

مقاله پژوهشی

مجله دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان

دوره ششم، شماره چهارم، زمستان ۱۳۸۶، ۲۶۴-۲۵۵

بررسی اثر سرب بر رشد سلول‌های آستروسیت جنین انسان و بیان ژن *bax* در محیط کشت

سعید رجبعیان^۱، فاطمه شاهی صدرآبادی^۲، دکتر شهریار دبیری^۳، عباس نژادراوری^۴، پروین صالحی نژاد^۵
رفعت حسینی^۶

دریافت مقاله: ۸۵/۹/۱۵ ارسال مقاله به نویسنده جهت اصلاح: ۸۶/۸/۲۱ پذیرش مقاله: ۸۶/۱۰/۲۰

چکیده

زمینه و هدف: سرب مسموم کننده محیط زیست انسان محسوب می‌شود و قادر است تغییرات گسترده‌ای را در ساختار و عملکرد مغز به خصوص در کودکان ایجاد کند. در مطالعه حاضر سمیت سرب بر سلول‌های آستروسیت جنین انسان بررسی شده است.

مواد و روش‌ها: در اولین مرحله این مطالعه آزمایشگاهی، اثرات مجاورت کوتاه مدت و بلند مدت با سرب، در مهار رشد با روش سنجش (MTT) (4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) بررسی شد. علاوه بر این، اثر سرم جنین گاوی (FCS) بر سمیت سلولی سرب نیز با روش فوق مورد بررسی قرار گرفت. در دومین مرحله، اثر سرب بر بیان ژن *bax* با روش ایمونوستیتوشیمی، ICC (immunocytochemistry) بررسی گردید.

یافته‌ها: سمیت سرب در غلظت‌های بالاتر از یک میلی‌مول مشاهده شد ($p=0.000$). مجاورت مکرر با رقت‌های ۲۵۰ و ۵۰۰ میکرومول کاهش قابل ملاحظه‌ای در رشد سلول ایجاد کرد ($p=0.01$). نتایج، اثرات محافظتی FCS را در برابر سمیت سرب نشان دادند. مجاورت با سرب بیان ژن *bax* را تحريك کرد.

نتیجه‌گیری: نتایج امکان اختلال عملکرد سلول‌های آستروسیت جنین به وسیله سرب و بنابراین تداخل در تکامل سیستم عصبی را مطرح می‌کنند.

واژه‌های کلیدی: استات سرب، سمیت سلولی، آستروسیت، Bax، ایمونوستیتوشیمی، سنجش MTT

مقدمه

کاربرد گسترده‌ای دارد. سرب به طور طبیعی در هیچ کدام از سیستم‌های بیولوژیکی بدن وجود ندارد ولی از طریق تنفس و تغذیه و به میزان کمی از طریق پوست جذب شده و از مسیر

سرب آلوده کننده دائمی محیط زیست است و در صنایع باطری‌سازی، رنگ‌سازی، چاپ، سوخت خودرو و مواد آرایشی

۱- (نویسنده مسؤول) پژوهشگر، مرکز تحقیقات علوم اعصاب کرمان، دانشگاه علوم پزشکی کرمان
تلفن: ۰۳۴۱-۲۱۲۰۵۴۶، فاکس: ۰۳۴۱-۲۱۱۱۰۱۰، پست الکترونیکی: srajabalian@yahoo.com

۲- کارشناس ارشد گروه آموزشی زیست‌شناسی تکوینی، دانشکده علوم، دانشگاه شهید باهنر کرمان
۳- استاد گروه آموزشی پاتولوژی، دانشگاه علوم پزشکی کرمان

۴- کارشناس ارشد گروه آموزشی زیست‌شناسی سلولی و مولکولی، دانشکده علوم، دانشگاه امام حسین تهران
۵- مریم و هیأت علمی، دانشکده مامایی و پرستاری، دانشگاه علوم پزشکی کرمان

۶- کارشناس گروه آموزشی زیست‌شناسی، مرکز تحقیقات علوم اعصاب، دانشگاه علوم پزشکی کرمان

الیگومر تبدیل شده و با ایجاد کانال در غشاء میتوکندری و ریزش واسطه‌هایی نظیر سیتوکروم C از میتوکندری به سیتوزول، پیام خودکشی را به اجزاء فرودست (downstream) منتقل می‌کند [۱۷-۱۸]. Niu و همکارانش اثر سرب را بر افزایش بیان ژن *bax* و کاهش بیان ژن *bcl-2* در سلول‌های مغزی موش صحرایی گزارش کردند [۱۹].

در صدی از بافت استخوان مادر در طول دوران حاملگی برای تأمین کلسیم جنین در حال رشد، تخریب می‌شود که این امر افزایش سطح سرب خون مادر را در پی دارد. با توجه به این که سرب به آسانی از جفت عبور می‌کند اثرات مخرب آن بر جنین در حال رشد مطرح می‌شود [۲۰-۲۱]. با توجه به این که آستروسیت‌ها از مراکز عمدۀ تجمع سرب به شمار می‌آیند [۱۳، ۲۲]، اثر این فلز بر سلول‌های آستروسیت جنین در حال رشد اهمیت می‌یابد. بنابراین در مطالعه حاضر ابتدا سمتیت یک و سه بار مجاورت با سرب در کشت سلول‌های آستروسیت جنین انسان با روش سنجش MTT و اثر رقت‌های مختلف سرم جنین گاوی بر سمتیت سرب بررسی شده است. در ادامه اثر سرب بر بیان ژن *bax* در کشت سلول‌های آستروسیت با روش ایمونوستیوژنی بررسی شد.

مواد و روش‌ها

مواد و کشت سلول آستروسیت: در این مطالعه آزمایشگاهی کیت ایمونو پراکسیداز، آنتی‌بادی مونوکلونال (کلون A3533) از کمپانی Dako و محیط کشت (Bax) DMEM/F12، استات سرب، تریپسین، MTT از کمپانی Sigma آمریکا خریداری شد. فلاسک کشت سلول، پلیت‌های Sigma ۹۶ حفره‌ای، پلیت‌های ۳۵ میلی‌متری و لوله‌های سانتریفیوژ از کمپانی NUNC و Falcon دانمارک و سرم جنین گاوی (FCS) از کمپانی Serumed آلمان تهیه گردید. جنین با همکاری بخش زنان و زایمان بیمارستان افضلی پور کرمان و با رضایت والدین تهیه شد. علت سقط جنین نارسایی قلبی مادر بود.

کشت سلول‌های آستروسیت مغز جنین انسان: جنین در PBS استریل سریعاً به آزمایشگاه منتقل و سلول‌های آستروسیت از مغز جنین ۱۴ هفت‌مای انسان به وسیله روش زیر

جريان خون به بافت‌های مختلف بدن منتقل می‌شود [۱]. سمتیت سرب با مکانیسم‌های مختلف اعمال می‌شود. این فلز سنگین به دلیل شباهت بالا به کاتیون‌های کلسیم و روی، به جایگاه اتصال آن‌ها در پروتئین‌های مربوطه متصل شده و فعالیت طبیعی پروتئین را مختل می‌سازد [۲-۳]. سرب به صورت مستقیم و یا با ایجاد رادیکال‌های آزاد به DNA آسیب می‌رساند [۴-۵]. همچنین این فلز با پراکسیداسیون لیپیدهای غشاء، به سلول و بافت آسیب وارد می‌کند. [۶].

شواهد متعدد سمتیت شدید سرب را بررسی‌تم عصبی افراد خردسال نسبت به افراد بالغ نشان می‌دهند. سرب از طریق افزایش نفوذپذیری سد خونی- مغزی وارد مغز شده و عملکرد نورون‌ها را مختل می‌سازد [۷-۸]. تعدادی از مقالات فعالیت تکثیری سرب را در مدل‌های مختلف کشت سلول نشان داده [۹-۱۰]، و این قابلیت را به افزایش فعالیت برخی از انواع پروتئین کیناز C (PKC) مربوط دانسته‌اند [۱۱-۱۲]. همچنین مطالعات انجام شده با استفاده از میکروسکوپ الکترونی، اثرات مخرب سرب را بر آستروسیت‌های موش صحرایی نشان داده است [۱۳-۱۴]. آستروسیت‌ها فیزیولوژی طبیعی مغز را در طی تکامل موجود زنده و بعد از آن حفظ می‌کنند [۱۵]. بنابراین هرگونه تغییر در فعالیت سلول‌های فوق، عملکرد طبیعی سیستم عصبی را مختل می‌کند. اثرات سرب بر رشد و تکثیر سلول‌های آستروسیت جنینی انسان تاکنون گزارش نشده است.

بخشی از اثرات مخرب ترکیبات شیمیایی از جمله فلزات سنگین از طریق افزایش یا کاهش عملکرد پروتئین‌های درگیر در خودکشی سلولی اعمال می‌شود [۱۶]. پروتئین‌های خانواده Bcl-2 با توجه به عملکرد از دو گروه مهار کننده آپوپتوز نظیر Bak و Bcl-XL و فعال کننده آپوپتوز، نظیر Bax و Bax-2 تشکیل شده‌اند. خودکشی سلولی و یا ادامه بقاء سلول، به نسبت بین فعالیت عوامل مهار کننده و فعال کننده آپوپتوز بستگی دارد. پروتئین Bax مستقر در سیتوزول، نقش کلیدی در راهاندازی مسیر میتوکندریایی خودکشی سلولی ایفاء می‌کند. پروتئین در حالت طبیعی مونومر است و با ایجاد استرس به خصوص در حضور مواد شیمیایی به شکل فعال

موج ۴۹۲ نانومتر و رفرازنس ۶۳۰ نانومتر ثبت گردید. تمامی مراحل آزمون سه مرتبه تکرار شد.

بررسی مجاورت مکرر با سرب بر رشد سلول: تأثیر مجاورت مکرر با سرب بر رشد و تکثیر سلول با روش بالا سنجش شد. بدین ترتیب که سوسپانسیون سلولی معادل DMEM/F12 ۵۰۰۰ سلول در میلی لیتر در محیط کشت ۱۰٪ FCS، ۱۰۰ میکروگرم در میلی لیتر حاوی ۱۰٪ FCS، ۱۰۰ میکروگرم در میلی لیتر استرپتومایسین و ۱۰۰ واحد در میلی لیتر پنی سیلین تهیه شد. یک دهم میلی لیتر از سوسپانسیون به چاهک های پلیت ۹۶ حفره ای وارد شد و پلیت ۲۴ ساعت در شرایط استاندارد انکوبه شد. غلظت های ۱۰۰، ۱۰۰، ۲۵۰ و ۵۰۰ میکرومول استات سرب در محیط کشت DMEM/F12 حاوی ۱۰٪ FCS، ۱۰۰ میکروگرم در میلی لیتر استرپتومایسین و ۱۰۰ واحد در میلی لیتر پنی سیلین تهیه شد. به مجرد پایان انکوباسیون محیط کشت چاهک ها به آرامی تخلیه شده و یک دهم میلی لیتر از هر غلظت استات سرب سریعاً به شش چاهک پلیت وارد شد. کشت سلول در محیط کشت بدون سرب حاوی ۱۰٪ FCS به عنوان کنترل رشد و تکثیر سلول در نظر گرفته شد. پلیت به مدت ۴۸ ساعت دیگر انکوبه شد. مجاورت با رقت های سرب با تخلیه محیط کشت کهنه و افزودن محیط کشت جدید در دو فاصله زمانی ۴۸ ساعته تکرار شد. هفت روز پس از آغاز کشت و تحمل سه پالس رشد و تکثیر سلول با روش بالا ارزیابی گردید. تمامی مراحل آزمون سه بار تکرار شد.

پردازش داده ها و آنالیز آماری: داده های سنجش های سمتی سلولی با محاسبه درصد رشد سلول نسبت به کنترل، پردازش و به صورت میانگین \pm انحراف معیار در نمودارها ارایه شده است. درصد رشد سلول نسبت به کنترل از رابطه زیر محاسبه شد:

$$\frac{\text{شدت جذب در مجاورت با سرب}}{\text{درصد رشد سلول}} = \frac{\text{شدت جذب محیط کشت بدون سرب}}{100 \times}$$

آنالیز آماری داده های سنجش سمتی سلولی به وسیله آنالیز واریانس یک طرفه (One Way ANOVA) از طریق آزمون Dunnett انجام شد. بدین ترتیب که میانگین های شدت

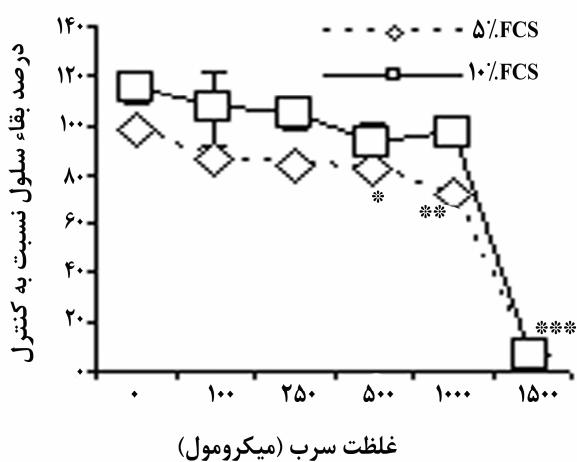
تهیه شد: استخوان جمجمه پس از شستشو با الكل ۷۵٪ برش داده شد. قطعه مناسبی از لب قدامی مغز در لوله های سانتریفیوژ ۵ میلی لیتری حاوی ۲۰ میلی لیتر محلول تریپسین ۰.۰۰۴٪ EDTA به مدت ۲۰ دقیقه انکوبه شد. پس از هضم بافت و شستشو، سلول ها در محیط DMEM/F12 حاوی ۱۰٪ FCS، ۱۰۰ میکروگرم در میلی لیتر استرپتومایسین، ۱۰۰ واحد در میلی لیتر پنی سیلین و ۵٪ سرم اسپ، در فلاسک های ۷۵ و ۲۵ سانتی متری در اتمسفر مرتبط در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد دارای ۵٪ دی اکسید کربن انکوبه شدند. بعد از اینکه سلول ها بیش از ۸۰٪ سطح فلاسک را پوشانند، کشت ها به فلاسک های جدید واکشت شدند. سلول ها پس از واکشت دوم در محیط کشت حاوی ۱۰٪ DMSO در ویال های متعدد در ازت مایع ذخیره شدند [۲۳].

بررسی اثر یک نوبت مجاورت با سرب بر رشد سلول: در این مطالعه تجربی، سمتی سلولی سرب در کشت سلول های آستروروسیت با روش سنجش MTT بررسی شده است [۲۴]. به این ترتیب که ابتدا سوسپانسیون های سلولی معادل صد هزار سلول در میلی لیتر در محیط کشت حاوی ۵٪ FCS تهیه شد. یک دهم میلی لیتر از سوسپانسیون ها به چاهک های پلیت های ۹۶ حفره ای افزوده شد و پلیت ها به مدت یک شب انکوبه شدند. درون چاهک های حاشیه پلیت ها آب مقطر استریل ریخته شد. به مجرد پایان انکوباسیون، رقت های ۳۰ میکرومول تا ۴/۵ میکرومول استات سرب در محیط کشت ۵۰٪ DMEM/F12 حاوی ۵٪ FCS تهیه شد. سپس ۵۰ میکرولیتر از هر رقت به شش چاهک مربوطه وارد شد. کشت سلول در محیط کشت بدون سرب حاوی ۵٪ FCS به عنوان کنترل رشد و تکثیر سلول در نظر گرفته شد. پلیت به مدت ۷۲ ساعت در شرایط استاندارد انکوبه شد. پس از پایان انکوباسیون ۳۰ میکرولیتر محلول MTT (۲/۵ میلی گرم در میلی لیتر PBS) به تمامی چاهک ها افزوده شده و پلیت به مدت دو ساعت دیگر انکوبه گردید. در پایان پس از تخلیه آرام محیط کشت، کریستال های رنگ فورمازان راسب شده در سیتوپلاسم سلول ها با افزودن ۱۰۰ میکرولیتر DMSO به هر چاهک حل شدند. شدت رنگ با دستگاه ثبت الیزا در طول

جای انکوباسیون با Ab اختصاصی اولیه با PBS انکوبه شد. در پایان رنگ‌آمیزی ویژه ایمونوستیتوشیمی با روش Avidin- Biotin complex immuno peroxidase طبق دستورالعمل کارخانه سازنده کیت انجام شد. تمامی مراحل آزمون سه بار تکرار شد و در هر مرتبه نتایج به صورت تصاویر میکروسکوپی جمع‌آوری گردید.

نتایج

سمیت سرب در کشت سلول‌های آستروسیت با روش سنجش MTT بررسی شد. توقف کامل رشد سلول در رقت ۱/۵ میلی‌مول سرب مشاهده شد ($p=0.000$). نتایج، افزایش جزئی رشد سلول را در غلظت‌های کمتر از ۵۰۰ میکرومول سرب در محیط کشت حاوی ۱۰٪ FCS نشان داد ($p>0.05$). سمیت با کاهش FCS افزایش یافت، به ترتیبی که در رقت‌های ۰/۵ و ۱ میلی‌مول کاهش رشد معادل ۱۵٪ ($p<0.05$) و ۲۸٪ ($p<0.01$) مشاهده شد (نمودار ۱).

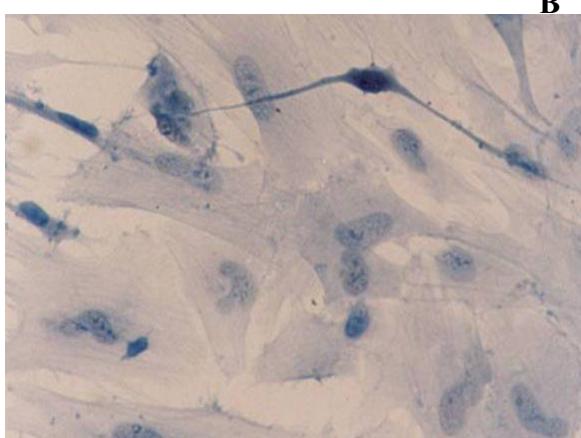


نمودار ۱- اثر یک نوبت مجاورت با غلظت‌های مختلف سرب در حضور دو غلظت ۵٪ و ۱۰٪ سرم جنینی گوساله بر رشد آستروسیت‌ها کشت‌های سلولی به مدت ۳ روز در حضور پنچ و ده درصد سرم جنین گاو با رقت‌های مختلف سرب مجاور شدند. در پایان، رشد و تکثیر سلول با روش MTT-assay تعیین شد. محور عمودی درصد بقاء سلول را در کشت‌های مجاور شده با سرب نسبت به کشت کنترل بدون سرب نشان می‌دهد. میزان رشد سلول در محیط کشت کنترل ۱۰۰٪ در نظر گرفته شده است. نتایج به صورت $mean \pm SEM$ ارایه شده است.

*: $p < 0.05$ مقایسه شده با محیط کشت کنترل حاوی ۵٪ سرم جنینی گوساله، **: $p < 0.01$ مقایسه شده با محیط کشت کنترل حاوی ۵٪ سرم جنینی گوساله، ***: $p < 0.001$ مقایسه شده با محیط کشت کنترل حاوی ۱۰٪ سرم جنینی گوساله.

جذب هر غلظت سرب مربوط به هر یک از سه تکرار (سه میانگین که هرکدام از میانگین شش کشت در هر تکرار به دست آمده است) با میانگین‌های شدت جذب مربوط به محیط کشت کنترل (سه میانگین که هرکدام از میانگین شش کشت در هر تکرار به دست آمده است) مقایسه آماری شدند. آنالیز آماری به وسیله نرم افزار SPSS 9.0 انجام شد.

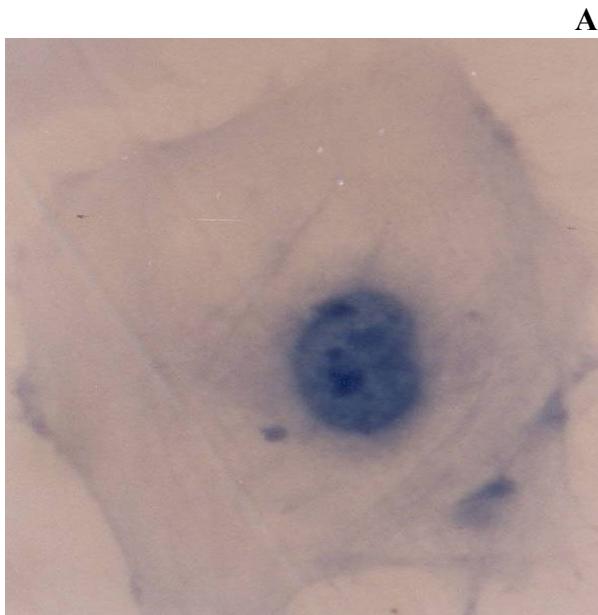
بررسی ایمونوستیتوشیمی: تأثیر سرب بر الگوی بیان ژن Bax در کشت سلول‌های آستروسیت با روش ایمونوستیتوشیمی بررسی گردید. همچنین درصد حضور سلول‌های آستروسیت در کشت‌های سلولی با روش زیر تعیین گردید. ابتدا سوسپانسیون سلولی معادل ۱۰۰۰۰۰ سلول در میلی‌لیتر در محیط کشت DMEM/F12 حاوی ۱۰٪ FCS، ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر استرپتومایسین و ۱۰۰ واحد در میلی‌لیتر پنی‌سیلین تهیه شد. ۰/۱ میلی‌لیتر از سوسپانسیون سلولی به مرکز پلیت‌های ۳۵ میلی‌متری ریخته شد (مرکز پلیت‌ها با دایره به قطر یک سانتی‌متر در پشت آن‌ها مشخص شد). پلیت‌ها در پتری‌های ۶۰ میلی‌متری استریل حاوی آب مقطر به مدت ۲۴ ساعت در شرایط استاندارد انکوبه شدند. به مجرد پایان انکوباسیون، محیط کشت پلیت‌ها تخلیه شده و ۱/۵ میلی‌لیتر محیط کشت DMEM/F12 کامل حاوی ۱۰٪ ۰/۱ میکرومول سرب به هر پلیت افزوده شد. محیط کشت تعدادی از پلیت‌ها با محیط کشت DMEM/F12 حاوی ۱۰٪ FCS، ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر استرپتومایسین و ۱۰۰ واحد در میلی‌لیتر پنی‌سیلین تعویض شد. پلیت‌ها به مدت ۷۲ ساعت در شرایط استاندارد انکوبه شدند. سپس لایه سلولی پس از شستشو با PBS با متابول سرد حاوی ۳٪ استون به مدت ۱۰ دقیقه فیکس شد. در ادامه جهت افزایش نفوذپذیری غشاها سلولی، اسمیرهای سلولی با تریتون ۰/۰۲٪ به مدت ۱۰ دقیقه پوشانده شدند. در هر مرحله شستشو با PBS انجام شد. سپس اسمیر سلولی با آلبومین سرم گاوی (BSA) ۲٪ به مدت ۱۰ دقیقه پوشانده شد. پس از خارج کردن BSA، اسمیرهای سلولی با آنتی بادی‌های مونوکلونال (۱:۵۰۰) GFAP و پلی‌کلونال (۱:۵۰) به مدت یک شب در چهار درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. به عنوان کنترل منفی، لایه سلولی به



شکل ۱- درصد آستروسیت‌ها در کشت اولیه

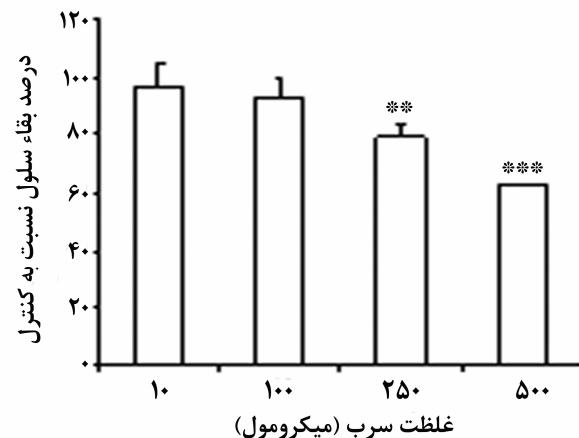
حضور پروتئین *GFAP* در کشت‌های سلولی با روش ایمونوستیوژنیمی بررسی شد. (A) رنگ قهوه‌ای تشکیل شده در سیتوپلاسم سلول‌های مجاور شده با آنتی‌بادی *GFAP* حضور پروتئین را در سیتوپلاسم سلول نشان می‌دهد، در حالی که هسته سلول بیضی شکل و به رنگ آبی مشاهده می‌شود. (B) سلول‌ها در کشت کنترل منفی با سیتوپلاسم بدون رنگ و هسته آبی رنگ مشاهده می‌شوند. از هماتوکسیلین برای رنگ آمیزی زمینه استفاده شده است. درشت نمایی ۱۰۰ برابر.

در هیچ یک از آزمون‌های ICC در کشت‌های کنترل منفی که به جای آنتی‌بادی اختصاصی با PBS انکوبه شده بودند، رنگ اختصاصی مشاهده نشد (1B). همچنین مطالعه مورفولوژیک حضور گرانول‌های سیتوپلاسمی را در رقت‌های بالاتر از ۲۵۰ میکرومول در سیتوپلاسم سلول‌های آستروسیت نشان داد (شکل ۲).



B

در ادامه تأثیر پالس رقت‌های کمتر از یک میلی‌مول سرب بر رشد و تکثیر سلول بررسی شد. رشد سلول به دنبال مجاورت مکرر با غلظت‌های ۲۵۰ و ۵۰۰ میکرومول سرب به ترتیب ۰/۲۱٪ (p<۰/۰۰۱) و ۰/۳۷٪ (p<۰/۰۰۱) کاهش یافت (نمودار ۲).

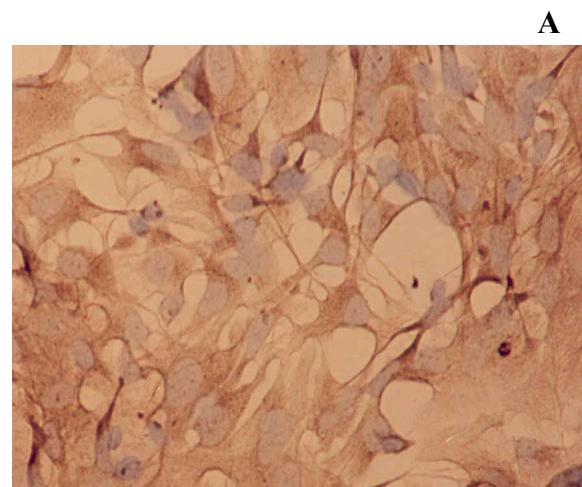


نمودار ۲- اثر مجاورت مکرر با رقت‌های مختلف سرب بر رشد آستروسیت‌ها

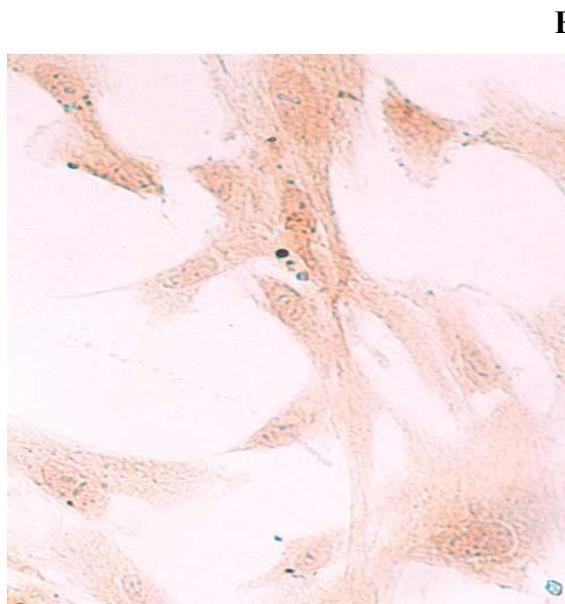
کشت‌های سلول در فواصل زمانی ۴۱ ساعته سه مرتبه با رقت‌های ۱۰، ۱۰۰، ۲۵۰ و ۵۰۰ میکرومول سرب مجاور شدند. سپس رشد سلول با روش *MTT-assay* تعیین شد. محور عمودی درصد بقاء سلول را در کشت‌های مجاور شده با سرب نسبت به کشت کنترل بدون سرب نشان می‌دهد. میزان رشد سلول در محیط کشت کنترل ۱۰۰٪ در نظر گرفته شده است. نتایج به صورت *mean±SEM* ارایه شده است.

***: $p<0/001$ مقایسه شده با محیط کشت کنترل بدون سرب
 ****: $p<0/0001$ مقایسه شده با محیط کشت کنترل بدون سرب

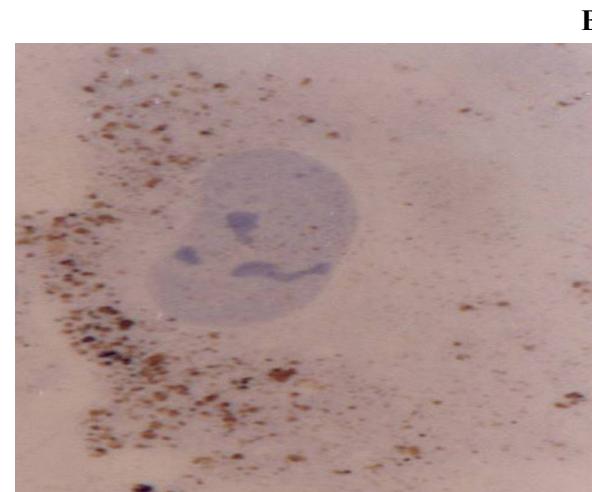
ماهیت کشت‌های سلولی و مطالعه مورفولوژیک: مطالعه ایمونوستیوژنیمی، حضور پروتئین *GFAP* را در سیتوپلاسم بیش از ۹۰٪ از سلول‌ها در پاساژ دوم نشان داد (شکل A).



A



شکل ۳- اثر سرب بر بیان پروتئین *BAX* در آستروسیت‌ها کشته‌های سلولی به مدت سه روز با رقت‌های ۰/۰۱، ۰/۰۱ و ۱ میکرومول سرب مجاور شدند. سپس تصاویر میکروسکوپی تهیه شد. (A) گرانول‌های قهقهه‌ای رنگ در سیتوپلاسم سلول‌های مجاور شده با سرب مشاهده می‌شوند، در حالی که هسته بیضی شکل به رنگ آبی در مرکز دیده می‌شود. نوک پیکان یک گرانول سیتوپلاسمی را نشان می‌دهد. (B) سلول‌های کشت کنترل با هسته بیضی شکل و سیتوپلاسم شفاف مشاهده می‌شوند. درشت نهایی ۱۰۰ برابر.



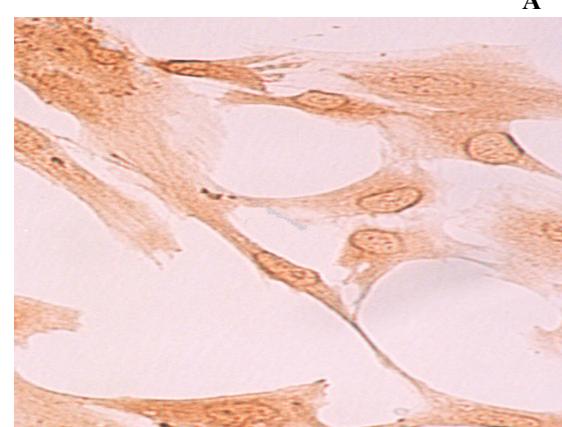
شکل ۲- اثر سرب بر ایجاد گرانول‌های سیتوپلاسمی در آستروسیت‌ها کشته‌های سلولی به مدت سه روز با رقت ۵۰۰ میکرومول سرب مجاور شدند. سپس تصاویر میکروسکوپی تهیه شد. (A) گرانول‌های قهقهه‌ای رنگ در سیتوپلاسم سلول‌های مجاور شده با سرب مشاهده می‌شوند، در حالی که هسته بیضی شکل به رنگ آبی در مرکز دیده می‌شود. نوک پیکان یک گرانول سیتوپلاسمی را نشان می‌دهد. (B) سلول‌های کشت کنترل با هسته بیضی شکل و سیتوپلاسم شفاف مشاهده می‌شوند.

اثر سرب بر بیان *Zn*: سلول‌های آستروسیت با غلظت‌های ۰/۰۱ تا ۱ میکرومول سرب به مدت سه روز مجاور شدند، سپس حضور پروتئین *Bax* با روش ICC بررسی شد. نتایج حضور ضعیف پروتئین را در هسته و سیتوپلاسم تمامی سلول‌های کشت کنترل بدون سرب، نشان داد. مجاورت آستروسیت‌ها با یک دهم میکرومول سرب، افزایش پروتئین *Bax* را در ۸۵ تا ۹۵٪ از سلول‌های آستروسیت نسبت به کنترل به دنبال داشت. حضور افزایش یافته *Bax* نه تنها در سیتوپلاسم و هسته سلول‌های مجاور شده با سرب مشخص بود، بلکه در غشاء هسته نیز حضور پروتئین قابل توجه بود

(شکل ۳).

بحث

نتایج، نشان‌دهنده مقاومت سلول‌های آستروسیت جنین انسان به غلظت‌های بالای سرب بود. همچنین مطالعات مورفولوژیک حضور گرانول‌های سیتوپلاسمی را در آستروسیت‌های مجاور شده با سرب نشان داد. هماهنگ با این نتایج Tiffany و همکارانش غلظت سرب در سلول‌های آستروسیت را ۵۵ برابر محیط خارج سلولی گزارش کردند. [۲۲]. همچنین محققین دیگر نشان دادند که آستروسیت‌ها، به عنوان محل تجمع سرب در مغز عمل کرده و بدین ترتیب نورون‌ها را محافظت می‌کنند [۱۳]. توانایی آستروسیت‌ها در



وقایع اولیه خودکشی سلوی ناشی از سرب معرفی کرده‌اند [۳۲]. در مطالعه آن‌ها، افزایش بیان پروتئین ضد خودکشی سلوی BCL-XL، به صورت کامل خودکشی را مهار کرده است. در مطالعه حاضر احتمالاً سرب با جلوگیری از فعال شدن یا غیر فعال کردن بعضی از اجزاء مسیر خودکشی سلوی، علی‌رغم افزایش پروتئین Bax، مانع از انتقال سیگنال *bcl-x* و یا *z*ن‌هایی با فعالیت ضد مرگ برنامه‌ریزی شده سلوی به صورت ذاتی یا تحت تأثیر سرب، در آستروسیت‌های جنینی وجود دارد. جهت تأیید احتمالات فوق مطالعات بیشتر ضروری است.

غلظت سرب در خون تام گروه‌های سنی ۴۹ تا ۹۲ سال ۵ تا ۱۵۰ میکروگرم در لیتر گزارش شده است [۳۳]. غلظت این فلز در پلاسما و خون تام گروه‌های سنی ۵ تا ۱۴ سال به ترتیب ۰/۱۴ تا ۰/۳۸ و ۰/۳۹ تا ۱۲۰ میکروگرم در لیتر گزارش شده است در حالی که مقدار این فلز در پلاسما و خون تام گروه‌های سنی ۴ تا ۱۵ سال که در معرض سرب بوده‌اند به ترتیب به ۰/۰۴۶ تا ۱۸/۴ و ۹۹ تا ۹۲۰ میکروگرم در لیتر افزایش یافته است [۳۴]. داده‌های فوق به انضمام نتایج مطالعه حاضر که افزایش قابل توجه پروتئین استرس Bax را در حضور غلظت ۰/۱ میکرومول سرب نشان داده است، احتمال اختلال در فعالیت طبیعی مغز را مطرح می‌کند.

نتیجه‌گیری

علی‌رغم این که آستروسیت‌ها با توانایی جمع‌آوری و ذخیره‌سازی سرب سلوول‌های دیگر را محافظت می‌کنند، مرگ فیزیولوژیکی و پاتولوژیکی این سلوول‌ها احتمال رهایش مقادیر قابل توجه سرب و آسیب‌های سلوی را به دنبال خواهد داشت. همچنین حضور افزایش یافته پروتئین Bax، شدت استرس ایجاد شده تحت تأثیر سرب و اختلال در عملکرد فیزیولوژیکی آستروسیت‌ها را منعکس می‌کند. نتایج این مطالعه احتمال فعالیت نوروتوكسیک سرب را از طریق تداخل در عملکرد طبیعی آستروسیت‌ها مطرح می‌کند.

تجمع سرب در وزیکول‌های سیتوپلاسمی و محافظت از پروتئین‌ها و اندامک‌های مهم سلوی می‌تواند یکی از دلایل مقاومت به این فلز باشد.

نتایج مطالعه، افزایش نسبی رشد سلوول را در حضور مقادیر کمتر از ۲۵۰ میکرومول سرب نشان داد. هماهنگ با این یافته، محققین فعالیت تکثیری سرب را در مدل‌های مختلف کشت‌های سلوی نشان داده‌اند (۹-۱۰)، و این قابلیت را از طریق افزایش فعالیت برخی از انواع پروتئین کیناز C (PKC) دانسته‌اند [۱۱]. همچنین نتایج مطالعه حاضر با مطالعاتی که افزایش سمتیت سرب را به دنبال کاهش FCS گزارش کرده‌اند، هماهنگ است [۲۵-۲۶]. این یافته‌ها تمايل زیاد فلز را برای اتصال به پروتئین‌های سرم نشان می‌دهند و بخش آزاد سرب را مسئول فعالیت‌های فیزیولوژی آن معرفی می‌کنند. نتایج این مطالعه با شواهدی که سمتیت بیشتر سرب را در افراد خردسال نسبت به افراد بزرگسال مطرح می‌کند، هم‌خوانی دارد [۷-۸]. با توجه به این که مقدار پروتئین‌های سرم در افراد خردسال نسبت به بالغین کمتر است [۲۷-۲۸]، انتظار می‌رود میزان سرب آزاد در خون این گروه سنی بیشتر باشد. احتمالاً این پدیده در نهایت به تجمع بیشتر فلز در بافت‌های مختلف و افزایش سمتیت آن می‌انجامد.

در مطالعه حاضر علی‌رغم استرس ناشی از سرب و بیان افزایش یافته Bax، مرگ برنامه‌ریزی شده سلوول دیده نشد. یک گروه از محققین خودکشی سلوی را به دنبال تجمع پروتئین Bax در غشاء هسته سلوول‌های مجاور شده با داروهای ضد توموری گزارش کرده‌اند [۲۹].

همچنین محققین دیگر افزایش پروتئین Bax را بخشی از مکانیسم خودکشی سلوول‌های ماکروفاژ مجاور شده با یون‌های کبریت و کروم دانسته‌اند [۳۰]. Hi و همکارانش، خودکشی سلوول‌های گیرنده نور (Rod Photoreceptor cells) ناشی از سرب را به دلیل دپلاریزاسیون میتوکندری، ریش سیتوکروم C به سیتوزول و فعال شدن اجزاء پایین دست مسیر گزارش کرده‌اند [۳۱]. همین گروه در گزارشی دیگر، انتقال پروتئین Bax از سیتوزول به غشاء میتوکندری و دپلاریزاسیون را از

پژوهشی تشکر می‌شود. هم‌چنین از همکاری خانم‌ها پروین صالحی و طاهره معتمدی قدردانی می‌شود.

تشکر و قدردانی

نتایج حاصل از این مطالعه مربوط به طرح پژوهشی مصوب مرکز تحقیقات علوم اعصاب کرمان است. لذا به این وسیله از آن مرکز

References

- [1] Moore MR, Meredith PA, Watson WS, Summer DJ, Taylor MK, Goldberg A, et al. The percutaneous absorption of lead-203 in humans from cosmetic preparations containing lead acetate, as assessed by whole-body counting and other techniques. *Food Cosmet Toxicol*, 1980; 18(4): 399-405.
- [2] Wiemann M, Schirrmacher K, Busselberg D. Interference of lead with the calcium release activated calcium flux of osteoblast-like cells. *Calcif Tissue Int*, 1999; 65(6): 479-85.
- [3] Zavia NH, Crumpton T, Brydie M, Reddy GR, Razmiasfari M. Disruption of the zinc finger domain: a common target that underlies many of the effects of lead. *Neurotoxicology*, 2000; 21(6):1069-80.
- [4] Vaglenov A, Creus A, Laltchev S, Petkova V, Pavlova S, Marcos R. Occupational exposure to lead and induction of genetic damage. *Environ Health Perspect*, 2001; 109(3): 295-8.
- [5] Wozniak K, Blasiak, J. In vitro genotoxicity of lead acetate: induction of single and double DNA strand breaks and DNA-protein cross-links. *Mutat Res*, 2003; 535(2): 127-39.
- [6] Lawton LJ, Donaldson WE. Lead-induced tissue fatty acid alterations and lipid peroxidation. *Biol Trace Elem Res*, 1991; 28(2): 83-97.
- [7] Min JY, Min KB, Cho SI, Kim R, Sakong J, Paek D. Neurobehavioral function in children with low blood lead concentrations. *Neurotoxicology*. 2007; 28(2); 421-5.
- [8] Jaako-Movits K, Zharkovsky T, Romantchik O, Jurgenson M, Merisalu E, Heidmets LT, Zharkovsky A. Developmental lead exposure impairs contextual fear conditioning and reduces adult hippocampal neurogenesis in the rat brain. *Int J Dev Neurosci*, 2005; 23(7): 627-35.
- [9] Choie DD, Richter GW. Cell proliferation in mouse kidney induced by lead. I. Synthesis of deoxyribonucleic acid. *Lab Inves*, 1974; 30(5): 647-51.
- [10] Apostoli P, Huard C, Chaumontet C, Martel P, Alessio L, Mazzoleni G. Effects of four inorganic lead compounds on the proliferation and junctional coupling of cultured REL liver cells. *Am J Ind Med*, 2000; 38(3): 340-8.
- [11] Lu H, Guizzetti M, Costa LG. Inorganic lead stimulates DNA synthesis in human astrocytoma cells: role of protein kinase Calpha. *J Neurochemistry*, 2001; 78(3): 590-9.
- [12] Sun X, Tian X, Tomsig JL, Suszkiw JB. Analysis of differential effects of Pb2+ on protein kinase C isozymes. *Toxicol Appl Pharmacol*, 1999; 156(1): 40-5.
- [13] Holtzman D, Olson JE, Devries C, Bensh K. Lead toxicity on primary cultured cerebral astrocyte and cerebellar granular neurons. *Toxicol Appl Pharmacol*, 1987; 89(2): 211-25.
- [14] Tang HW, Yan HL, Hu XH, Liang YX, Shen XY. Lead cytotoxicity in primary cultured rat astrocytes and Schwann cells. *J Appl Toxicol*, 1996; 16(3): 187-96.
- [15] Takuma K, Baba A, Matsuda T. Astrocyte apoptosis: implications for neuroprotection. *Prog Neurobiol*, 2004; 72(2): 111-27.
- [16] Robertson JD, Orrenius S. Molecular mechanisms of apoptosis induced by cytotoxic chemicals. *Crit Rev Toxicol*, 2000; 30(5): 609-27.

- [17] Dejean LM, Martinez-Caballero S, Manon S, Kinnally KW. Regulation of the mitochondria apoptosis –induced channel, MAC, by BCL-2 family proteins. *Biochim Biophys Acta*, 2006; 1762(2): 191-201.
- [18] Scorrano L, Korsmeyer SJ. Mechanisms of cytochrome c release by proapoptotic BCL-2 family members. *Biochem Biophys Res Commun*, 2003; 304(3): 437-444.
- [19] Niu Y, Zhang R, Cheng Y, Sun X, Tian J. Effect of lead acetate on the apoptosis and the expression of bcl-2 and bax genes in rat brain cells. *Zhonghua Yu Fang Yi Xue Za Zhi*, 2002; 36(1): 30-3.
- [20] Gulson BL, Mizon KJ, Korsch MJ, Palmer JM, Donnelly JB. Mobilization of lead from bone from human tissue during pregnancy and lactation--a summary long-term research. *Sci Total Environ*, 2003; 303(1-2): 79-104.
- [21] Rothenberg ST, Kondrashov V, Manalo M, Manton WI, Khan F, Todd AC, et al. Seasonal variation in bone lead contribution to blood lead during pregnancy. *Environ Res*, 2001; 85(3): 191-4.
- [22] Tiffany-Castiglion, E, Qian Y. Astroglia as metal depots: molecular, mechanisms for metal accumulation, storage and release, *Neurotoxicology*. 2001; 22(5): 577-92.
- [23] Mattson MP. Human fetal brain cell culture. *Methods Mol Med*, 2005; 107: 163-71.
- [24] Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*, 1983;65(1-2): 55-63.
- [25] Kern M, Audesirk T, Audesirk G, Effects of inorganic lead on the differentiation and growth of cortical neurons in culture. *Neurotoxicology*. 1993;14(2-3): 319-27.
- [26] Liu MY, Hsieh WC, Yang BC, In vitro aberrant gene expression as the indicator of lead-induced neurotoxicity in U-373MG cells. *Toxicology*. 2000; 147(1): 59-64.
- [27] Gomez P, Coca C, Vargas C, Acebillo J, Martinez A. Normal reference-intervals for 20 biochemical variables in healthy infants, children, and adolescents. *Clin Chem*, 1984; 30(3): 407-12.
- [28] Zlotkin SH, Casselman CW. Percentile estimates of reference values for total protein and albumin in sera of premature infants (less than 37 weeks of gestation). *Clin Chem*, 1987; 33(3): 411-3.
- [29] Ho YS, Lee HM, Chang CR, Lin JK. Induction of Bax protein and degradation of lamin A during p53-dependent apoptosis induced by chemotherapeutic agents in human cancer cell lines. *Biochem Pharmacol*, 1999; 57(2): 143-54.
- [30] Petit A, Mwale F, Zukor DJ, Catelas I, Antoniou J, Huk OL. Effect of cobalt and chromium ions on bcl-2, bax, caspase-3 and caspase-8 expression in U937 macrophages. *Biomaterials*, 2004; 25(11): 2013-8.
- [31] He L, Poblenz AT, Medrano CJ, Fox DA. Lead and calcium produce rod photoreceptor cell apoptosis by opening the mitochondria permeability transition pore. *J Biological Chemistry*, 2000; 275(16): 12175-84.
- [32] He L, Perkins GA, Poblenz AT, Harris JB, Hung M, Ellisman MH, et al. Bcl-xL overexpression blocks bax-mediated mitochondrial contact site formation and apoptosis in rod photoreceptors of lead-exposed mice. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003;100(3): 1022-7.
- [33] Baecklund M, Pederson NL, Bjorkman L, Vahter M. Variation in blood concentration of cadmium and lead in the elderly. *Environ Res*, 1999; 80(3): 222-30.
- [34] Bergdahl IA, Vahter M, Counter A, Schutz A, Buchanan LH, Ortega F, et al. Lead in plasma and whole blood from lead-exposed children. *Environ Res*, 1999; 80(1): 25-33.

Evaluation of Lead Acetate Exposure on the Growth and Expression of *Bax* in Cultured Human Embryonic Astrocytes

S. Rajabalian MSc¹, F. Shahi Sadrabadi MSc², Sh. Dabiri PhD³, A. Nejadvaravi MSc⁴, P. Salehinejad MSc⁵, R. Hosseini BSc⁶

Received: 06/12/06

Sent for Revision: 10/04/07

Received Revised Manuscript: 04/11/07

Accepted: 10/01/08

Background and Objective: Lead (pb) is an environmental toxicant which can induce structural and functional abnormalities in central nervous system, specially in young children.

Materials and Methods: In this experimental study, we evaluated the toxic effects of lead on human fetal astrocyte cells. At the first stage, the growth inhibition effects of short and long term exposure to lead were evaluated by 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay. Furthermore, the effect of Foetal Calf Serum (FCS) on lead toxicity was evaluated by above method. At the second stage, we applied immunocytochemistry (ICC) to analysis the effects of lead on the expression of stress related *bax* gene.

Results: The lead toxicity was observed at a concentration of $>1\text{mM}$ ($p=0.000$). Continuous lead exposure also (250 and 500 μM for 7 days) caused a significant growth inhibition ($p<0.01$) of astrocytes. The results showed the protective effect of FCS against lead toxicity. Lead exposure also induced *bax* gene expression.

Conclusion: These results show that lead may disturb the function of astrocytes and therefore and may interfere with development of fetal nervous system.

Key words: Lead Acetate, Cytotoxicity, Astrocyte, *Bax*, Immunocytochemistry, MTT Assay

Funding: This research was funded by Kerman Neuroscience Research Center.

Conflict of interest: None declared.

Ethical approval: The Ethics Committee of Kerman Medical University approved the study.

1- Reasercher, Neourosciences Reaserch Center, University of Medical Sciences, Kerman, Iran
 (Corresponding Author) Tel: (0341) 2120546-7, Fax: (0341) 2111010, E-mail: srajabalian@yahoo.com

2- MSc, Dept. of Biology, Faculty of Sciences, Bahonar University, Kerman, Iran

3- Prof. Dept. of Pathology, University of Medical Sciences, Kerman, Iran

4- MSc, Dept. of Biology, Faculty of Sciences, Imam-Hossein University, Tehran, Iran

5- Academic Member, Faculty of Nursing and Midwifery, University of Medical Sciences, Kerman, Iran

6- BSc, Dept. of Biology, Neourosciences Reaserch Center, University of Medical Sciences, Kerman, Iran