مجله علوم دانشگاه تهران
جلد بیست و هشتم (۱۳۸۱) شماره ۲ (۱۹۱-۱۸۳)

ویژگیهای سلولهای کلون شده پرولاکتینGH_3/B_6 در شرایط Invitro

حوری سپهری، یاسمن رسولی و ساطین صالحی
گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه تهران، تهران، ایران
(دریافت: ۷۹/۱۲/۱۵ ؛ پذیرش:۸۰/۱۰/٤)

چکیده

دراین پژوهش نشان داده شده است که سلولهای کلون شده از دودمان GH_3/B_6 که یک زیر مجموعه از سلولهای GH_3 که از تومور هیپوفیزی موش مشتق شده اند در محیط کشت Hams F_{12} به صورت یک لایه رشد می کنند. رشد این سلولها در محیط کشت طی ۶ الی ۸ روز به صورت تصاعدی می باشد و سپس رشد آنها آهسته می شود اما هرگز به مرحله سکون نمی رسد و تقسیم سلولها ادامه دارد. با استفاده از میکروسکوپ اینورت رشد این سلولها را به صورت لایه تک سلولی، تقسیمات مکرر و سلولهای شناور مشاهده کردیم. مشاهده سلولها با میکروسکوپ الکترونی در شرایط کنترل نشان می دهد که در کشت اولیه سلولها کوچک، تعداد گرانولهای ترشحی کم و نسبت هسته به سیتو پلاسم بالا می باشد در این سلولها پلی زومها فراوان و به صورت آزاد در سیتوپلاسم وجود دارند، شبکه آندوپلاسمیک گسترش فراوان دارد و دستگاه گلژی نیز با واحدهای نزدیک به هسته دیده می شود. رتیکولوم صاف در سلولهای GH_3 طویل و دارای وزیکول های کوچک می باشد. پژوهش های دیگر نشان داده است که این سلولها از نظر ترشح پرولاکتین دارای همان ویژگی های سلولهای طبیعی هستند یعنی ذخیره پرولاکتین در سلولهای دودمان GH_3 موجود و نوروپپتید TRH می تواند ترشح پرولاکتین را درآنها افزایش دهد این تاثیر در دو مرحله در این سلولها دیده می شود. ابتدا ترشح PRL بوسیله اثر TRH سریع است که علت آن مربوط به تحریک آزاد شدن پرولاکتین ذخیره در این سلولها می باشد. مرحله دوم تأثیر TRH بر ترشح PRL پس از سنتز آن بوسیله سلولهای GH_3/ B_6 مشخص میشود که با تأخیر انجام می گیرد.

واژه‌های کلیدی: *سلولهای کلون شده پرولاکتین، GH_3/B_6 – ترشح هورمون پرولاکتین*
TRH –Thyrotropin releasing Hormone(TRH) PRL

مقدمه

پژوهشهای ایمونوسیتوشیمی نشان می‌دهد که سلولهای متفاوتی در هیپو فیز ترشح پرولاکتین PRL ، سوماتوتروپین، تیروتروپین، گنادوتروپین‌ها و هورمون‌های گروه پرواپیوملانوکورتین POMC را به عهده دارند. بنابراین تنوع سلولی دراین بخش هیپوفیز بسیار زیاد است و در واقع غیر از جنبه مرفولوژیک سلولها نتیجه گیری دقیق از عمل هر یک از گروه سلولی بسیار مشکل است. لذا برای شناسائی مکانیسم عمل هر گروه سلولی دو راه وجود دارد. یکی جدا کردن سلولهای هرگروه و خالص‌کردن آن و دیگری تهیه دودمانهای کلون شده سلولی که قابلیت ترشح هورمونهای هیپوفیزی را دارا باشند. طریق اول برای سلولهای مترشحه پرولاکتین، سوماتروپین، تیروتروپین و گنادوتروپینها انجام شده است، اما به‌واسطه همپوشانی چندین فراکسیون سلولی و تعداد کم سلولها از این طریق بسیار محدود استفاده می‌شود.طریق‌دوم یعنی طریق تهیه دودمانهای کلون‌شده سلولهای تولید کننده هورمونهای هیپوفیزی، بیشتر مورد استفاده قرار می‌گیرد، زیرا دراین روش، جمعیتهای سلولی یکنواختی بوجود می‌آید که می‌توان آنها را درمقیاس بزرگ تولید نموده و مورد آزمایش قرارداد. دوگروه عمده از دودمان‌های سلولی که هورمونهای هیپوفیز را ترشح می‌کنند دردسترس قرار دارند، یکی گروه سلولهای GH درموش‌که هورمونهای نمو GH و پرولاکتینPRL را درنسبتهای مختلف ترشح می‌کنند و دیگری سلولهای ACT20/D16 سوری که هورمونهای گروه POMC پرواپیوملانوکورتین‌را ترشح می‌نمایند، همه دودمانهای کلون شده که هورمونهای هیپوفیزی را ترشح می‌کنند از تومورهای هیپوفیزی مشتق می‌شوند. نزدیک به سی‌سال است‌که روی سلولهای لاکتوتروپ و مکانیسم ترشح پرولاکتین توسط آنها مطالعات مختلف انجام می‌گیرد.

تاشجیان درسال ۱۹۷۰ سه کلون‌از سلولهای GH را معرفی نماید GH_1 ، GH_2C_1 و GH_3 که هرسه گروه قادر به سنتز و آزادکردن هورمون نمو و پرولاکتین می‌باشند(Tashjian, 1971). مارتینه مشخص نمود که مقدار سنتز و آزاد کردن این دو هورمون توسط سلولهای GH_3 با نوع کلون تغییر می‌کند. او همچنین تولید همزمانPRL و GH را بوسیله دودمان‌های سلولی GH مورد بررسی قرار داد. اما آیا این دو هورمون بوسیله سلولهای متفاوت ترشح می‌شوند یا خیر با وجود پژوهشهای زیاد هنوز جواب این سؤال مشخص نگردیده است(Martinet, 1999).

کلونی که عمدتاً برای مطالعات آندوکرینی مورد استفاده قرار می‌گیرد کلون GH1و GH3 است، چندین زیرکلون از هردو کلون تهیه شده است که نمونه GH_3/ B_6 یکی‌از زیر نمونه‌های آن‌است و درپژوهش حاضر ازاین زیرکلون استفاده شده است.

مواد و روش‌کار

محیط‌کشت برای این گروه سلولی یعنی دودمان GH_3/B_6، Hams F_{12} بودکه بـه آن سـرم گـاو ۱۵درصد و سرم گوساله ۲/۵ درصد غیرفعال اضافه شده است(Gourdji 1982). دمـای مناسـب برای کشت سلولها ۳۷ $^{\circ}C$ است.

بررسی اولیه سلولها بوسیله میکرسکپ اینورت صورت گرفته است سـلولها درمحـیط کشـت ابتدا بصورت تک لایه ای به سطح پلاستیک متصل میشوند وسپس با رشد و تکثیـر بـه حالـت سوسپانسیون درمی‌آیند و پس‌از حدود ۵۰ ساعت انکوباسیون درشرایط ذکـر شـده بـه دو برابـر تعداد اولیه می‌رسند، کیفیت سرم و شرایط ازمایشگاهی دراین رشـد و تکثیـر مـؤثر مـی‌باشـد. شکل۱ سلول‌ها را بصورت مونولایر و شکل۲ سلولهای تکثیر شـده را بـه حالـت سوسپانسـیون، بوسیله میکرسکپ اینورت نشان می‌دهد. بعداز تشـکیل مونـولایر(تـک لایـه‌ای)، سـلول‌هـابرای مشاهده و بررسی با میکروسکپ الکترونی آماده شده‌اند.

سلولها به مدت۲ ساعت درحرارت۳۷ $^{\circ}C$ درمحلول گلوتارآلدئید ثابت می‌شوند پـس‌از آن بـه مدت یک ساعت دردمای اتاق به وسیله اسیداسمیک۲ درصد و فرو سیانور پتاسـیم۳ درصـد در آب مقطر انکوبه شـده و پـس‌از آن وضـع ارگانلهـای سـلولی بوسـیله میکرسـکپ الکترونـی بـا بزرگنمائی۲۴۰۰۰ مورد بررسی قرار می‌گیرد.

بررسی ترشح پرولاکتین بوسیله سلولهایGH_3 و اثرتحرکـی نوروپپتیدهیپوتالاموسـی(TRH) پس‌از تشکیل مونولایر و تکثیر سلولها، نمونه‌هایی که‌در هرمیلی‌لیتر محیط کشت۵۰۰۰۰ سلول وجود داشت تهیه شد. نمونه‌ها درمحیط کشت و محیط‌کشـت حـاویTRH بـاتراکم۵۰mM/ml قـرار گرفتـه و بـه‌مـدت۴۸ سـاعت درحـرارت ۳۷ $^{\circ}C$ انکوبـه مـی‌شـوند. افـزودن Thyrotropin-Releasing Hormone (TRH) برای دانسـتن اثـر محـرک ایـن نوروپپتیـد روی سنتز و ترشح پرولاکتین دراین سلول‌ها می‌باشد. اندازه‌گیری پرولاکتین بـا روش رادیـو ایمونـو آسه(Radio immunoassay (RIA بوسیله متد Brunet اندازه‌گیری شده‌اسـت (Brunet 1981). مقدار پروتئین سلولها درهر نمونه به‌روشLowry محاسبه گردیده‌است.

نتایج

نتایج این پژوهش به دو قسمت تقسیم مـی‌شـود. قسـمت اول نتـایجی مـی‌باشـد کـه بوسـیله میکروسکوپ اینورت و میکروسکوپ الکترونی بدسـت آمـده و قسـمت دوم نتیجـه‌ایسـت کـه‌از اندازه‌گیری مقدار ترشح پرولاکتین بوسیله این سلولها حاصل شده‌است.

نتایج قسمت‌اول: دراین مطالعه که تصاویر۱ تا ۴ مبین‌آن می‌باشند نشان داده‌شده است که سلولهای GH_3/B_6 دریک لایه سلولی و همچنین بصورت شناور با تکثیر فراوان دیده می‌شوند(شکل۱و۲). ارگانهای سلولی که بوسیله میکروسکوپ الکترونی مشاهده شده است(شکل۳ و۴)، نشان می‌دهدکه دراین سلولها درکشت اولیه سلولها کوچک‌تر وتعداد گرانولهای ترشحی زیاد نمی‌باشند، نسبت هسته به سیتوپلاسم بالاست، تعداد پلی‌زومهائی که به صورت‌آزاد درسیتوپلاسم هستند بسیار زیاد است و شبکه آندوپلاسمیک صاف و دانه‌دار درآنها بسیار گسترده می‌باشد، رتیکولوم صاف، طویل ودارای وزیکولهای کوچک است و بالاخره دستگاه گلژی به صورت واحدهای نزدیک به هسته قابل مشاهده می‌باشد.

نتایج قسمت‌دوم: اندازه‌گیری مقدار پرولاکتین ترشح شده بوسیله این سلولها دردو محیط شاهد و محیط‌شاهد حاویTRH به مقدار۵۰mM درمیلی‌لیتر است.

دراین اندازه‌گیری که مقدار پرولاکتین برحسبpgPRL/µg prot/ml محاسبه شده نشان‌داده می‌شود که مقدار سنتز و ترشح پرولاکتین درمحیط حاویTRH بطور معنی‌دار افزایش یافته است بطوریکه مقدار متوسط ترشح پرولاکتین برای نمونه‌هایی که به محیط کشت‌آنTRH اضافه شده است بطور معنی‌دار از نمونه شاهد که درمحیط کشت طبیعی‌است افزایش یافته است. بطوریکه $P < ۰/۰۵$ می‌باشد. جدول‌زیر این تفاوت مقدار ترشح پرولاکتین را در دو محیط نشان می‌دهد

مقدار ترشح پرولاکتین:	Pg PRL/ µg prot/ ml
سلولها درمحیط طبیعی یا Ham's F_{12} :	۳۲۰۰ ± ۳۵۰
سلولها درمحیط طبیعی+ TRH :	۵۶۰۰* ± ۲۶۴

*معنی دار$P<۰/۰۵$

بحث

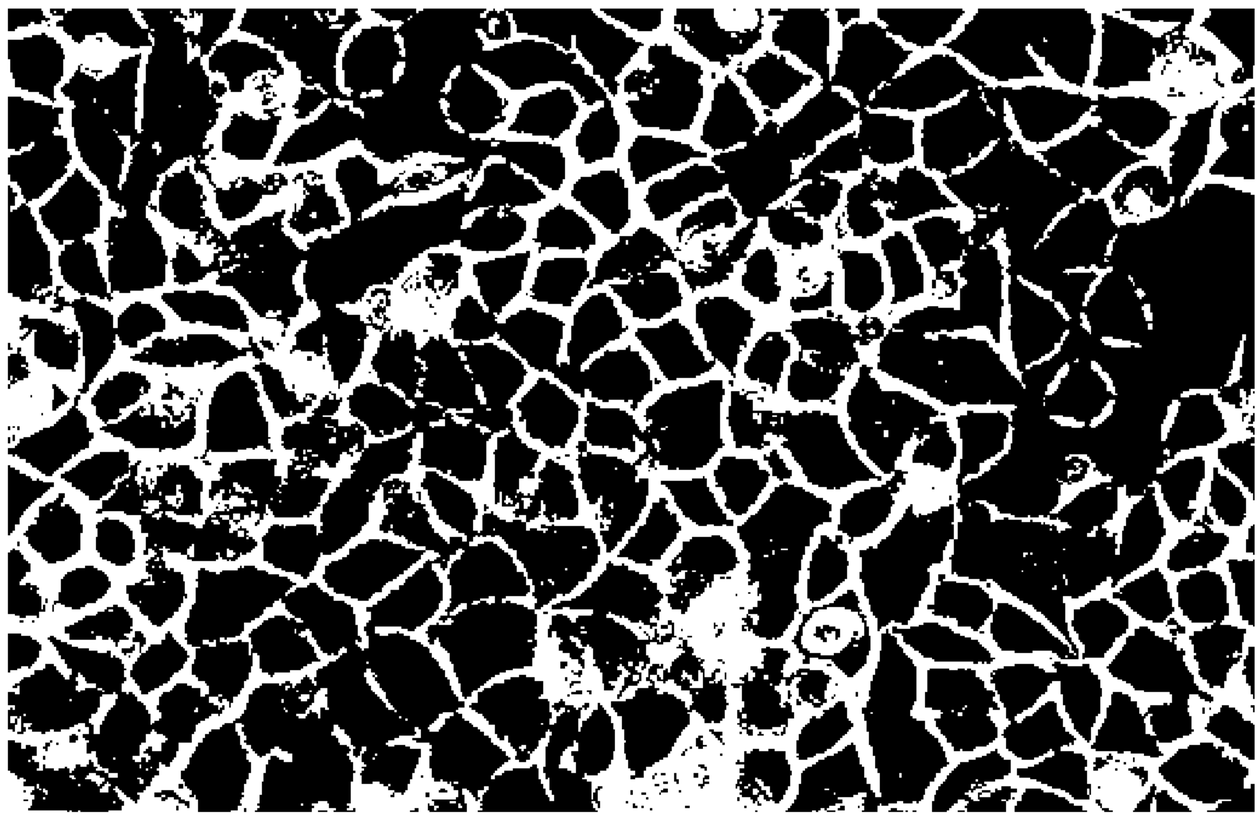
برای سلولهایGH_3پرولاکتین داخل سلولی مقداری‌است که درمدت۱ تا۲ ساعت به محیط ترشح می‌شود(Tashijian 1971). درطول مدت انکوباسیون دراز مدت مثلاً۲۴ ساعت مقدار پرولاکتین آزاد شده بطور خطی افزایش می‌یابد و درپژوهش‌حاضر نیز انکوباسیون به‌مدت۴۸ ساعت افزایش آزادشدنPRL را نشان می‌دهد.

تاکه‌موتو و کیدر نشان داده‌اند که درکشت دراز مدت سلولهای لاکتوتروپ مقدار ترشح GH و PRL درزمانی‌که رشد سلولها بصورت لگاریتمی و کفه‌ایست افزایش می‌یابد (Khider, 1996, 1997; Takemot 1962).

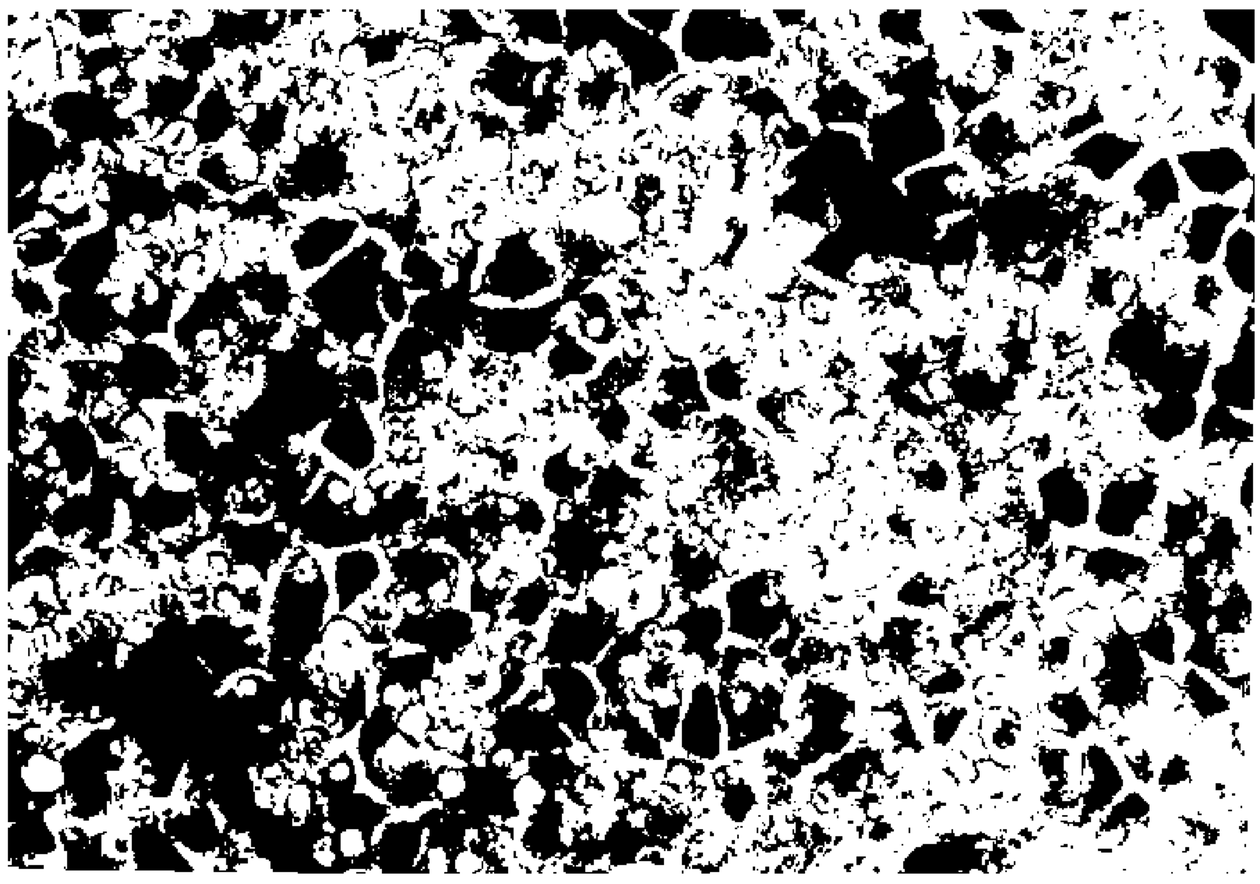
گوتریک و هاگ از لوسین رادیواکتیو برای تعیین مقداردرصد سنتز پرولاکتین و تولید همزمان هورمون PRL و GH درسلولهای لاکتوتروپ و GH_3 استفاده کرده‌اند (Haug 1977, Gautvik 1976). دراین مطالعه نشان داده‌اند که دژنره شدن درون سلولی پرولاکتین دیده نمی‌شود درحالیکه درمورد هورمونGH این امرصورت می‌گیرد. درباره تولید همزمان این دو هورمون پژوهشها ادامه دارد ولی هنوز جواب روشنی به این سؤال داده نشده است. تاکسیه و همکارانش معتقدند که ترشح پرولاکتین و GH توسط این سلولها با سلولهای طبیعی از نظرکمی تفاوتهائی دارد بطوریکه نسبت پرولاکتین خارج به داخل سلول درسلولهای GH_3 ده بار بیشتر از سلولهای طبیعی می‌باشد اما ترشحGH توسط سلولهای GH_3 مانند سلولهای طبیعی کمتراز ترشح پرولاکتین است .(Tixier-vidal,1978, 1976, 1980)

همین پژوهشگران با استفاده از رنگ آمیزیهای ایمونولوژیک بوسیله آنتی پرولاکتین موش دریافته‌اند که با میکروسکوپ نوری شدت رنگ برای سلولها متغیر است و این سلولها از سلولهای طبیعی کمرنگتر می‌باشند که علت تغییر را به واسطه مقادیر مختلف پرولاکتین دانسته‌اند.

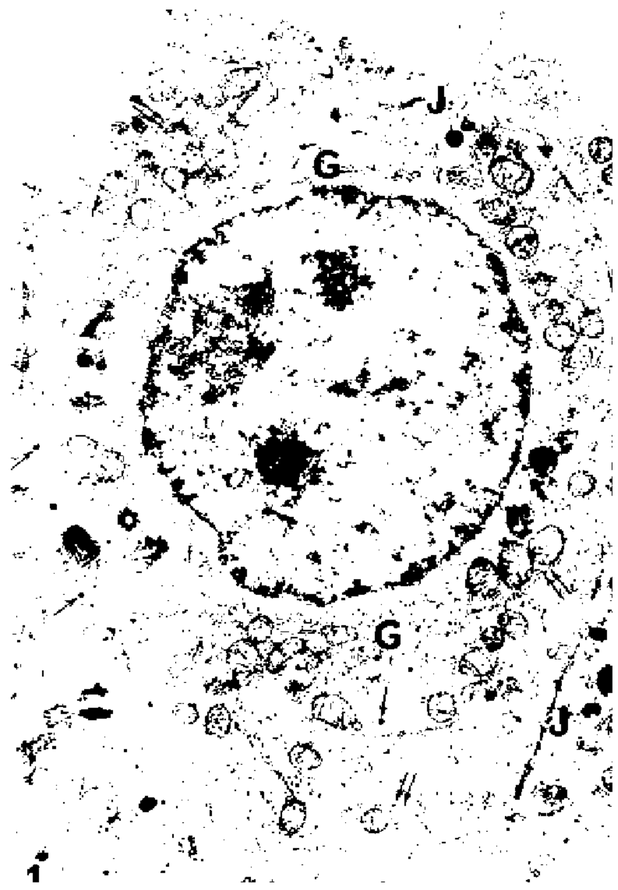
درپژوهش حاضر همانطورکه ذکر شد انکوباسیون طولانی‌مدت سلولهای GH_3 باعث افزایش آزاد شدنPRL در این سلولها می‌شود و اضافه کردن نوروپپتید TRH به محیط این ترشح را بطور معنی‌دار افزایش می‌دهد و بطورکلی می‌توانیم نتیجه بگیریم‌که اولاً با مشاهده این سلولها بوسیله میکروسکوپ اینورت و الکترونیک به این نتیجه می‌رسیم‌که سلولهایGH_3 شبیه سلولهای طبیعی پرولاکتین هستند و تفاوت آنها بیشترکمی‌است نه کیفی و ثانیاً انبار ذخیره PRL درسلولهای GH_3 وجود داردکه با نسبت بالای پرولاکتین خارج سلولی هماهنگ است و این سلولها نظیر سلولهای طبیعی پرولاکتین به نوروپپتید TRH که یکی‌از بهترین محرکهای ترشحPRL ازسلولهای لاکتوتروپ است جوابی‌کاملاً مشابه می‌دهند.



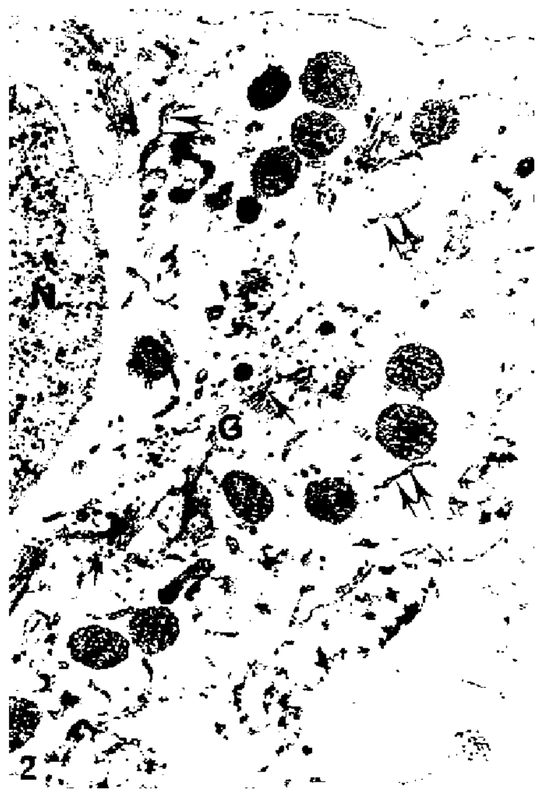
تصویر۱– سلولهایGH_3/B_6 دریک لایه سلولی درمحیط کنترل: تصویر بوسیله میکروسکوپ اینـــورت بزرگنمائی×۳۲



تصویر۲– سلولهایGH_3/ B_6 با تقسیم زیاد و سلولهای شناور درمحیط کنترل تصویر با میکروســکوپ اینورت بزرگنمائی× ۳۲



تصویر۳- سلولهای GH_3/B_6 در شرایط کنترل: دستگاه گلژی(G)، گرانول کوچک ترشحی تعداد حفرات شبکه آندوپلاسمیک دانه‌دار (↓↓) ارتباط مشخص سلولها (j) میکروسکوپ الکترونی با بزرگنمائی×۱۳/۰۰۰



تصویر۴- سلولهای GH_3/B_6 درشرایط کنترل: منطقه گلژی(↓G)، گراتولهای کوچک (Δ) میتوکندری (m) و هسته (N) میکروسکوپ الکترونی با بزرگنمائی×۲۴/۰۰۰ شبکه آندوپلاسمیک دانه‌دار (↓↓)

تشکر و قدردانی

از معاون و شورای پژوهشی دانشگاه تهران و مسئولین دانشکده علوم که از هرگونه مساعدت دریغ نداشتند قدردانی می‌شود.

ازخانم دانیل گرجیDanielle gourdji پژوهشگر INSERM، College de France برای اهداء سلولهایGH_3 به آزمایشگاه فیزیولوژی جانوری و مساعدت برای انجام پاره‌ای‌از آزمایشهای مربوط به میکرسکپ الکترونی سپاس و قدردانی می‌شود.

از آزمایشگاه بیوفیزیک و بیولوژی ملکولی مرکز تحقیقات بیوفیزیک و بیوشیمی برای همکاری بیدریغشان تشکر می‌شود.

Referance

Brunet, N., Rizzino, A., Gourdji, D., Tixier-vidal, A., (1981) *Effects of thyroliberin (TRH) on cell proliferation and prolactin secretion by GH3/B6 rat pituitary cells: a comparison between serum–free and serum supplemented media*. J. Cell physiol. **109,**363-372.

Gautvik, K.M. and Kriz, M., (1982) *Stimulation of prolacin synthesis and of adenosine 3, 5, cyclic phosphate formation by prostaglandins and thyroliberin in cultured rat piuitary cells*. Biochem. J., **150,** 111-117.

Gourdji, D., Tougand, C., Tiixier vidal A., (1982) *Clonal prolactin strains as a tool in Neuroendocrinology*. Frontiers in Neunoedocrinology. **7**, 317-333.

Haug, E., Ijemshaugen. H. and Gautvik, K.M., (1977) *Variations in prolavtin and growth hormone production during cellular growgy in clonal strains of rat pituitary cells*. Physiol. **91,** 15-30.

Hoyt, R.F., Jr. and Tashjian, AH., Jr. (1980*) Immune cytochemical analysis of prolactin production by monolayer cultures of GH3 rat anterior pituitary tumor cells. I. Long–term effects of stimulation with thynotropin–releasing hormone (TRH).* Anat. Rec., **196,**153-162.

Hogt, R.F., Jr. and Tashjian, A.H. Jr., (1980) *Immunocytochenical onalysis of prolactin production by monolager cultures of GH3 rat anterior pituitany tumor cells: II. Variation in prolaction with thyrotropin–releasing hormone (TRH).* Anal. Rec., **196,** 163-181.

Lkhider, M., Delpal, S., Ollivier–Bousquet, M., (1996) *Rat prolactin in serum, milk, and mammary tissue: Characterization and intracellular localization*. Endocrinology **137,** 4969-4979.

Lkhider M., Delpal. S., Le provost, F., Ollivier–Bousquet, M., (1997) *Rat prolactin synthesis by lactating mamary epithelial cells* FEBS Lett 117-122.

Martinet, Y., Houdebine L.M., Head, Herbert H., (1999) *The regulation of milk protein synthesis*. Bilogy of lactation, 401-427.

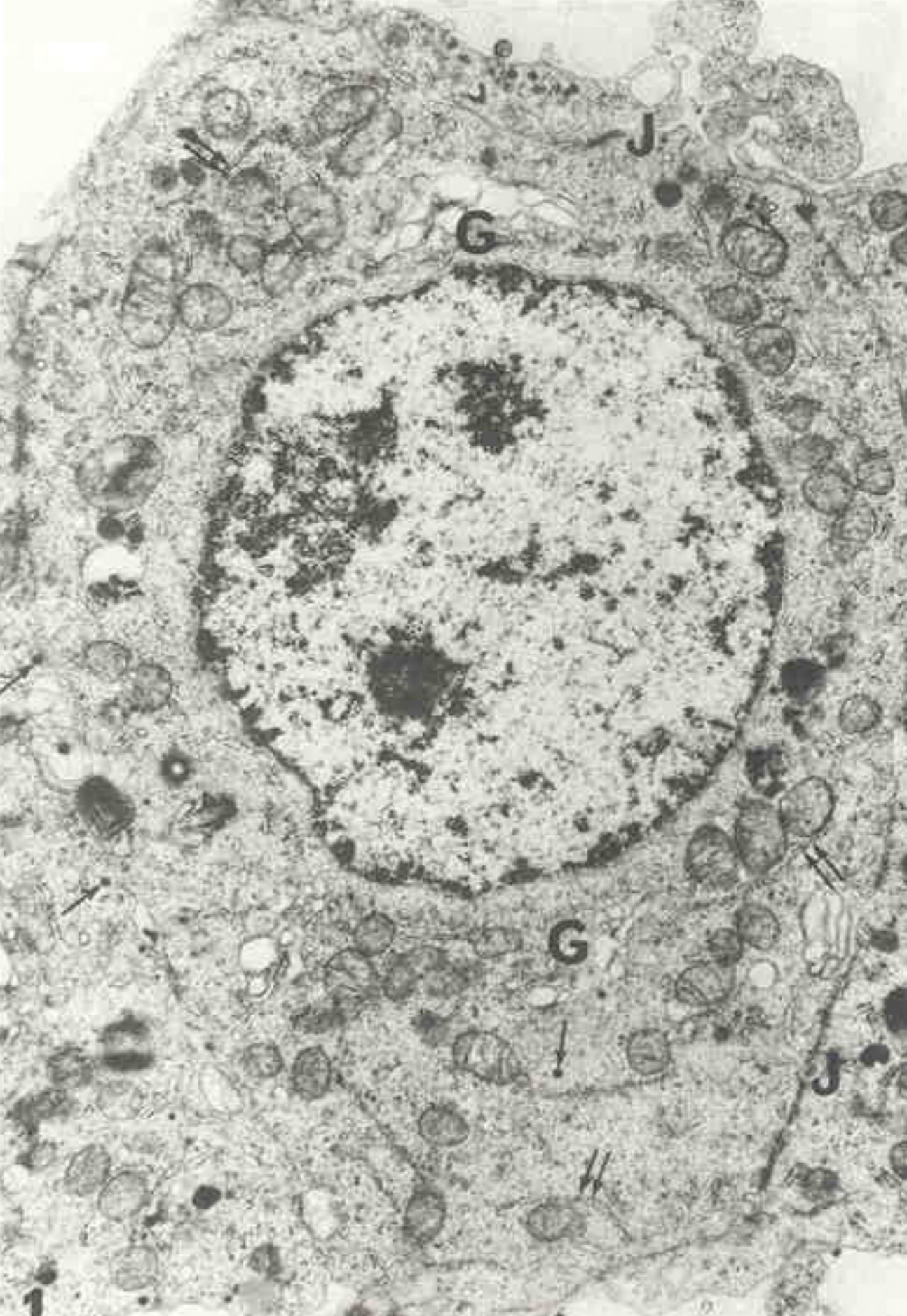
Takemoto, H., Yokoro, K., Furth. J. and cohen, A.I., (1971) *Adrenotropiv activity of mamosomatotropic tumors in ras and mice*. Cancer Res, **22,** 917-925.

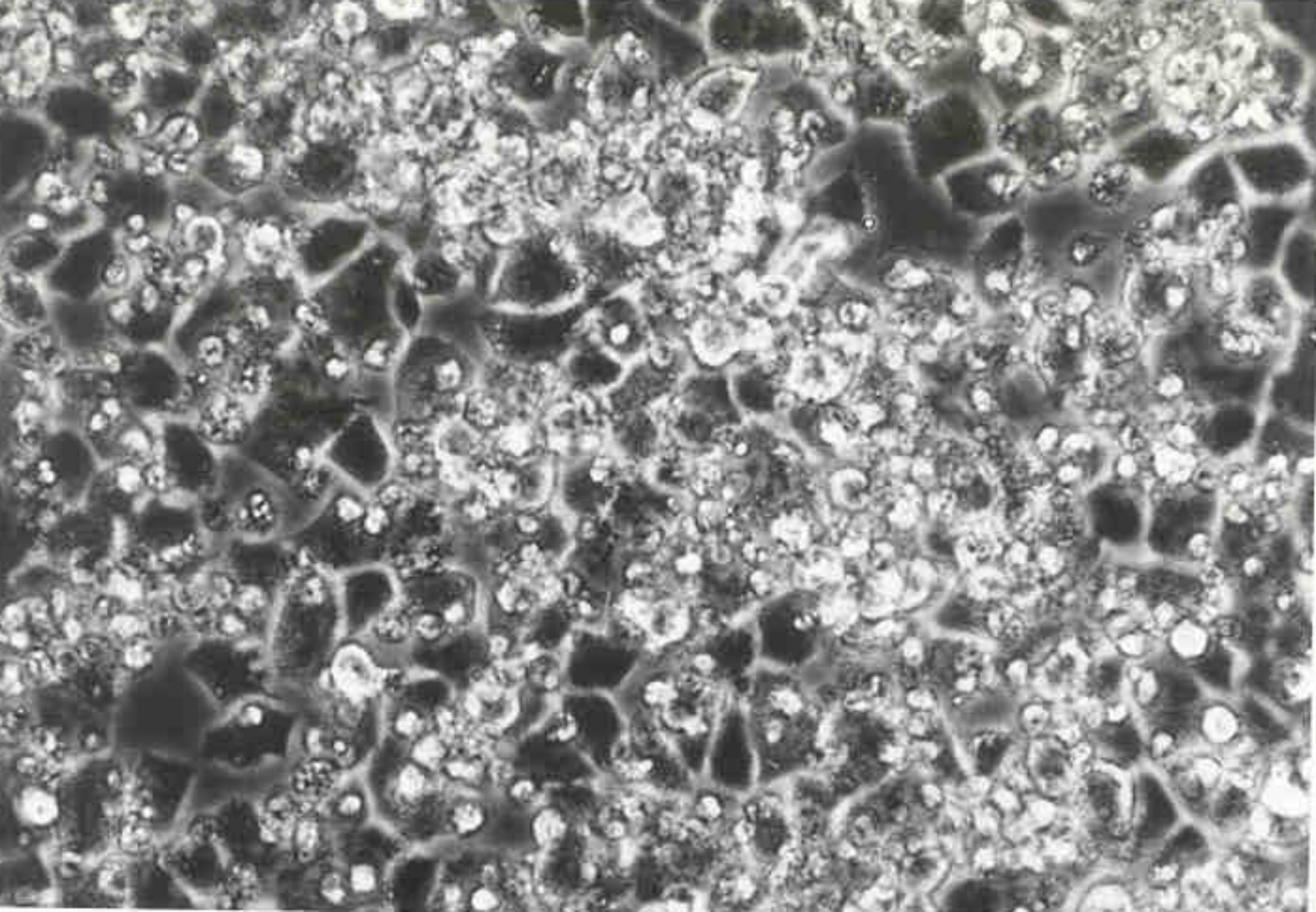
Tashjian, A.H., Jr., Bancroft, F.C., and levine, L.(1970) *Production of both prolactin and growth hormone by clonal strains of rat pituitary tumor cells*. J. Cell. Biol. **47,** 61-70.

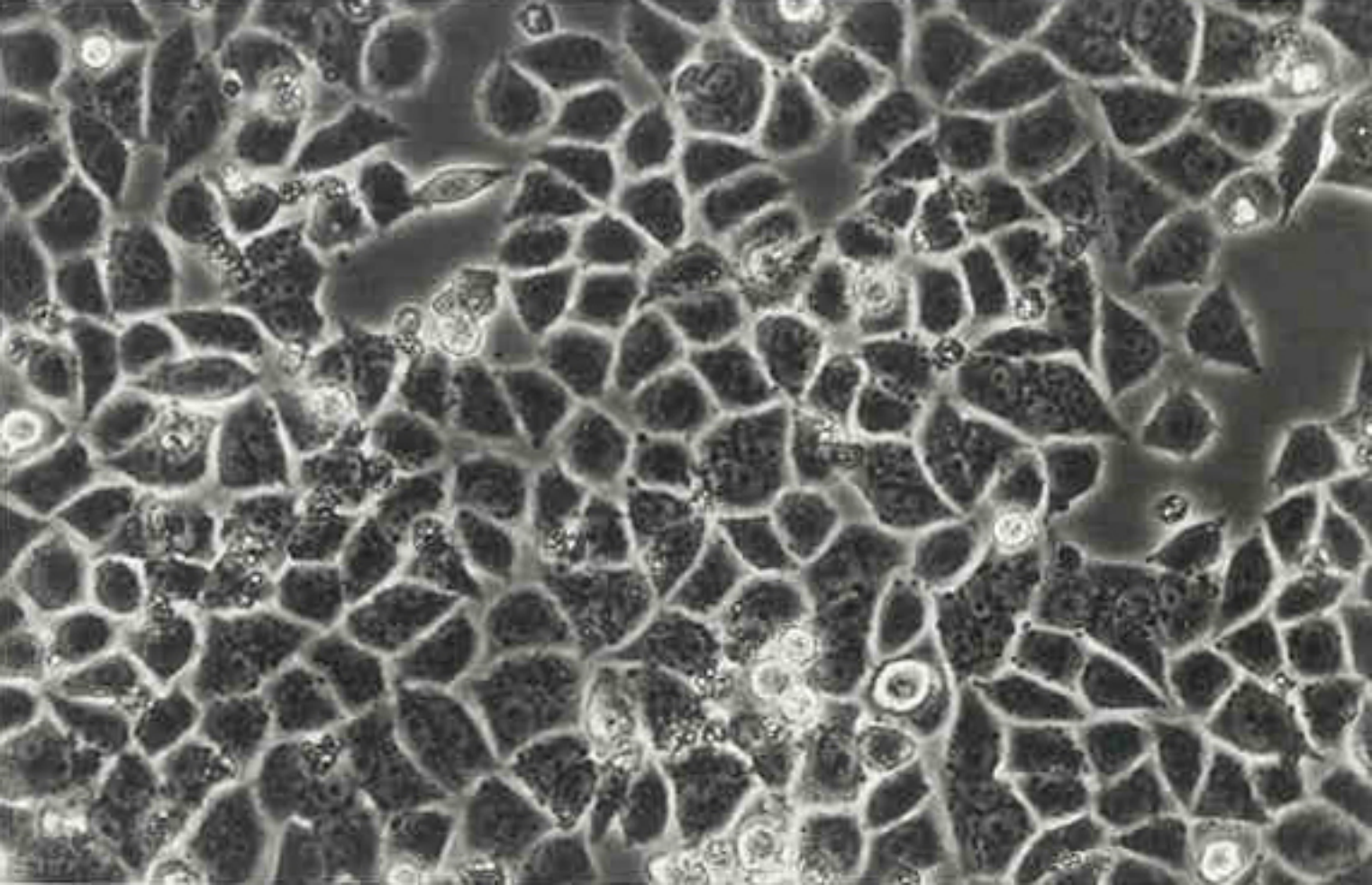
Tixier-vidal, A., Brunet, N., and Gourdji, D., (1978) *Morphological and molecular aspects of the regulation of prolactin secretion by rat pituitary cell lines*. In: Progress in prolactin physiology and pathology, edited by C., Robyn and M., Harter , pp. 29-43. Elsevier North- Holland Biomedical press. Amsterdam.

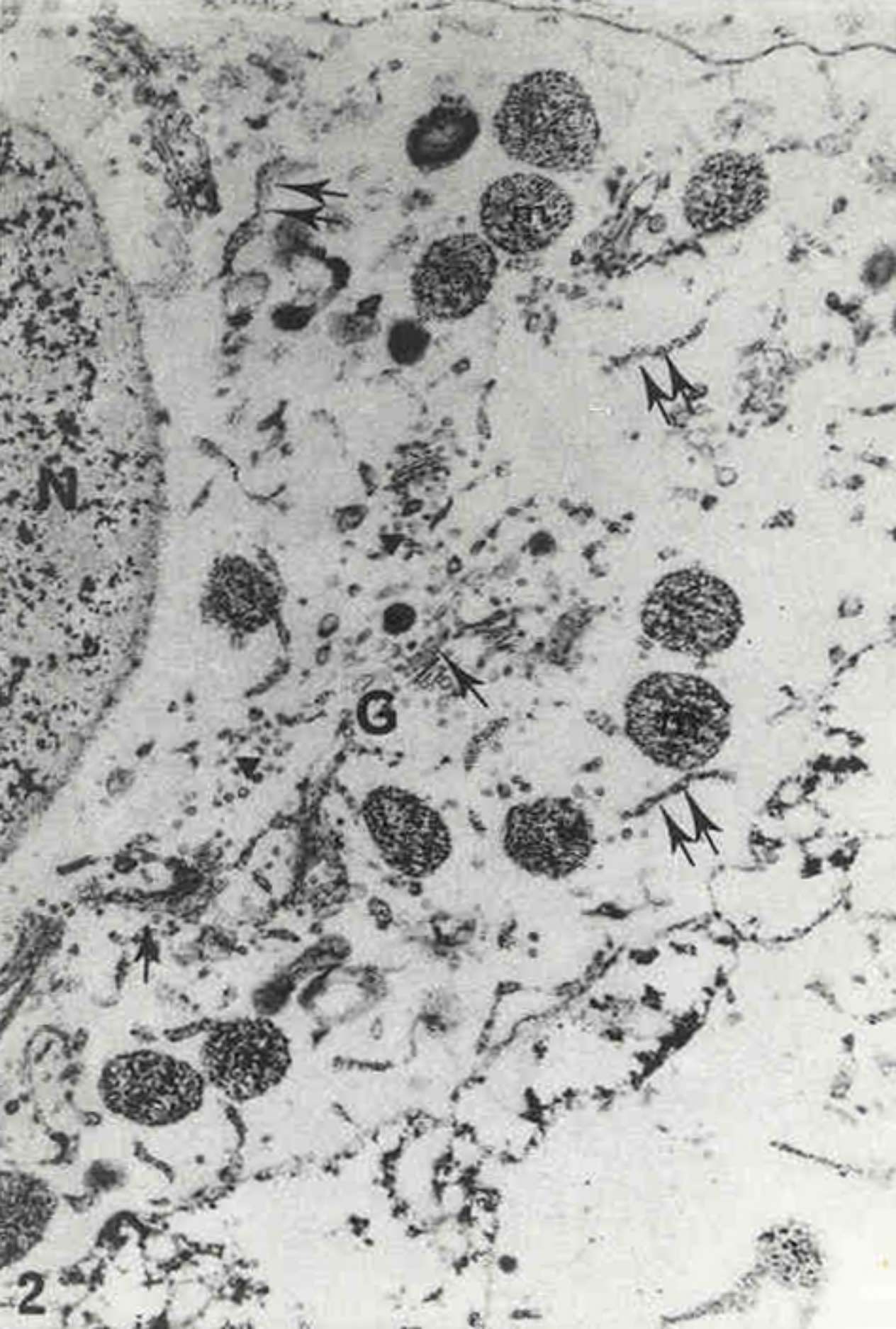
Tixier-Vidal, A., Brunet, N., Toggard. C., and Gourdji D, (1980) *Morphological and molecular aspects of prolactin and growth hormone secretion by normal and tumoral pituitary cells in culture. In: Pituitary Micro-Adenomas*, edited by G. Faglia, M.Giovanelli, and R.M. Mcleod, pp.73-90. Academic press, New York.

Tixier-Vidal, A., Tougard, CCI. and Picart, R., (1976) *Subcellular localization of some protein and glycoprotein hormones of the hypothalamo- hypophysal axis as revealed by peroxydase- labeled antibody method. In: Immumoenzymatic Techniques*, edited by G. Feldman P . Druet, J. Bugnon, and S. Avrameas, pp. 307-321. North Holland, Amsterdam.


J
J
G
G
J






N
G
2