DOI: 10.22122/jims.v36i474.9631 Published by Vesnu Publications

مجله دانشکده پزشکی اصفهان سال سی و ششم/شماره‌ی ٤٧٤/هفته‌ی دوم خرداد ۱۳۹۷

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۱۱/۱۸ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۲/۱۸ تاریخ چاپ: ۱۳۹۷/۳/۸

اثر اندوتلین–۱ بر بیان ژن NADPH اکسیداز از طریق گیرنده‌ی TGF-β در سلول‌های عضلات صاف آئورت انسانی

پریسا دایتی[۱]، ریحانه نیایش مهر[۱]، علیرضا جعفری[۱]، حسین بابا احمدی رضایی[۲]

مقاله پژوهشی

چکیده

مقدمه: NADPH اکسیداز (Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase یا Nox) یکی از منابع اصلی تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژن در دیواره‌ی عروق است. اندوتلین–۱، یک عامل منقبض کننده‌ی قوی است که فعالیت میتوژنیک در سلول‌های عضلات صاف عروق دارد. فعال شدن گیرنده‌ی Transforming growth factor beta (TGF-β) توسط اندوتلین–۱ نقش مهمی در بیماری‌های قلبی– عروقی ایفا می‌کند. هدف از انجام این مطالعه، بررسی تغییرات بیان ژن آنزیم Nox در سلول‌های عضلات صاف تیمار شده با اندوتلین–۱ در حضور مهار کننده‌ی گیرنده‌ی TGF-β بود.

روش‌ها: سلول‌های عضلات صاف آئورت انسانی (Human aortic smooth muscle cells یا HA-SMCs) با اندوتلین–۱ (۱۰۰ نانومولار) و TGF-β (۲ نانوگرم/میلی‌لیتر) در حضور و عدم حضور مهار کننده‌ی گیرنده‌ی TGF-β تیمار شدند. بیان Messenger RNA (mRNA) مربوط به Nox1 و Nox4 با استفاده از روش Real-time polymerase chain reaction (Real-time PCR) مورد ارزیابی قرار گرفت.

یافته‌ها: بیان ژن Nox1 در حضور اندوتلین–۱ در مقایسه با گروه شاهد افزایش یافت، اما در بیان ژن Nox4 تغییری مشاهده نشد. افزایش بیان Nox1 در حضور مهار کننده‌ی گیرنده‌ی TGF-β (۱۰ میکرومولار) کاهش یافت.

نتیجه‌گیری: نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که یکی از مکانیسم‌های افزایش بیان mRNA مربوط به Nox1 توسط اندوتلین–۱ از طریق فعال‌سازی مسیر TGF-β می‌باشد.

واژگان کلیدی: NADPH اکسیداز، اندوتلین–۱، Transforming growth factor beta

ارجاع: دایتی پریسا، نیایش مهر ریحانه، جعفری علیرضا، بابا احمدی رضایی حسین. **اثر اندوتلین–۱ بر بیان ژن NADPH اکسیداز از طریق گیرنده‌ی TGF-β در سلول‌های عضلات صاف آئورت انسانی.** مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۳۹۷؛ ۳۶ (۴۷۴): ۳۵۰–۳۴۴

مقدمه

در سیستم‌های بیولوژیک، تولید رادیکال‌های آزاد و گونه‌های فعال اکسیژن (Reactive oxygen species یا ROS) اجتناب ناپذیر است و بدن با طراحی مکانیسم‌های دفاع آنتی‌اکسیدانی، اثرات زیان‌بار آن‌ها را تا حدودی خنثی می‌نماید. یکی از منابع اصلی تولید ROS در سلول‌های گوناگون و به خصوص سلول‌های قلبی– عروقی، کمپلکس آنزیمی NADPH اکسیداز (Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase یا Nox) می‌باشد. این آنزیم غشایی که شامل زیر واحد کاتالیتیک غشایی و زیر واحدهای سیتوزولی می‌باشد، با انتقال الکترون از NADPH به اکسیژن مولکولی، موجب تولید آنیون مخرب سوپراکسید می‌گردد (۱). تا کنون ۷ نوع آنزیم NADPH اکسیداز شامل Nox1، Nox2، Nox3، Nox4، Nox5، Duox1 و Dual oxidase (Duox2) شناسایی شده است و به مجموع آن‌ها «Nox family» گفته می‌شود که از نظر تعداد زیر واحد، توزیع درون سلولی، الگوی بیان و مکانیسم فعال‌سازی با هم تفاوت دارند. از میان اعضای خانواده‌ی Nox، ۲ آنزیم Nox1 و Nox4 به طور عمده در سلول‌های عضلات صاف دیواره‌ی عروق بیان می‌شوند (۲). این آنزیم‌ها در حالت پایه و بدون القای محرک فعال می‌باشند و مقادیر اندکی ROS تولید می‌کنند که به عنوان پیام رسان‌های ثانویه در فعال شدن مسیرهای پیام‌رسانی و تنظیم بیان ژن‌ها مشارکت دارند. تحت

۱- مرکز تحقیقات آترواسکلروز، گروه بیوشیمی بالینی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی جندی‌شاپور اهواز، اهواز، ایران

۲- استادیار، مرکز تحقیقات آترواسکلروز، گروه بیوشیمی بالینی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی جندی‌شاپور اهواز، اهواز، ایران

نویسنده‌ی مسؤول: حسین بابا احمدی رضایی

Email: babaahmadi-h@ajums.ac.ir

تأثیر محرک‌های گوناگون، بیان این آنزیم‌ها افزایش می‌یابد که نقش مهمی در پاتوژنز بیماری‌های قلبی- عروقی دارند (۴-۳).

اندوتلین-۱، یک پپتید ۲۱ آمینو اسیدی است و برای اولین بار در سال ۱۹۸۸ توسط Yanagisawa و همکاران از محیط کشت سلول‌های اندوتلیال آئورت خوک جداسازی شد (۵). اندوتلین-۱ اثرات خود را بر روی سلول هدف به واسطه‌ی دو گیرنده‌ی ET_A و ET_B اعمال می‌کند که نقش بسیار مهمی در تنظیم رشد، تکثیر، افتراق سلول‌ها و آنژیوژنز دارند. گیرنده‌های اندوتلین-۱، متعلق به خانواده‌ی گیرنده‌های سطح سلولی به نام G-protein coupled receptors (GPCR) می‌باشند که هفت بار عرض غشا را طی می‌کنند و فعالیت‌های درون سلولی را با فعال‌سازی پروتئین‌های G انجام می‌دهند. این گیرنده‌ها، همچنین می‌توانند با مولکول‌های غیر از پروتئین‌های G میانکنش داشته باشند. GPCRها می‌توانند گیرنده‌های عوامل رشد را فعال کنند که این مسیر Transactivation نام دارد (۶).

برای اولین بار، در سال ۱۹۹۶، Daub و همکاران دریافتند که آگونیست‌های GPCR مانند ترومبین، لیزوفسفاتیدیک اسید و اندوتلین-۱ می‌توانند گیرنده‌های تیروزین کینازی به ویژه گیرنده‌ی عامل رشد اپیدرمی (Epidermal growth factor receptor یا EGFR) را در سلول‌های فیبروبلاست فعال کنند که در نهایت منجر به فسفریلاسیون Extracellular signal–regulated kinases (ERK1/2) به عنوان واسطه‌ی پایین دست گیرنده‌ی EGF می‌گردند (۷). مسیر Transactivation بسیار مهم می باشد؛ چرا که آگونیست‌های GPCR به طور معمول قادر به ایجاد سیگنال رشد سلولی نیستند، در حالی که می‌توانند با Transactivation گیرنده‌های عوامل رشد، توانایی ایجاد پاسخ رشد سلولی را به دست آورند.

مسیر Transactivation، مسیری است که تا حد بسیار زیادی پاسخ‌های آگونیست‌های GPCR را گسترش می‌دهد (۸). مسیر Transactivation تنها محدود به گیرنده‌های تیروزین کینازی نمی‌باشد، بلکه گیرنده‌های سرین/ ترئونین کینازی به خصوص گیرنده‌ی Transforming growth factor beta (TGF-β) توسط بعضی آگونیست‌های GPCR فعال می‌شوند. در سلول‌های Vascular smooth muscle cells (VSMC)، اندوتلین-۱ با اتصال به گیرنده‌ی خود و سپس، فعال‌سازی گیرنده‌ی TGF-β می‌تواند دو ریشه‌ی سرین در موقعیت‌های ۴۶۵ و ۴۶۷ در ناحیه‌ی کربوکسی Smad2 را فسفریله کند (۹). فسفریلاسیون ناحیه‌ی کربوکسی R-Smadها (Smad2 و Smad3) موجب اتصال آن‌ها به Co-Smad (Smad4) می‌گردد و نتیجه‌ی آن، تشکیل ساختمان ترایمر R-Smads /Co-Smad است که شامل دو R-Smad و یک Co-Smad می‌باشد. سپس، این ساختار وارد هسته می‌شود و در آن جا به عنوان یک عامل رونویسی در تنظیم بیان ژن‌های هدف، ایفای نقش می‌کند (۱۰). با توجه به این که اندوتلین-۱ با افزایش بیان و فعال‌سازی آنزیم Nox و در نتیجه، تولید ROS نقش مهمی در ایجاد بیماری‌های قلبی- عروقی ایفا می‌کند، در این مطالعه به بررسی اثر اندوتلین-۱ بر بیان Messenger RNA (mRNA) مربوط به ایزوفرم‌های Nox موجود در VSMC و نقش مهار کننده‌ی گیرنده‌ی TGF-β به عنوان مهار کننده‌ی مسیر Transactivation در تعدیل میزان بیان ژن پرداخته شد.

روش‌ها

در این مطالعه، اندوتلین-۱، بوستان و SB431542 از شرکت Sigma امریکا ، TGF-β از شرکت Cell Signalling امریکا، Fetal bovine serum (FBS) از شرکت Gibco امریکا، محیط کشت Dulbecco's Modified Eagle Medium/Nutrient Mixture F-12 (DMEM/12) و آنتی‌بیوتیک‌های پنی‌سیلین و استرپتومایسین از شرکت Bio-Idea ایران خریداری شدند.

کشت سلولی: در این مطالعه، رده‌ی سلولی عضلات صاف آئورت انسانی (Human aortic-VSMC یا HA-VSMC) به شماره‌ی ATCC CCL-1999™ به صورت فلاسک آماده از بانک سلولی انستیتو پاستور ایران تهیه شد. این رده‌ی سلولی چسبنده است و به صورت یک لایه‌ی چسبنده به سطح، در محیط کشت DMEM-F12 همراه با ۱۰ درصد FBS و پنی‌سیلین- استرپتومایسین در انکوباتوری با CO_2 ۵ درصد و رطوبت ۹۵ درصد و در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد به خوبی رشد می‌کنند. برای انجام آزمایش‌ها، سلول‌ها به تعداد ۴×۱۰^۵ به پلیت‌های ۶ خانه منتقل شدند و در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد و CO_2 ۵ درصد تا زمانی که ۸۰ درصد سطح پلیت‌ها توسط سلول‌ها پر شوند، انکوبه شدند. قبل از تیمار سلولی، سلول‌ها به مدت ۲۴ ساعت در محیط دارای ۰/۱ درصد FBS قرار داده شدند.

تیمار سلولی: به منظور بررسی اثر اندوتلین-۱ بر میزان بیان mRNA مربوط به ایزوفرم‌های Nox1 و Nox4، سلول‌ها با غلظت ۱۰۰ نانومتر از اندوتلین-۱ در زمان‌های مختلفی تیمار شدند. سپس، به منظور بررسی اثر مهار کننده‌ها بر بیان mRNA القا شده در اثر اندوتلین-۱، سلول‌ها ابتدا با غلظت ۱۰ میکرومولار از SB431542 (مهار کننده‌ی گیرنده‌ی TGF-β) و بوستان (مهار کننده‌ی گیرنده‌ی اندوتلین-۱) به مدت ۳۰ دقیقه انکوبه گردیدند و سپس، به مدت ۸ ساعت سلول‌ها تحت تیمار با غلظت ۱۰۰ نانومولار از اندوتلین-۱ و غلظت ۲ نانوگرم/میلی‌لیتر از TGF-β قرار گرفتند. غلظت‌های مورد

استفاده برای مهار کننده‌ها و عوامل رشد با توجه به مقالات انتخاب شدند (۹). گروه شاهد فقط DMSO به عنوان حلال دریافت کردند، سلول‌ها در گروه‌های ۲، ۴ و ۸ ساعته در معرض اندوتلین-۱ قرار گرفتند و همچنین، در گروه bos سلول‌ها ابتدا در معرض Bosentan (مهار کننده‌ی گیرنده‌ی اندوتلین-۱) به مدت ۳۰ دقیقه قرار گرفتند و پس از آن، اندوتلین-۱ به مدت ۸ ساعت اضافه گردید و سپس، میزان بیان Nox-1 مورد اندازه‌گیری قرار گرفت (شکل ۱). آزمایش دیگری برای بررسی اثر اندوتلین و TGF-β بر روی بیان Nox-1 صورت گرفت و بدین ترتیب، گروه شاهد، گروه اندوتلین (سلول‌ها فقط اندوتلین-۱ دریافت کردند) و گروهی که سلول‌ها اندوتلین و مهار کننده‌ی TGF-β دریافت کردند، مورد مطالعه قرار گرفتند (شکل ۲).

استخراج RNA Total از سلول‌ها، سنتز Quantitative Real-time و (cDNA) complementary DNA polymerase chain reaction

پس از جمع‌آوری سلول‌ها، RNA total با استفاده از کیت شرکت کیاژن (آلمان) طبق دستورالعمل شرکت سازنده استخراج گردید. سپس، با استفاده از دستورالعمل کیت مربوط (Takara, Japan)، نسخه‌ی cDNA از روی RNA total ساخته شد. در نهایت، تمام واکنش‌ها برای بررسی میزان بیان ژن‌های مربوط به Nox1، Nox4 و Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) با استفاده از کیت Master mix SYBR green (Takara, Japan) و با استفاده از دستگاه Real-time PCR مدل ABI 7500 fast (96 well) انجام شد. ژن GAPDH به عنوان ژن شاهد داخلی (House keeping) و به منظور تصحیح میزان بیان ژن هدف استفاده گردید. میزان بیان ژن ایزوفرم‌های Nox4 و Nox1 در برابر ژن مرجع GAPDH با استفاده از روش $2^{-\Delta\Delta CT}$ به دست آمد. برای طراحی و بررسی پرایمرها از نرم‌افزار *AlleleID*® نسخه‌ی ۶ استفاده گردید و همچنین، برای بررسی ویژگی (Specificity) پرایمرها BLAST آن‌ها صورت گرفت. پرایمرهای ژن‌های Nox1، Nox4 و GAPDH از شرکت تکاپوزیست (ایران) تهیه شدند. توالی پرایمرهای مورد استفاده به شرح زیر بودند:

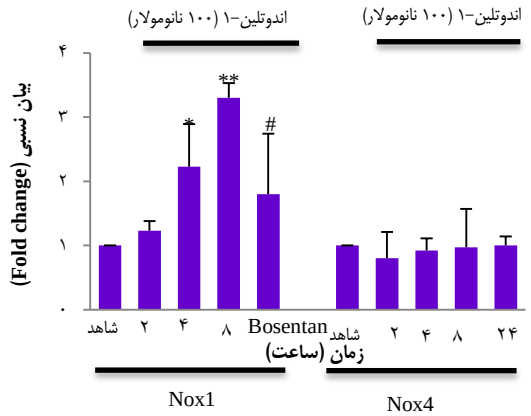
توالی رفت ژن Nox1:
5'-CATCCTTGCACCGGTCATTC-3'،
توالی برگشت ژن Nox1:
5'-ATCACAACCTTCTGCTGGGA-3'،
توالی رفت ژن Nox4:
5'-CCACAGACCTGGCTTTGGAT-3'،
توالی برگشت Nox4:
5'-CTGGCTTGTTGCTCCGGATA-3'،
توالی رفت ژن GAPDH:
5'-CAAGTTCAACGGCACAGTCAAG-3'،
توالی برگشت ژن GAPDH:
5'-CATACTCAGCACCAGCATCACC-3'

محاسبات آماری:

واکاوی آماری داده‌های به دست آمده، بر اساس میانگین ± انحراف معیار و آزمون One way ANOVA با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه‌ی ۱۶ (version 16, SPSS Inc., Chicago, IL) انجام شد. $P < ۰/۰۵$ به عنوان سطح معنی‌داری در نظر گرفته شد.

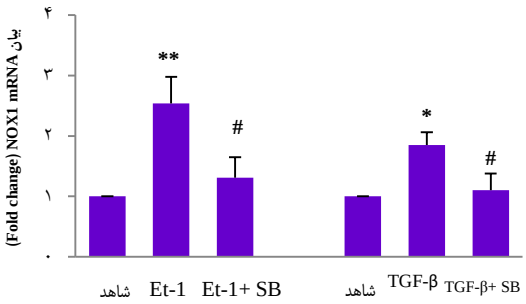
یافته‌ها

در این مطالعه، به منظور بررسی اثر اندوتلین-۱ بر روی بیان ژن‌های Nox1 و Nox4، سلول‌ها تحت تیمار با اندوتلین-۱ (۱۰۰ نانومولار) در زمان‌های مختلف مطابق شکل ۱ قرار گرفتند. نتایج به دست آمده، حاکی از آن بود که میزان بیان ژن Nox1 در زمان‌های ۴ و ۸ ساعت در سلول‌های تیمار شده با اندوتلین-۱ به صورت معنی‌داری نسبت به گروه شاهد افزایش می‌یابد، اما در بیان ژن مربوط به Nox4 در گروه‌های تیمار شده با اندوتلین-۱ نسبت به گروه شاهد تغییری مشاهده نشد. همچنین، در گروه انکوبه شده با مهار کننده‌ی گیرنده‌ی اندوتلین-۱، بوسنتان (bos)، بیان ژن مربوط به Nox1 کاهش معنی‌داری نشان داد (شکل ۱).



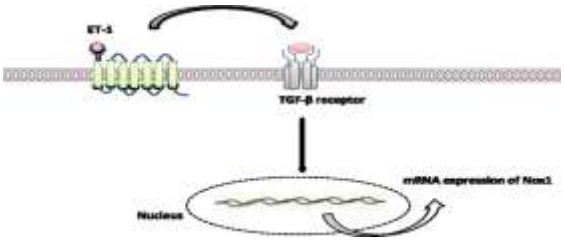
شکل ۱. نمودار مربوط به بیان ژن Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase (Nox1) و Nox4 در سلول‌های عضلات صاف آئورت انسانی تیمار شده با اندوتلین-۱ در غلظت ۱۰۰ نانومولار و در زمان‌های مختلف انکوباسیون. $P^{*} < ۰/۰۵$ و $P^{**} < ۰/۰۱$ برای گروه‌های تیمار شده با اندوتلین-۱ نسبت به گروه شاهد، $P^{\#} < ۰/۰۵$ برای گروه تیمار شده با بوسنتان در مقایسه با گروه تیمار شده با اندوتلین-۱ مدت زمان ۸ ساعت.

سپس، به منظور بررسی نقش گیرنده‌ی TGF-β بر میزان بیان ژن Nox1، از مهار کننده‌ی گیرنده‌ی TGF-β و SB431542، استفاده گردید. مطابق شکل ۲، بیان ژن Nox1 در گروه تیمار شده با اندوتلین-۱ و TGF-β در مدت ۸ ساعت نسبت به گروه شاهد به صورت معنی‌داری افزایش داشت. در حضور ۱۰ میکرومولار SB431542 بیان mRNA مربوط به Nox1 کاهش معنی‌داری نشان داد (شکل ۲). این تصویر، مسیر مورد بررسی را نمایش می‌دهد.



شکل ۲. نمودار مربوط به سنجش میزان بیان ژن Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase (Nox1) در حضور مهار کننده‌ی SB431542. اختلاف معنی‌دار با $P < ۰/۰۵$* و $P < ۰/۰۱$ برای گروه‌های تیمار شده با اندوتلین-۱ با غلظت ۱۰۰ نانوگرم در میلی‌لیتر و Transforming growth factor beta (TGF-β) با غلظت ۲ نانوگرم در میلی‌لیتر نسبت به گروه شاهد و اختلاف معنی‌دار میان گروه‌های تیمار شده با مهار کننده در مقایسه با گروه تیمار شده با آگونیست‌ها با $P < ۰/۰۵$# نشان داده شده است.**

اندوتلین-۱ با اتصال به گیرنده‌ی خود، منجر به فعال‌سازی گیرنده‌ی TGF-β می‌شود و می‌تواند از این مسیر، بیان ژن مربوط به ایزوفرم Nox1 را در سلول‌های عضلات صاف آئورت انسانی (HA-SMCs) افزایش دهد (شکل ۳).



شکل ۳. نمایش نحوه‌ی فعال‌سازی گیرنده‌ی Transforming growth factor beta (TGF-β) توسط اندوتلین-۱ و بیان Messenger RNA (mRNA) مربوط به Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase (Nox1) در سلول‌های عضله‌ی صاف آئورت انسانی که از نتایج این مطالعه حاصل شده است.

بحث

طبق نتایج حاصل از این مطالعه، میزان بیان mRNA مربوط به Nox1 در حضور اندوتلین-۱ در سلول‌های عضله‌ی صاف آئورت، افزایش نشان داد که این افزایش در حضور بوسنتان و SB431542 کاهش یافت. اطلاعات به دست آمده در بخش‌های تحقیقاتی و درمانی، عنوان می‌کند که گونه‌های فعال اکسیژن تولید شده توسط آنزیم Nox، نقش بسیار مهمی در فیزیولوژی و پاتوفیزیولوژی سلول‌های دیواره‌ی عروق قلبی دارند (۱۱). مطالعات نشان داده است که میان سطح هورمون‌ها و عوامل رشد مانند ترومبین، اندوتلین-۱ و TGF-β و میزان بیان و فعالیت Nox ارتباط مستقیمی وجود دارد (۱۴-۱۲).

اندوتلین-۱ به عنوان یک عامل منقبض کننده‌ی قوی عروقی، به طور عمده در سلول‌های اندوتلیال سنتز می‌گردد و با اتصال به گیرنده‌های GPCR خود بر روی سطح سلول‌های عضلات صاف دیواره‌ی عروق، طیف وسیعی از مسیرهای سیگنالینگ داخل سلولی را در این سلول‌ها القا می‌کند که این مسیرها، منجر به فعال‌سازی وقایع سلولی آتروژنیک مانند انقباض سلولی، تکثیر، مهاجرت سلولی، سنتز ماتریکس خارج سلولی، ترشح عوامل رشد، مدیاتورهای التهابی و استرس اکسیداتیو می‌گردد (۶).

بررسی اثرات اندوتلین-۱ بر میزان بیان آنزیم‌های Nox در سلول‌های مختلف پیش‌تر توسط مطالعات دیگر مطرح گردیده بود. Briones و همکاران، سلول‌های عضلات صاف Ratهای Wistar-Kyoto (WKY) را در معرض اندوتلین-۱ (۱۰۰ نانومولار) قرار دادند و مشاهده کردند که بیان ژن آنزیم Nox1 افزیش می‌یابد (۱۵). مطالعه‌ی Todirita و همکاران نشان داد که در سلول‌های عضلات صاف آئورت انسانی، تیمار سلول‌ها با اندوتلین-۱ در غلظت‌های ۵۰-۰ نانومولار، بیان پروتئین Nox1 و تولید ROS را افزایش می‌دهد (۱۶). در راستای مطالعات قبلی، نتایج حاصل از مطالعه‌ی حاضر نیز نشان داد که بین تیمار سلول‌های عضلات صاف آئورت انسانی با اندوتلین-۱ و بیان mRNA مربوط به Nox1، رابطه‌ی معنی‌داری وجود دارد، اما تغییری در بیان Nox4 مشاهده نشد.

در سلول‌های عضلات صاف دیواره‌ی عروق، دو نوع گیرنده‌ی ET_A و ET_B برای اندوتلین-۱ وجود دارد. برای بررسی نقش گیرنده‌ی اندوتلین-۱ بر میزان بیان Nox1، در این مطالعه از مهار کننده‌ی بوسنتان استفاده گردید. بوسنتان، یک آنتاگونیست علیه دو گیرنده‌ی نوع A و B است که به نقل از Thorin و Webb توسط گروه تحقیقاتی Clozel's در سال ۱۹۹۳ کشف گردید و به عنوان دارو در بیماران دارای افزایش فشار خون ریوی در سال ۲۰۰۱ مورد استفاده قرار گرفت (۱۷).

GPCRها بزرگ‌ترین گروه از گیرنده‌های سطح سلولی هستند

و مسیرهای سیگنالینگ مرتبط با آن‌ها از بزرگ‌ترین اهداف دارویی به شمار می‌آید. مسیرهای سیگنالینگ شامل مسیرهای مرتبط با پروتئین‌های G مانند فعال‌سازی مسیرهای مرتبط با فسفولیپاز C (Phospholipase C یا PLC)، پروتئین کیناز A (Protein kinase A یا PKA)، مسیرهای مرتبط با 3-kinase Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate (PI3K) و مسیر Rho-associated protein kinase (Rho/ROCK) است. علاوه بر این مسیرها، فعال‌سازی GPCRها منجر به فعال‌سازی و Transactivation گیرنده‌های عوامل رشد می‌شود (۱۸، ۶). در مطالعه‌ی Little و همکاران، مشخص گردید که در VSMC انسانی، اندوتلین-۱ از طریق فعال‌سازی گیرنده‌ی خود، می‌تواند موجب فعال شدن گیرنده‌ی TGF-β و فعال‌سازی عامل Smad2 گردد و این پاسخ در حضور مهار کننده‌ی اختصاصی گیرنده‌ی اندوتلین-۱ (بوسنتان) و گیرنده‌ی TGF-β (SB431542) به صورت معنی‌داری مهار گردید. عامل رونویسی Smad2 با انتقال به هسته، بیان ژن‌های متعددی را تنظیم می‌کند (۹).

در این مطالعه، برای بررسی این که «آیا مسیر سیگنالینگ TGF-β می‌تواند در افزایش میزان بیان ژن Nox1 القا شده توسط اندوتلین-۱ نقش داشته باشد یا خیر؟»، اثر عامل رشد TGF-β و مهار کننده‌ی گیرنده‌ی آن بر میزان بیان ژن Nox1 بررسی شد. تیمار سلول‌ها با TGF-β موجب القای بیان ژن Nox1 گردید که این افزایش بیان در حضور مهار کننده‌ی SB431542 کاهش یافت. سپس، عملکرد مهار کننده‌ی گیرنده‌ی TGF-β و نقش مسیر Transactivation بر میزان بیان ژن Nox1 در حضور اندوتلین-۱ مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج نشان دادند که افزایش بیان ژن Nox1 ایجاد شده توسط اندوتلین-۱ در حضور مهار کننده‌ی SB431542 کاهش پیدا کرد. این نتایج نشان داد که SB431542 با مهار مسیر Transactivation، باعث کاهش بیان ژن Nox1 می‌گردد. مطالعات گذشته در VSMCs نشان داد که Transactivation گیرنده‌ی TGF-β توسط اندوتلین-۱ منجر به افزایش در طول زنجیره‌های گلیکوز آمینوگلیکان (Glycosaminoglycans یا GAGs) در پروتئوگلیکان‌های ماتریکس خارج سلولی می‌گردد که این امر موجب افزایش اتصال به لیپوپروتئین‌های با چگالی پایین (Low density lipoprotein یا LDL) می‌شود و این فرایند، نقش بسیار مهمی در تشکیل پلاک‌های آترواسکلروتیک در لایه‌ی اینتیما دارد (۱۹، ۹). نتایج این مطالعه نشان داد که Transactivation گیرنده‌ی TGF-β توسط اندوتلین-۱ همچنین منجر به افزایش بیان آنزیم Nox1 می‌شود (شکل ۳).

افزایش بیان آنزیم Nox1 به عنوان فراوان‌ترین آنزیم از خانواده‌ی Nox در سلول‌های عضلات صاف، نقش بسیار مهمی در ایجاد و گسترش پلاک‌های آترواسکلروزی دارد (۴). بنابراین، اهمیت مسیر Transactivation و شناسایی واسطه‌های سیگنالینگ این مسیر قابل توجه است؛ چرا که شناسایی یک مسیر مشترک برای سنتز پروتئوگلیکان و بیان آنزیم‌های Nox، می‌تواند به عنوان یک هدف برای طراحی داروهای درمانی در پیش‌گیری از آغاز آترواسکلروز پیشنهاد گردد. مطالعات بیشتر برای تشخیص دقیق‌تر مکانیسم‌های مولکولی شرکت کننده در مسیر Transactivation و بیان Nox1 ضروری است.

تشکر و قدردانی

نتایج گزارش شده در این مطالعه، حاصل طرح تحقیقاتی ثبت شده در دانشگاه علوم پزشکی اهواز با شماره‌ی طرح CVRC-9208 می‌باشد. تمام امور تخصصی مربوط به اجرای این مطالعه، در گروه بیوشیمی بالینی دانشکده‌ی پزشکی دانشگاه علوم پزشکی جندی‌شاپور اهواز انجام شده است. بدین وسیله از حمایت استادان و کارشناسان محترم گروه بیوشیمی بالینی تشکر به عمل می‌آید.

References

1. Bedard K, Krause KH. The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: Physiology and pathophysiology. Physiol Rev 2007; 87(1): 245-313.
2. Santillo M, Colantuoni A, Mondola P, Guida B, Damiano S. NOX signaling in molecular cardiovascular mechanisms involved in the blood pressure homeostasis. Front Physiol 2015; 6: 194.
3. Dong F, Zhang X, Wold LE, Ren Q, Zhang Z, Ren J. Endothelin-1 enhances oxidative stress, cell proliferation and reduces apoptosis in human umbilical vein endothelial cells: Role of ETB receptor, NADPH oxidase and caveolin-1. Br J Pharmacol 2005; 145(3): 323-33.
4. Gimenez M, Schickling BM, Lopes LR, Miller FJ, Jr. Nox1 in cardiovascular diseases: Regulation and pathophysiology. Clin Sci (Lond) 2016; 130(3): 151-65.
5. Yanagisawa M, Kurihara H, Kimura S, Tomobe Y, Kobayashi M, Mitsui Y, et al. A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. Nature 1988; 332(6163): 411-5.
6. Ivey ME, Osman N, Little PJ. Endothelin-1 signalling in vascular smooth muscle: Pathways controlling cellular functions associated with atherosclerosis. Atherosclerosis 2008; 199(2): 237-47.
7. Daub H, Weiss FU, Wallasch C, Ullrich A. Role of transactivation of the EGF receptor in signalling by G-protein-coupled receptors. Nature 1996; 379(6565): 557-60.

8. Kamato D, Burch ML, Osman N, Zheng W, Little PJ. Therapeutic implications of endothelin and thrombin G-protein-coupled receptor transactivation of tyrosine and serine/threonine kinase cell surface receptors. J Pharm Pharmacol 2013; 65(4): 465-73.
9. Little PJ, Burch ML, Getachew R, Al-aryahi S, Osman N. Endothelin-1 stimulation of proteoglycan synthesis in vascular smooth muscle is mediated by endothelin receptor transactivation of the transforming growth factor-[beta] type I receptor. J Cardiovasc Pharmacol 2010; 56(4): 360-8.
10. Yang SN, Burch ML, Tannock LR, Evanko S, Osman N, Little PJ. Transforming growth factor-beta regulation of proteoglycan synthesis in vascular smooth muscle: contribution to lipid binding and accelerated atherosclerosis in diabetes. J Diabetes 2010; 2(4): 233-42.
11. Lassegue B, San MA, Griendling KK. Biochemistry, physiology, and pathophysiology of NADPH oxidases in the cardiovascular system. Circ Res 2012; 110(10): 1364-90.
12. Michaeloudes C, Sukkar MB, Khorasani NM, Bhavsar PK, Chung KF. TGF-beta regulates Nox4, MnSOD and catalase expression, and IL-6 release in airway smooth muscle cells. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 2011; 300(2): L295-L304.
13. Touyz RM, Briones AM, Sedeek M, Burger D, Montezano AC. NOX isoforms and reactive oxygen species in vascular health. Mol Interv 2011; 11(1): 27-35.
14. Jagadeesha DK, Takapoo M, Banfi B, Bhalla RC, Miller FJ, Jr. Nox1 transactivation of epidermal growth factor receptor promotes N-cadherin shedding and smooth muscle cell migration. Cardiovasc Res 2012; 93(3): 406-13.
15. Briones AM, Tabet F, Callera GE, Montezano AC, Yogi A, He Y, et al. Differential regulation of Nox1, Nox2 and Nox4 in vascular smooth muscle cells from WKY and SHR. J Am Soc Hypertens 2011; 5(3): 137-53.
16. Todirita A, Manea A, Manea SA. Endothelin Type A receptor mediates endothelin-1-induced upregulation of NADPH oxidase activity in human aortic smooth muscle cells. Annals of RSCB 2013; 18(1): 44-50.
17. Thorin E, Webb DJ. Endothelium-derived endothelin-1. Pflugers Arch 2010; 459(6): 951-8.
18. Kamato D, Rostam MA, Bernard R, Piva TJ, Mantri N, Guidone D, et al. The expansion of GPCR transactivation-dependent signalling to include serine/threonine kinase receptors represents a new cell signalling frontier. Cell Mol Life Sci 2015; 72(4): 799-808.
19. Ballinger ML, Ivey ME, Osman N, Thomas WG, Little PJ. Endothelin-1 activates ETA receptors on human vascular smooth muscle cells to yield proteoglycans with increased binding to LDL. Atherosclerosis 2009; 205(2): 451-7.

DOI: 10.22122/jims.v36i474.9631 Published by Vesnu Publications

Journal of Isfahan Medical School **Vol. 36, No. 474, 2nd Week, June 2018**

Received: 07.02.2018 Accepted: 21.05.2018 Published: 29.05.2018

The Effect of Endothelin-1 on Gene Expression of Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate (NADPH) Oxidase via Transforming Growth Factor Beta (TGF–β) Receptor in Human Aortic Smooth Muscle Cells

Parisa Dayati[1], Reyhaneh Niayesh-Mehr[1], Alireza Jafari[1], Hossein Babaahmadi-Rezaei[2]

Original Article

Abstract

Background: Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH) oxidase (Nox) is one of the predominant sources of the production of free oxygen radicals in the vascular wall. Endothelin-1 is a potent vasoconstrictor factor that also has mitogenic activity in vascular smooth muscle cells. The activation of transforming growth factor beta (TGF–β) receptor by endothelin-1 plays an important role in cardiovascular diseases. The aim of this study was to investigate the changes of Nox gene expression in smooth muscle cells treated with endothelin-1 in the presence of the transforming growth factor beta-receptor antagonist.

Methods: Human aortic smooth muscle cells (HA-SMCs) were treated with endothelin-1 (100 nM) and transforming growth factor beta (2 ng/ml) in the presence and absence of transforming growth factor beta-receptor antagonist. The mRNA expression of Nox1 and Nox4 were assessed using real-time polymerase chain reaction (PCR) technique.

Findings: The gene expression of Nox1 increased in the presence of endothelin-1 compared to control group, but there was no change in gene expression of Nox4. Increasing the expression of Nox1 decreased in the presence of transforming growth factor beta-receptor antagonist (10 μM).

Conclusion: The results of this study showed that activation of transforming growth factor beta pathway is one of the mechanisms for increasing the mRNA expression of Nox1 by endothelin-1.

Keywords: NADPH oxidase, Endothelin-1, Transforming growth factor beta

Citation: Dayati P, Niayesh-Mehr R, Jafari A, Babaahmadi-Rezaei H. **The Effect of Endothelin-1 on Gene Expression of Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate (NADPH) Oxidase via Transforming Growth Factor Beta (TGF–β) Receptor in Human Aortic Smooth Muscle Cells.** J Isfahan Med Sch 2018; 36(474): 344-50.

1- Atherosclerosis Research Center, Department of Clinical Biochemistry, School of Medicine, Ahvaz Jundishapur University of Medical Sciences, Ahvaz, Iran
2- Assistant Professor, Atherosclerosis Research Center, Department of Clinical Biochemistry, School of Medicine, Ahvaz Jundishapur University of Medical Sciences, Ahvaz, Iran
Corresponding Author: Hossein Babaahmadi-Rezaei, Email: babaahmadi-h@ajums.ac.ir