

Original Article

***Induction of Heme Oxygenase -1 by Lipocalin 2 Mediated by NF-κB
Transcription Factor***

***Bahmani P., M.Sc., Halabian R., M.Sc., Masroori N., M.Sc., Rouhbakhsh M., M.Sc.,
Ebrahimi M., M.Sc., Nourani M.R., Ph.D., Shokrgozar M.A., Ph.D.,
Habibi Roudkenar M., Ph.D*.***

** P.O.Box: 14665-1157, Research Center, Iranian Blood Transfusion Organization, Tehran, Iran*

Abstract

Purpose: Effect of lipocalin 2 on the expression of heme oxygenase I , II and NF-κB transcription factor was the purpose of this survey.

Materials and Methods : Lcn2 was cloned to pcDNA_{3.1} plasmid by using genetic engineering method. The recombinant vector was transfected to CHO and HEK293T to establish stable cell expressing lipocalin 2. The presence of lipocalin 2 gene in these cells was confirmed by using through RT-PCR and western blot analysis. Expression of Lcn2 was also down-regulated by siRNA in A549 cell line. Expression of heme oxygenase I , II and NF-κB transcription factor were determined in both ectopic expression Lcn2 cells and Lcn2 down regulated cells by using of RT-PCR and western blot analysis.

Results: The results showed that the expression of heme oxygenase I and those of NF-κB were higher in cells expressing recombinant lipocalin2 compared with the control cells. On the other hand, expression of heme oxygenase I and NF-κB in siRNA transfected cells was down-regulated.

Conclusion: These findings indicate that lipocalin2 induces the expression of HO-1 and suggest Lcn2 through NF-κB induces HO-1 expression

Key words : Lipocalin2 , Heme oxygenase I,II , NF-κB , Oxidative stress

مقاله تحقیقی

القای هم‌اکسیژناز I توسط لیپوکالین ۲ به واسطه فاکتور رونویسی NF-κB

پریسا بهمنی ^{M.Sc.}، راحله حلیان ^{M.Sc.}، ناصر مسروری ^{M.Sc.}، مهدی روحبخش ^{M.Sc.}، مجید ابراهیمی ^{M.Sc.}

محمد رضا نورانی ^{Ph.D.}، محمد علی شکرگزار ^{Ph.D.}، مهیار حبیبی رودکنار ^{Ph.D.}

* گروه بیوشیمی دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات، تهران، ایران

** گروه بیوتکنولوژی و بیولوژی سلولی مولکولی مرکز تحقیقات سازمان انتقال خون ایران، تهران، ایران

*** گروه سلولی مولکولی دانشگاه بقیه الله (عج) تهران، ایران

**** بانک سلولی انستیتو پاستور تهران، ایران

تاریخ وصول: اسفندماه ۸۷، تاریخ پذیرش: اردیبهشت ماه ۸۸

چکیده

هدف: بررسی اثر لیپوکالین ۲ بر بیان آنزیم هم‌اکسیژناز I و II و فاکتور رونویسی NF-κB

مواد و روش‌ها: در این مطالعه ابتدا با استفاده از پلاسمید $PcDNA_{3.1}$ و از طریق مهندسی ژنتیک، رده‌های سلولی پایدار مولد لیپوکالین ۲ ایجاد شد (HEK293-V-Lcn2 و CHO-V-Lcn2). سلول‌های CHO و HEK293 فاقد ژن لیپوکالین ۲ هستند بنابراین پس از انجام ترانسفکشن با بررسی بیان ژن لیپوکالین ۲ ورود ژن به درون این سلول‌ها تأیید شد.

آن‌گاه پس از استخراج RNA از سلول‌های حاوی ژن لیپوکالین نوترکیب از نمونه‌های RNA استخراج شده، cDNA ساخته شده و بیان هم‌اکسیژناز I، II و NF-κB (Nuclear factor kappa B) توسط روش‌های وسترن بلات و RT-PCR بررسی شد.

در مرحله بعد بیان لیپوکالین ۲ توسط SiRNA در رده سلولی A549 کاهش یافت و تأثیر خاموش سازی ژن لیپوکالین ۲ بر بیان آنزیم هم‌اکسیژناز I، II و NF-κB با روش PCR-RT مطالعه شد.

یافته‌ها: تا یج حاصل از آزمون PCR و وسترن بلات بیانگر افزایش بیان آنزیم هم‌اکسیژناز I و فاکتور NF-κB در سلول‌های حاوی وکتور بیان کننده لیپوکالین ۲ در مقایسه با سلول‌های کنترل است. همچنین خاموش سازی ژن لیپوکالین ۲ توسط SiRNA منجر به کاهش بیان هم‌اکسیژناز I و NF-κB در رده سلولی A549 شد.

نتیجه‌گیری: مشاهدات فوق نشان داد که لیپوکالین ۲ باعث افزایش بیان آنزیم هم‌اکسیژناز I می‌شود و با توجه به نتایج به دست آمده در این مطالعه، احتمال می‌رود که لیپوکالین ۲ بتواند با فعال کردن هم‌اکسیژناز I از طریق مسیر NF-κB، با استرس اکسیداتیو مقابله کرده و سبب تعدیل التهابات سلولی ناشی از ROS (Reactive oxygen species) شود.

کلید واژه‌ها: لیپوکالین ۲، هم‌اکسیژناز I، NF-κB، استرس اکسیداتیو

✉ آدرس مکاتبه: تهران، مرکز تحقیقات سازمان انتقال خون،

صندوق پستی ۱۱۵۷-۱۴۶۶۵ E-mail: roudkenar@ibto.ir

مقدمه

لیپوکالین ۲ به خانواده بزرگ و متنوعی از پروتئین‌های محلول و اغلب ترشحی لیپوکالین‌ها تعلق دارد که دارای عملکردهایی همچون انتقال رتینول‌ها و فرمون‌ها، سنتز پروستاگلاندین‌ها، تعدیل پاسخ‌های ایمنی بوده و در هموستاز سلولی و حس بویایی دخیل هستند [۱ و ۲].

لیپوکالین ۲ (24P3) که برای اولین بار در سال ۱۹۸۹ در سلول‌های ابتدایی کلیوی آلوده شده با SV40 در موش شناسایی شده [۳] در بسیاری از بافت‌ها بیان می‌شود و سنتز آن در سلول‌های اپی‌تلالی‌ای که با التهاب مواجه شده‌اند افزایش می‌یابد [۴ و ۵].

تا کنون عملکردهای متنوعی برای لیپوکالین ۲، مانند انتقال آهن و اسیدهای چرب، القای آپوپتوز، مهار رشد باکتریایی و تعدیل پاسخ‌های التهابی [۶] گزارش شده است. با توجه به نتایج برخی مطالعات به نظر می‌رسد که لیپوکالین ۲ یکی از پروتئین‌های فاز حاد (acute phase) نیز باشد چرا که بیان آن به‌صورت تپیک در انواع شرایط التهابی مانند آپاندیس، بیماری‌های التهابی روده، التهاب کولون و آرتریت روماتوئید افزایش می‌یابد [۷-۹]. به‌عنوان مثال واسانتی (vasanthi) در بررسی خود روی ماکروفاژهای تیمار شده با لیپولی ساکارید (LPS: Lipopolysaccharide) و افزایش پایداری را در بیان لیپوکالین ۲ در ماکروفاژهای کبد وریه گزارش کرده است و پیشنهاد می‌کند که افزایش لیپوکالین ۲ اولین پاسخی است که این سلول‌ها در برابر این شرایط بحرانی نشان می‌دهند [۱۰].

همچنین بیان بالایی از لیپوکالین ۲ را در سرطان‌های انسانی مانند سرطان سینه، کولورکتال، آپاندیس، مری و تخمدان شاهد هستیم [۷، ۸، ۱۱ و ۱۲]. اما یکی از نکات قابل توجه افزایش لیپوکالین ۲ در سلول‌هایی است که در معرض شرایط مضر ناشی از تولید رادیکال‌های آزاد هستند مانند مواردی

همچون التهابات، مسمومیت‌ها، صدمات کلیوی، بیماری‌های قلبی، آسیب‌های ناشی از سوختگی، عفونت‌های سلولی، التهابات روده و سرطان [۸ و ۱۴-۱۲].

آسیب اکسیداتیو به ماکرومولکول‌های سلولی به‌وسیله انواع مختلف اکسیژن‌های غیرفعال (ROS) مانند هیدروژن پراکسید، رادیکال‌های آزاد اکسیژن، اکسیژن واحد (Singlet oxygen)، آنیون هیپوکلریت، نیتریک اکسید و آنیون پراکسی نیتريت اعمال می‌شود [۱۵]. از آنجایی که رادیکال‌های آزاد تولید شده در استرس اکسیداتیو ناشی از تابش اشعه (IR) باعث القای Lcn2 در سلول‌های کبد می‌شود، احتمال می‌رود که لیپوکالین ۲ به‌عنوان یک پروتئین پاک‌کننده رادیکال‌های آزاد عمل کرده و باعث محافظت سلول از آسیب به‌وسیله ROS شود [۱۴]. همچنین تحقیقات نشان می‌دهند که لیپوکالین ۲ دارای یک عملکرد محافظتی در برابر توکسیسیتی (سمیت) ناشی از H₂O₂ و Cisplatin است [۱۶ و ۱۷]. اما عملکرد دقیق لیپوکالین ۲ در محافظت در برابر استرس اکسیداتیو و چگونگی انجام این مأموریت هنوز روشن نیست.

از سوی دیگر، استرس‌ها و التهابات سلولی همراه با افزایش در سطح هم‌اکسیژنازا I (HO-1) است [۱۸]. این آنتی‌اکسیدان نه تنها با استرس ناشی از تولید Heme مقابله می‌کند، بلکه بیان آن توسط هیپوکسیا و عواملی همچون فلزات سنگین، اشعه UV، پراکسید هیدروژن و لیپولی ساکارید که باعث افزایش ROS سلولی می‌شوند القا می‌شود [۱۹ و ۲۰]. به‌طوری که پاک‌کننده‌های ROS نظیر N-acetyl cysteine القای هم‌اکسیژنازا I توسط استرس اکسیداتیو را مهار می‌کنند [۲۰].

HO-1 و HO-2 دو ایزوزیم آنزیم هم‌اکسیژنازا، دارای الگوی بیان بافتی متفاوت هستند و در حالی که HO-2 یک آنزیم پایدار و غیرقابل القا است، در مقابل بیان HO-1 توسط عوامل استرس‌زا القا می‌شود و به‌نظر می‌رسد که فعالیت ژن HO-1

مواد و روش‌ها

کشت سلولی

رده سلولی کبد انسان (HepG2)، تخمدان هامستر چینی (CHO)، سلول‌های سـرطانی ریه (A549) و سلول‌های جنینی کلیه انسان (HEK293T) از بانک سلولی ایران (NCBI) تهیه در محیط (Gibco-Brl, Eggnestein, Germany) RPMI-16040 با FBS ۱۰ درصد کشت داده شدند.

ایجاد رده سلولی پایدار مولد لیپوکالین ۲

برای ایجاد پلاسمید بیانی لیپوکالین ۲، ابتدا cDNA ژن لیپوکالین ۲ از رده سلولی کبد انسان (HepG2) جدا سازی شد. ابتدا مکان و آنزیم‌های مناسب برای برش ژن لیپوکالین ۲ به منظور ورود ژن به درون وکتور یوکاریوتی شناسایی شدند و ژن توسط آنزیم‌های محدود کننده EcoR I, NOT I در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد برش داده شد و در همان راستا وکتور PCDNA3.1(+) هم با همان آنزیم‌ها برش خورد. سپس ژن لیپوکالین ۲ و وکتور PCDNA3.1(+) توسط آنزیم لیگاز در مکان مناسب به یکدیگر متصل شدند. آن‌گاه حضور ژن و صحت توالی ژن توسط توالی‌یابی (DNA Sequencing) ثابت شد (۱۶ و ۱۷).

سلول‌های CHO و HEK293T با $1 \mu\text{g}$ از PcDNA3.1-Lcn2 و توسط Fugene6 (Roche, Mannheim Germany) ترا آلوده شدند. PcDNA3.1 نیز برای کنترل به درون سلول‌های CHO و HEK293T ترا آلوده شد. سلول‌های CHO و HEK293T ای که به صورت پایدار لیپوکالین ۲ را بیان می‌کنند در محیط کشت حاوی Geneticin $600 \mu\text{g/ml}$ (Roche) برای حداقل ۱۴ روز کشت داده شدند که منجر به ایجاد رده پایدار مولد لیپوکالین ۲ شد.

سلول‌های CHO و HEK293T به صورت ذاتی فاقد ژن

یک مکانیسم دفاعی تطبیقی در کشت‌های سلولی و مدل‌های حیوانی است [۲۰].

برای پی بردن به عملکرد لیپوکالین ۲ در مقابله با استرس اکسیداتیو این مطالعه بر پایه این سؤال طراحی شد که آیا لیپوکالین ۲ می‌تواند از طریق القای هم‌اکسیژناز بخشی از اثر محافظتی خود در برابر استرس اکسیداتیو را اعمال کند؟

استراتژی درمانی برای بافت‌ها یا سلول‌هایی که با استرس اکسیداتیو مواجه شده‌اند نیازمند دست‌یابی به روش‌های مطمئن برای مشخص کردن مکانیزم سلولی و مولکولی ای است که لیپوکالین ۲ از طریق آن باعث مقاومت سلول‌ها به نکرز و آپوپتوز ناشی از رادیکال‌های آزاد می‌شود، استرس اکسیداتیو ناشی از این رادیکال‌های آزاد مسئول آسیب‌های ایجاد شده در بسیاری بیماری‌ها همچون آلزایمر، بیماری‌های التهابی، تالاسمی و... است. بنابراین با شناخت تاثیر لیپوکالین ۲ بر آنزیم هم‌اکسیژناز می‌توان از عملکرد تنظیمی لیپوکالین ۲ بر این آنزیم در پروژه‌های درمانی سود برد.

همچنین با توجه به اینکه پروموتور ژن HO-1 هم در انسان و هم در جوندگان (موش) دارای توالی‌ای برای اتصال NF- κ B است و بسیاری از تأثیرات استرس اکسیداتیو توسط القای ژنی از طریق فاکتورهای رونویسی‌ای همچون NF- κ B تعدیل می‌شود [۱۵]، در تحقیق حاضر بررسی شد که آیا لیپوکالین ۲ می‌تواند از طریق مسیر NF- κ B بر بیان ژن HO-1 تأثیر بگذارد؟

برای روشن کردن این فرضیه، دو رده سلولی دستکاری شده با روش‌های مهندسی ژنتیک که مولد لیپوکالین ۲ هستند ایجاد شد و بیان آنزیم هم‌اکسیژناز I, II و NF- κ B در آن‌ها مطالعه شد. همچنین در مرحله دوم بیان این ژن در سلول‌های A549 از طریق siRNA خاموش شد و بیان ژن‌های مذکور نیز در آن‌ها مطالعه شد.

نرمال‌سازی بیان ژن‌ها، بیان β-actin به‌عنوان یک ژن خانه‌دار (House keeping gene) استفاده شد. محصولات PCR روی ژل آگارز ۲ درصد جدا و با اتیدیوم بروماید قابل مشاهده شدند؛ سپس با دستگاه ترانس لومینوتور UV (uvidoc) ارزیابی شدند.

بررسی بیان پروتئین با روش وسترن بلات

برای بررسی بیان ژن در سطح پروتئین، با استفاده از روش SDS-PAGE نمونه محیط کشت پس از طی مراحل لازم روی ژل آکریلامید الکتروفورز شد و سپس با روش وسترن بلات به غشای PVDF (Roche-آلمان) منتقل و با استفاده از آنتی‌بادی‌های اختصاصی (Santa cruz biotechnology) بررسی شد. همچنین برای بررسی بیان فاکتور رونویسی NF-κB در سطح پروتئین، کل پروتئین سلولی استخراج شد به طوری که میزان این پروتئین در کل سلول (هم در هسته و هم در سیتوپلاسم) ارزیابی شد.

لیپوکالین ۲ هستند، بنابراین پس از انجام ترانسفکشن (تراآلودگی) با بررسی بیان ژن لیپوکالین ۲، ورود ژن به درون این سلول‌ها تأیید شد. به همین دلیل میزان بیان لیپوکالین ۲ در CHO-Lcn2 و HEK-Lcn2 به وسیله RT-PCR اندازه‌گیری شد.

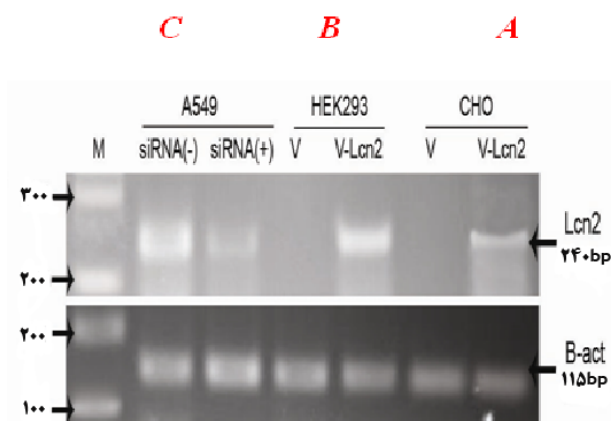
بررسی بیان ژن‌ها به روش نسخه‌برداری

معکوس واکنش زنجیره‌ای پلیمرز

در ابتدا با استفاده از کیت (Invitrogen Carlsbad .CA) RNA کل از محیط کشت استخراج شد سپس خلوص و غلظت RNA استخراج شده با جداسازی بر روی ژل یک درصد آگارز و دستگاه نانودراپ سنجیده شد. ۱۰۰۰ نانوگرم از RNA استخراج شده با استفاده از پرایمر Random Hexamer و آنزیم ترنس کریپتاز III (cDNA synthesise kit,Invitrogen) نسخه‌برداری معکوس شد، سپس از cDNA تولید شده به‌عنوان الگو برای PCR استفاده شد. برای پی بردن به میزان بیان ژن‌های مورد مطالعه در این تحقیق از پرایمرهای جدول ۱ استفاده شد و به‌منظور

جدول ۱. پرایمرهای طراحی شده برای بررسی بیان ژن‌های مورد مطالعه

GENES	Primer sequences (5-3)	Annealing Temperature	Size (bp)
NGAL	Forward: 5'-TCA CCT CCG TCC TGT TTA GG-3' Reverse: 5'-CGA AGT CAG CTC CTT GGT TC-3'	۶۰ °C	۲۴۰
Bactin	Forward: 5'-TTC TAC AAT GAG CTG CGT GTG G-3' Reverse: 5'-GTG TTG AAG GTC TCA AAC ATG AT-3'	۵۹ °C	۱۱۵
HO-1	Forward: 5'-ATG ACA CCA AGG ACC AGA GC-3' Reverse: 5'-GTG TAA GGA CCC ATC GGA GA-3'	۵۵ °C	۱۵۳
HO-2	Forward: 5'-GGA AAC CTC AGA GGG GGT AG-3' Reverse: 5'-GTG GCC AGC TTA AAC AGC TC-3'	۵۵ °C	۱۹۸
NF-κB	Forward: 5'-TGG GAA TGG TGA GGT CAC TC-3' Reverse: 5'-TCT CAT CCT GCA CAG CAG TG-3'	۵۵ °C	۱۹۷



شکل ۱. بیان ژن لیپوکالین ۲ در رده‌های سلولی ترانسفکت شده با Lcn2 و خاموش‌سازی این ژن در رده سلولی A549 از طریق SiRNA

A و B در شکل ۱: پس از استخراج RNA از سلول‌های ترانسفکت شده با PCDNA3.1-Lcn2 و سلول‌های ترانسفکت شده با PCDNA3.1، CDNA مربوط به آن‌ها سنتز شده و با استفاده از پرایمرهای اختصاصی برای Lcn2 آزمایش PCR انجام شد، حضور باند ۲۴۰ جفت بازی در سلول‌های ترانسفکت شده با وکتور حاوی ژن Lcn2 (v-Lcn2) نشانگر بیان ژن لیپوکالین ۲ در این سلول‌هاست.

C: برای اطمینان از خاموش‌سازی ژن لیپوکالین ۲ در رده سلولی A549 آزمایش‌های RT-PCR و انجام شد و محصولات PCR روی ژل آگارز ۲ درصد توسط الکتروفورز جداسازی و ارزیابی شد. کاهش بیان لیپوکالین ۲ در سلول‌های ترانسفکت شده با SiRNA (+) در مقایسه با سلول‌های کنترل (SiRNA-) نشان‌دهنده خاموش‌سازی صحیح بیان لیپوکالین ۲ توسط SiRNA است.

باند‌های ردیف پایین نشان‌دهنده بیان یکسان Bactin در سلول‌های ترانسفکت شده با وکتور pcDNA- و pcDNA Lcn2 است. و M؛ نشانگر ۱۰۰ جفت باز است.

فاکتور رونویسی NF- κ B دارای زیر واحدهای مختلف p50، p65 و RelB است که به صورت کمپلکس‌های همودایمر و هتروداایمر وجود دارند، با توجه به اینکه در این بررسی اندازه‌گیری میزان تغییر در بیان این فاکتور رونویسی مد نظر محققان بود، بنابراین برای شناسایی این فاکتور از یک آنتی‌بادی پلی کلونال برای زیر واحد p65 NF- κ B استفاده شد (Santa cruz biothecnology).

خاموش کردن ژن لیپوکالین ۲ به وسیله siRNA

در این مرحله بیان RNA مربوط به لیپوکالین ۲ توسط siRNA اختصاصی لیپوکالین ۲ (Qia gene, Germany) در سلول‌های A549 (که لیپوکالین ۲ را به میزان بالایی بیان می‌کنند)، طبق دستورالعمل شرکت سازنده کاهش یافت [۱۶ و ۱۷]. ۷۲ ساعت بعد خاموش‌سازی ژن لیپوکالین ۲ به وسیله PCR و اندازه‌گیری میزان پروتئین ترشح شده به محیط کشت ثابت شد.

یافته‌ها

بیان لیپوکالین ۲ در سلول‌های CHO و HEK293T

برای اطمینان از این موضوع که سلول‌هایی که ترانسفکت شده قادر به بیان لیپوکالین ۲ هستند، آزمایش RT-PCR انجام شد که نشان‌دهنده بیان لیپوکالین ۲ در سلول‌های ترانسفکت شده با PcdNA3.1--Lcn2 و عدم بیان آن در سلول‌های ترانسفکت شده با PcdNA3.1 بود (شکل A و B ۱).

وجود باند ۲۴۰ جفت بازی در رده‌های سلولی CHO و HEK293T حاوی ژن لیپوکالین ۲ نو ترکیب و عدم حضور این باند در رده‌های سلولی فاقد ژن نو ترکیب لیپوکالین ۲ نشان‌دهنده بیان ژن لیپوکالین ۲ در سلول‌های ترانسفکت شده است.

ترانسفکت شده با وکتور نو ترکیب حاوی ژن Lcn2 (VECTOR-Lcn2) تفاوتی با سلول‌های ترانسفکت شده با وکتور خالی (V) ندارد.

C: افزایش بیان NF-κB در سلول‌های مولد لیپوکالین ۲ (HEK-V-Lcn2, CHO-V-Lcn2) نشانگر اثر القا کنندگی لیپوکالین ۲ بر این فاکتور رونویسی است.

D: بیان یکسان بتا اکتین در سلول‌های ترانسفکت شده با وکتور pcDNA و pcDNA-Lcn2؛ نشانگر ۱۰۰ جفت باز است

افزایش بیان NF-κB در رده‌های سلولی مولد لیپوکالین ۲

برای اثبات این فرضیه که لیپوکالین ۲ قادر به فعال‌سازی فاکتور رونویسی NF-κB است، آزمایش‌های RT-PCR و وسترن بلات طراحی شد. نتایج PCR نشان‌دهنده افزایش در میزان RNA مربوط به NF-κB در سلول‌های مولد لیپوکالین ۲ در مقایسه با سلول‌های کنترل است (شکل C ۲). همچنین نتایج وسترن بلات افزایش NF-κB در سطح پروتئین را نیز تأیید می‌کند (شکل C ۳).

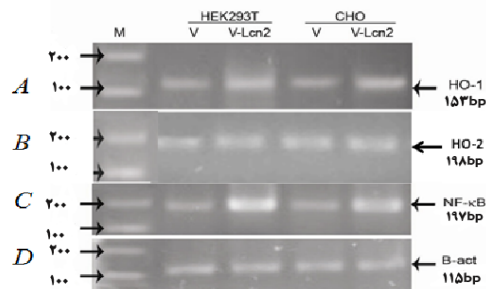
کاهش بیان HO-1 در اثر خاموش‌سازی لیپوکالین ۲ توسط siRNA

برای بررسی تاثیر خاموش‌سازی لیپوکالین ۲ روی بیان هم‌اکسیژنازا I, II, و NF-κB از siRNA استفاده شد. به این منظور siRNA در سلول‌های A549 ترانسفکت شد که پس از انجام RT-PCR، خاموش‌سازی ژن لیپوکالین ۲ توسط siRNA تأیید شد (شکل 1-c)

نتایج PCR، کاهش هم‌اکسیژنازا I و NF-κB را در سلول‌هایی که خاموش‌سازی لیپوکالین ۲ در آن‌ها صورت گرفته نسبت به سلول‌هایی که siRNA کنترل در آن‌ها استفاده شده نشان می‌دهد (شکل ۴).

افزایش بیان HO-1 در رده‌های سلولی مولد لیپوکالین ۲

برای روشن شدن تاثیر لیپوکالین ۲ بر بیان آنزیم‌های HO-1 و HO-2 آزمایش RT-PCR با پرایمرهای اختصاصی هم‌اکسیژنازا I و II صورت گرفت و از B-actin نیز به عنوان کنترل استفاده شد. نتایج RT-PCR روی ژل آگارز ۲ درصد نشان‌دهنده افزایش RNA مربوط به HO-1 در HEK-Lcn2 و CHO-Lcn2 در مقایسه با سلول‌های کنترل است (شکل A ۲). اما میزان بیان RNA مربوط به HO-2 در سلول‌های مولد لیپوکالین ۲ هیچ تفاوتی را نسبت به سلول‌های کنترل نشان نمی‌دهد زیرا HO-2 یک آنزیم پایدار و غیرقابل القا است و بیان آن نسبت به سلول‌های کنترل تغییری نکرده است (شکل B ۲). همچنین نتایج وسترن بلات نشان‌دهنده افزایش HO-1 در سطح پروتئین در سلول‌های HEK-Lcn2 و CHO-Lcn2 در مقایسه با سلول‌های کنترل است در حالی که بیان پروتئین هم‌اکسیژنازا II در سلول‌های مولد لیپوکالین ۲ و سلول‌های کنترل یکسان است (شکل‌های A ۳ و B ۳).



شکل ۲. افزایش بیان HO-1 و NF-κB در رده‌های سلولی مولد لیپوکالین ۲

A در شکل ۲: نتایج PCR با استفاده از پرایمرهای اختصاصی آنزیم هم‌اکسیژنازا I افزایش بیان این آنزیم را در سلول‌های مولد لیپوکالین ۲ (HEK-V-Lcn2, CHO-V-Lcn2) نشان می‌دهد.

B: ژن HO-2 غیرقابل القا بوده و بیان آن در سلول‌های

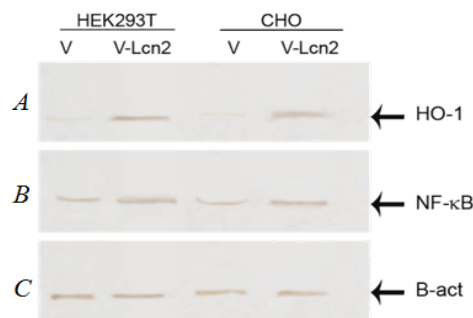
پس از خاموش‌سازی ژن لیپوکالین ۲ توسط SiRNA، به‌منظور بررسی بیان آنزیم هم‌اکسیژناز I و فاکتور NF-κB آزمایش‌های RTPCR و PCR انجام شد. نتایج PCR کاهش بیان آنزیم هم‌اکسیژناز I و فاکتور NF-κB را در سلول‌های siRNA(+) در مقایسه با سلول‌های siRNA(-) نشان می‌دهد.

بحث

نتایج بسیاری از مطالعات بر دخالت لیپوکالین‌ها در روند التهابات سلولی دلالت دارند و ثابت شده است که لیپوکالین‌ها به لیگاندهای مختلفی که در هموستاز و التهاب دخیل هستند، متصل می‌شوند [۱، ۹، ۲۱، ۲۲ و ۲۳]. همچنین در بسیاری از بیماری‌ها که تولید رادیکال‌های آزاد افزایش یافته است (سرطان، صدمات کلیوی و...) نیز افزایشی را در لیپوکالین ۲ شاهد هستیم. بنابراین احتمال می‌رود که لیپوکالین ۲ در برابر استرس اکسیداتیو ناشی از ROS نقش داشته باشد.

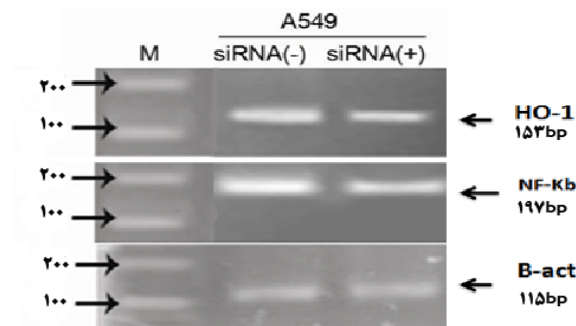
به‌عنوان مثال ری یانو (Rie yano) و همکارانش در بررسی آسیب حاد ریوی ایجاد شده توسط LPS و DEP به افزایش قابل توجهی در بیان 24p3 اشاره می‌کنند، DEP شامل انواع مختلفی از فلزات سنگین همچون آهن و مس است که قادر است از طریق یک کاتالیز وابسته به آهن، سوپراکسید و H₂O₂ را به رادیکال‌های هیدروکسیل مبدل سازد [۲۲]. بنابراین به‌نظر می‌رسد بیان 24P3 در آسیب حاد ریوی وابسته به تولید رادیکال‌های آزادی باشد که توسط LPS و DEP ایجاد شده‌اند، ژن لیپوکالین ۲ انسانی دارای ۹۶ درصد همولوژی با ژن 24P3 است و احتمالاً دارای نقشی مشابه 24p3 در التهاب وابسته به LPS و DEP است.

همچنین نتایج یک بررسی نشان می‌دهد که استرس ناشی از هیپوکسیا و ایسکمی حاد قلبی بیان لیپوکالین ۲ را افزایش می‌دهد و در واقع ترشح لیپوکالین ۲ پاسخی است



شکل ۳. نتایج حاصل از وسترن بلات نشان‌دهنده افزایش HO-1، NF-κB در سطح پروتئین است.

در شکل ۳، A و B: وجود باند قویتر NF-κB و HO-1 در سلول‌های ترانسفکت شده با وکتور حاوی ژن Lcn2 (HEK-) (V-Lcn2، CHO-V-Lcn2)، نشانگر افزایش بیان هم‌اکسیژناز I و NF-κB در حضور لیپوکالین ۲ است. C: بتا اکتین که به‌عنوان کنترل استفاده شده است در سلول‌های ترانسفکت شده با لیپوکالین ۲ و سلول‌های کنترل بیان یکسانی را نشان می‌دهد.



شکل ۴. خاموش‌سازی لیپوکالین ۲ توسط siRNA منجر به کاهش بیان HO-1 و NF-κB می‌شود.

کاهش RNA مربوط به هم‌اکسیژناز I و NF-κB در سلول‌هایی که بیان لیپوکالین ۲ در آن‌ها کاهش یافته نشان‌دهنده نقش لیپوکالین ۲ در فعال‌سازی بیان هم‌اکسیژناز I از طریق مسیر NF-κB است. بیان هم‌اکسیژناز II پایدار بوده و تغییری در میزان آن مشاهده نشد.

SiRNA خاموش شد که نتایج یافته‌های حاضر در مرحله قبل را تأیید نمود.

بررسی نمونه‌های بافتی موش‌هایی که در بیان آنزیم HO-1 نقص دارند، حساسیت بالایی را به اندوتوکسین و هیپوکسیا نشان می‌دهد. این شواهد بیان‌کننده نقش محافظتی آنزیم هم‌اکسیژناز در بیماری‌های مرتبط با استرس اکسیداتیو است [۲۰]. همچنین در بسیاری عوارض و بیماری‌هایی که رادیکال‌های آزاد و استرس ناشی از آن‌ها نقش قابل توجهی دارد بیان القا یافته‌ای هم در هم‌اکسیژناز I و هم در لیپوکالین ۲ دیده می‌شود. بنابراین به نظر می‌رسد آنزیم هم‌اکسیژناز I و لیپوکالین ۲ در تعدیل این شرایط استرس‌زا با یکدیگر همکاری می‌کنند.

تعداد زیادی از تعدیل‌کننده‌های التهاب مانند IL10، Rapamycin، Statin، 15-PDGJ2 و... از طریق عملکرد HO-1 تأثیرات ضد التهابی خود را اعمال می‌کنند. برای مثال IL10 برای القای تأثیر خود در ماکروفازها به عملکرد تقویتی هم‌اکسیژناز I نیازمند است و در صورت بلوکه شدن هم‌اکسیژناز I، IL10 نمی‌تواند خصوصیات ضد التهابی خود را آشکار کند [۲۷]. بنابراین چندان دور از ذهن نخواهد بود که لیپوکالین ۲ نیز از طریق هم‌اکسیژناز اثرهای خنثی‌کننده خود را بر استرس اکسیداتیو اعمال کند.

کیوشی موری (Kiyoshi mori) در آزمایش‌های خود روی موش‌هایی که دچار نکروز حاد ریوی (Acute tubular necrosis) شده بودند انباشتگی فراوانی از لیپوکالین ۲ را در لوله‌های پیچیده نزدیک کلیه تشخیص داد. همچنین نتایج این آزمایش‌ها نشان داد که درمان با ۱۰-۱۰۰ μg لیپوکالین ۲ سبب افزایش بیان HO-1 (5-10 Fold) در ایسکمی بافتی می‌شود، در این مورد به‌خصوص درحالی‌که لیپوکالین ۲ باعث محافظت کلیه از Ischemia reperfusion damage می‌شود، تزریق مهارکننده هم‌اکسیژناز سبب بلوکه شدن این اثر محافظتی می‌شود این

که این سلول‌ها به استرس ناشی از هیپوکسیا نشان می‌دهند [۲۳ و ۲۴]. به‌علاوه رودکنار (Roudkenar) و همکارانش در سال ۲۰۰۸ ثابت کردند که لیپوکالین ۲ یک فاکتور محافظتی در برابر سیتوتوکسیتی H₂O₂ و رادیکال‌های آزاد ناشی از آن است [۱۷].

از سوی دیگر، مطالعات گسترده‌ای نیز بر نقش مفید HO-1 در محافظت بسیاری بافت‌ها از جراحات التهابی و اکسیداتیو متمرکز شده است. هم‌اکسیژناز حساسترین آنزیم آنتی‌اکسیدان در برابر استرس سلولی است [۲۵]. این آنزیم دارای عملکردهای متنوعی است اما مهمترین وظیفه هم‌اکسیژناز دفاع در برابر استرس اکسیداتیو است. هم‌اکسیژناز از یک سو با تخریب Heme از تولید ROS و تخریب لیپیدها، پروتئین‌ها و DNA جلوگیری می‌کند [۱۹] و از سوی دیگر با تبدیل Heme به بیلی‌روبین، بیلی‌وردین و مونوکسیدکربن که دارای نقش آنتی‌اکسیدان هستند و گاهی به‌عنوان پاک‌کننده رادیکال‌های آزاد اکسیژن عمل می‌کنند، با آثار سیتوتوکسیک ناشی از استرس‌های سلولی مقابله می‌کند [۲۶].

نتایج این یافته‌ها و تمرکز بر عملکرد هم‌اکسیژناز به‌عنوان حساس‌ترین آنزیم آنتی‌اکسیدان، محققان حاضر را به این نکته رهنمون کرد که احتمالاً لیپوکالین ۲ دارای اثرهای مثبت بر بیان آنزیم هم‌اکسیژناز است. برای این منظور وکتور PcdNA3.1 حاوی ژن لیپوکالین ۲ به سلول‌های CHO و HEK293T ترانسفکت شد، سلول‌های CHO و HEK293T فاقد لیپوکالین ۲ هستند؛ بنابراین پس از انجام ترانسفکشن با بررسی بیان lcn2 ورود ژن به درون سلول تأیید و رده پایدار مولد لیپوکالین ۲ ایجاد شد.

مشاهده افزایش بیان HO-1 در سلول‌های حاوی ژن نو ترکیب لیپوکالین ۲ در مقایسه با سلول‌های کنترل نشان‌دهنده نقش لیپوکالین ۲ در القای هم‌اکسیژناز I است. همچنین برای تأیید این فرضیه بیان لیپوکالین ۲ در سلول‌های A549 به‌وسیله

مطرح نمود؛ از آنجایی که هم‌اکسیژناز نیز مرگ سلولی آپوپتوتیک را کاهش می‌دهد [۳۴]، ممکن است لیپوکالین ۲ از طریق القای هم‌اکسیژناز قادر به تعدیل آپوپتوز باشد. از سوی دیگر به نظر می‌رسد لیپوکالین ۲ برای مخابره پیام‌های خود به هم‌اکسیژناز و فعال کردن آن به سیگنال‌های سلولی و فاکتورهای ترجمه نیازمند باشد. نتایج بررسی حکایت از افزایش NF- κ B در حضور لیپوکالین ۲ هم در سلول‌های CHO و هم HEK293T دارد. همچنین با خاموش کردن ژن لیپوکالین ۲ توسط siRNA، کاهش NF- κ B و به تبع آن کاهش هم‌اکسیژناز I در سطح پروتئین و RNA مشاهده شد. ناحیه ۵ فرادست ژن هم‌اکسیژناز I دارای بایندینگ سایت برای NF- κ B و AP2 است و این فاکتورهای رونویسی در تنظیم بیان هم‌اکسیژناز I مؤثرند. همچنین NF- κ B در تنظیم بسیاری از فعالیت‌های سلولی همچون استرس، آسیب‌های سلولی و پاسخ‌های التهابی دخالت دارد [۳۵]، بنابراین احتمال می‌رود که لیپوکالین ۲ بتواند از طریق NF- κ B بر بیان هم‌اکسیژناز I اثرگذار باشد.

به‌طور کلی با توجه به نتایج آزمایش‌هایی که توسط گروه تحقیقاتی حاضر انجام شد، به نظر می‌رسد که لیپوکالین ۲ بتواند با فعال کردن هم‌اکسیژناز I از طریق مسیر NF- κ B با استرس اکسیداتیو و احتمالاً آپوپتوز مقابله کرده و سبب تعدیل التهابات سلولی ناشی از ROS شود. شاید خصوصیات منحصر به فرد لیپوکالین ۲، مربوط به فعال کردن واسطه‌ها و آنزیم‌هایی همچون HO-1 است که آثار حفاظتی لیپوکالین ۲ در برابر ROS را اعمال می‌کنند.

مسئله نشان می‌دهد که فعالیت هم‌اکسیژناز برای عملکرد محافظتی لیپوکالین ۲ در این نوع آسیب ضروری است [۲۸]. نتایج آزمایش‌ها PCR و western blot نشان داد که بیان آنزیم هم‌اکسیژناز II در سلول‌های حاوی لیپوکالین ۲ نو ترکیب هیچ تفاوتی با سلول‌های کنترل ندارد. این نتیجه بر این مسئله تأکید می‌کند که درحالی‌که بیان HO-1 قابل القا بوده و نشانه‌ای برای استرس اکسیداتیو در سلول‌های پستانداران است بیان HO-2 غیر قابل القاء بوده و در سطح پایه باقی می‌ماند [۲۹].

مطالعات متعددی نیز روی نقش لیپوکالین ۲ به‌عنوان یک ضد آپوپتوز صورت گرفته است. یک آنتی‌بادی پلی‌کلونال طراحی شده برای لیپوکالین ۲ می‌تواند آپوپتوز را در سلول‌های A549 تا ۲۴ ساعت القا کند. همچنین در همین بررسی استفاده از siRNA برای لیپوکالین ۲ باعث افزایش فعالیت آپوپتوتیک داروی ضد التهاب Celecoxib شد [۷]. بررسی‌های مختلف دیگری نیز بر نقش لیپوکالین ۲ به‌عنوان یک عامل ضد آپوپتوز دلالت دارند [۴، ۸، ۳۲-۳۰]. با این وجود عملکرد دقیق لیپوکالین ۲ در برابر آپوپتوز مشخص نیست.

دویردی (Devireddy) و همکارانش در نتیجه بررسی‌های خود این پیشنهاد را مطرح می‌کنند که فعالیت پیش‌حیاتی (Pro survival) در مورد لیپوکالین ۲ به‌علت توانایی آن برای اتصال به آهن و انتقال آن به درون سلول است، به‌طوری‌که احتمالاً لیپوکالین ۲ با حمل آهن و وارد کردن آن به درون سلول سبب جلوگیری از آپوپتوز می‌شود [۳۳]. اما با توجه به نتایج آزمایش‌های تحقیق حاضر می‌توان احتمال دیگری را

References

1. Flower DR. Beyond the superfamily: the lipocalin receptors. *Biochim Biophys Acta* 2000; 1482: 327-36.
2. Flower DR. The lipocalin protein family: structure and function. *Biochem J* 1996;318 (Pt 1):1-14.
3. hraba renevey S, Turler H, kress M, Salomon C, Weil R. Sv40 induced expression of mouse gene 24p3 involves a post transcriptional mechanism. *Oncogene* 1989; 4: 601-8.
4. Kjeldsen L, Cowland JB, Borregaard N. Human

- neutrophil gelatinase-associated lipocalin and homologous proteins in rat and mouse *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)* 2000;1482:272-83
5. **Triebel S, Blaser J, Reinke H, Tschesche H, Harrison PM, Arosio P.** The ferritins:molecular proper- kDa -2-microglobulin-related protein is a component of the 125 kDa ties, iron storage function and cellular regulation. *Biochim. Biophys. Form of human gelatinase.* *FEBS Lett* 1996; 3: 386–8.
 6. **Cowland JB, Sørensen DE, Sehested M, Borregaard N.** Neutrophil gelatinase-associated lipocalin is up-regulated in human epithelial cells by IL-1 but not by TNF-α. *J Immunol* 2003; 171: 6630–9.
 7. **Tong Z, Wu X, Ovcharenko D, Zhu J, Chen C-S, Kehrer JP.** Neutrophil gelatinase-associated lipocalin as a survival factor. *Biochem J* 2005;391:441–8.
 8. **Lannetti A, Pacifico F, Acquaviva R, Lavorgna A, Crescenzi E, Vascotto C, et al.** The neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL), a NF-κB-regulated gene, is a survival factor for thyroid neoplastic cells. *PNAS* 2008; 37: 14058–63.
 9. **Katano M, Okamoto K, Arito M, Kawakami Y, Kurokawa MS, Suematsu N, et al.** Implication of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor induced neutrophil gelatinase-associated lipocalin in pathogenesis of rheumatoid arthritis revealed by proteome analysis. *Arthritis Res Ther* 2009;11:in press.
 10. **Sunil VR, Patel KJ, Nilsen-Hamilton M, Heck DE, Laskin JD, Laskin DL.** Acute endotoxemia is associated with upregulation of lipocalin 24p3/Lcn2 in lung and liver. *Exp Mol Pathol* 2007;83:177-87.
 11. **Zhang H, Xu L, Xiao D, Xie J, Zeng H, Wang Z et al.** Upregulation of neutrophil gelatinase-associated lipocalin in oesophageal squamous cell carcinoma: significant correlation with cell differentiation and tumour invasion. *J Clin Pathol* 2007;60:555–61
 12. **Seth P, Porter D, Lahti-Domenici J, Geng Y, Richardson A, Polyak K.** Cellular and Molecular Targets of Estrogen in Normal Human Breast Tissue. *Cancer Res* 2002;62:4540-4.
 13. **Cho H, Kim J-H.** Lipocalin2 Expressions Correlate Significantly With Tumor Differentiation in Epithelial Ovarian Cancer. *J. Histochem. Cytochem* 2009;57:513-21.
 14. **Roudkenar MH, Kuwahara Y, Baba T, Roushandeh, A. M, Ebishima, S, Abe, S, et al.** Oxidative stress induced lipocalin 2 gene expression: addressing its expression under the harmful conditions. *J Radiat Res (Tokyo)* 2007;48:39-44.
 15. **Lavrovsky Y, Song CS, Chatterjee B, Roy AK.** Age-dependent increase of heme oxygenase-1 gene expression in the liver mediated by NFκB. *Mech Ageing Dev* 2000;114:49–60.
 16. **Roudkenar MH, Ghasemipour Z, Halabian R, Roushandeh, A. M, Yaghmai P, Gharehbaghian A, et al.** Lipocalin 2 acts as a cytoprotective factor against cisplatin toxicity, an in vitro study. *Daru* 2008;16:106-11.
 17. **Roudkenar M, Halabian R, Ghasemipour Z, Roushandeh A, Rouhbakhsh M, Nekogoftar M, et al.** Neutrophil Gelatinase-associated Lipocalin Acts as a Protective Factor against H2O2 Toxicity. *Arch Med Res* 2008; 39: 560-6.
 18. **Katori M, Dean M. Anselmo, Ronald WB, Jerzy WK.** A novel strategy against ischemia and reperfusion injury: cytoprotection with heme oxygenase system, *Transpl Immunol* 2002; 9: 227–33.
 19. **Kumar S, Bandyopadhyay U.** Free heme toxicity and its detoxification systems in human. *Toxicol Lett* 2005; 157: 175-88.
 20. **Immenschuh S, Ramadori G.** Gene Regulation of Heme Oxygenase-1 as a Therapeutic Target. *Biochem Pharmacol* 2000; 60: 1121–8.
 21. **Canteli MC, Medina RL, SanCristobal MS, Barrientos AA, Santos A, Castillo AP.** CCAAT/enhancer binding protein β deficiency provides cerebral protection following excitotoxic injury. *J Cell Sci* 2008; 121: 1224-34.

22. **Yanagisawa R, Takano H, Inoue K-I, Ichinose T, Yoshida Si, Sadakane K, et al.** Complementary DNA Microarray Analysis in Acute Lung Injury Induced by Lipopolysaccharide and Diesel Exhaust Particles. *Exp Biol Med* 2004;229:1081-7.
23. **Hemdahl AL, Gabrielsen A, Zhu C, Eriksson P, Hedin U, Kastrup J, et al.** Expression of neutrophil gelatinase-associated lipocalin in atherosclerosis and myocardial infarction. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006; 26: 136-42.
24. **Wenlei J, Marco C, Manuela MS.** Anemia upregulates lipocalin2 in the liver and serum. *Blood Cells Mol Dis* 2008; 41: 169-74.
25. **Hayashi K, Haneda M, Koya D, Maeda S, Isshiki K, Kikkawa R.** Enhancement of glomerular heme oxygenase-1 expression in diabetic rats. *Diabet Res Clin Pract* 2001; 52: 85-96.
26. **Kikuchi G, Yoshida T, Noguchi M.** Heme oxygenase and heme degradation. *Biochem Biophys Res Commun* 2005; 338: 558-67.
27. **Bach FH.** Heme oxygenase-1 and transplantation tolerance. *Hum Immunol* 2006;67:430-2.
28. **Mori K, Lee HT, Rapoport D, Drexler IR, Foster K, Yang J, et al.** Endocytic delivery of lipocalin-siderophoreiron complex rescues the kidney from ischemia-reperfusion injury .Citation for this article: *J Clin Invest* 2005; 115: 610-21.
- 29 **Ryter S, kvam E, Richman L, Hartmann F, Tyrrell RM.** A chromatographic assay for heme oxygenase activity in cultured human cells: application to artificial heme oxygenase overexpression . *Free Radical Biol Med* 1998; 24: 959-71.
30. **Bratt T.** Lipocalins and cancer. *Biochem Biophys Acta* 2000; 1482: 318-26.
31. **Kehrer JP.** Lipocalin-2: pro- or anti-apoptotic? *Cell Biol Toxicol* 2009.
32. **Gentili C, Tutolo G, Zerega B, Di Marco E, Cancedda R, Cancedda FD.** Acute phase lipocalin Ex-FABP is involved in heart development and cell survival. *J Cell Physiol* 2005;202:683-9.
33. **Devireddy LR, Gazin C, Zhu X, Green MR.** A cell-surface receptor for lipocalin 24p3 selectively mediates apoptosis and iron uptake. *Cell* 2005; 123: 1293-305.
34. **Bussolati B, Ahmed A, Pemberton H, Landis R. C, Di Carlo F, Haskard D. O,et al.** Bifunctional role for VEGF-induced heme oxygenase-1 in vivo: induction of angiogenesis and inhibition of leukocytic infiltration. *Blood* 2004;103:761-6.
35. **Lavrovsky Y, Schwartzman ML, Levere RD, Kappas A, Abraham NG.** Identification of binding sites for transcription factors NFkB and AP-2 in the promoter region of the human heme oxygenase 1 gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91, 5987-91.