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 رجبعلیان[۱]، فاطمه شاهی صدرآبادی[۲]، دکتر شهریار دبیری[۳]، عباس نژادراوری[۴]، پروین صالحی‌نژاد[۵]، رفعت حسینی[۶]

دریافت مقاله: ۸۵/۹/۱۵ ارسال مقاله به نویسنده جهت اصلاح: ۸۶/۱/۲۱ دریافت اصلاحیه از نویسنده: ۸۶/۸/۱۳ 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 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) 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 ایمونوسیتوشیمی، ICC، (immunocytochemistry) بررسی گردید.

یافته‌ها: سمیت سرب در غلظت‌های بالاتر از یک میلی‌مول مشاهده شد ($p=۰/۰۰۰$). مجاورت مکرر با رقت‌های ۲۵۰ و ۵۰۰ میکرومول کاهش قابل ملاحظه‌ای در رشد سلول ایجاد کرد ($p<۰/۰۱$). نتایج، اثرات محافظتی FCS را در برابر سمیت سرب نشان دادند. مجاورت با سرب بیان ژن bax را تحریک 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، ایمونوسیتوشیمی، سنجش MTT

مقدمه

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

۱- (نویسنده مسؤول)پژوهشگر، مرکز تحقیقات علوم اعصاب کرمان، دانشگاه علوم پزشکی کرمان

تلفن: ۷- ۲۱۲۰۵۴۶-۰۳۴۱، فاکس: ۲۱۱۱۰۱۰-۰۳۴۱، 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- مربی و هیأت علمی، دانشکده مامایی و پرستاری، دانشگاه علوم پزشکی کرمان

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

جریان خون به بافت‌های مختلف بدن منتقل می‌شود [۱]. سمیت 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 [۳-۲]. سرب به صورت مستقیم و یا با ایجاد رادیکال‌های آزاد به DNA آسیب می‌رساند [۵-۴]. هم‌چنین این فلز با پراکسیداسیون لیپیدهای غشاء، به سلول و بافت آسیب وارد می‌کند. [۶].

شواهد متعدد سمیت شدید سرب را برسیستم 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 [۸-۷]. تعدادی از مقالات فعالیت تکثیری سرب را در مدل‌های مختلف کشت سلول نشان داده [۱۰-۹]، و این قابلیت را به افزایش فعالیت برخی از انواع پروتئین کیناز C (PKC) مربوط دانسته‌اند [۱۲-۱۱]. هم‌چنین مطالعات انجام شده با استفاده از میکروسکوپ الکترونی، اثرات مخرب سرب را بر آستروسیت‌های موش صحرایی نشان داده است [۱۴-۱۳]. 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 Bcl-2 و Bcl-XL و فعال کننده آپوپتوز، نظیر Bax و Bak، 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 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 [۱۸-۱۷]. 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].

درصدی 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 [۲۱-۲۰]. با توجه به این که آستروسیت‌ها از مراکز عمده تجمع سرب به شمار می‌آیند [۱۳،۲۲]، اثر این فلز بر سلول‌های آستروسیت جنین در حال رشد اهمیت می‌یابد. بنابراین در مطالعه حاضر ابتدا سمیت 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 سمیت سرب بررسی شده است. در ادامه اثر سرب بر بیان ژن *bax* در کشت سلول‌های آستروسیت با روش ایمونوسیتوشیمی بررسی شد.

مواد و روش‌ها

مواد و کشت سلول آستروسیت: در این مطالعه آزمایشگاهی کیت ایمونو پراکسیداز، آنتی‌بادی مونوکلونال Bax (کلون A3533) از کمپانی Dako دانمارک و محیط کشت DMEM/F12، استات سرب، تریپسین، MTT از کمپانی Sigma آمریکا خریداری شد. فلاسک کشت سلول، پلیت‌های ۹۶ حفره‌ای، پلیت‌های ۳۵ میلی‌متری و لوله‌های سانتریفوژ 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 افضلی‌پور 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 ۱۴هفته‌ای انسان به وسیله روش زیر

تهیه شد: استخوان جمجمه پس از شستشو با الکل ۷۵٪ برش داده شد. قطعه مناسبی از لب قدامی مغز در لوله‌های سانتریفوژ ۵۰ میلی‌لیتری حاوی ۲۰ میلی‌لیتر محلول تریپسین ۰/۲٪- EDTA ۰/۰۴٪ به مدت ۲۰ دقیقه انکوبه شد. پس از هضم بافت و شستشو، سلول‌ها در محیط DMEM/F12 حاوی ۱۰٪ FCS، ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر استرپتومایسین، ۱۰۰ واحد در میلی‌لیتر پنی‌سیلین و ۵٪ سرم اسب، در فلاسک‌های ۷۵ و ۲۵ سانتی‌متری در اتمسفر مرطوب در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد دارای ۵٪ دی‌اکسیدکربن انکوبه شدند. بعد از اینکه سلول‌ها بیش از ۸۰٪ سطح فلاسک را پوشاندند، کشت‌ها به فلاسک‌های جدید واکشت شدند. سلول‌ها پس از واکشت دوم در محیط کشت حاوی ۱۰٪ DMSO در ویال‌های متعدد در ازت مایع ذخیره شدند [۲۳].

بررسی اثر یک نوبت مجاورت با سرب بر رشد سلول: در این مطالعه تجربی، سمیت سلولی سرب در کشت سلول‌های آستروسیت با روش سنجش MTT بررسی شده است [۲۴]. به این ترتیب که ابتدا سوسپانسیون‌های سلولی معادل صد هزار سلول در میلی‌لیتر در محیط کشت حاوی ۵ و ۱۰٪ FCS تهیه شد. یک دهم میلی‌لیتر از سوسپانسیون‌ها به چاهک‌های پلیت‌های ۹۶ حفره‌ای افزوده شد و پلیت‌ها به مدت یک شب انکوبه شدند. درون چاهک‌های حاشیه پلیت‌ها آب مقطر استریل ریخته شد. به مجرد پایان انکوباسیون، رقت‌های ۳۰ میکرومول تا ۴/۵ میلی‌مول استات سرب در محیط کشت DMEM/F12 حاوی ۵ و ۱۰٪ FCS تهیه شد. سپس ۵۰ میکرولیتر از هر رقت به شش چاهک مربوطه وارد شد. کشت سلول در محیط کشت بدون سرب حاوی ۵ و ۱۰٪ 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 میلی‌گرم در میلی‌لیتر PBS) به تمامی چاهک‌ها افزوده شده و پلیت به مدت دو ساعت دیگر انکوبه گردید. در پایان پس از تخلیه آرام محیط کشت، کریستال‌های رنگ فورمازان راسب شده در سیتوپلاسم سلول‌ها با افزودن ۱۰۰ میکرولیتر DMSO به هر چاهک حل شدند. شدت رنگ با دستگاه ثبت الیزا در طول موج ۴۹۲ نانومتر و رفرانس 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 ۵۰۰۰۰ سلول در میلی‌لیتر در محیط کشت DMEM/F12 حاوی ۱۰٪ FCS، ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر استرپتومایسین و ۱۰۰ واحد در میلی‌لیتر پنی‌سیلین تهیه شد. یک دهم میلی‌لیتر از سوسپانسیون به چاهک‌های پلیت ۹۶ حفره‌ای وارد شد و پلیت ۲۴ ساعت در شرایط استاندارد انکوبه شد. غلظت‌های ۱۰، ۱۰۰، ۲۵۰ و ۵۰۰ میکرومول استات سرب در محیط کشت DMEM/F12 حاوی ۱۰٪ FCS، ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر استرپتومایسین و ۱۰۰ واحد در میلی‌لیتر پنی‌سیلین تهیه شد. به مجرد پایان انکوباسیون محیط کشت چاهک‌ها به آرامی تخلیه شده و یک دهم میلی‌لیتر 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 رقت‌های 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 داده‌ها و آنالیز آماری: داده‌های سنجش‌های سمیت سلولی با محاسبه درصد رشد سلول نسبت به کنترل، پردازش و به صورت میانگین ± انحراف معیار در نمودارها ارایه شده است. درصد رشد سلول نسبت به کنترل از رابطه زیر محاسبه شد:

$$\text{درصد رشد سلول} = \frac{\text{شدت جذب در مجاورت با سرب}}{\text{شدت جذب محیط کشت بدون سرب}} \times ۱۰۰$$

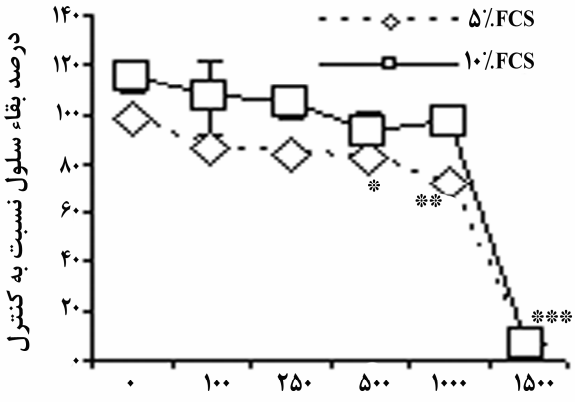
آنالیز آماری داده‌های سنجش سمیت سلولی به وسیله آنالیز واریانس یک طرفه (One Way ANOVA) از طریق آزمون Dunnett انجام شد. بدین ترتیب که میانگین‌های شدت

جذب هر غلظت سرب مربوط به هر یک از سه تکرار (سه میانگین که هرکدام از 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 ایمونوسیتوشیمی: تأثیر سرب بر الگوی بیان ژن Bax در کشت سلول‌های آستروسیت با روش ایمونوسیتوشیمی 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 ۰/۱ و ۰/۰۱ میکرومول سرب به هر پلیت افزوده شد. محیط کشت تعدادی از پلیت‌ها با محیط کشت DMEM/F12 حاوی ۱۰٪ FCS، ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر استرپتو مایسین 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 متانول سرد حاوی ۳٪ استون به مدت ۱۰ دقیقه فیکس شد. 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 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 Bax (۱: ۵۰۰) و پلی‌کلونال GFAP (۱:۵۰) به مدت یک شب در چهار درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. به عنوان کنترل منفی، لایه سلولی به جای انکوباسیون با Ab اختصاصی اولیه با PBS انکوبه شد. در پایان رنگ‌آمیزی ویژه ایمونوسیتوشیمی 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

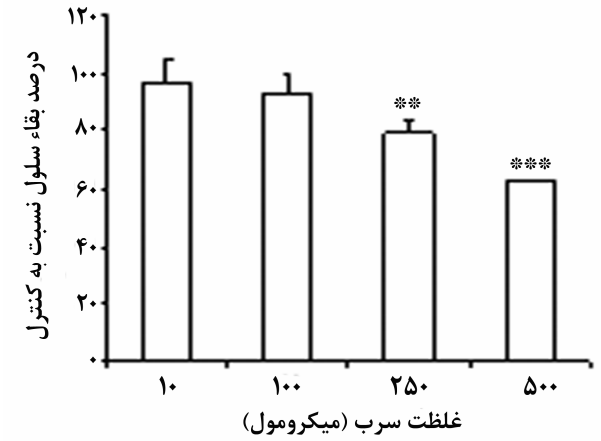
سمیت سرب در کشت سلول‌های آستروسیت با روش سنجش MTT بررسی شد. توقف کامل رشد سلول در رقت ۱/۵ میلی‌مول سرب مشاهده شد (p=۰/۰۰۰). نتایج، افزایش جزئی رشد سلول را در غلظت‌های کمتر از ۵۰۰ میکرومول سرب در محیط کشت حاوی ۱۰٪ FCS نشان داد (p>۰/۰۵). سمیت با کاهش FCS افزایش یافت، به ترتیبی که در رقت‌های ۰/۵ و ۱ میلی‌مول کاهش رشد معادل ۱۵٪ (p<۰/۰۵) و ۲۸٪ (p<۰/۰۱) 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 پنج 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±SEM ارایه شده است.

****: p<۰/۰۵ مقایسه شده با محیط کشت کنترل حاوی ۵٪ سرم جنینی گوساله، **: p<۰/۰۱ مقایسه شده با محیط کشت کنترل حاوی ۵٪ سرم جنینی گوساله، ***: p<۰/۰۰۱ مقایسه شده با محیط کشت کنترل حاوی ۵ و ۱۰٪ سرم جنینی گوساله.***

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 ۲۱٪ ($p<0/01$) و ۳۷٪ ($p<0/001$) کاهش یافت (نمودار ۲).



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

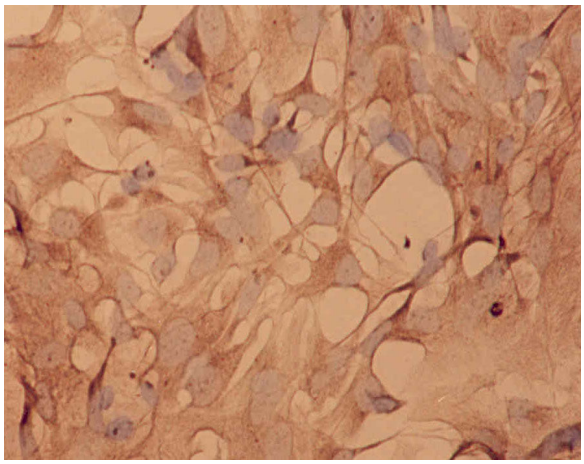
کشت‌های سلول در فواصل زمانی ۴۸ ساعته سه مرتبه با رقت‌های ۱۰، ۱۰۰، ۲۵۰ و ۵۰۰ میکرومول سرب مجاور شدند. سپس رشد سلول با روش MTT-assay تعیین شد. محورعمودی درصد بقاء سلول را در کشتهای مجاور شده با سرب نسبت به کشت کنترل بدون سرب نشان می‌دهد. میزان رشد سلول در محیط کشت کنترل ۱۰۰٪ در نظر گرفته شده است. نتایج به صورت mean±SEM ارایه شده است.

: $p<0/01$ مقایسه شده با محیط کشت کنترل بدون سرب

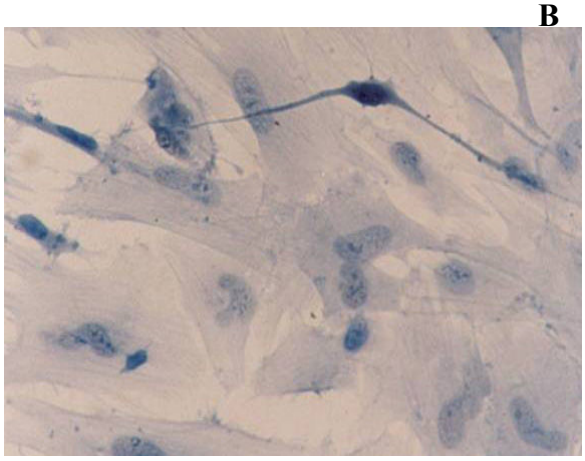
: $p<0/001$ مقایسه شده با محیط کشت کنترل بدون سرب

ماهیت کشت‌های سلولی و مطالعه مورفولوژیک: مطالعه ایمونوسیتوشیمی، حضور پروتئین GFAP را در سیتوپلاسم بیش از ۹۰٪ از سلول‌ها در پاساژ دوم نشان داد (شکل A ۱).

A



B

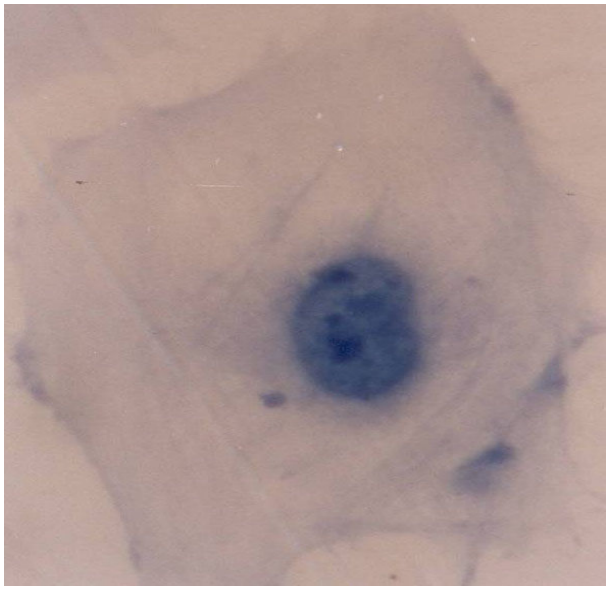


شکل ۱- درصد آستروسیت‌ها در کشت اولیه

حضور پروتئین GFAP در کشت‌های سلولی با روش ایمونوسیتوشیمی 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).

A



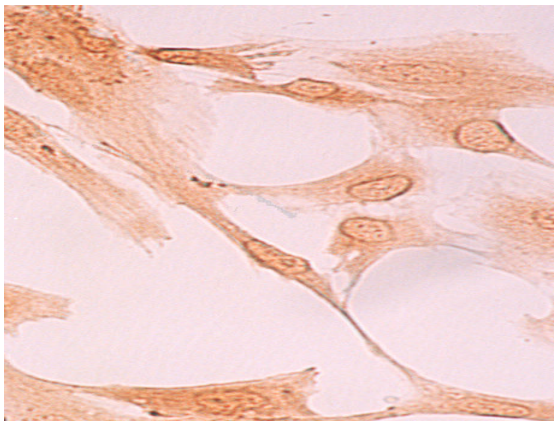
B



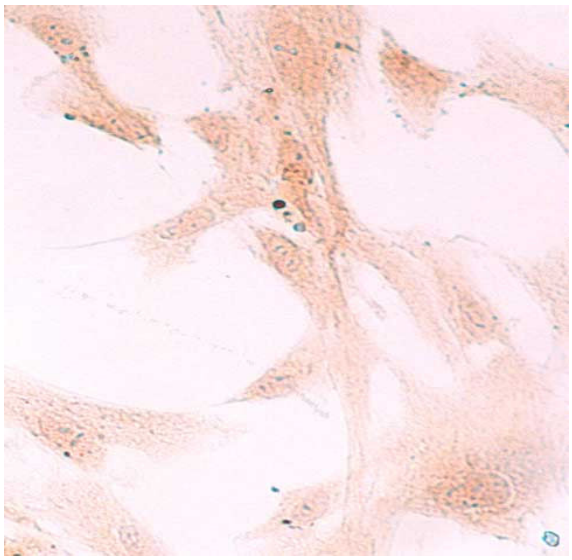
شکل ۲- اثر سرب بر ایجاد گرانول‌های سیتوپلاسمی در آستروسیت‌ها کشت‌های سلولی به مدت سه روز با رقت ۵۰۰ میکرومول سرب مجاور شدند. سپس تصاویر میکروسکوپی تهیه شد. (A) گرانول‌های قهوه‌ای رنگ در سیتوپلاسم سلول‌های مجاور شده با سرب مشاهده می‌شوند، در حالی که هسته بیضی شکل به رنگ آبی در مرکز دیده می‌شود. نوک پیکان یک گرانول سیتو پلاسمی را نشان می‌دهد. (B) سلول‌های کشت کنترل با هسته بیضی شکل و سیتوپلاسم شفاف مشاهده می‌شوند. درشت نمایی ۴۰۰ برابر.

اثر سرب بر بیان ژن *bax*: 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).

A



B



شکل ۳- اثر سرب بر بیان پروتئین BAX در آستروسیت‌ها کشتهای سلولی به مدت سه روز با رقت‌های ۰/۰۱، ۰/۱ و ۱ میکرومول سرب مجاور شدند. سپس بررسی ایمونو سیتوشیمی ژن bax انجام شد. تصویر A بیان افزایش یافته پروتئین Bax را به خصوص در غشاء هسته، در رقت ۰/۱ میکرومول سرب نشان می‌دهد. نتایج مشابهی در رقت ۱ میکرومول سرب دیده شد. نوک پیکان تراکم پروتئینBax را در غشاء هسته نشان می‌دهد. نتایج مجاورت با ۰/۰۱ میکرومول سرب مشابه با کشت کنترل بود (تصویر B). درشت نمایی ۱۰۰ برابر.

نتایج مشابهی در غلظت یک میکرومول سرب به دست آمد. نتایج رنگ‌آمیزی ایمونوسیتوشیمی در غلظت ۰/۰۱ میکرومول سرب مشابه کشت‌های کنترل بدون سرب بود. در سرتاسر مطالعات ICC در سلول‌های کنترل منفی که به جای آنتی‌بادی اختصاصی با PBS انکوبه شده بودند رنگ اختصاصی ایمونوشیمی مشاهده نشد (تصویر ۱B).

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

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

نتایج مطالعه، افزایش نسبی رشد سلول را در حضور مقادیر کمتر از ۲۵۰ میکرومول سرب نشان داد. هماهنگ با این یافته، محققین فعالیت تکثیری سرب را در مدل‌های مختلف کشت‌های سلولی نشان داده‌اند (۱۰-۹)، 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 سمیت سرب را به دنبال کاهش FCS گزارش کرده‌اند، هماهنگ است [۲۶-۲۵]. این یافته‌ها تمایل 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 سمیت بیشتر سرب را در افراد خردسال نسبت به افراد بزرگسال مطرح می‌کند، هم‌خوانی دارد [۸-۷]. با توجه به این که مقدار پروتئین‌های سرم در افراد خردسال نسبت به بالغین کمتر است [۲۸-۲۷]، 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 سمیت آن می‌انجامد.

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

هم‌چنین محققین دیگر افزایش پروتئین Bax را بخشی از مکانیسم خودکشی سلول‌های ماکروفاژ مجاور شده با یون‌های کبالت و کروم دانسته‌اند [۳۰]. Hi و همکارانش، 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 گزارش کرده‌اند [۳۱]. همین گروه در گزارشی دیگر، انتقال پروتئین Bax از سیتوزول به غشاء میتوکندری و دپولاریزاسیون را از وقایع اولیه خودکشی سلولی ناشی از سرب معرفی کرده‌اند [۳۲]. در مطالعه آن‌ها، افزایش بیان پروتئین ضد خودکشی سلولی 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 خود کشی سلولی، علی‌رغم افزایش پروتئین Bax، مانع از انتقال سیگنال خودکشی شده است. هم‌چنین احتمال فعالیت بالای ژن *bcl-xl* و یا ژن‌هایی با فعالیت ضد مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی 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 گروه های سنی ۵ تا ۱۴ سال به ترتیب ۰/۱۴ تا ۰/۳۸ و ۳۹ تا ۱۲۰ میکروگرم در لیتر گزارش شده است در حالی که مقدار این فلز در پلاسما و خون تام گروهای سنی ۴ تا ۱۵ سال که در معرض سرب بوده‌اند به ترتیب به ۰/۴۶ 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 سلول‌های دیگر را محافظت می‌کنند، مرگ فیزیولوژیکی و پاتولوژیکی این سلول‌ها احتمال رهایش مقادیر قابل توجه سرب و آسیب‌های سلولی 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 نوروتوکسیک سرب را از طریق تداخل در عملکرد طبیعی آستروسیت‌ها مطرح می‌کند.

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

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] 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] 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 lnog-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. *Neurotoxicol*ogy. 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. Indution 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 MSc [1], **F. Shahi Sadrabadi** MSc[2], **Sh. Dabiri** PhD[3], **A. Nejadravari** MSc[4], **P. Salehinejad** MSc[5], **R. Hosseini** BSc[6]

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>1mM ($p=0.000$). Continuous lead exposure also (250 and 500 μM for 7 days) caused a significant growth inhibition ($p<0.01$) of astroastes. 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 Patology, 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