مقاله تحقیقی

مجلهٔ دانشگاه علوم پزشکی بابل
دوره پانزدهم، شمارهٔ ۶، آبان ۱۳۹۲، صفحه ۵۱-۴۴

اثر حفاظتی مورفین بر مرگ سلولی القا شده در کشت بدون سرم در سلول‌های PC12

حسین ژاله(MSc)[۱]، علی بیدمشکی پور(PhD)[۱*]، مهری آزادبخت(PhD)[۱]، محمدامین حرمشاهی(MSc)[۱]

۱- گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه ، دانشگاه رازی ، کرمانشاه

دریافت: ۹۱/۱۲/۱۹، اصلاح: ۹۲/۲/۱۱، پذیرش: ۹۲/۴/۱۹

خلاصه

سابقه و هدف: مورفین یکی از داروهای مهم در درمان درد بوده و بعنوان تنظیم کننده بقا یا مرگ سلولی در سلول های عصبی و توموری می باشد. بیشتر مطالعات پیشنهاد می کنند که مورفین باعث القا آپوپتوزیس در سلول های عصبی می شود اما در مطالعات دیگری بیان شده که مورفین اثرات مهاری برعلیه مرگ سلولی القا می کند. در این مطالعه اثر غلظت‌های مختلف مورفین بر مرگ سلولی القا شده در سلول‌های PC۱۲ تحت شرایط کشت بدون سرم بررسی شد.

مواد و روشها: سلول ها در محیط کشت RPMI1640 همراه با ۰/۲ درصد BSA کشت داده شدند. سلول ها به دو گروه (گروهI: بدون پیش تیمار با نالتروکسان و گروه II: همراه با پیش تیمار نالتروکسان) تقسیم شدند. در هر گروه سلول ها همراه با غلظت‌های مختلف (تیمار ۱: $۱۰^{-۱۲}$، تیمار ۲: $۱۰^{-۱۰}$، تیمار ۳: $۱۰^{-۸}$، تیمار۴: $۱۰^{-۶}$، تیمار ۵: $۱۰^{-۴}$ و تیمار ۶: ۰مولار) مورفین تیمار شدند. میزان سیتوتوکسیسیتی از طریق اندازه گیری لاکتات دهیدروژناز و میزان مرگ سلول ها از طریق رنگ آمیزی افتراقی Hoechst/PI اندازه‌گیری شد.

یافته ها: بعد از ۶ روز تمامی سلول های کنترل در اثر عدم وجود سرم کاملا دچار آپوپتوزیس (۱۰۰٪) و مرگ سلولی شدند ($p<۰/۰۵$). ارزیابی میزان سیتوتوکسیسیتی و مرگ سلول ها نشان داد که مورفین در تمامی غلظت‌ها میزان سیتوتوکسیسیتی و مرگ سلول های القا شده توسط شرایط بدون سرم در سلول های PC12 مهار می کند ($p<۰/۰۵$).

نتیجه گیری: نتایج نشان داد که مورفین بعنوان یک فاکتور کمکی با مکانیسم وابسته به رسپتورهای اپیوئیدی منجر به مهار مرگ سلولی در سلول های PC۱۲ در شرایط کشت بدون سرم می شود.

واژه های کلیدی: آپوپتوزیس، مورفین، سرم، PC۱۲.

مقدمه

مرگ سلولی نتیجهٔ نهایی آسیب سلول و یکی از وخیم‌ترین رویداد ها در روند آسیب هر بافت یا عضو است (۲و۱). آپوپتوز مرگ فیزیولوژیک سلول است که برای تکامل و هموستاز بافتی ضروری است. حذف سلولهای پیر و آسیب دیده و از بین رفتن حالت پره ای بین انگشتان در انسان در دوره جنینی، نمونه هایی از نقش آپوپتوز در حفظ هموستاز و تکوین اعضاء می‌باشد (۳). محرکهای مختلف شامل عوامل ژنوتوکسیک (شیمی درمانی و رادیوتراپی)، هورمون درمانی و محرومیت سلول از عوامل رشد مانند سیتوکاین‌ها سبب تسریع روند آپوپتوز می شوند (۴). وجود و یا فقدان فاکتورهای رشد در محیط کشت سلول ها به ترتیب نقش مهمی در بقا و مرگ سلول ها دارد (۶و۵). در سیستم عصبی، بیشتر نورون ها و الیگودندروسیت ها به علت عدم دسترسی به عوامل نوروتروفیک دچار تخریب و مرگ سلولی می شوند (۸و۷). در کشت آزمایشگاهی، شرایط بدون سرم استرس های مختلفی را در سلول ها القا می کنند و میزان زنده ماندن الیگودندروسیت ها و نورون های تمایز یافته وابسته به وجود عوامل رشد موجود در سرم است (۹و۸و۶). اپیوئید اصطلاحی است که به هرنوع ماده درون زا و یا صناعی مولد اثرات شبه مورفینی اطلاق می گردد (۱۱و۱۰). از طرفی عملکردهای اپیوئیدها وابسته به تشکیل کمپلکس رسپتور- آگونیست در سطح غشاهای سلولی به وجود می آید. اتصال آگونیست های اپیوئیدی به رسپتورها و فعال شدن رسپتورها باعث شروع آبشاری از وقایع بیولوژیکی در درون سلول ها می گردد (۱۲). مطالعات نشان می دهند که مورفین بعنوان داروئی اپیوئیدی سبب تنظیم فرآیند های اندوکرینی (۱۵-۱۳) و سیستم ایمنی (۱۷و۱۶) می گردد. مورفین علاوه بر اثرات ضد دردی، در تکوین مغز، عصب‌زایی، تمایز سلولی و آپوپتوز و در شرایط in vivo مورفین وابسته به دوز مصرفی، مرگ سلولی یا بقا سلولها را در نورون‌های سیستم عصبی مرکزی تعدیل می‌کند (۱۹و۱۸). مطالعه اثرات مورفین در کشت سلولهای مختلف مانند نورون‌ها و میکروگلیاها، سلول‌های ریوی و حتی

▣ این مقاله حاصل پایان نامه حسین ژاله دانشجو کارشناسی ارشد زیست شناسی سلولی و مولکولی دانشگاه رازی کرمانشاه می باشد.

* مسئول مقاله:
آدرس: کرمانشاه، خیابان باغ ابریشم، دانشگاه رازی، دانشکده علوم پایه، گروه زیست شناسی، تلفن: ۰۸۳۱-۴۲۷۴۵۴۵
e-mail:a.bidmeshkipour@gmail.com

[DOR: 20.1001.1.15614107.1392.15.6.6.9]
[DOI: 10.18869/acadpub.jbums.15.6.44]

سلول‌های سرطانی همگی به نقش تخریبی دوزهای بالای آن بر القای مرگ سلولی یا نکروز در این سلول ها تأکید دارند (۲۰). از این رو جهت بهبود رشد و پایداری سلول ها و جلوگیری از مرگ سلولی و تخریب سلولهای عصبی معمولا از سرم بعنوان فاکتور خارجی و یا از عوامل پایدار کننده سلول ها استفاده می شود. امروزه علاوه بر سرم از عوامل متفاوتی جهت بهبود رشد و مهار مرگ سلولی در سلول های کشت شده مانند FGF، NGF و انسولین استفاده می شود (۲۲و۲۱). این عوامل گرچه باعث مهار مرگ سلولی در سلول های PC12 و نیز تحریک تقسیم سلولی می گردند، اما بعلت هزینه زیاد و محدودیت دسترسی به این فاکتورها مشکلاتی را برای محققین ایجاد می کند. از این رو محققین همواره بدنبال تولید و کشف عواملی با عملکردهای شبیه فاکتورهای رشد با شرایط ارزان، در دسترس و مناسب هستند. لذا در این مطالعه با توجه به اثر وابسته به غلظت مورفین، اثرات جبرانی شبه فاکتور رشدی این ماده بر مرگ سلولی القا شده در کشت سلول‌هایPC۱۲ بدون حضور فاکتورهای کمکی موجود در سرم مورد مطالعه قرار گرفت.

مواد و روشها

کشت سلول‌های PC۱۲: سلول های PC۱۲ از انستیتو پاستور ایران تهیه و در محیط کشت RPMI1640 همراه با ۲/۰% (w/v) (Bovine Serum Albumin; BSA) BSA، ۱% (v/v) L-Glutamin و ۱% (v/v) NEAA (Nonessential Amino Acids; NEAA)، درون فلاسک کشت سلول T-25 (NUNC) کشت داده شدند. پس از گذشت ۴۸ ساعت محیط کشت سلولی با محیط کشت تازه تعویض شد. هنگامی که تراکم سلول‌های چسبیده به کف فلاسک کشت سلول به ۷۰ تا ۸۰ درصد رسید، پاساژ سلول‌ها با استفاده از محلول Trypsin-EDTA ۰/۲۵% درصد انجام شد.

تیمار سلول‌های PC۱۲: سلول‌ها در درون فلاسک کشت سلول T-25 و با تراکم 10^4 Cell/Cm^2 در محیط کشت RPMI1640 همراه با ۲/۰% (w/v) BSA، ۱% (v/v) L-Glutamin و ۱% (v/v) NEAA کشت داده شدند و در انکوباتور با دمای ۳۷ ^{0}C و ۵% CO_2 نگهداری شدند. سلول ها به دو گروه تقسیم شدند. گروهI شامل سلولهای PC۱۲ که توسط مهارکننده نالتروکسان پیش تیمار نشده بودند و گروه II: شامل سلولهای رده PC۱۲ که توسط مهارکننده نالتروکسان پیش تیمار شده بودند. در هر گروه سلولها با ۶ دوز تیماری متفاوت (تیمار۱: 10^{-12} ، تیمار۲: 10^{-10} ، تیمار۳: 10^{-8} ، تیمار۴: 10^{-6} ، تیمار۵: 10^{-4} و تیمار۶: ۰/۰ مولار) مورفین تیمار شدند. سلول‌هایی که محیط تیمار آن‌ها فاقد مورفین بود (تیمار۶ در هر گروه) به عنوان کنترل در نظر گرفته شدند. سپس سلول ها در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد و ۵% CO_2 به مدت ۱۲ روز انکوبه شدند. سلولها از لحاظ میزان سیتوتوکسیسیتی و میزان مرگ سلولی با میکروسکوپ معکوس مجهز به دوربین عکسبرداری و بررسی شدند.

ارزیابی میزان سیتوتوکسیسیتی سلول ها: سنجش لاکتات دهیدروژناز روشی سریع و ساده بمنظور کمیت سنجی سیتوتوکسیسیتی براساس اندازه‌گیری فعالیت آنزیم لاکتات دهیدروژناز آزاد شده از سلولهای آسیب دیده می باشد. در این روش، سلولها با تراکم 10^4 سلول در میلی‌لیتر در محیط کشت RPMI1640 حاوی ۰/۲ درصد BSA در چاهک‌های ظروف کشت ۲۴ خانه کشت داده شدند. پس از آن که سلولها به کف ظرف چسبیدند، محیط کشت سلولها برداشته و با محلول PBS شستشو داده شدند. سپس سلول ها در محیط کشت سلولی همراه با غلظتهای مختلف مورفین و به صورت سه تایی تیمار شدند. جهت تعیین میزان تأثیر مواد بر بقای سلولها، ۱۰۰ میکرولیتر از محیط رویی سلولها با استفاده از سمپلر به ظرف کشت ۹۶ خانه‌ای منتقل شدند. به منظور تهیه مخلوط واکنش، ابتدا کاتالیست در یک میلی‌لیتر آب دیونیزه حل شد و برای تهیه مخلوط واکنش به تعداد ۱۰۰ تست، ۲۵۰ میکرولیتر از محلول کاتالیست با ۱۱/۲۵ میلی‌لیتر محلول رنگ مخلوط شد. ۱۰۰ میکرولیتر از مخلوط واکنش به هر چاهک اضافه شده و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق و به دور از نور انکوبه شد. سپس جذب نمونه‌ها در ۵۰۰–۴۹۰ نانومتر با استفاده از یک دستگاه ELISA reader خوانده شده و طول موج ۶۰۰ نانومتر نیز به عنوان رفرانس انتخاب گردید. این آزمایش در روزهای ۳، ۶، ۹ و ۱۲ روز پس از تیمار انجام شد.

ارزیابی میزان مرگ سلولی سلول ها: اندازه گیری میزان مرگ سلولی با استفاده از رنگ های فلورسنس به روش افتراقی انجام شد (۲۳). در این روش سلولهای PC۱۲ تیمار شده در دو مرحله رنگ آمیزی شدند. سلو لها با تراکم 10^4 سلول در میلی‌لیتر در محیط کشت RPMI1640 حاوی ۰/۲ درصد BSA در چاهک‌های ظروف کشت ۶ خانه‌ای کشت داده شدند. پس از آنکه سلولها به کف ظرف چسبیدند، محیط کشت سلول ها برداشته شد و با محلول PBS شستشو داده شدند. سپس سلول های محیط کشت سلولی همراه با غلظتهای مختلف مورفین و به صورت سه تایی تیمار شدند. پس از گذشت ۲۴ ساعت، جهت تعیین میزان مرگ سلولی، سلولها با PBS شسته و به مدت ۳۰ دقیقه توسط محلول رنگی بیس بنزآمید (۱۰ میکروگرم در میلی لیتر محیط کشت) رنگ آمیزی شدند. پس از نفوذ رنگ به داخل هسته سلول ها و اتصال به DNA، هسته سلول ها به رنگ آبی در آمد. سپس سلول ها سه بار و به مدت ۵ دقیقه در PBS شستشو داده شدند. سپس سلول ها به مدت پنج دقیقه در محلول رنگ پروپیدیوم یدید (PI) (۵۰ میکرو گرم در میلی لیتر محیط کشت) قرار داده شدند. بعد سلولها به مدت ۱۰ دقیقه در محلول پارافرمالدهید ۰/۴ درصد قرار داده و فیکس شدند. پس از رنگ آمیزی سلول های آپوپتوتیک دارای ظاهر صورتی روشن و هسته ای متراکم و قطعه قطعه هستند. این آزمایش در روزهای ۳، ۶، ۹ و ۱۲ روز پس از تیمار انجام شد.

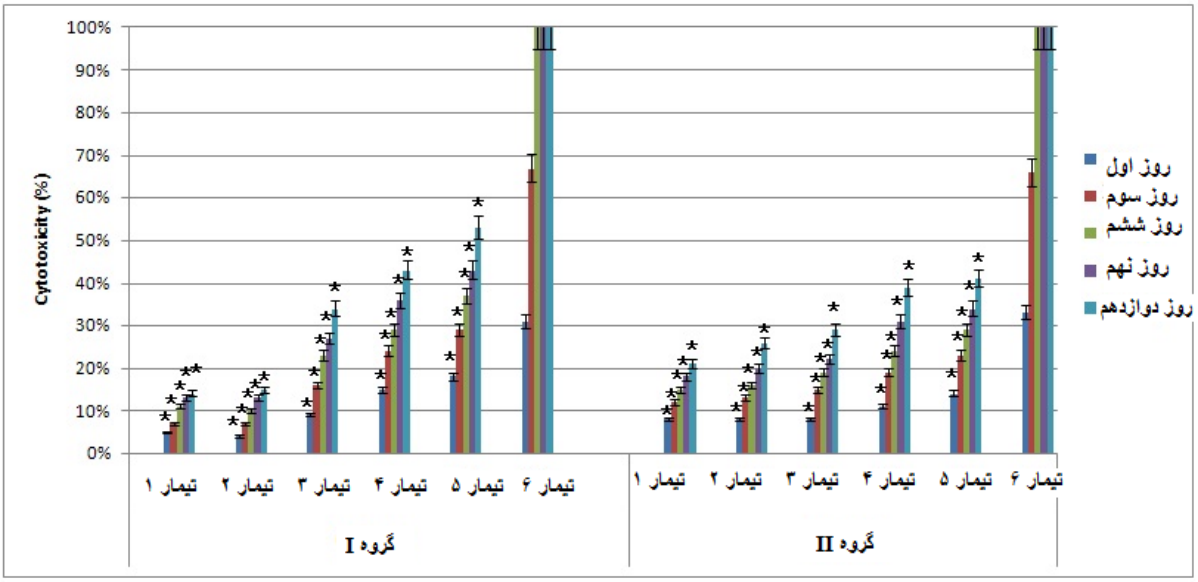
بررسی آماری داده های حاصل از ارزیابی میزان سیتوتوکسیسیتی و میزان مرگ سلولی با استفاده از نرم افزار آماری SPSS; version 16 محاسبه شد و از آزمون واریانس یک طرفه (One-Way ANOVA) و تست Tukey برای بررسی معنی دار بودن اختلاف بین گروه ها استفاده شد و $p<0/05$ معنی دار در نظر گرفته شد.

یافته ها

اثر مورفین بر میزان سیتوتوکسیسیتی سلول های PC12: نتایج بدست آمده از بررسی سیتوتوکسیسیتی سلول‌های PC۱۲ نشان داد که یک روز پس از تیمار در هر گروه با افزایش غلظت مورفین در تیمارهای مختلف در مقایسه با تیمار ۶ میزان سیتوتوکسیسیتی کاهش می یابد ($p<0/05$). پس از گذشت ۳ روز از انجام آزمایش میزان سیتوتوکسیسیتی سلول ها در هر گروه با افزایش

[DOR: 20.1001.1.15614107.1392.15.6.6.9]
[DOI: 10.18869/acadpub.jbums.15.6.44]

غلظت مورفین در تیمار های مختلف در مقایسه با تیمار۶ کاهش یافت (p<۰/۰۵). بررسی آماری نشان داد که افزایش در میزان سیتوتوکسیسیتی پس از ۳ روز در مقایسه با روز اول در تیمارهای ۱، ۲، ۴ و ۵ در گروه I در مقایسه با تیمارهای مشابه در گروه II معنی دار بودند (p<۰/۰۵). اما این اختلاف بین تیمار۱ و ۲ از نظر آماری معنی دار نبود. پس از گذشت ۶ روز از انجام آزمایش میزان فعالیت سیتوکسیسیتی سلول ها در گروه I در تیمارهای ۱ تا ۵ (به ترتیب ۱۰،۱۱، ۲۳، ۲۹ و ۳۷ درصد) در مقایسه با سلولهای تیمار۶ (۱۰۰درصد) که در این زمان کاملا از بین رفته و دچار تخریب شده بودند، دارای کاهش معنی داری بودند (p<۰/۰۵). کاهش میزان سیتوکسیسیتی در تیمارهای۱ تا ۵ در گروه II در مقایسه با تیمار۶ (۱۰۰درصد) دیده شد که تمامی این اختلافات معنی دار بود (p<۰/۰۵). مقایسه بین گروه ها نشان داد که اختلافات آماری ایجاد شده در تیمارهای ۱ تا ۵ در گروه های I و II معنی دار و ناشی از تحریک سیگنال های درون سلولی ناشی از فعالیت رسپتورهای اپیوئیدی بود (p<۰/۰۵). مطالعات آماری نشان داد که اختلاف افزایشی در میزان سیتوکسیسیتی پس از ۶ روز در مقایسه با روزهای اول و سوم در تیمارهای ۱ تا ۵ در هر دو گروه I و II معنی دار بود (p<۰/۰۵). پس از گذشت ۹ و ۱۲ روز از انجام آزمایش میزان سیتوتوکسیسیتی در سلول‌ها در گروه های I و II در تیمار های ۱ تا ۵ در مقایسه با تیمار۶ (۱۰۰درصد) در هر گروه دارای کاهش معنی دار بودند و این اختلافات آماری بین گروه ها نیز معنی دار بودند (p<۰/۰۵). بررسی آماری در مطالعات آزمایشگاهی پس از ۹ و ۱۲ روز از آزمایش نشان داد کـه اختلافات افزایشی در تیمارهـای ۱ تا ۵ در هـر دو گـروه در مقایسه با روزهای پیشین معنی دار بودند (p<۰/۰۵) (نمودار۱).



نمودار ۱. اثر مورفین بر میزان سیتوتوکسیسیتی سلول‌های رده PC۱۲ بدون حضور سرم در زمان های مختلف.

گروهI غلظت‌های مختلف مورفین بدون پیش تیمار نالتروکسان، گروهII غلظت‌های مختلف مورفین همراه با پیش تیمار نالتروکسان، تیمار۱: 10^{-12} مولار مورفین، تیمار۲: 10^{-10} مولار مورفین ، تیمار۳: 10^{-8} مولار مورفین، تیمار۴: 10^{-6} مولار مورفین ، تیمار۵: 10^{-4} مولار مورفین و تیمار۶: ۰/۰ مولار مورفین.

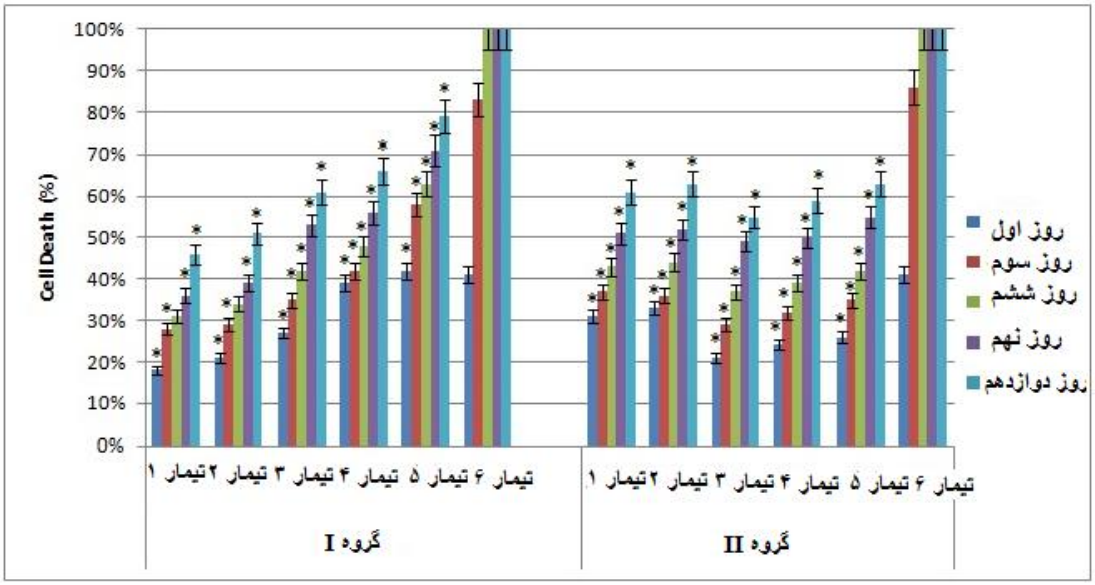
***: مقایسه تیمارها بشکل درون گروهی و ستون‌ها با این نماد دارای اختلاف معنی دار با تیمار۶ هستند.**

اثر مورفین بر میزان مرگ سلولی سلولهای PC12: نتایج بدست آمده از بررسی مرگ سلولی در سلول‌های رده PC۱۲ نشان داد که یک روز پس از اعمال اثر مورفین در گروه I تیمارهای ۱، ۲ و ۳ (به ترتیب ۱۸، ۲۱و ۲۷ درصد) در مقایسه با تیمار ۶ (۴۱٪) و در گروه II تیمارهای ۱ تا ۵ (به ترتیب ۳۱، ۲۴، ۲۱، ۳۳ و ۲۶ درصد) که پیش تیمار شده بودند و در معرض مورفین قرار داشتند اختلاف معنی داری از نظر میزان مرگ سلولی با تیمار۶ (۴٪) وجود داشت (p<۰/۰۵). در این مرحله بین تمامی تیمارهـای ۱ تا ۵ در گروه I در مقایسه با تیمارهـای ۱ تا ۵ در گروهII در میزان مرگ سلولـی اختلاف معنی داری دیده شد (p<۰/۰۵). پس از گذشت ۳ روز از انجام آزمایش میزان مرگ سلولی سلول ها گروه I در تمامی تیمارهای ۱ تا ۵ به ترتیب ۲۷، ۲۹، ۳۵، ۴۲ و ۵۸ درصد بود که در مقایسه با سلولهای تیمار ۶ (۸۳٪) که در این زمان دچار مرگ سلولـی شدیدی شده بودند، دارای اختلاف معنی داری بودند (p<۰/۰۵). کاهش میزان مرگ سلولی در تیمارهـای ۱ تا ۵ (به ترتیب ۳۷، ۲۹، ۳۶، ۳۲ و ۳۵ درصد) در گروهII در مقایسه با تیمار۶ (۸۲٪) دیده شد که تمامی این اختلافات معنی دار است (p<۰/۰۵). مقایسه بین گروه ها نشان می دهد که اختلافات آماری ایجاد شده در تیمارهای ۱ تا ۵ در گروه هـای I و II معنـی دار و ناشـی از تحریک سیگنـال هـای درون سلولـی ناشـی از فعالیت رسپتورهـای اپیوئیدی است (p<۰/۰۵). مطالعات آماری نشان می دهد که اختلاف افزایشی در میزان مرگ سلولی پس از ۳ روز در مقایسه با روز اول در تیمارهای ۱ تا ۵ در گروه I و گروه II معنی دار بوده است (p<۰/۰۵). پس از گذشت ۶ روز از انجام آزمایش میزان مرگ سلولی در سلول های گروه I در تمامی تیمارهای ۱ تا ۵ به ترتیب ۳۱، ۳۴، ۴۲، ۴۸ و۶۳ درصد بود که در مقایسه با سلولهای تیمار ۶ (۱۰۰٪) که در این زمان کاملا از بین رفته و دچار مرگ سلولی شده بودند دارای اختلاف معنی داری بودند (p<۰/۰۵). کاهش میزان مرگ سلولی در تیمارهای

[DOR: 20.1001.1.15614107.1392.15.6.6.9]
[DOI: 10.18869/acadpub.jbums.15.6.44]

۱ تا ۵ (به ترتیب ۴۳، ۳۷، ۴۴، ۳۹ و ۴۲ درصد) در گروه II در مقایسه با تیمار ۶ (۱۰۰درصد) دیده شد که تمامی این اختلافات معنی دار بود (p<۰/۰۵). مقایسه بین گروه ها نشان داد که اختلافات آماری ایجاد شده در تیمارهای ۱ تا ۵ در گروه های I و II معنی دار و به دلیل تحریک سیگنال های درون سلولی ناشی از فعالیت رسپتورهای اپیوئیدی است (p<۰/۰۵). مطالعات آماری نشان داد که اختلاف افزایشی در میزان مرگ سلولی پس از ۶ روز در مقایسه با روز اول و سوم در تیمارهای ۱ تا ۵ در هر دو گروه I و II معنی دار بود (p<۰/۰۵). پس از گذشت ۹ و ۱۲ روز از انجام آزمایش میزان مرگ سلولی در سلول‌ها در گروه های I و II در تیمار های ۱ تا ۵ در مقایسه با تیمار ۶ (۱۰۰٪) دارای کاهش معنی دار بود و این اختلافات آماری بین گروه ها نیز معنی دار بود (p<۰/۰۵).

اختلافات آماری و افزایش نسبی میزان مرگ سلولی در گروه II در مقایسه با گروه I در تمامی روزهای تیماری نتیجه سرکوب سیگنالهای سلولی ناشی از فعال شدن رسپتورهای اپیوئیدی است که توسط مهارکننده نالتروکسان ایجاد می شود. در تمامی تیمارها با مورفین، در هر دو گروه، میزان مرگ سلولی در مقایسه با گروه کنترل (تیمار ۶) دچار کاهش معنی داری بود که این مسئله می تواند بازگوکننده نقش حفاظتی دوزهای مختلف مورفین در برابر مرگ سلولی ناشی از کمبود سرم در محیط سلول ها باشد (نمودار ۲).



نمودار ۲. اثر مورفین بر میزان درصد مرگ سلولی سلول‌های رده PC۱۲ بدون حضور سرم در زمان های مختلف.

گروهI غلظت‌های مختلف مورفین بدون پیش تیمار نالتروکسان، گروهII غلظت‌های مختلف مورفین همراه با پیش تیمار نالتروکسان، تیمار۱: 10^{-12} مولار مورفین، تیمار۲: 10^{-10} مولار مورفین، تیمار۳: 10^{-8} مولار مورفین ، تیمار۴: 10^{-6} مولار مورفین ، تیمار۵: 10^{-4} مولار مورفین و تیمار۶: ۰/۰ مولار مورفین.

***:مقایسه تیمارها بشکل درون گروهی و ستون‌ها با این نماد دارای اختلاف معنی دار با تیمار۶ هستند.**

بحث و نتیجه گیری

در این تحقیق بررسی های مورفولوژیک سلول های غیر تیمار شده و تحت تیمار با دوزهای مورد استفاده مورفین به مدت ۱۲ روز نشان داد که فقدان سرم در محیط کشت سلول های PC۱۲ سبب القا سیتوتوکسیسیتی و مرگ سلولی شدید در سلول ها می شود بطوریکه سلولها پس از حدود ۵ روز از کشت کاملا دچار آپوپتوزیس می گردند. محققین سال های متمادی است که از سلولهای رده PC۱۲ به عنوان یک مدل مناسب جهت مطالعات نوروبیولوژیک و بررسی اثرات فاکتورهای رشد بر سلول های عصبی استفاده می کنند. سلولهای PC۱۲ در صورت فقدان عوامل رشد موجود در سرم قادر به زنده بودن و تقسیم نبوده و دچار مرگ سلولی می شوند (۲۴و۲۱). در این مطالعه نشان داده شد که فقدان عوامل رشد موجود در سرم باعث القا مرگ سلولی در سلول های PC12 می شود. علاوه بر القا مرگ سلولی، در سلول های PC۱۲ در صورت فقدان سرم و عوامل رشد موجود در آن، دچار تمایز سلولی نمی گردند (۲۶و۲۵و۲۲). عوامل نوروتروفیک باعث تحریک فعال شدن مسیر PI_3K/AKT و در نتیجه حفاظت سلول‌ها در مقابل آپوپتوز در برخی از مدل‌های کشت بدون سرم می گردند (۲۷). در سلول‌های PC۱۲ حذف کامل سرم تحریکی موجب فعالیت سریع مسیر JNK و در نتیجه القا فعالیت آپوپتوتیکی در تیپ‌های سلولی عصبی می‌شود (۲۸). مورفین به عنوان یک داروی μ اپیوئیدی قوی، یکی از پر مصرف ترین داروها در درمان دردهای مزمن است. سیگنال مورفین بسیار پیچیده بوده و این مسئله به علت پیوستگی پیچیده رسپتورهای اپیوئیدی با مولکولهای افکتوری غشاء پلاسمایی و سازمانهای داخل سلولی سلول هاست که باعث فعال شدن پروتئین کینازهای مختلف شامل ERK، P38MAPK، JNK و ERK5 می شود. این عوامل در بسیاری از سیگنالهای سلولی مانند تکثیر سلولی، تمایز، بقا، یادگیری و حافظه نقش فعالی دارند (۲۹).

مورفین با تحریک و فعال کردن زیر واحد G پروتئینی βγ سبب فسفریلاسیون و فعال کردن IP3Kγ و IP3Kβ (۳۱و۳۰) و مهار آپوپتوز از طریق مهار (۳۳و۳۲) پروتئین پیش مرگی Bad و فعال کردن پروتئین NF-kβ

[DOR: 20.1001.1.15614107.1392.15.6.6.9]
[DOI: 10.18869/acadpub.jbums.15.6.44]

می شود. این فعالیت کاملا به واسطه رسپتورهای اپیوئیدی و تمامی اثرات فوق به واسطه نالتروکسان و مهار کننده PI3K (ورتامانین) مهار می گردد (۳۵و۳۴). مطالعات نشان داد که استفاده از مورفین در خلال جنین زایی باعث جلوگیری از آپوپتوز نورونهای گانگلیون ciliary که به شکل نرمال در خلال تشکیل سیناپسها از بین می روند، می گردد (۳۶). مورفین همچنین باعث مهار القا آپوپتوز با واسطه پراکسی نیتریت در آستروسیت های اولیه (۳۷) و تحریک تکثیر سلولی سلولهای اندوتلیال (۳۸)، فیبروبلاست های کلیه (۳۹) و نورونهای پیش سازی هیپوکامپ (۳۷) می شود. غلظت های 10^{-12}–10^{-10} و 10^{-4} مولار مورفین به ترتیب ایجاد کمترین و بیشترین فعالیت سیتوتوکسیسیتی و القای اثر مرگ سلولی را در مقایسه با سایر غلظت های مورفین ایجاد کرده اما در مقایسه با سلول های کنترل (فاقد غلظت های مورفین) دارای اثرات جبرانی بر مرگ سلولی و سیتوتوکسیسیتی بودند. بررسی فعالیت مهار کننده رسپتورهای اپیوئیدی (نالتروکسان) نشان داد که با پیش تیمار سلول ها توسط این مهارکننده، اثرات مختلف مورفین در شرایط بدون مهارکننده در غلظت های مختلف مورفین رفتارهای معکوسی حاصل می شود که نشان می دهد رفتارهای مورفین در محیط کشت وابسته به تحریک و فعالیت رسپتورهای اپیوئیدی توسط مورفین است.

به طور کلی نتایج حاصل از ارزیابی میزان سیتوتوکسیسیتی و مرگ سلولی پیشنهاد می‌کند که مورفین در یک روش وابسته به غلظت و وابسته به رسپتورهای اپیوئیدی می‌تواند نقش یک فاکتور کمکی- حفاظتی را برای سلولهای PC۱۲ داشته باشد. این نتایج نشان می دهد که از مورفین می توان به عنوان یک عامل کمکی موثر در پروتوکل های کشت سلول های PC۱۲ استفاده کرد.

تقدیر و تشکر

بدینوسیله از گروه زیست شناسی دانشگاه رازی کرمانشاه، قدردانی بعمل می آید.

[DOR: 20.1001.1.15614107.1392.15.6.6.9]
[DOI: 10.18869/acadpub.jbums.15.6.44]

Protective Effects of Morphine on Serum Deprivation-induced Cell Death in PC12 Cells

H. Zhaleh (MSc) [1], A. Bidmeshki Pour (PhD) [1*], M. Azadbakht (PhD) [1], M.A. Haramshahi (MSc) [1]

1. Department of Biology, Faculty of Sciences, Razi University, Kermanshah, Iran

J Babol Univ Med Sci; 15(6); Nov 2013; pp: 44-51

Received: Mar 9th 2013, Revised: May 1st 2013, Accepted: Jul 10th 2013.

ABSTRACT

BACKGROUND AND OBJECTIVE: Morphine is the most effective pain-relieving drugs in the management of pain. Morphine modulates survival and apoptosis of neural and tumoral cells. Some data suggest that morphine induces apoptosis in neurons, while other evidence shows that morphine could have beneficial effects against apoptosis. The present study was undertaken to evaluate the effects of different concentrations of morphine on serum deprivation-induced cell death in PC12 cells

METHODS: In this study PC12 cells (Pastour Insititue, Iran) were cultured in RPMI1640 culture medium supplemented with 0.2% BSA. Cells were divided to 2 groups (group I: cells unpretreated with naltrexone; group II: cells pretreated with naltrexone). There were six treatments in each group. Cells treated with different concentrations (The treatments were: treatment1: 10^{-12}, treatment 2: 10^{-10}, treatment 3: 10^{-8}, treatment 4: 10^{-6}, treatment 5: 10^{-4}, Treatment 6: 0.0 M,) of morphine. The percentage of cytotoxicity by lactate dehydrogenase assay and the percentage of cell death by Hoechst/PI differential staining of each group were assessed.

FINDINGS: After 6 days, serum deprivation result in full cell death (100%) in PC12 cells ($p<0.05$). The percentage of cytotoxicity and cell death assessment showed that morphine at different concentration inhibited serum deprivation-induced cell death and cytotoxicity in PC12 cells ($p<0.05$).

CONCLUSION: Our results concluded that morphine with an opioid receptor-depended as a growth factor lead to inhibition of serum deprivation-induced cell death in PC12 cells.

KEY WORDS: *Apoptosis, Morphine, Serum, PC12.*

*Corresponding Author;
Address: Department of Biology, Faculty of Sciences, Razi University, Bagh Abrisham St., Kermanshah, Iran
Tel: +98 831 4274545
E-mail: a.bidmeshkipour@gmail.com

[DOR: 20.1001.1.15614107.1392.15.6.6.9]
[DOI: 10.18869/acadpub.jbums.15.6.44]

References

1.Amin F, Bowden ID, Szegedi Z, Mihalik R, Szende B. Apoptotic and non-apoptotic modes of programmed cell death in MCF-7 human breast cancinoma cells. Cell Biol Int 2000;24(4):253-60.

2.Ceruti S, Beltrami E, Matarrese P, et al. A key role for caspase-2 and caspase-3 in the apoptosis induced by 2-chloro-2-deoxy-adenosine (cladribine) and 2-chloro-adenosine in human astrocytoma cells. Mol Pharmacol 2003;63(6):1437-47.

3.Sadoul R, Catsicas S, Martinou JC. Neuronal death: common mechanisms during development and disease. Seminar Neurosci 1994;6(5):343-6.

4.Robbins S, Cotran R, Kumar V. Robbins basis pathology. 7th ed. Boston: Harvard Medical School 2009; pp: 400-2.

5.Raff, M. C. Social controls on cell survival and cell death. Nature (Lond.) 1992 Apr 2;356(6368):397-400.

6.Raff MC, Barres BA, Burne JF, Coles HS, Ishizaki Y, Jacobson MD. Programmed cell death and the control of cell survival: lessons from the nervous system. Science 1993;262(5134):695-700.

7.Barres BA, Hart IK, Coles HS, et al. Cell death and control of cell survival in the oligodendrocyte lineage. Cell 1992;70(1):31-46.

8.Martin DP, Schmidt RE, Distefano PS, Lowry OH, Carter JG, Johnson EM. Inhibitors of protein synthesis and RNA synthesis prevent neuronal death caused by nerve growth factor deprivation. J Cell Biol 1988;106(3):829-44.

9.Birren SJ, Lo L, Anderson DJ. Sympathetic neuroblasts undergo a developmental switch in trophic dependence. Development 1993;119(3):597-610.

10.Trescot AM, Datta S, Lee M, Hansen H. Opioid pharmacology. Pain Physican 2008;11(Suppl 2):133-53.

11.McCleane G, Smith HS. Opioid for persistent noncancer pain. Med Clin North Am 2007;91(2):177-97.

12.Minami M, Onogi T, Nakagawa T, et al. DAMGO, a mu-opioid receptor selective ligand, distinguishes between mu- and kappa-opioid receptors at a different region from that for the distinction between mu- and delta-opioid receptors. FEBS Lett 1995;364(1):23-7.

13.Schafer M, Martin R. Opioid peptides in the pituitary: a hormone, a panacrine modulator and a peptide in search of function. Biol Chem Hoppe Seyler 1994;375(11):737-40.

14.Brown SM, Stimmel B, Taub RN, Kochwa S, Rosenfield R. Immunologic dysfunction in heroin addicts. Arch Intern Med 1974;134(6):1001-6.

15.Roy S, Loh HH. Effects of opioids on the immune system. Neurochem Res 1996;21(11):1375-86.

16.Minneman KP, Lee D, Zhong H, Berts A, Abbott KL, Murphy TJ. Transcriptional re- sponses to growth factor and G protein-coupled receptors in PC12 cells: Comparison of 1- adrenergic receptor subtypes. J Neurochem 2000;74(6):2392-400.

17.King AJ, Sun H, Diaz B, et al. The protein kinase Pak3positivelyregulates Raf-1activity through phosphorylation of serine 338. Nature 1998;396(6707):180-3.

18.Liu B, Qin L, Yan SN, Wilson BC, Liu Y, Hong JS. Femtomolar concentrations of dynorphins protect rat mesencephalic dopaminergic neurons against inflammatory damage. J Pharmacol Exp Ther 2001;298(3):1133-41.

19.Cadet P, Rasmussen M, Zhu W, Tonnesen E, Mantione KJ, Stefano GB. Endogenous morphinergic signaling and tumor growth. Front Biosci 2004;9:3176-86.

20.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(17):7650-61.

21.Rukenstein A, Rydel RE, Greene LA. Multiple agents rescue PC12 cells from serum-free cell death by translation and transcription-independent mechanisms. J Neurosci 1991;11(8):2552-63.

[DOR: 20.1001.1.15614107.1392.15.6.6.9]
[DOI: 10.18869/acadpub.jbums.15.6.44]

22.Batistatou A, Greene LA. Aurintricarboxylic acid rescues PC12 cells and sympathetic neurons from cell death caused by nerve growth factor deprivation: correlation with suppression of endonuclease activity. J Cell Biol 1991;115(2):461-71.

23.Yuan W, Guo J, Li X, et al. Hydrogen peroxide induces the activation of the phospholipase C-g1 survival pathway in PC12 cells: protective role in apoptosis. Acta Biochim Biophys Sin 2009;41(8): 625-30.

24.Fujita K, Lazarovici P, Gurol'f G. Regulation of the differentiation of PC12 pheochromocytoma cells. Environ Health Perspect 1989;80: 127-42,

25.Batistatou A, Greene LA. Internucleosomal DNA cleavage and neuronal cell survival/death. J Cell Biol 1993;722(3):523-32.

26.Pittman RN, Wang S, Dibenedetto AJ, Mills JC. A system for charac terizing cellular and molecular events in programmed neuronal cell death. J Neurosci 1993;13(9):3669-80.

27.Krause D, Lyons A, Fennelly C, O'Connor R. Transient activation of Jun N-terminal kinases and protection from apoptosis by the insulin-like growth factor I receptor can be suppressed by dicumarol. J Biol Chem 2001;276(22): 19244-52.

28.Levresse V, Butterfield L, Zentrich E, Heasley LE. Akt negatively regulates the cJun N-terminal kinase pathway in PC12 cells. J Neurosci Res 2000; 62(6):799-808.

29.Trapaidze N, Gomes I, Cvejic S, Bansinath M, Devi LA. Opioid receptor endocytosis and activation of MAP kinase pathway. Brain Res Mol Brain Res 2000;76(2):220-8.

30.Brock C, Schaefer M, Reusch HP, et al. Roles of G beta gamma in membrane recruitment and activation of p110 gamma/p101 phosphoinositide 3-kinase gamma. J Cell Biol 2003;160(1):89-99.

31.Maier U, Babich A, Nurnberg B. Roles of non-catalytic subunits in gbetagamma-induced activation of class I phosphoinositide 3-kinase isoforms beta and gamma. J Biol Chem 1999;274(41):29311-7.

32.Madrid LV, Wang CY, Guttridge DC, Schottelius AJ, Baldwin ASJr, Mayo MW. Akt suppresses apoptosis by stimulating the transactivation potential of the RelA/p65 subunit of NF-kappaB. Mol Cell Biol 2000;20(5):1626-38.

33.Polakiewicz RD, Schieferl SM, Gingras AC, Sonenberg N, Comb MJ. Mu-opioid receptor activates signaling pathways implicated in cell survival and translational control. J Biol Chem 1998;273(36):23534-41.

34.Belcheva MM, Haas PD, Tan Y, Heaton VM, Coscia CJ. The fibroblast growth factor receptor is at the site of convergence between mu-opioid receptor and growth factor signaling pathways in rat C6 glioma cells. J Pharmacol Exp Ther 2002;303(3):909-18.

35.Tegeder I, Geisslinger G. Opioids as modulators of cell death and survival-unraveling mechanisms and revealing new indications. Pharmacol Rev 2004;56(3):351-69.

36.Persson AI, Thorlin T, Bull C, Eriksson PS. Opioid-induced proliferation through the MAPK pathway in cultures of adult hippocampal progenitors. Mol Cell Neurosci 2003;23(3):360-72.

37.Moon TD. The effect of opiates upon prostatic carcinoma cell growth. Biochem Biophys Res Commun 1988;153(2):722-7.

38.Ni X, Lin BC, Song CY, Wang CH. Dynorphin A enhances mitogen-induced proliferative response and interleukin-2 production of rat splenocytes. Neuropeptides 1999;33:137-43.

39.Law PY, Bergsbaken C. Properties of delta opioid receptor in neuroblastoma NS20Y: receptor activation and neuroblastoma proliferation. J Pharmacol Exp Ther 1995;272(1):322-32.

[DOR: 20.1001.1.15614107.1392.15.6.6.9]
[DOI: 10.18869/acadpub.jbums.15.6.44]