اثر دو پکتین سیب یا اسید پکتیک (AP) و پکتین تغییر یافته مرکبات (MCP) بر ترشح نیتریک اکساید در دودمان سلولهای توموری هیپوفیز موش GH3/B6

حسن مقتدری[۱]، حوری سپهری*[۱]،آمنه رضایوف[۱]، لادن دلفی[۱] و سارا دشت بزرگی[۱]

تهران، دانشگاه تهران، پردیس علوم، دانشکده زیست شناسی، گروه فیزیولوژی جانوری

تاریخ دریافت: ۹۱/۹/۱۸ تاریخ پذیرش: ۹۲/۸/۲۷

چکیده

پکتینها ترکیبات پلی ساکاریدی دیواره سلولی گیاهان می باشند که قادر به القای آپوپتوز در سلولهای توموری هستند. مطالعه حاضر اثر این مواد را بر آزادسازی نیتریک اکساید در سلولهای لاکتوتروف GH3/B6 که از سلولهای غده ای هیپوفیز موش می باشند، مورد بررسی قرارمی دهد . تأثیر نیتریک اکساید بر سلولهای توموری به نوع سلول و غلظت آن بستگی دارد، به طوری که قادر به ایفای هر دو نقش مهاری و تسهیلی در روند آپوپتوز می باشد. در پژوهشهای انجام شده نشان دادند که آنزیم نیتریک اکساید سنتتاز، در دودمان سلولی هیپوفیز موش، GH3/B6 بیان می شود و باعث تولید نیتریک اکساید از ال- آرژنین می گردد. در این مطالعه سلولهای GH3/B6 پس از تیمار با غلظتهای مختلف اسید پکتیک یا پکتین سیب (AP) و پکتین تغییر یافته مرکبات (MCP)، سنجش نیتریک اکساید در آنها انجام شد و سپس درصد مهار تکثیر سلولی با استفاده از تست MTT تعیین گردید. در این پژوهش، انکوباسیون سلولها با ۱mg/ml اسید پکتیک، پس از ۴ ساعت، موجب افزایش۴۰ درصدی ترشح نیتریک اکساید نسبت به گروه شاهد می گردد، در حالی که غلظتهای مختلف پکتین تغییر یافته مرکبات (MCP) تأثیری بر ترشح نیتریک اکساید ندارد. مساله قابل ملاحظه این است که، غلظتهای ۲/۵ mg/ml و ۵ از اسید پکتیک و ۳ mg/ml و ۵ از پکتین تغییر یافته مرکبات در انکوباسیون ۲۴ و ۴۸ ساعت، مهار تکثیر سلولها را موجب می گردند. نتیجه کلی در این مطالعه را می توان چنین بیان کرد که AP موجب آزاد سازی نیتریک اکساید از سلولهای GH3/B6 می شود. در حالی که پکتین مرکبات (MCP) فاقد این اثر می باشد، اما هر دو پکتین بر تکثیرسلولی اثر مهاری دارند بنابراین AP از راه آزادسازی نیتریک اکساید این مهار را انجام می دهد و MCP مسیر عملکردی دیگری مستقل از آزادسازی نیتریک اکساید را دارا می باشد.

واژه های کلیدی: اسید پکتیک، پکتین تغییر یافته مرکبات (MCP)، نیتریک اکساید، سلولهایGH3/B6

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۲۱۶۱۱۱۲۶۲۶، پست الکترونیکی: hsepehri@khayam.ur.ac.ir

مقدمه

نیتریک اکساید برای اولین بار در سال ۱۹۸۷به عنوان یک فاکتور شل کننده در عروق کشف شد (۱۳). این ماده چربی دوست است و قابلیت انتشار بالایی برای عبور از عرض غشاء دارد، فعالیت آن به نوع سلول هدف و تراکم آن بستگی دارد (۱۸). نیتریک اکساید دارای نیمه عمر کوتاهی است که بین۱۵-۴۵ ثانیه است(۲۰). این ماده به تنهایی قادر به ایجاد واکنش با پروتئینها و نوکلوتید ها نمی باشد ولی در حضور سوپر اکساید واکنش پذیر می گردد، که به نیتریک اکساید فعال ویژه (RNOS) شهرت دارد. RNOS نوع ویژه ای از نیتریک اکساید است که از اکسید شدن نیتریک اکساید توسط سوپر اکسید تولید می شود و باعث ایجاد رادیکالهای آزاد نیتریک اکساید می گردد. این مواد میل ترکیبی بالایی برای پروتئینها و نوکلوتیدها دارند که شامل نیتروژن دی اکساید، نیتروژن تری اکساید، دی نیتروژن تری اکساید و دی نیتروژن تترا اکساید می باشند.

واکنش شیمیایی تولید RNOS به صورت زیر می باشد (۲۱).

$2NO + O_2 \rightarrow 2NO_2$	Nitrogen dioxide
$NO2 + 1/2O_2 \rightarrow NO3$	Nitrogen trioxide
$NO_2 + NO \rightarrow N_2O_3$	Dinitrogen trioxide
$NO2 + NO2 \rightarrow N_2O_4$	Dinitrogen tetraoxide

RNOS می تواند با بار مثبت یونهای فلزی موجود در کمپلکس آنزیمها واکنش دهد، مانند واکنش نیتریک اکساید با آهن موجود در هموگلوبین که باعث تولید آنیون NO_3 و مت هموگلوبین می گردد. ترکیب یون NO_3^- با آهن موجود در گوانیل سیکلاز باعث تولید کمپلکس آهن- نیتروزیل و غیر فعال شدن گوانیل سیکلاز می گردد. آنیون NO_3 می تواند باعث القای آسیب به DNA، پراکسیداسیون لیپیدها و شکستن پروتئینها گردد (۵).

نیتریک اکساید از ال- آرژنین ساخته می شود. برای انجام این واکنش NADPH، FAD، BH4 و اکسیژن لازم است. محصولات ابن واکنش نیتریک اکساید و سیترولین می باشند. کاتالیز این واکنش توسط آنزیم نیتریک اکساید سنتتاز صورت می گیرد (۱۵ و ۱۶).

ایزوفرمهای مختلفی ازآنزیم نیتریک اکساید سنتتاز (NOS) وجود دارد که دریک دامنه وسیع از شرایط فیزیولوژیک و پاتولوژیک فعال می گردند. این ایزوفرمها در دوگروه کلی قرار می گیرند.

۱- ایزوفرمهای وابسته به کلسیم: این ایزوفرمها مقدار نیتریک اکساید کمتری نسبت به گروه دیگر تولید می کنند که مقدار آن در حد نانومولار است. این ایزوفرمها شامل دو گروه می باشند که عبارتند از:

- نیتریک اکساید سنتتاز اندوتلیوم رگی(eNOS) که در گشاد کردن رگها مؤثر است(۳).

- نیتریک اکساید سنتتاز عصبی(nNOS) که در سلول عصبی فعال می باشد و در پلاستیسته نورونی دخالت دارد(۱۴).

۲- ایزوفرم غیر وابسته به کلسیم: در این ایزوفرم مقدار تولید نیتریک اکساید در حد میکرومولار است که شامل یگ گروه می باشد.

- نیتریک اکساید سنتتاز القایی (iNOS) که ابتدا در سلولهای ایمنی کشف شد و اینتر لوکین ها و TNF-α می توانند آن را فعال کنند(۲۲).

لازم به ذکر است که، نقش نیتریک اکساید در سلولهای سرطانی به خوبی شناخته نشده است و اثر این ماده به نوع سلول و مقدار تراکم آن بستگی دارد. تحقیقات نشان داده است که، نیتریک اکساید در بعضی از سلولها نقش آپوپتوزی (۸) و در بعضی دیگر نقش ضد آپوپتوزی دارد. به عنوان مثال، اضافه کردن دهنده های نیتریک اکساید به سلولهای مونوسیت U937 باعث جلوگیری از روند آپوپتوز در این سلولها می شود (۱۲). در ضمن، در سلولهای سرطان سینه انسان MCF-7 تراکم پایین از یک دهنده نیتریک اکساید مانند سدیم نیترو پروساید (SNP) باعث مهار آپوپتوز می شود در حالی که، تراکم بالای آن قادر به القای آپوپتوز در این سلولها می باشد (۷). علاوه بر این، در سلولهای ماکروفاژی Raw-264، دهنده های نیتریک اکساید مانند نیتروگلوتامین و SNP باعث القای بیان پروتئین p53 و افزایش بروز آپوپتوز در این سلول می گردند (۶).

در تحقیق حاضر از دودمان سلول توموری هیپوفیز موش GH3/B6 استفاده شد که قابلیت سنتز و ترشح هورمون رشد و پرولاکتین را دار می باشد (۱۰). در ضمن، این دودمان سلولی ایزوفرمهای iNOS و nNOS را نیز بیان می کند (۱۹).

مواد و روشها

- **کشت سلولGH3/B6**: سلولهای GH3/B6 در محیط کشت HamsF12 (GIBCO) به همراه ۱۲/۵ درصد سرم اسب (HIMEDIA) و ۲/۵ درصد سرم جنین گوساله

(GIBCO) غیر فعال شده کشت داده شد. شرایط اتمسفری مناسب برای رشد این سلولها رطوبت ۹۵ درصد، دمای ۳۷ درجه سانتی گراد و ۵ درصد دی اکسید کربن می باشد. این سلولها به صورت تک لایه به سطح فلاسک چسبیده و تکثیر می شوند (۱ و۲).

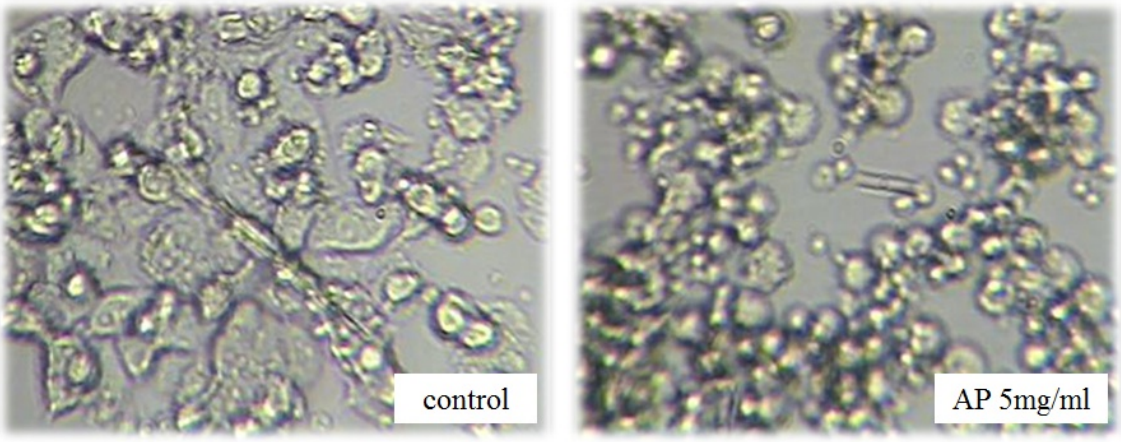
– **بررسی درصد مهار تکثیر سلول:** برای به دست آوردن درصد مهار تکثیر سلول از روش MTT استفاده شد. ۲۰۰در هر چاهک پلیت ۹۶ خانه ای تعداد 10^4 سلول کشت داده شد. سلولها پس از ۷۲ ساعت پیش انکوباسیون، با غلظتهای مختلف AP (FLUKA) ، MCP (EcoNugenics) وSNP (MERCK) تیمار شد. سپس پلیتها برای مدت زمانهای ۶، ۲۴ و ۴۸ ساعت در انکوباتور قرار گرفتند. پس از طی زمان مورد نظر به هر چاهک ۲۰µl از محلول MTT (SIGMA) با غلظت ۵mg/ml اضافه شد و در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد برای مدت ۳ ساعت انکوبه گردید. سپس پلیت حاوی سلولها از انکوباتور خارج شده و محیط روی سلولها تخلیه و به چاهکهای مورد نظر ۲۰۰µl DMSO(SIGMA) اضافه گردید. سپس میزان جذب با دستگاه microplate Reader در طول موج ۶۳۰nm مورد بررسی قرار گرفت. برای به دست آوردن مهار تکثیر سلول از فرمول زیر استفاده گردید (۱۸). بر این اساس مهار تکثیر سلولها در زمانهای مختلف و غلظتهای مختلف ماده مورد نظر به دست آمد.

$$\text{درصد مهار تکثیر} = 1 - \frac{\text{میانگین جذب نمونه های تیمار شده}}{\text{میانگین جذب نمونه های کنترل}}$$

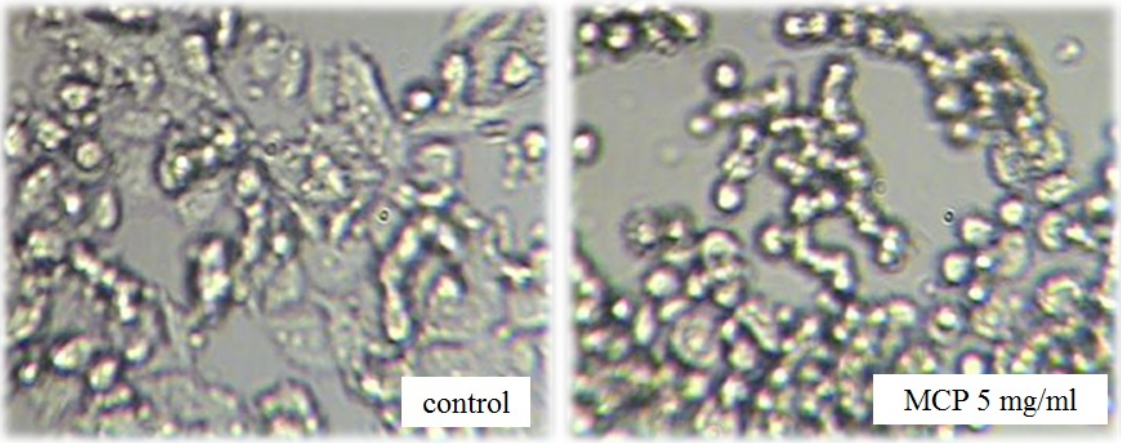
– **سنجش نیتریک اکساید:** برای سنجش نیتریک اکساید از واکنشگر گریس استفاده شد. بدین منظور تعداد 10^5 سلول در هر چاهک مولتی دیشهای ۲۴ خانه ای کشت داده شد. پس از ۷۰ ساعت پیش انکوباسیون، سلولها با غلظتهای مختلف AP ، MCP و SNP تیمار شدند. پلیتها برای زمانهای ۲، ۴، ۶، ۲۴ و ۴۸ ساعت در انکوباتور قرار گرفتند. پس از طی زمان مورد نظر ۵۰µl از محیط رویی سلول را برداشته و به آن ۵۰µl محلول سولفانیل آمید (MERCK) اضافه گردید و سپس ۵۰µl محلول NED (Naphthylethyl-enediamindihydrochloride) (MERCK) نیز به همه چاهکها اضافه گردید. جذب با دستگاه microplate Reader در طول موج ۵۷۰nm خوانده شد. میزان جذب در این طول با مقدار آزاد سازی نیتریک اکساید رابطه مستقیم دارد(۱۱). میزان ترشح نیتریک اکساید برای هر غلظت از مواد مورد استفاده جهت تیمار از رابطه زیر استفاده شد:

$$\text{میزان ترشح نیتریک اکساید} = \frac{\text{میانگین جذب نمونه های تیمار شده}}{\text{میانگین جذب نمونه های کنترل}}$$

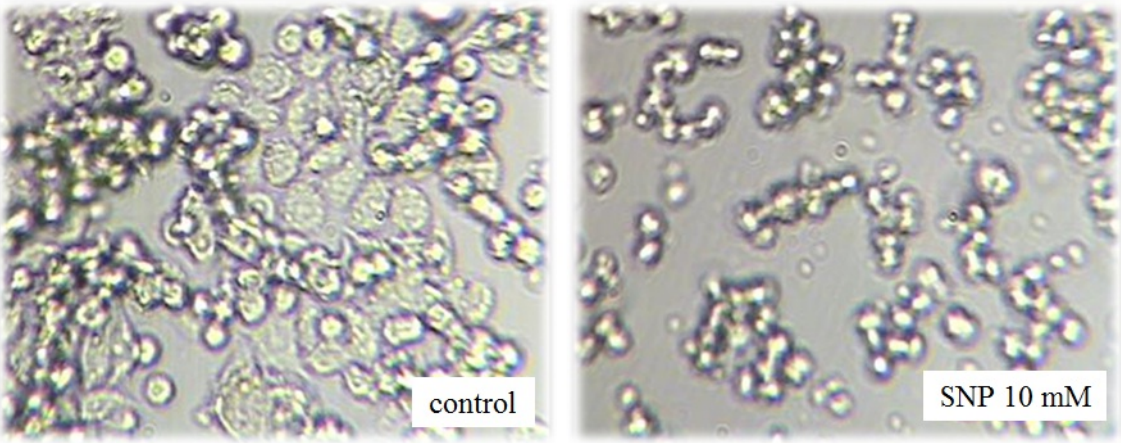
آنالیز آماری: آنالیزهای آماری با استفاده از نرم افزار SPSS 15 و تست پارامتریک ANOVA یک طرفه انجام شده است. $P \leq ۰/۰۵$ به عنوان اختلاف معنی دار محاسبه گردید. نتایج به صورت SEM± میانگین (n =۳) نشان داده شد.



شکل ۱- تغییرات مورفولوژیکی سلولها پس از تیمار با ۵ mg/ml اسید پکتیک در زمان انکوباسیون۴۸ ساعت. در تصویر سمت راست کاهش حجم سلول و گرانوله شدن سلولها نشان داده شده است تصویر سمت چپ گروه کنترل می باشد.



شکل ۲- تغییرات مورفولوژیکی سلولها پس از تیمار با MCP ۵ mg/ml در زمان انکوباسیون۴۸ ساعت. در تصویر سمت راست کاهش حجم سلول و گرانوله شدن سلولها نشان داده شده است تصویر سمت چپ گروه کنترل می باشد.



شکل ۳- تغییرات مورفولوژیکی سلولها پس از تیمار با SNP10mM در زمان انکوباسیون۴۸ ساعت. در تصویر سمت راست کاهش حجم سلول و گرانوله شدن سلولها نشان داده شده است تصویر سمت چپ گروه کنترل می باشد.

نتایج

- اثر AP ، MCP و SNP بر مورفولوژی سلولهای GH3/B6 : به منظور مطالعه اثر AP، MCP و SNP **بر** مورفولوژی سلولهای GH3/B6، تعداد 10^4 سلول در هر چاهک پلیت ۹۶ خانه ای کشت داده شد. مدت پیش انکوباسیون ۷۲ ساعت در نظر گرفته شد. سپس غلظتهای مختلف از AP (شکل۱)، MCP (شکل۲) ،SNP (شکل۳) در زمان ۴۸ ساعت روی سلولها اثر داده شد. این سلولها به وسیله میکروسکوپ اینورت مورد بررسی و عکسبرداری قرار گرفتند.

تغییرات مورفولوژیکی سلولهای GH3/B6 پس از سپری شدن ۴۸ ساعت به ترتیب زیر می باشد

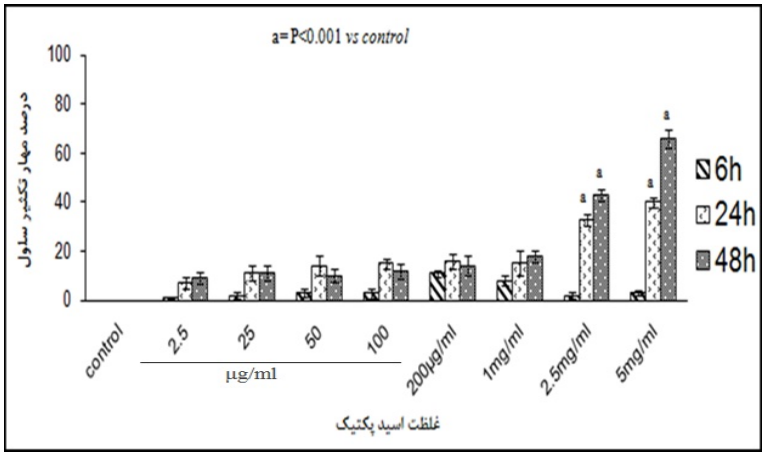
۱- گروه سلولهایی که نمونه کنترل می باشند در آنها تغییری از این نظر ایجاد نشده است.

۲- در سلولهای تیمار شده با دوز بالا AP، MCP و SNP تغییراتی نظیر چروکیده شدن غشاء، کاهش حجم سلول وگرانوله شدن آن مشاهده گردید. ضمنا تعدادی از سلولها از کف فلاسک جدا شده وشناور گردیدند.

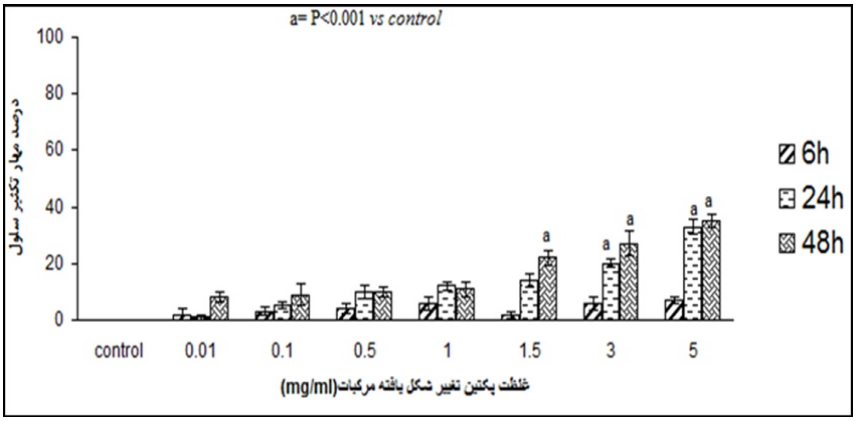
-بررسی درصد مهار تکثیر سلولهای GH3/B6 به وسیله تست MTT : AP وMCP در زمان ۶ ساعت تیمار تأثیر محسوسی بر درصد مهار تکثیر سلولهای GH3/B6 نداشت، اما APدر زمان ۲۴ و ۴۸ ساعت در غلظتهای ۵ mg/ml و ۲/۵ باعث افزایش معنی دار درصد مهار تکثیر سلولها نسبت به گروه کنترل گردید ($p<0.001$) (شکل۴). همچنین MCP در زمان ۲۴ و ۴۸ ساعت با غلظتهای ۵ mg/ml و ۳ باعث افزایش معنی دار مهار تکثیر سلولهای GH3/B6 نسبت به گروه کنترل می شود. ($p<0.001$) (شکل۵).

SNP با غلظتهای ۲۰ mM و ۱۰، ۵ پس از ۶ ساعت انکوباسیون باعث افزایش معنی دار مهار تکثیر سلولهای GH3/B6 نسبت به گروه کنترل شد ($p<0.001$). این ماده در زمانهای ۲۴ و ۴۸ با غلظتهایmM ۲۰ و ۱۰، ۵، ۱ افزایش معنی دار مهار تکثیر سلولهای GH3/B6 نسبت به گروه کنترل را نشان داد ($p<0.001$) (شکل۶).

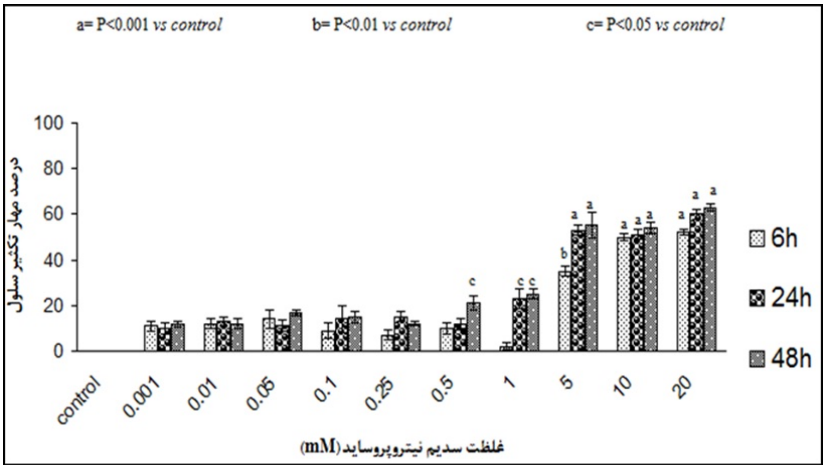
بنابراین می توان این گونه نتیجه گرفت که، درصد مهار تکثیر سلولهای GH3/B6 تحت تأثیر AP، MCP و SNP در یک حالت وابسته به دوز و زمان، افزایش نشان می دهد. در ضمن مهار تکثیر سلولهای GH3/B6 که تحت انکوباسیون ۴۸ ساعت قرار گرفته اند افزایش معنی داری نسبت به مهار تکثیرسلول در انکوباسیون ۲۴ ساعت نشان داد ($p<0.001$).



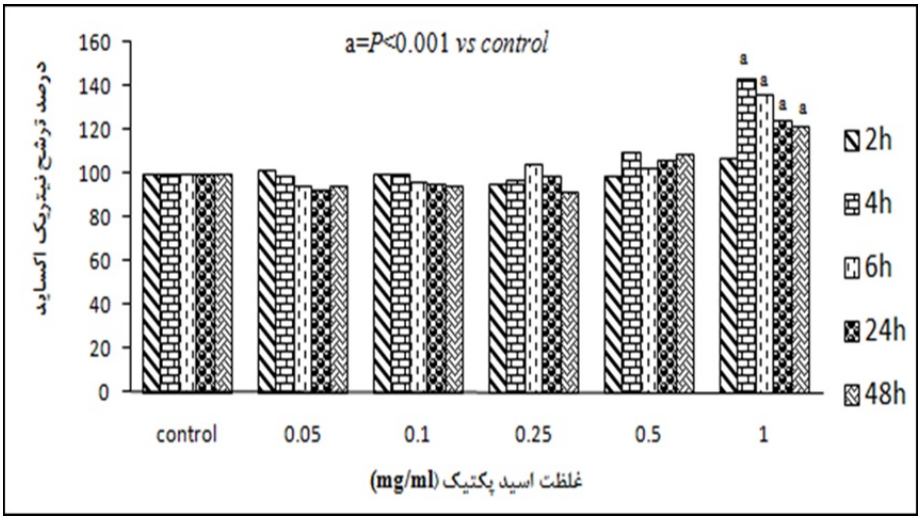
شکل ۴- اثر غلظتهای متفاوت اسید پکتیک بر درصدمهار تکثیرسلولهای GH3/B6 پس از۶و۲۴و۴۸ساعت انکوباسیون. غلظتهای ۲/۵mg/ml و ۵ AP باعث افزایش معنی دار مهار تکثیر سلولهای تحت تیمار نسبت به گروه کنترل شده است. مقادیر ارائه شده معادل mean±S.E.M می باشند. (N=3 و a = $p<0.001$)



شکل۵- اثر غلظتهای متفاوت پکتین تغییر شکل یافته مرکبات بر درصد مهار تکثیر سلولهای GH3/B6پس از ۶، ۲۴ و۴۸ساعت انکوباسیون. غلظتهای ۱/۵و۳و۵MCPباعث افزایش معنی دار مهار تکثیر سلولهای تحت تیمار نسبت به گروه کنترل شده است. مقادیر ارائه شده معادل mg/ml mean±S.E.M می باشند. (a = p<0.001، و N=3)



شکل۶- اثر غلظتهای متفاوت سدیم نیتروپروساید بر درصد مهار تکثیر سلولهای GH3/B6 پس از ۶، ۲۴ و۴۸ ساعت انکوباسیون. غلظتهای ۲۰، ۱۰، ۵، ۱، ۰/۵میلی مولار سدیم نیتروپروساید تفاوت معنی داری در افزایش مهار تکثیر سلولهای تیمار شده نسبت به کنترل ایجاد کرده است. مقادیر ارائه شده معادل mean±S.E.Mمی باشند. (a = p<0.001، b = p<0.01، c = p<0. 05 و n=3)



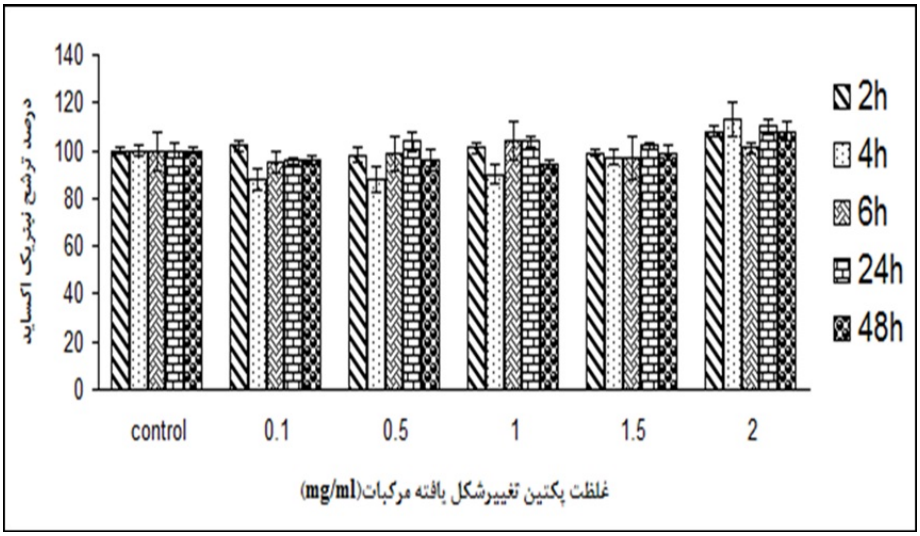
شکل ۷- اثر غلظتهای متفاوت اسید پکتیک بر ترشح نیتریک اکساید در سلولهای GH3/B6 پس ازساعت۲، ۴، ۶، ۲۴ و ۴۸ انکوباسیون. غلظت ۱mg/mlAP باعث افزایش معنی دار بر ترشح نیتریک اکساید از سلولهای تحت تیمار نسبت به گروه کنترل شده است. (a = p<0.001، و N=3)

- بررسی ترشح نیتریک اکساید در سلولهای GH3/B6 بوسیله واکنشگر گریس: AP با غلظت ۱mg/ml در زمان ۲ ساعت تأثیر معنی داری بر ترشح نیتریک اکساید از سلولهای GH3/B6 نشان نداد، اما در زمانهای ۴، ۶، ۲۴ و ۴۸ ساعت باعث افزایش معنی دار ترشح نیتریک اکساید از سلولهای تحت تیمار نسبت به گروه کنترل شد (p<0.001) (شکل۷). درحالیکه MCP در هیچ یک از زمانهای ۲، ۴، ۶، ۲۴ و ۴۸ ساعت تأثیر معنی داری بر ترشح نیتریک اکساید از سلولهای تحت تیمار نسبت به کنترل نداشت (شکل۸).

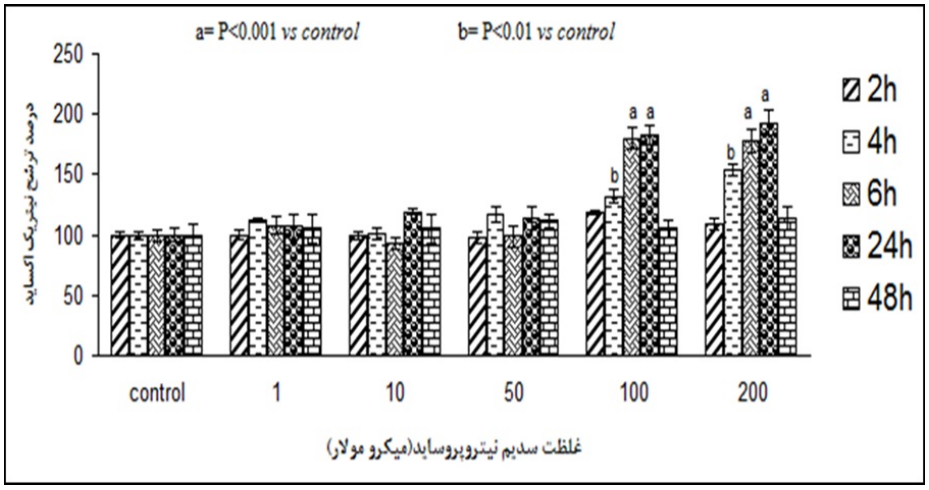
SNP با غلظت ۲۰۰ µM و ۱۰۰ در زمان ۲ ساعت تأثیر معنی داری بر ترشح نیتریک اکساید از سلولهای تحت تیمار نسبت به کنترل نشان نمی دهد، اما در زمان های ۴، ۶ و ۲۴ ساعت باعث افزایش معنی دار ترشح نیتریک اکساید می شود (p<0.001). اما در زمان ۴۸ ساعت تأثیر معنی داری بر ترشح نیتریک اکساید از سلولهای نشان نمی دهد که احتمالا دلیل آن مصرف تمام SNP بعد از این مدت می باشد. (شکل۹).

بحث

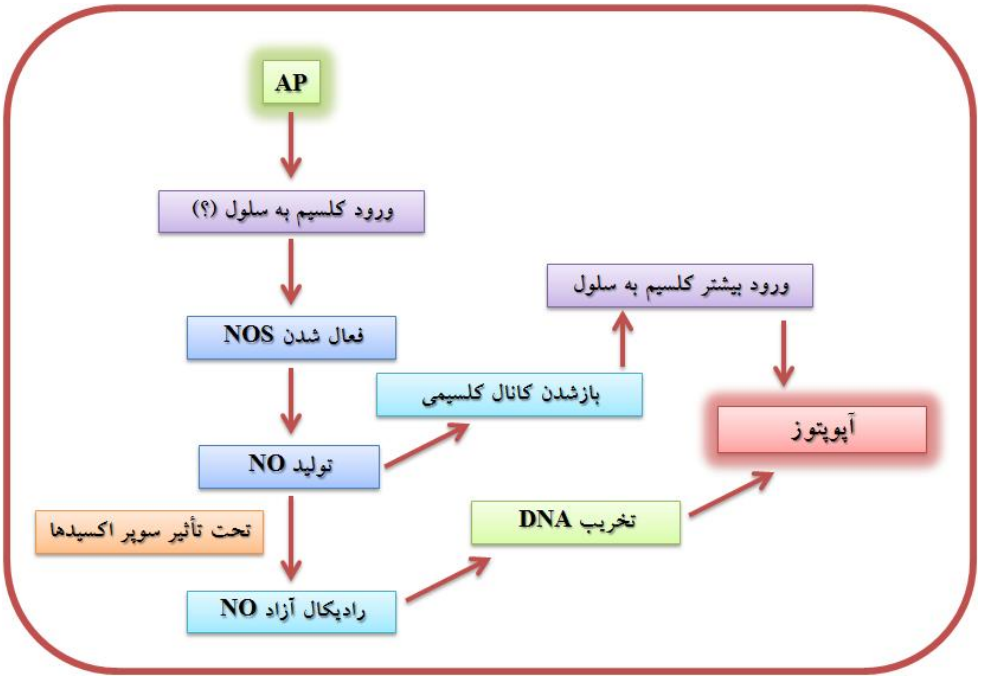
تحقیقات نشان داده است که پکتین سیب (AP) در زمان انکوباسیون کوتاه مدت، ترشح پرولاکتین را افزایش می دهد (۹، ۱۶ و ۱۷) و در زمان انکوباسیون بلند مدت باعث القای آپوپتوز در سلولهای GH3/B6 می گردد (۴). مکانسیم دقیق اثر آپوپتوزی مواد پکتینی بر سلولهای توموری و سرطانی به خوبی شناسایی نشده است. از سوی دیگر، نقش نیتریک اکساید در سلولهای سرطانی بسیار پیچیده است و اثر مهاری و تسهیلی آن بر روند آپوپتوز به نوع سلول و غلظت نیتریک اکساید بستگی دارد.(۷).



شکل ۸- اثر غلظتهای متفاوتMCP بر ترشح نیتریک اکساید در سلولهای GH3/B6 پس از۲، ۴، ۶، ۲۴ و ۴۸ ساعت انکوباسیون. غلظتهای مختلف MCP باعث تغییر معنی دار بر ترشح نیتریک اکساید از سلولهای تحت تیمار نسبت به گروه کنترل نشده است. مقادیر ارائه شده معادل mean±S.E.M می باشند.N=3



شکل ۹- اثر غلظتهای متفاوتسدیم نیتروپروساید بر ترشح نیتریک اکساید در سلولهای GH3/B6 پس از۲ ،۴ ،۶ ، ۲۴ و ۴۸ ساعت انکوباسیون.
غلظتهایμM،۱۰۰،۲۰۰سدیم نیتروپروساید باعث افزایش معنی دار بر ترشح نیتریک اکساید از سلولهای تحت تیمار نسبت به گروه کنترل شده است.
(N=3 و a = p<0.001,b = p<0.01)



شکل ۱۰- در این شکل مسیر احتمالی تأثیر پکتین سیب (AP) بر القای آپوپتوز در سلول از طریق آزاد سازی نیتریک اکساید نشان داده شده است.

مواد مختلفی بر ترشح نیتریک اکساید تأثیر می گذارند، به عنوان مثال استروژن در سلولهای GH3/B6 باعث کاهش بیان nNOS می گردد و این عمل تولید نیتریک اکساید را در این سلولها کاهش می دهد (۲۳). طبق بررسیهای انجام شده SNP و L-ARGININE میزان ترشح نیتریک اکساید را در سلولهای GH3 افزایش می دهند (۲۳). علاوه بر این، محققین نشان داده اند که غلظتهای بالای SNP باعث مهار رشد سلولهای سرطانی پروستات انسانی و سلولهای سرطانی دهان انسان می گردند (۱۹). طبق بررسیهای انجام شده، اضافه کردن یک دهنده نیتریک اکساید به محیط

کشت سلولهای GH3/B6 باعث مهار ترشح پرولاکتین در این سلولها می شود (۱۸). با توجه به اینکه مکانیسم القای آپوپتوز توسط مشتقات پکتینی بر سلولهای توموری و سرطانی ناشناخته می باشد، بررسی نقش احتمالی ترشح نیتریک اکساید در القای آپوپتوز بر این سلولها، پس از تیمار با مواد پکتینی، به عنوان هدف این مطالعه در نظر گرفته شد. ودو مطلب کلی مورد بررسی قرار گرفت:

۱-بررسی اثر اسید پکتیک (AP) و MCP بر تولید نیتریک اکساید توسط سلولهای GH3/B6

۲-بررسی نقش نیتریک اکساید در مهار رشد و تکثیر سلولها

نتایج نشان داد که، AP در زمان ۲ ساعت تأثیری بر ترشح نیتریک اکساید ندارد ولی در زمان ۴، ۶، ۲۴ و ۴۸ ساعت با غلظت mg/ml ۱ باعث افزایش معنی دار ترشح نیتریک اکساید می گردد. در ضمن، غلظتهای mg/ml ۵ و ۲/۵ AP در زمانهای ۲۴ و ۴۸ ساعت باعث مهار تکثیر سلولها می گردند. اثر مهار تکثیر سلولها را برای AP احتمالاً می توان به خاطر افزایش ورود کلسیم به داخل سلول دانست. ورود یون کلسیم، ایزوفرم nNOS را فعال کرده و باعث تولید نیتریک اکساید می گردد (۲۱). با توجه به اینکه، نیتریک اکساید نیز خود محرک ورود کلسیم به سلول می باشد، بنابراین با تولید نیتریک اکساید درون این سلولها، مقدار کلسیم درون سلولی افزایش بیشتری می یابد (۲۲). از طرف دیگر نیتریک اکساید تحت تأثیر سوپر اکسید های درون سلولی به رادیکال آزاد نیتریک اکساید تبدیل می شود این رادیکال آزاد باعث آسیب به DNA و تخریب آن گردد (شکل ۱۰) (۵).

از طرف دیگر، MCP با غلظتهای mg/ml ۵ و ۳ تکثیر سلولهای GH3/B6 را مهار می کند در حالی که، تأثیری بر ترشح نیتریک اکساید در این سلولها ندارد. بنابراین، این احتمال وجود دارد که تأثیر MCP بر سلولها مستقل از مسیر نیتریک اکساید باشد.

نتایج کلی این مطالعه نشان داد که، اسید پکتیک یا پکتین سیب با تحریک ورود کلسیم به سلول باعث فعال شدن آنزیم نیتریک اکساید سنتاز و ترشح نیتریک اکساید می گردد، ولی پکتین تغییر یافته مرکبات در پیدایش این مکانیسم در سلولهای GH3/B6 بی اثر است. بنابراین پکتین سیب احتمالاً سلولهای GH3/B6 را از طریق افزایش نیتریک اکساید به طرف آپوپتوز می برد واین مکانیسم می تواند به علت افزایش کلسیم داخل سلولی باشد.

تشکر و قدردانی

پژوهش حاضر توسط بودجه دانشگاه تهران – پردیس علوم انجام یافته است. از سرکار خانم دانیل گرجی (Danielle Gourdji) پژوهشگر college de France و INSERM برای اهدای سلول GH3/B6 به آزمایشگاه فیزیولوژی جانوری قدردانی می گردد. از جناب آقای کاوه دارابی به خاطر همکاری بی دریغشان کمال تشکر و امتنان را دارد.

منابع

۱- دلفی لادن، سپهری حوری، رسولی یاسمن، سمیده خویی. (۱۳۸۵). اثر β-گلوکان بر تحریک ترشح پرولاکتین و مورفولوژی سلولهای GH3/B6. مجله زیست شناسی ایران. جلد ۱۹: شماره ۳ (۲۸۱-۲۷۲)

۲- شاعر زاده فاطمه، سپهری حوری، حسین قمر تاج، گلیایی بهرام، دلفی لادن، رسولی یاسمن. (۱۳۸۹). تأثیر تراکم های مختلف β-گلوکان بر سنتزپرولاکتین در یاخته های GH3/B6 و بررسی گیرنده β-گلوکان در این یاخته ها. مجله زیست شناسی ایران. جلد ۲۳: شماره ۵ (۶۷۱-۶۶۳)

3- Alderton W, Cooper C, Knowles R. (2001). Nitric oxide synthesis: Structure, function and Inhibition, *Biochem.J,* 357: 593-615

4- Attari F, Sepehri H, Delphi L, Goliaei B. (2009). Apoptotic and Necrotic effects of pectic acid on Rat Pituitary GH3/B6 Tumor cells. *Iranian Biomedical journal*, 48: 163-170

5- Beckman j. (1996). The physiological and pathological chemistry of nitric oxide, *Nitric oxide journal,* 4: 85-96
6- Chen Y, Huse SH, Lin L. (2005). Effect of inducible Nitric oxide synthase inhibitors on DAMB-induced hamster buccal –pouch squamous –cell carcinogenesis, *Nitric oxide journal*, 14: 232-239
7- Chinthalapally R. (2004). Nitric oxide signaling in colon cancer chemopreventation. *mutation research*, 3: 107-11
8- Coulter J, Mccarthy H, Xiang J, Roedl W, Wanger E, Robson T, Hirst D. (2008). Nitric oxide –A novel therapeutic for cancer. *Nitric oxide journal*, 161: 192-198
9- Eslimi D, Sepehri H, Rassouli Y, Khoei S and GoliaeiB. (2008). Pectic Acid Effects on Prolactin Secretion in GH3/B6. *Iran. Biomed. J.* 12 (3): 167-172
10- Gourdji D and Vidal T. (1980). Prolactin secreting cell lines: a tool for the study of the mechanism of action of hypophysio tropic neuropeptides. *J.Physiol*, 76: 233-241
11- Green L, Wagner D, Glogowski J, Skipper P, Wishnok J, Tannenbaum S. (1982). Analysis of nitrate, nitrite and nitrate in biological fluids. *Anal BiochemRew ,* 126: 131–138
12- Kim P, Zamora R, Petrosko P, Billiar T. (2001). The regulatory role of Nitric oxide in apoptosis. *int.immunophar.journal*, 6(2): 1421-1441
13- LaLaP,Chakraborty C. (2001). Role of nitric oxide in carcinogenesis and tumor Progression. *Nitric oxide journal*, 13: 149-156
14- Lechner M, Lirk P, Rieder J. (2005). Inducible nitric oxide synthase (iNOS) in Tumorbiology: the two sides of the same cone. *Cancer biology*, 14: 277-289
15- Scalerno J. (1996). Nitric oxide complexes of metalloproteinase: an introductory overview. *Nitric oxide journal,* 4: 115-123
16- Sepehri H, Delphi L, and rassuli Y. (2007). The effect of β-glucan on prolactin secretionin GH3/B6 cell3. *Iranian Journal of Science & Technology*, 31: 21-24
17- Sepehri H, Zoraghi R. &Haeri- RohaniA. (2001). An effect of pectic acid and β- glucan on prolactin secretion by ovine pituitary explants. *Iranian Journal of Science,* 1: 99-107
18- Shang Z, Lee Z (2006). Invitro effects of nitric oxide synthase inhibitor L-NAME on oral squamouse cell carcinoma. *int.j.oralMaxillo of surge*, 41: 539-543
19- Tsumori M,murakamiB,koshimura K and kato Y. (1999). Thyrotropin – releasing hormone stimulates NO release from GH3 cells. *Neuroendocrinology journal*, 11: 451-456
20- William's D. (2004), Nitric oxide in biological system. *Nitric oxide journal,* 28: 161-169
21- William's D. (2003). The biological chemistry of nitric oxide, *Nitric oxide journal,* 21: 81-92
22- Wolff D. (2003). Calmodulin –dependent Nitric oxide synthase, *Biological chemistry J* , 268(13): 425-429
23- Xian Q, Jin L and Liyod R. (1999). Esterogen down regulate neuronal nitric oxide in rat anterior pituitary cell and GH3 tumors. *Endocrine journal,* 11(3): 123-130

Effect of apple pectin or pectic acid and modified citrus pectin on NO release and inhibition of cell proliferation in rat pituitary tumor cells GH3/B6

Moghtaderi H., Sepehri H., Rezayof A., Delphi L. and Dashtbozorgi S.

Animal Physiology Dept., Faculty of Biology, University College of Science, University of Tehran, Tehran, I.R. of Iran

Abstract

Nitric oxide (NO) can both induce and suppress apoptosis according to the physiological conditions. Recent investigations have indicated that pectin derivatives, which are polysaccharides in the cell wall of plants, are able to induce apoptosis in cancerous cells. In the present study the amount of NO release from rat pituitary tumor cell line GH3/B6 after treatment with deferent concentration of modified citrus pectin (MCP), pectic acid (PA), SNP (as positive control) and L-NAME (as negative control) is under investigation. The cells were cultured in Ham's F12 medium which was completed with 10% FBS and treated with different concentration of MCP and AP. The cell proliferation inhibition rate was determined with MTT assay. The amount of NO release was assessed by an indirect method of using Griess reagent. Our results demonstrated that incubation of GH3/B6 cells with 1mg/ml PA for 4 hours increased the amount of NO release up to 40% more than control otherwise none of MCP concentrations affect the secretion of NO. In addition, MTT assay determined significant proliferation inhibition rate for the cells with 2.5, 5 mg/ml of PA and 3, 5 mg/ml of MCP after 24 and 48 hours incubation. So these results suggest that PA may inhibit cell proliferation via induction of NO release in GH3/B6 cells but MCP shows its inhibitory effect on cell proliferation by another pathway.

Key words: *Pectic Acid, Modified Citrus Pectin, Nitric Oxide, GH3/B6 cell line*