

مقاله پژوهشی

بررسی ارتباط متقابل NADPH oxidase و گیرنده آریل هیدروکربن در تولید ملانین از سلول‌های کشت داده شده ملانوسیت رده B16/F10

درنا دوانی داوری، فاطمه دستغیب، امین‌رضا اکبری زاده، افشین محمدی بردبری*

گروه فارماکولوژی و سم‌شناسی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی شیراز، شیراز

پذیرش: ۲۳ اسفند ۹۵

دریافت: ۵ دی ۹۵

چکیده

زمینه و هدف: بعضی از بیماری‌ها از قبیل پیسی، پسروریازیس و سرطان پوست در اثر اختلال در تولید رنگدانه‌های پوست و هموستاز سلول‌های تولیدکننده ملانین ایجاد می‌شود. گیرنده آریل هیدروکربن (AHR) یک گیرنده وابسته به لیگاند می‌باشد که نقش مهمی در متابولیسم داروها، تکامل سیستم ایمنی، تعیین سرنوشت سلول‌های بنیادی، رشد و ازدیاد سلولی، هموستاز سلولی، تنظیم چرخه طبیعی سلول و ساخته شدن ملانین دارد. هدف این بررسی ارتباط متقابل سیستم NADPH oxidase ها (NOXs) و AHR در ایجاد و یا جلوگیری از سنتز ملانین می‌باشد.

روش‌ها: بعد از کشت سلول‌های ملانومای موش رده B16/F10 در محیط استاندارد، سلول‌ها با غلظت‌های مختلف لیگاند درون‌زاد گیرنده AHR به نام 6-formylindolo[3,2-b] carbazole (FICZ) به تنهایی یا همراه با آنتاگونیست گیرنده، AHR 3'-Methoxy-4'-Nitroflavone, MNF، مهارکننده آنزیم سیتوکروم P450 1A1 از خانواده CYP1A1 و مهارکننده آنزیم NADPH oxidase (NOX) (کورکومین ۱ میکرومولار) تیمار شدند و سپس فعالیت آنزیم CYP1A1، فعالیت آنزیم تیروزیناز و مقدار ملانین اندازه‌گیری شد.

یافته‌ها: FICZ به صورت معنادار و با یک الگوی وابسته به دوز و زمان باعث افزایش فعالیت آنزیم CYP1A1 شد. FICZ در غلظت زیاد (۱۰۰ نانومولار) به تنهایی و یا همراه با مهارکننده CYP1A1 و NOX باعث افزایش فعالیت آنزیم CYP1A1 و افزایش میزان ملانین گردید. FICZ در غلظت کم (۱ نانومولار) همراه با مهارکننده NOX به صورت معناداری ($p < 0.05$) باعث افزایش سنتز ملانین گردید.

نتیجه‌گیری: مهار متابولیسم FICZ می‌تواند باعث تحریک سنتز ملانین در شرایط برون تن شود.

واژه‌های کلیدی: ملانین، گیرنده آریل هیدروکربن، NADPH oxidase

مقدمه

به Xenobiotic response element (XRE) یا Dioxin response element (DRE) در ناحیه‌ی پروموتور ژن هدف الزامی است. شواهد نشان می‌دهد در حیوانات ناک اوت شده AHR تکامل کبد، تخمدان و دستگاه تناسلی، قلب و سیستم عروقی با اشکال روبرو است. علاوه بر این AHR نقش مهمی در عملکرد طبیعی سیستم ایمنی و هورمونی، پوست، سیکل شبانه روزی، خون‌سازی و تولید سلول بنیادی دارد [۱].

آریل هیدروکربن‌رسپتور یا به اختصار AHR جزء basic-helix-loop-helix (bHLH), PAS (Per-Arnt-Sim) است که گروه بزرگی از فاکتورهای رونویسی می‌باشند و برای فعال شدن وجود لیگاند برای اتصال به AHR و اتصال رسپتور

* نویسنده مسئول مکاتبات: toxicology@sums.ac.ir

وبگاه مجله: http://ijpp.phypha.ir

ijpp@phypha.ir

پست الکترونیکی مجله:

مواد و روش‌ها

رده سلولی مورد استفاده در این پژوهش سلول‌های ملانوسیت B16/F10 بودند که سلول‌های سرطانی اپیتلیال پوست موش C57BL/6 بوده و برای مطالعات سرطان پوست مورد استفاده قرار می‌گیرند. این سلول‌ها ویژگی‌هایی از سلول‌های تمایز یافته‌ی پوست را حفظ کرده‌اند از جمله توانایی در تولید رنگ‌دانه ملانین را دارند و در محیط کشت به صورت چسبنده به کف ظرف رشد می‌کنند. سلول‌های فوق‌الذکر در محیط کشت RPMI حاوی ۱۰٪ از سرم جنین گاوی یا Fetal bovine serum (FBS) ۱۰۰ واحد/میلی لیترنی سیلین، ۱۰۰ میکروگرم/میلی لیتر استرپتومایسین و در شرایط دی‌اکسیدکربن ۵٪ و دمای ۳۷ درجه سانتیگراد کشت داده شدند. بعد از پرشدن ۷۰ تا ۸۰ درصد چاهک‌ها توسط سلول‌ها، با غلظت‌های مختلف 6-formylindolo[3,2-b]carbazole یا FICZ (۱ نانومولار، ۱۰۰ نانومولار و ۱ میکرومولار) DMSO به عنوان کنترل و غلظت ۵۰۰ نانومولار 3'-Methoxy-4-Nitroflavone یا MNF و ۱ میکرومولار کورکومین به مدت ۱/۵، ۳، ۴/۵، ۷/۵ و ۲۴ ساعت تیمار شدند. MNF باعث القای آنزیم CYP1A1 می‌شود. MNF یک آنتاگونیست قوی برای AHR است که می‌تواند عملکرد آگونیستی نیز از خود نشان دهد. MNF می‌تواند تجزیه شدن FICZ را مهار کند [۱۴]. کورکومین می‌تواند بر پتانسیل اکسایشی-کاهش سلول اثر بگذارد. این ماده هم نقش آنتی اکسیدانت دارد و هم نقش پرو اکسیدانت. کورکومین از همین راه می‌تواند باعث مهار NOX شود [۱۵].

اندازه‌گیری میزان فعالیت آنزیم CYP1A1

برای اندازه‌گیری فعالیت آنزیم از تست ارود-7 (*EROD*; 7-*ethoxyresorufin O-deethylation*) استفاده شد. سلول‌ها با غلظت‌های مختلف FICZ و برای مدت معین تیمار شدند. سپس سلول‌ها به وسیله‌ی PBS شست‌وشو داده شدند. سپس به سلول‌ها اتوکسی رزورفین ۲ میکرو مولار اضافه می‌شود و به مدت ۲۰ دقیقه انکوبه می‌شوند. سپس فلورسانس در طول موج excitation معادل ۵۳۵ نانومتر و طول موج emission معادل ۵۹۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. بعد از اندازه‌گیری طول موج‌ها محلول اتوکسی رزورفین دور ریخته می‌شود. سلول‌ها دو مرتبه

طبق مشاهداتی که قبلاً صورت گرفته سه مسیر سیگنالینگ برای تنظیم بیوسنتز ملانین شناخته شده که شامل (۱) مسیر سیگنالینگ هورمون محرک ملانوسیت آلفا (α -MSH)، (۲) مسیر سیگنالینگ Wnt و (۳) مسیر سیگنالینگ Extracellular signal-Regulated Kinase می‌باشد [۷-۲]. با این حال امروزه مشخص شده که علاوه بر مسیرهای سیگنالینگ یاد شده در بالا، مسیر سیگنالینگ آریل هیدروکربن رسپتور نیز می‌تواند در تنظیم بیوسنتز ملانین مؤثر باشد [۸]. مسیر سیگنالینگ AHR نه تنها به وسیله‌ی تماس با زنبوبوتیک‌ها بلکه بعد از مواجهه با اشعه UVB نیز فعال می‌شود [۹]. مطالعات اخیر نشان داده است که تربیتوفان تحت تاثیر اشعه UV، متابولیت‌هایی تولید می‌کند که می‌تواند موجب فعال شدن AHR و آنزیم‌های مسیر سیتوکروم P450 شود. دو ماده اصلی که از تابش اشعه UV به اسیدآمینه تربیتوفان تولید می‌شوند شامل ۶-فرمیل ایندوکاربازول (FICZ) و ۶-دی‌فرمیل‌ایندول کاربازول می‌باشند [۱۰].

NADPH oxidase یا NOX آنزیمی است که باعث تنظیم بسیاری از مسیرهای سیگنالی سلول می‌شود. با فعال شدن آنزیم‌های NOX در ماکروفاژها و فاگوسیت‌ها، H_2O_2 (با غلظتی در حدود میلی مولار) تولید می‌شود که باعث از بین رفتن باکتری‌ها و سایر پاتوژن‌ها می‌گردد [۱۱]. فعال شدن NOX در سلول‌های غیرفاگوسیتی باعث تنظیم بسیاری از مسیرهای سیگنالی سلول می‌شود [۱۲]. سطح کلسیم درون سلولی و یا فسفریلاسیون اجزای تنظیم‌کننده $TGF\alpha$ ، $TGF\beta$ ، اینترلوکین‌های 1α و β ، EGF، $TNF\alpha$ ، نیروهای محرک مکانیکی (در سلول‌های اندوتلیال)، تغییرات در فشار اکسیژن، هورمون‌ها و یا تغییرات محیطی در سوخت و ساز می‌تواند سیستم سیگنالینگ وابسته به NOX غیرفاگوسیتی را فعال کنند [۱۳].

هدف از این مطالعه بررسی نقش آریل هیدروکربن رسپتور و لیگاند داخلی آن FICZ و سیستم NOXs در ملانوسیتس بود. بدین منظور فعالیت آنزیم CYP1A1 به عنوان آنزیم شاخص فعالیت آریل هیدروکربن رسپتور به همراه فعالیت آنزیم تیروزیناز، به عنوان کلیدی‌ترین آنزیم در سنتز ملانین و نهایتاً مقدار ملانین توتال در سلول‌های ملانوسیت موشی مورد سنجش و بررسی قرار گرفت.

مایع رویی حاوی آنزیم تیروزیناز بود. برای اندازه‌گیری فعالیت آنزیم تیروزیناز مایع رویی در L-Dopa با غلظت 2 mg/ml و بافر فسفات 50 mM مخلوط شد. با تشکیل دوپاکروم فعالیت آنزیم تیروزیناز به وسیله‌ی دستگاه اسپکتوفوتومتر هر 5 دقیقه به مدت 1 ساعت در طول موج 492 نانومتر خوانده شد. رسوب در سدیم هیدروکسید 1 مولار حل شد و به وسیله محلول برادفورد و خواندن جذب به وسیله‌ی دستگاه اسپکتوفوتومتر در طول موج 690 نانومتر میزان پروتئین اندازه‌گیری شد [10].

بعد از جمع‌آوری داده‌ها، با استفاده از برنامه کامپیوتری Graph Pad Prism، از آنالیز واریانس یک طرفه یا دو طرفه و آزمون student t test همراه با تست تکمیلی Tukey برای مقایسه گروه‌های مورد آزمایش استفاده شد. اختلاف بین گروه‌ها با $p < 0.05$ معنی‌دار در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

میزان فعالیت آنزیم CYP1A1 به طور قابل‌توجهی هم وابسته به زمان و هم وابسته به غلظت FICZ می‌باشد. هنگامی که سلول‌ها با FICZ با غلظت 1 نانومولار تیمار شدند، فعالیت آنزیم CYP1A1 پس از 4 ساعت و نیم به حداکثر میزان خود رسید؛ این در حالی است که فعالیت آنزیم CYP1A1 پس از طی زمان 24 ساعت (با همان غلظت 1 نانومولار FICZ) به کم‌ترین حد خود رسید. از طرفی هنگامی که سلول‌ها با FICZ با غلظت‌های بالا (1 میکرومولار) تیمار شدند افزایش معنی‌داری در میزان عملکرد آنزیم CYP1A1 مشاهده گردید به طوری که پس از طی زمان 24 ساعت فعالیت این آنزیم به میزان pmol resorufin/mg protein 90 رسید که این مقدار تقریباً 3 برابر فعالیت آنزیم پس از طی زمان 3 ساعت می‌باشد (نمودار 1).

تیمار سلول‌ها با MNF و FICZ با غلظت 1 نانومولار تفاوت معنی‌داری در سنتز ملانین نسبت به گروه کنترل ایجاد نکرد اما هنگامی که سلول‌ها به وسیله‌ی FICZ با غلظت 1 نانومولار به همراه MNF تیمار شدند مقدار ملانین نسبت به کنترل افزایش پیدا کرد ($p < 0.05$). از طرفی نتایج نشان می‌دهد که تیمار سلول‌ها به وسیله‌ی FICZ با غلظت 100 نانومولار به تنهایی و یا به همراه MNF باعث افزایش قابل‌توجهی (به ترتیب $p < 0.05$ و $p < 0.01$) در مقدار ملانین می‌شود (نمودار 2).

با PBS شست‌وشو داده می‌شود. به منظور نرمالایز کردن داده‌ها به سلول‌ها NaOH با غلظت 0.5 مولار اضافه شد. آنگاه پلیت‌ها نیم ساعت بر روی شیکر قرار داده شد. به هر چاهک معرف برادفورد اضافه شد. جذب با دستگاه الیزا ریدر در طول موج 690 نانومتر خوانده شد. برای منحنی استاندارد از غلظت‌های مختلف اتوکسی زورفین استفاده می‌شود.

اندازه‌گیری ملانین

سلول‌ها با غلظت‌های متفاوت FICZ، کورکومین و MNF به تنهایی یا به صورت ترکیبی به مدت 24 ساعت تیمار شدند؛ سپس سلول‌ها به وسیله‌ی PBS شست‌وشو داده شدند. پس از شست‌وشو بافر RIPA (بافر RIPA از Tris-HCl با غلظت 50 میلی مولار، NaCl با غلظت 150 نانومولار، 1% از Sodium dodecyl sulfate و 0.2% Nonidet P-40 تشکیل شده است. pH این بافر باید در 7.4 تنظیم شود [10]) به سلول‌ها اضافه شد. سپس به واسطه‌ی خراشیدن سطح هر خانه که دارای RIPA بود سلول‌ها لیز شدند. مواد هر خانه به یک اپندورف مجزا منتقل شد. اپندورف‌ها به مدت 10 دقیقه با دور 10000 rpm سانتریفیوژ شدند. از مایع رویی به منظور اندازه‌گیری غلظت پروتئین به وسیله معرف برادفورد و خواندن جذب در طول موج 690 نانومتر استفاده شد (برای نرمالایز کردن). از رسوب نیز به منظور اندازه‌گیری ملانین استفاده شد. رسوب در سدیم هیدروکسید 1 مولار حل شد و به مدت 1 ساعت در بن ماری 60°C قرار گرفت. مقدار ملانین به وسیله‌ی دستگاه اسپکتوفوتومتر و در طول موج 450 نانومتر اندازه‌گیری شد. در نهایت ملانین توسط مقدار پروتئین نرمالایز گردید [10].

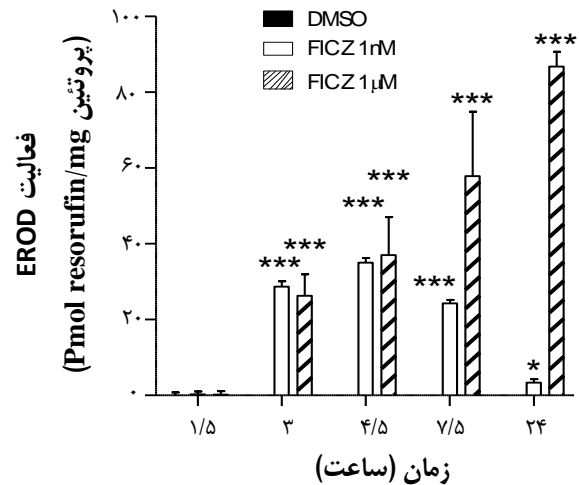
اندازه‌گیری فعالیت آنزیم تیروزیناز

سلول‌ها با غلظت‌های متفاوت FICZ، کورکومین و MNF به تنهایی یا به صورت ترکیبی به مدت 24 ساعت تیمار شدند؛ سپس سلول‌ها به وسیله‌ی PBS شست‌وشو داده شدند. پس از شست‌وشو بافر لیزکننده به سلول‌ها اضافه شد و به مدت 30 دقیقه در دمای 4 درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند؛ سپس به واسطه‌ی خراشیدن سطح هر خانه که دارای بافر بود سلول‌ها لیز شدند. مواد هر خانه به یک اپندورف مجزا منتقل شد. اپندورف‌ها به مدت 30 دقیقه با دور 14000 rpm سانتریفیوژ شدند (در سانتریفیوژ یخچال‌دار در دمای 4 درجه سانتی‌گراد).

آنزیم تیروزیناز نشان ندادند؛ این در حالی است که غلظت‌های بالای FICZ (غلظت ۱۰۰ نانومولار) باعث افزایش معنی‌دار در فعالیت آنزیم تیروزیناز گردید ($p < 0.01$). در تیمار هم‌زمان FICZ با غلظت ۱ نانومولار و کورکومین نیز هیچ تفاوت معنی‌داری با گروه کنترل مشاهده نشد. تیمار هم‌زمان سلول‌ها با FICZ با غلظت ۱۰۰ نانومولار و کورکومین باعث افزایش عملکرد آنزیم تیروزیناز به صورت معناداری گردید ($p < 0.01$)، نمودار ۵).

بحث

امروزه گفته می‌شود که علاوه بر مسیرهای سیگنالینگ هورمون محرک ملانوسیت آلفا (α -MSH)، Wnt و Extracellular signal-Regulated Kinase، مسیر سیگنالینگ آریل هیدروکربن رسپتور نیز می‌تواند در تنظیم بیوسنتز ملانین مؤثر باشد [۸]. مسیر سیگنالینگ AHR نه تنها به وسیله‌ی تماس با زنبیوتیک‌ها بلکه بعد از مواجهه با اشعه UVB نیز فعال می‌شود [۱]. اسید آمینه تریپتوفان تحت تاثیر اشعه UV، متابولیت‌هایی تولید می‌کند که می‌تواند موجب فعال شدن AHR و آنزیم‌های مسیر سیتوکروم P450 شود. دو ماده اصلی که از تابش اشعه UV به اسیدآمینه تریپتوفان تولید می‌شوند شامل ۶-فرمیل ایندوکاربازول (FICZ) و ۶-دی فرمیل ایندول کاربازول می‌باشند [۱۰]. در مطالعات مشاهده شده

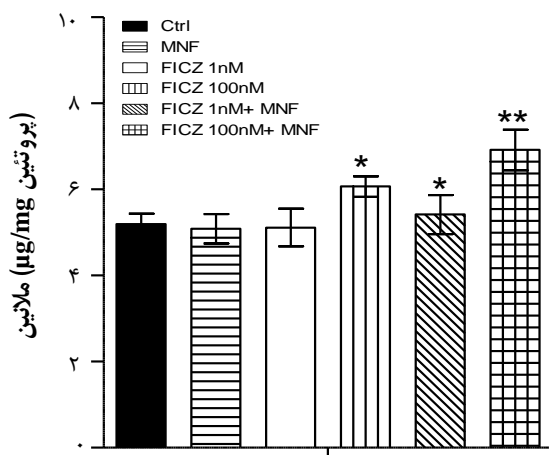


نمودار ۱- اثرات وابسته به دوز و زمان لیگاند داخلی آریل هیدروکربن رسپتور (FICZ) بر روی میزان فعالیت آنزیم CYP1A1 (با روش 7- EROD; ethoxresorufin O-deethylation) سلول‌های ملانوما B16/F10 با DMSO و غلظت‌های مختلف FICZ در زمانهای ۱.۵، ۳، ۴.۵، ۷.۵ و ۲۴ ساعت تیمار شده و بعد از تیمار میزان فعالیت آنزیم CYP1A1 اندازه‌گیری شد. $p < 0.05$ ، * $p < 0.001$ ، *** در مقایسه با کنترل.

همان‌طور که در نمودار ۳ مشاهده می‌شود تیمار سلول‌ها با کورکومین به تنهایی یا FICZ با غلظت ۱ نانومولار به تنهایی تفاوت معنی‌داری در ساخت ملانین نسبت به کنترل مشاهده نشد. هنگامی که سلول‌ها به وسیله‌ی FICZ با غلظت ۱ نانومولار به همراه کورکومین تیمار می‌شوند تفاوت معنی‌داری در مقدار ملانین مشاهده شد ($p < 0.05$). این در حالی است که تیمار سلول‌ها به وسیله‌ی FICZ با غلظت ۱۰۰ نانومولار همراه کورکومین باعث افزایش قابل‌توجهی در مقدار ملانین می‌شود ($p < 0.01$).

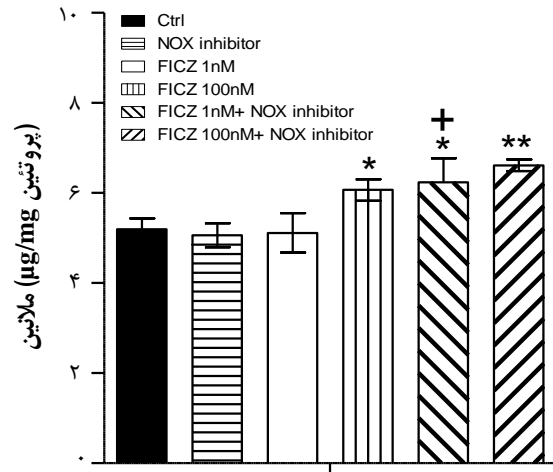
همان‌طور که در نمودار ۴ مشاهده می‌شود تیمار سلول‌ها با FICZ با غلظت ۱ نانومولار و MNF تفاوت معنی‌داری از نظر افزایش یا کاهش فعالیت آنزیم تیروزیناز ایجاد نکرد؛ این در حالی است که غلظت‌های بالای FICZ (غلظت ۱۰۰ نانومولار) باعث افزایش فعالیت آنزیم تیروزیناز شد ($p < 0.001$). در تیمار هم‌زمان FICZ با غلظت ۱ نانومولار و MNF نیز هیچ تفاوت معنی‌داری با گروه کنترل مشاهده نشد. تیمار هم‌زمان سلول‌ها با FICZ با غلظت ۱۰۰ نانومولار و MNF باعث افزایش عملکرد آنزیم تیروزیناز به صورت معناداری گردید ($p < 0.001$).

سلول‌های تیمار شده با کورکومین و FICZ با غلظت ۱ نانومولار تفاوت معنی‌داری از نظر افزایش و کاهش فعالیت



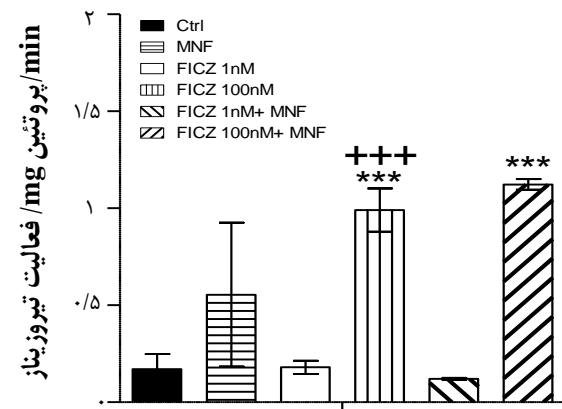
نمودار ۲- اثرات وابسته به دوز لیگاند داخلی آریل هیدروکربن رسپتور FICZ بر روی میزان سنتز ملانین در حضور و عدم حضور آنتاگونیست آریل هیدروکربن رسپتور MNF. سلول‌های ملانوما B16/F10 با DMSO و غلظت‌های مختلف FICZ به تنهایی یا همراه با MNF به مدت ۲۴ ساعت تیمار شده و میزان ملانین توتال اندازه‌گیری شد. $p < 0.05$ ، * $p < 0.001$ ، *** در مقایسه با کنترل.

Receptor Repressor) و همچنین بیان mRNA آریل هیدروکربن رسپتور می‌شود و در ادامه در صورت درمان هم‌زمان با آنتاگونیست نسبی AHR (سه متوکسی نیتروفلاون) اثرات مورد نظر از بین می‌رود. تماس ملانوسیت‌های نرمال انسانی با TCDD (۱۰ نانومولار) برای مدت ۳ روز منجر به افزایش فعالیت آنزیم تیروزیناز و مقدار ملانین می‌شود. این در حالی بود که مواجهه هم‌زمان این سلول‌ها با TCDD و سه متوکسی نیتروفلاون یا آلفا نفتول فلاون (آنتاگونیست AHR) باعث از بین رفتن فعالیت تیروزیناز می‌شود. در این مطالعه القاء فعالیت آنزیم تیروزیناز و افزایش مقدار ملانین تام، با افزایش تکثیر سلول‌های ملانوسیت مرتبط نبود که نتایج مشابهی در مطالعات ما نیز مشاهده شد. در مقابل، این تغییرات همراه با افزایش فعالیت و بیان mRNA آنزیم تیروزیناز بوده است. در ادامه نویسندگان اشاره دارند که استفاده از FICZ (۱۰ نانومولار) باعث القاء بیان CYP1A1 و CYP1B1 در ملانوسیت‌های نرمال انسانی بعد از ۳ ساعت می‌شود. در حالی که فعالیت تیروزیناز در همین سلول‌ها بعد از ۲۴ ساعت و در غلظت‌های بالا (۱۰۰ نانومولار) و نه پایین (۱ و ۱۰ نانومولار) افزایش می‌یابد. همچنین در این مطالعه مشاهده شد که اثرات FICZ در مقایسه با TCDD ضعیف‌تر و گذراتر می‌باشد که خود ناشی از متابولیزه شدن سریع و موثر FICZ توسط CYP1A1 های کنترل‌شونده به وسیله AHR می‌باشد. در پایان



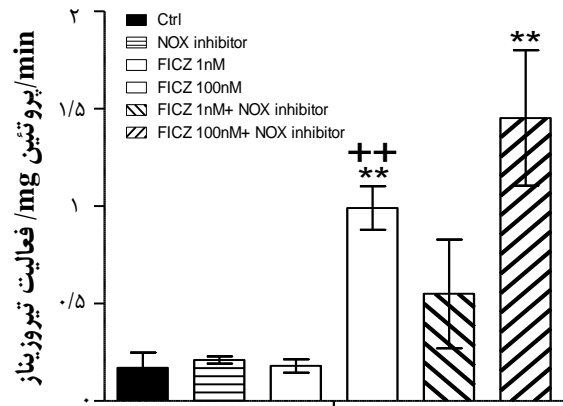
نمودار ۳- اثرات وابسته به دوز لیگاند داخلی آریل هیدروکربن رسپتور FICZ بر روی میزان سنتز ملانین با حضور و عدم حضور ممانعت‌کننده NOX (کورکومین). سلول‌های ملانوما B16/F10 با DMSO و غلظت‌های مختلف FICZ به تنهایی یا همراه با مهارکننده NOX به مدت ۲۴ ساعت تیمار شده و میزان ملانین توتال اندازه‌گیری شد. $p < 0.05$ *, $p < 0.001$ **، در مقایسه با کنترل، $p < 0.05$ +, در مقایسه با غلظت ۱ نانومولار.

که UVB به عنوان مهمترین تحریک‌کننده فیزیولوژیک برای تولید ملانین عمل می‌کند. علاوه بر این UVB همچنین به عنوان موثرترین عامل در تولید FICZ از تریپتوفان می‌باشد که نتیجه آن القای بیان ژن‌های هدف AHR یعنی CYP1A1 در پوست انسان است. این لیگاند باعث افزایش بیان ژن‌های پاسخ‌دهنده AHR (مثل CYP1A1) به صورت موثر اما گذرا می‌شود که علت این اثر ناشی از متابولیزه شدن سریع آن توسط CYP1A1 در یک مکانیسم فیدبکی می‌باشد. در یک نتیجه‌گیری عقلانی می‌توان گفت که این توالی رویدادها، که به نوعی حلقه نظارتی خودتنظیم‌شونده در مسیر سیگنالینگ بیولوژی تحریک شده توسط FICZ می‌باشد، در حقیقت پیشنهاد می‌کند که FICZ ممکن است یک نقش فیزیولوژیک مهم در بدن داشته باشد [۱۶]. در مطالعه‌ای که توسط



نمودار ۴- اثرات وابسته به دوز لیگاند داخلی آریل هیدروکربن رسپتور FICZ بر روی میزان فعالیت آنزیم تیروزیناز با حضور و عدم حضور آنتاگونیست آریل هیدروکربن رسپتور MNF. سلول‌های ملانوما B16/F10 با DMSO و غلظت‌های مختلف FICZ به تنهایی یا همراه با مهارکننده MNF به مدت ۲۴ ساعت تیمار شده و میزان فعالیت آنزیم تیروزیناز اندازه‌گیری شد. $p < 0.05$ *, $p < 0.001$ **، در مقایسه با کنترل، $p < 0.001$ ***، در مقایسه با غلظت ۱۰۰ نانومولار.

Luecke و همکارانش انجام شد نشان داده شده که تماس ملانوسیت‌های نرمال انسانی با TCDD یا 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (۱۰ نانومولار) که یک لیگاند خارجی بسیار قوی برای AHR است، باعث فعال شدن مسیر سیگنالینگ AHR، افزایش میزان بیان سیتوکروم 1B1,1A1 و Aryl Hydrocarbon AHR (Aryl Hydrocarbon AHR)



نمودار ۵- اثرات وابسته به دوز لیگاند داخلی آریل هیدروکربن رسپتور FICZ بر روی میزان فعالیت آنزیم تیروزیناز با حضور و عدم حضور ممانعت کننده NOX (کورکومین). سلول‌های ملانومای B16/F10 با DMSO و غلظت‌های مختلف FICZ به تنهایی یا همراه با مهار کننده NOX به مدت ۲۴ ساعت تیمار شده و میزان فعالیت آنزیم تیروزیناز اندازه گیری شد. $p < 0.01$: ** در مقایسه با کنترل، $p < 0.01$: ++ در مقایسه با FICZ با غلظت ۱۰۰ نانومولار.

سلول‌های ملانومای B16/F10 با غلظت‌های بالاتر FICZ (۱ میکرومولار) تیمار می‌شوند فعالیت آنزیم CYP1A1 به مرور افزایش می‌یابد. به دلیل بالا بودن غلظت‌های FICZ، متابولیزه کردن آن به وسیله آنزیم CYP1A1 با تأخیر صورت می‌گیرد و در نتیجه فعالیت آنزیم در کل مدت ۲۴ ساعت با یک روند صعودی همراه است. طبق مطالعات صورت گرفته در سال ۲۰۱۰ در صورت تیمار هم‌زمان سلول‌های ملانوسیت با TCDD و MNF (به عنوان آنتاگونیست AHR) جلوی مسیرهای افزایش بیان mRNA AHR، مسیر سیگنالینگ AHR گرفته می‌شود. میزان بیان آنزیم‌های سیتوکروم 1A، B1 و همچنین میزان AHRR کاهش می‌یابد [۸]. در ادامه این مطالعه و سایر مطالعات، ما به بررسی تأثیر هم‌زمان FICZ و MNF در ملانوزنژ پرخاکیتم. در طی این مطالعه افزایش معنی‌داری در سطح ملانین طی تیمار سلول‌های ملانومای B16/F10 با MNF و FICZ در غلظت‌های پایین (۱ نانومولار) به تنهایی نسبت به کنترل مشاهده نشد. عملکرد آنزیم تیروزیناز نیز پس از تیمار با موارد بالا طی زمان‌های مختلف تفاوت معناداری نسبت به کنترل نداشت. اما هنگامی که سلول‌های ملانوما با غلظت‌های بالای FICZ (۱۰۰ نانومولار) تیمار شدند مقدار ملانین و عملکرد آنزیم تیروزیناز افزایش قابل توجهی داشت که این افزایش حاکی از این است که FICZ با غلظت‌های بالا می‌تواند از طریق مسیر AHR بر روی ملانوزنژیس تأثیرگذار باشد. هنگامی که سلول‌های ملانومای B16/F10 با غلظت‌های پایین FICZ (۱ نانومولار) و MNF هم‌زمان تیمار شدند سطح ملانین نسبت به گروه کنترل افزایش معنی‌داری داشت اما در فعالیت آنزیم تیروزیناز نسبت به کنترل در زمان‌های مختلف تفاوتی مشاهده نشد. می‌توان این‌طور استنباط نمود که FICZ در غلظت‌های کم ممکن است از طریق مسیر سیگنالینگ متفاوت باعث سنتز ملانین شود. به طور مثال می‌توان استنباط کرد که FICZ در غلظت‌های کم باعث پایداری آنزیم‌های تیروزیناز، TRP1 و TRP2 می‌شود بدون اینکه بر روی میزان بیان تیروزیناز تأثیر داشته باشد. مطالعات قبلی نشان داده‌اند که MNF می‌تواند با مهار متابولیسم FICZ باعث تجمع FICZ گردد اما زمانی که غلظت‌های بالای FICZ (۱۰۰ نانومولار) و MNF به صورت هم‌زمان مورد بررسی قرار گرفت افزایش قابل توجهی هم در سطح ملانین و هم در عملکرد آنزیم تیروزیناز مشاهده شد.

نویسندگان نتیجه‌گیری می‌کنند که افزایش سطح ملانین در سلول‌های مواجهه یافته با FICZ یا TCDD ناشی از افزایش بیان آنزیم تیروزیناز است که خود احتمالاً ناشی از اتصال مستقیم فاکتور رونویسی AHR به پروموتور ژن آنزیم تیروزیناز باشد چرا که در پروموتور آنزیم یاد شده دو ناحیه اتصال XRE وجود دارد [۱۷]. این مطالعه در ادامه مطالعه بالا و به منظور بررسی میزان فعالیت آنزیم CYP1A1 و بررسی ارتباط مستقیم آنزیم‌های NOX و AHR در سنتز و یا عدم سنتز ملانین صورت گرفته است. طبق آزمایشات انجام شده و نتایج به دست آمده فعالیت آنزیم CYP1A1 هم وابسته به غلظت FICZ است و هم وابسته به زمان می‌باشد. طبق بررسی‌های ما، FICZ در طی یک روش وابسته به غلظت و زمان بر روی فعالیت آنزیم CYP1A1 اثر می‌گذارد. زمانی که سلول‌های ملانومای B16/F10 با غلظت‌های کم FICZ (۱ نانومولار) تیمار شدند پس از طی ۴/۵ ساعت فعالیت آنزیم CYP1A1 به حداکثر میزان خود رسید. این در حالی بود که به مرور و پس از ۲۴ ساعت فعالیت این آنزیم کاهش یافت که نشان‌دهنده متابولیزه شدن FICZ با غلظت‌های کم به وسیله آنزیم CYP1A1 است. در واقع پس از کاهش FICZ، میزان فعالیت خود آنزیم CYP1A1 نیز به تدریج کاهش می‌یابد. این نتایج در واقع عملکرد خودتنظیمی آنزیم CYP1A1 و FICZ را اثبات می‌کند. برخلاف غلظت‌های اندک FICZ، هنگامی که

وسيله‌ی FICZ (۱ نانومولار) و کورکومین تیمار می‌شوند با هنگامی که به تنهایی با FICZ (۱ نانومولار) تیمار می‌شوند، مقایسه شد. این مقایسه نشان‌دهنده‌ی تفاوت معناداری در میزان ساخت ملانین بود که می‌توان اینطور استنباط نمود که مهارکننده‌ی NOX به همراه غلظت کم FICZ اثرگذاری بیشتری در ملانوزنزیس دارد. نتایج به دست آمده از مهارکننده‌ی NOXs مشابه مهارکننده‌ی CYP1A1 می‌باشد و برای فهمیدن نقش دقیق‌تر این سیستم مطالعات بیشتری با روش‌های دقیق‌تری لازم است.

نتیجه‌گیری

مهارمتابولیسم لیگاند داخلی آریل هیدروکربن رسپتور می‌تواند اثرات شبه TCDD در سلول‌های تولید ملانین ایجاد کند.

ملاحظات مالی

این مطالعه با حمایت مالی دانشگاه علوم پزشکی شیراز، از محل طرح‌های شماره ۹۳-۰۱-۰۵-۸۱۵۴ و ۹۳-۰۱-۰۵-۰۵-۸۲۷۳ انجام شده است. نویسندگان مراتب قدردانی خود را اعلام می‌نمایند.

تعارض در منافع

نویسندگان این مقاله تعارض در منافع ندارند.

سهم نویسندگان

د.د.د: انجام مطالعه و نگارش مقاله؛ ف.د: انجام مطالعه و نگارش مقاله؛ ا.ا: انجام مطالعه و نگارش مقاله؛ ا.م.ب: ایده، طراحی، نظارت بر حسن اجرای مطالعه، آنالیز آماری و نگارش مقاله.

فهرست منابع

- [1] Mohammadi-Bardbori A. *Influence of oxidative stress on aryl hydrocarbon receptor signaling* [dissertation]. Institute of Environmental Medicine, Karolinska Univ., 2013.
- [2] Busca R, Ballotti R, Cyclic AMP a key messenger in

شواهدی وجود دارد مبنی بر اینکه گروه سولفوهدریل در AHR و ناحیه اتصال در ژن AHR به استرس‌های اکسیداتیو حساس هستند [۱۸،۱۹]. یکی از راه‌هایی که رادیکال‌های فعال اکسیژن می‌توانند به وجود آیند از طریق سنتز نیتریک اکساید و لیپواکسیژناز در سیتوزول‌ها و آنزیم‌های NOX در غشای پلاسمایی است [۲۰]. پس می‌توان نتیجه گرفت که NOXs در شرایط فیزیولوژیک به واسطه‌ی تولید هیدروژن پراکساید که یک مولکول سیگنالینگ و پیام‌آور مهمی می‌باشد که در بیان و فعالیت AHR و Nrf2 نقش دارند. سیستم NOXs در شرایط پاتولوژیک با تولید غلظت‌های بالای هیدروژن پراکساید نقش دفاعی در مقابل پاتوژن‌ها ایفا می‌کند [۱].

در این مطالعه ارتباط مستقیم یک مهارکننده سیستم NOX و AHR در سنتز ملانین و عملکرد تیروزیناز مورد بررسی قرار گرفته است. در تیمار سلول‌های ملانومای B16/F10 به وسیله‌ی غلظت‌های اندک FICZ (۱ نانومولار) و کورکومین (به عنوان مهارکننده‌ی آنزیم‌های NOX) هرکدام به تنهایی سطح ملانین و عملکرد آنزیم تیروزیناز نسبت به کنترل تفاوت آن‌چنانی ندارد اما هنگامی که سلول‌های ملانومای B16/F10 با غلظت‌های بالای FICZ (۱۰۰ نانومولار) تیمار شدند هم سطح ملانین و هم فعالیت آنزیم تیروزیناز نسبت به کنترل افزایش قابل‌توجهی یافت که نشان‌دهنده‌ی این است که FICZ در غلظت‌های بالا از طریق فعال‌سازی بر AHR بر ملانوزنزیس تأثیرگذار است.

تیمار هم‌زمان سلول‌ها با غلظت‌های پایین FICZ (۱ نانومولار) و کورکومین باعث افزایش معنی‌دار مقدار ملانین نسبت به گروه کنترل شد؛ این در حالی بود که عملکرد آنزیم تیروزیناز نسبت به گروه کنترل اختلاف معناداری نداشت. در ادامه هنگامی که سلول‌های ملانوما با غلظت‌های بالای FICZ (۱۰۰ نانومولار) و کورکومین به صورت هم‌زمان تیمار شدند هم میزان تولید ملانین و هم میزان فعالیت آنزیم تیروزیناز افزایش یافت. از طرفی میزان ملانین توتال هنگامی که سلول‌ها به

the regulation of skin pigmentation. *Pigm Cell Res* 13 (2000) 60-69.

- [3] Hunt G, Todd C, Cresswell JE, Thody AJ, Alpha-melanocyte stimulating hormone and its analogue Nle4DPhe7 alpha-MSH affect morphology, tyrosinase activity and melanogenesis in cultured human melanocytes. *J Cell Sci* 107 (1994) 205-211.
- [4] Kim DS, Park SH, Kwon SB, Park ES, Huh CH, Youn

- SW, Sphingosylphosphorylcholine-induced ERK activation inhibits melanin synthesis in human melanocytes. *Pigm Cell Res* 19 (2006) 146-153.
- [5] Kim D-S, Hwang E-S, Lee J-E, Kim S-Y, Kwon S-B, Park K-C, Sphingosine-1-phosphate decreases melanin synthesis via sustained ERK activation and subsequent MITF degradation. *J Cell Sci* 116 (2003) 1699-1706.
- [6] Xu W, Gong L, Haddad MM, Bischof O, Campisi J, Yeh ET, Regulation of microphthalmia-associated transcription factor MITF protein levels by association with the ubiquitin-conjugating enzyme hUBC9. *Exp Cell Res* 255 (2000) 135-143.
- [7] Chang T-S, An updated review of tyrosinase inhibitors. *Int J Mol Sci* 10 (2009) 2440-2475.
- [8] Luecke S, Backlund M, Jux B, Esser C, Krutmann J, Rannug A, The aryl hydrocarbon receptor (AHR), a novel regulator of human melanogenesis. *Pigm Cell Melanoma Res* 23 (2010) 828-833.
- [9] Rannug A, Fritsche E, The aryl hydrocarbon receptor and light. *Biol Chem* 387 (2006) 1149-1157.
- [10] Wincent E, Bengtsson J, Bardbori AM, Alsberg T, Luecke S, Rannug U, Inhibition of cytochrome P4501-dependent clearance of the endogenous agonist FICZ as a mechanism for activation of the aryl hydrocarbon receptor. *Proc Natl Acad Sci* 109 (2012) 4479-4484.
- [11] Rhee SG, H₂O₂, A necessary evil for cell signaling. *Science* 312 (2006) 1882-1883.
- [12] Dröge W, Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev* 82 (2002) 47-95.
- [13] Jiang F, Zhang Y, Dusting GJ, NADPH oxidase-mediated redox signaling: roles in cellular stress response, stress tolerance, and tissue repair. *Pharmacol Rev* 63 (2011) 218-242.
- [14] Zhou J, Gasiewicz TA, 3'-Methoxy-4'-nitroflavone, a reported aryl hydrocarbon receptor antagonist, enhances Cyp1A1 transcription by a dioxin responsive element-dependent mechanism. *Arch Biochem Biophys* 416 (2003) 68-80.
- [15] Halliwell B, Are polyphenols antioxidants or pro-oxidants? What do we learn from cell culture and in vivo studies? *Arch Biochem Biophys* 476 (2008) 107-112.
- [16] Wei Y-D, Bergander L, Rannug U, Rannug A, Regulation of CYP1A1 transcription via the metabolism of the tryptophan-derived 6-formylindolo [3, 2-b] carbazole. *Arch Biochem Biophys* 383 (2000) 99-107.
- [17] Luecke S, Wincent E, Backlund M, Rannug U, Rannug A, Cytochrome P450 1A1 gene regulation by UVB involves crosstalk between the aryl hydrocarbon receptor and nuclear factor κB. *Chem Biol Interact* 184 (2010) 466-473.
- [18] Xu C, Siu C-S, Pasco DS, DNA binding activity of the aryl hydrocarbon receptor is sensitive to redox changes in intact cells. *Arch Biochem Biophys* 358 (1998) 149-156.
- [19] Cumming RC, Andon NL, Haynes PA, Park M, Fischer WH, Schubert D, Protein disulfide bond formation in the cytoplasm during oxidative stress. *J Biol Chem* 279 (2004) 21749-21758.
- [20] Halliwell B, Cross CE, Oxygen-derived species: their relation to human disease and environmental stress. *Environ Health Perspect* 102 (1994) 5.

Research paper

Interaction of NADPH oxidase and aryl hydrocarbon receptor in melanogenesis by B16/F10 cell line

Dorna Davani-Davari, Fatemeh Dastgheib, Amin Reza Akbarizadeh, Afshin Mohammadi-Bardbori*

Department of Pharmacology and Toxicology, Faculty of Pharmacy, Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, Iran

Received: 25 December 2016

Accepted: 13 March 2017

Abstract

Background and aim: Vitiligo, psoriasis and some skin cancers are due to abnormal melanogenesis and disturbance in melanocytes homeostasis. Aryl hydrocarbon receptor (AHR) is a ligand-dependent transcriptional factor involved in many physiological processes including drugs metabolism, development of immune system, cellular homeostasis, regulation of cell cycle, and as an essential factor in melanogenesis. The aim of this study was to investigate whether the NADPH oxidases (NOXs) system can interfere with the normal function of aryl hydrocarbon receptor in melanogenesis.

Methods: B16/F10 mouse melanoma cell line were cultured in DMEM and treated with different concentrations of the endogenous ligand of AHR, 6-formylindolo[3,2-b] carbazole (FICZ) (1-100 nM) alone or in combination with an AHR antagonist 3'-Methoxy-4'-Nitroflavone, MNF, or cytochrome P450 type CYP1A1 inhibitor, or a NADPH oxidase (NOX) inhibitor, curcumin (1 μ M), for different time periods. The activity of CYP1A1 and tyrosinase enzymes as well as total melanin level were measured at the end of treatments.

Results: CYP1A1 enzyme activity was induced in B16/F10 cells by FICZ in a dose and time dependent manner. Tyrosinase activity and melanin level also were increased by FICZ 100nM. Importantly, treatment of the cells with combination of FICZ 1nM and curcumin induced melanin synthesis.

Conclusion: Taken together, inhibition of metabolic degradation of FICZ might elicit biological/toxicological effects on skin homeostasis.

Keywords: Melanin, Aryl hydrocarbon receptor, NADPH oxidase

Please cite this article as follows:

Davani-Davari D, Dastgheib F, Akbarizadeh AR, Mohammadi-Bardbori A, Interaction of NADPH oxidase and aryl hydrocarbon receptor in melanogenesis by B16/F10 cell line. *Iran J Physiol Pharmacol* 2 (2018) 74-82.

*Corresponding author e-mail: toxicology@sums.ac.ir
Available online at: <http://ijpp.phypha.ir>
Journal E-mail: ijpp@phypha.ir