محلول هیبریداسیون در طول شب پرورانده شده است و صبح روز بعد دو بار (هربار ۱۵ دقیقه و در درمای اتاق) با ۰/۱ درصد SDS و SSC ۲× شسته شده و نهایتاً برای شستن نهایی در محلولی محتوی ۰/۱ درصد SDS وSSC× 0.1 شسته شده و نهایتاً با کاست‌های تشدید کننده رادیو گرافی در ۷۰- نگهداری شده و با تکنیک فسفوایمجینک تحلیل گردیده است.

کلیه داده‌های این تحقیق بر اساس mean± SEM بیان گردیده است و مقایسه بین گروه‌های آماری (ساعت‌های مختلف بیان ژن) با آزمون دانشجویی جفت (Paired Student test) انجام شده است و اختلاف زمانی معنی‌دار تلقی گردیده است ($P<0.05$).

یافته ها

دراین مطالعه برای بررسی ظهورSDF-1α در سطح RNA در طول زمان ابتدا RNA از سلول‌های کبدی که به‌مدت سه ساعت کشت داده شده بود، استخراج گردیده و برای تولید محصولات PCR مطابق با ژن SDF-1α به‌کار رفته است. cDNA تولیدشده و به داخل پلاسمید PCR®2.1 تکثیرشده است(تصویرشماره۲).



تصویر شماره ۲ : وکتور pCR®2.1-TOPO

www.SID.ir
Archive of SID

پس ازانتقال پلاسمید به داخل سلول‌های TOPO10 ® OneShot و کشت و تکثیر پلاسمید دراین سلول ها و پس از انتخاب کلونی های حاوی ژن قطعهٔ ژن القاء شده با انجام حداقل آمادگی (Mini Preparation) و هضم به وسیله آنزیم ECORI با موفقت جداسازی و آماده گردیده است (تصویر شماره ۱). باندهای موجود cDNA ی SDF-1 α را نشان می‌دهند که از نظر وزن مولکول با اندازه مولکولی این ژن تطابق کامل دارند ولی به جهت حساسیتی که در انجام تکنیک‌های بعدی یعنی Northern Blotting بوده است، این‌قطعه پس از آمادگی متوسط (Midi Preparation) باموفقیت مرتب گردیده است (تصویر شماره ۳). برای نشان دادن دامنه تغییرات ظهور ژن SDF-1 α در سلول‌های اولیه پس ازجداسازی وکشت از روش RT-PCR و Northern Blotting استفاده شده است. برای مقایسه و آنالیز میزان ظهور ژن در ساعات معین، از زمان جداسازی تا انتقال به محیط کشت و کشت دادن سلول‌ها با هم مقایسه گردیده است. ژن SDF-1 از سلول‌های کبدی سه ساعته پس از طراحی پرایمرهای SDF-1 تکثیر وبرای حصول اطمینان مرتب شده است (تصویر شماره ۳). که پس از بررسی همانندشناسی و مقایسه با اطلاعات موجود در سایت BLAST به میزان ۹۶ درصد با ژن SDF-1 هم‌خوانی داشته است. cDNA ی SDF-1 به عنوان یک پروب برای انجام Northern Blotting مورد استفاده قرارگرفته است(تصویر شماره ۴). با این روش میزان ظهور ژن SDF-1 در سطح RNA مطالعه‌گردیده است. میزان ظهور mRNAی SDF-1 در لحظات اولیه (ساعت صفر) بسیار کم و قابل انکار است، در حالی که میزان ظهور mRNAی این ژن متعاقب با جداسازی هپاتوسیت‌ها و نگهداری سه ساعته آن‌ها در محیط کشت به شدت افزایش و به حداکثر میزان حد خود رسیده است. تحلیل آماری انجام شده با آزمون T نشان داده است که اختلاف معنی‌داری بین ظهور ژن SDF-1 درساعت سوم و سایر زمان‌های بررسی شده وجود دارد ($P<0.001$).

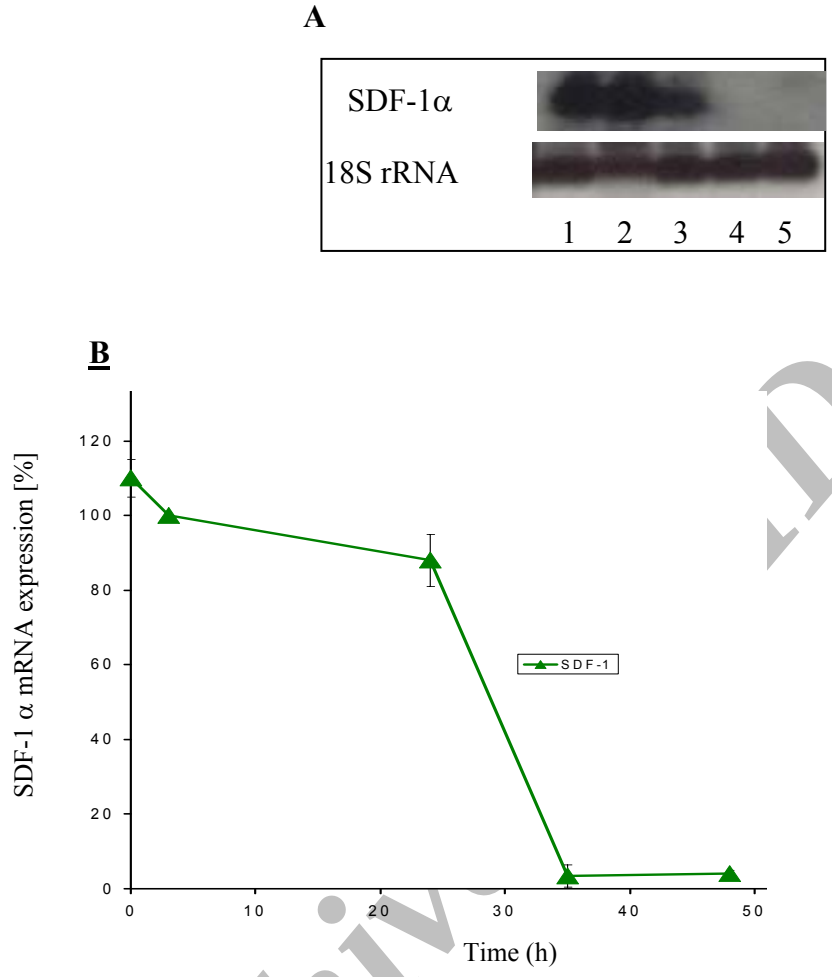
agtgtgcattgacccgaaattaaagtggatccaagagtacctggacaaagcc*1**ttaaacaagtaagcacaacagcccaaaggactttccagt**
agacccctgaggaaggctgacctnngtgggagaggaaagggcagtggtgnggaggagggcctgaaccctggccaggttggccaatgg
gacggcactgactggggtcatgctgagatttgccagcacaaagacactccaccaatagcatatggtacgatattgctacttatattcatccgtgccctcg
cccgtgcacaatggagcttttataactgggggtttttctaagaaattgtattaccctaaccagttagcttcatcctcatcttcctcatcctcatcctcatctcatttt
ttaaaagcagtgattacttcaaggtctgtattcggtttgctttggagcttctcgcttccctggggcctctgggcacagttacaggtggtggctttgctgggagc
cctggggagtagcaaccttccaccagagcaggtccgaggaatgctgcagggcttgtcctgcaggggcgctcccggacagattccttgccgagagt
cactcagctcaaggttgggcagaggctccttttccagttcagtgtcaggggtagggaagcttcctttagaaggtacccctggggcctgtgctcagaga
ccctttcctagccgttcctgatctctgcttgcctccaaaagcatgcttcaactggcttccgcttctcacctctgtagcctgacctgccaatgctgcagtggaa
ggaaggagaatgttttgggggcgcttcctccctctttccctttgctttcctctcacttgggccctttgtgagatttctctttggcctcctgtagaatggagcca
gcccctcctggataatgtgagaacatgcctagaattaaccacagaacacaagtctgagaattatccgaaacgcaatttaaatttgaaaactttgagg
aattggacttttgcaattgcccctgagtcctatatatttcaacagtggctccgtgggctctgagttttcgaatatcagagatgaaaaaaatgaataagcca
gaatcttgccgtgaagccacagtggggattctgggttccaatcagaaatgggaacaagataaaattggatacgtcctaatgatcacagacggccctg
gtggttttgataactatttgcaaggcatttttacatatatttttgtgcacttttatgtttctttggaagacaaatgtatttcagaatatatttgtagtcaattccta*2**t**
atttgaagagaagccatagtagtgtcagtagatngcctctacggtcttgaactactgncgatttgtaaagaaatatatatgacataaagatgt
attgtagcttgccaatgtcagccagtgtatttttccacttgtaatgaaattgtatcaactgtgacactatatgcactagcaataaaatgccaactgtttc
gtgctgtaa

تصویر شماره ۳: آنالیز داده های سکونس شدهٔ ژن SDF-1

تصویر شماره ۳ سکونس DNA تولیدی در این تحقیق است که با (Nucleotide Database) مقایسه و میزان مشابهت آن با اطلاعات مربوط به ژن SDF-1 در سایت BLAST مقایسه گردیده است. سکونس پرایمرهای بکار برده شده در داخل مستطیل ها است به طوری که مستطیل بالائی حاوی سکونس پرایمر جلوبر (Forward) و مستطیل انتهائی حاوی سکونس پرایمر برگردان (Reverse) می باشند. شماره های نشان دهنده نواحی سکونس شده به طوری که ناحیه ۱ نشان دهنده مشابهت بین این سکونس و اطاعات ژن در BLAST با تعداد 92 باز مشابه از کل 96 باز و به میزان ٪96 است در حالی که ناحیه ۲ نشان دهنده ناحیه دوم بوده و نشان دهنده میزان مشابهت بین DNA کلون شده با اطلاعات ژن در BLAST با تعداد 133 باز مشابه از کل 137 باز و به میزان ٪97 است. بازهائی که با علامت قرمز نشان داده شده اند نشان دهندهٔ تفاوت از ژن مبدأ در بانک ژن می باشند.

Archive of SID

www.SID.ir



تصویر شماره ٤: آنالیز بیان mRNA ی SDF-1 در کشت معمول هپاتوسیت ها در زمان ها متعدد

هپاتوسیت های مورد مطالعه از کبد موش صحرائی نژاد Sprague Dawley جدا سازی و بین $۲-۵\times۱۰^{۶}$ سلول درون پلیت هائی که مخصوص کشت بافت بوده و از قبلا"با ماتریکس کلاژن نوع I پوشیده شده بودند کشت داده شده است. ابتدا سلول های جدا شده در محیط کشت اولیه به تعلیق در آمده و سپس به پلیتهای کشت اضافه گردیده اند. سلول ها به مدت ۳ ساعت انکوباتور با شرایط (٪۵) Co_2 و (٪۹۵) O_2 در دمای ۳۷°c کشت شده اند. پس از سه ساعت انکوباسیون محیط کشت نگهدارنده محیط کشت اولیه جایگزین گردیده است و فرآیند کشت تا ۴۸ ساعت ادامه پیدا کرده است. در ساعات مورد اشاره معین سلول های هپاتوسیت د رتریزول جمع آوری و برای استخراج RNA به ۸۰°c- منتقل گردیده اند. برای انجام آزمایش RNA سلول ها استخراج و خالص گردیده است. RNA استخراج شده پس از خالص سازی روی ژل آگارز ۱٪ جداسازی و سپس به غشاء نایلونی منتقل گردیده است. یک پروب cDNA از ژن SDF-1 که با رادیو اکتیو نشان دار شده (مواد و روش ها) به غشاء نایلون اضافه و پس از مدت لازم غشاء شسته و رادیو اکتیویته (با در معرض فیلم رادیوگرافی قرار دادن غشاء نایلون) اندازه گیری شده است.

A) تصویر A نشان دهنده یک نمونه نورترن بلات (Northern Blot) است که با $[\alpha\text{-}^{32}P]$ dCTP cDNA ی SDF-. rRNA (18S) نیز برای استاندارد کردن مقدار یکسان RNA در چاهک های ژل استفاده شده است. ۱ = زمان صفر، ۲ = RNA ی سه ساعته ، ۳= RNA ی ۲۴ ساعته،۴= RNA ی ۳۵ ساعته، ۵ = RNA ی ۴۸ ساعته. B) تصویر B بیان ژن SDF-1 نشان داده شده است. در این آنالیز میزان بیان SDF-1 در کشت ۵ ساعته هپاتوسیت ها به عنوان ۱۰۰٪ بیان لحاظ و بیان ژن در سایر ساعات با آن مقایسه شده است. اعداد بر اساس mean±SEM برای آزمایش انجام شده است و در جائی که $P<0.01$ بوده است اختلاف معنی دار تلقی شده است.

www.SID.ir

بحث

جداسازی سلول‌های کبدی یک فرآیند تهاجمی است که داربست سلولی و واکنش‌های سلول در کبد را تغییر می‌دهد و جدا کردن سلول‌ها مشابه آسیب کبدی می‌باشد. در حالت‌های آسیب بافتی از قبیل ترمیم کبد، ایسکمی، التهاب و سرطان کبد مسیرهای انتقال سیگنال مشترکی فعال می‌شوند. شرایط جداسازی و ناهنجاری‌های کبدی ممکن است درشناسایی فاکتورهای مؤثر در پاسخ کبدی به تغییرات محیطی در طول جداسازی کمک کند(۱۰،۱۱). بنابراین بر اساس مطالعات منتشر شده، در این تحقیق بروز یک نوع کموکاین CXC بنام SDF-1α ارزیابی گردید. شواهد روشنی وجود دارد که SDF-1α توسط سلول‌های کبدی جدا شده بارز شده و بنابراین جدا سازی و کشت سلول‌ها باعث فعال شدن ظهور SDF-1α در سطح mRNA می‌گردد. بروز SDF-1α بلافاصله بعد از جداسازی هپاتوسیت‌ها صورت می‌گیرد و تا۲۴ساعت ادامه‌می‌یابد. گزارش شده است که SDF-1α توسط سلول‌های ردهٔ DW4 و سلول‌های CHO که ژن B-CKP به آنها منتقل شده است و پیش سازهای سلول B ظاهر می‌شود(۹،۱۲ تا ۱۴). به علاوه مقایسه مطالعه ما با مطالعات قبلی که در این زمینه انجام شده است نشان می‌دهد که ظهور کموکین دیگری مانند IP-10 از گروه CXC که متعاقب جداسازی و کشت اولیه سلول‌های کبدی و نیز تیمار آنها با شوک حرارتی بیان می‌شود، تطابق دارد(۱۵). ظهور SDF-1α به همراه کموکین دیگری از همین گروه یعنی GRO در سلول‌های هپاتومای H4 متعاقب تنش‌های محیطی نظیر شوک حرارتی، اسمزی و آب اکسیژنه نیز احتمالا بیانگر این واقعیت است‌که این سلول‌ها مانند سلول‌های اولیه کبدی برای مقابله با تغییرات محیطی با تولید کموکین‌ها به مقابله با تنش‌های محیطی می‌پردازند(۱۶) که نتایج به دست آمده در این تحقیق موید تحقیقات انجام شده قبلی است. علاوه بر ظهور کموکین‌ها، ظهور ژن‌های با عملکرد نامشخص نیز که به همراه کموکین‌ها در اثر تنش‌های جداسازی بیان می‌شوند، نیز گزارش شده است که دلیل بیان آنها در پرده‌ای از ابهام است و از آن نمونه می‌توان به ژن BEST5 اشاره کرد که توسط همین گروه تحقیقاتی گزارش گردیده است(۱۷).

فهرست منابع

1. Nagasawa T, Hirota S, Tachibana K, Takakura N, Nishikawa S, Kitamura Y, et al. Defects of B-cell lymphopoiesis and bone-marrow myelopoiesis in mice lacking the CXC chemokine PBSF/SDF-1. ***Nature*** 1996; 382(6592): 635-8.
2. Nagasawa T, Kikutani H, Kishimoto T. Molecular cloning and structure of a pre-B-cell growth-stimulating factor. ***Proc Natl Acad Sci*** 1994; 91(6): 2305-9.
3. Coulomb-L`Hermine A, Amra A, Schiff C, Durand- Gasselin I, Foussat A, Delaunay T, et al. 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. ***Proceeding in National Academy of Science of USA*** 1999; 96: 8585-8590.

Archive of SID

www.SID.ir

4. Terada R, Yamamoto K, Hakoda T, Shimada N, Okano N, Baba N, et al. Stromal cell-derived factor-1 from biliary epithelial cells recruits CXCR4-positive cells: implications for inflammatory liver diseases. ***Lab Invest Laboratory Investigation*** 2003; 83: 665-672.
5. 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.
6. Mitra P, De A, Ethier MF, Mimori K, Kodys K, Shibuta K, Mori M, et al. Loss of chemokine SDF- 1alpha- mediated CXCR4 signalling and receptor internalization in human hepatoma cell line HepG2. ***Cellular Signalling*** 2001; 13: 311-319.
7. Shibuta K, Begum NA, Ori M, Shimoda K, Akiyoshi T, Barnard GF. Reduced expression of the CXC chemokine hIRH/SDF-1alpha mRNA in hepatoma and digestive tract cancer. ***Int J Cancer*** 1997; 73(5): 656-62.
8. Shirozu M, Nakano T, Inazawa J, Tashiro K, Tada H, Shinohara T, et al. Structure and chromosomal localization of the human stromal cell-derived factor 1 (SDF1) gene. ***Genomics*** 1995; 28(3): 495-500.
9. Seglen PO. Preparation of isolated rat liver cells. ***Methods Cell Biol*** 1976; 13: 29-83.
10. Wang, H,Gao X, Fukomoto S, Tademoto S,Sato K,Hirai K. Differential expression and regulation of chemokines JE, KC ands IP-10 gene in primary cultured murine hepatocytes. ***J Cellular Physiology*** 1999; 181: 361-70.
11. 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.
12. Wuyts A, Haelens A, Proost P, Lenaerts JP, Conings R, Opdenakker G, et al. ***J Immunology*** 1996; 157: 1736-43.
13. Nagasawa T, Hirota S, Tachibana K, Takakura N, Nishikawa S, Kitamura Y, et al. Defects of B-cell lymphopoiesis and bone-marrow myelopoiesis in mice lacking the CXC chemokine PBSF/ SDF-1. ***Nature*** 1996; 382(6592): 635-8.
14. Nagasawa T, Tachibana K, Kishimoto T. A novel CXC chemokine PBSF/SDF-1 and its receptor CXCR4: their functions in development, hematopoiesis and HIV infection. ***Semin Immunol*** 1998; 10(3): 179-85.
15. Hassanshahi G.G, Patel S.S, Jafarzadeh A.A, Dickson A.J. Expression of CXC chemokine IP-10/ Mob-1 by primary hepatocytes following heat shock. ***Saudi Medical Journal*** 2007; 28(4): 514-518.

Archive of SID

www.SID.ir

۱۷. حسن شاهی غلامحسین، جعفرزاده عبدالله، حکیمی حمید، رضائیان محسن، وزیری نژاد رضا، طباطبایی سیدضیاء، اسماعیلی عباس، دیکسون الن. بررسی اثر استرس بر بیان ژن BEST-5 در سلول های کبدی کشت داده شده موش صحرایی و کلونینگ این ژن. ***مجله دانشگاه علوم پزشکی کرمان***. پاییز ۱۳۸۵ سال سیزدهم شماره ۴. صفحه ۷۸.

16. Hassanshahi GH, Hajizadeh MR, Zia Sheikhoaleslam N, Jafarzadeh A, Mirzaii MR, Sadeghi A, Ghoreshi Z, Gashiri Esfahani A, Dickson A. ***Gene cloning and expression analysis of Gro/KC by primary hepatocytes***. J Mazand Uni Med Sci 2007; 17(67): 32-41.

Archive of SID

www.SID.ir