بررسی روند آپپتوز ناشی از مورفین در سلولهای PC12: نقش پروتئین Bax و Bcl_2

دکتر حبیب اسلامی [۱] **دکتر علی محمد شریفی** [۲]

[۱] استادیار گروه فارماکولوژی، مرکز تحقیقات پزشکی مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی هرمزگان [۲] استاد گروه فارماکولوژی، مرکز تحقیقات علوم دارویی رازی، دانشگاه علوم پزشکی تهران

مجله پزشکی هرمزگان سال شانزدهم شماره دوم خرداد و تیر ۹۱ صفحات ۸۸-۸۱

چکیده

مقدمه: *مطالعات نشان داده‌اند که مورفین موجب آپپتوز سلولهای عصبی می‌شود. اما مکانیسم دقیق مولکولی آن هنوز مشخص نشده است. در مطالعه حاضر نقش پروتئین های Bax و Bcl_2 درآپپتوز ناشی از مورفین در سلولهای PC12 که یک رده سلولی عصبی هستند، مورد بررسی قرار گرفت.*

روش کار: *در این مطالعه تجربی، توان حیاتی سلولها بعد از مواجهه با مورفین توسط روش MTTارزیابی شد. آپپتوز ناشی از مورفین توسط فراگمنتاسیون DNA بررسی شد. جهت بررسی تغییرات بیان پروتئین Bax و$Bcl2$ از روش ایمونوبلاتینگ استفاده شد.*

نتایج: *مورفین (۱ میلی مولار) بعد از ۹۶ ساعت، مرگ سلولی معنی‌داری در سلولهای تیمار شده نسبت به سلولهای کنترل ایجاد کرد ($P<۰/۰۵$) که با الگوی نردبانی فراگمنتاسیون DNA مشاهده گردید. نتایج ایمونوبلاتینگ نشان داد که بیان پروتئین Bax در سلولهای تحت تیمار به طور معنی‌داری نسبت به گروه کنترل افزایش دارد. در حالی که تغییر معنی‌داری در بیان Bcl2 مشاهده نشد. همچنین نسبت بین این دو پروتئین Bax/Bcl-2 نیز افزایش معنی‌داری را نشان داد ($P<۰/۰۱$).*

نتیجه‌گیری: *مورفین موجب القا آپپتوز در سلولهای PC12 در مسیر داخلی می‌گردد. در این میان پروتئین Bax نقش مهمی ایفا می‌کند.*

کلیدواژه‌ها: *سلولهای PC12 – مورفین – آپپتوز – میتوکندری*

نویسنده مسئول:
دکتر حبیب اسلامی
دانشکده پزشکی، مرکز تحقیقات پزشکی مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی هرمزگان
بندرعباس – ایران
تلفن: ۳۶۵۳ ۸۹۴ ۹۱۷ ۹۸+
پست الکترونیکی:
islamidulabi@yahoo.com

دریافت مقاله: ۹۰/۵/۲۲ اصلاح نهایی: ۹۰/۱۰/۵ پذیرش مقاله: ۹۰/۱۰/۲۱

مقدمه:

داروهای اپیوئیدی موجب القا آپپتوز در رده‌های مختلف سلولی می‌گردند (۳-۱). مورفین یک داروی ضد درد اپیوئیدی بوده که به میزان زیادی مورد سوءاستفاده قرارمی‌گیرد و می‌تواند باعث آپپتوز نورونها شود (٤). این سمیت عصبی مورفین ممکن است با بسیاری از عوارض جانبی آن مانند هیپر آلژزی، اختلالات تکاملی و ایجاد تحمل که مصارف بالینی آن را محدود می‌کند، مرتبط باشد (۷-۵). بنابراین تحقیق در مورد مکانیسم‌های دقیق مولکولی سمیت عصبی مورفین، می‌تواند جهت کنترل عوارض جانبی و سوءمصرف مورفین سودمند بوده و همچنین راهگشای کشف هدفهای جدید دارویی در این زمینه گردد (۸).

مطالعات متعددی در مورد مکانیسم‌های مولکولی سمیت عصبی مورفین انجام یافته است (٤). در یک مطالعه نشان داده شد که مورفین از طریق کاهش سطح دوپامین داخل سلولی که با افزایش متابولیسم دوپامین و آسیب اکسیداتیو به سلول همراه است، موجب مرگ نورونها می‌گردد (۹). همچنین میتوکندری به عنوان میانجی مهم در این رابطه مطرح شده است (٤). یک مطالعه اخیر نیز نقش کاسپاز ۳ از طریق مکانیسم وابسته به گیرنده اپیوئیدی را در این فرآیند مطرح کرده است

Archive of SID
www.SID.ir

(۷). آدنیلیل سیکلاز و پروتئین کیناز A هم ممکن است در آپپتوز ناشی از مورفین در سلولهای شاخی پشتی نخاع نقش داشته باشند (۱۰). اما هنوز مکانیسم دقیق مرگ نورونها در اثر مورفین مشخص نگردیده است (۸).

آپپتوز یا مرگ سلولی برنامه‌ریزی شده، یک فرآیند طبیعی و فعال مرگ سلولی در هنگام تکامل بوده که بعد از مواجهه شدن سلولها با عوامل سیتوتوکسیک هم رخ می‌دهد (۱۱). مشخصات اصلی آپپتوز شامل چروکیده شدن سلول، آسیب به غشا، متراکم شدن کروماتین و قطعه قطعه شدن DNA می‌باشد (۱۲). تنظیم آپپتوز بسیار پیچیده بوده و پروتئین‌های مختلف در آن دخیل هستند. خانواده پروتئینی Bcl2 که شامل پروتئین‌های مهارکننده و پیش‌برنده آپپتوز هستند، از تنظیم کننده‌های اساسی این فرآیند به شمار می‌روند (۱۳). پروتئین Bcl2 به عنوان سرکوبگر در حالی که Bax پیش‌برنده فرآیند آپپتوز است. Bcl2 از طریق اتصال به کانال‌های موجود بر روی غشاء خارجی میتوکندری موجب حفظ یکپارچگی این غشا می‌شود (۱٤). بعد از مواجهه شدن سلولها با عوامل القاکننده آپپتوز، Bax از سیتوپلاسم به غشا میتوکندری انتقال یافته و تغییراتی در نفوذپذیری غشا خارجی ایجاد می‌کند. این تغییرات باعث آزاد شدن سیتوکروم c و سایر فاکتورهای پیش‌برنده آپپتوز از میتوکندری شده و در نهایت منجر به قطعه قطعه شدن DNA می‌شود. این مسیر را مسیر میتوکندریایی آپپتوز می‌نامند (۱۵).

رده سلولی فئوکروسیتومای رت PC12 ویژگیهای یک نورون را دارا بوده و بصورت گسترده به عنوان مدل در تحقیقات مرگ سلولی نورون‌ها استفاده می‌شود (۱٦،۱۷).

مطالعه حاضر جهت بررسی آپپتوز سلولهای PC12 ناشی از مورفین و تعیین نقش پروتئین‌های Bax و Bcl2 انجام می‌گیرد.

روش کار:

سلولهای PC12 از انستیتو پاستور تهران تهیه شد. مواد مورد نیاز کشت سلولی از شرکت Gibco، فلاسک‌ها و میکروپلیت‌ها از شرکت Greiner خریداری شدند. سلولها در محیط کشت DMEM (Dulbecco's-Modified Eagle Medium) به مراه ۵٪ سرم جنین گاوی FBS (Fetal Bovine Serum)، ۱۰٪ سرم اسب HS (Horse Serum) و ۱٪ پنی‌سیلین – استرپتومایسین(100U/ml پنی‌سیلین و 100μg/ml استرپتومایسین) و در انکوباتور (Memert, Germany) با رطوبت ۹۰٪ CO2 ۵٪ و دمای ۳۷°C کشت داده شدند. محیط کشت سلولها هر ٤۸ ساعت تعویض می‌شد. با پاساژ دادن هر دو تا سه روز، سلولها در فاز لگاریتمی رشد نگهداری می‌شدند.

میزان حیات سلولی توسط تست MTT (-3(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromide) بررسی شد.

MTT زرد رنگ هنگامی که وارد سلولهای زنده می‌شود، بوسیله آنزیم دهیدروژناز این سلولها احیا می‌شود و رسوب بنفش رنگ ایجاد می‌کند. در حدود ۵۰۰۰ سلول در هر خانه پلیت ۹٦ خانه قرار گرفت. بعد از گذراندن زمان ۲٤ ساعت، با مورفین (۱-۰ میلی مولار) به مدت ۷۲ و ۹٦ ساعت تیمار شدند. بعد از اتمام زمان تیمار، ۱۰ میکرولیتر محلول MTT (mg/ml ۵ در PBS) به چاهک‌های پلیت ۹٦ خانه اضافه شد و به مدت ۱ ساعت در انکوباتور ۳۷°C قرار گرفتند. سپس، محتوای چاهکها خالی گردید و ۱۰۰ میکرولیت DMSO (Dimethyl sulfoxide) به هر کدام اضافه شد و به مدت ۱۰ دقیقه جهت حل کردن رسوبهای بنفش MTT، تکان داده شد. جذب نوری آن بوسیله الایزا ریدر در طول موج ۵۷۰ نانومتر اندازه‌گیری شد و توان حیاتی سلولهای تیمار شده نسبت به سلولهای کنترل (سلولهای PC12 که مورفین به محیط کشت آنها اضافه نشده است) محاسبه گردید.

جهت تشخیص آپپتوز در سلولهای PC12 از روش رنگ‌آمیزی Hoechst استفاده شد (۱۸). ابتدا سلولها به مدت ۹٦ ساعت با یک میلی مولار مورفین تیمار شدند. سپس با PBS شتشو شده و به مدت ۳۰ دقیقه با پارافرماآلدهید ٤٪ تثبیت شدند. بعد از اتمام این مرحله سلولها با Hoechst (10µg/ ml) به مدت ۱۰ دقیقه رنگ‌آمیزی شده و توسط میکروسکوپ فلورسنت بررسی گردید.

جهت استخراج پروتئین تام سلولی که برای بررسی فعالیت آنزیمی و ایمونوبلاتینگ استفاده شد، سلولها در فلاسک cm^2

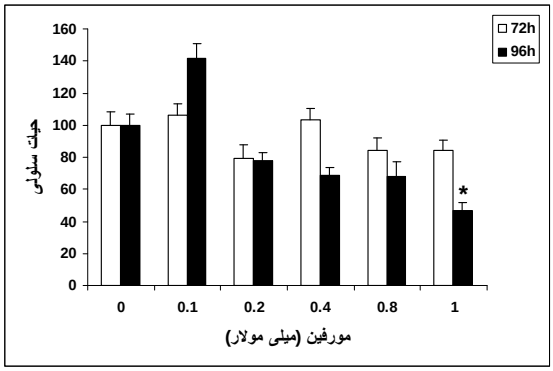
Archive of SID
www.SID.ir

۷۵ کشت داده شدند و بعد از گذراندن زمان ۲٤ ساعت با یک میلی مولار مورفین به مدت ۹٦ ساعت تیمار شدند. سلولهای کنترل و تیمار شده با محلول لیزکننده سلولی یا RIPA (PBS 1X، ۱٪ NP-40، ۰/۵٪ سدیم داکسی کولات، ۰/۱٪ SDS ، ۰/۱ mg/ml فنیل متیل سولفونیل فلوراید (PMSF) و µl/ml ۳۰ آپروتینین) هموژنیزه شدند. بعد از اضافه کردن PMSF (۱۰میکرولیتر از محلول ۱۰ mg/ml) ، به مدت یک ساعت بر روی یخ قرار گرفت. سپس به مدت ۲۰دقیقه (در ٤°C و با شتاب g ۱۵۰۰۰) سانتریفیوژ گردید. محلول رویی حاصل تا زمان انجام آزمایشات در دمای ۸۰°C- نگهداری شدند. غلظت پروتئین توسط روش Bradford اندازه گیری شد (۱۹) و BSA (Bovine serum albumin) به عنوان استاندارد بکار رفت. میزان یکسانی از پروتئین‌های استخراج شده از سلولها، ٦۰ میکروگرم، به روش SDS-PAGE الکتروفورز شده (۲۰) و باندهای پروتئینی به روش بلاتینگ به روی ورقه پلی‌وینیلیدن دی فلوراید (PVDF) منتقل شد. برای شناسایی باندهای مربوط به پروتئین Bax و Bcl2 از آنتی بادی اولیه پلی کلونال بر علیه این پروتئین‌ها استفاده شد (BioVision USA, Mountain View, CA,). از آنتی بادی اولیه بر علیه بتا اکتین به عنوان کنترل داخلی استفاده شد. این آنتی بادیها توسط آنتی‌بادی ثانویه متصل به پراکسیداز (HRP) (Roche Applied Science) شناسایی و به طریق لومینسانس (Roche ECL chemiluminiscence detection kit) ظاهر گردید. فیلم ظاهر شده، اسکن گردیده و شدت باندهای حاصل با استفاده از آنالیز دانسیتومتری به صورت کمی بیان گردید.

داده‌ها به صورت میانگین ± خطای ممعیار (Mean±S.E.M) نشان داده شده‌اند. اختلاف آماری بین گروههای کنترل و تیمار شده با استفاده از آزمون t بررسی شد. در این مطالعه، $P < ۰/۰۵$ از نظر آماری معنی‌دار تلقی شد.

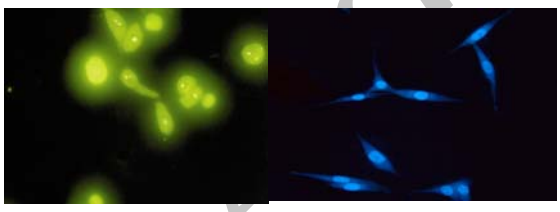
نتایج:

طبق نمودار شماره ۱، مورفین در غلظت ۰/۱ میلی مولار موجب افزایش رشد سلولها گردید، اما در غلظتهای ۱- ۰/۲ میلی مولار به صورت وابسته به دوز توان حیاتی سلولها را کاهش داد که در غلظت یک میلی مولار نسبت به گروه کنترل تفاوت معنی‌داری نشان داد ($P < ۰/۰۵$).



نمودار شماره ۱- اثر مورفین (۱-۰ میلی مولار) بر روی توان حیاتی سلولهای PC12 بعد از ۷۲ و ۹۶ ساعت تیمار کردن. برای هر دوره زمانی، نمونه های کنترل وجود داشت که تیمار نشده بودند. نتایج بصورت mean ± S.E.M نشان داده شده اند. $P < ۰/۰۵$* در مقایسه با گروه کنترل

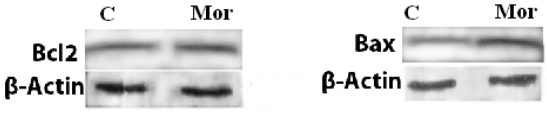
تیمار کردن سلولها به مدت ۹٦ ساعت با یک میلی مولار مورفین، موجب القا آپپتوز در سلولها شده و در عکس میکروسکوپی فلورسنت هسته قطعه قطعه شده مشخص بوده که مؤید آپپتوز می‌باشد (شکل ۱). در حالی که چنین الگویی در سلولهای کنترل دیده نشد.



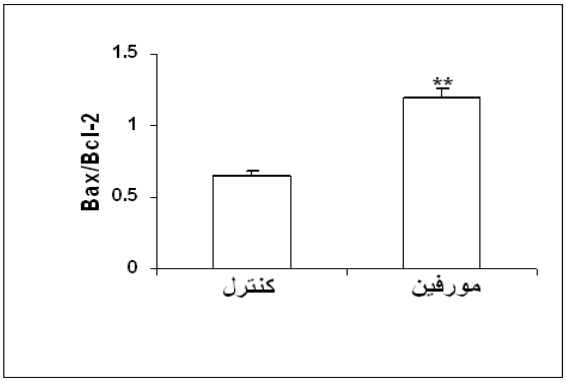
شکل ۱- عکس میکروسکوپ فلورسنت سلولهای PC12 بعد از تیمار با یک میلی مولار مورفین به مدت ۹۶ ساعت (پانل راست) و سلولهای کنترل (پانل چپ) که با Hoechst رنگ‌آمیزی شدند.

مورفین در غلظت یک میلی مولار بعد از ۹٦ ساعت مواجهه با سلولها، باعث افزایش بیان پروتئین Bax گردید. در حالی که تغییر معنی‌دار در بیان پروتئین Bcl_2 مشاهده نشد (شکل۲). نسبت بین این دو پروتئین Bax/Bcl-2 نیز افزایش معنی‌داری را نشان داد ($P < ۰/۰۱$) (نمودار شماره ۲).

Archive of SID
www.SID.ir



شکل ۲- بررسی میزان بیان پروتئین Bax و Bcl2 توسط روش ایمونوبلاتینگ در سلولهای کنترل (C) و سلولهای تیمار شده با یک میلی مولار مورفین به مدت ۹۶ ساعت (Mor).



نمودار شماره ۲- نسبت بین Bax/Bcl-2 در سلولهای کنترل و سلولهای تیمار با یک میلی مولار مورفین به مدت ۹۶ ساعت. نتایج به صورت mean±S.E.M نشان داده شده اند. P< ۰/۰۱در مقایسه با گروه کنترل.**

بحث و نتیجه‌گیری:

تحقیقات متعدد نشان داده‌اند که مورفین موجب القاء آپپتوز در نورونها می‌شود. اگرچه این داروی ضد درد به صورت گسترده در کلنیک بکار رفته و مورد سوءاستفاده قرار می‌گیرد (٤،٢١). مکانیسم دقیق مولکولی سمیت عصبی مورفین هنوز مشخص نشده است. این مطالعه نشان داد که پروتئین Bax نقش مهمی در آپپتوز ناشی از مورفین در سلولهای PC12، احتمالاً از طریق مسیر میتوکندریایی (٢٢)، ایفا می‌کند.

در مطالعه حاضر نقش آپپتوز در مرگ سلولی ناشی از مورفین با دو روش رنگ‌آمیزی Hoechst و بررسی بیان پروتئین Bax و Bcl2 با ایمونوبلاتینگ به اثبات رسید. تیمار سلولهای PC12 با یک میلی مولار مورفین به مدت ٩٦ ساعت، موجب افزایش معنی‌دار بیان پروتئین Bax گردید. این نتایج با مطالعات گذشته که افزایش این پروتئین را در نورونها و دیگر رده‌های سلولی بعد از تیمار طولانی مدت با مورفین گزارش کرده‌اند، همخوانی دارد (٤،٦). اما در بیان پروتئین Bcl2 تغییر معنی‌داری مشاهده نشد و این یافته در تضاد با نتایج تحقیقاتی است که نشان‌دهنده کاهش بیان این پروتئین بعد از مواجهه طولانی مدت سلولها با مورفین است (٦،٢٣). غلظت بالای مورفین استفاده شده در این مطالعه نسبت به مطالعات دیگر می‌تواند توجیه احتمالی این تفاوت باشد.

نسبت Bax/Bcl-2 در این مطالعه بعد از چهار روز تیمار سلولها با مورفین افزایش معنی‌داری نسبت به کنترل داشت (P< ۰/۰۱). این نسبت به عنوان ایندکس فرآیند آپپتوز مطرح شده و تعیین‌کننده مسیر مرگ سلول به سمت آپپتوز بعد از مواجهه با عوامل سیتوتوکسیک است (١٤). پروتئین Bax در وضعیت نرمال سلول به فرم مونومر در سیتوزول یا متصل به غشاءها می‌باشد. اما Bcl2 اساساً در داخل غشای میتوکندری قرار داشته و با پروتئین Bax هترودیمر تشکیل می‌دهد (١٢). این هترودیمیر منجر به خنثی شدن متقابل اثرات پروآپپتوتیک و آنتی‌آپپتوتیک این دو پروتئین می‌شود. تعادل بین میزان بیان Bax و Bcl2 از طریق تنظیم یکپارچگی غشاء خارجی میتوکندری، در فعال کردن مسیر میتوکندریایی آپپتوز دخیل است (٢٤،٢٥). بنابراین افزایش نسبت Bax/Bcl-2 که در این مطالعه مشاهده شده، می‌تواند تا اندازه‌ای بیانگر فعال شدن مسیر میتوکندریای آپپتوز در سلولهای PC12 بعد از تیمار با مورفین باشد.

القاء آپپتوز در سلولهای PC12 بعد از تیمار با مورفین به صورت قطعه قطعه شدن DNA در رنگ‌آمیزی فلورسنت مشاهده گردید که در واقع مرحله انتهایی مرگ آپپتوتیک یک سلول به شمار می‌رود و پروتئین Bax می‌تواند با دو مسیر مختلف این فرآیند را پیش ببرد. فعال شدن Bax و قرار گرفتن آن در غشاء میتوکندری موجب تغییر پتانسیل این غشا و آزادسازی سیتوکروم c می‌شود. در نتیجه کاسپاز ٩ فعال شده و با فعال کردن کاسپاز ٣ موجب آسیب به DNA می‌شود (٢٤). از طرف دیگر، Bax ممکن از مسیر غیر وابسته به کاسپاز آپپتوز را القا کند (٢٦). در این حالت فاکتوری به نام AIF باعث متراکم شدن کروماتین و فراگمنتاسیون DNA می‌شود (٢٧).

Archive of SID

www.SID.ir

در این مطالعه، اتفاقات آپپتوتیک قبل از فعال شدن Bax، بررسی نگردیده است. مورفین در نورونها و دیگر رده‌های سلولی توانسته است با واسطه پروتئین‌هایی مانند Bim و JNK موجب افزایش فعالیت Bax شود (۲۸،۲۹). همچنین مورفین باعث افزایش رادیکالهای آزاد در سلولهای PC12 می‌شود (۹) که این عوامل فعال کننده JNK هستند (۳۰،۳۱). بنابراین این دو مسیر احتمالاً در فعال شدن Bax در سلولهای PC12 بعد از تیمار با مورفین که در این تحقیق مشاهده شد، دخیل هستند.

یافته جالب در این مطالعه، افزایش حیات سلولی بعد از تیمار با مورفین با غلظت۰/۱ میلی مولار به مدت ۹۶ ساعت بود (شکل ۱). این نتیجه در توافق با داده‌های تحقیقاتی است که نشان داده‌اند مورفین در غلظتهای کم می‌تواند نورونها ر ا در برابر مرگ سلولی ناشی از محرومیت از سرم، حفاظت کند (۳۲،۳۳). از طرف دیگر، در مدلهای حیوانی اعتیاد که سمیت عصبی مورفین را گزارش کرده‌اند، غلظت پلاسمایی مورفین در حدود ۲/۵ میلی مولار بوده است (۳٤). یعنی در حدود ۲/۵ برابر غلظتی که در این مطالعه موجب آپپتوز سلولهای PC12 گردید. این یافته‌ها بیانگر این است که مورفین بسته به اینکه در چه دوزی بکار رود می تواند باعث افزایش رشد یا مرگ نورونها شود. بطوریکه در غلظت های کم موجب تقویت رشد اما مصرف طولانی مدت دوزهای بالا، رشد سلولها را مهار می‌کند. این موضوع از این لحاظ اهمیت کلینیکی دارد که احتمال بروز سمیت عصبی این دارو به هنگام تجویز دوزهای بالای آن مثلاً کنترل درد در افراد سرطانی (۳۵) یا سوء مصرف و اعتیاد، وجود دارد.

به طور خلاصه داده‌های این تحقیق نشان داد که مورفین با افزایش فعالیت پروتئین Bax و احتمالاً دخالت مسیر میتوکندریایی آپپتوز موجب مرگ سلولهای PC12 می‌شود. مطالعات بیشتری لازم است تا مکانیسم‌های دیگری که ممکن است در ایجاد مرگ سلولی نورونی ناشی از مورفین دخالت داشته باشند، مشخص شود.

سپاسگزاری:

از گروه رادیولوژی دانشکده پیراپزشکی و مرکز تحقیقات سلولی مولکولی دانشگاه علوم پزشکی تهران صمیمانه قدردانی می‌شود.

منابع References

1. Hsiao PN, Chang MC, Cheng WF, Chen CA, Lin HW, Hsieh CY. Morphine induces apoptosis of human endothelial cells through nitric oxide and reactive oxygen species pathways. *Toxicology*. 2009;256:83-91.
2. Li Y, Sun X, Zhang Y, Huang J, Hanley G, Ferslew KE, et al. Morphine promotes apoptosis via TLR2, and this is negatively regulated by beta-arrestin 2. *Biochem Biophys Res Commun*. 2009;378:857-861.
3. Bryant L, Doyle T, Chen Z, Cuzzocrea S, Masini E, Vinci MC, et al. Spinal ceramide and neuronal apoptosis in morphine antinociceptive tolerance. *Neurosci Lett*. 2009;463:49-53.
4. Cunha-Oliveira T, Rego AC, Oliveira CR. Cellular and molecular mechanisms involved in the neurotoxicity of opioid and psychostimulant drugs. *Brain Res Rev*. 2008;58:192-208.
5. Vella-Brincat J, Macleod AD. Adverse effects of opioids on the central nervous systems of palliative care patients. *J Pain Palliat Care Pharmacother*. 2007; 21:15-25.
6. Mao J, Sung B, Ji RR, Lim G. Neuronal apoptosis associated with morphine tolerance: evidence for an opioid-induced neurotoxic mechanism. *J Neurosci*. 2002;22:7650-7661.

Archive of SID
www.SID.ir

7. Hu S, Sheng WS, Lokensgard JR, Peterson PK. Morphine induces apoptosis of human microglia and neurons. *Neuropharmacology*. 2002;42:829-836.

8. Zhang Y, Chen Q, Yu LC. Morphine: a protective or destructive role in neurons? *Neuroscientist*. 2008;14:561-570.

9. Oliveira MT, Rego AC, Morgadinho MT, Macedo TR, Oliveira CR. Toxic effects of opioid and stimulant drugs on undifferentiated PC12 cells. *Ann N Y Acad Sci*. 2002;965:487-496.

10. Lim G, Wang S, Lim JA, Mao J. Activity of adenylyl cyclase and protein kinase A contributes to morphine-induced spinal apoptosis. *Neurosci Lett*. 2005;389:104-108.

11. Taylor RC, Cullen SP, Martin SJ. Apoptosis: controlled demolition at the cellular level. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2008;9:231-241.

12. Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol*. 2007;35:495-516.

13. Skommer J, Wlodkowic D, Deptala A. Larger than life: Mitochondria and the Bcl-2 family. *Leuk Res*. 2007;31:277-286.

14. Adams JM, Cory S. Bcl-2-regulated apoptosis: mechanism and therapeutic potential. *Curr Opin Immunol*. 2007;19:488-496.

15. Er E, Oliver L, Cartron PF, Juin P, Manon S, Vallette FM. Mitochondria as the target of the pro-apoptotic protein Bax. *Biochim Biophys Acta*. 2006;1757:1301-1311.

16. Haviv R, Lindenboim L, Yuan J, Stein R. Need for caspase-2 in apoptosis of growth-factor-deprived PC12 cells. *J Neurosci Res*. 1998;52:491-497.

17. Martin TF, Grishanin RN. PC12 cells as a model for studies of regulated secretion in neuronal and endocrine cells. *Methods Cell Biol*. 2003;71:267-286.

18. Koyama AH, Akari H, Adachi A, Goshima F, Nishiyama Y. Induction of apoptosis in HEp-2 cells by infection with herpes simplex virus type 2. *Arch Virol*. 1998;143:2435–2441.

19. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*. 1976;72:248-254.

20. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970;227:680-685.

21. Tegeder I, Geisslinger G. Opioids as modulators of cell death and survival--unraveling mechanisms and revealing new indications. *Pharmacol Rev*. 2004;56:351-369.

22. Webb SJ, Harrison DJ, Wyllie AH. Apoptosis: an overview of the process and its relevance in disease. *Adv Pharmacol*. 1997;41:1-34.

23. Boronat MA, Garcla-Fuster MJ, Garcla-Sevilla JA. Chronic morphine induces up-regulation of the pro-apoptotic Fas receptor and down-regulation of the anti-apoptotic Bcl-2 oncoprotein in rat brain. *Br J Pharmacol*. 2001;134:1263-1270.

24. Tsujimoto Y. Cell death regulation by the Bcl-2 protein family in the mitochondria. *J Cell Physiol*. 2003;195:158-167.

25. Armstrong JS. The role of the mitochondrial permeability transition in cell death. *Mitochondrion*. 2006;6:225-234.

26. Selznick LA, Zheng TS, Flavell RA, Rakic P, Roth KA. Amyloid beta-induced neuronal death is bax-dependent but caspase-independent. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2000;59:271-279.

27. Cregan SP, Fortin A, MacLaurin JG, Callaghan SM, Cecconi F, Yu SW, et al. Apoptosis-inducing factor is involved in the regulation of caspase-independent neuronal cell death. *J Cell Biol*. 2002;158:507-517.

28. Harris CA, Johnson EM Jr. BH3-only Bcl-2 family members are coordinately regulated by the JNK pathway and require Bax to induce apoptosis in neurons. *J Biol Chem*. 2001;276:37754-37760.

Archive of SID

www.SID.ir

29. Lin X, Wang YJ, Li Q, Hou YY, Hong MH, Cao YL, et al. Chronic high-dose morphine treatment promotes SH-SY5Y cell apoptosis via c-Jun N-terminal kinase-mediated activation of mitochondria-dependent pathway. *FEBS J*. 2009;276:2022-2036.

30. Aoki H, Kang PM, Hampe J, Yoshimura K, Noma T, Matsuzaki M, et al,.Direct activation of mitochondrial apoptosis machinery by c-Jun N-terminal kinase in adult cardiac myocytes. *J Biol Chem*. 2002;277:10244-10250.

31. Saeki K, Kobayashi N, Inazawa Y, Zhang H, Nishitoh H, Ichijo H, et al. Oxidation-triggered c-Jun N-terminal kinase (JNK) and p38 mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways for apoptosis in human leukaemic cells stimulated by epigallocatechin-3-gallate (EGCG): a distinct pathway from those of chemically induced and receptor-mediated apoptosis. *Biochem J*. 2002;368:705-720.

32. Chen Q, Cui J, Zhang Y, Yu LC. Prolonged morphine application modulates Bax and Hsp70 levels in primary rat neurons. *Neurosci Lett*. 2008;441:311-314.

33. Cui J, Chen Q, Yu LC, Zhang Y. Chronic morphine application is protective against cell death in primary human neurons. *Neuroreport*. 2008; 19: 1745-1749.

34. Roy S, Cain KJ, Chapin RB, Charboneau RG, Barke RA. Morphine modulates NF kappa B activation in macrophages. *Biochem Biophys Res Commun*. 1998; 245:392-396.

35. Zech DF, Grond S, Lynch J, Hertel D, Lehmann KA. Validation of World Health Organization Guidelines for cancer pain relief: a 10-year prospective study. *Pain*. 1995;63:65-76.

Archive of SID

www.SID.ir

Morphine-induced apoptosis in PC12 cells: role of Bax and Bcl2

H. Eslami, PhD [1] A. Sharifi, PhD [2]

Assistant Professor Department of Pharmacology [1], Research Center for Molecular Medicine, Hormozgan University of Medical Sciences, Bandar Abbas, Iran. Professor Department of Pharmacology [2], Razi Institute for Drug Research, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

(Received 13 Aug, 2010 Accepted 11 Jan, 2012)

ABSTRACT

Introduction: It was reported that morphine could induce apoptosis in neurons. However, its specific mechanistic pathways remain elusive. The present study was undertaken to determine whether morphine could induce apoptosis in PC12 cells, a neuronal cell line, and the involvement of Bax and Bcl-2, as upstream factors of mitochondrial pathway.

Methods: In an experimental study, the viability of PC12 cells exposed to morphine was measured by MTT assay. Subsequently, to confirm whether morphine could induce apoptosis, analysis of DNA fragmentation in PC12 cells was carried out. Moreover, the alteration in expression of pro- apoptotic, Bax and anti-apoptotic, Bcl-2, proteins were measured by Western blotting.

Results: The results showed that morphine (1mM) significantly reduced the cell viability after 96 h and induced apoptosis in PC12 cells, as evidenced by a DNA ladder pattern, a hallmark of apoptosis. In Western blot analysis, the Bax pro-apoptotic expression in treated rats was significantly increased while there was no change in Bcl2 expression, so that the ratio of Bax/Bcl-2 protein expression in cells treated with morphine was significantly increased compared to controls.

Conclusion: These data support the idea that morphine can induce apoptosis in PC12 cells, possibly by the mitochondrial pathway through higher expression of Bax pro-apoptotic protein.

Correspondence:
H. Islami, PhD.
Medical School, Research Center for Molecular Medicine.
Hormozgan University of Medical Sciences.
Bandar Abbas, Iran
Tel:+98 917 894 3653
Email:
islamidulabi@yahoo.com

Key words: PC12 Cells – Morphine – Apoptosis – Mitochondria

Archive of SID

www.SID.ir