مجله علوم دانشگاه تهران
جلد بیست و نهم (۱۳۸۲) شماره ۲ (۲۵۵-۲۴۷)

اثر اسید پکتیک و β- گلوکان بر ترشح پرولاکتین PRL در دودمان سلولی GH3/B6

حوری سپهری، ساطین صالحی، یاسمن رسولی
گروه زیست شناسی ، دانشکده علوم، دانشگاه تهران، تهران، ایران
(دریافت: ۸۱/۳/۱۵ ؛ پذیرش:۸۱/۸/۷)

چکیده

پژوهشهای اخیر نشان داده است که عصاره گیاهان شیرزا قادر به ترشح هورمون تولید شیر یا پرولاکتین و هورمون نمو می‌باشند. بخش فعال این عصاره از جنس پلی ساکاریدها می‌باشد که بطور عمده از مشتقات پکتین (اسید پکتیک) و در بعضی موارد β- گلوکان می‌باشد.

در پژوهش حاضرمشاهده شد که افزودن اسید پکتیک و β-گلوکان به محیط کشت دودمان سلولی GH3/B6 که سلولهای کلون شده از تومور هیپوفیزی موش می‌باشند باعث آزادسازی پرولاکتین می‌شوند.

انکوباسیون سلولها درمحیط کشتی که به آن اسیدپکتیک به تراکم ۱۰۰ μg/ml اضافه شده پس از ۳۰دقیقه موجب افزایش ترشح پرولاکتین می‌شود که این افزایش حدود ٪٤٠ نسبت به محیط شاهد می‌باشد.

انکوباسیون سلولها در محیط کشت واجدβ-گلوکان با تراکم ۱۰ μg/ml تا ٤٨ ساعت و در تراکم‌های بالاتر ۱۰۰ μg/ml تا ۵۰ پس از ۷۲ ساعت انکوباسیون اثر تحریکی بر ترشح PRL دارد.

پژوهش‌های گذشته نشان داده است که TRH (Thyrotropin Releasing Hormone) محرک بسیار مؤثر در ترشح PRL به وسیله سلولهای لاکتوتروپ می‌باشد بنابراین TRH به عنوان کنترل کننده پاسخ ترشحی این سلولها به یک محرک قوی، مورد استفاده قرار گرفته است. اثر تحریکی این ماده روی سلولها بطور معنی‌دار مشاهده شده است.

نتایج به دست آمده نشان می‌دهد که این دو ماده در شرایط"in vitro"روی سلولهای GH3 اثر تحریکی دارند.

واژه‌های کلیدی: *اسید پکتیک، β- گلوکان، پرولاکتین، سلولهای GH3.*

مقدمه

بعضی از گیاهان دارای خاصیت لاکتوژنیک و یا شیرزایی می‌باشند. پژوهشهای سالهای اخیر نشان داده است که مصرف خوراکی عصارهٔ چندین گیاه می‌تواند در موش باکرهٔ ماده سنتز کازئین را القاء کند. عصاره از گیاهان آفریقائی(Sawadogo & Houdebine،1988a) و ایران (Sepehri *et al.,* 1992) بدست آمده است. فراکسیون فعال این گیاهان ابتدا از دو طریق بلع و تزریق درون رگی در گوسفند و موش مورد بررسی قرار گرفت، در هر دو مورد افزایش ترشح PRL و GH در سرم خون این حیوانات مشاهده گردید، با توجه به این نکته که مقدار ترشح GH کمتر از مقدار ترشح پرولاکتین بوده است.

فراکسیون فعال این گیاهان مشتقات پکتین (اسیدپکتیک) و دربعضی‌از آنها β-گلوکان است.

درسالهای اخیر، پژوهش‌هائی که با استفاده از اکسپلانهای هیپوفیز یا قطعات بسیار کوچک (۱ mm) گوسفند ماده انجام شده، نشان داده است که هم پکتین و هم β-گلوکان قادرند، ترشح PRL (ونه GH) را درطی انکوباسیونهای کوتاه مدت تحریک کنند (Sepehri *et al.,* 1990) دراین مطالعه از دودمان سلولی GH3/B6 که جمعیت یکنواختی از سلولهای مترشحهٔ پرولاکتین هستند، استفاده شده است تا پاسخ دو سؤال زیر مشخص شود:

نخست، آیا اسیدپکتیک و β-گلوکان مستقیماً درسطح سلولهای لاکتوتروپ مؤثرند؟ و دومین سؤال این که کدام مرحله از روند ترشحی به وسیله این مواد فعال می‌شود. آزادسازی هورمون از قبل ذخیره شده، یا تولید دراز مدت پرولاکتین؟

اسیدپکتیک

پکتینها پلیمرهای خطی هستند که از واحدهای اسید D گالاکتورونیک با اتصالهای α۴-۱ درست شده‌اند. ملکولهای D–گالاکتوز، L1–رامنوز و L – آرابینوز هم با زنجیرهٔ اصلی دارای پیوند جانبی می‌باشند. بخش عمده ترکیبات پکتینی را اسید پکتیک یا اسید پلی D گالاکتورونیک $(C6H8C6)_n$ تشکیل می‌دهد. pH مناسب آن برای نگهداری پکتینها حدود ۴ می‌باشد.

اسید پکتیک به وسیله روشهای کروماتوگرافی از سایر پکتینها جدا می‌شود. اسیدپکتیک دارای ویژگیهای بیولوژیکی فراوان است که موارد زیر را می‌توان ذکر کرد:

۱. با جذب آب عبور مواد غذائی را از روده تسریع می‌کند.
۲. بافت کلیه را در برابر آنتی‌بادیهای گلیکوزیدی که برای این بافت اختلال‌آور هستند محافظت می‌کند.

۳. مانع انقباضات شدید معده است.
۴. با دارابودن اثرات ضدسمی روی کاتیونهای فلزی سمی، در درمان سرطان مورد استفاده قرار می‌گیرد.
۵. در متابولیسم لیپیدها نقش دارد (Anderson & Beardall, 1991; Ryan, 1987).

β-گلوکان

β-گلوکان از پلیمرهای گلوکز با اتصالهای β۳-۱ و β۴-۱ بوده و دارای انشعابات جانبی از مانوز می‌باشد. این ماده در دیواره اسکلتی قارچها، مخمرها و گیاهان دیده می‌شود. امروزه ثابت شده است که β -گلوکان به عنوان پیش ساز مستقیم موادی به نام الیسیتورها می‌باشدکه رسپتورهای ویژه آن درسطح سلولهای‌گیاهی شناسائی‌شده است و به عنوان هورمون‌های گیاهی عمل کرده وموجب ظهور ژنهای معین و بروز واکنشهای دفاعی در این سلولها می‌شود (Sawadogo *et al.,* 1989).

مواد و روشها

سلولهای GH3/B6 یک زیرکلون ازسلولهای GH3 می‌باشند که ازتومورهیپوفیزی موش مشتق شده و قابلیت ترشح PRL را دارند. این سلولها همانطور که قبلاً ذکر شده درمحیطHam's F12 با اضافه کردن ٪۱۵ سرم گاو غیرفعال و٪۲/۵ سرم جنین گوساله کشت داده شده‌اند.

دراین تجربیات، ۵۰/۰۰۰ سلول در یک میلی‌لیتر از محیط کامل در ظروف کشت با ۲۴ چاهک به مدت ۵ روز تقسیم شده و رشد کرده‌اند (Gourdji *et al.,* 1982). محیط کشت روز سوم عوض شده است. سپس به دنبال یک شستشوی کوتاه به وسیلهٔ Ham's F12 سلولها در محیط کشت با ترکیب شیمیایی مشخص و بدون سرم انکوبه شده‌اند. این محیط حاوی ترانسفرین (۵ μg/ml)، انسولین (۱۰μg/ml)، هورمون پاراتیروئید (۰/۵ng/ml)، سلنات سدیم (M ۵×۱۰^{-۸}) می‌باشد که TRH، اسید پکتیک و یا بتاگلوکان با تراکم‌های مشخصی به آن اضافه شده است.

پس از انکوباسیون به مدت ۳ دقیقه، ۴۸ ساعت و ۷۲ ساعت، محیط کشت جمع‌آوری می‌شود. اندازه‌گیریPRL از طریق رادیوایمونواسی (RIA) که توسط کین (Kanne, 1971) ارائه شده است، با استفاده از NIDDK-rPRL به عنوان مرجع و یک آنتی‌بادی ضد PRL که به وسیلهٔ D.grouselle آماده شده است، انجام می‌گیرد. اندازه‌گیری مقدار پروتئین‌ها به وسیله روش برادفورد (Bradford, 1976) صورت گرفته است. برای کنترل کردن قابلیت ترشحیPRL

توسط سلولهای GH3/B6 از ماده‌ای کـه محـرک واقعـی آن اسـت یعنـی TRH کـه از شـرکت کال‌بیوکم تهیه شده، استفاده گردیده اسـت. اسـید پکتیـک از شـرکت Fluka و β -گلوکـان از شرکت Sigma تهیه گردید. نحوه رشد سلولها دراین محیط مورد مطالعه قرارگرفته و نشان داده شده است که هیچ کدام از این مواد در هر مقدار و مدتی که مصرف شده‌اند، سمی نمی‌باشند.

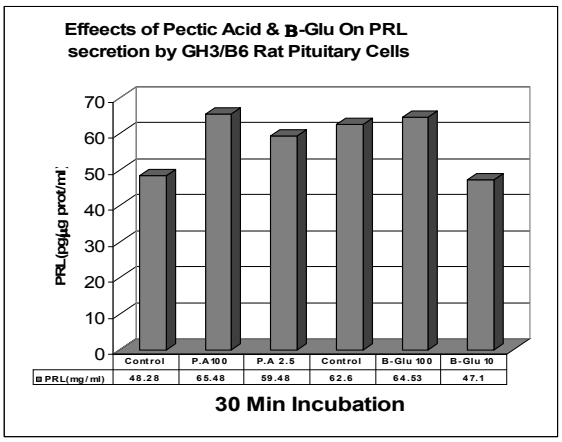
اندازه‌گیریهای غلظت PRL در هر نمونه دوبار انجام گرفته است و نتایج بـا محاسـبه آمـاری ANOVA یکطرفه، (۴ نمونه برای هر آزمایش) محاسبه شده‌است.

نتایج

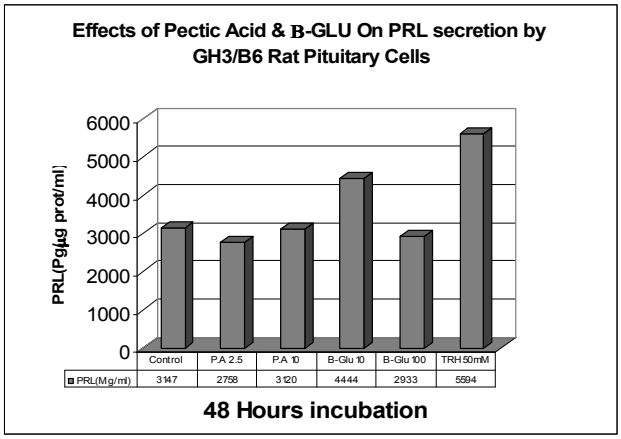
در پژوهش حاضر اثر TRH بر ترشح پرولاکتین توسط سلولهای GH3/B6 بطور معنـی‌دار قابـل مشاهده است ($P<$ ۰/۰۱) و نشان می‌دهد که این سلولها به خوبی به تحریـک ایـن نوروپپتیـد جواب می‌دهند.

اسـید پکتیـک پـس از ۳۰ دقیقـه انکوباسـیون بـا غلظـت μg/ml100 ترشـح پـرولاکتین را حدود٪۴۰ افزایش می‌دهد. تغییرات معنـی‌داری پـس از ۴۸ تـا ۷۲ سـاعت انکوباسـیون دیـده نمی‌شود (شکلهای ۱و۲و۳).

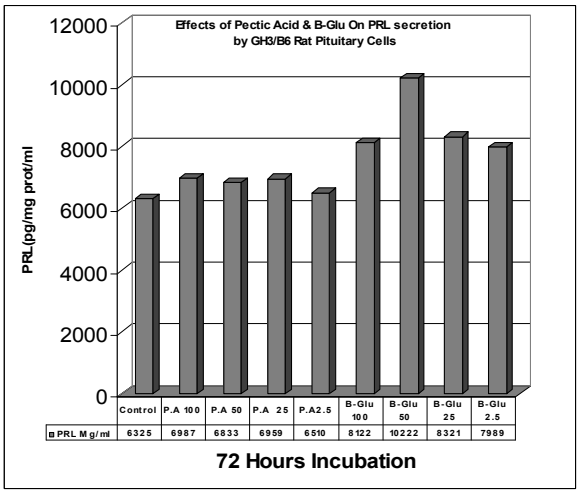
β-گلوکان درترشح پرولاکتین پس‌از۳۰ دقیقه اثرتحریکی نشان نمی‌دهد (شکل۱) اما پس از ۴۸ ساعت انکوباسیون درتراکم μg/ml ۱۰و پس از۷۲ ساعت انکوباسیون درتـراکم μg/ml ۵۰ اثر تحریک‌کنندگی نشان می‌دهد که در۷۲ ساعت معنی‌دار است و * ۰/۰۵ > **P** می‌باشد.



شکل ۱- اثرات اسید پکتیک و بتا-گلوکان بر ترشح پرولاکتین توسط سلولهای GH3/B6 هیپوفیز Rat در۳۰ دقیقه.



شکل ۲- اثرات اسیدپکتیک و بتا-گلوکان بر ترشح پرولاکتین توسط سلولهای GH3/B6 هیپوفیز Rat در ۴۸ ساعت * P < ۰/۰۱ .



شکل ۳- اثرات اسیدپکتیک و بتا- گلوکان بر ترشح پرولاکتین توسط سلولهای GH3/B6 هیپوفیز Rat در ۷۲ ساعت * P < ۰/۰۵ .

بحث و نتیجه‌گیری

هنگامی که رسپتورهای ویژه در سلولهای هدف توسط نوروپپتیدها اشغال می‌شوند اثر بیولوژیک خود را به وسیله مکانیسمهای ویژه انجام می‌دهند. درسال ۱۹۸۹، Laverriere و همکاران نشان دادند که تحریک نسخه برداری از ژن پرولاکتین توسط TRH از طریق مسیر

فسفاتیدیل اینوزیتول که خود موجب افزایش مقدار کلسیم Ca^{++} داخل سلولی و فعال شدن پروتئین کیناز C شده است انجام می‌شود وهمچنین اشغال گیرنده‌هایTRH باعث فعال شدن کانالهای کلسیم وابسته به ولتاژ می‌گردد.

در سال ۱۹۹۴، Passegue و همکاران نشان دادند که نوروپپتید TRH می‌تواند مقدار mRNA و پرولاکتین را در سلولهای GH3/B6 افزایش دهد و همزمان بطور موازی مقدار mRNA ژنهای *C-jas* و B *jun* را نیز افزایش می‌دهد که احتمالاً نشان دهنده القاء عمل ترشح پرولاکتین و نسخه برداری از ژن آن در این سلولها به وسیله این زوج می‌باشد.

نتایج دیگر در سال ۱۹۸۲ توسط Gourdji و همکاران نشان داد که TRH روی ترشح GH درسلولهای GH3 نیز مؤثر است این اثر به صورت بی‌فازیک است یعنی ابتدا باعث افزایش ترشح GH دراین سلولها می‌شود ولی در دراز مدت اثر منفی دارد.

نتایجی که از پژوهش حاضر به دست آمده است، قابلیت تحریکی اسید پکتیک وβ-گلوکان را در ترشح پرولاکتین در شرایط In vitro که در تحقیقات قبلی روی اکسپلانهای هیپوفیزی مشخص شده بود تأئید می‌کند (Sepehri *et al.,* 1990).

همچنین با توجه به ماهیت این سلولها این نتایج تأثیرگذاری ویژه دو مادهٔ فوق را روی سلولهای لاکتوتروپ بیان می‌کند. از طرف دیگر، تحریک این مواد، درمحیطی با ترکیب شیمیایی مشخص و عاری از هورمون و فاکتورهای رشد به استثنای انسولین وهورمون پاراتیروئید مشاهده شده است. بدین ترتیب می‌توان نتیجه گرفت که اسید پکتیک و β-گلوکان مستقیماً درسطح سلولهای لاکتوتروپ عمل می‌کنند و اثر تحریکی آنها به تداخلهای پیچیده‌تر مربوط نمی‌شود.

در شرایط پژوهش‌های حاضر به صورت In vitro ، اسید پکتیک از β-گلوکان فعالتر و مؤثرتر به نظر می‌رسد. این نتیجه با نتایج حاصل از اکسپلانهای هیپوفیزی قابل انطباق است. با وجود این، درگوسفند تزریق درون رگی اسید پکتیک و β-گلوکان اثرات مشابهی در تحریک پرولاکتین ایجاد می‌کنند (Sawadogo *et al.,* 1988).

مدت انکوباسیون درآزمون روی اکسپلانهای هیپوفیز موش برای۲ مادهٔ اسید پکتیک و β-گلوکان هر دو یک ساعت بود، در صورتی که در این پژوهش اثر این دو ماده بر سلولهای GH3/B6 طی انکوباسیونهای کوتاه و دراز مدت مطالعه شده است متعاقباً، تفاوت قابل توجهی در نحوهٔ عملکرد این دو ماده ملاحظه می‌شود .اسید پکتیک سریعاً ولی به صورت موقت ترشح پرولاکتین را افزایش می‌دهد، در صورتی که β-گلوکان ترشح را در درازمدت (۷۲ ساعت) افزایش می‌دهد.

به نظر نمی‌رسد که این تفاوت بستگی به ثبات شیمیایی این مواد در محیط کشت داشته باشد. ولی اینکه آیا اسید پکتیک به مدت ۴۸ یا ۷۲ ساعت هنوز در محیط وجود دارد یا نه بررسی نشده است. احتمالاً اسید پکتیک محرک ترشح پرولاکتین است در حالیکه β-گلوکان بیشتر سنتز پرولاکتین را تحریک می‌کند. این موضوع با نتایج به دست آمده از تحقیقات In vivo و In vitro روی مدل گوسفندی و مشاهدهٔ اثر القایی شدید β-گلوکان درتحریک پرولاکتین درتناقض است.

این مورد اختلاف احتمالاً از تفاوت مشخصات و شرایط آزمایش بین موش و گوسفند ناشی می‌شود زیرا دودمان سلولی GH3/B6 یک دودمان سلولی ماموسوماتوتروپیک است که به نوع سلولهای دو- ترشحی تعلق دارند ولی در هیپوفیز طبیعی موش تنها درصد کوچکی از سلولها ترشح PRL را به عهده دارند. مکانیسم عمل پکتین و β-گلوکان و تأثیر آن در ترشح پرولاکتین هنوز ناشناخته است. نتایج به دست آمده، پژوهشهای قبلی بر روی اکسپلانهای هیپوفیزی موش را تأئید می‌کند و نشان می‌دهد که سلولهای دودمان هیپوفیزی GH3 راحتتر تحت تجربه قرار می‌گیرند و ابزاری مناسب برای مطالعهٔ مکانیسمهای مولکولی و سلولی دخیل در عملکرد اسید پکتیک و β-گلوکان می‌باشند.

تشکر و قدردانی

از معاون و شورای پژوهشی دانشگاه تهران و مسئولین دانشکده علوم که از هرگونه مساعدت دریغ نداشتند قدردانی می‌شود. از خانم دانیل گرجی Danielle Gourdji پژوهشگر College de France و INSERM برای اهداء سلولهای GH_3 به آزمایشگاه فیزیولوژی جانوری و مساعدت برای انجام پاره ای از آزمایشها سپاس و قدردانی می‌شود. از آزمایشگاه بیوفیزیک و بیولوژی ملکولی مرکز تحقیقات بیوفیزیک و بیوشیمی برای همکاری بی دریغشان تشکر می‌شود.

References

Anderson, Y.W., Beardall, Y. (1991). Molecular activities of plant cells in Introduction to plant biochemistry, Blackwell co.

Bradford, M.M.A. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem. **72,** 246–254.

Gourdji, D., Tougard, C., Tixier-Vidal A. (1982). Clonal prolactin strains as a Tool in Neuroendocrinology. Frontiers in Neuroendocinology, **7,** 317–357.

Kanne, C. (1971). Dosage radioimmunologique de la prolactine plasmatique chez les ovines C.R. Acad. Sci., Paris, **272,** 2808–2811.

Laverriere, J.N., J.L., Richard, N. Buisson, N., Martial, J.A., Tixier-Vidal, A., and Gourdji, D. (1989). Thyroliberin and dihydropyridines modulate prolactin gene expression through interacting pathways in GH3 cells. Neuroendocrinology, **50,** 693–701.

Passegue, E., J-N.Laverriere and Gourdji, D. (1994). Thyrotropin-Releasing Hormone Stimulates in Parallel Jun β and C-fos Messenger Ribonucleic Acids in GH3/B6 Pituitary cells: Comparison with PRL Secretion Molecular and Cellular Neurosciences, **5,** 109–118.

Ryan, C.A. (1987). Oligosaccharide Signaling in plants.Ann. Rev. Cell.biol., **3,** 295–317.

Sawadogo, L., Houdebine, L.M., Thibault, J.F., Rouau, X., Ollivier Bousquet, M. (1988). Effects of pectic substances on prolactin and growth hormone secretion in the ewe and on the induction of casein synthesis in the rat. Reprod. Nutr. Dev., **28,** 293–301.

Sawadogo, L., Houdebine, L.M. (1988a). Induction de la synthese de caseine –β dans la glande mammaire de rates traitees par des extraits de plantes. C. R. Acad. Sci. Paris, **306,** 167–172.

Sawadogo, L., Houdebine, L.M. (1988b). Identification of the lactogenic compound present in beer. Ann. Biol. Clin., **46,** 129–134.

Sawadogo, L., Sepehri, H. and Houdebine, L.M. (1989). Mise en evidence d'un facteur stimulant de la secretion de prolactine et de l'hormone de croissance dans les dreches de brasserie. Reprod. Nutr .Develop, **29,** 139–146.

Sepehri, H., Kann, G., Houdebine, L.M. (1992). Pouvoir lactogene potentiel de quelques extraits de plantes iraniennes. Cahiers Agricultures, **1,** 35–39.

Sepehri, H., Renard, C., Houdebine, L.M. (1990). β-glucan and pectin derivatives stimulate prolactin secretion from hypophysis in vitro. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., **194,** 193–197.