



Monitoring Lead Toxicity by Huh7-1x-ARE-luc Cell Line Luciferase Biosensor

ARTICLE INFO

Article Type

Original Research

Authors

Kavoosi S.¹ MSc,
Shirzad H.*² PhD,
Jalili Sh.² PhD,
Sadeghizadeh M.¹ PhD,
Motahari P.¹ MSc

How to cite this article

Kavoosi S, Shirzad H, Jalili Sh, Sadeghizadeh M, Motahari P. Monitoring Lead Toxicity by Huh7-1x-ARE-luc Cell Line Luciferase Biosensor. Modares Journal of Biotechnology. 2019;10(1):125-131.

ABSTRACT

Aims The accumulation of free radicals in the body leads to damages to cellular biopolymers through oxidative stress. Due to the increasing proliferation of heavy metals in soil and water environments, finding efficient methods for diagnostic detection and measurement of heavy metals in contaminated environments is very important. Cell-based biosensors can produce a measurable signal in response to specific chemical or physical agent in their environment. In this study, stable hepatoma Huh7 ARE-reporter cell line was developed containing luciferase gene with the aim of monitoring lead toxicity. This biosensor is reported to be able to detect lead by expressed signal which is measurable. The luciferase assay and Real time-PCR were performed.

Materials & Methods In this experimental research, the Huh7-1x-ARE-luc was stably transferred in to the Huh7 cells and transfected cells were selected. After 5 passages, stable clones were isolated to confirm plasmid entrance. Luciferase activity of the Huh7-1x-ARE-luc cell line was performed with 0-80 μM lead concentration to induce oxidative stress response. Cell viability was assessed by MTT. With Real time PCR, ARE\KEAP1 pathway gene expression were detected. Statistical analysis was performed by ΔCt method, using graphpad prism 6 software.

Findings The gene expression of the reporter gene increased with increasing oxidative stress. Reducing the expression of the reporter gene was observed after 30 μM. 35 μM lead inhibited 50% cell metabolism. Expression of antioxidant pathway genes was significantly increased in 30 μM lead cells compared to control gene.

Conclusion The biosensor prepared from Huh7-1x-ARE-luc cell line of the reporter gene can be a convenient and efficient means for measuring oxidative compounds such as heavy metals such as lead.

Keywords Reporter Gene; Biosensor; Oxidative Stress; Antioxidant Response Element

¹Genetics Department, Biologic Sciences Faculty, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

²Research Institute of Police Science and Social Studies, Tehran, Iran

*Correspondence

Address: Research Institute of Police Science and Social Studies, Tehran, Iran

Phone: -

Fax: -

hadi_shirzad@yahoo.com

Article History

Received: November 16, 2016

Accepted: February 01, 2018

ePublished: March 16, 2019

CITATION LINKS

[1] Peroxynitrite, a stealthy biological oxidant [2] Mechanisms for redox control of gene expression [3] The copper, zinc-superoxide dismutase gene of *Saccharomyces cerevisiae*: Cloning, sequencing, and biological activity [4] Regulation of the OxyR transcription factor by hydrogen peroxide and the cellular thiol-disulfide status [5] Emerging role of NRF2 in chemoresistance by regulating drug-metabolizing enzymes and efflux transporters [6] Decoding enhancers using massively parallel reporter assays [7] NRF2 oxidative stress induced by heavy metals is cell type dependent [8] Neuroinflammatory processes are important in neurodegenerative diseases: An hypothesis to explain the increased formation of reactive oxygen and nitrogen species as major factors involved in neurodegenerative disease development [9] Update of the NAD(P)H: Quinone oxidoreductase (NQO) gene family [10] Lead poisoning and the fall of Rome [11] Contaminated and natural lead environments of man [12] Lead poisoning in children [13] NRF2 and KEAP1 mutations: Permanent activation of an adaptive response in cancer

پایش سمیت سرب به وسیله زیست‌حسگر لوسیفراز رده سلولی Huh7-1x-ARE-luc

سعیده کاووسی MSc

گروه ژنتیک، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

هادی شیرزاد* PhD

پژوهشگاه علوم انتظامی و مطالعات اجتماعی، تهران، ایران

شیرین جلیلی PhD

پژوهشگاه علوم انتظامی و مطالعات اجتماعی، تهران، ایران

مجید صادقی‌زاده PhD

گروه ژنتیک، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

پریا مطهری MSc

گروه ژنتیک، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

چکیده

اهداف: تجمع رادیکال‌های آزاد در بدن با ایجاد استرس اکسیداتیو منجر به تخریب پلیمرهای زیستی می‌شود. به دلیل ورود فلزات سنگین به محیط‌های آبی و خاکی، یافتن روش‌های کارآمد برای شناسایی و اندازه‌گیری میزان فلزات سنگین لازم است. زیست‌حسگرهای سلولی می‌توانند در حضور یک محرک از جمله فلزات سنگین، سیگنالی قابل اندازه‌گیری تولید کنند. در این تحقیق رده سلولی Huh7-1x-ARE-luc تحت کنترل پروموتور حساس به حضور اکسیدان‌ها با هدف پایش سرب استفاده شد و کارایی آن در سنجش سمیت این مواد به واسطه آرمایش‌های لوسیفراز و Real time-PCR بررسی شد.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه تجربی، بعد از ترنسفکشن وکتور نوترکیب سنجش فعالیت ژن لوسیفراز در نمونه‌های تیمار شده با سرب انجام شد. تعدادی از کلون‌های تایید شده با فنوتیپ پایدار بعد از پاساژ پنجم برای بررسی بیان ژن لوسیفراز در غلظت‌های صفر تا ۸۰ میکرومولار از سرب بررسی شدند. سپس قابلیت مهارکنندگی به روش MTT assay و تغییرات بیان ژن‌های مسیر اکسیداتیو توسط Real time-PCR بررسی شد. تحلیل‌های آماری با روش ΔCt و با استفاده از نرم‌افزار graphpad prism 6 انجام شد.

یافته‌ها: میزان بیان ژن گزارشگر همراه با افزایش ماده اکسیداتیو افزایش یافت. کاهش بیان ژن گزارشگر بعد از غلظت ۳۰ میکرومولار سرب قابل مشاهده بود. غلظت ۳۵ میکرومولار سرب، متابولیسم ۵۰٪ سلول‌ها را مهار کرد. بیان ژن‌های مسیر آنتی‌اکسیدانی در سلول‌های تیمار شده با سرب ۳۰ میکرومولار نسبت به ژن کنترل، افزایش معنی‌داری داشت.

نتیجه‌گیری: زیست‌حسگر تهیه شده از رده سلولی نوترکیب Huh7-1x-ARE-luc حامل ژن گزارشگر می‌تواند وسیله مناسب و کارآمدی برای سنجش ترکیبات اکسیداتیو همچون فلزات سنگین چون سرب باشد.

کلیدواژه‌ها: ژن گزارشگر، زیست‌حسگر، استرس اکسیداتیو، توالی پاسخگوی آنتی‌اکسیدانی

تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۰۸/۲۶

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۱۱/۱۲

*نویسنده مسئول: hadi_shirzad@yahoo.com

مقدمه

تجمع عناصر غیرحیاتی مانند جیوه، کادمیوم و سرب در موجودات زنده و به‌خصوص پستانداران باعث بیماری‌های خطرناکی می‌شود. به‌طور معمول این فلزات از طریق هوا، آب و مواد غذایی آلوده وارد بدن پستانداران می‌شوند. اغلب این فلزات سنگین فاقد نقش‌های شناخته شده زیستی بوده و می‌توانند با تجمع در موجودات باعث ایجاد اثرات سمی شوند^[1]

میزان تمایل تجمع فلزات سنگین در موجودات و اندام‌های مختلف متفاوت است. یکی از اساسی‌ترین مسایل در رابطه با فلزات سنگین عدم متابولیسم شدن آنها در بدن است. در واقع فلزات سنگین پس از ورود به بدن دیگر از آن دفع نشده و در بافت‌هایی مثل چربی، عضلات، استخوان‌ها و مفاصل رسوب کرده و انباشته می‌شوند که همین امر موجب بروز بیماری‌ها و عوارض متعددی در

بدن می‌شود^[2,3]. از طرفی خاصیت تجمع‌پذیری فلزات سنگین در گیاهان و ورود آنها به زنجیره غذایی خطرات ناشی از این سموم را دو برابر کرده است. با رشد صنعت و افزایش مصرف مواد شیمیایی و افزایش ورود آنها در آب، خاک و هوا احتمال رویارویی انسان با خطرات ناشی از آنها بیشتر شده است^[4].

یکی از این فلزات سنگین مضر سرب است. به‌طوری که می‌توان گفت سرب یکی از چهار فلزی است که بیشترین عوارض را بر سلامت انسان دارد. عوارض مسمومیت سرب در انسان شامل بالارفتن میزان سرب در خون و ایجاد مسمومیت در دو نوع حاد و مزمن است. در اثر مسمومیت مزمن، بیماری‌هایی نظیر فلج‌شدن، التهاب کلیه، کم‌خونی، بالارفتن میزان اسیداوریک خون، نقرس سربی و سقط جنین در انسان و حیوانات باردار بروز می‌کند. علائم مسمومیت حاد با سرب در حیوانات شامل کوری، ترشح بیش‌ازحد بزاق، انقباض ماهیچه، ساییدگی دندان‌ها و مرگ ناگهانی است^[5].

بدن انسان برای از بین بردن این اثرات سمی فلزات سنگین و کلیه ترکیبات اکسیداتیو از مکانیزم استرس اکسیداتیو استفاده می‌کند. سلول‌ها در هنگام مواجهه با استرس اکسیداتیو، به‌سرعت ظرفیت‌های آنتی‌اکسیدانی خود را افزایش می‌دهند تا بدین وسیله علاوه بر مقابله با میزان افزایش‌یافته مواد اکسیداتیو درون سلول، باعث پایداری هموستازی خود نیز شوند.

پروتئین *Nrf2* یک نوع فاکتور رونویسی هسته‌ای است که نقش اساسی در شبکه تنظیم‌کننده ژن‌های هموستازی و ردوکس ایفا می‌کند. در واقع تحت شرایط استرس اکسیداتیو و الکتروفیلیک، مسیر انتقال *Nrf2* فعال می‌شود و سپس میزان بیان انواع اکسیدان‌ها و آنزیم‌های فاز دوم سیستم سم‌زدایی افزایش می‌یابد. به‌طور کلی اثبات شده است که افزایش بیان ژن‌های وابسته به *Nrf2* منجر به سم‌زدایی آلاینده‌ها از جمله فلزات سنگین درون سلول‌ها و تسکین آسیب ناشی از استرس اکسیداتیو درون ارگانیسم‌ها می‌شود.

با وجود اهمیت ترکیبات اکسیداتیو و اثرات سمی آن در انسان استفاده از رده سلولی نوترکیب حامل ژن گزارشگر برای سنجش ترکیبات اکسیداتیو همچون فلزات سنگین مفید به نظر می‌رسد. به‌کارگیری زیست‌حسگرهای سلولی فلزات سنگین که حاوی یک ژن گزارشگر تحت کنترل پروموتور حساس به حضور انواع یون‌های سنگین هستند، در حضور این آلاینده‌ها سیگنالی ایجاد می‌کنند که قابل شناسایی و اندازه‌گیری است؛ در نتیجه استفاده از آنها در سنجش آلودگی فلزات سنگین علاوه بر مزیت بزرگ سنجش غلظت در دسترس زیستی این عناصر، دارای مزایای دیگری نظیر صرف زمان و هزینه کمتر و سهولت کاربرد آنها است^[6].

در مواجهه انسان با سرب دو دسته از سیستم‌های سم‌زدایی در بدن به کار می‌افتد. فرآیندهای سم‌زدایی فاز ۱ توسط خانواده آنزیمی سیتوکروم P450 صورت می‌گیرد و خانواده آنزیم‌های فاز ۲ روی محصولات فاز ۱ عمل می‌کنند و باعث افزایش حلالیت این ترکیبات و کاهش سمیت آنها با مکانیزم‌های مختلف می‌شوند^[7].

رده سلولی هیپاتومای انسانی (Huh7) در چندین مدل "در شیشه" سنجش سمیت مورد استفاده قرار گرفته است. خصوصاتی همچون فنوتایپ پایدار، امکان تولید مجدد، ارزان‌قیمت بودن و از همه مهم‌تر نشان‌دادن خواص نرمال سلول‌های هیپاتوسایت، این رده سلولی را برای مطالعات متابولیک کبد، سمیت مواد گزونیوتیک و جست‌وجوی فاکتورهای آنتی‌توکسیک منحصر به فرد کرده است. اگر چه هیپاتوسیت‌ها بهترین مدل برای مطالعه اثر و متابولیسم داروها و سایر ترکیباتی که در کبد متابولیزه

از سلول‌های کشت شده به میزان مساوی در چاهک‌های پلیت ۲۴ خانه ریخته شد. به هر چاهک ۵۰۰ میکرولیتر محیط کشت حاوی سرم ۵% و بدون آنتی‌بیوتیک اضافه شد. بعد از گذشت یک روز محیط قبلی خارج و با ۴۰۰ میکرولیتر بافر فسفات‌سالین (PBS) شسته و به هر چاهک محیط کشت جدید فاقد سرم و آنتی‌بیوتیک اضافه و پلیت به انکوباتور منتقل شد. برای هر چاهک مقدار ۰/۸ تا ۱/۲ میکروگرم پلاسمید و ۵۰ میکرولیتر محیط کشت فاقد سرم و آنتی‌بیوتیک به‌طور جداگانه در ویال‌ها تهیه شد. این وکتورهای رقیق شده با ۲ میکرولیتر لیپوفکتامین که در ۵۰ میکرولیتر محیط کشت فاقد سرم و آنتی‌بیوتیک حل شده بودند با هم مخلوط و به مدت ۲۰ دقیقه در دمای اتاق انکوبه شدند. ۱۰۰ میکرولیتر از مخلوط ایجاد شده را به آرامی به هر چاهک اضافه و پلیت‌ها به انکوباتور منتقل شدند و روز بعد محیط کشت سلول‌ها تعویض شد.

سنجش میزان بیان لوسیفراز در سلول‌های ترانسفکشن شده با دستگاه لومینومتر: ابتدا لیز سلول‌ها انجام شد، به این صورت که بعد از تخلیه محیط کشت و شست‌وشوی سلول‌ها با PBS به هر چاهک ۷۰ میکرولیتر بافر لیز اضافه شد. پلیت به مدت ۲۰-۱۵ دقیقه در ظرف یخ شیک شد و عصاره سلولی جمع‌آوری شده به مدت ۲-۱ دقیقه ورتکس شدید شد. ۵ میکرولیتر از محصول لیز شده زیست‌حسگر با ۵ میکرولیتر کمپلکس سنجش در داخل لوله‌های مخصوص لومینومتر مخلوط و به دستگاه لومینومتر که روی طول موج ۵۶۰ نانومتر تنظیم شده بود منتقل شد. سپس نور تولید شده توسط دستگاه لومینومتر بر حسب RLU/Sec قرائت شد. میزان RLU/Sec نشان‌دهنده میزان فعالیت آنزیم لوسیفراز بیان شده در سلول‌ها بعد از انجام موفقیت‌آمیز ترانسفکشن است.

سنجش حساسیت سلول‌های ترانسفکشن شده به سرب: به منظور بررسی میزان فعالیت لوسیفراز رده سلولی Huh7-1x-ARE-luc در حضور ماده اکسیداتیو (سرب)، تیمار این سلول‌ها با غلظت‌های مختلف سرب (۸۰- میکرومولار) صورت گرفت. سپس طبق روش ذکر شده در بالا میزان فعالیت لوسیفراز آن با دستگاه لومینومتر، سنجیده شد.

استخراج RNA و سنتز DNA مکمل: به منظور بررسی میزان بیان ژن‌های مورد نظر در سلول‌های تحت تیمار سرب استخراج RNAی این سلول‌ها ضروری است. بعد از استخراج RNA طبق دستورالعمل کیت استخراج RNA، کیفیت و کمیت RNA استخراج شده به ترتیب توسط الکتروفورز روی ژل و دستگاه نانو دراپ (ترموفیشر ساینترفیک؛ ایالات متحده) مورد سنجش قرار گرفت. سپس سنتز DNA مکمل توسط کیت سنتز cDNA (فرمنتاز- ایالات متحده) انجام شد.

آماده‌سازی پرایمرها برای انجام واکنش زنجیره‌ای پلیمرز معکوس (RT-PCR): طراحی پرایمرها توسط ابزار طراحی پرایمر سایت NCBI، به آدرس اینترنیتی

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/index.cgi?LINK=BlastHome> انجام گرفت. برای جلوگیری از تکثیر DNA ژنومی، پرایمرها طوری طراحی شدند که اتصالات اگزونی را تکثیر نمایند. در این پروژه از ژن *Gapdh* به عنوان کنترل داخلی استفاده شد. توالی و مشخصات پرایمرهای به کار رفته به شرح زیر بود (جدول ۱):

بررسی بیان ژن‌ها به روش RT-PCR: پس از سنتز cDNA مورد نظر از RNAهای استخراج شده، برای اطمینان از صحت واکنش رونویسی معکوس و اختصاصی بودن پرایمرها برای ژن‌های مذکور، واکنش RT-PCR هر یک از ژن‌های مورد نظر انجام شد و به منظور

می‌شوند، هستند ولی به علت محدودیت‌ها از سلول‌های هپاتوما در تحقیقات استفاده می‌شود. رده سلولی Huh7 دارای نزدیک‌ترین سطح از نظر پروفایل بیان آنزیم‌های فاز I و II در استرس اکسیداتیو با هپاتوسیت‌ها است و به همین دلیل این رده کارسینومای کبدی برای به کارگیری سیستم زیست‌سنجش در این پروژه مناسب به نظر می‌رسد.

فلز سرب به عنوان یک اکسیدان باعث افزایش بیان ژن‌های دربردارنده توالی ARE در پروموتورشان (NQO1) می‌شود و این امر توسط رهایی و افزایش فاکتور *Nrf2* صورت می‌پذیرد و به دنبال آن بیان ژن لوسیفراز هم افزایش خواهد یافت. از این ویژگی می‌توان برای ردیابی سرب توسط این زیست‌حسگر بهره برد. از این رو با وجود اهمیت ترکیبات اکسیداتیو و اثرات سمی آن در انسان استفاده از رده سلولی نوترکیب حامل ژن گزارشگر برای سنجش ترکیبات اکسیداتیو همچون فلزات سنگین مفید به نظر می‌رسد.

با توجه به اهمیت اکسیدان‌ها و بررسی‌های اندک در زمینه ساخت زیست‌حسگر مناسب، در واقع هدف این تحقیق استفاده از زیست‌حسگر سلولی برای اندازه‌گیری مقدار سرب موجود است که متشکل از رده سلولی Huh7 و وکتور حامل ژن لوسیفراز تحت کنترل پروموتور مرکزی ARE سلول‌های نوترکیب است.

مواد و روش‌ها

تهیه پلاسمید نوترکیب: پلاسمید pGL4.26 (سیگما؛ ایالات متحده) به دلیل داشتن پروموتور حداقل وکتور مناسبی برای کلونینگ و انتقال عوامل پاسخ‌های مختلف در بالادست پروموتور است. زیرا این وکتور در شرایط نرمال دارای حداقل بیان لوسیفراز است و می‌توان با کمک آن تفاوت فعالیت لوسیفراز را در حضور ماده فعال‌کننده و عدم حضور ماده فعال‌کننده نشان داد. ۲۲ الیگونوکلوئید مربوط به پروموتور مرکزی ARE که برای تحریک بیان ژن‌های پاسخگو به مواد دارای خاصیت اکسیداتیو است در این وکتور کلون شد. بعد از انتقال وکتور نوترکیب به باکترهای مستعد Top10، استخراج پلاسمید این باکترهای ترانسفرم شده با کمک کیت و روش دستی انجام شد. در نهایت غلظت و خلوص پلاسمید استخراج شده با دستگاه نانو دراپ (ترموفیشر ساینترفیک؛ ایالات متحده) اندازه‌گیری شد.

تایید کلونی‌های حاوی وکتور نوترکیب: برای تایید کلونی‌های مورد نظر از دو روش هضم آنزیمی، با استفاده از آنزیم *EcoRV* که جایگاه برش آن روی نوکلئوتید شماره ۴۲ است و تعیین توالی پلاسمیدهای استخراج شده با پرایمر اختصاصی وکتور، استفاده شد.

سنجش قابلیت مهارکنندگی کشت سلول‌های Huh7 به روش MTT assay: برای سنجش قابلیت متابولیک سلول‌های Huh7 به هیگرومایسین (مارکر مقاومتی این رده سلولی) از روش MTT استفاده شد. به این منظور از سلول‌های کشت شده Huh7 در هر چاهک پلیت‌های ۹۶ خانه به تعداد ۱۵۰۰۰ عدد به صورت تکرارهای سه‌تایی کشت داده شد. ۲۴ ساعت بعد، پس از چسبیدن سلول‌ها به کف پلیت، سلول‌ها در مجاورت غلظت‌های ۰ تا ۹۰۰ میکرومولار هیگرومایسین، به مدت ۲۴ ساعت قرار گرفته و سپس قابلیت متابولیک به روش MTT assay در سلول‌های تیمار شده با ترکیب مذکور، اندازه‌گیری شد.

ترنسفکشن وکتور نوترکیب به سلول‌های Huh7 با لیپوفکتامین ۲۰۰۰: لیپوفکتامین برای ترنسفکشن اسیدهای نوکلئیک DNA و RNA به داخل سلول‌های یوکاریوتی به کار می‌رود. روش کار به اختصار به شرح زیر است:

یکسان سازی ترکیبات در همه تیوب های PCR، یک محلول اصلی از کلیه ترکیبات مورد استفاده به غیر از پرایمر یا cDNA ساخته شد. واکنش PCR در حجم ۲۰ میکرولیتری در دستگاه ترموسایکلر انجام شد. مراحل انجام واکنش به صورت زیر بود (جدول ۲).

جدول ۱) نام و مشخصات پرایمرهای مورد استفاده در واکنش های RT-PCR و Real-time PCR

ژن	دمای اتصال اندازه	توالی (۵'-۳')
<i>NRF2</i>	۶۰	F5'-ATCCATTCTGAGTTACAGTGTCT-3' R5'-TGGAGAGGATGCTGCTGAAG-3'
<i>NQO1</i>	۶۰	F5'-CCAATTCAGAGTGGCATTCTGC-3' R5'-GGAAGTTTAGGTCAAAGAGGCTG-3'

جدول ۲) برنامه دمایی و زمانی واکنش RT-PCR

دمای زمان	دمای زمان	دمای زمان	دمای زمان	دمای زمان
واکنش اولیه	واکنش	اتصال	طویل شدن	طویل شدن نهایی
۱۰ دقیقه در ۹۵°C	۲۰ ثانیه در ۹۵°C	۳۰ ثانیه - مطابق	۲۰ ثانیه در ۹۵°C	۷ دقیقه در ۷۲°C

ریل تایم PCR (Real time PCR): بعد از الکتروفورز محصولات RT-PCR مراحل انجام واکنش ریل تایم PCR انجام شد. تعیین کمیت ژن های مورد نظر براساس روش مقایسه ای انجام گرفت. برای این منظور از SYBR Green، پرایمرهای اختصاصی برای ژن های هدف و *Gapdh* به عنوان ژن کنترل داخلی استفاده شد. این واکنش روی دستگاه Step One (ای بی آی سیستم؛ کانادا) در حجم ۱۰ میکرولیتر و طبق برنامه توصیه شده توسط شرکت ارایه کننده کیت برای ۴۰ سیکل انجام شد. میزان بیان ژن با استفاده از $2^{-\Delta\Delta Ct}$ و نرم افزار Graph pad محاسبه و بین گروه ها مقایسه شد (جدول ۳ و ۴). مواد به کاررفته و برنامه زمانی دستگاه Real-time PCR تنظیم شد.

جدول ۳) نوع و میزان مواد مورد استفاده در هر واکنش Real time PC

مقادیر مورد استفاده (میکرولیتر)	مواد مورد استفاده در Real-time PCR
۵	SYBR Green
۱	Primers (R+F)
۰/۵	cDNA (۱۵۰ نانوگرم)
۳/۵	dd-Water

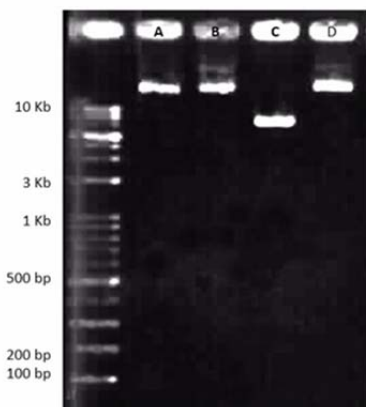
جدول ۴) برنامه تنظیم شده برای انجام واکنش Real-time PCR

سیکل	زمان	دمای (درجه سانتی گراد)	مراحل
۱	۱۰ دقیقه	۹۵	دنا تورا سیون اولیه
۴۰	۳۰ ثانیه	۹۵	دنا تورا سیون
	۳۰ ثانیه	۶۴	اتصال
	۲۰ ثانیه	۷۲	گسترش
۱	-	-	منحنی ذوب

تهیه سازه pGL4.26/ARE: برای تهیه سازه شناسایی کننده مواد اکسیداتیو که حاوی ژن گزارشگر تحت کنترل پروموتور پاسخگو به اکسیدان ها است از وکتو رپلاسمیدی pGL4.26 (پرومگا؛ ایالات متحده) استفاده شد.

کلون کردن قطعه پروموتور مرکزی ARE در پلاسمید: پس از حذف آنزیم و بافرها و خالص سازی محصول برش با آنزیم، با استفاده از T4 DNA Ligase پس از محاسبه مقادیر لازم از قطعه پروموتور مرکزی ARE و وکتور برای واکنش لیگاسیون، الحاق صورت گرفت. سپس محصول لیگاسیون به باکتری های Top10 منتقل و باکتری ها روی پلیت حاوی آنتی بیوتیک آمپی سیلین کشت داده شد.

برای تشخیص کلونی های دارای وکتور نوترکیب از روش هضم آنزیمی و تعیین توالی استفاده شد. در این روش پس از تخلیص پلاسمید از کلونی های مورد نظر هضم آنزیمی این پلاسمیدها توسط آنزیم محدودالتر *EcoR V* انجام شد. از آن جا که این جایگاه روی نوکلئوتید شماره ۴۲ قرار دارد، در صورت موفق بودن پروسه کلونینگ و وارد شدن قطعه ۳۶ نوکلئوتیدی به وکتور در حد فاصل نوکلئوتیدهای ۳۴ تا ۶۶، جایگاه برش برای آنزیم محدودالتر *EcoR V* از بین می رود (شکل ۱).



شکل ۱) نتیجه هضم آنزیمی با آنزیم محدودالتر *EcoR V*. کنترل منفی ردیف C که در اثر هضم آنزیمی به صورت خطی درآمده است. ردیف A و B که چهار هضم آنزیمی نشدند و برای تایید نهایی مورد توالی یابی قرار گرفتند و ردیف D که وکتور سوپرکویل بدون اثر آنزیم است.

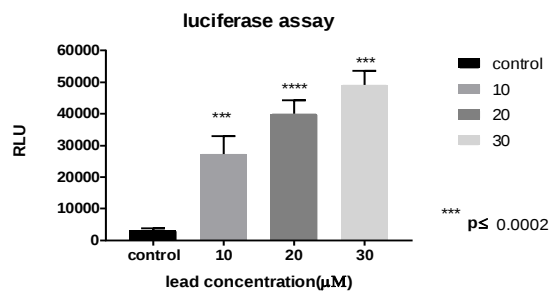
پس از تایید کلونینگ به روش هضم آنزیمی و پس از بررسی کیفیت آن با مشاهده روی ژل الکتروفورز و محاسبه غلظت آن با نانودراپ، وکتور مذکور برای تعیین توالی فرستاده شد.

تعیین حساسیت آنتی بیوتیکی سلول های Huh7 به هیگرومیسین: یکی از شرایط تولید لاین های پایدار سلولی مطابق با روش Dominant Selection Markers انتخاب داروی مناسب است. مارکر انتخابی برای وکتور pGL4.26 در سلول های یوکاریوتی آنتی بیوتیک هیگرومیسین است و با آن می توان سلول های پایدار و حاوی پروموتور مرکزی ARE را انتخاب کرد. بنابراین اولین مرحله کار تعیین دامنه حساسیت سلول های Huh7 به آنتی بیوتیک هیگرومیسین است.

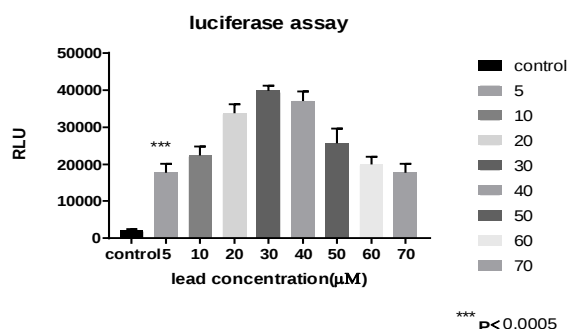
بعد از کشت سلول ها در چاهک ها پیلیت ۹۶ خانه سلول ها با غلظت های ۹۰۰-۱۰ میکرو مولار هیگرومیسین به مدت ۴۸ ساعت به صورت تکرارهای سه گانه تیمار شدند. در پایان آزمون مشخص شد که مقدار هیگرومیسین مورد نیاز برای از بین بردن نیمی از سلول های ترانسفرم نشده ۴۵۰ میکرو مولار است زیرا پس از انجام آزمایش MTT میزان جذب در خانه های مربوط به غلظت ۴۵۰ میکرو مولار به حدود نصف چاهک با غلظت صفر از دارو رسیده بود.

تعیین حساسیت سلول ها به سرب: برای بررسی قابلیت متابولیک سلول های Huh7 در حضور غلظت های مختلف سرب، این سلول ها با دامنه غلظت ۸۰-۱۰ میکرومولار از سرب به مدت ۴۸ ساعت تیمار شدند. بعد از سپری شدن زمان تیمار آزمایش MTT برای این سلول ها انجام شد.

به منظور مشخص نمودن فعالیت اولیه پروموتور مرکزی ARE، برای بررسی تاثیر مواد اکسیداتیو، پلاسمید ایجاد شده از طریق لیپوفکتامین ۲۰۰۰ به رده سلولی Huh7 ترنسفکت شد. بعد از



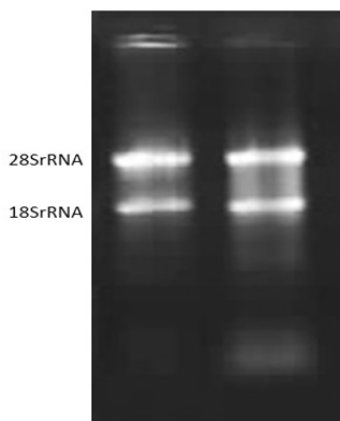
نمودار ۳) نتایج حاصل از افزایش فعالیت پروموتور مرکزی ARE بعد از تیمار.



نمودار ۴) سنجش فعالیت سازه pGL4.26/ARE Core Promoter در حضور سرب بعد از پاساژ پنجم سلول ها. افزایش بیان ژن گزارشگر در حضور ترکیبات اکسیدان نشان دهنده تحریک پروموتور مرکزی ARE و تایید سازه است.

بررسی کیفیت RNA استخراج شده روی ژل آگارز: RNA استخراج شده روی ژل آگارز ۱٪ الکتروفورز شد. دو باند ۲۸S و ۱۸S به طور واضح قابل تشخیص بود که حضور این باندها نشان دهنده سالم بودن RNA بودند. شدت باند ۲۸S بیشتر از باند ۱۸S بود (شکل ۲). عدم حضور باندهای اضافه نشان دهنده خلوص RNA استخراج شده بود.

بررسی بیان ژن های درگیر در مسیر آنتی اکسیدانی ARE/KEAP1 به طریق RT-PCR: نتایج RT-PCR نشانگر بیان تمامی ژن های انتخاب شده در این مطالعه شامل *Nrf2* و *NQO1* در سلول های سرطانی کبدی (Huh7) بود (شکل ۳). با توجه به طراحی پرایمرها و اندازه قطعات مورد نظر (*Nrf2* با اندازه ۲۰۳ جفت باز و *NQO1* با اندازه ۱۹۰ جفت باز) و نتایج حاصل از تکثیر این ژن ها در واکنش RT-PCR دقیقاً این ژن ها با همان اندازه مولکولی و بدون هیچ قطعه غیراختصاصی تکثیر شدند که صحت تکثیر صحیح این ژن ها را نشان داد.



شکل ۲) بررسی کیفیت RNA استخراج شده از سلول های Huh7 روی ژل آگارز

ترنس فکشن، میزان بیان لوسیفراز با دستگاه لومینومتر مورد بررسی قرار گرفت.

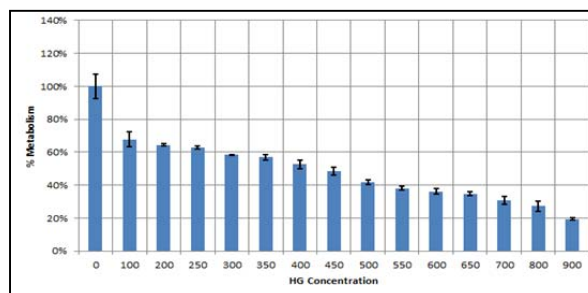
انتخاب سلول های پایدار و سنجش فعالیت زیست حسگر پروموتور مرکزی ARE pGL4.26 در حضور سرب بعد از پاساژ دادن سلول ها: بعد از انتخاب سلول ها به وسیله مارکر مقاومت به آنتی بیوتیک، ۵ بار پاساژ داده شدند تا از الحاق وکتور به درون ژنوم مطمئن شده و به منظور تایید نهایی سازه ساخته شده تحت تیمار با سرب قرار گرفت. داشتن فنوتیپ پایدار پس از چندین پاساژ یکی از روش هایی است که به منظور اطمینان از الحاق پلاسمید در ژنوم به کار برده می شود.

پس از سنتز cDNA، بیان ژن *Nrf2* و *NQO1*، که ژن های اصلی در مسیر پیام رسانی ARE/KEAP1 هستند، بین نمونه های تیمار شده با غلظت سرب ۳۰ میکرومولار و نمونه کنترل تیمار نشده مقایسه شد.

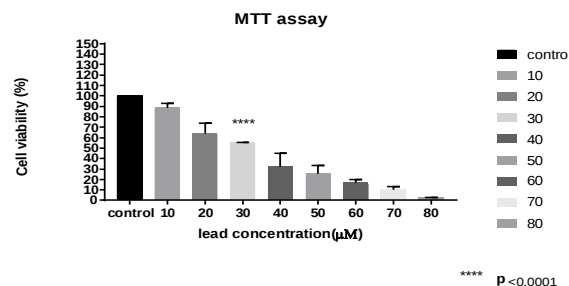
تحلیل های آماری: تحلیل های آماری با روش ΔCt و با استفاده از نرم افزار graphpad prism 6 انجام شد.

یافته ها

نتیجه تعیین توالی، حضور قطعه پروموتور مرکزی ARE در وکتور و تطابق توالی آن با توالی سفارش داده شده اولیه را تایید کرد. میزان ۴۵۰ میکرو مولار هیگرومایسین برای فرآیند انتخاب سلول های ترانسفرم شده در نظر گرفته شد (نمودار ۱). در غلظت ۳۵ میکرومولار از سرب متابولیزم نیمی از سلول ها مهار شدند (نمودار ۲). با افزایش غلظت سرب میزان فعالیت لوسیفراز نیز افزایش یافت و این افزایش فعالیت مربوط به تحریک پروموتور مرکزی ARE با ماده اکسیداتیو (سرب) بود (نمودار ۳). این آزمایش عملکرد صحیح پروموتور مرکزی ARE را در حضور ترکیبات اکسیدان تایید کرد. سازه ساخته شده در حضور محرک ها نسبت به کنترل (سلول تیمار نشده) دارای بیان بالای ژن گزارشگر لوسیفراز بود و این موضوع حضور پروموتور مرکزی ARE را در ژنوم و در نتیجه ساخت زیست حسگر مورد نظر را تایید می کند (نمودار ۴).



نمودار ۱) اثر مهار کنندگی هیگرومایسین بر سلول های Huh7 با آزمایش MTT. سلول ها با غلظت های مختلف از هیگرومایسین تیمار شدند.



نمودار ۲) اثر سمیت سرب بر سلول های Huh7 با آزمایش MTT. سلول ها با غلظت ۸۰-۱۰۰ میکرومولار از سرب تیمار شدند.

بحث

زندگی مدرن امروزی همراه با افزایش استرس‌های محیطی، مواجهه با مواد شیمیایی و آلودگی‌ها باعث تجمع رادیکال‌های آزاد در بدن می‌شود. رادیکال‌های آزاد و عوامل محیطی اکسیداتیو مثل فلزات سنگین، قابلیت آسیب‌رساندن به اسیدهای نوکلئیک و پروتئین‌ها و ایجاد اختلال در عملکرد این ماکرومولکول‌ها را دارند. در مطالعات اخیر استرس اکسیداتیو یکی از کشنده‌ترین مکانیزم‌های موثر سمیت فلزات سنگین همچون سرب مطرح شده است. بدن انسان مکانیزم‌های متعددی را برای مقابله با این استرس‌های اکسیداتیو در پیش می‌گیرد که مهم‌ترین آنها تولید آنتی‌اکسیدان‌ها است. در صورت برهم‌خوردن تعادل بین این ترکیبات و آنتی‌اکسیدان‌ها شرایطی ایجاد می‌شود که استرس اکسیداتیو خوانده می‌شود [8]. به همین دلیل ارگانیزم‌ها خود را به مقدار کافی از آنتی‌اکسیدان‌ها مجهز کرده‌اند.

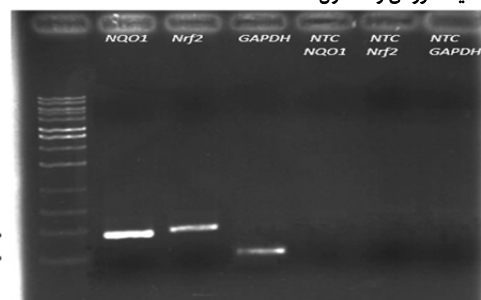
مطالعات انجام‌شده روی پروتئین‌های این مسیرها، نحوه تنظیم و عملکرد آنها را روشن کرده است. از جمله ژن‌های دخیل در فرآیند آنتی‌اکسیدانی فاکتور *Nrf2* است که نقش کلیدی در حفاظت ارگانیزم‌ها در برابر استرس‌های محیطی و داخل سلولی دارد [9].

به‌علت اینکه سرب هیچ نقش فیزیولوژیکی در بدن ندارد [10] سطح طبیعی آن در بدن انسان باید نزدیک به صفر باشد. پترسون در سال ۱۹۶۵ میزان سرب مجاز در خون را ۰/۰۰۲۵ پی‌پی‌ام که معادل ۰/۲۵ میکروگرم بر دسی‌لیتر بود، گزارش کرده است [11].

در مطالعات اخیر حداقل میزانی از سرب که باعث مسمومیت در بچه‌ها و جنین می‌شود ۱۰ تا ۱۵ میکروگرم بر دسی‌لیتر گزارش شده است، به‌طوری که در برخی مطالعات مشخص شده است که میزان حداقل ۵ میکروگرم سرب در هر دسی‌لیتر خون کودکان سبب اثرات سوء بر بهره‌هوشی خواهد شد و این اثرات با افزایش تماس با سرب و افزایش غلظت خونی آن افزایش خواهد یافت. تماس با سرب در کودکان می‌تواند منجر به اختلال تمرکز و پرخاشگری شود، زیرا سرب به پیوندهای عصبی آسیب رسانده (به‌خصوص در بچه‌ها) و موجب بیماری‌های خونی و مغزی می‌شود [12]. به همین دلیل طراحی و به‌کارگیری سیستم‌های پایش سمیت سربی که بتوانند کمترین میزان سرب موجود در محیط (حداقل میزان مجاز سرب) را تشخیص دهد بسیار حایز اهمیت است.

امروزه استفاده از مدل‌های حیوانی برای یافتن سموم کبدی علاوه بر صرف هزینه بالا، زمان‌بر نیز هست. استفاده از روش‌های "در شیشه" سریع تحت عنوان بازده بالا غربالگری (HTS) بر پایه سلول قادر است در زمانی کوتاه اطلاعات عظیمی از سمیت‌سنجی مواد آلاینده محیطی همچون فلزات سنگین موثر بر سلول‌های کبدی را در اختیار محققان قرار دهد. از میان تمام روش‌های متفاوت سنجش میزان سمیت مواد، استفاده از ژن گزارشگر *بتالاکتاماز* تحت پروموتور حاوی توالی *ARE (ARE-bla)* این قابلیت را دارد تا بیش از ۱۰۰۰۰۰ ماده شیمیایی اکسیداتیو را شناسایی کند. زیست‌حسگر سلولی ترکیبات اکسیداتیو (*pGL4.26-ARE*) که حاوی یک ژن گزارشگر تحت کنترل پروموتوری حساس به حضور انواع اکسیدان‌ها است، در حضور این آلاینده‌ها سیگنالی ایجاد می‌کند که قابل شناسایی و اندازه‌گیری است؛ در نتیجه استفاده از آن در سنجش آلودگی ترکیبات اکسیداتیو القاکننده مسیر سیگنالینگ *Nrf2-ARE* است. علاوه بر امتیاز بزرگ سنجش غلظت‌های در دسترس زیستی این عناصر، دارای مزایای دیگری نظیر صرف زمان و هزینه کمتر و سهولت کار با آن است.

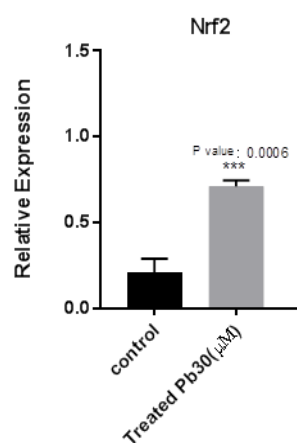
به‌منظور تایید فعالیت پروموتور مرکزی *ARE* ترنسفاکشن وکتور



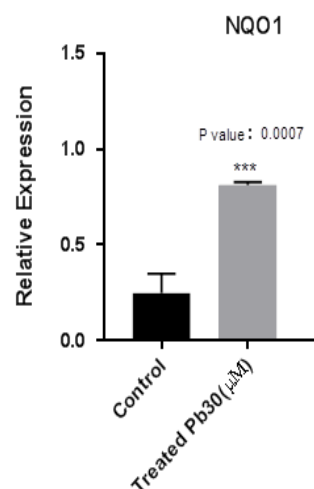
شکل ۳) بیان ژن‌های *Nrf2* و *NQO1* در سلول‌های Huh7

نتایج تحلیل داده‌های Real time-PCR: در سلول‌های تیمار شده با سرب ۳۰ ماکرومولار نسبت به نمونه‌های تیمارنشده کنترل، بیان ژن‌های *Nrf2* و *NQO1* به‌علت خاصیت اکسیدانی سرب افزایش معنی‌داری داشت (*Nrf2*) برابر با $p=0.0006$ *NQO1* برابر با $p=0.0007$ ؛ نمودارهای ۵ و ۶).

بیان ژن *Nrf2* در نمونه‌های تیمار شده با سرب ۳۰ ماکرومولار نسبت به نمونه‌های کنترل افزایش داشت که از نظر آماری نیز معنی‌دار بود. در خصوص میزان بیان ژن *NQO1* در نمونه‌های تیمار شده با سرب ۳۰ ماکرومولار نسبت به نمونه‌های کنترل نیز افزایش معنی‌داری مشاهده شد.



نمودار ۵) افزایش بیان ژن آنتی‌اکسیدانی *Nrf2* در نمونه‌های تیمار شده با سرب ۳۰ ماکرومولار نسبت به کنترل.



نمودار ۶) افزایش بیان ژن آنتی‌اکسیدانی *NQO1* در نمونه‌های تیمار شده با سرب ۳۰ ماکرومولار نسبت به کنترل.

داشته‌اند و جناب پروفیسور مجید صادقی زاده تشکر و قدردانی می‌شود.
تأییدیه اخلاقی: موردی از سوی نویسندگان گزارش نشده است.
تعارض منافع: موردی از سوی نویسندگان گزارش نشده است.
سهم نویسندگان: سعیده کاووسی (نویسنده اول)، نگارنده مقدمه/پژوهشگر اصلی (۲۰٪)؛ هادی شیرزاد (نویسنده دوم)، روش‌شناس/نگارنده بحث (۲۰٪)؛ شیرین جلیلی (نویسنده سوم)، پژوهشگر کمکی/تحلیلگر آماری (۲۰٪)؛ مجید صادقی‌زاده (نویسنده چهارم)، پژوهشگر کمکی/تحلیلگر آماری (۲۰٪)؛ پریا مطهری (نویسنده پنجم)، پژوهشگر کمکی/تحلیلگر آماری (۲۰٪)
منابع مالی: موردی از سوی نویسندگان گزارش نشده است.

منابع

- 1- Radi R. Peroxynitrite, a stealthy biological oxidant. J Biol Chem. 2013;288(37):26464-72.
- 2- Bauer CE, Elsen S, Bird TH. Mechanisms for redox control of gene expression. Annu Rev Microbiol. 1999;53(1):495-523.
- 3- Bermingham-McDonogh O, Gralla EB, Valentine JS. The copper, zinc-superoxide dismutase gene of *Saccharomyces cerevisiae*: Cloning, sequencing, and biological activity. Proc Natl Acad Sci U S A. 1988;85(13):4789-93.
- 4- Aslund F, Zheng M, Beckwith J, Storz G. Regulation of the OxyR transcription factor by hydrogen peroxide and the cellular thiol-disulfide status. Proc Natl Acad Sci U S A. 1999;96(11):6161-5.
- 5- Bai X, Chen Y, Hou X, Huang M, Jin J. Emerging role of NRF2 in chemoresistance by regulating drug-metabolizing enzymes and efflux transporters. Drug Metab Rev. 2016;48(4):541-67.
- 6- Inoue F, Ahituv N. Decoding enhancers using massively parallel reporter assays. Genomics. 2015;106(3):159-64.
- 7- Simmons SO, Fan CY, Yeoman K, Wakefield J, Ramabhadran R. NRF2 oxidative stress induced by heavy metals is cell type dependent. Curr Chem Genomics. 2011;5(1):1-12.
- 8- Floyd RA. Neuroinflammatory processes are important in neurodegenerative diseases: An hypothesis to explain the increased formation of reactive oxygen and nitrogen species as major factors involved in neurodegenerative disease development. Free Radic Biol Med. 1999;26(9-10):1346-55.
- 9- Vasiliou V, Ross D, Nebert DW. Update of the NAD(P)H: Quinone oxidoreductase (NQO) gene family. Hum Genomics. 2006;2(5):329-35.
- 10- Gilfillan SC. Lead poisoning and the fall of Rome. J Occup Environ Med. 1965;7(2):53-60.
- 11- Patterson CC. Contaminated and natural lead environments of man. Arch Environ Health. 1965;11(3):344-60.
- 12- Warniment C, Tsang K, Galazka SS. Lead poisoning in children. Am Fam Physician. 2010;81(6):751-7.
- 13- Hayes JD, McMahon M. NRF2 and KEAP1 mutations: Permanent activation of an adaptive response in cancer. Trends Biochem Sci. 2009;34(4):176-88.

نو ترکیب مورد نظر انجام گرفت که نتایج حاصل از سنجش فعالیت ژن گزارشگر لوسیفراز در نمونه‌های تیمار شده با سرب، تحریک ARE را در حضور ترکیبات اکسیداتیو تأیید کرد. در مرحله بعد و پس از اطمینان از فعالیت ARE مراحل تهیه زیست‌حسگر تحت دخول پلاسمید به صورت مداوم انجام شد. سلول‌های باقی‌مانده در این مرحله در حضور آنتی‌بیوتیک، تحت آزمایش میزان فعالیت ژن لوسیفراز در حضور القاکننده سرب قرار گرفتند. کلون‌های تأیید شده تا ۵ بار پاساژ داده شدند تا ورود پلاسمید به ژنوم تأیید شود. تعدادی از کلون‌ها فنوتیپ پایداری از خود نشان دادند که این مساله ورود پلاسمید به داخل ژنوم را تأیید می‌کند. برای آزمایش زیست‌حسگر سلولی تهیه‌شده پس از پاساژ پنجم از سرب برای القای استرس اکسیداتیو استفاده شد. به عبارت دیگر این ترکیب به عنوان محرک فعالیت پروموتور مرکزی ARE انتخاب شد.

زیست‌حسگر سلولی مورد نظر (pGL4.26-ARE) قادر به ردیابی مواد القا کننده مسیر *Nrf2-ARE* است. در این آزمایش میزان بیان ژن لوسیفراز در غلظت‌های ۰ تا ۸۰ میکرومولار سرب مورد بررسی قرار گرفت. میزان بیان ژن گزارشگر همراه با افزایش مقدار ماده اکسیداتیو افزایش می‌یابد و کاهش بیان ژن گزارشگر بعد از غلظت ۳۰ میکرومولار برای سرب، به علت اثر مهارکنندگی آن روی متابولیسم سلول‌ها مشاهده می‌شود. غلظت ۳۵ میکرومولار از سرب متابولیسم ۵۰٪ سلول‌ها را مهار می‌کند.

در یک تحقیق، زیست‌حسگر HepG2/ARE فقط دارای ۱۰ جفت‌باز از توالی هسته *ARE* بود و در آن از سلول‌های HepG2 برای ساخت زیست‌حسگر استفاده شد^[13]. برای تیمار سلول‌ها در این تحقیق از فلزات گوناگون القاکننده استرس اکسیداتیو برای بررسی حساسیت سازه استفاده شده است. توالی استفاده‌شده در این تحقیق حاوی همه نوکلئوتیدهای ضروری برای القای بیان ژن‌های درگیر در پاسخ به استرس اکسیداتیو نیست و همه القاکننده‌ها را شناسایی نمی‌کند، به طوری که تعدادی از فلزات ایجادکننده استرس اکسیداتیو توسط این زیست‌حسگر شناسایی نشده‌اند.

نتیجه‌گیری

بیان تمامی ژن‌های مورد بررسی شامل *Nrf2* و *NQO1* در سلول‌های Huh7 تیمار شده با سرب ۳۰ میکرومولار، نسبت به بیان همان ژن‌های بدون تیمار با سرب افزایش معنی‌داری دارد. غلظت ۳۰ میکرومولار از سرب باعث افزایش پاسخ استرس اکسیداتیو در سلول‌ها و در نتیجه افزایش بیان ژن‌های این مسیر یعنی *Nrf2* و *NQO1* می‌شود تا بتواند اثر سمیت سرب بر سلول‌ها را کاهش دهد. زیست‌حسگر تهیه‌شده از رده سلولی نو ترکیب Huh7-1x-ARE-luc حامل ژن گزارشگر می‌تواند وسیله مناسب و کارآمدی برای سنجش ترکیبات اکسیداتیو همچون فلزات سنگینی چون سرب باشد.

تشکر و قدردانی: از تمام عزیزانی که در اجرای این پروژه همکاری داشته‌اند به خصوص جناب آقای دکتر هادی شیرزاد ریاست محترم پژوهشگاه علوم انتظامی که حمایت مالی این پروژه را بر عهده