● مجلهٔ دانشگاه علوم پزشکی کرمان، دورهٔ‌سیزدهم، شمارهٔ ۴، ص ۲۰۲-۱۹۵، ۱۳۸۵

مقالهٔ پژوهشی

بررسی اثر استرس بر بیان ژن BEST-5 در سلول‌های کبدی کشت داده شده موش صحرایی و کلونینگ این ژن

دکتر غلامحسین حسن‌شاهی [*۱]، دکتر عبدالله جعفرزاده [۲]، دکتر حمید حکیمی [۳]، دکتر محسن رضاییان [۴]، دکتر رضا وزیری نژاد [۴]، سید ضیاء طباطبایی [۵]، دکتر عباس اسماعیلی [۶] و پروفسور الن‌دیکسون [۷]

خلاصه

مقدمه: کبد نقش مهمی در تنظیم و کنترل واکنش‌های متابولیسمی دارد و در مطالعات متابولیک از سلول‌های کبدی استفاده می‌شود. گزارش شده است که جداسازی و کشت سلول‌های کبدی بر روی بیان ژن‌ها در این سلول‌ها تأثیر گذاشته و منجر به خاموش شدن ژن‌های طبیعی و فعال شدن ژن‌های خاموش از قبیل ژن‌های مرتبط با استرس می‌شود. هدف این مطالعه تأثیر استرس جداسازی و کشت سلول‌های کبد موش بر بیان ژن BEST-5 در این سلول‌ها می‌باشد.

روش: در این مطالعه کبد موش‌های نر نژاد Sprague-Dawley جدا و سلول‌های کبد در شرایط استریل کشت داده شدند. سپس RNA سلول‌ها از سلول‌های محیط کشت سه ساعته استخراج و cDNA با روش الگوبرداری معکوس تولید شد. cDNA تولیدی در داخل وکتور پلاسمیدی PCR®2.1 کلون گردید و متعاقب آن پلاسمید به داخل سلول‌های TOPO10 OneShot® منتقل و سلول‌ها روی محیط اگار LB محتوی X-گالاکتوز و امپی‌سیلین در دمای ۳۷ درجه در طول شب کشت داده شدند. سپس برای تأیید وجود ژن در داخل سلول‌ها از روش مینی پریپاریشن (mini preparation) استفاده و پس از هضم انزیماتیک قطعه ژنی کلون شده تعیین توالی گردید. در مطالعات ابتدایی با انجام RTPCR وجود ژن BEST-5 در سلول‌های کبدی به اثبات رسید و برای تأیید آن ژن BEST-5 نیز با روش Northern blotting بررسی شد.

یافته‌ها: این مطالعه نشان می‌دهد که جداسازی و کشت سلول‌های کبد موش باعث بیان ژن BEST-5 در این سلول‌ها می‌شود. میزان بیان ژن در لحظات اولیه جداسازی بسیار کم بوده و با افزایش زمان افزایش یافت و ۳ ساعت بعد از کشت به حداکثر رسید. بررسی و مقایسه داده ها نشان داد که بین بیان ژن در ساعت سوم و ساعات صفر، ۲۴، ۳۵ و ۴۸ کشت هپاتوسیت‌ها تفاوت معنی‌داری وجود دارد.

نتیجه‌گیری: این نتایج برای اولین بار نشان می‌دهند که استرس جداسازی و کشت سلول‌های کبدی باعث بروز ژن BEST-5 در این سلول‌ها شده و میزان بروز ژن نیز وابسته به زمان می‌باشد.

واژه‌های کلیدی : سلول‌های کبد، استرس، ژن BEST-5، بیان ژن، RT-PCR، Northern Blotting

۱- استادیار هماتولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی - درمانی رفسنجان ۲- دانشیار ایمونولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی - درمانی رفسنجان, ۳- استادیار میکروبیولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی - درمانی رفسنجان, ۴- استادیار اپیدمیولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی - درمانی رفسنجان, ۵- مربی مدیریت خدمات بهداشتی و درمانی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی - درمانی رفسنجان ۶- استادیار بهداشت، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی - درمانی رفسنجان ۷- پروفسور بیوشیمی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه منچستر

* **نویسنده مسؤول:** دانشکده پزشکی, دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان ● **آدرس پست الکترونیک :** ghassanshahi@gmail.com

دریافت مقاله: ۱۳۸۵/۴/۱۰ **دریافت مقاله اصلاح شده :** ۱۳۸۵/۷/۲۴ **پذیرش مقاله:** ۱۳۸۵/۹/۱

مقدمه

کبد به دلیل تولید آنزیم‌های مخصوص سم‌زدایی (ایزوفرم‌های سیتوکروم P450)، یکی از مهم‌ترین ارگان‌ها در مطالعات پزشکی است (۱،۴،۱۱). امروزه به طور گسترده‌ای از سلول‌های کبدی در آزمایشگاه‌های پیشرفته و در مطالعات متابولیک و کنترل متابولیسم داروها و سموم استفاده می‌شود (۱). ولی مشکل عمده در کشت سلول‌های کبدی این است که این سلول‌ها پس از جداسازی ژن‌های مخصوص کبد مانند آلبومین و سیتوکروم P450 در این سلول‌ها خاموش می‌شوند (۵) و از طرفی دیگر یک‌سری ژن‌های وابسته به استرس در آنها فعال شده و منجر به تولید پروتئین‌های وابسته به استرس در آنها می‌شود (۱،۶). به نظر می‌رسد که ارتباط مؤثری بین الگوی بیان ژن‌ها و ورود سلول‌های کبدی به مرحله غیر متمایز باشد که از آن جمله می‌توان به بیان سریع ژن‌ها اشاره نمود (۸) . به علاوه گروه‌های تحقیقاتی متعددی شامل گروه پژوهشگران حاضر بیان ژن کموکین‌هایی نظیر IP-10/Mob-1 و Gro/KC را متعاقب جداسازی و در ساعات اولیه کشت سلول‌های کبدی و سلول‌های هپاتوما نشان داده‌اند (۷،۱۰). یافته‌های زیادی در باره این ژن و به ویژه عملکرد آن وجود ندارد (۹) جز این که BEST-5(Bone Expressed Sequenced Tag -5) برای اولین بار از سلول‌های استئوبلاست که نوعی از سلول‌های بافت مزانشیمی استخوان می‌باشند با روش PCR استخراج و شناسایی گردیده است. Grewal و همکاران علی‌رغم کوششی که برای شناسایی این ژن در کبد و سلول‌های کبدی موش صحرایی به عمل آوردند، قاصر از شناسایی آن در سلول‌های کبدی بوده‌اند. بنابراین بر اساس مطالعات اولیه‌ای که در مورد ژن جدید BEST-5 مبنی بر بیان ژن در شرایط استرس مکانیکی بر استخوان‌ها توسط Grewalو همکاران انجام شده بوده این گروه بر آن شد تا میزان ژن BEST-5 را در شرایط استرس‌زا جداسازی و کشت سلول‌های کبدی را بررسی نماید (۴). در این مطالعه حاضر برای اولین بار ژن جدید BEST-5 از سلول‌های کبدی که در محیط کشت اولیه مخصوص سلول‌های کبدی کشت شده بودند، کلون گردیده و با روش‌های RT-PCR و Northern Blotting میزان بیان ژن بررسی گردید.

روش بررسی

الف) جداسازی هپاتوسیت‌ها

در این تحقیق سلول‌های کبدی مورد مطالعه از کبد موش‌های صحرایی نر از نژاد Sprague – Dawley (واحد BSU دانشگاه منچستر) با وزن تقریبی ۲۰۰g جداسازی شدند. با استفاده از بافر Krebs-Henseleit (محتوی ۲۵ میلی‌مولار کلروسدیم، ۵ میلی‌مولار کلروپتاسیم، یک میلی‌مولار فسفات هیدروژن-پتاسیم، ۱ میلی‌مولار سولفات منیزیم، ۲۵ میلی‌مولار کربنات هیدروژن سدیم و ۲۵ میلی‌مولار کلرور سدیم) در شرایط استریل از کبد حیوان جدا شدند (۹). پس از ۱۰ –۸ دقیقه، کبد برداشته شده و در شرایطی کاملاً استریل به همراه بافرKrebs–Henseleit خرد شده و از میان یک قطعه گاز استریل به داخل یک بشر فیلتر شد. سلول‌ها برای سه بار با محلول فوق شسته شد، به طوری که در هر شستشو ته لوله با محلول رقیق گردیده دوباره سانتریفوژ گردید. تودهٔ نهایی سلول‌های کبدی به داخل محلول محرک (محتوی محیط کشت Waymouth MD 1721 ساخت شرکت اینوبیروژن انگلستان) منتقل و میزان درصد زنده بودن سلول‌ها با استفاده از تریپان‌بلو مشخص شد. آن دسته از سلول‌های کبدی مورد استفاده قرار گرفتند که میزان در صد سلول‌های زنده آنها بیش از ۸۵٪ و اکثراً در محدوده ۹۵–۹۰٪ بود. جمعیت هپاتوسیت‌ها در زیر میکروسکوپ نوری کنترل گردیده و خلوص سلول‌های کبدی در بهترین حالت بوده و حضور سلول‌های اندوتلیال در محیط کشت از ۱٪ تجاوز نمی‌کرد. در هر پلیت (۳ سانتی‌متری برای RNA و ۶ سانتی‌متری برای پروتئین) که از کلاژن نوع – I پوشیده شده بود تعداد $۱۰^{۶}\times$ ۵–۲ سلول در هر میلی‌لیتر محلول القاء کاشته شد و پس از آن به انکوباتور (Co_2٪۵)، (O_2 ۹۵٪) در دمای $۳۷^{\circ}C$ منتقل گردید. پس از گذشت ۳ ساعت از کشت، محیط کشت حاوی محلول محرک یا محیط کشت نگهدارنده (محیط کشت به اضافه BSA و سدیم اولئات ۰/۰۰۰۵W/V٪) تعویض گردید و نهایتاً سلول‌ها با روشی که در زیرنویس تصاویر آمده است تیمار شدند.

ب) استخراج RNA

برای استخراج RNA به ازای هر پلیت ۳ سانتی‌متری، مقدار یک میلی‌لیتر تریزول ™ (Gibco BRL) Trizol اضافه گردیده و سپس سلول‌ها جمع‌آوری و به داخل لوله سانتریفوژ منتقل گردیدند و در دمای $-۸۰^{\circ}C$ تا زمان آزمایش نگهداری و یا مستقیماً برای استخراج RNA مصرف شدند. برای استخراج ابتدا RNA با افزودن کلروفرم رسوب داده شده و در مرحله بعد به وسیله کیت MessagClean تمیز شده و از آلودگی با DNA پاک گردید.

ج) تولید cDNA (به وسیله واکنش RT)

برای ساخت DNA مکمل (cDNA) واکنش الگوبرداری معکوس (Reverse Transcription) به قرار زیر انجام شد.

مقدار ۴ میکرولیتر از بافر واکنش (۱۲۵ میلی‌مولار تریس – کلرید هیدروژن با pH=۸/۳ ، ۱۸۸ میلی‌مولار کلرور پتاسیم (KCl) ، ۷/۶ میلی‌مولار کلرور منیزیم (Mg Cl2) و ۲۵ میلی‌مولار دی‌اتیل‌تری‌تیول (DTT)، ۱ میکرولیتر از هر نوع dNTP (dTTP, dGTP, dCTP, dATP)، ۴ میکرولیتر اولیگو – دی تی، ۱ میکرولیتر RNA استخراج شده ،۴ میکرولیتر آب محتوی DEPC و ۱/۵ میکرولیتر آنزیم مخصوص واکنش RT (M-MLV) درون یک لوله میکروسانتریفوژ با هم مخلوط و به مدت ۶۰ دقیقه در بن‌ماری ۳۷°C انکوبه شد. پس از انقضای مدت انکوباسیون، cDNA تولید شده تا زمان انجام PCR و مواد مورد نیاز بعدی در ۲۰°C- نگهداری شد. برای انجام PCR بر روی cDNA تولیدی محلول واکنش با افزودن مواد ذیل در یک لوله میکروسانتریفوژ روی یخ انجام شد.

– ۱۰ میکرولیتر بافر آنزیم تگ‌پلیمراز (Tag Polymerase)، ۳ میکرولیتر کلرورمنیزیم، ۲ میکرولیتر از هر dNTP, dCTP, dATP (dTTP dGTP)، ۲ میکرولیتر از هر پرایمر طراحی شده برای کموکین‌ها و ۴ میکرولیتر از cDNA تولیدی مخلوط شده و مخلوط فوق پس از رسانیدن حجم آن به ۹۹ میکرولیتر با آب مقطر استریل با ۴۰ تا ۶۰ میکرولیتر روغن معدنی پوشیده شده و در ترموسایکلر PCR انجام شد.

د) کلون کردن ژن BEST-5

برای کلون کردن این ژن حدود ۵۰mg از قطعه DNA به دست آمده در فرآیند RT-PCR به داخل وکتور به وسیله انکوباسیون با آنزیم T_4 لیگاز وارد شد. برای انجام این واکنش علاوه بر آنزیم از بافر فعالیت لیگاز (حاوی ۳۰ میلی‌مولار Tris-HCL با pH=۷/۸ محتوی ۱۰ میلی‌مولار کلرورمنیزیم (MgCL2)، ۱۰ میلی‌مولار دی‌اتیل‌تری‌تیول (DTT) و یک میلی‌مولار ATP) اضافه و نهایتاً حجم به ۱۰ میکرولیتر رسیده و به مدت ۱۶ ساعت در ۴°C انکوبه گردید. وکتورها با روش ترانسفورماسیون به باکتری اشرشیا کولی آبی سوش XL-1 منتقل و به محیط کشت LB محتوی ۵۰µg/ml آمپی‌سیلین منتقل و در طول شب در ۳۷°C کشت شد. صبح روز بعد کلونی‌های رشد کرده در سطح پلیت انتخاب و به محیط کشت مایع LB محتوی ۵۰µg/ml آمپی‌سیلین منتقل و دوباره در طول شب در ۳۷°C در انکوباتور متحرک با سرعت بالا کشت داده شد. از محیط کشت نهایی در روز بعد به وسیله کیت Midi-Preparation (شرکت کیاژن) پلاسمید محتوی قطعه cDNA ژن BEST-5 جداسازی گردیده و در مرحله بعد با کمک آنزیم‌های محدود کننده و با انکوباسیون یک ساعته در ۳۷°C قطعه جدا شد. قسمت بریده شده cDNA ژن نهایتاً روی ژل ۱٪ آگارز به مدت یک ساعت با ولتاژ ۷۰ ولت الکتروفورز گردید. در مرحله نهائی قطعه cDNA از ژن بریده و به وسیله کیت Gel Extration (شرکت کیاژن) از آگار پالایش و خالص گردیده و سکانس شد (تصویر ۲).

ر) بررسی ژن توسط نورترن بلاتینگ

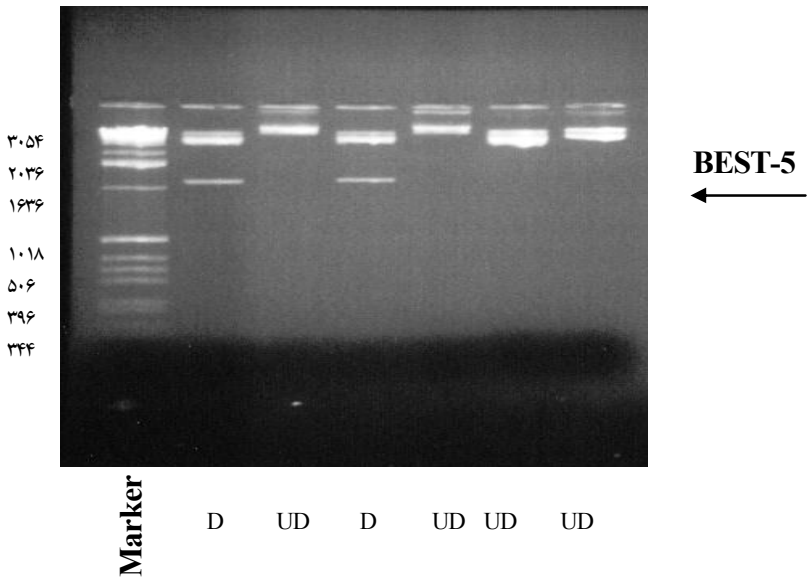
مقدار ۲۰ میکروگرم RNA بر روی ژن محتوی ۱٪ آگارز و ۱۷٪ فرمالید الکتروفورز گردیده و به غشاء نیتروسلولز Hybond-N^{tm} منتقل گردید. قسمتی از RNA ژن BEST-5 به طور تصادفی با ۵۰ میکروکیوری از dATP [α-^{32}P] نشاندار گردید و برای استانداردکردن و حصول اطمینان از هم اندازه بودن مقدار RNA موجود در حفرات ribosomal S ۱۸ نیز با ۲۰ میکروکیوری α–^{32}P dATP نشاندار و مطالعه گردید. پس از الکتروفورز غشاءهای نیتروسلولزی محتوی RNA در محلول هیبرید شامل ۵۰٪(V/V) فرمالید در SSPE در دنهارد ۰/۱mg/ml از DNA خنثی شده اسپرم ماهی سالمون و ۱/۵٪ SDS در دمای ۴۲°C پری هیبرید شدند. غشاءهای پس از پری هیپرید شدن با cDNA نشاندار، محلول هیبریداسیون در طول شب انکوبه گردید و صبح روز بعد دو بار (هربار ۱۵ دقیقه و در درمای اتاق) با ۰/۱٪SDS و ۲× SSC شسته شده و برای شستن نهایی در محلولی محتوی۰/۱٪SDS و ۰/۱×SSC شسته شده و نهایتاً با کاست‌های تشدید کننده رادیوگرافی در ۷۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شده و با روش فسفوایمجینک آنالیز گردید.

ز) آنالیز آماری:

کلیه داده‌های این تحقیق بر اساس mean±SEM بیان گردید و مقایسه بین گروه‌های آماری (ساعت‌های مختلف بیان ژن) با Paired Student test انجام شد و اختلاف زمانی با P<۰/۰۵ معنی‌دار تلقی گردید.

نتایج

در این مطالعه برای بررسی بیان BEST-5 در سطح RNA در طول زمان ابتدا RNA از سلول‌های کبدی که به مدت سه ساعت کشت داده شده بوده‌اند، استخراج گردیده و برای تولید محصولات PCR مطابق با ژن BEST-5 بکار رفت. cDNA تولید شده و به داخل پلاسمید PCR®2.1 کلون شد (تصویر ۱). پس از انتقال پلاسمید به داخل سلول‌های TOPO10 OneShot® و کشت و



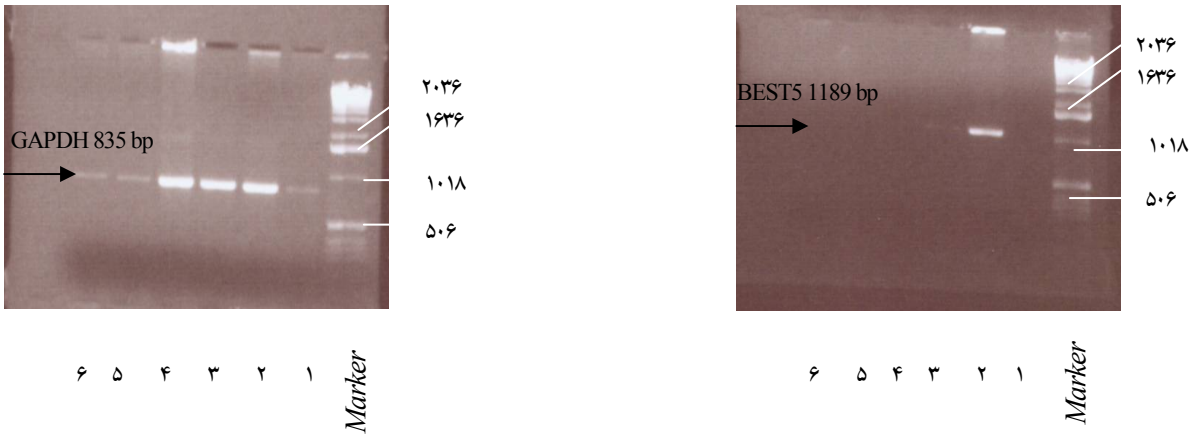
تصویر ۱ : *هضم با آنزیم‌های محدود کننده پلاسمید pCR® 2.1 حاوی cDNA طراحی شده با پرایمرهای BEST-5 توسط PCR*

این تصویر هضم (به وسیله آنزیم ECORI) پلاسمید وکتور pCR® 2.1 که حاوی DNA ای که با پرایمرهای طراحی شده‌ی ژن BEST-5 بوده و به وسیله PCR تولید شده است را نشان می‌دهد. برای انجام این کار از کیت اینویتروژن TAcloning استفاده شده و محصول PCR به داخل وکتور پلاسمیدی منتقل گردیده است و سپس پلاسمید به سلول‌های One-Shot® (TOPO10) منتقل و به وسیله Mini-Preparation ارزیابی شده‌اند. قطعه DNA تولیدی روی ژل الکتروفورز گردیده و سپس تصویربرداری شده است. D نشان دهندهٔ قسمت هضم شده و UD نشان دهنده قسمت دست نخورده و بدون افزایش آنزیم یا هضم نشده است. شماره‌های سمت چپ نشان دهنده اندازه باندهای مارکر مولکولی استاندارد است.

atgctagtgcctactgcgct[1*]tgctcggctgctgagcctgttccagcaacagctgggttccctctg
gagtggcctggccatgctgttctgctggctgagaatagcattggggtggccagatcctggaaa
gggacagccacgggtccggggtgagcccaaggagactcaggagacccacgaagatccag
gcagtgctcagcccacaacccccgttagtgtcaactaccacttcacgcgtcagtcaactacaa
atgtggcttctgcttccacacggccaagacatccttcgtgctgcccctggaggaggccaagcg
aggactgcttctgctcaaacaggctggtatggagaagatcaacttttcagaggagaacccttcc
tacaggacaggggtgaatacttgggcaagctcgtgagattctgcaaggaggagctagccctg
ccctctgtgagcatagtgagcaatggcagccttatccgagagagatggttcaaggactatgga
gactatttggacattcttgctatctcctgtgacagctttgatgagcaggttaatgtgctcattggtcg
tggccaanggaaaaagaaccatgtggaaaaccttcaaaagctgcggaagtggtgcanggat
tacaaggnggctttcaagancaattncgtcattaatcgcttcaacgtggaccaagatntgaatg
agcacatcaaggngctgancctgtccgttggaaggtttnncaatgccttctgat[2*]tgagggt
gaaaaaccaggagaagatgccctgagggaagcagaaagatttcttataagcaatgaagaatt
tgaagcattcttacagcgtcacaaagatgtgtcctgcttggtgcctgaatctaaccagaagatg
aaagactcctaccttatcctggatgaatatatggctttttgaactgtaccggtggccgggaagg
acccttccaggtccatcctggatgttggcgtggaggaagcgatcaaattcagtgggtttgatg
agaagagtttctgaagcgcgggggaagtatgtatggagtaaggctgacctgaagtctaga
ctggtgaggtgagatggacggagactctaaccagctacgaggagtccacgagcagccgctcgc
caccacgcacatctggctgtctac tggactcctcgtagctggtt

تصویر ۲ : *ترادف ژن BEST-5*

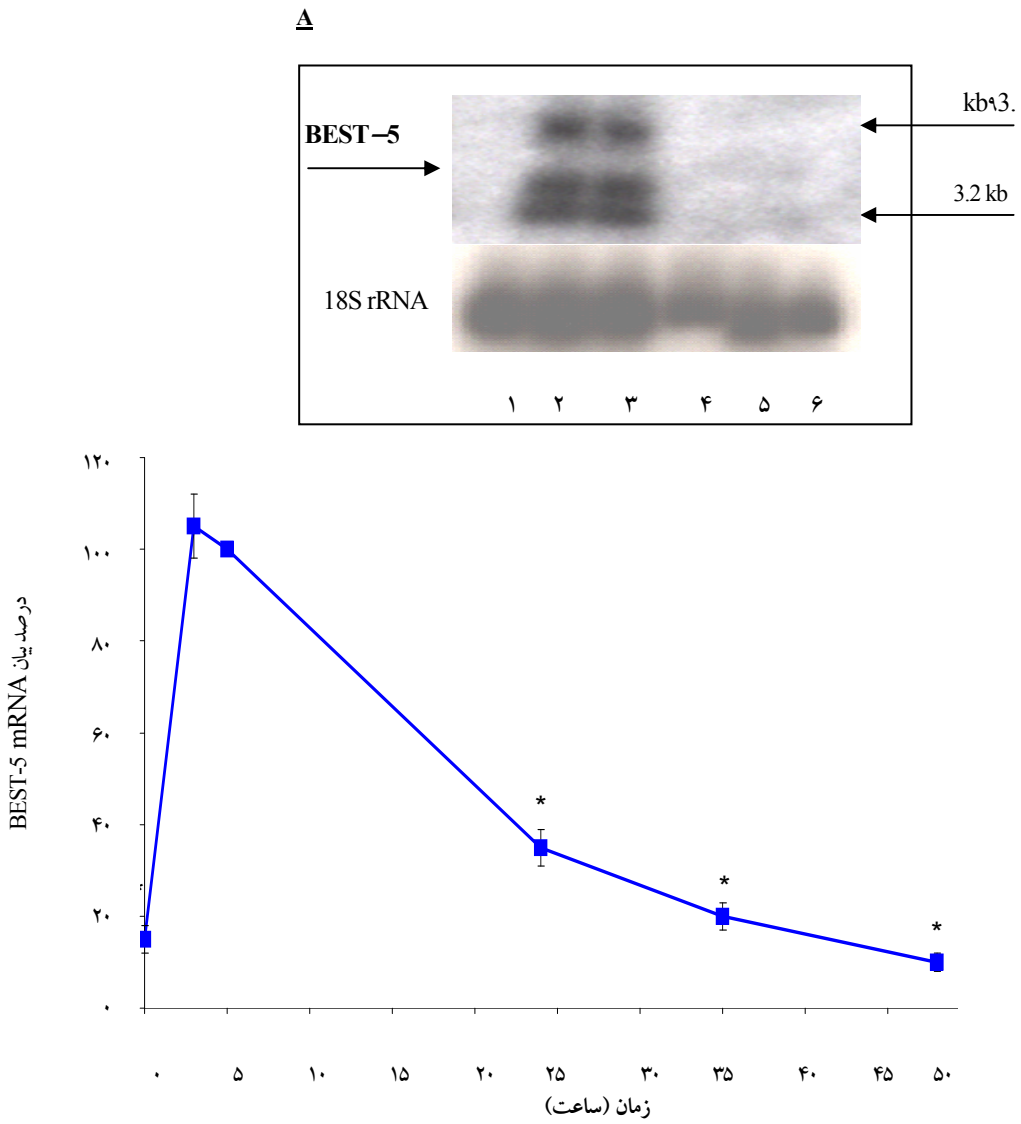
این تصویر سکانس DNA تولیدی در این تحقیق است که با (Nucleotide Database) مقایسه و میزان مشابهت آن با اطلاعات مربوط به ژن BEST-5 در سایت BLAST مقایسه گردیده است. سکانس پرایمرهای به کار برده شده در داخل مستطیل‌ها است به طوری که مستطیل بالایی حاوی سکانس پرایمر جلوبر (Forward) و مستطیل انتهای حاوی سکانس پرایمر برگردان (Reverse) می‌باشند. شماره‌ها نشان‌دهنده نواحی سکانس شده می‌باشند به طوری که ناحیه ۱ نشان‌دهنده مشابهت بین این سکانس و اطاعات ژن در BLAST با تعداد ۷۱۶ باز مشابه از کل ۷۳۰ باز و به میزان ۹۸٪ است در حالی که ناحیه ۲ نشان‌دهنده ناحیه دوم بوده و نشان‌دهنده میزان مشابهت بین DNA کلون شده با اطلاعات ژن در BLAST با تعداد ۳۴۸ باز مشابه از کل ۳۵۰ باز و به میزان ۹۹٪ است. بازهایی که زیر آنها خط کشیده شده است نشان‌دهندهٔ تفاوت از ژن مبدأ در بانک ژن می‌باشند.



تصویر ۳: *آنالیز بیان BEST-5 mRNA در سلول‌های کبدی کشت داده شده در محیط معمولی کشت سلول با روش PCR*

هپاتوسیت‌های مورد مطالعه از کبد موش صحرایی نژاد Sprague Dawley جداسازی و بین $۱۰^۶$×۵-۲ سلول درون پلیت هایی که مخصوص کشت بافت بوده و از قبل با ماتریکس کلاژن نوع I پوشیده شده بودند کشت داده شده است. ابتدا سلول‌های جدا شده در محیط کشت اولیه به تعلیق در آمده و سپس به پلیت‌های کشت اضافه گردیده اند. سلول ها به مدت ۳ ساعت در انکوباتور با شرایط ۵٪ Co_2 و ۹۵٪ O_2 در دمای ۳۷°c کشت شده اند. پس از سه ساعت انکوباسیون محیط کشت نگهدارنده محیط کشت اولیه جایگزین گردیده است و فرآیند کشت تا ۴۸ ساعت ادامه پیدا کرده است در ساعات مورد اشاره معین سلول‌های هپاتوسیت د رتریزول جمع آوری و برای استخراج RNA به ۸۰°c- منتقل گردیده‌اند. برای انجام آزمایش RNA سلول‌ها استخراج و خالص گردیده است و با ۱ میکروگرم از هر نمونه RNA آنالیز RT-PCR انجام شده است و محصول نهایی فرآیند روی ژن آگارز ۱٪ الکتروفورز گردیده. PCR به وسیله DNA کلون شده پرایمرهای BEST-5 و GAPDH انجام شده است. اندازه محصول PCR برای BEST-5 تعداد ۱۱۸۹ باز و برای GAPDH ۸۳۵ باز است. زمان‌های برداشت نمونه برای آنالیز عبارتند از: شماره ۱ = زمان صفر، شماره ۲ = کشت سه ساعته، شماره ۳ = کشت ۵ ساعته، شماره ۴ = کشت ۲۴ ساعته، شماره ۵ = کشت ۳۵ ساعته و شماره ۶ = کشت ۴۸ ساعته.

تکثیر پلاسمید در این سلول‌ها و پس از انتخاب کلونی‌های حاوی ژن BEST-5 قطعه ژن القاء شده با انجام Mini Preparation و هضم به وسیله آنزیم ECORI با موفقیت جداسازی و آماده گردید (تصویر ۱). باندهای موجود BEST-5 cDNA را نشان می‌دهند که از نظر وزن مولکول با اندازه مولکولی این ژن تطابق کامل دارند ولی به دلیل حساسیتی که در انجام تکنیک‌های بعدی یعنی Northern Blotting وجود دارد. این قطعه پس از Midi Preparation با موفقیت تعیین ترادف گردید (تصویر ۲). برای نشان دادن دامنه تغییرات بیان ژن BEST-5 در سلول‌های اولیه پس از جداسازی و کشت از روش RT- PCR و Northern Blotting استفاده شد. برای مقایسه و آنالیز میزان بیان ژن در ساعات معین، از زمان جداسازی تا انتقال به محیط کشت و کشت دادن سلول‌ها با هم مقایسه گردید. ژن BEST-5 از سلول‌های کبدی سه ساعته پس از طراحی پرایمرهای BEST-5 کلون و برای حصول اطمینان تعیین ترادف گردید (تصویر ۲) که پس از بررسی همولوژی و مقایسه با اطلاعات موجود در سایت BLAST به میزان ۹۹٪ با ژن BEST-5 هم خوانی داشت. BEST-5 cDNA به عنوان یک پروب برای انجام Northern Blotting مورد استفاده قرار گرفت. با این روش میزان بیان ژن BEST-5 در سطح RNA مطالعه گردید. میزان بیان BEST-5 mRNA در لحظات اولیه (ساعت صفر) بسیار کم و قابل انکار است در حالی میزان بیان mRNA این ژن متعاقب با جداسازی هپاتوسیت‌ها و نگهداری سه ساعته آنها در محیط کشت به شدت افزایش و به ماکزیمم حد خود رسید. آنالیز آماری انجام شده با t test نشان داد که اختلاف معنی‌داری بین بیان ژن BEST-5 در ساعت سوم و سایر زمان‌های بررسی شده وجود دارد ($P<۰/۰۱$).



تصویر ٤: *آنالیز بیان mRNA BEST-5 در کشت معمول هپاتوسیت ها در زمان‌های متعدد*

هپاتوسیت‌های مورد مطالعه از کبد موش صحرایی نژاد Sprague Dawley جداسازی و بین $۱۰^۶×۵$-۲ سلول درون پلیت‌هایی که مخصوص کشت بافت بوده و از قبل با ماتریکس کلاژن نوع I پوشیده شده بودند کشت داده شده است. ابتدا سلول‌های جدا شده در محیط کشت اولیه به تعلیق در آمده و سپس به پلیت‌های کشت اضافه گردیده‌اند. سلول‌ها به مدت ۳ ساعت در انکوباتور با شرایط (٪۵) Co_2 و (٪۹۵) O_2 در دمای ۳۷°c کشت شده‌اند. پس از سه ساعت انکوباسیون محیط کشت نگهدارنده جایگزین محیط کشت اولیه گردیده است و فرآیند کشت تا ۴۸ ساعت ادامه پیدا کرده است. در ساعات مورد اشاره معین سلول‌های هپاتوسیت در تریزول جمع‌آوری و برای استخراج RNA به ۸۰°c- منتقل گردیده‌اند. برای انجام آزمایش RNA سلول‌ها استخراج و خالص گردیده است. RNA استخراج شده پس از خالص‌سازی روی ژل آگارز ۱٪ جداسازی و سپس به غشاء نایلونی منتقل گردیده است. یک پروب cDNA از ژن BEST-5 که با رادیواکتیو نشان‌دار شده (مواد و روش‌ها) به غشاء نایلون اضافه و پس از مدت لازم غشاء شسته و رادیواکتیویته (با در معرض فیلم رادیوگرافی قرار دادن غشاء نایلون) اندازه گیری شده است. A) تصویر A نشان دهنده یک نمونه نورترن بلات (Northern Blot) است که با BEST-5 cDNA $[\alpha\text{-}^{32}P]$ dCTP نشان‌دار شده است. 18S rRNA نیز برای استاندارد کردن مقدار یکسان RNA در چاهک‌های ژل استفاده شده است. ۱ = زمان صفر، ۲ = RNA سه ساعته، ۳= RNA ۲۴ ساعته، ۴= RNA ۳۵ ساعته، ۵ = RNA ۴۸ ساعته. B) تصویر B بیان ژن BEST-5 نشان داده شده است. در این آنالیز میزان بیان BEST-5 در کشت ۵ ساعته هپاتوسیت‌ها به عنوان ۱۰۰٪ بیان لحاظ و بیان ژن در سایر ساعات با آن مقایسه شده است. اعداد بر اساس mean±SEM برای کاهش آزمایش انجام شده است و در جایی که $P<۰/۰۱$ بوده است اختلاف معنی‌دار تلقی شده است.

بحث

بررسی هویت قطعه تولیدی نشان داد که ترادف این قطعه کلون شده با مشخصات ژن BEST-5 که در اطلاعات موجود در بانک ژن وجود دارد هم‌خوانی کامل دارد. در این تحقیق علاوه بر نشان دادن بیان این ژن در سلول‌های کبدی با جستجو در سایت علمی BLAST نشان داده شد که ژن BEST-5 به میزان ۸۰٪

با ژن دیگری به نام Cig-5 همولوژی دارد. این ژن اولین بار در سلول‌های MG که با ویروس آلوده گردیده بودند، کلون و شناسایی گردیده است و نقشی در سیستم ایمنی و پاسخ ایمنی ایفاء می کند (۴). بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که BEST-5 نیز احتمالاً مانند ژن Cig-5 در پاسخ ایمنی سلول‌های کبدی دخالت دارد. با توجه به این که نتایج تحقیقات اخیر نشان داده است که این ژن به همراه ژن‌های پروتین‌های مرتبط با شوک حرارتی از جمله HSP27 و HSP90 در ایسکمی متعاقب پیوند پانکراس بیان می‌شود همراهی این ژن با استرس را قوت می‌بخشد (۳). از طرفی نیز اثر تنظیمی مسیر انتقال پیام p38 که یک مسیر وابسته به استرس می‌باشد، در تنظیم بیان ژن BEST-5 در سلول‌های عضلات قلب نشان داده شده است که بیانگر نقش احتمالی استرس در بیان این ژن می‌باشد (۱۲). در این تحقیق از تکنیک‌های RT-PCR و Northern Blot استفاده شد و نتایج Northern Blot وجود یک باند دوگانه BEST-5 را نشان می‌دهد که با مطالعات انجام شده توسط Grewal و همکاران که این ژن را در سلول استیوسارکوما شناسایی کرده‌اند (۴) هماهنگی دارد و در تحقیق حاضر نیز مانند تحقیق Grewal و همکارانش دو باند ۳/۲kb و۳/۹kb شناسایی شدند. BEST-5 cDNA به عنوان پروبی در آزمایش‌های Northern Blotting به کار رفته است و همان طور که از تصویر ۴ بر می‌آید در سلول‌های کبدی در ساعت صفر جداسازی آنها وجود ندارد و پس از سه ساعت کشت سلول بارز می‌شود و تا ساعت پنجم کشت بیان می‌شود پس از ساعت ۵ کشت، دوباره سلول‌های کبدی به حالت اولیه برگشته و این ژن را بیان نمی‌کنند. بر اساس تحقیقات به دست آمده دلایل متعددی می‌تواند عامل بیان و کاهش بیان این ژن باشد که یکی از دلایل آن تبدیل سلول‌های کبدی به سلول‌های غیر متمایز (و سلول‌هایی که ژن‌های اختصاصی خود را از دست می‌دهند) می‌باشد. از آنجا که جداسازی سلول‌های کبدی از محل طبیعی خود در کبد یک فرآیند استرس‌زا است، ممکن است منجر به بیان این ژن مانند سایر ژن‌های مرتبط با استرس از قبیل کموکین‌ها شود، زیرا شواهد زیادی دال بر بیان ژن و تولید پروتئین کموکین‌ها متعاقب جداسازی هپاتوسیت‌ها و کشت آنها گزارش گردیده است (۱،۲،۴،۷،۱۰). از عوامل دیگر دخیل در کاهش بیان ژن می‌توان به کمبود نیمه عمر BEST-5 RNA اشاره نمود که احتمالاً نیمه عمر BEST-5 RNA کم است.

تقدیر و تشکر

دکتر غلامحسین حسن شاهی جهت تحصیلات خود و هزینه‌های انجام این تحقیق از بورس وزارت بهداشت، درمان جمهوری اسلامی ایران استفاده نموده و بر خود لازم می‌داند از آن وزارت محترم تشکر و قدردانی نماید. زحمت تایپ این مقاله را سرکار خانم بژگول کشیده‌اند که نویسندگان از ایشان نیز تشکر می‌نمایند.

Summary

Evaluation of the Stress Effect on Expression of BEST-5 Gene in Cultured Rat Hepatocytes and Cloning of This Gene

Hassanshahi Gh., PhD.[1], Jafarzadeh A., PhD.[2], Hakimi H., PhD.[3], Rezaeian M., PhD.[4], Vazirinejad R., PhD.[4], Tabatabaee S.Z., MSc.[5], Esmaeili A., PhD.[6], Dickson A. J. PhD.[7],

1. Assistant Professor of Hematology, School of Medicine, Rafsanjan University of Medical Sciences and Health Services, Rafsanjan, Iran 2. Associate Professor of Immunology, School of Medicine, Rafsanjan University of Medical Sciences and Health Services, Rafsanjan, Iran 3. Assistant Professor of Microbiology, School of Medicine, Rafsanjan University of Medical Sciences and Health Services, Rafsanjan, Iran 4. Assistant Professor of Epidemiology, School of Medicine, Rafsanjan University of Medical Sciences and Health Services, Rafsanjan, Iran 5. Instructor of Health Management, School of Medicine, Rafsanjan University of Medical Sciences and Health Services, Rafsanjan, Iran 6. Assistant Professor of Health Science, School of Medicine, Rafsanjan University of Medical Sciences and Health Services, Rafsanjan, Iran 7. Professor of Biochemistry, Faculty of life Sciences, The University of Manchester, England

Introduction: *Liver has important roles in body metabolic regulation and for this reason hepatocytes are used worldwide. Investigations showed that isolation of hepatocytes causes activation of stress related genes. The aim of this study was to study the stress related expression of BEST-5 following hepatocytes isolation and culture.*

Method: *The BEST-5 gene is cloned and analyzed for the first time from isolated and cultured rat hepatocytes. Very little is known about this gene and almost nothing is known about its function. RNA was isolated from hepatocytes after*

3h culture and used for generation of PCR products corresponding to the BEST-5. cDNA generated was cloned into pCR®2.1 plasmid vector. Following transformation into TOPO10 oneshot® cells, the cells were grown in LB agar plates containing X-Gal and ampicillin, overnight at 37℃. To confirm that the plasmids contained inserts of the correct size, the vectors obtained from mini-preparations were digested with the desired restriction enzymes.

Results: *Sequencing was performed for the gene. RT-PCR and Northern blotting analysis showed that BEST-5 mRNA is expressed, 3h after isolation and culture of primary hepatocytes (3h) BEST-5 mRNA was observed until 5h of culture and then there was no detectable band of BEST-5 at further time points. Comparison of expression of the level of mRNA of BEST-5, when data statistically were analyzed, showed a significant difference between the expression of BEST-5 mRNA expression at 3h with 0h, 24h, 35h and 48h of culture (P<0.001).*

Conclusion: *According to the results the stress induced by hepatocytes isolation and culture leads to the expression of Best-5 time-dependently.*

Key words*: BEST-5, Stress, Hepatocytes, RT-PCR, Northern Blotting*

Journal of Kerman University of Medical Sciences, 2006; 13(4): 195-202

References

1. Berry MN, Edwards AM, Barritt GJ. Isolated Hepatocytes Preparation, Properties and Applications. USA, Elsevier Publication, 1991; PP243-5.
2. Berry MN, Grivell AR, Grivell MB, Phillips JW. Isolated hepatocytes-past, present and future. *Cell Biol Toxicol* 1997; 13(4-5): 223-33.
3. Drognitz O, Michel P, Koczan D, Neeff H, Mikami Y, Obermaier R, Thiesen HJ, Hopt UT, Loebler M. Characterization of ischemia/reperfusion-induced gene expression in experimental pancreas transplantation. *Transplant* 2006; 81(10): 1428-34.
4. Grewal TS, Genever PG, Brabbs AC, Birch M, Skerry TM. BEST-5: a novel interferon-inducible gene expressed during bone formation. *FASEB J* 2000;14(3): 523-31.
5. Hou DX, Arimura M, Fukuda M, Oka T, Fujii M. Expression of cell adhesion molecule and albumin genes in primary culture of rat hepatocytes. *Cell Biol Int* 2001; 25(3): 239-44.
6. Paine AJ, Andreakos E. Activation of signalling pathways during hepatocyte isolation: relevance to toxicology in vitro. *Toxicol In Vitro* 2004; 18(2): 187-93.
7. Rana B, Mischoullon D, Xie Y, Bucher NL, Farmer SR. Cell-extracellular matrix interactions can regulate the switch between growth and differentiation in rat hepatocytes: reciprocal expression of C/EBP alpha and immediate-early growth response transcription factors. *Mol Cell Biol* 1994; 14(9): 5858-69.
8. Ren X, Carpenter A, Hogaboam C, Colletti L. Mitogenic properties of endogenous and pharmacological doses of macrophage inflammatory protein-2 after 70% hepatectomy in the mouse. *Am J Pathol* 2003; 163(2): 563-70.
9. Seglen PO. Preparation of isolated rat liver cells. *Methods Cell Biol* 1976; 13: 29-83.
10. Varley CL, Armitage S, Hassanshahiraviz G, Dickson AJ. Regulation of the C-X-C chemokine, mob-1, gene expression in primary rat hepatocytes. *Cytokine* 2003; 23(3): 64-75.
11. Wang H, Gao X, Fukomoto S, Tademoto S, Sato K, Hirai K. Differential expression and regulation of chemokines JE, KC and Ip to gene in primary cultured morine hepatocytes. *J Cell Physiol* 1999; 181: 361-70.
12. Saris JJ, 't Hoen PA, Garrelds IM, Dekkers DH,den Dunnen JT, Lamers JM, Jan Danser AH. Prorenin induces intracellular signaling in cardiomyocytes independently of angiotensin II. *Hypertension* 2006; 48(4): 564-71.