

تأثیر cAMP در القاء آپوپتوز پیش از سلولهای ماکروفاژ ریوی

مهوش حعفری^{*}، عذر اردانی^۲

^۱- استادیار گروه بیوشیمی دانشگاه علوم پزشکی تهران ۲- استاد مرکز تحقیقات بیوشیمی - بیوفیزیک دانشگاه تهران

سابقه و هدف: AMP حلقوی به عنوان پیامبر ثانویه و عامل تنظیمی داخل سلولی در بسیاری از فرایندهای متنوع بیولوژیکی شرکت می کند. بسیاری از ترکیبات قادرند عمل خود را از طریقAMP CAMP در القاء آب و بوتیزیر، در سلولهای مادر و فائز در پیش، شده است.

مواد و روشها: سلولهای ماکروفاژ ریوی موش صحرایی با استفاده از روش لاواز ریه تهیه گردید و تحت تاثیر غلظت های مختلف cAMP (μM ۰-۵-۲۰۰) قرار گرفت و به مدت ۲۴ ساعت در شرایط استاندارد کشت داده شد. سپس اثر cAMP روی درصد تقاضای سلولی، میزان قطعه قطعه شدن DNA و تولید سویم اکسید بررسی گردید.

یافته ها: نتایج نشان می دهد که در غلظت های کم ($\mu M < 50$) بقای سلولی افزایش می یابد، ولی در غلظت های بالاتر ($\mu M > 100$) بطور معنی دار در صد سلولهای زنده کاهش می یابد. همچنین، تولید آنیون سوپر اکسید در غلظت های کم cAMP تغییر معنی داری نکرده، در حالیکه در غلظت های بالاتر ($\mu M > 100$) میزان قطعه قطعه شدن DNA و آنیون سوپر اکسید هر دو افزایش می یابند.

نتیجه گیری: اثرات cAMP وابسته به غلظت است و اثرات آن روی سلولها مشابه کافئین است. بنابر این، در غلظت های کم cAMP آپوپتوزیس در سلولهای ماکروفاز مهار می شود، درحالیکه در غلظت های بالاتر cAMP، سلولها بطرف آپوپتوزیس می روند.

واژه های کلیدی: *cAMP*: سلولهای ماکروفاژ ریوی، آپوپتوزیس.

مجله دانشگاه علوم پزشکی بابل، دوره هشتم، شماره ۱، زمستان ۱۳۸۴، صفحه ۲۷۸-۲۷۲

مقدمه

cAMP را در سلول افزایش دهد(۸-۱۰). ماکروفاژهای ریوی نه تنها جهت نابودی باکتریها و برطرف کردن التهابات نقش موثری دارند، بلکه در سنتر یکسری پروتئین ها و ترکیبات مختلف شرکت می کنند(۱۱-۱۲). مطالعه قبلی ما نشان داد که غلظت های کم کافثین ($2/5\text{ mM}$) از آپوپتوزیس سلولهای ماکروفاژ جلوگیری می کند، در حالیکه غلظت های متوسط کافثین ($5-20\text{ mM}$) آپوپتوزیس را القاء می کند و در غلظت های بالاتر از 20 میلی مولار نکروز در سلولها واقع می شود. همچنین، کافثین قادر است با افزایش، سنتز پروستاگلاندین، ها و مهار آنزیم فسفو دی، استراز باعث

آنوزین منو فسفات حلقوی (cAMP) بعنوان پیامبر ثانویه و عامل تنظیمی داخل سلولی در بسیاری از فرایندهای متنوع بیولوژیکی شرکت می کند. cAMP نقش مهمی در کنترل تکثیر، تمایز و آپوپتوزیس ایفاء می کند^(۱-۴). تولید cAMP بوسیله سیگنال های داخل و خارج سلولی مثل هورمونها، نوروترانسمیترها و بعضی داروها تنظیم می گردد و بسیاری از ترکیبات قادرند عمل خود را از طریق cAMP انجام دهند^(۵-۷). کافئین یکی از آلکالوئیدهای فعال است که در درمان نوزادان مبتلا به آسم و آپنه استفاده می شود و قادر است از طریق، مهار آنژین فسفه دی، استراز سطح

کشت اضافه و در آنکوباتور واحد $5\% \text{CO}_2$ ، حرارت 37°C و رطوبت کامل بمدت ۲۴ ساعت قرار گرفتند. پس از اتمام زمان آنکوباسیون Rubber Policeman جدا و سوسپانسیون سلولی جهت بررسی درصد بقای سلولی و بررسی بیوشیمیایی بکار برده شد.

اندازه گیری میزان آنیون سوپر اکسید: پس از اتمام زمان آنکوباسیون سوسپانسیون سلولی در حضور و عدم حضور غلظت‌های مختلف cAMP در 2000g به مدت ۱۰ دقیقه در 40°C سانتریفوژ گردید. رسوب حاصله را دو بار با بافر فسفات سالین (PBS) شسته و سانتریفوژ گردید. سپس به همه نمونه‌ها، سیتوکروم $160\text{ }\mu\text{M}$ میکرو مولار، فربل میرستیک استات 10°C مولار اضافه و فقط به نمونه کنترل 60°C واحد آنزیم سوپر اکسید دیسموتاز اضافه گردید. نمونه‌ها به مدت ۱۵ دقیقه در 37°C قرار داده شدند و در 6000g به مدت ۱۰ دقیقه در 40°C سانتریفوژ گردید و به دقت محلول رویی خارج شد. میزان تولید آنیون سوپر اکسید با استفاده از جذب نمونه‌ها در طول موج 550 nm با استفاده از دستگاه اسپکتروفوتومتری Shimadzu U.V ۲۶۰ محسوبه گردید(۱۶).

اندازه گیری قطعه قطعه شدن DNA: سلولهای ماکروفاز در حضور و عدم حضور غلظت‌های مختلف cAMP پس از اتمام زمان آنکوباسیون در 2000g به مدت ۱۰ دقیقه در 40°C سانتریفوژ شد و $5\text{ }\mu\text{l}$ لیتر بافر لیز سلولی ($10\text{ }\mu\text{l}$ مولار تریس HCl، یک $0.5\text{ }\mu\text{l}$ میلی لیتر EDTA $\text{pH}=8$ و $0.2\text{ }\mu\text{l}$ تریتون X) به رسوب میلی مولار اضافه گردید و پس از مخلوط کردن در 2000g به مدت ۲۰ دقیقه در 40°C سانتریفوژ گردید. $5\text{ }\mu\text{l}$ میلی لیتر از بافر لیز سلولی به رسوب اضافه گردید و سپس به رسوب (P) و محلول رویی (S) $0.5\text{ }\mu\text{l}$ میلی لیتر اضافه شد. سپس به رسوب (P) و محلول رویی (S) $25\text{ }\mu\text{l}$ TCA $25\%\text{ v/v}$ اضافه شد و یک شب در دمای 40°C قرار داده شد و بعد از سانتریفوژ در 15000g به مدت ۲۰ دقیقه در 40°C ، روی رسوب لوله‌های P و S، $80\text{ }\mu\text{l}$ میکرولیتر TCA $5\%\text{ v/v}$ اضافه شد و در 83°C به مدت ۲۰ دقیقه آنکوبه شد. سپس به هر نمونه $160\text{ }\mu\text{l}$ میکرولیتر معرف دی فنیل آمین (150 mg/mL) دی فنیل آمین در $10\text{ }\mu\text{l}$ لیتر اسید اسیتیک، $150\text{ }\mu\text{l}$ میکرولیتر اسید سولفوریک، $50\text{ }\mu\text{l}$ میکرولیتر استالدئید 16 mg/mL اضافه شد و برای ۲۴ ساعت در درجه حرارت اتاق آنکوبه شد و جذب نمونه‌ها در طول موج 600 nm توانometer خوانده شد و

افزایش غلظت cAMP سلولی گردد(۱۳-۱۴). برای درک بیشتر مکانیسم عمل کافین باید بررسی کرد که آیا اثرات cAMP روی سلولهای ماکروفاز مشابه کافین است و آیا کافین اثرات خود را در این سلولها از طریق cAMP القاء می‌کند. در این مطالعه، نقش cAMP در القاء آپوپتوزیس در سلولهای ماکروفاز بررسی شده است.

مواد و روشها

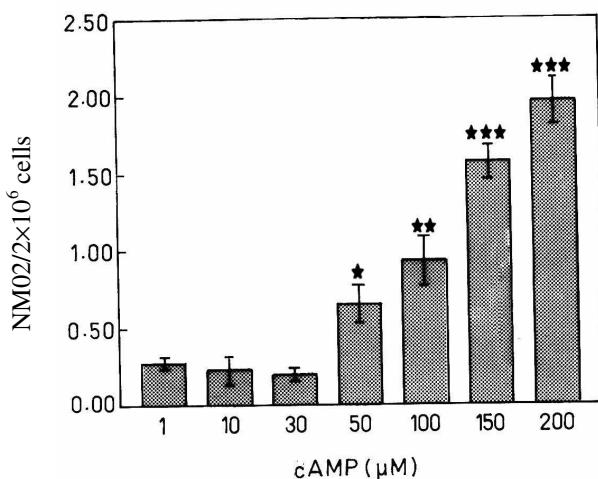
مواد شیمیایی: تریپان بلو، اتیدیوم بروماید، سیتوکروم C، سوپر اکسید دیسموتاز (Superoxide dismutase:SOD) و بوتیریل cAMP از شرکت سیگما خریداری شد. دی فنیل آمین و ترکیبات دیگر از شرکت مرک خریداری گردید. محیط کشت (Dulbeccos Modified Eagle Medium) DMEM جنین گوساله (Fetal Calf Serum: FCS) از شرکت Gibco تهیه شد. محیط کشت 120 mg/mL DMEM با 30 mg/L آسپارژین، 120 mg/mL پنی سیلین و 200 mg/mL استرپتومایسین $\text{pH}=7/4$ تهیه گردید و سپس با فیترهای میلی پور $45\text{ }\mu\text{m}/0^\circ\text{C}$ نگهداری شد. کافین بطور تازه در محیط کشت حل گردید.

حیوان: از موش صحرایی نوع Sprague - Dawley با وزن $200-250\text{ g}$ خریداری شده از انتستیو پاستور استفاده شد و در محیط مناسب از نظر نور و دما نگهداری شد.

تهیه سلولهای ماکروفاز ریوی: از روش لاواز ریه استفاده گردید (۱۵). با ایجاد شکاف کوچکی در نای، لوله پلاستیکی وارد ریه و برای شستشو آن از سرم فیزیولوژیکی استریل استفاده شد. کلیه محلولهای جمع آوری شده در 2000g برای 10°C دقیقه در دمای 40°C سانتریفوژ و سلولها یکبار نیز با محیط کشت حاوی $10\text{ }\mu\text{l}$ درصد FCS شستشو گردید. سپس به آرامی محیط رویی در شرایط استریل خارج و کف پریها با حجم معینی از محیط کشت سرم دار شسته و درصد بقای سلولها بوسیله تریپان بلو و شمارش سلولها توسط متیلن گرین انجام گرفت.

کشت سلولهای ماکروفاز در حضور cAMP: سلولهای ماکروفاز تهیه شده به میزان دو میلیون سلول در هر میلی لیتر محیط کشت DMEM حاوی $10\%\text{ v/v}$ FCS در ظروف کشت استریل وارد گردید. سپس غلظت‌های مختلفی از $200\text{ }\mu\text{M}$ cAMP به محیط

شکل ۲ اثر cAMP روی آزاد شدن آنیون سوپراکسید از سلولهای ماکروفاز بعد از ۲۴ ساعت انکوباسیون را نشان می‌دهد. کاهش تولید سوپراکسید در غلظت‌های کم ($<50\mu M$) معنی‌دار نیست. اما در غلظت‌های بالاتر ($\geq 50\mu M$) تولید سوپراکسید افزایش می‌یابد که اثر ماکزیمم آن در ۲۰۰ میکرومولار مشاهده می‌گردد.



نمودار شکل ۲. اثر غلظت‌های مختلف cAMP روی آزاد شدن آنیون سوپراکسید از سلولهای ماکروفاز بعد از ۲۴ ساعت کشت سلولی.
*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001 در مقایسه با کنترل (بدون cAMP) (n=۴).

تعیین درصد قطعه قطعه شدن DNA سلولهای ماکروفاز با غلظت‌های مختلف cAMP بعد از ۲۴ ساعت انکوباسیون در شکل ۳ نشان می‌دهد که درصد قطعه قطعه شدن DNA با افزایش غلظت cAMP در مقایسه با کنترل تا غلظت کمتر از ۵۰ میکرومولار کاهش می‌یابد که فقط درصد DNA قطعه قطعه شده است (کنترل ۱۱%).

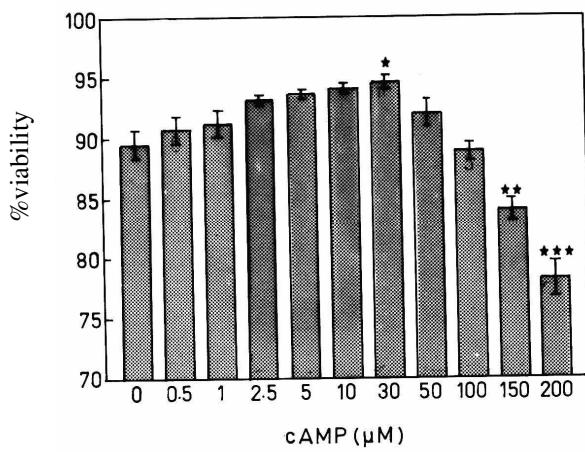
اما بین ۵۰ تا ۱۰۰ میکرومولار cAMP افزایش میزان قطعه قطعه شدن DNA در مقایسه با کنترل معنی‌دار نیست و در غلظت‌های بالاتر ($>100\mu M$)، درصد قطعه قطعه شدن DNA افزایش می‌یابد بطوریکه در ۲۰۰ میکرومولار ۱۵ درصد قطعه قطعه شده است.

درصد قطعه قطعه شدن DNA محاسبه گردید(۱۷).
$$\% \text{ Fragmented DNA} = \frac{\text{OD (S)}}{\text{OD (S)} + \text{OD (P)}} \times 100$$

تحلیل آماری: با استفاده از آزمون های آماری آنالیز واریانس یک طرفه و t-test نتایج مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت و به صورت Mean \pm SD بیان شد. نتایج با $p<0.05$ معنی‌دار لحاظ گردید.

یافته‌ها

بررسی‌های سیتولوزیکی بر روی سلولهای ماکروفاز ریبوی نشان داد که ۹۶-۹۸٪ سلولها زنده و سالم بودند و از یکپارچگی سیتوپلاسمی کامل برخوردار و هیچ آسیب غشایی مشاهده نمی‌شود. شکل ۱ درصد بقای سلولی ماکروفاز‌ها را بعد از ۲۴ ساعت کشت در حضور و عدم حضور غلظت‌های مختلف cAMP نشان می‌دهد. در غلظت‌های کم ($<50\mu M$) درصد سلولهای زنده افزایش می‌یابد و در غلظت $\geq 50\mu M$ درصد بقای سلولی مشاهده می‌شود در مقایسه با کنترل که $\approx 86\%$ می‌باشد. بین ۳۰ تا ۵۰ میکرومولار cAMP درصد بقای سلولی هنور بالاتر از کنترل است و در غلظت‌های بالاتر ($>100\mu M$) سلولها به شدت به طرف مرگ پیش می‌روند، بطوریکه در ۲۰۰ میکرومولار cAMP درصد بقای سلولی به $\approx 78\%$ می‌رسد.



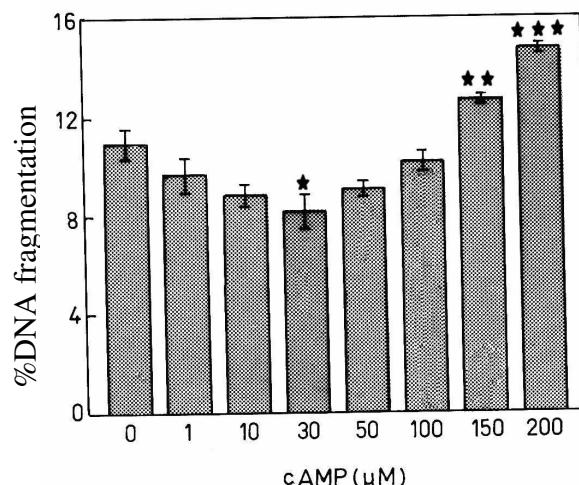
نمودار ۱. اثر غلظت‌های مختلف cAMP بر روی درصد بقای سلولهای ماکروفاز بعد از ۲۴ ساعت کشت سلولی.
*p<0.001, **p<0.01, ***p<0.05 در مقایسه با کنترل (بدون cAMP) (n=۴).

معنی داری نمی کند. این نتایج با مطالعات قبلی مطابقت دارد که cAMP در غلظت های کم نه تنها روی بقاء سلولها اثر نمی گذارد بلکه باعث شادابی سلولهای نیز می گردد(۲۱-۲۶). این نتایج پیشنهاد می کند که احتمالاً در غلظت های کم cAMP آپوپتوزیس در سلولهای ماکروفاژ مهار می شود. وقتی سلولهای ماکروفاژ در حضور ۳۰-۱۰۰ میکرومولار cAMP کشت داده شدند، درصد بقای سلولی در مقایسه با کنترل کاهش می یابد ولیکن در مقایسه با کنترل معنی دار نیست. در غلظت های بالاتر ($>100\mu M$) این کاهش شدید تر می گردد و تعیین درصد قطعه قطعه شدن DNA و تولید سوپراکسید در این غلظت ها افزایش را نشان می دهد. این نتایج با مطالعات قبلی مطابقت دارد که cAMP نه تنها در غلظت های بالا آپوپتوزیس را القا می کند بلکه در غلظت های خاص باعث تغییر حالت نکروز به آپوپتوز می گردد(۲۷-۳۱).

نتایج بالا نشان می دهد که الگوی اثرات cAMP روی سلولهای ماکروفاژ مشابه کافئین است(۱۳-۱۴). بنابر این، می توان نتیجه گرفت که در غلظت های کم کافئین ($2/5\text{ mM}$)، سطح cAMP در سلولهای ماکروفاژ افزایش می یابد و احتمالاً از این طریق مانع از آپوپتوزیس میگردد و در غلظتهای متوسط($5-10\text{ mM}$)، سطح cAMP افزایش بیشتری می یابد که آپوپتوزیس را القاء می کند. در غلظت های بالاتر ($>20\text{ mM}$)، سطح cAMP افزایش شدید می یابد و باعث مرگ سلولی از نوع نکروز می شود.

تقدیم و تشکر

کلیه کارهای تحقیقاتی انجام شده در این مقاله در مرکز تحقیقات بیوشیمی - بیوفیزیک دانشگاه تهران انجام گرفته است.



نمودار ۳. اثر غلظت های مختلف cAMP روی درصد قطعه قطعه شدن DNA سلولهای ماکروفاژ بعد از ۲۴ ساعت کشت سلولی.
 $*: p < 0.05$; $**: p < 0.01$; $***: p < 0.001$ در مقایسه با کنترل (بدون cAMP) (n=۴).

بحث و نتیجه گیری

ماکروفاژها نقش مهمی در فرآیند التهاب دارند و کافئین نه تنها مهار کننده آنزیم فسفو دی استراز است بلکه در بعضی از بافتها سنتز پروستاگلاندین ها را تحрیک می کند که هر دو مکانیسم باعث افزایش سطح cAMP می شود(۱۸-۲۰). هدف این مطالعه بررسی اثر cAMP بر سلولهای ماکروفاژ است.

نتایج حاصل نشان می دهد که عمل cAMP وابسته به غلظت است. در غلظت های کم cAMP ($50\mu M$)، درصد بقای سلولی به شدت افزایش می یابد که حداقل آن در غلظت ۳۰ میکرومولار مشاهده می شود. درصد قطعه قطعه شدن DNA در این غلظت ها کاهش می یابد در حالیکه میزان تولید سوپراکسید تغییر

References

- Conigrave AD, Fernando KC, Gu B, Tasevski V, Zhang W, Luttrell BM, Wiley JS. P2YII receptor expression by human lymphocytes: evidence for two cAMP-linked purinoceptors. *Eur J Pharmacol* 2001; 426: 157-63.
- Metz F, Mossalayi MD, Ouaaz F, Debre P. Involvement of cAMP in CD3 T cell receptor complex- and CD2-mediated apoptosis of human thymocytes. *Eur J Immunol* 1995; 25: 1798-801.

3. Nishihara H, Kizaka-Kondoh S, Insel PA, Eckmann L. Inhibition of apoptosis in normal and transformed intestinal epithelial cells by cAMP through induction of inhibitor of apoptosis protein (IAP)-2. *Proc Natl Acad Sci, USA* 2003; 100(15): 8921-6.
4. Rudolph JA, Poccia JL, Cohen MB. Cyclic AMP activation of the extracellular signal-regulated kinases 1 and 2: implications for intestinal cell survival through the transient inhibition of apoptosis. *J Biol Chem* 2004; 279 (15): 14828-34.
5. Weinryb I, Chasin M, Free CA, et al. Effects of therapeutic agents on cyclic AMP metabolism In vitro. *Medical Res New Burns Wick* 1972; 61(10): 1556-67.
6. Stringfield TM, Morimoto BH. Modulation of cyclic AMP levels in a Clonal Neural Cell Line by inhibitors of tyrosine phosphorylation. *Biochem Pharmacol* 1997; 53: 1271-8.
7. Iyengar R. Molecular and functional diversity of mammalian Gs-stimulated adenylyl cyclases. *FASEB J* 1993; 7: 768-75.
8. McCusker RR, Goldberger BA, Cone EJ. Caffeine content of specialty coffees. *J Anal Toxicol* 2003; 27: 520-2.
9. Nehilg A. Are we dependent upon coffee and caffeine? A review on human and animal data. *Neuroscience Biobehavioral Rev* 1999; 23: 563-76.
10. Bara AI, Barley EA. Caffeine for asthma (Cochrane Review). *Cochran Database Syst Rev* 2001; 4: CD001112.
11. Unanue ER, Allen PM. The basis for the immunoregulatory role of macrophages and other accessory cells. *Science* 1987; 236: 551-7.
12. Gordon S. The macrophage. *Bio Essays* 1995; 17: 977-86.
13. Jafari M, Rabbani A. Dose and time dependent effects of caffeine on superoxide release cell survival and DNA fragmentation of alveolar macrophages from rat lung. *Toxicology* 2000; 149: 101-8.
14. Jafari M, Rabbani A. Studies on the mechanism of caffeine action in alveolar macrophages: Caffeine elevates cyclic adenosine monophosphate level and prostaglandin synthesis. *Metabolism* 2004; 53(6): 687-92.
15. McCarron RM, Goroff DK, Luhr JE. Methods for the collection of peritoneal and alveolar macrophages. *Methods in Enzymology* 1984; 108: 274-584.
16. Mayo LA, Curnutte JT. Kinetic microplate assay for superoxide production by neutrophils and other phagocytic cells. *Methods in Enzymology* 1990; 186: 567-75.
17. Burton K. The study of the conditions and mechanisms of the diphenylamine reaction for the calorimetric estimation of deoxyribonucleic acid. *Biochem J* 1956; 62: 615-23.
18. Taylor L, Polger P, Macateer JA. Prostaglandin production by type II alveolar epithelial cells. *Biochim Biophys Acta* 1979; 572: 502-9.
19. Naderali EK, Poyser NL. Effects of caffeine and theophylline on prostaglandin production by guinea-pig endometrium. *Prostaglandin Leukoc Essent Fatty Acids* 1997; 56: 63-7.

20. Docker K. Biologically active products of stimulated liver macrophage (Kupffer cells). *Eur J Biochem* 1990; 192: 245-61.
21. Taurin S, Ryazhsky GG, Maximova NV, Chuchalin AG, Hamet P, Pshezhetsky AV, Orlov SN. Suppression of programmed cell death by intracellular cAMP is not mediated by expression of genes encoding an inhibitor of apoptosis. *Biochemistry (Mosc)* 2002; 67(2): 254-9.
22. Kwon G, Pappan KL, Marshall CA, Schaffer JE, McDaniel ML. cAMP dose-dependently prevents palmitate-induced apoptosis by both protein kinase A- and cAMP-guanine nucleotide exchange factor-dependent pathways in beta-cells. *J Biol Chem* 2004; 279(10): 8938-45.
23. Inouye LK, Wharton W. The relationship between intracellular cyclic AMP concentrations and the in vitro growth of macrophages. *J Leukoc Biol* 1986; 39(6): 657-70.
24. Webster CR, Usechak P, Anwer MS. cAMP inhibits bile acid-induced apoptosis by blocking caspase activation and cytochrome c release. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2002; 283(3): 727-38.
25. Krakstad C, Christensen AE, Doskeland SO. cAMP protects neutrophils against TNF-{alpha}-induced apoptosis by activation of cAMP-dependent protein kinase, independently of exchange protein directly activated by cAMP (Epac). *J Leukoc Biol* 2004; 76(3): 641-7.
26. Berridge M, Tan A, Hilton C. cAMP promotes cell survival and retards apoptosis in a factor-dependent bone marrow-derived cell line. *Exp Hematol* 1993; 21: 269-76.
27. Hale AJ, Smith CA, Sutherland LC. Apoptosis: molecular regulation of cell death. *Eur J Biochem* 1996; 236: 1-26.
28. Grbovic O, Jovic V, Ruzdijic S, Pejanovic V, Rakic L, Kanazir S. 8-Cl-cAMP affects glioma cell-cycle kinetics and selectively induces apoptosis. *Cancer Invest* 2002; 20 (7-8): 972-82.
29. Zwain IH, Amato P. cAMP-induced apoptosis in granulosa cells is associated with up-regulation of P53 and bax and down-regulation of clusterin. *Endocr Res* 2001; 27(1-2): 233-49.
30. Studzinski DM, Benjamins JA. Cyclic AMP differentiation of the oligodendroglial cell line N20.1 switches staurosporine- induced cell death from necrosis to apoptosis. *J Neurosci Res* 2001; 66 (4): 691-7.
31. Chae HJ, Chae SW, An NH, et al. Cyclic-AMP inhibits nitric oxide-induced apoptosis in human osteoblast: the regulation of caspase-3, -6, -9 and the release of cytochrome c in nitric oxide-induced apoptosis by cAMP. *Biol Pharm Bull* 2001; 24(5): 453-60.