

کاپتوپریل و پاراکوات در بیان ژن و پروتئین p53 و Bcl-2 در نمونه‌های بافت ریه موش صحرایی: روش RT-PCR و ایمونوهیستوشیمی

چکیده

شمیله فولاددل^۱

علی محمدی کرکانی^۲

محمود قاضی خوانساری^۲

ابراهیم عزیزی^{*۱}

۱- آزمایشگاه تحقیقات مولکولی، گروه

داروشناسی و سم‌شناسی، دانشکده داروسازی

۲- گروه داروشناسی، دانشکده پزشکی

دانشگاه علوم پزشکی تهران

* نویسنده مسئول: آزمایشگاه تحقیقات مولکولی، گروه

سم‌شناسی و داروشناسی، دانشکده داروسازی، دانشگاه

علوم پزشکی تهران

تلفن: ۶۶۹۵۹۱۰۰
email: aziziebr@tums.ac.ir

مقدمه

پاراکوات Paraquat به‌عنوان علف‌کش به‌دلیل خصوصیات منحصر به‌فرد دارای مصرف و تولید قابل توجه در سراسر جهان می‌باشد. پاراکوات در انسان پس از جذب از راه خوراکی به‌دلیل حجم توزیع بالا، در تمام ارگان‌های مهم بدن و به‌ویژه در ریه‌ها (بیش از ۱۰ برابر پلاسما) به‌عنوان عضو انتخابی تجمع می‌یابد. به‌طوری‌که در موارد مسمومیت شدید مرگ در اثر نارسایی تنفسی به‌دلیل ادم ریه‌ها و فیبروز حاد می‌گردد.^{۱-۳} تحقیقات نشان داده که فیبروز ریوی حاصل از پاراکوات توسط برخی آنتی‌اکسیدانت‌ها، ملاتونین، شلاته‌کننده‌های آهن و اخیراً داروهای ضد فشارخون نظیر کاپتوپریل قابل جلوگیری یا تاخیر می‌باشد. القای آپاپتوز در سلول‌ها به‌وسیله آنژیوتانسین ۲ و آنژیوتانسینوزن نیز گزارش شده است.^{۳-۸} همچنین تحقیقات اخیر نشان داده است که این داروها و به‌ویژه کاپتوپریل

زمینه و هدف: پاراکوات به‌عنوان علف‌کش به‌دلیل خصوصیات منحصر به‌فرد دارای مصرف و تولید قابل توجه در سراسر جهان می‌باشد. تحقیقات نشان داده که فیبروز ریوی حاصل از پاراکوات توسط برخی مواد نظیر کاپتوپریل قابل جلوگیری یا تاخیر می‌باشد. لذا در این تحقیق نقش کاپتوپریل بر بیان ژن و پروتئین p53 و Bcl-2 در نمونه‌های بافتی ریه موش صحرایی که در تماس با پاراکوات قرار گرفته‌اند مورد ارزیابی قرار گرفت. روش بررسی: اثر محافظتی کاپتوپریل در اثرات سمی پاراکوات بر بیان ژن و پروتئین p53 و Bcl-2 در نمونه‌های بافت ریه موش‌های صحرایی به‌روش ایمونوهیستوشیمی و RT-PCR مورد ارزیابی قرار گرفت. یافته‌ها: داده‌های حاصل از آزمایشات نشان‌دهنده عدم بیان متفاوت پروتئین و mRNA مربوط به p53 در نمونه‌های مورد آزمایش (به‌غیر از مورد mRNA مربوط به کاپتوپریل تنها) بود. اما پروتئین Bcl-2 در نمونه‌های تحت تماس با پاراکوات، پیش‌درمان و پس‌درمان با کاپتوپریل نسبت به کاپتوپریل تنها و کنترل بدون درمان افزایش نشان می‌دهد. نتیجه‌گیری: در مجموع نتایج نشان می‌دهد که پاراکوات باعث صدمه قابل توجه به DNA سلول‌های ریوی در هیچ مورد نشده و لذا میزان بیان پروتئین p53 تغییر چندانی پیدا نکرده است. ولی پاراکوات توانسته است با ایجاد التهاب ریوی منجر به افزایش میزان پروتئین Bcl-2 بدون اثر بر میزان mRNA آن شود. ضمناً کاپتوپریل نتوانسته تاثیر چندانی بر روی اثرات پاراکوات در بیان p53 یا Bcl-2 در نمونه‌های بافتی مورد آزمایش از خود نشان دهد.

کلمات کلیدی: پاراکوات، کاپتوپریل، p53، Bcl-2، سمیت ریه، موش صحرایی.

دارای خواص ضد فیبروز و مهار آپاپتوز در سلول‌های اپیتلیال آلئول‌های ریه می‌باشند^{۹-۱۲} این خواص را به‌وجود گروه‌های تیولی در ساختمان این داروها مرتبط می‌دانند. p53 و Bcl-2 در روند آپاپتوز دخالت داشته و از جمله مولکول‌های کلیدی در وقایع سلولی مرتبط با آپاپتوز می‌باشند. ژن p53 به‌عنوان یک ژن مهار کننده تومور، کد کننده یک فسفوپروتئین داخل هسته است که باعث ثبات ژنتیکی سلول شده، در کنترل عملکرد طبیعی سلول نقش کلیدی دارد. پس از آسیب DNA سطح بافتی این پروتئین افزایش یافته و این به‌منظور توقف چرخه سلول و تحریک مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی است. طبیعی است با موتاسیون و فقدان عملکرد این ژن، توانمندی سلول در ترمیم آسیب‌های DNA کاهش یافته، سرعت پرولیفراسیون تقویت و قدرت القای مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی کاهش می‌یابد.^{۱۳،۱۴} این وضعیت با تاثیر بر جداره میتوکندری باعث غیرفعال شدن Bcl-2 و

محدوده غلظت‌های ۲۰-۵ mg/kg و کاپتوپریل (شرکت سیگما- سنت لوئیز- آمریکا) در محدوده غلظت‌های ۱۰۰-۱ mg/kg مورد استفاده قرار گرفتند و براساس نتایج آزمایشات بافت‌شناسی، غلظت ۲۰ mg/kg از پاراکوات و ۱۰ mg/kg از کاپتوپریل برای کلیه آزمایشات مورد نظر در این طرح مورد استفاده قرار گرفت. پودر پاراکوات در آب مقطر حل گردید و کاپتوپریل در آب‌آشامیدنی حل گردید. برای انجام آزمایشات، تعداد ۴-۵ موش به طور تصادفی در هر گروه تقسیم شدند که شامل گروه کنترل (گروه ۱) که فقط آب آشامیدنی دریافت کردند، گروه پاراکوات (گروه ۲) که ۲۰ mg/kg از پاراکوات به صورت داخل صفاقی دریافت کردند، گروه کاپتوپریل (گروه ۳) که ۱۰ mg/kg از کاپتوپریل در آب‌آشامیدنی در شبانه روز دریافت کردند، گروه پس‌درمان (گروه ۴) که پس از تزریق داخل صفاقی پاراکوات (۲۰ mg/kg) از کاپتوپریل در آب‌آشامیدنی دریافت کردند و گروه پیش‌درمان (گروه ۵) که یک روز قبل از تزریق داخل صفاقی پاراکوات (۲۰ mg/kg) از کاپتوپریل در آب‌آشامیدنی دریافت کردند. میزان آب مصرفی در شبانه‌روز برای هر قفس اندازه‌گیری شد تا مقدار دریافتی کاپتوپریل بر اساس میزان آب آشامیدنی مشخص شود. این رژیم درمانی به مدت ۲۱ روز تا پایان آزمایشات رعایت شدند و سپس موش‌ها را کشته و قفسه سینه باز شد و محلول سرم فیزیولوژی به داخل قلب تزریق شد. سپس ریه موش‌های هر گروه جدا شدند و در محلول ۱۰٪ بافره فرمالین خنثی به مدت ۲۴ ساعت قرار داده شدند تا برای آزمایشات بعدی فیکس شوند. آزمایشات ایمنو‌هیستوشیمی^{۱۶}: برش‌های بافتی از ریه فیکس شده موش‌ها (حدود پنج میکرون) ابتدا در گزین دیارافینه شده و در بافر سترات داغ به وسیله مایکروویو قرار گرفتند تا آنتی‌ژن‌ها در معرض قرار بگیرند. سپس نمونه‌های بافتی مراحل بلوک کردن با آب اکسیژنه و آلبومین سرم گاوی را گذرانده و با آنتی‌بادی‌های اولیه ضد p53 و Bcl-2 به مدت ۱۸-۱۶ ساعت در دمای یخچال انکوبه شدند. برای این تحقیق از Mouse Anti-Human p53 Protein (شرکت داکو- دانمارک) که با نوع موتانت و طبیعی پروتئین مورد نظر واکنش می‌دهد با رقت ۱:۷۵ استفاده شد. همچنین از آنتی‌بادی مخصوص Mouse Anti-Human Bcl-2 (شرکت داکو- دانمارک) که با نوع طبیعی پروتئین واکنش می‌دهد و محل آن سایتوپلاسمیک است با رقت ۱:۸۰ استفاده گردید. پس از انکوباسیون با آنتی‌بادی اولیه در

سایر پروتئین‌های Anti-apoptotic گشته، پروتئین‌های Pro-apoptotic مانند Bak, Bax, Bad فعال می‌شوند. بنابراین فقدان ژن p53 طبیعی طی آسیب‌های DNA، با تداوم در رشد و تکثیر سلول‌های غیر طبیعی، افزایش تغییرات نئوپلاستیک، تقویت عملکرد پروتوانکوژن‌ها و اختلال در فرآیند apoptosis نهایتاً موجب تقویت پرولیفراسیون سلولی خواهد شد. ژن Bcl-2 متعلق به خانواده‌ای از ژن‌هاست که بزرگترین خانواده ژنی مداخله‌گر در مرگ برنامه‌ریزی شده سلول محسوب می‌شود و کدکننده پروتئین‌های تنظیم‌کننده مرگ برنامه‌ریزی شده سلول می‌باشد. Bcl-2 به عنوان یک پروتوانکوژن و مهار کننده apoptosis در سطح میتوکندری باعث جلوگیری از تخریب اکسیداتیو سلول می‌گردد.^{۱۴،۱۵} لذا در این تحقیق نقش کاپتوپریل بر بیان ژن و پروتئین p53 و Bcl-2 در نمونه‌های بافتی ریه موش صحرایی که در تماس با پاراکوات قرار گرفته‌اند مورد ارزیابی قرار گرفت.

روش بررسی

این تحقیق یک مطالعه تجربی است که در سال‌های ۲۰۰۶-۲۰۰۷ در گروه داروشناسی دانشکده پزشکی و گروه داروشناسی و سم‌شناسی دانشکده داروسازی تهران انجام شده است. نمونه‌های بافت ریه موش‌های صحرایی شامل کنترل، پاراکوات، کاپتوپریل، پاراکوات و پس‌درمان کاپتوپریل، پاراکوات و پیش‌درمان کاپتوپریل که در مطالعه قبلی در گروه داروشناسی دانشکده پزشکی تهیه شده بودند در اختیار آزمایشگاه تحقیقات مولکولی دانشکده داروسازی قرار داده شدند. به منظور بررسی‌های مولکولی در ارتباط با بیان ژن و پروتئین p53 و Bcl-2 آزمایشات ایمنو‌هیستوشیمی و RT-PCR به شرح زیر صورت گرفت. موش‌های سفید نر ویستار (Wistar) با وزن ۱۵۰-۳۰۰ گرم از حیوان‌خانه گروه فارماکولوژی دانشکده پزشکی در مراحل مختلف تحقیق مورد استفاده قرار گرفت. حیوانات در قفس‌های استیل با پوشش خاک چوب در دمای ۳±۲۲ درجه سانتیگراد و سیکل ۱۲ ساعت روشنایی و تاریکی نگهداری شدند. حیوانات دسترسی آزاد به آب آشامیدنی و غذای استاندارد مخصوص در طی این تحقیق داشتند. در تمام مراحل تحقیق کلیه ضوابط و شرایط نگهداری و انجام آزمایشات روی حیوانات بر اساس دستورالعمل‌های مصوب کمیته اخلاق دانشگاه صورت پذیرفت. برای تعیین غلظت مورد نظر، پاراکوات (متیل ویولوژن، شرکت سیگما- سنت لوئیز- آمریکا) در

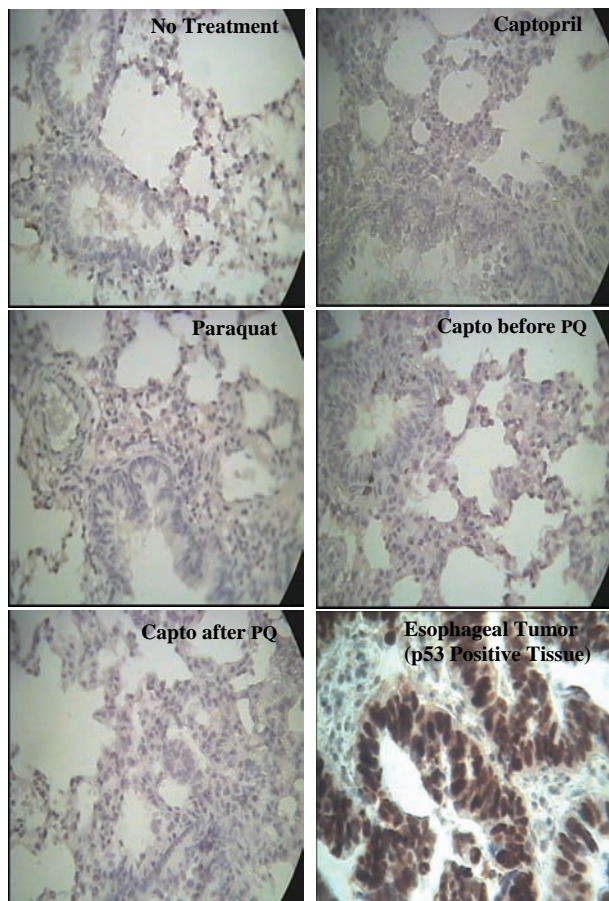
حیوانات کنترل و تحت درمان می‌باشد (شکل ۱). از طرفی بیان پروتئین Bcl-2 در بافت‌های ریه حیوانات کنترل و کاپتوپریل کمتر از حیوانات تحت تماس با پاراکوات می‌باشد (شکل ۲). نتایج RT-PCR: همان‌طور که در روش کار اشاره شد نمونه‌های Total RNA از نمونه‌های بافتی ریه موش‌های کنترل و تحت درمان تهیه گردید و به روش RT-PCR وضعیت بیان ژن‌های p53 و Bcl-2 تعیین گردید. از نمونه‌های Total RNA سلول‌های سرطانی T47D و MCF-7 به‌عنوان کنترل مثبت استفاده گردید. همچنین وضعیت بیان b-Actin به‌عنوان House keeping gene بررسی گردید. بیان mRNA مربوط به p53 و b-Actin فقط در نمونه‌های RNA مربوط به سلول‌های سرطانی (کنترل مثبت) دیده شد ولی نمونه‌های بافتی مورد تحقیق در روش RT-PCR فقط بند واضحی برای p53 با شدت نسبتاً متفاوت نشان دادند (شکل ۳). همچنین علیرغم انجام آزمایش در شرایط مختلف

هر مورد، از کیت آشکارساز LSAB2 (شرکت داکو- دانمارک) و کروموزن AEC (۳- آمینو- ۹- اتیل کربازول) که پاسخ را به رنگ قرمز نشان می‌دهد مطابق دستورالعمل شرکت سازنده استفاده گردید. معمولاً در این نوع آزمایشات، آنالیز نمونه‌ها در زیر میکروسکوپ بر اساس شدت و سطح گسترش نقاط قرمز با اعداد قراردادی از ۰-۴+ درجه‌بندی می‌شوند. آزمایشات RT-PCR^{۱۵-۱۷}: از نمونه‌های بافتی با استفاده از معرف Trizol، نمونه‌های Total RNA جدا سازی شد و به کمک آنزیم RT و مواد دیگر لازم، نمونه‌های RNA بافت‌ها در دمای ۴۲ درجه به مدت یک ساعت تبدیل به cDNA گردید. سپس با انجام آزمایشات مختلف، شرایط زیر برای انجام PCR و تعیین میزان بیان mRNA مورد نظر انتخاب شد. به طوری که پس از افزودن مواد لازم و مخلوط نمودن آنها در تیوب‌های مخصوص PCR، در طی ۳۶ سیکل با شرایط دمای denaturation ۹۴ درجه به مدت یک دقیقه، دمای annealing برای p53 ۶۹/۴ درجه، برای Bcl-2 ۶۴/۳ درجه و برای b-actin ۵۷ درجه سانتیگراد به مدت یک دقیقه و دمای extension ۷۲ درجه به مدت یک دقیقه و ۲۰ ثانیه و در انتها به مدت هشت دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتیگراد تکثیر cDNA با توجه به پرایمرهای مربوطه صورت گرفت. سپس نتیجه با استفاده از آگاروز ژل الکتروفورزیز در بافر TAE پس از گذشت حدود نیم ساعت توسط دستگاه Photodoc بررسی شد و از ژل عکس گرفته شد تا نسبت سطح بند b-actin به بند مربوط به ژن‌های مربوطه مقایسه شوند. پرایمرهای اختصاصی (شرکت MWG آلمان) که در این تحقیق استفاده شدند شامل موارد زیر بودند:

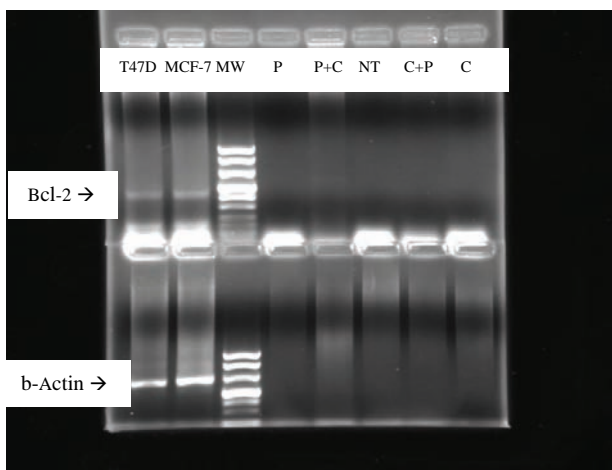
p53(forward),5'-CTGAGGTTGGCTCTGACTGTACCACCATCC-3'
p53(reverse),5'-CTCATTAGCTCTCGGAACATCTCGAAGCG-3'
Bcl-2(forward),5'-GTTCCGGTGGGGTCATGTGTGTGGAGA-3'
Bcl-2(reverse),5'-GCTGATTCGACGTTTTGCCTGAAGAC-3'
b-Actin(forward),5'-TGACGGGGTCAACCCACACTGT-3'
b-Actin(reverse),5'-CTAGAAGCATTGCGGTGGAC-3'

یافته‌ها

بافت‌های مورد آزمایش به روش ایمونوهیستوشیمی با استفاده از آنتی‌بادی‌های ضد p53 و Bcl-2 و به‌کارگیری کیت آشکارساز LSAB2 و کروموزن AEC رنگ‌آمیزی شدند که نمونه‌هایی از آنها در شکل‌های ۱ و ۲ نشان داده شده است. بافت سرطانی مری به‌عنوان کنترل مثبت مورد استفاده قرار گرفت. نتایج حاصل از این آزمایشات نشان‌دهنده عدم تفاوت قابل توجه در بیان پروتئین p53 در بافت‌های ریه



شکل-۱: بیان پروتئین p53 در بافت‌های مورد بررسی به روش ایمونوهیستوشیمی با استفاده از آنتی‌بادی ضد p53، کیت آشکارساز و کروموزن AEC. بافت سرطانی مری به‌عنوان کنترل مثبت برای پروتئین p53 مورد استفاده قرار گرفت

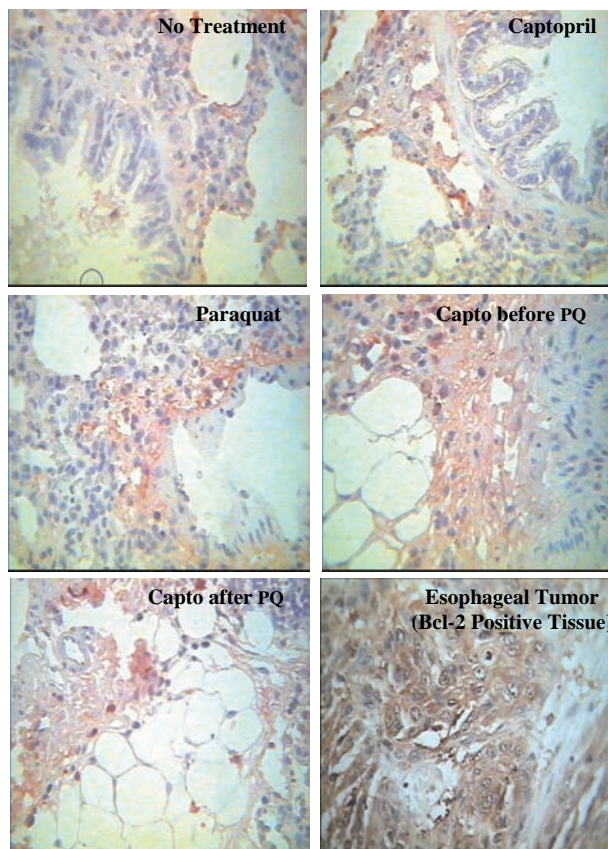


شکل-۴: بیان mRNA مربوط به Bcl-2 با استفاده از Total RNA نمونه‌های بافتی ریه موش‌های کنترل و تحت درمان به روش RT-PCR. از نمونه‌های Total RNA سلول‌های سرطانی T47D و MCF7 به‌عنوان کنترل مثبت استفاده شد. پاراکوات تنها (P)، پاراکوات سپس کاپتوپریل (P+C)، کنترل (NT)، کاپتوپریل قبل از پاراکوات (C+P)، کاپتوپریل تنها (C)

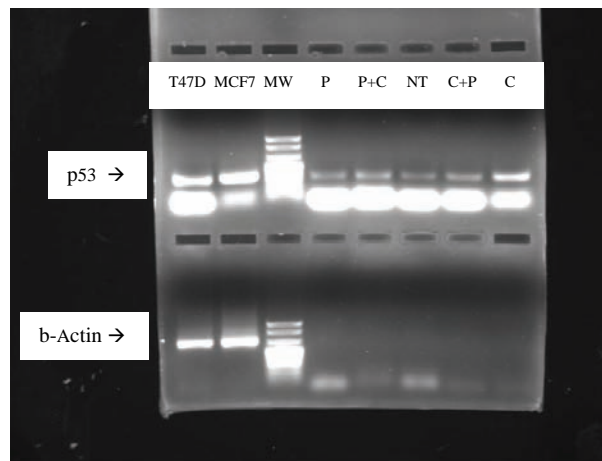
هیچ‌یک از نمونه‌های بافتی مورد تحقیق در روش RT-PCR بند واضحی برای Bcl-2 وژ b-Actin نشان ندادند (شکل‌های ۳ و ۴).

بحث

مطالعات قبلی نشان‌دهنده خواص ضد فیروز و مهار آپاپتوز کاپتوپریل در سلول‌های اپیتلیال آلوئول‌های ریه می‌باشند.^{۹،۱۰} این خواص کاپتوپریل ممکن است مربوط به وجود گروه‌های تیولی در ساختمان این دارو باشد.^{۱۱،۱۲} از طرفی دخالت ژن‌های p53 و Bcl-2 در روند آپاپتوز سلول‌های مختلف با درجات متفاوتی قبلاً گزارش شده است.^{۱۳،۱۴} لذا تصمیم گرفتیم در این طرح تحقیقاتی وضعیت بیان ژن و پروتئین p53 و Bcl-2 در نمونه‌های بافتی ریه موش‌های مورد آزمایش جهت تعیین اثر محافظتی کاپتوپریل در سمت ریوی پاراکوات را مورد ارزیابی قرار دهیم. در این تحقیق وضعیت تعاملات بین این پروتئین‌ها مورد آنالیز واقع شد تا نهایتاً نقش هر یک از آنها در شرایط مختلف آزمایش تعیین گردد. آنچه با استفاده از نتایج ایمونوسیتوشیمی می‌توان بیان نمود این است که بیان پروتئین p53 بر خلاف Bcl-2 تغییری در شرایط مختلف آزمایش نشان نمی‌دهد. این موضوع ممکن است به علت عدم تاثیر ترکیبات مورد آزمایش بر روی DNA سلول‌های بافت ریه حیوانات در شرایط مختلف باشد که نتوانسته باعث افزایش بیان پروتئین p53 شود. از طرفی افزایش بیان



شکل-۲: بیان پروتئین Bcl-2 در بافت‌های مورد بررسی به روش ایمونوهیستوشیمی با استفاده از آنتی‌بادی ضد Bcl-2، کیت آشکارساز و کروموزن AEC. از بافت سرطانی مری به‌عنوان کنترل مثبت پروتئین Bcl-2 استفاده گردید.



شکل-۳: بیان mRNA مربوط به p53 با استفاده از Total RNA نمونه‌های بافتی ریه موش‌های کنترل و تحت درمان به روش RT-PCR. از نمونه‌های Total RNA سلول‌های سرطانی T47D به‌عنوان کنترل مثبت استفاده شد. پاراکوات تنها (P)، پاراکوات سپس کاپتوپریل (P+C)، کنترل (NT)، کاپتوپریل قبل از پاراکوات (C+P)، کاپتوپریل تنها (C)

mRNA برای Bcl-2 و b-Actin کمتر از حد لازم برای تشخیص به روش RT-PCR بوده و ممکن است تعداد کپی آنها در سلول‌های بافت ریه موش‌های صحرایی با استفاده از روش‌های پرخرج نظیر Real-time RT-PCR قابل تعیین باشد. به هر حال تاثیرات مواد مختلف نظیر پاراکوات بر روی سلول‌ها و بافت‌های مختلف در سطوح مولکولی شامل پروتئین و mRNA لزوماً همگام نبوده و گزارشات متعددی مبنی بر تغییر در سطح پروتئین بدون تغییر در سطح mRNA مربوطه وجود دارد که نشان‌دهنده اثر مواد در مرحله Post transcription modification می‌باشد. مطالعات گذشته نشان می‌دهد که داروهای مهارکننده ACE نظیر کاپتوپریل دارای اثرات ضد فیبروزی در بافت‌های تحت مطالعه از نظر آسیب بافتی و ترمیم ضایعات می‌باشد.^{۱۹،۲۰} البته همان‌طور که اشاره شد امکان انجام تحقیق در پروژه‌های بعدی با استفاده از روش‌های تکمیلی وجود دارد تا نسبت به روشن‌تر کردن وضعیت پاسخ‌های بافت ریه به پاراکوات و اثر محافظتی کاپتوپریل اقدام نمود.

پروتئین Bcl-2 در برخی سلول‌های ریوی حیوانات مواجه شده با پاراکوات و پیش‌درمانی یا پس‌درمانی به‌وسیله کاپتوپریل می‌تواند به‌علت پاسخ‌های التهابی ناشی از پاراکوات باشد که باعث تحریک بیان و یا پایداری پروتئین Bcl-2 شده است. نتایج آزمایشات RT-PCR نیز نشان می‌دهد که در سطح mRNA پاسخ‌های سلولی بافت‌های ریوی مورد آزمایش تفاوتی با سطح پروتئین‌های p53 و Bcl-2 دارند. به‌طوری‌که در مقایسه با نمونه‌های RNA سلول‌های سرطانی (به‌عنوان کنترل مثبت) باندهای مربوط به p53 mRNA تقریباً مشابه یکدیگر (کمی بیشتر در کاپتوپریل تنها) در نمونه‌های استخراج‌شده RNA در شرایط مختلف دیده می‌شود. البته افزایش mRNA مربوط به برخی ژن‌ها نظیر p53 و HSP70 در اثر کاپتوپریل در کراتینوسیت‌ها قبلاً نیز گزارش شده است.^{۱۸} علیرغم انجام آزمایش در شرایط مختلف و بر خلاف نمونه‌های کنترل مثبت، باند مشخصی برای Bcl-2 و b-Actin دیده نشد که با توجه به استفاده از همان cDNA که باند p53 را به‌وضوح نشان داده است این امکان وجود دارد که سطح

References

- Day BJ, Patel M, Calavetta L, Chang LY, Stamler JS. A mechanism of paraquat toxicity involving nitric oxide synthase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; 96: 12760-5.
- Darr D, Combs S, Murad S, Pinnell S. Studies on the inhibition of collagen synthesis in fibroblasts treated with paraquat. *Arch Biochem Biophys* 1993; 306: 267-71.
- Lasky JA, Ortiz LA. Antifibrotic therapy for the treatment of pulmonary fibrosis. *Am J Med Sci* 2001; 322: 213-21.
- Clark JG. The molecular pathology of pulmonary fibrosis in connective tissue diseases. *Uitto J and Pereira AJ* 1987; 7: 321-43.
- Chandler DB, Hyde DM, Giri SN. Morphometric estimates of infiltrative cellular changes during the development of bleomycin-induced pulmonary fibrosis in hamsters. *Am J Pathol* 1983; 112: 170-7.
- Seyer JM, Hutcheson ET, Kang AH. Collagen polymorphism in idiopathic chronic pulmonary fibrosis. *J Clin Invest* 1976; 57: 1498-507.
- Franklin TJ. Current approaches to the therapy of fibrotic diseases. *Biochem Pharmacol* 1995; 49: 267-73.
- Crouch E. Pathobiology of pulmonary fibrosis. *Am J Physiol* 1999; 259: 159-84.
- Wang R, Ramos C, Joshi I, Zagariya A, Pardo A, Selman M, et al. Human lung myofibroblast-derived inducers of alveolar epithelial apoptosis identified as angiotensin peptides. *Am J Physiol* 1999; 277: L1158-64.
- Song L, Wang D, Cui X, Shi Z, Yang H. Kinetic alterations of angiotensin-II and nitric oxide in radiation pulmonary fibrosis. *J Environ Pathol Toxicol Oncol* 1998; 17: 141-50.
- Ohishi T, Saito H, Tsusaka K, Toda K, Inagaki H, Hamada Y, et al. Erratum to "Anti-fibrogenic effect of an angiotensin converting enzyme inhibitor on chronic carbon tetrachloride-induced hepatic fibrosis in rats". *Hepato Res* 2002; 22: 322.
- Vavřínková H, Tutterová M, Stopka P, Divisová J, Kazdová L, Drahotka Z. The effect of captopril on nitric oxide formation and on generation of radical forms of mitochondrial respiratory chain compounds in ischemic rat heart. *Physiol Res* 2001; 50: 481-9.
- Levine AJ, Momand J, Finlay CA. The p53 tumour suppressor gene. *Nature* 1991; 351: 453-6.
- Walsh TN, Grannell M, Mansoor S. Predictive factors for success of neo-adjuvant therapy in upper gastrointestinal cancer. *J Gastroenterol Hepatol* 2002; 17 Suppl: S172-5.
- Tamm I, Schriever F, Dörken B. Apoptosis: implications of basic research for clinical oncology. *Lancet Oncol* 2001; 2: 33-42.
- Bidgoli SA, Minaee MH, Ghahremani SN, Djamali-Zavarei M, Azizi E. Immunohistochemical expression of p53 and Bcl-2 proteins in advanced esophageal cancer patients. *ACTA Medica Iranica*, 2005, 43: 313-22.
- Sambrook I, Russell D. Molecular cloning: A laboratory manual. 3rd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press: 2001.
- Baroni A, Buommino E, Aoletti IP. Pemphigus serum and captopril induce heat shock protein 70 and inducible nitric oxide synthase overexpression triggering apoptosis in human keratinocytes. *British J Dermatol* 2004; 150: 1070-80.
- Tsukada S, Parsons CJ, Rippe RA. Mechanisms of liver fibrosis. *Clin. Chim. Acta* 2006; 364: 33-60.
- Ohishi T, Saito H, Tsusaka K, Toda K, Inagaki H, Hamada Y, et al. 2001. Anti-fibrogenic effect of an angiotensin converting enzyme inhibitor on chronic carbon tetrachloride-induced hepatic fibrosis in rats. *Hepato Res* 21: 147-58.

Effect of captopril and paraquat on expression of p53 and Bcl-2 genes and proteins in rat lung tissue using RT-PCR and immunohistochemistry

Fouladdel Sh.¹
Mohammadi-Karakani A.²
Ghazi-Khansari M.²
Azizi E.^{1*}

1- Molecular Research Lab,
Department of Pharmacology and
Toxicology, Faculty of Pharmacy
2- Department of Pharmacology,
Faculty of Medicine

Tehran University of Medical
Sciences

Abstract

Background: Paraquat is an herbicide produced and used prevalently worldwide. Studies have shown that lung fibrosis induced by paraquat can be prevented or delayed by certain antioxidants, iron chelating agents, melatonin, and, recently, blood pressure lowering drugs such as captopril.

Methods: The protective effects of captopril on paraquat toxicity were studied using RT-PCR and immunohistochemistry to determine the gene and protein expression of p53 and Bcl-2 in lung tissue samples from rats treated with captopril before and after exposure to paraquat.

Results: We found no significant difference in the gene and protein expression of p53 in different tissue samples, except for mRNA levels in the lung tissue of captopril-treated rats. However, the protein expression of Bcl-2 is greater in tissue from rats exposed to paraquat alone and paraquat together with pre- and posttreatment with captopril compared to tissue from untreated control rats and from those treated with captopril alone, which can be due to inflammatory responses of lung tissue. By RT-PCR, we were unable to detect Bcl-2 in lung tissue samples.

Conclusion: These results show that paraquat does not induce significant DNA damage; therefore, the gene and protein expression of p53 was not changed. Paraquat does induce lung tissue inflammation, which in turn increases Bcl-2 protein expression. Finally, captopril had no significant effect on the lung tissue toxicity induced by paraquat. Considering these results and the cellular interactions in lung tissue, we suggest that complementary assays and *in-vitro* cell culture experiments be performed to further elucidate the molecular events underlying paraquat lung toxicity.

Keywords: Paraquat, captopril, rat, toxicity, p53, Bcl-2.

* Corresponding author: Molecular
Research Lab, Dept. of Pharmacology and
Toxicology, Faculty of Pharmacy, Tehran
University of Medical Sciences, Tehran,
IRAN
Tel: +98-21-66959100
email: aziziebr@tums.ac.ir