ISSN: 2476-6917; Modares Journal of Biotechnology. 2019;10(1):125-131

Monitoring Lead Toxicity by Huh7-1x-ARE-luc Cell Line Lucifersae Biosensor

ARTICLE INFO

Article Type
Original Research

Authors
Kavoosi S.[1] *MSc*,
Shirzad H.*[2] *PhD*,
Jalili Sh.[2] *PhD*,
Sadeghizadeh M.[1] *PhD*,
Motahari P.[1] *MSc*

How to cite this article
Kavoosi S, Shirzad H, Jalili Sh, Sadeghizadeh M, Motahari P. Monitoring Lead Toxicity by Huh7-1x-ARE-luc Cell Line Lucifersae Biosensor. Modares Journal of Biotechnology. 2019;10(1):125-131.

ABSTRACT

Aims The accumulation of free radicals in the body leads to damages to cellular biopolymers through oxidative stress. Due to the increasing proliferation of heavy metals in soil and water environments, finding efficient methods for diagnostic detection and measurement of heavy metals in contaminated environments is very important. Cell-based biosensors can produce a measurable signal in response to specific chemical or physical agent in their environment. In this study, stable hepatoma Huh7 ARE-reporter cell line was developed containing luciferase gene with the aim of monitoring lead toxicity. This biosensor is reported to be able to detect lead by expressed signal which is measurable. The luciferase assay and Real time-PCR were performed.
Materials & Methods In this experimental research, the Huh7-1x-ARE-luc was stably transferred in to the Huh7 cells and transfected cells were selected. After 5 passages, stable clones were isolated to confirm plasmid entrance. Luciferase activity of the Huh7-1x-ARE-luc cell line was performed with 0-80μM lead concentration to induce oxidative stress response. Cell viability was assessed by MTT. With Real time PCR, ARE*KEAP1* pathway gene expression were detected. Statistical analysis was performed by ΔCt method, using graphpad prism 6 software.
Findings The gene expression of the reporter gene increased with increasing oxidative stress. Reducing the expression of the reporter gene was observed after 30 μM. 35 μM lead inhibited 50% cell metabolism. Expression of antioxidant pathway genes was significantly increased in 30 μM leaded cells compared to control gene.
Conclusion The biosensor prepared from Huh7-1x-ARE-luc cell line of the reporter gene can be a convenient and efficient means for measuring oxidative compounds such as heavy metals such as lead.

Keywords Reporter Gene; Biosensor; Oxidative Stress; Antioxidant Response Element

Archive

[1]Genetics Department, Biologic Sciences Faculty, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran
[2]Research Institute of Police Science and Social Studies, Tehran, Iran

Correspondence
Address: Research Institute of Police Science and Social Studies, Tehran, Iran
Phone: -
Fax: -
hadi_shirzad@yahoo.com

Article History
Received: November 16, 2016
Accepted: February 01, 2018
ePublished: March 16, 2019

CITATION LINKS

[1] Peroxynitrite, a stealthy biological oxidant [2] Mechanisms for redox control of gene expression [3] The copper, zinc-superoxide dismutase gene of Saccharomyces cerevisiae: Cloning, sequencing, and biological activity [4] Regulation of the OxyR transcription factor by hydrogen peroxide and the cellular thiol-disulfide status [5] Emerging role of NRF2 in chemoresistance by regulating drug-metabolizing enzymes and efflux transporters [6] Decoding enhancers using massively parallel reporter assays [7] NRF2 oxidative stress induced by heavy metals is cell type dependent [8] Neuroinflammatory processes are important in neurodegenerative diseases: An hypothesis to explain the increased formation of reactive oxygen and nitrogen species as major factors involved in neurodegenerative disease development [9] Update of the NAD(P)H: Quinone oxidoreductase (NQO) gene family [10] Lead poisoning and the fall of Rome [11] Contaminated and natural lead environments of man [12] Lead poisoning in children [13] NRF2 and KEAP1 mutations: Permanent activation of an adaptive response in cancer

Copyright© 2019, TMU Press. This open-access article is published under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License which permits Share (copy and redistribute the material in any medium or format) and Adapt (remix, transform, and build upon the material) under the Attribution-NonCommercial terms.

www.SID.ir

پایش سمیت سرب به‌وسیله زیست‌حسگر لوسیفراز رده سلولی Huh7-1x-ARE-luc

سعیده کاووسی MSc
گروه ژنتیک، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
هادی شیرزاد* PhD
پژوهشگاه علوم انتظامی و مطالعات اجتماعی، تهران، ایران
شیرین جلیلی PhD
پژوهشگاه علوم انتظامی و مطالعات اجتماعی، تهران، ایران
مجید صادقی‌زاده PhD
گروه ژنتیک، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
پریا مطهری MSc
گروه ژنتیک، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

چکیده
اهداف: تجمع رادیکال‌های آزاد در بدن با ایجاد استرس اکسیداتیو منجر به تخریب پلیمرهای زیستی می‌شود. به‌دلیل ورود فلزات سنگین به محیط‌های آبی و خاکی، یافتن روش‌های کارآمد برای شناسایی و اندازه‌گیری میزان فلزات سنگین لازم است. زیست‌حسگرهای سلولی می‌توانند در حضور یک محرک از جمله فلزات سنگین، سیگنالی قابل اندازه‌گیری تولید کنند. در این تحقیق رده سلولی Huh7-1x-ARE-luc تحت کنترل پروموتر حساس به حضور اکسیدان‌ها با هدف پایش سرب استفاده شد و کارآیی آن در سنجش سمیت این مواد به واسطه آرمایش‌های لوسیفراز و Real time-PCR بررسی شد.
مواد و روش‌ها: در این مطالعه تجربی، بعد از ترنسفکشن وکتور نوترکیب سنجش فعالیت ژن لوسیفراز در نمونه‌های تیمارشده با سرب انجام شد. تعدادی از کلون‌های تاییدشده با فنوتیپ پایدار بعد از پاساژ پنجم برای بررسی بیان ژن لوسیفراز در غلظت‌های صفر تا ۸۰ماکرومولار از سرب بررسی شدند. سپس قابلیت مهارکنندگی به روش MTT assay و تغییرات بیان ژن‌های مسیر اکسیداتیو توسط Real time-PCR بررسی شد. تحلیل‌های آماری با روش ΔCt و با استفاده از نرم‌افزار graphpad prism 6 انجام شد.
یافته‌ها: میزان بیان ژن گزارشگر همراه با افزایش ماده اکسیداتیو افزایش یافت. کاهش بیان ژن گزارشگر بعد از غلظت ۳۰ماکرومولار سرب قابل مشاهده بود. غلظت ۳۵ماکرومولار سرب، متابولیسم ۵۰% سلول‌ها را مهار کرد. بیان ژن‌های مسیر آنتی‌اکسیدانی در سلول‌های تیمارشده با سرب ۳۰ماکرومولار نسبت به ژن کنترل، افزایش معنی‌داری داشت.
نتیجه گیری: زیست‌حسگر تهیه‌شده از رده سلولی نوترکیب Huh7-1x-ARE-luc حامل ژن گزارشگر می‌تواند وسیله مناسب و کارآمدی برای سنجش ترکیبات اکسیداتیو همچون فلزات سنگینی چون سرب باشد.
کلیدواژه‌ها: ژن گزارشگر، زیست‌حسگر ، استرس اکسیداتیو، توالی پاسخگوی آنتی‌اکسیدانی

تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۰۸/۲۶
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۱۱/۱۲
*نویسنده مسئول: hadi_shirzad@yahoo.com

مقدمه

تجمع عناصر غیرحیاتی مانند جیوه، کادمیوم و سرب در موجودات زنده و به‌خصوص پستانداران باعث بیماری‌های خطرناکی می‌شود. به‌طور معمول این فلزات از طریق هوا، آب و مواد غذایی آلوده وارد بدن پستانداران می‌شوند. اغلب این فلزات سنگین فاقد نقش‌های شناخته‌شده زیستی بوده و می‌توانند با تجمع در موجودات باعث ایجاد اثرات سمی شوند[1]

میزان تمایل تجمع فلزات سنگین در موجودات و اندام‌های مختلف متفاوت است. یکی از اساسی‌ترین مسایل در رابطه با فلزات سنگین عدم متابولیزه‌شدن آنها در بدن است. در واقع فلزات سنگین پس از ورود به بدن دیگر از آن دفع نشده و در بافت‌هایی مثل چربی، عضلات، استخوان‌ها و مفاصل رسوب کرده و انباشته می‌شوند که همین امر موجب بروز بیماری‌ها و عوارض متعددی در بدن می‌شود[2, 3]. از طرفی خاصیت تجمع‌پذیری فلزات سنگین در گیاهان و ورود آنها به زنجیره غذایی خطرات ناشی از این سموم را دو برابر کرده است. با رشد صنعت و افزایش مصرف مواد شیمیایی و افزایش ورود آنها در آب، خاک و هوا احتمال رویارویی انسان با خطرات ناشی از آنها بیشتر شده است[4].

یکی از این فلزات سنگین مضر سرب است. به‌طوری که می‌توان گفت سرب یکی از چهار فلزی است که بیشترین عوارض را بر سلامت انسان دارد. عوارض مسمویت سرب در انسان شامل بالارفتن میزان سرب در خون و ایجاد مسمومیت در دو نوع حاد و مزمن است. در اثر مسمومیت مزمن، بیماری‌هایی نظیر فلج‌شدن، التهاب کلیه، کم‌خونی، بالارفتن میزان اسیداوریک خون، نقرس سربی و سقط جنین در انسان و حیوانات باردار بروز می‌کند. علایم مسمومیت حاد با سرب در حیوانات شامل کوری، ترشح بیش‌ازحد بزاق، انقباض ماهیچه، ساییدگی دندان‌ها و مرگ ناگهانی است[5].

بدن انسان برای ازبین‌بردن این اثرات سمی فلزات سنگین و کلیه ترکیبات اکسیداتیو از مکانیزم استرس اکسیداتیو استفاده می‌کند. سلول‌ها در هنگام مواجهه با استرس اکسیداتیو، به‌سرعت ظرفیت‌های آنتی‌اکسیدانی خود را افزایش می‌دهند تا بدین وسیله علاوه بر مقابله با میزان افزایش‌یافته مواد اکسیداتیو درون سلول، باعث پایداری هموئستازی خود نیز شوند.

پروتئین *Nrf2* یک نوع فاکتور رونویسی هسته‌ای است که نقش اساسی در شبکه تنظیم‌کننده ژن‌های هموئستازی و ردوکس ایفا می‌کند. در واقع تحت شرایط استرس اکسیداتیو و الکتروفیلیک، مسیر انتقال *Nrf2* فعال می‌شود و سپس میزان بیان انواع اکسیدان‌ها و آنزیم‌های فاز دوم سیستم سم‌زدایی افزایش می‌یابد. به‌طور کلی اثبات شده است که افزایش بیان ژن‌های وابسته به *Nrf2* منجر به سم‌زدایی آلاینده‌ها از جمله فلزات سنگین درون سلول‌ها و تسکین آسیب ناشی از استرس اکسیداتیو درون ارگانیزم‌ها می‌شود.

با وجود اهمیت ترکیبات اکسیداتیو و اثرات سمی آن در انسان استفاده از رده سلولی نوترکیب حامل ژن گزارشگر برای سنجش ترکیبات اکسیداتیو همچون فلزات سنگین مفید به نظر می‌رسد. به‌کارگیری زیست‌حسگرهای سلولی فلزات سنگین که حاوی یک ژن گزارشگر تحت کنترل پروموتر حساس به حضور انواع یون‌های سنگین هستند، در حضور این آلاینده‌ها سیگنالی ایجاد می‌کنند که قابل شناسایی و اندازه‌گیری است؛ در نتیجه استفاده از آنها در سنجش آلودگی فلزات سنگین علاوه بر مزیت بزرگ سنجش غلظت در دسترس زیستی این عناصر، دارای مزایای دیگری نظیر صرف زمان و هزینه کمتر و سهولت کاربرد آنها است[6].

در مواجهه انسان با سرب دو دسته از سیستم‌های سم‌زدایی در بدن به کار می‌افتد. فرآیندهای سم‌زدایی فاز ۱ توسط خانواده آنزیمی سیتوکروم P450 صورت می‌گیرد و خانواده آنزیم های فاز ۲ روی محصولات فاز ۱ عمل می‌کنند و باعث افزایش حلالیت این ترکیبات و کاهش سمیت آنها با مکانیزم‌های مختلف می‌شوند[7].

رده سلولی هپاتومای انسانی (Huh7) در چندین مدل "*در شیشه*" سنجش سمیت مورد استفاده قرار گرفته است. خصوصیاتی همچون فنوتایپ پایدار، امکان تولید مجدد، ارزان‌قیمت‌بودن و از همه مهم‌تر نشان‌دادن خواص نرمال سلول‌های هپاتوسایت، این رده سلولی را برای مطالعات متابولیک کبد، سمیت مواد گزونوبیوتیک و جست‌وجوی فاکتورهای آنتی‌توکسیک منحصربه‌فرد کرده است. اگر چه هپاتوسیت‌ها بهترین مدل برای مطالعه اثر و متابولیزم داروها و سایر ترکیباتی که در کبد متابولیزه

Archive of SID
www.SID.ir

می‌شوند، هستند ولی به‌علت محدودیت‌ها از سلول‌های هپاتوما در تحقیقات استفاده می‌شود. رده سلولی Huh7 دارای نزدیک‌ترین سطح از نظر پروفایل بیان آنزیم‌های فاز I و II در استرس اکسیداتیو با هپاتوسیت‌ها است و به همین دلیل این رده کارسینومای کبدی برای به‌کارگیری سیستم زیست‌سنجش در این پروژه مناسب به نظر می‌رسد.

فلز سرب به‌عنوان یک اکسیدان باعث افزایش بیان ژن‌های دربردارنده توالی ARE در پروموترشان (NQO1) می‌شود و این امر توسط رهایی و افزایش فاکتور *Nrf2* صورت می‌پذیرد و به‌دنبال آن بیان ژن لوسیفراز هم افزایش خواهد یافت. از این ویژگی می‌توان برای ردیابی سرب توسط این زیست‌حسگر بهره برد. از این رو با وجود اهمیت ترکیبات اکسیداتیو و اثرات سمی آن در انسان استفاده از رده سلولی نوترکیب حامل ژن گزارشگر برای سنجش ترکیبات اکسیداتیو همچون فلزات سنگین مفید به نظر می‌رسد.

با توجه به اهمیت اکسیدان‌ها و بررسی‌های اندک در زمینه ساخت زیست‌حسگر مناسب، در واقع هدف این تحقیق استفاده از زیست‌حسگر سلولی برای اندازه‌گیری مقدار سرب موجود است که متشکل از رده سلولی Huh7 و وکتور حامل ژن لوسیفراز تحت کنترل پروموتر مرکزی ARE سلول‌های نوترکیب است.

مواد و روش‌ها

تهیه پلاسمید نوترکیب: پلاسمید pGL4.26 (سیگما؛ ایالات متحده) به‌دلیل داشتن پروموتر حداقل وکتور مناسبی برای کلونینگ و انتقال عوامل پاسخ‌های مختلف در بالادست پروموترش است. زیرا این وکتور در شرایط نرمال دارای حداقل بیان لوسیفراز است و می‌توان با کمک آن تفاوت فعالیت لوسیفراز را در حضور ماده فعال‌کننده و عدم حضور ماده فعال‌کننده نشان داد. ۳۲ الیگونوکلئوتید مربوط به پروموتر مرکزی ARE که برای تحریک بیان ژن‌های پاسخگو به مواد دارای خاصیت اکسیداتیو است در این وکتور کلون شد. بعد از انتقال وکتور نوترکیب به باکتری‌های مستعد Top10، استخراج پلاسمید این باکتری‌های ترانسفرم‌شده با کمک کیت و روش دستی انجام شد. در نهایت غلظت و خلوص پلاسمید استخراج‌شده با دستگاه نانودراپ (ترموفیشر ساینتیفیک؛ ایالات متحده) اندازه‌گیری شد.

تایید کلونی‌های حاوی وکتور نوترکیب: برای تاییدکلونی‌های مورد نظر از دو روش هضم آنزیمی، با استفاده از آنزیم *EcoRV* که جایگاه برش آن روی نوکلئوتید شماره ۴۲ است و تعیین توالی پلاسمیدهای استخراج‌شده با پرایمر اختصاصی وکتور، استفاده شد.

سنجش قابلیت مهارکنندگی کشت سلول‌های Huh7 به روش MTT assay: برای سنجش قابلیت متابولیک سلول‌های Huh7 به هیگرومایسین (مارکر مقاومتی این رده سلولی) از روش MTT استفاده شد. به این منظور از سلول‌های کشت‌شده Huh7 در هر چاهک پلیت‌های ۹۶ خانه به تعداد ۱۵۰۰۰ عدد به‌صورت تکرارهای سه‌تایی کشت داده شد. ۲۴ ساعت بعد، پس از چسبیدن سلول‌ها به کف پلیت، سلول‌ها در مجاورت غلظت‌های۰ تا ۹۰۰ماکرومولار هیگرومایسین، به‌مدت ۲۴ ساعت قرار گرفته و سپس قابلیت متابولیک به روش MTT assay در سلول‌های تیمارشده با ترکیب مذکور، اندازه‌گیری شد.

ترنسفکشن وکتور نوترکیب به سلول‌های Huh7 با لیپوفکتامین۲۰۰۰: لیپوفکتامین برای ترنسفکت‌کردن اسیدهای نوکلئیک DNA و RNA به داخل سلول‌های یوکاریوتی به کار می‌رود. روش کار به اختصار به شرح زیر است:

از سلول‌های کشت‌شده به میزان مساوی در چاهک‌های پلیت ۲۴ خانه ریخته شد. به هر چاهک۵۰۰میکرولیتر محیط کشت حاوی سرم ۵% و بدون آنتی‌بیوتیک اضافه شد. بعد از گذشت یک روز محیط قبلی خارج و با ۴۰۰ماکرولیتر بافر فسفات‌سالین (PBS) شسته و به هر چاهک محیط کشت جدید فاقد سرم و آنتی‌بیوتیک اضافه و پلیت به انکوباتور منتقل شد. برای هر چاهک مقدار ۰/۸ تا ۱/۲میکروگرم پلاسمید و ۵۰میکرولیتر محیط کشت فاقد سرم و آنتی‌بیوتیک به‌طور جداگانه در ویال‌ها تهیه شد. این وکتورهای رقیق‌شده با ۲میکرولیتر لیپوفکتامین که در ۵۰میکرولیتر محیط کشت فاقد سرم و آنتی‌بیوتیک حل شده بوند با هم مخلوط و به‌مدت ۲۰دقیقه در دمای اتاق انکوبه شدند. ۱۰۰میکرولیتر از مخلوط ایجادشده را به‌آرامی به هر چاهک اضافه و پلیت‌ها به انکوباتور منتقل شدند و روز بعد محیط کشت سلول‌ها تعویض شد.

سنجش میزان بیان لوسیفراز در سلول‌های ترانسفکت‌شده با دستگاه لومینومتر: ابتدا لیز سلول‌ها انجام شد، به این صورت که بعد از تخلیه محیط کشت و شست‌وشوی سلول‌ها با PBS به هر چاهک ۷۰میکرولیتر بافر لیز اضافه شد. پلیت به‌مدت ۲۰-۱۵ دقیقه در ظرف یخ شیک شد و عصاره سلولی جمع‌آوری‌شده به‌مدت ۲-۱ دقیقه ورتکس شدید شد. ۵میکرولیتر از محصول لیزشده زیست‌حسگر با ۵میکرولیتر کمپلکس سنجش در داخل لوله‌های مخصوص لومینومتر مخلوط و به دستگاه لومینومتر که روی طول موج ۵۶۰نانومتر تنظیم شده بود منتقل شد. سپس نور تولیدشده توسط دستگاه لومینومتربر حسب RLU/Sec قرائت شد. میزان RLU/Sec نشان‌دهنده میزان فعالیت آنزیم لوسیفراز بیان‌شده در سلول‌ها بعد از انجام موفقیت‌آمیز ترانسفکشن است.

سنجش حساسیت سلول‌های ترانسفکت‌شده به سرب: به‌منظور بررسی میزان فعالیت لوسیفرازی رده سلولی Huh7-1x-ARE-luc در حضور ماده اکسیداتیو (سرب)، تیمار این سلول‌ها با غلظت‌های مختلف سرب (۸۰-۰میکرومولار) صورت گرفت. سپس طبق روش ذکرشده در بالا میزان فعالیت لوسیفرازی آن با دستگاه لومینومتر، سنجیده شد.

استخراج RNA و سنتز DNA مکمل: به‌منظور بررسی میزان بیان ژن‌های مورد نظر در سلول‌های تحت تیمار سرب استخراج RNAای این سلول‌ها ضروری است. بعد از استخراج RNA طبق دستورالعمل کیت استخراج RNA، کیفیت و کمیت RNA استخراج‌شده به‌ترتیب توسط الکتروفورز روی ژل و دستگاه نانودراپ (ترموفیشر ساینتیفیک؛ ایالات متحده) مورد سنجش قرار گرفت. سپس سنتز DNA مکمل توسط کیت سنتز cDNA (فرمنتاز- ایالات متحده) انجام شد.

آماده‌سازی پرایمرها برای انجام واکنش زنجیره‌ای پلیمراز معکوس (RT-PCR): طراحی پرایمرها توسط ابزار طراحی پرایمر سایت NCBI، به آدرس اینترنتی http//www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/index.cgi?LINK=BlastHome انجام گرفت. برای جلوگیری از تکثیر DNA ژنومی، پرایمرها طوری طراحی شدند که اتصالات اگزونی را تکثیر نمایند. در این پروژه از ژن *Gapdh* به‌عنوان کنترل داخلی استفاده شد. توالی و مشخصات پرایمرهای به‌کاررفته به شرح زیر بود (جدول ۱):

بررسی بیان ژن‌ها به روش RT-PCR: پس از سنتز cDNA مورد نظر از RNAهای استخراج‌شده، برای اطمینان از صحت واکنش رونویسی معکوس و اختصاصی‌بودن پرایمرها برای ژن‌های مذکور، واکنش RT-PCR هر یک از ژن‌های مورد نظر انجام شد و به‌منظور

Archive of SID
www.SID.ir

یکسان‌سازی ترکیبات در همه تیوب‌های PCR، یک محلول اصلی از کلیه ترکیبات مورد استفاده به‌غیر از پرایمر یا cDNA ساخته شد. واکنش PCR در حجم ۲۰میکرولیتری در دستگاه ترموسایکلر انجام شد. مراحل انجام واکنش به‌صورت زیر بود (جدول ۲).

جدول ۱) نام و مشخصات پرایمرهای مورد استفاده در واکنش‌های RT-PCR و Real-time PCR

ژن	دمای اتصال	اندازه	توالی (’۵-’۳)
NRF2	۶۰	۲۰۳	F5’-ATCCATTCCTGAGTTACAGTGTCT -3’ R5’-TGGAGAGGATGCTGCTGAAG -3’
NQO1	۶۰	۱۹۰	F5’-CCAATTCAGAGTGGCATTCTGC -3’ R5’-GGAAGTTTAGGTCAAAGAGGCTG -3’

جدول ۲) برنامه دمایی و زمانی واکنش RT-PCR

دماو زمان واسرشت اولیه	۳۵-۳۰ چرخه			دما و زمان طویل‌شدن نهایی
	دما و زمان واسرشت	دما و زمان اتصال	دما و زمان طویل‌شدن	
۱۰دقیقه در دمای ۹۵°C	۲۰ ثانیه در دمای ۹۵°C	۳۰ ثانیه – مطابق	۲۰ ثانیه در دمای ۹۵°C	۷ دقیقه در دمای ۷۲°C

ریل تایم PCR **(Real tim PCR):** بعد از الکتروفورز محصولات RT-PCR مراحل انجام واکنش ریل تایم PCR انجام شد. تعیین کمیت ژن‌های مورد نظر براساس روش مقایسه‌ای انجام گرفت. برای این منظور از SYBR Green، پرایمرهای اختصاصی برای ژن‌های هدف و *Gapdh* به‌عنوان ژن کنترل داخلی استفاده شد. این واکنش روی دستگاه Step One (ای‌بی‌آی سیستم؛ کانادا) در حجم ۱۰میکرولیتر و طبق برنامه توصیه‌شده توسط شرکت ارایه‌کننده کیت برای ۴۰ سیکل انجام شد. میزان بیان ژن با استفاده از $2^{-\Delta\Delta Ct}$ و نرم‌افزار Graph pad محاسبه و بین گروه‌ها مقایسه شد (جداول ۳ و ۴). مواد به‌کاررفته و برنامه زمانی دستگاه Real-time PCR تنظیم شد.

جدول ۳) نوع و میزان مواد مورد استفاده در هر واکنش Real time PC

مقادیر مورد استفاده (میکرولیتر)	مواد مورد استفاده در Real-time PCR
۵	SYBR Green
۱	Primers (R+F)
۰/۵	cDNA (۱۵۰نانوگرم)
۳/۵	dd-Water

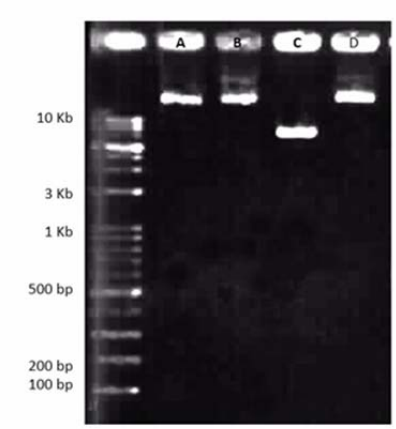
جدول ۴) برنامه تنظیم‌شده برای انجام واکنش Real-time PCR

سیکل	زمان	دما (درجه سانتی گراد)	مراحل
۱	۱۰دقیقه	۹۵	دناتوراسیون اولیه
۴۰	۳۰ثانیه	۹۵	دناتوراسیون
	۳۰ثانیه	۶۴	اتصال
	۲۰ثانیه	۷۲	گسترش
۱	-	-	منحنی ذوب

تهیه سازه pGL4.26/ARE: برای تهیه سازه شناسایی‌کننده مواد اکسیداتیو که حاوی ژن گزارشگر تحت کنترل پروموتر پاسخگو به اکسیدان‌ها است از وکتو ریپلاسمیدی pGL4.26 (پرومگا؛ ایالات متحده) استفاده شد.

کلون‌کردن قطعه پروموتر مرکزی ARE در پلاسمید: پس از حذف آنزیم و بافرها و خالص‌سازی محصول برش با آنزیم، با استفاده از T4 DNA Ligase پس از محاسبه مقادیر لازم از قطعه پروموتر مرکزی ARE و وکتور برای واکنش لیگاسیون، الحاق صورت گرفت. سپس محصول لیگاسیون به باکتری‌های Top10 منتقل و باکتری‌ها روی پلیت حاوی آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین کشت داده شد.

برای تشخیص کلونی‌های دارای وکتور نوترکیب از روش هضم آنزیمی و تعیین توالی استفاده شد. در این روش پس از تخلیص پلاسمید از کلونی‌های مورد نظر هضم آنزیمی این پلاسمیدها توسط آنزیم محدودالاثر *EcoR V* انجام شد. از آن جا که این جایگاه روی نوکلئوتید شماره ۴۲ قرار دارد، در صورت موفق‌بودن پروسه کلونینگ و واردشدن قطعه ۳۶نوکلئوتیدی به وکتور در حد فاصل نوکلئوتیدهای ۳۴ تا ۶۶، جایگاه برش برای آنزیم محدودالاثر *EcoR V* از بین می‌رود (شکل ۱).



شکل ۱) نتیجه هضم آنزیمی با آنزیم محدودالاثر *EcoR V*.کنترل منفی ردیف C که در اثر هضم آنزیمی به‌صورت خطی درآمده است .ردیف A و B که دچار هضم آنزیمی نشدند و برای تایید نهایی مورد توالی‌یابی قرار گرفتند و ردیف D که وکتور سوپرکویل بدون اثر آنزیم است.

پس از تایید کلونینگ به روش هضم آنزیمی و پس از بررسی کیفیت آن با مشاهده روی ژل الکتروفورز و محاسبه غلظت آن با نانودراپ، وکتور مذکور برای تعیین توالی فرستاده شد.

تعیین حساسیت آنتی بیوتیکی سلول‌های Huh7 به هیگرومایسین: یکی از شرایط تولید لاین‌های پایدار سلولی مطابق با روش Dominant Selection Markers انتخاب داروی مناسب است. مارکر انتخابی برای وکتور pGL4.26 در سلول‌های یوکاریوتی آنتی‌بیوتیک هیگرومایسین است و با آن می‌توان سلول‌های پایدار و حاوی پروموتر مرکزی ARE را انتخاب کرد. بنابراین اولین مرحله کار تعیین دامنه حساسیت سلول‌های Huh7 به آنتی بیوتیک هیگرومایسین است.

بعد از کشت سلول‌ها در چاهک‌ها پیلیت ۹۶ خانه سلول‌ها با غلظت‌های ۹۰۰-۰میکرو مولار هیگرومایسین به‌مدت ۴۸ ساعت به‌صورت تکرارهای سه‌گانه تیمار شدند. در پایان آزمون مشخص شد که مقدار هیگرومایسین مورد نیاز برای ازبین‌بردن نیمی از سلول‌های ترانسفرم‌نشده ۴۵۰میکرو مولار است زیرا پس از انجام آزمایش MTT میزان جذب در خانه‌های مربوط به غلظت ۴۵۰میکرو مولار به حدود نصف چاهک با غلظت صفر از دارو رسیده بود.

تعیین حساسیت سلول‌ها به سرب: برای بررسی قابلیت متابولیک سلول‌های Huh7 در حضور غلظت‌های مختلف سرب، این سلول‌ها با دامنه غلظت ۸۰-۰میکرومولار از سرب به‌مدت ۴۸ ساعت تیمار شدند. بعد از سپری‌شدن زمان تیمار آزمایش MTT برای این سلول‌ها انجام شد.

به‌منظور مشخص‌نمودن فعالیت اولیه پروموتر مرکزی ARE، برای بررسی تاثیر مواد اکسیداتیو، پلاسمید ایجادشده از طریق لیپوفکتامین ۲۰۰۰ به رده سلولی Huh7 ترنسفکت شد. بعد از

Archive of SID
www.SID.ir

ترنسفکشن، میزان بیان لوسیفراز با دستگاه لومینومتر مورد بررسی قرار گرفت.

انتخاب سلول‌های پایدار و سنجش فعالیت زیست‌حسگر پروموتر مرکزی pGL4.26 ARE در حضور سرب بعد از پاساژدادن سلول‌ها: بعد از انتخاب سلول‌ها به‌وسیله مارکر مقاومت به آنتی‌بیوتیک، ۵ بار پاساژ داده شدند تا از الحاق وکتور به درون ژنوم مطمئن شده و به‌منظور تایید نهایی سازه ساخته‌شده تحت تیمار با سرب قرار گرفت. داشتن فنوتیپ پایدار پس از چندین پاساژ یکی از روش‌هایی است که به‌منظور اطمینان از الحاق پلاسمید در ژنوم به کار برده می‌شود.

پس از سنتز cDNA، بیان ژن *Nrf2* و *NQO1*، که ژن‌های اصلی در مسیر پیام‌رسانی ARE/KEAP1 هستند، بین نمونه‌های تیمارشده با غلظت سرب ۳۰ماکرومولار و نمونه کنترل تیمارنشده مقایسه شد.

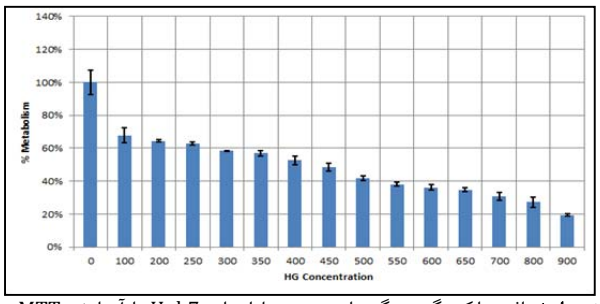
تحلیل‌های آماری: تحلیل‌های آماری با روش ΔCt و با استفاده از نرم‌افزار graphpad prism 6 انجام شد.

یافته‌ها

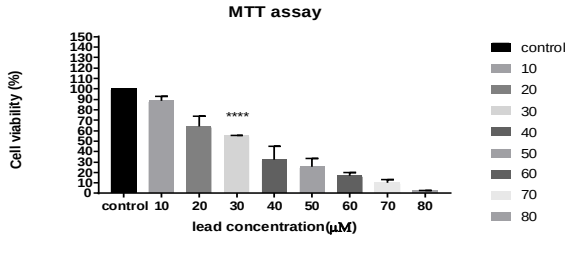
نتیجه تعیین توالی، حضور قطعه پروموتر مرکزی ARE در وکتور و تطابق توالی آن با توالی سفارش‌داده‌شده اولیه را تایید کرد. میزان ۴۵۰میکرو مولار هیگرومایسین برای فرآیند انتخاب سلول‌های ترانسفرم‌شده در نظر گرفته شد (نمودار ۱). در غلظت ۳۵میکرومولار از سرب متابولیزم نیمی از سلول‌ها مهار شدند (نمودار ۲).

با افزایش غلظت سرب میزان فعالیت لوسیفراز نیز افزایش یافت و این افزایش فعالیت مربوط به تحریک پروموتر مرکزی ARE با ماده اکسیداتیو (سرب) بود (نمودار ۳). این آزمایش عملکرد صحیح پروموتر مرکزی ARE را در حضور ترکیبات اکسیدان تایید کرد.

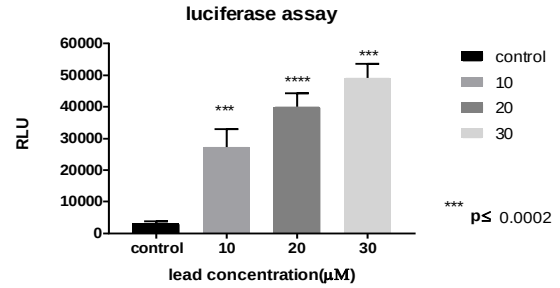
سازه ساخته‌شده در حضور محرک‌ها نسبت به کنترل (سلول تیمارنشده) دارای بیان بالای ژن گزارشگر لوسیفراز بود و این موضوع حضور پروموتر مرکزی ARE را در ژنوم و در نتیجه ساخت زیست‌حسگر مورد نظر را تایید می‌کند (نمودار ۴).



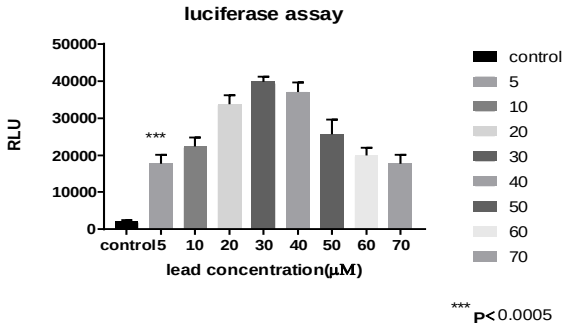
نمودار ۱) اثر مهارکنندگی هیگرومایسین بر سلول‌های Huh7 با آزمایش MTT. سلول‌ها با غلظت‌های مختلف از هیگرومایسین تیمار شدند.



نمودار ۲) اثر سمیت سرب بر سلول‌های Huh7 با آزمایش MTT. سلول‌ها با غلظت ۸۰-۰ماکرومولار از سرب تیمار شدند.



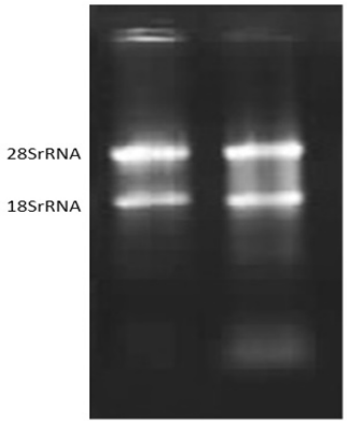
نمودار ۳) نتایج حاصل از افزایش فعالیت پروموتر مرکزی ARE بعد از تیمار.



نمودار ٤) سنجش فعالیت سازه pGL4.26/ARE Core Promoter درحضور سرب بعد از پاساژ پنجم سلول‌ها. افزایش بیان ژن گزارشگر در حضور ترکیبات اکسیدان نشان‌دهنده تحریک پروموتر مرکزی ARE و تایید سازه است.

بررسی کیفیت RNA استخراج‌شده روی ژل آگارز: RNA استخراج‌شده روی ژل آگارز ۱% الکتروفورز شد. دو باند ۲۸S و ۱۸S به‌طور واضح قابل تشخیص بود که حضور این باندها نشان‌دهنده سالم‌بودن RNA بودند. شدت باند ۲۸S بیشتر از باند ۱۸S بود (شکل ۲). عدم حضور باندهای اضافه نشان‌دهنده خلوص RNA استخراج شده بود.

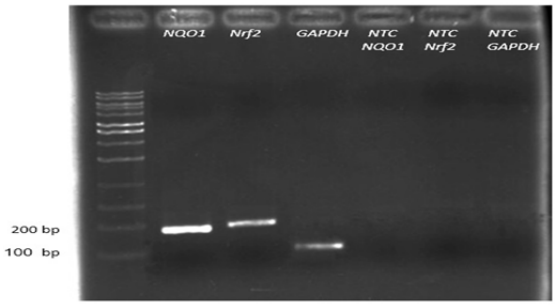
بررسی بیان ژن‌های درگیر در مسیر آنتی‌اکسیدانی ARE/KEAP1 به طریق RT-PCR: نتایج RT-PCR نشانگر بیان تمامی ژن‌های انتخاب‌شده در این مطالعه شامل *Nrf2* و *NQO1* درسلول‌های سرطانی کبدی (Huh7) بود (شکل ۳). با توجه به طراحی پرایمرها و اندازه قطعات مورد نظر (*Nrf2* با اندازه ۲۰۳ جفت‌باز و *NQO1* با اندازه ۱۹۰ جفت‌باز) و نتایج حاصل از تکثیر این ژن‌ها در واکنش RT-PCR دقیقاً این ژن‌ها با همان اندازه مولکولی و بدون هیچ قطعه غیراختصاصی تکثیر شدند که صحت تکثیر صحیح این ژن‌ها را نشان داد.



شکل ۲) بررسی کیفیت RNA استخراج‌شده از سلول‌های Huh7 روی ژل آگارز

Archive of SID

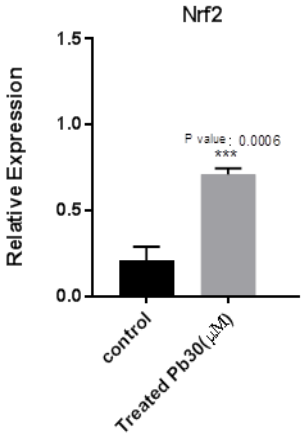
www.SID.ir



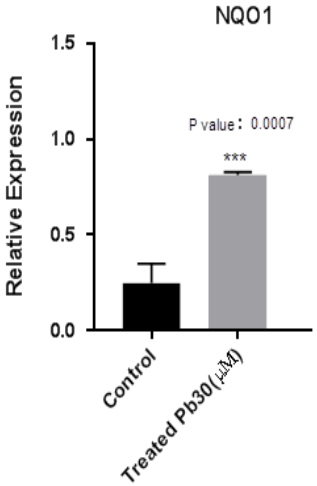
شکل ۳) بیان ژن‌های *Nrf2* و *NQO1* در سلول‌های Huh7

نتایج تحلیل داده‌های Real time-PCR: در سلول‌های تیمارشده با سرب ۳۰ماکرومولار نسبت به نمونه‌های تیمارنشده کنترل، بیان ژن‌های *Nrf2* و *NQO1* به‌علت خاصیت اکسیدانی سرب افزایش معنی‌داری داشت (*Nrf2* برابر با p=0.0006؛ *NQO1* برابر با p=0.0007؛ نمودارهای ۵ و ۶).

بیان ژن *Nrf2* درنمونه‌های تیمارشده با سرب ۳۰ماکرومولار نسبت به نمونه‌های کنترل افزایش داشت که از نظر آماری نیز معنی‌دار بود. در خصوص میزان بیان ژن *NQO1* در نمونه‌های تیمارشده با سرب ۳۰ماکرومولار نسبت به نمونه‌های کنترل نیز افزایش معنی‌داری مشاهده شد.



نمودار ۵) افزایش بیان ژن آنتی‌اکسیدانی *Nrf2* در نمونه‌های تیمارشده با سرب ۳۰ماکرومولار نسبت به کنترل.



نمودار ۶) افزایش بیان ژن آنتی‌اکسیدانی *NQO1* در نمونه‌های تیمارشده با سرب ۳۰ماکرومولار نسبت به کنترل.

بحث

زندگی مدرن امروزی همراه با افزایش استرس‌های محیطی، مواجهه با مواد شیمیایی و آلودگی‌ها باعث تجمع رادیکال‌های آزاد در بدن می‌شود. رادیکال‌های آزاد و عوامل محیطی اکسیداتیو مثل فلزات سنگین، قابلیت آسیب‌رساندن به اسیدهای نوکلئیک و پروتئین‌ها و ایجاد اختلال در عملکرد این ماکرومولکول‌ها را دارند.

در مطالعات اخیر استرس اکسیداتیو یکی از کشنده‌ترین مکانیزم‌های موثر سمیت فلزات سنگین همچون سرب مطرح شده است. بدن انسان مکانیزم‌های متعددی را برای مقابله با این استرس‌های اکسیداتیو در پیش می‌گیرد که مهم‌ترین آنها تولید آنتی‌اکسیدان‌ها است. در صورت برهم‌خوردن تعادل بین این ترکیبات و آنتی‌اکسیدان‌ها شرایطی ایجاد می‌شود که استرس اکسیداتیو خوانده می‌شود[8]. به همین دلیل ارگانیزم‌ها خود را به مقدار کافی از آنتی‌اکسیدان‌ها مجهز کرده‌اند.

مطالعات انجام‌شده روی پروتئین‌های این مسیرها، نحوه تنظیم و عملکرد آنها را روشن کرده است. از جمله ژن‌های دخیل در فرآیند آنتی‌اکسیدانی فاکتور *Nrf2* است که نقش کلیدی در حفاظت ارگانیزم‌ها در برابر استرس‌های محیطی و داخل سلولی دارد[9].

به‌علت اینکه سرب هیچ نقش فیزیولوژیکی در بدن ندارد[10] سطح طبیعی آن در بدن انسان باید نزدیک به صفر باشد. *پترسون* در سال ۱۹۶۵ میزان سرب مجاز در خون را ۰/۰۰۲۵پی‌پی‌ام که معادل ۰/۲۵میکروگرم بر دسی‌لیتر بود، گزارش کرده است[11].

در مطالعات اخیر حداقل میزانی از سرب که باعث مسمومیت در بچه‌ها و جنین می‌شود ۱۰ تا ۱۵میکروگرم بر دسی‌لیتر گزارش شده است، به‌طوری که در برخی مطالعات مشخص شده است که میزان حداقل ۵میکروگرم سرب در هر دسی‌لیتر خون کودکان سبب اثرات سوء بر بهره هوشی خواهد شد و این اثرات با افزایش تماس با سرب و افزایش غلظت خونی آن افزایش خواهد یافت. تماس با سرب در کودکان می‌تواند منجر به اختلال تمرکز و پرخاشگری شود، زیرا سرب به پیوندهای عصبی آسیب رسانده (به‌خصوص در بچه‌ها) و موجب بیماری‌های خونی و مغزی می‌شود[12]. به همین دلیل طراحی و به‌کارگیری سیستم‌های پایش سمیت سربی که بتوانند کمترین میزان سرب موجود در محیط (حداقل میزان مجاز سرب) را تشخیص دهد بسیار حایز اهمیت است.

امروزه استفاده از مدل‌های حیوانی برای یافتن سموم کبدی علاوه بر صرف هزینه بالا، زمان‌بر نیز هست. استفاده از روش‌های "*در شیشه*" سریع تحت عنوان بازده بالا غربالگری (HTS) بر پایه سلول قادر است در زمانی کوتاه اطلاعات عظیمی از سمیت‌سنجی مواد آلاینده محیطی همچون فلزات سنگین موثر بر سلول‌های کبدی را در اختیار محققان قرار دهد. از میان تمام روش‌های متفاوت سنجش میزان سمیت مواد، استفاده از ژن گزارشگر *بتالاکتاماز* تحت پروموتر حاوی توالی ARE (ARE-bla) این قابلیت را دارد تا بیش از ۱۰،۰۰۰ ماده شیمیایی اکسیداتیو را شناسایی کند. زیست‌حسگر سلولی ترکیبات اکسیداتیو (pGL4.26-ARE) که حاوی یک ژن گزارشگر تحت کنترل پروموتری حساس به حضور انواع اکسیدان‌ها است، در حضور این آلاینده‌ها سیگنالی ایجاد می‌کند که قابل شناسایی و اندازه‌گیری است؛ در نتیجه استفاده از آن در سنجش آلودگی ترکیبات اکسیداتیو القاکننده مسیر سیگنالینگ *Nrf2-ARE* است. علاوه بر امتیاز بزرگ سنجش غلظت‌های در دسترس زیستی این عناصر، دارای مزایای دیگری نظیر صرف زمان و هزینه کمتر و سهولت کار با آن است.

به‌منظور تایید فعالیت پروموتر مرکزی ARE ترنسفکشن وکتور

Archive of SID
www.SID.ir

نوترکیب مورد نظر انجام گرفت که نتایج حاصل از سنجش فعالیت ژن گزارشگر لوسیفراز در نمونه‌های تیمارشده با سرب، تحریک ARE را در حضور ترکیبات اکسیداتیو تایید کرد. در مرحله بعد و پس از اطمینان از فعالیت ARE مراحل تهیه زیست‌حسگر تحت دخول پلاسمید به‌صورت مداوم انجام شد. سلول‌های باقی‌مانده در این مرحله در حضور آنتی‌بیوتیک، تحت آزمایش میزان فعالیت ژن لوسیفراز در حضور القاکننده سرب قرار گرفتند. کلون‌های تاییدشده تا ۵بار پاساژ داده شدند تا ورود پلاسمید به ژنوم تایید شود. تعدادی از کلون‌ها فنوتیپ پایداری از خود نشان دادند که این مساله ورود پلاسمید به داخل ژنوم را تایید می‌کند. برای آزمایش زیست‌حسگر سلولی تهیه‌شده پس از پاساژ پنجم از سرب برای القای استرس اکسیداتیو استفاده شد. به عبارت دیگر این ترکیب به‌عنوان محرک فعالیت پروموتر مرکزی ARE انتخاب شد.

زیست‌حسگر سلولی مورد نظر (pGL4.26-ARE) قادر به ردیابی مواد القا کننده مسیر *Nrf2-ARE* است. در این آزمایش میزان بیان ژن لوسیفراز در غلظت‌های ۰ تا ۸۰ماکرومولار سرب مورد بررسی قرار گرفت. میزان بیان ژن گزارشگر همراه با افزایش مقدار ماده اکسیداتیو افزایش می‌یابد و کاهش بیان ژن گزارشگر بعد از غلظت ۳۰ماکرومولار برای سرب، به‌علت اثر مهارکنندگی آن روی متابولیزم سلول‌ها مشاهده می‌شود. غلظت ۳۵ماکرومولار از سرب متابولیزم ۵۰% سلول‌ها را مهار می‌کند.

در یک تحقیق، زیست‌حسگر HepG2/ARE فقط دارای ۱۰جفت‌باز از توالی هسته *ARE* بود و در آن از سلول‌های HepG2 برای ساخت زیست‌حسگر استفاده شد[13]. برای تیمار سلول‌ها در این تحقیق از فلزات گوناگون القاکننده استرس اکسیداتیو برای بررسی حساسیت سازه استفاده شده است. توالی استفاده‌شده در این تحقیق حاوی همه نوکلئوتیدهای ضروری برای القای بیان ژن‌های درگیر در پاسخ به استرس اکسیداتیو نیست و همه القاکننده‌ها را شناسایی نمی‌کند، به‌طوری که تعدادی از فلزات ایجادکننده استرس اکسیداتیو توسط این زیست‌حسگر شناسایی نشده‌اند.

نتیجه‌گیری

بیان تمامی ژن‌های مورد بررسی شامل *Nrf2* و *NQO1* در سلول‌های Huh7 تیمارشده با سرب ۳۰ماکرومولار، نسبت به بیان همان ژن‌های بدون تیمار با سرب افزایش معنی‌داری دارد. غلظت ۳۰ماکرومولار از سرب باعث افزایش پاسخ استرس اکسیداتیو در سلول‌ها و در نتیجه افزایش بیان ژن‌های این مسیر یعنی *Nrf2* و *NQO1* می‌شود تا بتواند اثر سمیت سرب بر سلول‌ها را کاهش دهد. زیست‌حسگر تهیه‌شده از رده سلولی نوترکیب Huh7-1x-ARE-luc حامل ژن گزارشگر می‌تواند وسیله مناسب و کارآمدی برای سنجش ترکیبات اکسیداتیو همچون فلزات سنگینی چون سرب باشد.

تشکر و قدردانی: از تمام عزیزانی که در اجرای این پروژه همکاری داشته‌اند به‌خصوص جناب آقای دکتر هادی شیرزاد ریاست محترم پژوهشگاه علوم انتظامی که حمایت مالی این پروژه را بر عهده داشته‌اند و جناب پروفسور مجید صادقی زاده تشکر و قدردانی می‌شود.

تاییدیه اخلاقی: موردی از سوی نویسندگان گزارش نشده است.

تعارض منافع: موردی از سوی نویسندگان گزارش نشده است.

سهم نویسندگان: سعیده کاووسی (نویسنده اول)، نگارنده مقدمه/پژوهشگر اصلی (۲۰%)؛ هادی شیرزاد (نویسنده دوم)، روش‌شناس/نگارنده بحث (۲۰%)؛ شیرین جلیلی (نویسنده سوم)، پژوهشگر کمکی/تحلیلگر آماری (۲۰%)؛ مجید صادقی‌زاده (نویسنده چهارم)، پژوهشگر کمکی/تحلیلگر آماری (۲۰%)؛ پریا مطهری (نویسنده پنجم)، پژوهشگر کمکی/تحلیلگر آماری (۲۰%)

منابع مالی: موردی از سوی نویسندگان گزارش نشده است.

منابع

1- Radi R. Peroxynitrite, a stealthy biological oxidant. J Biol Chem. 2013;288(37):26464-72.
2- Bauer CE, Elsen S, Bird TH. Mechanisms for redox control of gene expression. Annu Rev Microbiol. 1999;53(1):495-523.
3- Bermingham-McDonogh O, Gralla EB, Valentine JS. The copper, zinc-superoxide dismutase gene of Saccharomyces cerevisiae: Cloning, sequencing, and biological activity. Proc Natl Acad Sci U S A. 1988;85(13):4789-93.
4- Aslund F, Zheng M, Beckwith J, Storz G. Regulation of the OxyR transcription factor by hydrogen peroxide and the cellular thiol-disulfide status. Proc Natl Acad Sci U S A. 1999;96(11):6161-5.
5- Bai X, Chen Y, Hou X, Huang M, Jin J. Emerging role of NRF2 in chemoresistance by regulating drug-metabolizing enzymes and efflux transporters. Drug Metab Rev. 2016;48(4):541-67.
6- Inoue F, Ahituv N. Decoding enhancers using massively parallel reporter assays. Genomics. 2015;106(3):159-64.
7- Simmons SO, Fan CY, Yeoman K, Wakefield J, Ramabhadran R. NRF2 oxidative stress induced by heavy metals is cell type dependent. Curr Chem Genomics. 2011;5(1):1-12.
8- Floyd RA. Neuroinflammatory processes are important in neurodegenerative diseases: An hypothesis to explain the increased formation of reactive oxygen and nitrogen species as major factors involved in neurodegenerative disease development. Free Radic Biol Med. 1999;26(9-10):1346-55.
9- Vasiliou V, Ross D, Nebert DW. Update of the NAD(P)H: Quinone oxidoreductase (NQO) gene family. Hum Genomics. 2006;2(5):329-35.
10- Gilfillan SC. Lead poisoning and the fall of Rome. J Occup Environ Med. 1965;7(2):53-60.
11- Patterson CC. Contaminated and natural lead environments of man. Arch Environ Health. 1965;11(3):344-60.
12- Warniment C, Tsang K, Galazka SS. Lead poisoning in children. Am Fam Physician. 2010;81(6):751-7.
13- Hayes JD, McMahon M. NRF2 and KEAP1 mutations: Permanent activation of an adaptive response in cancer. Trends Biochem Sci. 2009;34(4):176-88.

Archive of SID

www.SID.ir