

## بررسی اثر سرب بر رشد سلول‌های استئوبلاست مهره ستون فقرات جنین انسان و بیان ژن *bax* در محیط کشت

دکتر فروغ السادات منصور<sup>۱</sup>، سعید رجبعلیان<sup>۲</sup>، فاطمه شاهی صدرآبادی<sup>۳</sup>، فاطمه پویا<sup>۴</sup>

دریافت مقاله: ۸۵/۳/۱۳ ارسال مقاله به نویسنده جهت اصلاح: ۸۵/۸/۱ دریافت اصلاحیه از نویسنده: ۸۶/۵/۱ پذیرش مقاله: ۸۶/۶/۲۷

### چکیده

**زمینه و هدف:** بافت استخوان مرکز عمده تجمع سرب محسوب شده و به عنوان یکی از اهداف اصلی سمیت این فلز سنگین مطرح است. در مطالعه حاضر ما اثر سرب را بر رشد سلول‌های کشت اولیه ستون مهره جنین انسان و بیان پروتئین Bax بررسی کردیم.

**مواد و روش‌ها:** نوع مطالعه حاضر آزمایشگاهی است. به این منظور ابتدا کشت اولیه از سلول‌های ستون مهره جنین انسان پس از هضم آنزیمی بافت تهیه شد و میزان حضور سلول‌های استئوبلاست در کشت با بررسی آنزیم آلکالین فسفاتاز تعیین گردید. سپس اثر مجاورت با رقت‌های ده میکرومول تا ۱/۵ میلی‌مول سرب بر تکثیر سلول در محیط کشت حاوی ۵ و ۱۰٪ سرم جنین گاوی (Fetal Bovine Serum, FBS) با روش سنجش MTT (Methyl Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide) بررسی شد. در ادامه، اثر ۰/۱ میکرومول سرب، بر بیان ژن *bax*، با روش ایمونوسیتوشیمی بررسی شد.

**یافته‌ها:** درصد سلول‌های استئوبلاست در کشت اولیه با بررسی آنزیم آلکالین فسفاتاز، ۸۰ تا ۸۵٪ تعیین شد. رقت‌های ۱۰۰ تا ۱۵۰۰ میکرومول سرب تکثیر سلول را در محیط کشت حاوی ۱۰٪، ۴۰ تا ۸۱٪ افزایش داد و بیشترین تحریک رشد در رقت یک میلی‌مول مشاهده شد ( $p < 0/001$ ). هم‌زمان با کاهش FBS، فعالیت‌های مهارتی و تکثیری سرب افزایش یافت، به ترتیبی که در رقت‌های بین ۱۰ تا ۱۰۰۰ میکرومول رشد سلول بین ۱۵ تا ۱۰۳٪ افزایش یافت، و در رقت ۱/۵ میلی‌مول، ۷۲٪ کاهش رشد مشاهده شد ( $p < 0/01$ ). بیشترین تحریک تکثیر سلول در رقت ۵۰۰ میکرومول اعمال شد ( $p < 0/001$ ).

**نتیجه‌گیری:** مجاورت سلول‌ها با یک دهم میکرومول سرب، افزایش پروتئین Bax را در سیتوپلاسم سلول نسبت به کشت کنترل به دنبال داشت. نتایج این مطالعه، احتمال اختلال در عملکرد فیزیولوژیک طبیعی بافت استخوان به وسیله سرب را مطرح می‌کند.

**واژه‌های کلیدی:** استات سرب، استئوبلاست، Bax، MTT assay

۱- (نویسنده مسئول) استادیار گروه آموزشی بافت‌شناسی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید باهنر کرمان

تلفن: ۰۳۴۱-۳۲۲۲۰۴۷، فاکس: ۰۳۴۱-۲۱۱۱۰۱۰، پست الکترونیکی: [fmansori\\_2000@yahoo.com](mailto:fmansori_2000@yahoo.com)

۲- فوق لیسانس گروه آموزشی ژنتیک، مرکز تحقیقات علوم اعصاب کرمان، دانشگاه علوم پزشکی کرمان

۳- دانشجوی فوق لیسانس گروه آموزشی زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه شهید باهنر کرمان

۴- مربی و عضو هیأت علمی گروه آموزشی آناتومی، دانشگاه علوم پزشکی کرمان

## مقدمه

سرب از عوامل آلوده کننده محیط زیست است. این فلز سنگین 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 جریان خون به بافت‌های مختلف بدن منتقل می‌شود [۱]. سمیت سلولی سرب با مکانیسم‌های مختلف اعمال می‌شود. این فلز سنگین به دلیل شباهت زیاد 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 [۴-۶].

بیشترین تجمع سرب در بافت استخوان با نیمه عمر نزدیک به ۲۰ سال گزارش شده است [۷]. Rosen و همکارانش مقدار سرب استخوان را در گروه‌های سنی ۲ تا ۶ سال، ۲۰۰-۷ میکروگرم در هر گرم گزارش کرده‌اند [۸]. سرب رشد و ترمیم بافت استخوان را در حیوان آزمایشگاهی کاهش داده [۹-۱۰] و در برخی مطالعات، رشد و تکثیر سلول‌های مختلف، از جمله سلول‌های استئوبلاست را در محیط‌های کشت مختل کرده است [۱۱-۱۳]. هم‌چنین سرب با اثر مستقیم بر استئوبلاست‌ها با مهار تولید استئوکلسین فرآیند استخوان‌سازی را مختل کرده است [۱۴]. کاهش کیفیت بافت استخوان به دنبال مجاورت با سرب گزارش شده است [۱۵]. هم‌چنین سرب فعالیت فاکتور رشد شبه انسولینی، هورمون رشد هیپوفیز و متابولیت‌های ویتامین D را که در رشد استخوان نقش دارند مهار کرده است [۱۶]. تعدادی از مقالات فعالیت تکثیری سرب را در مدل‌های مختلف کشت سلول نشان داده‌اند و این قابلیت را از طریق افزایش فعالیت برخی از انواع پروتئین کیناز C (PKC) دانسته‌اند [۱۷-۱۹].

بخشی از اثرات مخرب ترکیبات شیمیایی از جمله فلزات سنگین از طریق افزایش یا کاهش عملکرد پروتئین‌های درگیر در خودکشی سلولی اعمال می‌شود [۲۰]. 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 الیگومر تبدیل شده و با ایجاد کانال در غشاء

میتوکندری و ریزش واسطه‌هایی نظیر سیتوکروم C از میتوکندری به سیتوزول، سیگنال خودکشی را به اجزاء فرودست (downstream) منتقل می‌کند [۲۱-۲۳]. Niu و همکارانش اثر سرب را بر افزایش بیان ژن bax و کاهش بیان ژن bcl-2 در سلول‌های مغزی موش صحرایی گزارش کردند [۲۴]. در مطالعه دیگر، سرب بیان Bax را در کشت سلول‌های ماکروفاژ افزایش داده است [۲۵]. هم‌چنین اخیراً شواهدی مبنی بر خودکشی سلولی ناشی از افزایش بیان Bax و گروهی از ژن‌های استرس در سلول‌های اپیتلیال ریه انسان مجاور شده با ذرات آلوده کننده هوا شامل فلزات و هیدروکربن‌ها گزارش شده است [۲۶].

درصدی از بافت استخوان مادر در طول دوران حاملگی جهت 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 این فلز به آسانی از جفت عبور می‌کند، اثرات مخرب آن بر جنین در حال رشد مطرح بوده و مطالعه در این زمینه اهمیت می‌یابد [۲۷-۲۸]. در مطالعه حاضر، ابتدا اثر سرب بر رشد سلول‌های کشت اولیه مهره ستون فقرات جنین انسان، در محیط کشت حاوی درصدهای مختلف FBS و سپس اثر فلز بر بیان ژن bax در کشت سلول‌های فوق بررسی شد.

## مواد و روش‌ها

این مطالعه از نوع تجربی بوده که بعد از اخذ مجوز شورای پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی کرمان انجام شد.

**مواد:** کیت ایمونو پراکسیداز، آنتی‌بادی مونوکلونال Bax (کلون A۳۵۳۳) از کمپانی Dako دانمارک تهیه گردید. کیت آلکالین فسفاتاز (۸۶R)، محیط کشت DMEM/F۱۲، استات سرب، تریپسین و کروموژن MTT از کمپانی سیگما آمریکا تهیه گردید. آنزیم کلاژناز از کمپانی Gibco-UK تهیه گردید. فلاسک کشت سلول، پلیت‌های ۹۶ حفره‌ای، پلیت‌های ۳۵ میلی‌متری و لوله‌های سانتریفوژ از کمپانی NUNC و Falcon و FBS از کمپانی Serumed آلمان تهیه شد. رقت ۴۰ میلی‌مول استات سرب در آب دیونایز شده تهیه گردید و پس از عبور از فیلتر ۰/۲ میکرون استریل، به حجم‌های کوچک تقسیم و در ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

انکوبه شد. سپس فیکساسیون سلول‌ها و بررسی آلکالین فسفاتاز طبق دستورالعمل کارخانه سازنده کیت انجام شد. درصد سلول‌های آلکالین فسفاتاز مثبت، به وسیله شمارش تعداد سلول‌هایی با سیتوپلاسم قرمز رنگ در مجموع ۳۰۰ سلول شمارش شده محاسبه گردید.

**بررسی اثر سرب بر رشد سلول:** نوع مطالعه حاضر آزمایشگاهی است. سمیت سلولی سرب با روش MTT-assay بررسی شد [۳۰]. بدین ترتیب که اثر ۶ رقت مختلف سرب بر یک گروه از کشت‌های سلولی حاوی ۵٪ سرم جنین گاوی و گروه دیگر حاوی ۱۰٪ سرم جنین گاوی بررسی شد. هم‌چنین یک گروه نیز حاوی ۵ یا ۱۰٪ سرم جنین گاوی بدون سرب به عنوان کنترل رشد سلولی منظور شد. ابتدا سوسپانسیون سلولی معادل ۲۵۰۰۰ سلول در میلی‌لیتر در محیط کشت کامل تهیه شد. شمارش سلولی با کمک لام هموسایتومتر انجام شد. ۰/۱ میلی‌لیتر از سوسپانسیون به وسیله سمپلر به چاهک‌های پلیت ۹۶ حفره‌ای افزوده شد و پلیت به مدت یک شب انکوبه گردید. به چاهک‌های حاشیه پلیت آب مقطر استریل افزوده شد. پس از اتمام زمان انکوباسیون، رقت‌های ۱۰ تا ۱۵۰۰ میکرومول استات سرب به وسیله رقیق‌سازی متوالی از رقت بیشتر به کمتر در محیط کشت حاوی ۵ و ۱۰٪ سرم جنین گاوی تهیه شد. سپس محیط کشت چاهک‌ها به نوبت و به آرامی تخلیه شده و ۰/۱ میلی‌لیتر از هر رقت سرب به شش چاهک پلیت وارد شد. کشت سلول در محیط حاوی ۵ و ۱۰٪ سرم جنین گاوی بدون حضور سرب به عنوان کنترل رشد سلول انجام شد. پلیت به مدت ۷۲ ساعت در شرایط استاندارد انکوبه گردید. در ادامه، ۳۰ میکرولیتر محلول MTT (۲/۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر PBS) به هر چاهک پلیت وارد شد و پلیت به مدت یک ساعت دیگر انکوبه گردید. سپس محیط کشت چاهک‌ها به آرامی تخلیه و رنگ راسب شده در ۱۰۰ میکرولیتر DMSO حل شد. شدت رنگ به وسیله دستگاه الیزا در طول موج نانومتر ثبت گردید. تمام مراحل از موم حداقل سه مرتبه تکرار شد.

بررسی اثر سرب بر بیان ژن *bax* [۳۱] ابتدا سوسپانسیون سلولی معادل ۵۰۰۰۰ سلول در میلی‌لیتر در محیط کشت کامل تهیه شد. ۰/۱ میلی‌لیتر از سوسپانسیون به مرکز پلیت‌های ۳۵

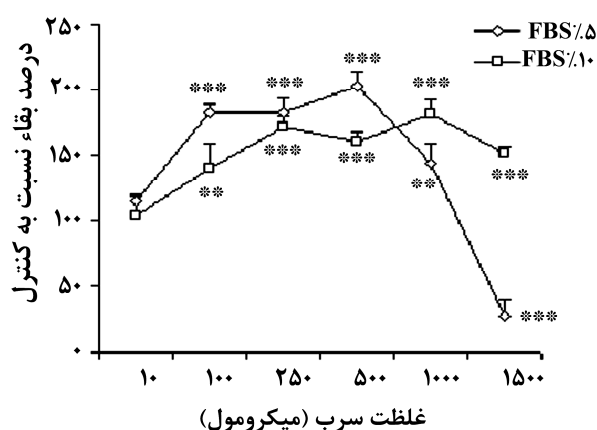
کشت سلول‌های ستون فقرات جنین انسان [۲۹]: جنین ۱۳ تا ۱۴ هفته‌ای انسان که به دلیل نارسایی قلبی مادر سقط شده بود، با همکاری بخش زنان و زایمان بیمارستان افضل پور کرمان و با رضایت والدین سریعاً به آزمایشگاه کشت سلول مرکز تحقیقات علوم و اعصاب دانشگاه علوم پزشکی جهت انجام مطالعه منتقل شد.

پس از اسپری کردن سطح بدن جنین با الکل ۷۵٪، ستون فقرات با برش‌های عمودی و افقی خارج گردید و به پتریدیش استریل منتقل شد. مهره‌ها، پس از پاکسازی بافت‌های اطراف و شستشو با PBS (Phosphat Bufferd Salin)، در محلول تریپسین ۰/۲۵٪ و ۰/۰۴٪ EDTA به مدت نیم ساعت انکوبه شدند (این مرحله با هدف هضم و پاکسازی بافت‌های حاشیه‌ای باقی مانده انجام شد). مهره‌ها پس از پیتاژ کردن و تخلیه محلول تریپسین و شستشو، به قطعات ۱ تا ۲ میلی‌متری بریده شدند. سپس ۱۵ تا ۲۰ قطعه بافت به فلاسک‌های ۲۵ سانتی‌متر مربع منتقل گردید. قطعات بافت در محیط کشت MEM/F۱۲ حاوی ۱۰٪ FCS، ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر استریتوماپسین، ۱۰۰ واحد در میلی‌لیتر پنی سیلین و ۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر ویتامین C (محیط کشت کامل)، ۲/۵ میکروگرم در میلی‌لیتر استریتوماپسین و پنج صدم کلاژناز، در اتمسفر مرطوب دارای پنج درصد دی‌اکسیدکربن در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت یک شب انکوبه شدند. سپس سوسپانسیون سلولی متشکل از سلول‌های منفرد و قطعات بافت پس از سانتریفیوژ، در محیط کشت کامل به فلاسک‌های جدید منتقل شدند. رنگ آمیزی سوسپانسیون سلولی با تریپان بلو بیش از ۹۰٪ بقاء سلول را نشان داد. در این مطالعه فریز و نگهداری سلول‌ها با روش‌های روتین به دلیل کاهش ۶۰ تا ۷۰ درصدی بقاء سلول پس از اقدام به کشت مجدد امکان‌پذیر نشد. بنابر این، جهت انجام آزمون‌ها از واکشت‌های دو تا پنج استفاده شد.

**بررسی آلکالین فسفاتاز کشت‌های سلولی (۲۹):** کشت‌های سلولی در پاساژهای دو و چهار از نظر حضور آنزیم آلکالین فسفاتاز بررسی شدند. بدین منظور سوسپانسیونی معادل ۵۰۰۰۰ سلول در میلی‌لیتر تهیه شد. ۱/۵ میلی‌لیتر از سوسپانسیون در پلیت ۳۵ میلی‌متری به مدت ۴۸ ساعت در شرایط استاندارد

آلکالین فسفاتاز در واکشت‌های ۲ و ۴، ۸۰ تا ۸۵٪ تعیین شد. سلول‌هایی با سیتوپلاسم قرمز رنگ به عنوان سلول استئوبلاست شناسایی و شمارش شد.

اثر سرب بر تکثیر کشت‌های سلولی: در این مطالعه، تکثیر سلول در محیط کشت حاوی ۱۰٪ FBS در حضور رقت‌های ۱۰۰، ۲۵۰، ۵۰۰، ۱۰۰۰ و ۱۵۰۰ میکرومول سرب به ترتیب  $40 \pm 19$ ،  $71 \pm 8$ ،  $60 \pm 8$ ،  $81 \pm 11$  و  $51 \pm 5$ ٪ نسبت به کنترل افزایش یافت ( $p=0/000$ ) و بیشترین تحریک رشد در رقت یک میلی‌مول ثبت شد (نمودار ۱).



نمودار ۱- اثر سرب بر رشد سلولهای ستون مهره جنین انسان

کشت‌های سلولی در محیط‌های کشت حاوی ۵ و ۱۰٪ سرم جنین گاوی با رقت‌های مختلف سرب به مدت سه روز مجاور شدند. در پایان رشد و تکثیر سلول با روش *MTT - assay* تعیین شد. میزان رشد کشت‌های کنترل ۱۰۰ درصد منظور شده و درصد رشد آزمون‌ها نسبت به کنترل سنجیده شده است. محور افقی غلظت سرب را بر حسب میکرومول و محور عمودی درصد بقای سلول را نسبت به گروه کنترل نشان می‌دهد.

\*\*\*:  $p < 0/01$  مقایسه شده با محیط کشت کنترل ۵ یا ۱۰٪ سرم جنین گاوی  
 \*\*\*:  $p < 0/001$  مقایسه شده با محیط کشت کنترل ۵ یا ۱۰٪ سرم جنین گاوی

هم‌زمان با کاهش FBS، فعالیت‌های مهارتی و تکثیری سرب با توجه به رقت سرب افزایش یافت، به صورتی که در رقت‌های ۱۰، ۱۰۰، ۲۵۰، ۵۰۰ و ۱۰۰۰ میکرومول رشد سلول به ترتیب  $15 \pm 5$ ،  $82 \pm 7$ ،  $82 \pm 11$ ،  $103 \pm 11$ ،  $44 \pm 15$ ٪ نسبت به کنترل افزایش یافت، و در رقت ۱/۵ میلی‌مول، ۷۲٪ کاهش نشان داد ( $p=0/000$ ).

اثر سرب بر بیان ژن *bax* در کشت‌های سلولی: نتایج ایمنوسیتوشیمی از طریق مشاهده میکروسکوپی با درشت‌نمایی صد برابر بررسی شد. همان‌گونه که در شکل ۱ مشاهده می‌شود

میلی‌متری ریخته شد (مرکز پلیت‌ها با دایره به قطر ۱ سانتی‌متر در پشت آن‌ها مشخص شد). پلیت‌ها در پتری‌های ۶۰ میلی‌متری استریل حاوی آب مقطر به مدت یک شب در شرایط استاندارد انکوبه شدند. به مجرد پایان انکوباسیون، ۱/۵ میلی‌لیتر از رقت ۰/۱ میکرومول استات سرب در محیط کشت کامل به پلیت‌ها اضافه شد. محیط کشت کامل به پلیت‌های کنترل اضافه شد. پلیت‌ها به مدت ۷۲ ساعت در شرایط استاندارد انکوبه شدند. سپس، سلول‌ها با متانول سرد حاوی ۳٪ استون به مدت ۱۰ دقیقه دقیق فیکس شدند. در ادامه، جهت افزایش نفوذپذیری غشاهای سلولی، اسمیرهای سلولی با تریتون ۰/۲٪ به مدت ۱۰ دقیقه پوشانده شدند. در هر مرحله شستشو با PBS انجام شد. سپس لایه سلولی با آلبومین سرم گاوی (BSA) ۲٪ به مدت ۱۰ دقیقه پوشانده شد. پس از خارج کردن BSA، سلول‌ها با آنتی‌بادی مونوکلونال Bax (۵۰۰:۱) به مدت یک شب در ۴ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. به عنوان کنترل منفی، لایه سلولی به جای انکوباسیون با Ab اختصاصی اولیه، با PBS انکوبه شد. سپس رنگ‌آمیزی ویژه ایمنوسیتوشیمی با روش Avidin-Biotin complex immuno peroxidase، طبق دستورالعمل کارخانه سازنده کیت انجام شد.

تجزیه و تحلیل داده‌ها: داده‌های سنجش‌های سمیت سلولی با محاسبه درصد رشد سلول نسبت به کنترل پردازش و به صورت  $mean \pm SD$  در نمودار ۱ ارائه شده است. آنالیز آماری داده‌های سنجش سمیت سلولی با آنالیز واریانس یک طرفه (One Way ANOVA) از طریق آزمون Dunnett انجام شد. بدین ترتیب که میانگین‌های شدت جذب هر غلظت سرب مربوط به هر یک از سه تکرار (سه میانگین که هرکدام از میانگین‌های شش کشت در هر تکرار به دست آمده است) با میانگین‌های شدت جذب مربوط به محیط کشت کنترل (سه میانگین که هرکدام از میانگین‌های شش کشت در هر تکرار به دست آمده است) مقایسه آماری شد. ارزش  $p < 0/05$  معنی‌دار منظور شد.

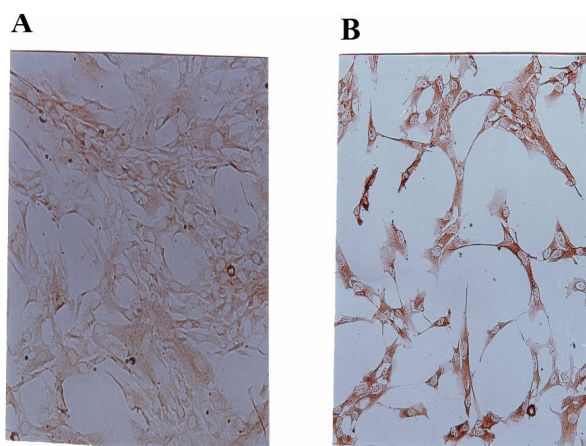
## نتایج

درصد سلول‌های استئوبلاست کشت‌های سلولی: درصد سلول‌های استئوبلاست در کشت‌های سلول، با بررسی آنزیم

کیناز C آلفا (PKC- $\alpha$ ) را دلیل اصلی اثر فوق دانسته‌اند [۱۹]. بنابراین در مطالعه حاضر احتمال اعمال اثرات تکثیری سرب از طریق افزایش فعالیت PKC- $\alpha$  مطرح می‌شود. مطالعات اپیدمیولوژیک افزایش انواع سرطان‌ها را در گارگران کارخانه‌های سرب نشان می‌دهند [۳۴-۳۵]. سرب به دلیل آسیب مستقیم به DNA و مهار فعالیت آنزیم‌های ترمیم کننده DNA به عنوان ترکیب ژنوتوکسیک معرفی شده است [۴-۶]. اثرات میتوژنیک سرب در مطالعه حاضر، به همراه نتایج مطالعات دیگر، نقش احتمالی سرب را در ایجاد تومورهای مربوط به بافت استخوان مطرح می‌کند. اثبات مورد فوق و شناسایی مکانیسم‌های مولکولی احتمالی دیگر مطالعات بیشتری را می‌طلبد.

در مطالعه حاضر علی‌رغم استرس ناشی از سرب و بیان افزایش یافته BAX، مرگ برنامه ریزی شده سلول دیده نشد. 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 الیگومر تبدیل شده و با ایجاد کانال در غشاء میتوکندری و ریزش واسطه‌هایی نظیر سیتوکروم C از میتوکندری به سیتوزول، سیگنال خودکشی را به اجزاء فرودست (downstream) منتقل می‌کند [۲۱-۲۳]. محققین افزایش پروتئین Bax را بخشی از مکانیسم خودکشی سلول‌های ماکروفاژ مجاور شده با یون‌های کبالت و کروم دانسته‌اند [۳۶]. در مطالعه دیگر علی‌رغم این که سرب بیان BAX را در کشت سلول‌های ماکروفاژ موش افزایش داده است، مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی مشاهده نشده و نکرودز دلیل مرگ سلولی دانسته شده است [۳۷]. در مطالعه حاضر، احتمالاً سرب با جلوگیری از فعال شدن یا غیر فعال کردن بعضی از اجزاء مسیر به صورت مستقیم یا غیر مستقیم مانع از انتقال سیگنال خودکشی شده است. البته، محققین خودکشی سلولی ناشی از سرب را گزارش کرده‌اند [۳۸]. گروهی خودکشی سلول‌های گیرنده نور (Rod Photoreceptor cells) ناشی از سرب را به دلیل دپلاریزاسیون میتوکندری، ریزش سیتوکروم C به سیتوزول و فعال شدن اجزاء پایین دست مسیر دانسته‌اند [۳۹]. همین گروه در گزارشی دیگر، انتقال پروتئینه BAX از سیتوزول به غشاء

مجاورت کشت‌های سلولی با ۰/۱ میکرومول سرب بیان پروتئین Bax را نسبت به کشت کنترل افزایش داده است. نتایج مشابهی در میدان‌های دید مختلف میکروسکوپ مشاهده شد. نتایج حاصل، افزایش پروتئین را در بیش از ۹۰٪ از سلول‌های مجاور شده با سرب در تکرارهای مختلف نشان داد. پروتئین Bax سیتوزولی است و نتایج حاصل از مطالعه حاضر، پروتئین را تنها در سیتوپلاسم سلول‌های مجاور شده با سرب و سلول‌های کشت کنترل نشان داد.



شکل ۱- اثر سرب بر بیان ژن Bax در کشت سلول‌های ستون مهره جنین انسان

کشت‌های سلولی با رقت ۰/۱ میکرومول سرب به مدت سه روز مجاور شدند. در پایان بیان ژن Bax با روش ایمونوسیتوشیمی بررسی شد. (a) سلولهای مجاور شده با سرب تجمع پروتئین Bax در سیتوپلاسم سلوها نمایش می‌دهد در حالی هسته سلول که در مرکز آن قرار دارد همچنان بدون رنگ باقی مانده است. (b) کشت کنترل بزرگنمایی ۱۰۰ برابر

## بحث

نتایج مطالعه حاضر افزایش رشد سلول‌های کشت اولیه ستون مهره جنین انسان را در رقت‌های بالاتر از ۱۰ میکرومول استات سرب نشان داد. افزایش بیان ژن Bax در رقت ۰/۱ میکرومول استات سرب از نتایج قابل توجه این مطالعه است.

محققین حداقل بخشی از اثرات فیزیولوژیک سرب را به دلیل شباهت بالای فلز به یون کلسیم می‌دانند [۲۰،۳۲]. افزایش فعالیت پروتئین کیناز C وابسته به کلسیم در حضور یون‌های فلز گزارش شده است [۳۳]. هماهنگ با نتایج حاضر، اثر تکثیری سرب در برخی از مدل‌های کشت سلولی گزارش شده است [۱۸-۱۷]. یک گروه از محققین افزایش سنتز DNA را در حضور رقت‌های مختلف سرب گزارش کرده‌اند و افزایش فعالیت پروتئین

توجه به این که مقدار پروتئین‌های سرم در افراد خردسال نسبت به بالغین کمتر است انتظار می‌رود میزان سرب آزاد در خون این گروه سنی بیشتر باشد. این پدیده، احتمالاً در نهایت به تجمع بیشتر فلز در بافت‌های مختلف و افزایش سمیت آن می‌انجامد.

### نتیجه‌گیری

نتایج این مطالعه احتمال ایجاد اختلال در شکل‌گیری طبیعی بافت استخوان جنین به وسیله سرب را مطرح کرده و این فلز را به عنوان یک عنصر میتوز و بنابراین سرطان‌زا معرفی می‌کند. بنابراین به عنوان نتیجه‌گیری بهتر است کودکان از حضور در مناطقی که احتمال آلودگی سرب دارند اجتناب کنند.

### تشکر و قدردانی

نتایج این مطالعه حاصل طرح پژوهشی مشترک بین دانشگاه‌های شهید باهنر کرمان، علوم پزشکی کرمان و مرکز تحقیقات علوم اعصاب کرمان است. لذا به این وسیله از آن مراکز پژوهشی تشکر می‌شود.

میتوکندری و دیپولاریزاسیون را از وقایع اولیه خودکشی سلولی ناشی از سرب معرفی کرده‌اند [۴۰]. در مطالعه همین گروه، افزایش بیان پروتئین ضد خودکشی سلولی BCL-XL، به صورت کامل خودکشی را مهار کرده است. در مطالعه حاضر، احتمال فعالیت بالای ژن *bcl-xl* به صورت ذاتی یا تحت تأثیر سرب در سلول‌های مهره جنینی وجود دارد. به هر حال، جهت تأیید احتمال فوق مطالعات بیشتر ضروری است.

نتایج به دست آمده از مطالعه حاضر افزایش فعالیت تکثیری و مهارت سرب را همزمان با کاهش درصد FBS محیط کشت نشان داد. به این صورت که با کاهش FBS اثرات تکثیری سرب در رقت‌های کمتر از یک میلی‌مول افزایش یافت و در مقادیر بالاتر سمیت شدید فلز مشاهده شد. هماهنگ با این نتایج، افزایش سمیت سرب همزمان با کاهش سرم در مدل‌های مختلف کشت سلولی گزارش شده است [۴۱-۴۲]. این یافته‌ها تمایل زیاد فلز را برای اتصال به پروتئین‌های سرم نشان می‌دهد و بخش آزاد سرب را مسئول فعالیت‌های فیزیولوژیک آن معرفی می‌کند. همچنین، نتایج مطالعه حاضر با شواهدی که سمیت بیشتر سرب را در افراد خردسال نسبت به افراد بزرگسال مطرح می‌کند، هماهنگ است. با

## References

- [1] Moore MR, Meredith PA, Watson WS, Summer DJ, Taylor MK, Goldberg A. 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, Schirmacher 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] Zawia NH, Crumpton T, Brydie M, Reddy GR, Razmiafshari 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] Poma A, Pittaluga E, Tucci A. Lead acetate genotoxicity on human melanoma cells in vitro. *Melanoma Res*, 2003; 13(6): 563-6.
- [7] Steenhout A. Kinetics of lead storage in teeth and bones: an epidemiologic approach. *Arch Environ Health*, 1982; 37(4): 224-31.
- [8] Rosen JF, Markowitz ME, Bijur PE, Jenks ST, Wielopolski L, Kelef-Ezra JA, et al. L-line x-ray fluorescence of cortical bone lead compared with the CaNa2EDTA test in lead-toxic children: Public health implications. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1989; 86(2): 685-9

- [9] Bagchi D, Preuss HG. Effects of acute and chronic oval exposure of lead on blood pressure and bone mineral density in rats. *J Inorg Biochem*, 2005; 99(5): 1155-64.
- [10] Carmouche JJ, Puzas JE, Zhang X, Tiyapatanaputi P, Cory-Slechta DA, Gelein R, et al. Lead exposure inhibits fracture healing and is associated with increased chondrogenesis, delay in cartilage mineralization, and a decrease in osteoprogenitor frequency. *Environ Health Perspect*, 2005; 113(6): 749-55.
- [11] Angle CR, Thomas DJ, Swanson SA, Osteotoxicity of cadmium and lead in HOS TE 85 and ROS 17/2.8 cells: relation to metallothionin induction and mitochondrial binding. *Biometals*, 1993; 6(3): 179-84.
- [12] Iavicoli I, Sgambato A, Carelli G, Ardito R, Cittadini A, Castellino N. Lead-related effects on rat fibroblasts. *Mol Cell Biochem*, 2001; 222(1-2): 35-40.
- [13] Mameli O, Caria MA, Melis F, Solinas A, Tavera C, Ibba A, et al. Neurotoxic effect of lead at low concentrations, *Brain Res Bull*, 2001; 55(2): 269-75.
- [14] Long GJ, Rosen JF, Pounds JG. Lead impairs the production of osteocalcin by rat osteosarcoma (ROS 17/2.8) cells. *Toxicol Appl Pharmacol*, 1990; 106(2): 270-7.
- [15] Potula V, Kleinbaum D, Kaye W. Lead exposure and spine bone mineral density. *J Occup Environ Med*, 2006; 48(6): 556-64.
- [16] Pounds JG, Long GJ, Rosen JF. Cellular and molecular toxicity of lead in bone. *Environ Health Perspect*, 1991; 91: 17-32.
- [17] Choie DD, Richter GW. Cell proliferation in mouse kidney induced by lead. I. Synthesis of deoxyribonucleic acid. *Lab Invest*, 1974; 30(5): 647-51.
- [18] Fujiwara Y, Kaji T, Yamamoyo C, Sakamoto M, Kozuka H, Stimulatory effects of lead on the proliferation of cultured vascular smooth-muscle cells. *Toxicology*. 1995; 98(1-3): 105-110.
- [19] 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.
- [20] Robertson JD, Orrenius S. Molecular mechanisms of apoptosis induced by cytotoxic chemicals. *Crit Rev Toxicol*, 2000; 30(5):609-27.
- [21] 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.
- [22] Scorrano L, Korsmeyer SJ. Mechanisms of cytochrome c release by proapoptotic BCL-2 family members. *Biochem Biophys Res Commun*, 2003; 304(3): 437-44.
- [23] Lalier L, Cartron PF, Juin P, Nedelkina S, Manon S, Bechinger B, et al. Bax activation and mitochondrial insertion during apoptosis. *Apoptosis*. 2007; 12(5): 887-96.
- [24] 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.
- [25] Gargioni R, Filipak Neto F, Buchi DF, Randi MA, Franco CR, Paludo KS, et al. Cell death and DNA damage in peritoneal macrophages of mice (*Mus musculus*) exposed to inorganic lead. *Cell Biol Int*, 2006; 30(7): 615-23.
- [26] Dagher Z, Garcon G, Billet S, Gosset P, Ledoux F, Courcot D, et al. Activation of different pathways of apoptosis by air pollution particulate matter (PM2.5) in human epithelial lung cells (L132) in culture. *Toxicology*. 2006; 225(1): 12-24.
- [27] Gulson BL, Jameson CW, Mahaffey KR, Mizon KJ, Korsch MJ, Vimpani G. Pregnancy increases mobilization of lead from maternal skeleton. *J Lab Clin Med*, 1997; 130(1): 51-62.
- [28] Gulson BL, Mizon KJ, Korsch MJ, Palmer JM, Donnelly JB. Mobilization of lead from human bone tissue during pregnancy and lactation. A summary long- term research, *Sci Total Environ*, 2003; 303(1-2): 79-104.
- [29] Gallagher JA, Gundle R, Beresford JN. Isolation and culture of Bone-forming cells (osteoblasts) from human bone human cell culture protocols. In: Jones GE, ed. *Methods in molecular medicine: Human cell culture protocols*. Totawa, NJ. Humana Press, 1996; pp: 233-62.
- [30] In Vitro Analysis of Differential Expression of Collagens, Integrins, and Growth Factors in Cultured Human Chondrocytes. *Otolaryngology Head and Neck Surgery*. 2006; 134: 510-5.
- [31] 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.
- [32] Goldstein GW. Evidence that lead acts as a calcium substitute in second messenger metabolism. *Neurotoxicology*. 1993; 14(2-3): 97-101.
- [33] Sun X, Tian X, Tomsing JL, Suszkiw JB. Analysis of differential effects of Pb<sup>2+</sup> on protein kinase C isozymes. *Toxicol Appl Pharmacol*, 1999; 156(1): 40-5.

- [34] Anttila A, Heikkila P, Pukkala E, Nykyri E, Kauppinen T, Hernberg S, et al. Excess lung cancer among workers exposed to lead. *Scand J Work Environ Health*, 1995; 21(6): 460-9.
- [35] Anttila A, Heikkila P, Nykyri E, Kauppinen T, Pukkala E, Hernberg S, et al. Risk of nervous system cancer among workers exposed to lead. *J Occup Environ Med*, 1996; 38(2): 131-6.
- [36] Petit A, Mwale E, 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.
- [37] Gargioni R, Filipak Neto F, Buchi DF, Randi MAF, Franco CRC, Paludo KS. Cell death and DNA damage in peritoneal macrophages of mice (*Mus musculus*) exposed to inorganic lead. *Cell Biol Int*, 2006; 30(7): 615-23.
- [38] Oberto A, Marks N, Evans HL, Guidotti A. Lead (pb<sup>2+</sup>) promotes apoptosis in newborn rat cerebellar neurons: pathological implications. *J Pharmacol Exp Ther*, 1996; 279(1): 435-42.
- [39] He L, Poblenz AT, Medrano CJ, Fox DA. Lead and calcium produce rod photoreceptor cell apoptosis by opening the mitochondria permeability transition pore. *J Biol Chem*, 2000; 275(16): 12175-84.
- [40] 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.
- [41] 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.
- [42] 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.