● مجلهٔ دانشگاه علوم پزشکی بابل، دوره هشتم، شمارهٔ ۱، زمستان ۱۳۸٤، صفحه ۲۷-۲۲
دریافت: ۸۳/۳/۲٦، پذیرش: ۸٤/٤/۱

تأثیر cAMP در القاء آپوپتوزیس در سلولهای ماکروفاژ ریوی

مهوش جعفری [۱*]، عذرا ربانی [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 طریق cAMP انجام دهند دراین مطالعه، نقش cAMP در القاء آپوپتوزیس در سلولهای ماکروفاژ بررسی شده است.

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

یافته ها: نتایج نشان می دهد که در غلظت های کم (۵۰ μM >) بقای سلولی افزایش می یابد، ولی در غلظتهای بالاتر (۱۰۰ μM>) بطور معنی دار در صد سلولهای زنده کاهش می یابد. همچنین، تولید آنیون سوپر اکسید در غلظت های کمcAMP تغییرمعنی داری نکرده، درحالیکه در غلظت های بالاتر (۱۰۰ μM>) 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 ماکروفاژ مهار می شود، درحالیکه در غلظت های بالاتر cAMP، سلولها بطرف آپوپتوزیس می روند.

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

مجلهٔ دانشگاه علوم پزشکی بابل، دوره هشتم، شمارهٔ ۱، زمستان ۱۳۸۴، صفحه۲۷-۲۲

مقدمه

آدنوزین 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(۴-۱). 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(۷-۵). کافئین یکی از آلکالوئیدهای فعال ااست که در درمان نوزادان مبتلا به آسم و آپنه استفاده می شود و قادر است از طریق مهار آنزیم فسفو دی استراز سطح cAMP را در سلول افزایش دهد(۱۰-۸). ماکروفاژهای ریوی نه تنها جهت نابودی باکتریها و برطرف کردن التهابات نقش موثری دارند، بلکه در سنتز یکسری پروتئین ها و ترکیبات مختلف شرکت می کنند(۱۲-۱۱). مطالعه قبلی ما نشان داد که غلظت های کم کافئین (۲/۵ mM>) از آپوپتوزیس سلولهای ماکروفاژ جلوگیری می کند، درحالیکه غلظت های متوسط کافئین (۲۰mM-۵) آپوپتوزیس را القاء می کند و در غلظت های بالاتر از ۲۰ میلی مولار نکروز در سلولها واقع می شود. همچنین، کافئین قادر است با افزایش سنتز پروستاگلاندین ها و مهار آنزیم فسفو دی استراز باعث

[DOR: 20.1001.1.15614107.1384.8.1.3.3]

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

مواد وروشها

مواد شیمیایی: تریپان بلو، اتیدیوم بروماید، سیتوکروم C، سوپراکسید 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 DMEM (Dulbeccos Modified Eagle Medium) و سرم جنین گوساله (Fetal Calf Serum: FCS) از شرکت Gibco تهیه شد. محیط کشت DMEM با ۳۰ mg/L آسپارژین، ۱۲۰mg/mL پنی سیلین و ۲۰۰mg/mL استرپتومایسین pH=۷/۴ تهیه گردید و سپس با فیلترهای میلی پور ۰/۴۵µM استریل و در $۴^{0}C$ نگهداری شد. کافئین بطور تازه در محیط کشت حل گردید.

حیوان: از موش صحرایی نوعSprague – Dawley با وزن ۲۵۰-۲۰۰ گرم خریداری شده از انستیتو پاستور استفاده شد و در محیط مناسب از نظر نور ودما نگهداری شد.

تهیه سلولهای ماکروفاژ ریوی: از روش لاواژ 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 g۲۰۰۰ برای ۱۰ دقیقه در دمای $۴^{o}C$ سانتریفوژ و سلولها یکبار نیز با محیط کشت حاوی ۱۰درصد FCS شستشو گردید. سپس به آرامی محیط رویی در شرایط استریل خارج و کف پتریها 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 ماکروفاژ در حضور cAMP: سلولهای ماکروفاژ تهیه شده به میزان دو میلیون سلول درهر میلی لیتر محیط کشت DMEM حاوی ۱۰٪ FCS در ظروف کشت استریل وارد گردید. سپس غلظت های مختلفی از cAMP (۲۰۰ µM –۰/۵) به محیط کشت اضافه و در آنکوباتور واجد ۵٪ CO_2، حرارت $۳۷^{o}C$ و رطوبت کامل بمدت ۲۴ ساعت قرارگرفتند. پس از اتمام زمان آنکوباسیون سلولهای چسبیده به کف پتری ها توسط 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 غلظت های مختلف cAMP در g۲۰۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه در ۴^{0C} سانتریفوژ گردید. رسوب حاصله را دو بار با بافر فسفات سالین (PBS) شسته و سانتریفوژ گردید. سپس به همه نمونه ها، سیتوکروم ۱۶۰^{C} میکرو مولار، فربل میرستیک استات $۱۰^{-۶}$ مولار اضافه و فقط به نمونه کنترل ۶۰ واحد آنزیم سوپراکسید دیسموتاز اضافه گردید. نمونه ها به مدت ۱۵ دقیقه در $۳۷^{°C}$ قرار داده شدند و در g۶۰۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه در ۴^{0C} سانتریفوژ گردید و به دقت محلول رویی خارج شد. میزان تولید آنیون سوپر اکسید با استفاده از جذب نمونه ها در طول موج ۵۵۰ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتری Shimadzu U.V ۲۶۰ محاسبه گردید(۱۶).

اندازه گیری قطعه قطعه شدن DNA: سلولهای ماکروفاژ در حضور و عدم حضورغلظت های مختلف cAMP پس از اتمام زمان آنکوباسیون در g۲۰۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه در ^{0C} ۴ سانتریفوژ شد و ۰/۵ میلی لیتر بافر لیز سلولی (۱۰ میلی مولار تریس HCl، یک میلی مولارEDTA pH= ۸ و ۰/۲٪ تریتون ۱۰۰- X) به رسوب اضافه گردید و پس از مخلوط کردن در g۱۵۰۰۰ به مدت ۲۰ دقیقه در ۴^{0C} سانتریفوژ گردید. ۰/۵ میلی لیتر از بافر لیز سلولی به رسوب اضافه شد. سپس به رسوب (P) و محلول رویی (S) ۰/۵ میلی لیتر ۲۵٪TCA اضافه شد و یک شب در دمای ۴^{0C} قرار داده شد و بعد از سانتریفوژ در g۱۵۰۰۰ به مدت ۲۰ دقیقه در ۴^{0C}، روی رسوب لوله های P و S، ۸۰ میکرولیتر TCA ۵٪ اضافه شد و در ۸۳^{0C} به مدت ۲۰ دقیقه آنکوبه شد. سپس به هر نمونه ۱۶۰ میکرولیتر معرف دی فنیل آمین (۱۵۰mg/mL دی فنیل آمین در ۱۰ میلی لیتر اسید اسیتک، ۱۵۰ میکرولیتر اسید سولفوریک، ۵۰ میکرولیتر استالدئید mg/mL ۱۶ اضافه شد و برای ۲۴ ساعت در درجه حرارت اتاق آنکوبه شد و جذب نمونه ها در طول موج ۶۰۰ نانومتر خوانده شد و

[DOR: 20.1001.1.15614107.1384.8.1.3.3]

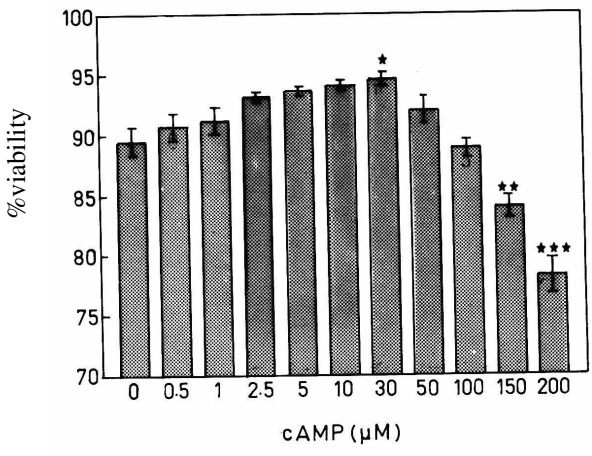
درصد قطعه قطعه شدن DNA محاسبه گردید(۱۷).

%Fragmented DNA= OD (S) / OD (S) + OD (P) × 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±SD بیان شد. نتایج با $p<۰/۰۵$ معنی دار لحاظ گردید.

یافته ها

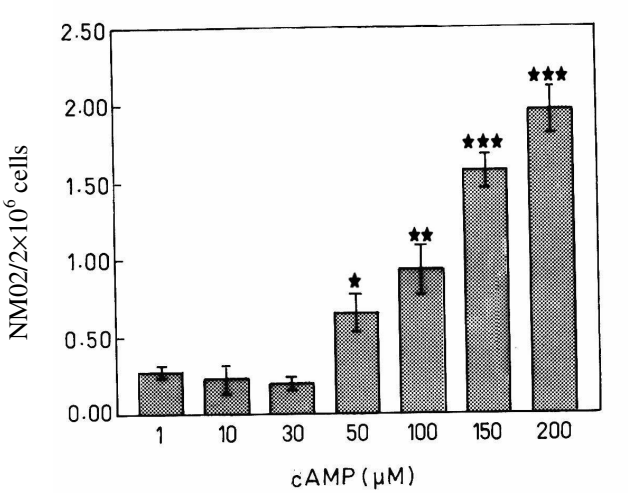
بررسی های سیتولوژیکی بر روی سلولهای ماکروفاژ ریوی نشان داد که ۹۸-۹۶٪ سلولها زنده و سالم بودند و از یکپارچگی سیتوپلاسمی کامل برخوردار و هیچ آسیب غشایی مشاهده نمی شود. شکل ۱درصد بقای سلولی ماکروفاژ ها را بعد از ۲۴ ساعت کشت در حضور و عدم حضور غلظت های مختلف cAMP نشان می دهد. در غلظتهای کم cAMP (<۵۰μM) درصد سلولهای زنده افزایش می یابد و در غلظت ۳۰میکرومولار حداکثر درصد بقای سلولی (۹۶٪) مشاهده میشود در مقایسه با کنترل که ۸۶٪ می باشد. بین ۳۰ تا ۵۰ میکرو مولار cAMP درصد بقا ی سلولی هنور بالاتر از کنترل است و در غلظت های بالاترcAMP (>۱۰۰μM) سلولها به شدت به طرف مرگ پیش می روند، بطوریکه در ۲۰۰ میکرو مولارcAMP درصد بقای سلولی به ۷۸/۹٪ می رسد.



نمودار ۱. اثر غلظت های مختلف cAMP بر روی درصد بقای سلولهای ماکروفاژ بعد از ۲۴ ساعت کشت سلولی.

$^{*}p<۰/۰۵$؛ $^{**}p<۰/۰۱$؛ $^{***}p<۰/۰۰۱$ در مقایسه با کنترل(بدون cAMP) (n= ۴).

شکل ۲ اثرcAMP روی آزاد شدن آنیون سوپراکسید از سلولهای ماکروفاژ بعد از ۲۴ ساعت آنکوباسیون را نشان می دهد. کاهش تولید سوپراکسید در غلظت های کم cAMP (<۵۰μM) معنی دار نیست. اما در غلظت های بالاتر cAMP (≥۵۰ μM) تولید سوپراکسید افزایش می یابد که اثر ماکزیمم آن در ۲۰۰ میکرو مولار مشاهده می گردد.



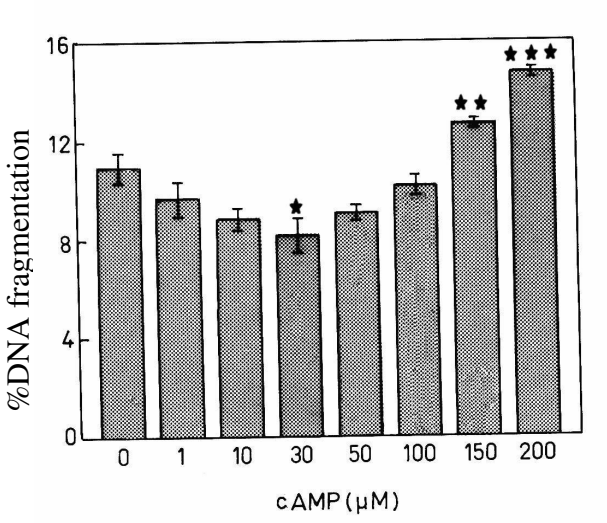
نمودار شکل۲.اثر غلظتهای مختلف cAMP روی آزاد شدن آنیون سوپراکسید از سلولهای ماکروفاژ بعداز۲۴ساعت کشت سلولی.

$^{*}p<۰/۰۵$؛ $^{**}p<۰/۰۱$؛ $^{***}p<۰/۰۰۱$ درمقایسه باکنترل (بدونcAMP)(n=۴).

تعیین درصد قطعه قطعه شدن DNA سلولهای ماکروفاژ با غلظت های مختلف cAMP بعد از ۲۴ ساعت انکوباسیون در شکل ۳ نشان می دهد که درصد قطعه قطعه شدن DNA با افزایش غلظت cAMP در مقایسه با کنترل تا غلظت کمتر از ۵۰ میکرو مولارکاهش می یابد که فقط ۸درصدDNA قطعه قطعه شده است (کنترل ۱۱٪).

اما بین ۵۰ تا ۱۰۰ میکرو مولار cAMP افزایش میزان قطعه قطعه شدن DNA در مقایسه با کنترل معنی دار نیست و در غلظت های بالاتر cAMP (>۱۰۰μM)، درصد قطعه قطعه شدن DNA افزایش می یابد بطوریکه در ۲۰۰ میکرو مولار ۱۵ درصد DNA قطعه قطعه شده است.

[DOR: 20.1001.1.15614107.1384.8.1.3.3]



نمودار۳.اثر غلظت های مختلف cAMP روی درصد قطعه قطعه شدن DNA سلولهای ماکروفاژ بعد از ۲۴ ساعت کشت سلولی. $^{*}p<۰/۰۵$؛ $^{**}p<۰/۰۱$؛ $^{***}p<۰/۰۰۱$ 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 تحریک می کند که هر دو مکانیسم باعث افزایش سطح cAMP می شود(۲۰-۱۸). 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 (۵۰μM >)، درصد بقای سلولی به شدت افزایش می یابد که حداکثر آن در غلظت ۳۰ میکرو مولار مشاهده می شود. درصد قطعه قطعه شدن DNA در این غلظت ها کاهش می یابد در حالیکه میزان تولید سوپراکسید تغییر 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(۲۶-۲۱). این نتایج پیشنهاد می کند که احتمالا در غلظت های کم cAMP آپوپتوزیس در سلولهای ماکروفاژ مهار می شود. وقتی سلولهای ماکروفاژ در حضور۱۰۰-۳۰ 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 (۱۰۰μM>) 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 القاء می کند بلکه در غلظت های خاص باعث تغییر حالت نکروز به آپوپتوزیس می گردد(۳۱-۲۷).

نتایج بالا نشان می دهد که الگوی اثرات cAMP روی سلولهای ماکروفاژ مشابه کافئین است(۱۴-۱۳). بنابر این، می توان نتیجه گرفت که در غلظت های کم کافئین (۲/۵ mM>)، سطح cAMP در سلولهای ماکروفاژ افزایش می یابد و احتمالا از این طریق مانع ازآپوپتوزیس میگردد و در غلظتهای متوسط(۱۰mM-۵)، سطح cAMP افزایش بیشتری می یابد که آپوپتوزیس را القاء می کند. در غلظت های بالاتر (۲۰mM>)، سطح cAMP افزایش شدید می یابد و باعث مرگ سلولی از نوع نکروز می شود.

تقدیر و تشکر

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

****

References

1. 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.

2. 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.

[DOR: 20.1001.1.15614107.1384.8.1.3.3]

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 Biophy Acta 1979; 572: 502-9.

19. Naderali EK, Poyser NL. Effects of caffeine and theophylline on prostaglandin production by guniea-pig endometrium. Prostaglandin Leukoc Essent Fatty Acids 1997; 56: 63-7.

[DOR: 20.1001.1.15614107.1384.8.1.3.3]

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.

* آدرس نویسنده مسئول: تهران، دانشگاه علوم پزشکی بقیه اله، گروه بیوشیمی، تلفن: ۳- ۲۲۸۹۹۴۱-۰۲۱.

jafari@bmsu.ac.ir

[DOR: 20.1001.1.15614107.1384.8.1.3.3]