

اثر دو پکتین سیب یا اسید پکتیک (AP) و پکتین تغییر یافته مرکبات (MCP) بر ترشح نیتریک اکساید در دودمان سلولهای توموری هیپوفیز موش GH3/B6

حسن مقتدری^۱، حوری سپهری^{۱*}، آمنه رضایوف^۱، لادن دلفی^۱ و سارا دشت بزرگی^۱

تهران، دانشگاه تهران، پردیس علوم، دانشکده زیست‌شناسی، گروه فیزیولوژی جانوری

تاریخ پذیرش: ۹۲/۸/۲۷

تاریخ دریافت: ۹۱/۹/۱۸

چکیده

پکتین‌ها ترکیبات پلی ساکاریدی دیواره سلولی گیاهان می‌باشند که قادر به القای آپوپتوز در سلولهای توموری هستند. مطالعه حاضر اثر این مواد را بر آزادسازی نیتریک اکساید در سلولهای لاکتوتروف GH3/B6 که از سلولهای غده ای هیپوفیز موش می‌باشند، مورد بررسی قرار می‌دهد. تأثیر نیتریک اکساید بر سلولهای توموری به نوع سلول و غلظت آن بستگی دارد، به طوری که قادر به ایفای هر دو نقش مهار و تسهیلی در روند آپوپتوز می‌باشد. در پژوهشهای انجام شده نشان دادند که آنزیم نیتریک اکساید سنتتاز، در دودمان سلولی هیپوفیز موش، GH3/B6 بیان می‌شود و باعث تولید نیتریک اکساید از ال-آرژنین می‌گردد. در این مطالعه سلولهای GH3/B6 پس از تیمار با غلظتهای مختلف اسید پکتیک یا پکتین سیب (AP) و پکتین تغییر یافته مرکبات (MCP)، سنجش نیتریک اکساید در آنها انجام شد و سپس درصد مهار تکثیر سلولی با استفاده از تست MTT تعیین گردید. در این پژوهش، انکوباسیون سلولها با ۱ mg/ml اسید پکتیک، پس از ۴ ساعت، موجب افزایش ۴۰ درصدی ترشح نیتریک اکساید نسبت به گروه شاهد می‌گردد، در حالی که غلظتهای مختلف پکتین تغییر یافته مرکبات (MCP) تأثیری بر ترشح نیتریک اکساید ندارد. مساله قابل ملاحظه این است که، غلظتهای ۲/۵ mg/ml و ۵ از اسید پکتیک و ۳ و ۵ mg/ml از پکتین تغییر یافته مرکبات در انکوباسیون ۲۴ و ۴۸ ساعت، مهار تکثیر سلولها را موجب می‌گردند. نتیجه کلی در این مطالعه را می‌توان چنین بیان کرد که AP موجب آزاد سازی نیتریک اکساید از سلولهای GH3/B6 می‌شود. در حالی که پکتین مرکبات (MCP) فاقد این اثر می‌باشد، اما هر دو پکتین بر تکثیر سلولی اثر مهار دارند بنابراین AP از راه آزادسازی نیتریک اکساید این مهار را انجام می‌دهد و MCP مسیر عملکردی دیگری مستقل از آزادسازی نیتریک اکساید را دارا می‌باشد.

واژه های کلیدی: اسید پکتیک، پکتین تغییر یافته مرکبات (MCP)، نیتریک اکساید، سلولهای GH3/B6

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۲۱۶۱۱۲۶۲۶، پست الکترونیکی: hsepehri@khayam.ur.ac.ir

مقدمه

که به نیتریک اکساید فعال ویژه (RNOS) شهرت دارد. RNOS نوع ویژه ای از نیتریک اکساید است که از اکسید شدن نیتریک اکساید توسط سوپر اکسید تولید می‌شود و باعث ایجاد رادیکالهای آزاد نیتریک اکساید می‌گردد. این مواد میل ترکیبی بالایی برای پروتئینها و نوکلوتیدها دارند که شامل نیتروژن دی اکساید، نیتروژن تری اکساید، دی نیتروژن تری اکساید و دی نیتروژن تترا اکساید می‌باشند.

نیتریک اکساید برای اولین بار در سال ۱۹۸۷ به عنوان یک فاکتور شل کننده در عروق کشف شد (۱۳). این ماده چربی دوست است و قابلیت انتشار بالایی برای عبور از عرض غشاء دارد، فعالیت آن به نوع سلول هدف و تراکم آن بستگی دارد (۱۸). نیتریک اکساید دارای نیمه عمر کوتاهی است که بین ۱۵-۴۵ ثانیه است (۲۰). این ماده به تنهایی قادر به ایجاد واکنش با پروتئینها و نوکلوتیدها نمی‌باشد ولی در حضور سوپر اکساید واکنش پذیر می‌گردد،

۲- ایزوفریم غیر وابسته به کلسیم: در این ایزوفریم مقدار تولید نیتریک اکساید در حد میکرومولار است که شامل یگ گروه می باشد.

- نیتریک اکساید سنتتاز القایی (iNOS) که ابتدا در سلولهای ایمنی کشف شد و اینترلوکین ها و TNF- α می توانند آن را فعال کنند(۲۲).

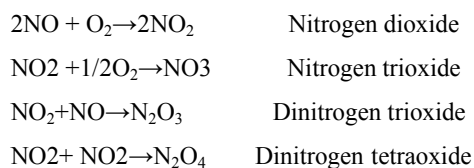
لازم به ذکر است که، نقش نیتریک اکساید در سلولهای سرطانی به خوبی شناخته نشده است و اثر این ماده به نوع سلول و مقدار تراکم آن بستگی دارد. تحقیقات نشان داده است که، نیتریک اکساید در بعضی از سلولها نقش آپوپتوزی (۸) و در بعضی دیگر نقش ضد آپوپتوزی دارد. به عنوان مثال، اضافه کردن دهنده های نیتریک اکساید به سلولهای مونوسیت U937 باعث جلوگیری از روند آپوپتوز در این سلولها می شود (۱۲). در ضمن، در سلولهای سرطان سینه انسان MCF-7 تراکم پایین از یک دهنده نیتریک اکساید مانند سدیم نیترو پروساید (SNP) باعث مهار آپوپتوز می شود در حالی که، تراکم بالای آن قادر به القای آپوپتوز در این سلولها می باشد (۷). علاوه بر این، در سلولهای ماکروفاژی Raw-264، دهنده های نیتریک اکساید مانند نیتروگلوتامین و SNP باعث القای بیان پروتئین p53 و افزایش بروز آپوپتوز در این سلول می گردند (۶).

در تحقیق حاضر از دودمان سلول توموری هیپوفیز موش GH3/B6 استفاده شد که قابلیت سنتز و ترشح هورمون رشد و پرولاکتین را دار می باشد (۱۰). در ضمن، این دودمان سلولی ایزوفریمهای iNOS و nNOS را نیز بیان می کند (۱۹).

مواد و روشها

- کشت سلول GH3/B6: سلولهای GH3/B6 در محیط کشت HamsF12 (GIBCO) به همراه ۱۲/۵ درصد سرم اسب (HIMEDIA) و ۲/۵ درصد سرم جنین گوساله

واکنش شیمیایی تولید RNOS به صورت زیر می باشد (۲۱).



RNOS می تواند با بار مثبت یونهای فلزی موجود در کمپلکس آنزیمها واکنش دهد، مانند واکنش نیتریک اکساید با آهن موجود در هموگلوبین که باعث تولید آنیون NO_3^- و مت هموگلوبین می گردد. ترکیب یون NO_3^- با آهن موجود در گوانیل سیکلاز باعث تولید کمپلکس آهن- نیتروزیل و غیر فعال شدن گوانیل سیکلاز می گردد. آنیون NO_3^- می تواند باعث القای آسیب به DNA، پراکسیداسیون لیپیدها و شکستن پروتئینها گردد (۵).

نیتریک اکساید از ال- آرژنین ساخته می شود. برای انجام این واکنش FAD، NADPH، BH4 و اکسیژن لازم است. محصولات این واکنش نیتریک اکساید و سیتروکین می باشند. کاتالیز این واکنش توسط آنزیم نیتریک اکساید سنتتاز صورت می گیرد (۱۵ و ۱۶).

ایزوفریمهای مختلفی از آنزیم نیتریک اکساید سنتتاز (NOS) وجود دارد که در یک دامنه وسیع از شرایط فیزیولوژیک و پاتولوژیک فعال می گردند. این ایزوفریمها در دو گروه کلی قرار می گیرند.

۱- ایزوفریمهای وابسته به کلسیم: این ایزوفریمها مقدار نیتریک اکساید کمتری نسبت به گروه دیگر تولید می کنند که مقدار آن در حد نانومولار است. این ایزوفریمها شامل دو گروه می باشند که عبارتند از:

- نیتریک اکساید سنتتاز اندوتلیوم رگی (eNOS) که در گشاد کردن رگها مؤثر است (۳).

- نیتریک اکساید سنتتاز عصبی (nNOS) که در سلول عصبی فعال می باشد و در پلاستیسته نوروئی دخالت دارد (۱۴).

قرار گرفتند. پس از طی زمان مورد نظر به هر چاهک $20 \mu\text{l}$ از محلول MTT (SIGMA) با غلظت 5mg/ml اضافه شد و در دمای 37°C درجه سانتی‌گراد برای مدت ۳ ساعت انکوبه گردید. سپس پلیت حاوی سلولها از انکوباتور خارج شده و محیط روی سلولها تخلیه و به چاهکهای مورد نظر $200 \mu\text{l}$ DMSO (SIGMA) اضافه گردید. سپس میزان جذب با دستگاه microplate Reader در طول موج 630nm مورد بررسی قرار گرفت. برای به دست آوردن مهار تکثیر سلول از فرمول زیر استفاده گردید (۱۸). بر این اساس مهار تکثیر سلولها در زمانهای مختلف و غلظتهای مختلف ماده مورد نظر به دست آمد.

(GIBCO) غیر فعال شده کشت داده شد. شرایط اتمسفری مناسب برای رشد این سلولها رطوبت ۹۵ درصد، دمای 37°C درجه سانتی‌گراد و ۵ درصد دی‌اکسید کربن می‌باشد. این سلولها به صورت تک‌لایه به سطح فلاسک چسبیده و تکثیر می‌شوند (۱ و ۲).

- بررسی درصد مهار تکثیر سلول: برای به دست آوردن درصد مهار تکثیر سلول از روش MTT استفاده شد. 200 در هر چاهک پلیت ۹۶ خانه ای تعداد 10^4 سلول کشت داده شد. سلولها پس از ۷۲ ساعت پیش‌انکوباسیون، با غلظتهای مختلف AP (FLUKA) ، MCP ، EcoNugenics) و SNP (MERCK) تیمار شد. سپس پلیتها برای مدت زمانهای ۶، ۲۴ و ۴۸ ساعت در انکوباتور

میانگین جذب نمونه های تیمار شده

میانگین جذب نمونه های کنترل

-۱ = درصد مهار تکثیر

- سنجش نیتریک اکساید: برای سنجش نیتریک اکساید از واکنشگر گریس استفاده شد. بدین منظور تعداد 10^5 سلول در هر چاهک مولتی دیشهای ۲۴ خانه ای کشت داده شد. پس از ۷۰ ساعت پیش‌انکوباسیون، سلولها با غلظتهای مختلف AP ، MCP ، و SNP تیمار شدند. پلیتها برای زمانهای ۲، ۴، ۶، ۲۴ و ۴۸ ساعت در انکوباتور قرار گرفتند. پس از طی زمان مورد نظر $50 \mu\text{l}$ از محیط رویی سلول را برداشته و به آن $50 \mu\text{l}$ محلول سولفانیل آمید

(MERCK) اضافه گردید و سپس $50 \mu\text{l}$ محلول NED (Naphthylethyl-enediamindihydrochloride) (MERCK) نیز به همه چاهکها اضافه گردید. جذب با دستگاه microplate Reader در طول موج 570nm خوانده شد. میزان جذب در این طول با مقدار آزاد سازی نیتریک اکساید رابطه مستقیم دارد (۱۱). میزان ترشح نیتریک اکساید برای هر غلظت از مواد مورد استفاده جهت تیمار از رابطه زیر استفاده شد:

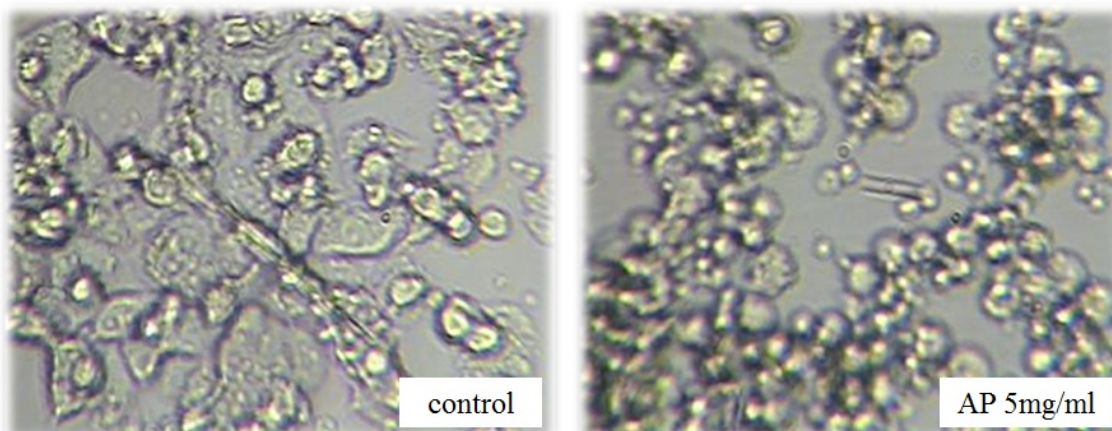
میانگین جذب نمونه های تیمار شده

= میزان ترشح نیتریک اکساید

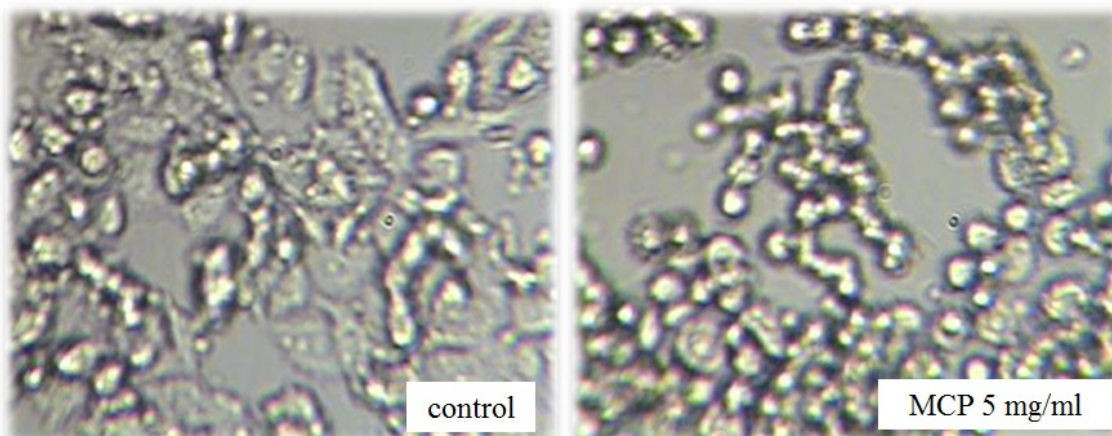
میانگین جذب نمونه های کنترل

است. $P \leq 0.05$ به عنوان اختلاف معنی دار محاسبه گردید. نتایج به صورت $\pm \text{SEM}$ میانگین ($n=3$) نشان داده شد.

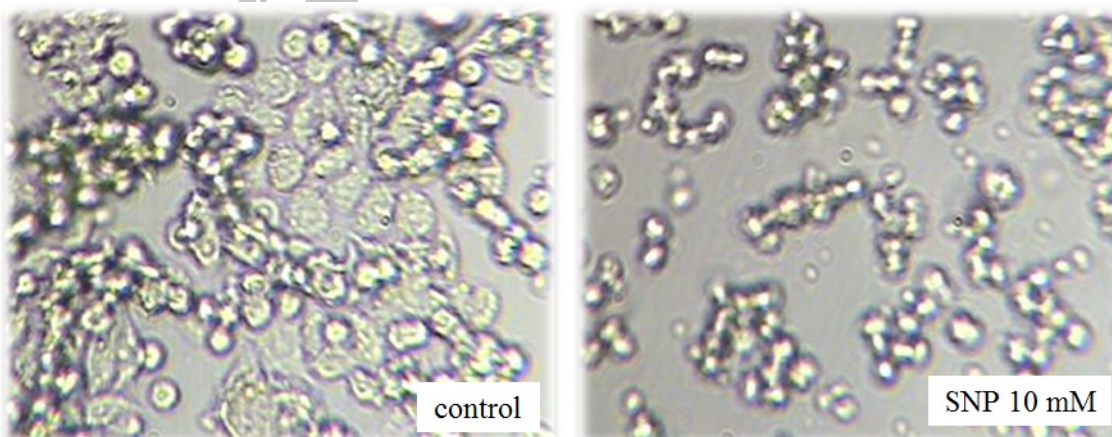
آنالیز آماری: آنالیزهای آماری با استفاده از نرم افزار SPSS 15 و تست پارامتریک ANOVA یک طرفه انجام شده



شکل ۱- تغییرات مورفولوژیکی سلولها پس از تیمار با ۵ mg/ml اسید پکتیک در زمان انکوباسیون ۴۸ ساعت. در تصویر سمت راست کاهش حجم سلول و گرانوله شدن سلولها نشان داده شده است تصویر سمت چپ گروه کنترل می باشد.



شکل ۲- تغییرات مورفولوژیکی سلولها پس از تیمار با MCP ۵ mg/ml در زمان انکوباسیون ۴۸ ساعت. در تصویر سمت راست کاهش حجم سلول و گرانوله شدن سلولها نشان داده شده است تصویر سمت چپ گروه کنترل می باشد.



شکل ۳- تغییرات مورفولوژیکی سلولها پس از تیمار با SNP10mM در زمان انکوباسیون ۴۸ ساعت. در تصویر سمت راست کاهش حجم سلول و گرانوله شدن سلولها نشان داده شده است تصویر سمت چپ گروه کنترل می باشد.

نتایج

– اثر AP، MCP و SNP بر مورفولوژی سلولهای GH3/B6: به منظور مطالعه اثر AP، MCP و SNP بر مورفولوژی سلولهای GH3/B6، تعداد 10^4 سلول در هر چاهک پلیت ۹۶ خانه ای کشت داده شد. مدت پیش انکوباسیون ۷۲ ساعت در نظر گرفته شد. سپس غلظتهای مختلف از AP (شکل ۱)، MCP (شکل ۲)، SNP (شکل ۳) در زمان ۴۸ ساعت روی سلولها اثر داده شد. این سلولها به وسیله میکروسکوپ اینورت مورد بررسی و عکسبرداری قرار گرفتند.

تغییرات مورفولوژیکی سلولهای GH3/B6 پس از سپری شدن ۴۸ ساعت به ترتیب زیر می باشد

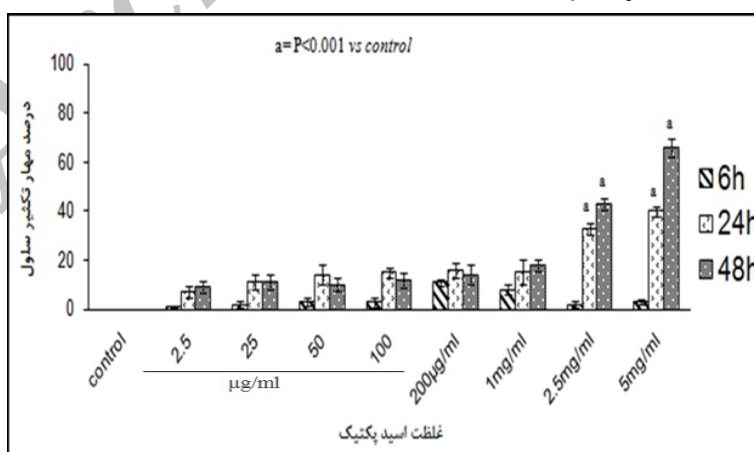
- ۱- گروه سلولهایی که نمونه کنترل می باشند در آنها تغییری از این نظر ایجاد نشده است.
- ۲- در سلولهای تیمار شده با دوز بالا AP، MCP و SNP تغییراتی نظیر چروکیده شدن غشاء، کاهش حجم سلول و گرانوله شدن آن مشاهده گردید. ضمناً تعدادی از سلولها از کف فلاسک جدا شده و شناور گردیدند.

– بررسی درصد مهار تکثیر سلولهای GH3/B6 به وسیله تست MTT: AP و MCP در زمان ۶ ساعت تیمار تأثیر محسوسی بر درصد مهار تکثیر سلولهای GH3/B6

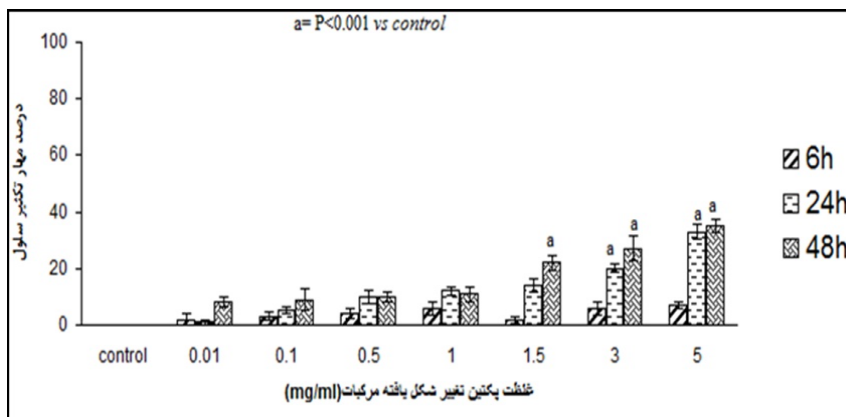
نداشت، اما AP در زمان ۲۴ و ۴۸ ساعت در غلظتهای ۵ و ۲/۵ mg/ml باعث افزایش معنی دار درصد مهار تکثیر سلولها نسبت به گروه کنترل گردید ($p < 0.001$) (شکل ۴). همچنین MCP در زمان ۲۴ و ۴۸ ساعت با غلظتهای ۵ و ۳ mg/ml باعث افزایش معنی دار مهار تکثیر سلولهای GH3/B6 نسبت به گروه کنترل می شود. ($p < 0.001$) (شکل ۵).

SNP با غلظتهای ۲۰، ۱۰، ۵ و ۶ ساعت انکوباسیون باعث افزایش معنی دار مهار تکثیر سلولهای GH3/B6 نسبت به گروه کنترل شد ($p < 0.001$). این ماده در زمانهای ۲۴ و ۴۸ با غلظتهای ۲۰، ۱۰، ۵، ۱ افزایش معنی دار مهار تکثیر سلولهای GH3/B6 نسبت به گروه کنترل را نشان داد ($p < 0.001$) (شکل ۶).

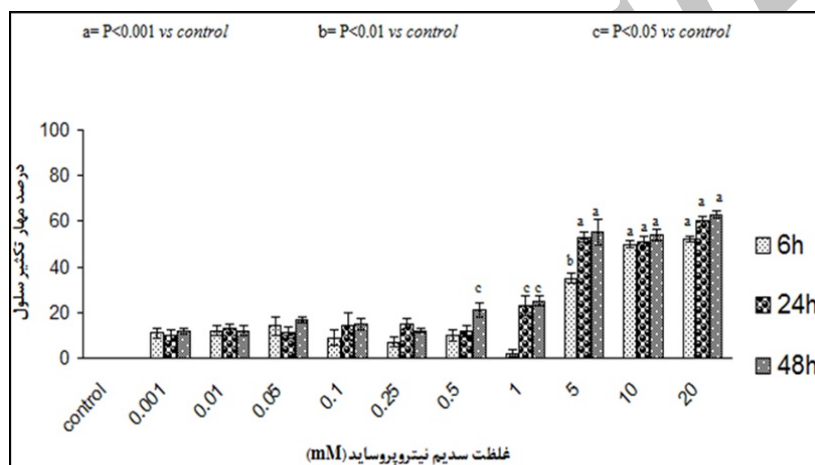
بنابراین می توان این گونه نتیجه گرفت که، درصد مهار تکثیر سلولهای GH3/B6 تحت تأثیر AP، MCP و SNP در یک حالت وابسته به دوز و زمان، افزایش نشان می دهد. در ضمن مهار تکثیر سلولهای GH3/B6 که تحت انکوباسیون ۴۸ ساعت قرار گرفته اند افزایش معنی داری نسبت به مهار تکثیر سلول در انکوباسیون ۲۴ ساعت نشان داد ($p < 0.001$).



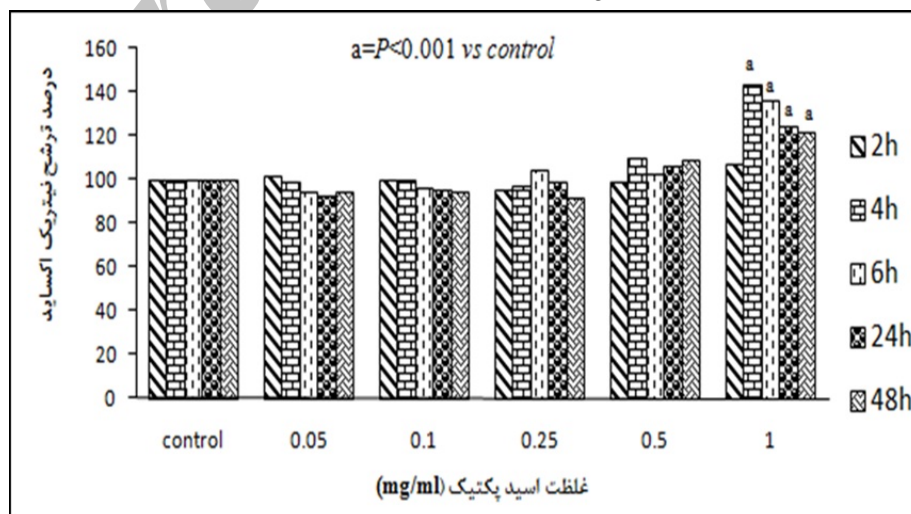
شکل ۴- اثر غلظتهای متفاوت اسید پکتیک بر درصد مهار تکثیر سلولهای GH3/B6 پس از ۶ و ۲۴ و ۴۸ ساعت انکوباسیون. غلظتهای ۲/۵ و ۵ mg/ml باعث افزایش معنی دار مهار تکثیر سلولهای تحت تیمار نسبت به گروه کنترل شده است. مقادیر ارائه شده معادل $\text{mean} \pm \text{S.E.M}$ می باشند. ($N=3$ و $a = p < 0.001$)



شکل ۵- اثر غلظت‌های متفاوت پکتین تغییر شکل یافته مرکبات بر درصد مهار تکثیر سلولهای GH3/B6 پس از ۶، ۲۴ و ۴۸ ساعت انکوباسیون. غلظت‌های ۱/۵، ۳ و ۵ mg/ml باعث افزایش معنی دار مهار تکثیر سلولهای تحت تیمار نسبت به گروه کنترل شده است. مقادیر ارائه شده معادل mean ± S.E.M می باشند. (a = p < 0.001 و N = 3)



شکل ۶- اثر غلظت‌های متفاوت سدیم نیتروپروساید بر درصد مهار تکثیر سلولهای GH3/B6 پس از ۶، ۲۴ و ۴۸ ساعت انکوباسیون. غلظت‌های ۰.۵، ۱، ۵، ۱۰، ۲۰ میلی مولار سدیم نیتروپروساید تفاوت معنی داری در افزایش مهار تکثیر سلولهای تیمار شده نسبت به کنترل ایجاد کرده است. مقادیر ارائه شده معادل mean ± S.E.M می باشند. (a = p < 0.001, b = p < 0.01, c = p < 0.05 و n = 3)



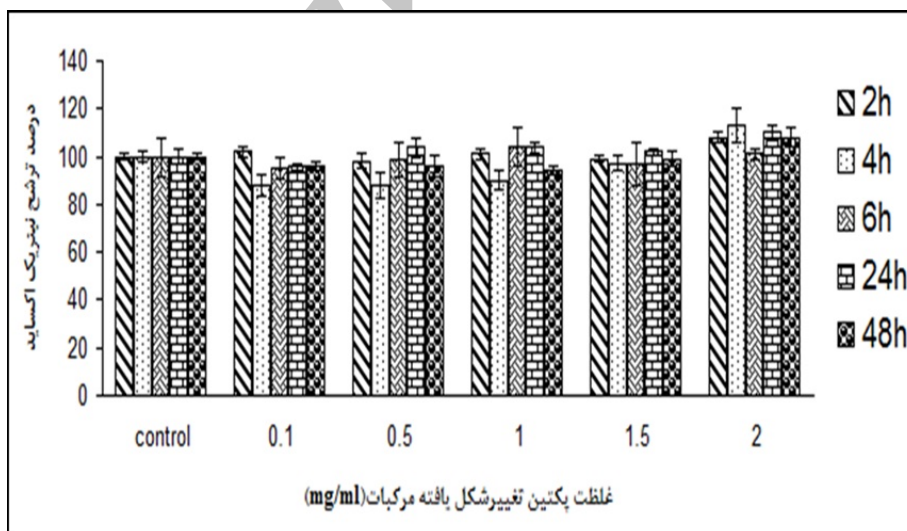
شکل ۷- اثر غلظت‌های متفاوت اسید پکتیک بر ترشح نیتریک اکساید در سلول‌های GH3/B6 پس از ساعت ۲، ۴، ۶، ۲۴ و ۴۸ انکوباسیون. غلظت AP باعث افزایش معنی‌دار بر ترشح نیتریک اکساید از سلول‌های تحت تیمار نسبت به گروه کنترل شده است. ($a = p < 0.001$ و $N=3$)

معنی‌داری بر ترشح نیتریک اکساید از سلول‌های نشان نمی‌دهد که احتمالاً دلیل آن مصرف تمام SNP بعد از این مدت می‌باشد. (شکل ۹).

بحث

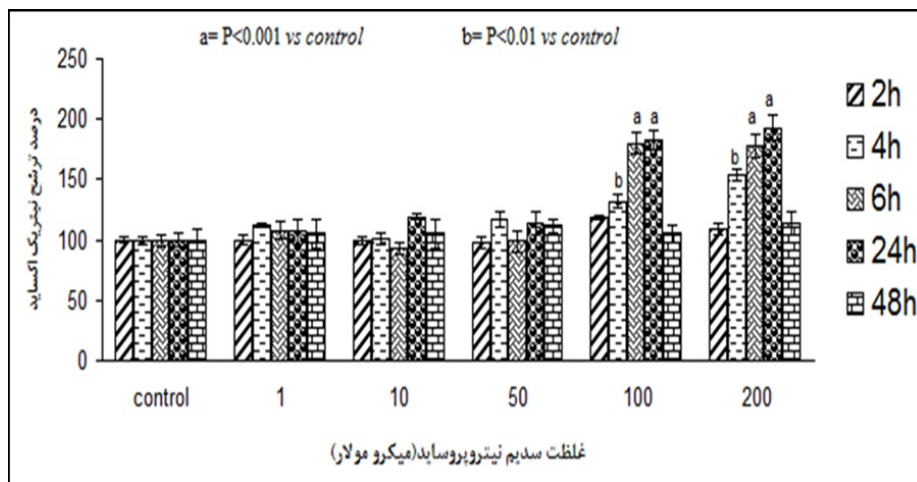
تحقیقات نشان داده است که پکتین سیب (AP) در زمان انکوباسیون کوتاه مدت، ترشح پرولاکتین را افزایش می‌دهد (۹، ۱۶ و ۱۷) و در زمان انکوباسیون بلند مدت باعث القای آپوپتوز در سلول‌های GH3/B6 می‌گردد (۴). مکانسیم دقیق اثر آپوپتوزی مواد پکتینی بر سلول‌های توموری و سرطانی به خوبی شناسایی نشده است. از سوی دیگر، نقش نیتریک اکساید در سلول‌های سرطانی بسیار پیچیده است و اثر مهار و تسهیلی آن بر روند آپوپتوز به نوع سلول و غلظت نیتریک اکساید بستگی دارد (۷).

- بررسی ترشح نیتریک اکساید در سلول‌های GH3/B6 بوسیله واکنشگر گریس: AP با غلظت ۱ mg/ml در زمان ۲ ساعت تأثیر معنی‌داری بر ترشح نیتریک اکساید از سلول‌های GH3/B6 نشان نداد، اما در زمان‌های ۴، ۶، ۲۴ و ۴۸ ساعت باعث افزایش معنی‌دار ترشح نیتریک اکساید از سلول‌های تحت تیمار نسبت به گروه کنترل شد ($p < 0.001$) (شکل ۷). درحالی‌که MCP در هیچ یک از زمان‌های ۲، ۴، ۶، ۲۴ و ۴۸ ساعت تأثیر معنی‌داری بر ترشح نیتریک اکساید از سلول‌های تحت تیمار نسبت به کنترل نداشت (شکل ۸).
SNP با غلظت ۲۰۰ و ۱۰۰ μM در زمان ۲ ساعت تأثیر معنی‌داری بر ترشح نیتریک اکساید از سلول‌های تحت تیمار نسبت به کنترل نشان نمی‌دهد، اما در زمان‌های ۴، ۶ و ۲۴ ساعت باعث افزایش معنی‌دار ترشح نیتریک اکساید می‌شود ($p < 0.001$). اما در زمان ۴۸ ساعت تأثیر

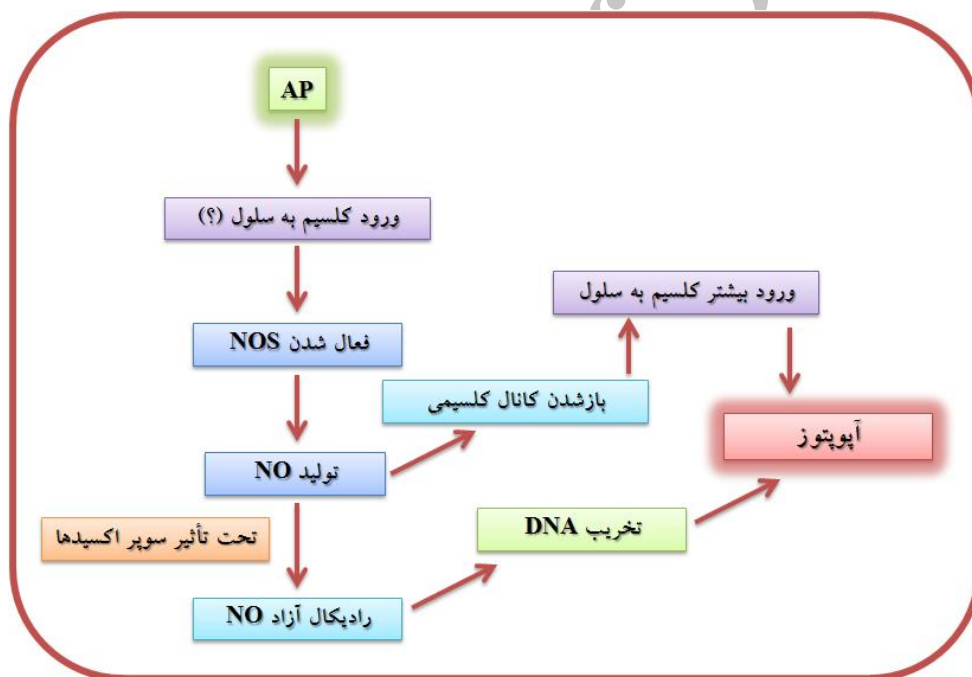


شکل ۸- اثر غلظت‌های متفاوت MCP بر ترشح نیتریک اکساید در سلول‌های GH3/B6 پس از ساعت ۲، ۴، ۶، ۲۴ و ۴۸ ساعت انکوباسیون. غلظت‌های مختلف MCP باعث تغییر معنی‌دار بر ترشح نیتریک اکساید از سلول‌های تحت تیمار نسبت به گروه کنترل نشده است. مقادیر ارائه شده معادل

mean \pm S.E.M می‌باشند. $N=3$



شکل ۹- اثر غلظت‌های متفاوت سدیم نیتروپروساید بر ترشح نیتریک اکساید در سلول‌های GH3/B6 پس از ۲، ۴، ۶، ۲۴ و ۴۸ ساعت انکوباسیون. غلظت‌های ۱۰۰، ۲۰۰، ۳۰۰ μM سدیم نیتروپروساید باعث افزایش معنی‌دار بر ترشح نیتریک اکساید از سلول‌های تحت تیمار نسبت به گروه کنترل شده است. (N=3 و a = p<0.001, b = p<0.01)



شکل ۱۰- در این شکل مسیر احتمالی تأثیر پکتین سیب (AP) بر القای آپوپتوز در سلول از طریق آزاد سازی نیتریک اکساید نشان داده شده است.

را در سلول‌های GH3 افزایش می‌دهند (۲۳). علاوه بر این، محققین نشان داده‌اند که غلظت‌های بالای SNP باعث مهار رشد سلول‌های سرطانی پروستات انسانی و سلول‌های سرطانی دهان انسان می‌گردند (۱۹). طبق بررسی‌های انجام شده، اضافه کردن یک دهنده نیتریک اکساید به محیط

مواد مختلفی بر ترشح نیتریک اکساید تأثیر می‌گذارند، به عنوان مثال استروژن در سلول‌های GH3/B6 باعث کاهش بیان nNOS می‌گردد و این عمل تولید نیتریک اکساید را در این سلول‌ها کاهش می‌دهد (۲۳). طبق بررسی‌های انجام شده SNP و L-ARGININE میزان ترشح نیتریک اکساید

می‌شود این رادیکال آزاد باعث آسیب به DNA و تخریب آن گردد (شکل ۱۰) (۵).

از طرف دیگر، MCP با غلظت‌های ۵ و ۳ mg/ml تکثیر سلول‌های GH3/B6 را مهار می‌کند در حالی که، تأثیری بر ترشح نیتریک اکساید در این سلول‌ها ندارد. بنابراین، این احتمال وجود دارد که تأثیر MCP بر سلول‌ها مستقل از مسیر نیتریک اکساید باشد.

نتایج کلی این مطالعه نشان داد که، اسید پکتیک یا پکتین سیب با تحریک ورود کلسیم به سلول باعث فعال شدن آنزیم نیتریک اکساید سنتاز و ترشح نیتریک اکساید می‌گردد، ولی پکتین تغییر یافته مرکبات در پیدایش این مکانیسم در سلول‌های GH3/B6 بی‌اثر است. بنابراین پکتین سیب احتمالاً سلول‌های GH3/B6 را از طریق افزایش نیتریک اکساید به طرف آپوپتوز می‌برد و این مکانیسم می‌تواند به علت افزایش کلسیم داخل سلولی باشد.

تشکر و قدردانی

پژوهش حاضر توسط بودجه دانشگاه تهران - پردیس علوم انجام یافته است. از سرکار خانم دانیل گرجی (Danielle Gourdj) پژوهشگر college de France و INSERM برای اهدای سلول GH3/B6 به آزمایشگاه فیزیولوژی جانوری قدردانی می‌گردد. از جناب آقای کاوه دارابی به خاطر همکاری بی‌دریغشان کمال تشکر و امتنان را دارد.

کشت سلول‌های GH3/B6 باعث مهار ترشح پرولاکتین در این سلول‌ها می‌شود (۱۸). با توجه به اینکه مکانیسم القای آپوپتوز توسط مشتقات پکتینی بر سلول‌های توموری و سرطانی ناشناخته می‌باشد، بررسی نقش احتمالی ترشح نیتریک اکساید در القای آپوپتوز بر این سلول‌ها، پس از تیمار با مواد پکتینی، به عنوان هدف این مطالعه در نظر گرفته شد. و دو مطلب کلی مورد بررسی قرار گرفت:

۱- بررسی اثر اسید پکتیک (AP) و MCP بر تولید نیتریک اکساید توسط سلول‌های GH3/B6
۲- بررسی نقش نیتریک اکساید در مهار رشد و تکثیر سلول‌ها

نتایج نشان داد که، AP در زمان ۲ ساعت تأثیری بر ترشح نیتریک اکساید ندارد ولی در زمان ۴، ۶، ۲۴ و ۴۸ ساعت با غلظت ۱ mg/ml باعث افزایش معنی‌دار ترشح نیتریک اکساید می‌گردد. در ضمن، غلظت‌های ۵ mg/ml و AP ۲/۵ در زمان‌های ۲۴ و ۴۸ ساعت باعث مهار تکثیر سلول‌ها می‌گردند. اثر مهار تکثیر سلول‌ها را برای AP احتمالاً می‌توان به خاطر افزایش ورود کلسیم به داخل سلول دانست. ورود یون کلسیم، ایزوفرم nNOS را فعال کرده و باعث تولید نیتریک اکساید می‌گردد (۲۱). با توجه به اینکه، نیتریک اکساید نیز خود محرک ورود کلسیم به سلول می‌باشد، بنابراین با تولید نیتریک اکساید درون این سلول‌ها، مقدار کلسیم درون سلولی افزایش بیشتری می‌یابد (۲۲). از طرف دیگر نیتریک اکساید تحت تأثیر سوپر اکسید‌های درون سلولی به رادیکال آزاد نیتریک اکساید تبدیل

منابع

- ۱- دلفی لادن، سپهری حوری، رسولی یاسمن، سمیده خوبی. (۱۳۸۵). اثر β -گلوکان بر تحریک ترشح پرولاکتین و مورفولوژی سلول‌های GH3/B6. مجله زیست‌شناسی ایران. جلد ۱۹: شماره ۳ (۲۷۲-۲۸۱)
- ۲- شاعر زاده فاطمه، سپهری حوری، حسین قمر تاج، گلیبایی بهرام، دلفی لادن، رسولی یاسمن. (۱۳۸۹). تأثیر تراکم‌های مختلف β -گلوکان بر سنتز پرولاکتین در یاخته‌های GH3/B6 و بررسی گیرنده β -گلوکان در این یاخته‌ها. مجله زیست‌شناسی ایران. جلد ۲۳: شماره ۵ (۶۶۳-۶۷۱)
- 3- Alderton W, Cooper C, Knowles R. (2001). Nitric oxide synthesis: Structure, function and Inhibition, *Biochem.J*, 357: 593-615
- 4- Attari F, Sepehri H, Delphi L, Goliaei B. (2009). Apoptotic and Necrotic effects of pectic acid on Rat Pituitary GH3/B6 Tumor cells. *Iranian Biomedical journal*, 48: 163-170

- 5- Beckman J. (1996). The physiological and pathological chemistry of nitric oxide, *Nitric oxide journal*, 4: 85-96
- 6- Chen Y, Huse SH, Lin L. (2005). Effect of inducible Nitric oxide synthase inhibitors on DAMB-induced hamster buccal –pouch squamous –cell carcinogenesis, *Nitric oxide journal*, 14: 232-239
- 7- Chinthalapally R. (2004). Nitric oxide signaling in colon cancer chemoprevention. *mutation research*, 3: 107-11
- 8- Coulter J, McCarthy H, Xiang J, Roedl W, Wanger E, Robson T, Hirst D. (2008). Nitric oxide –A novel therapeutic for cancer. *Nitric oxide journal*, 161: 192-198
- 9- Eslimi D, Sepehri H, Rassouli Y, Khoei S and Goliaei B. (2008). Pectic Acid Effects on Prolactin Secretion in GH3/B6. *Iran. Biomed. J.* 12 (3): 167-172
- 10- Gourdji D and Vidal T. (1980). Prolactin secreting cell lines: a tool for the study of the mechanism of action of hypophysiotropic neuropeptides. *J. Physiol*, 76: 233-241
- 11- Green L, Wagner D, Glogowski J, Skipper P, Wishnok J, Tannenbaum S. (1982). Analysis of nitrate, nitrite and nitric oxide in biological fluids. *Anal Biochem*, 126: 131-138
- 12- Kim P, Zamora R, Petrosko P, Billiar T. (2001). The regulatory role of Nitric oxide in apoptosis. *int. immunophar. journal*, 6(2): 1421-1441
- 13- LaLaP, Chakraborty C. (2001). Role of nitric oxide in carcinogenesis and tumor Progression. *Nitric oxide journal*, 13: 149-156
- 14- Lechner M, Lirk P, Rieder J. (2005). Inducible nitric oxide synthase (iNOS) in Tumorbiology: the two sides of the same coin. *Cancer biology*, 14: 277-289
- 15- Scalerno J. (1996). Nitric oxide complexes of metalloproteinase: an introductory overview. *Nitric oxide journal*, 4: 115-123
- 16- Sepehri H, Delphi L, and Rassouli Y. (2007). The effect of β -glucan on prolactin secretion in GH3/B6 cell3. *Iranian Journal of Science & Technology*, 31: 21-24
- 17- Sepehri H, Zoraghi R. & Haeri- Rohani A. (2001). An effect of pectic acid and β - glucan on prolactin secretion by ovine pituitary explants. *Iranian Journal of Science*, 1: 99-107
- 18- Shang Z, Lee Z (2006). In vitro effects of nitric oxide synthase inhibitor L-NAME on oral squamous cell carcinoma. *int. j. oral Maxillo of surge*, 41: 539-543
- 19- Tsumori M, Murakami B, Koshimura K and Kato Y. (1999). Thyrotropin – releasing hormone stimulates NO release from GH3 cells. *Neuroendocrinology journal*, 11: 451-456
- 20- William's D. (2004). Nitric oxide in biological system. *Nitric oxide journal*, 28: 161-169
- 21- William's D. (2003). The biological chemistry of nitric oxide, *Nitric oxide journal*, 21: 81-92
- 22- Wolff D. (2003). Calmodulin –dependent Nitric oxide synthase, *Biological chemistry J*, 268(13): 425-429
- 23- Xian Q, Jin L and Liyod R. (1999). Estrogen down regulate neuronal nitric oxide in rat anterior pituitary cell and GH3 tumors. *Endocrine journal*, 11(3): 123-130

Effect of apple pectin or pectic acid and modified citrus pectin on NO release and inhibition of cell proliferation in rat pituitary tumor cells GH3/B6

Moghtaderi H., Sepehri H., Rezayof A., Delphi L. and Dashtbozorgi S.

Animal Physiology Dept., Faculty of Biology, University College of Science, University of Tehran, Tehran, I.R. of Iran

Abstract

Nitric oxide (NO) can both induce and suppress apoptosis according to the physiological conditions. Recent investigations have indicated that pectin derivatives, which are polysaccharides in the cell wall of plants, are able to induce apoptosis in cancerous cells. In the present study the amount of NO release from rat pituitary tumor cell line GH3/B6 after treatment with different concentration of modified citrus pectin (MCP), pectic acid (PA), SNP (as positive control) and L-NAME (as negative control) is under investigation. The cells were cultured in Ham's F12 medium which was completed with 10% FBS and treated with different concentration of MCP and AP. The cell proliferation inhibition rate was determined with MTT assay. The amount of NO release was assessed by an indirect method of using Griess reagent. Our results demonstrated that incubation of GH3/B6 cells with 1mg/ml PA for 4 hours increased the amount of NO release up to 40% more than control otherwise none of MCP concentrations affect the secretion of NO. In addition, MTT assay determined significant proliferation inhibition rate for the cells with 2.5, 5 mg/ml of PA and 3, 5 mg/ml of MCP after 24 and 48 hours incubation. So these results suggest that PA may inhibit cell proliferation via induction of NO release in GH3/B6 cells but MCP shows its inhibitory effect on cell proliferation by another pathway.

Key words: *Pectic Acid, Modified Citrus Pectin, Nitric Oxide, GH3/B6 cell line*