

مقاله پژوهشی

مطالعه اثر اپی گالوکاتچین-۳-گالات بر مهار سمیت القاء شده توسط بیسفنول آ در سلول‌های بنیادی مزانشیم مغز استخوان موش صحرایی بالغ در شرایط آزمایشگاهی

ملک سلیمانی مهرنجانی، مجید مهدیه، روناک حیدریان*

گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه اراک، اراک

پذیرش: ۱۷ خرداد ۹۴

دریافت: ۲ خرداد ۹۴

چکیده

زمینه و هدف: بیسفنول آ ماده‌ای با خاصیت شبه استروژنی است که در صنعت و دندان پزشکی استفاده وسیعی دارد. اپی گالوکاتچین-۳-گالات به عنوان یک آنتی‌اکسیدان قوی نقش مهمی در حذف رادیکال‌های آزاد دارد. هدف از انجام این مطالعه، بررسی نقش حفاظتی اپی گالوکاتچین-۳-گالات بر سلول‌های بنیادی مزانشیم مغز استخوان به دنبال تیمار با بیسفنول آ (القاء کننده استرس اکسیداتیو) بود.

روش‌ها: در این مطالعه بعد از استخراج و کشت سلول‌ها از رت بالغ، سلول‌های پاساژ سوم به ۴ گروه کنترل، بیسفنول آ، اپی گالوکاتچین-۳-گالات، و بیسفنول آ+پی-گالوکاتچین-۳-گالات تقسیم و برای مدت ۲۴، ۳۶، ۴۸، ۶۰ و ۷۲ ساعت تیمار شد. سپس قدرت حیات، مورفولوژی سلولی و کلسیم داخل سلولی سلول‌ها اندازه‌گیری شد.

یافته‌ها: بیسفنول آ موجب کاهش معنی‌دار وابسته به دوز و زمان در توانایی زیستی و کلسیم داخل سلولی شد. همچنین تغییرات مورفولوژیک مانند چروکیدگی سیتوپلاسم در گروه تیمار شده با بیسفنول آ مشاهده گردید. اپی گالوکاتچین-۳-گالات توانست اثرات سمیت سلولی و تغییرات مورفولوژیک القا شده توسط بیسفنول آ را مهار کند.

نتیجه‌گیری: بیسفنول آ موجب کاهش توانایی زیستی سلول‌های بنیادی مزانشیم شد و اپی گالوکاتچین-۳-گالات به عنوان یک آنتی‌اکسیدان باعث جبران اثرات تخریبی این ماده در حد کنترل گردید.

واژه‌های کلیدی: اپی گالوکاتچین-۳-گالات، بیسفنول آ، سلول‌های بنیادی مزانشیمی

مقدمه

۵۰ ماده‌ی شیمیایی برتر تولیدی در جهان است. از این ماده برای پوشش رزینی اکثر قوطی کنسروهای آلومینیومی، درب پلاستیکی پلی‌کربناتی شیشه شیر، اسباب بازی و مواد پرکننده دندان استفاده می‌شود. بسیاری از آزمایش‌ها نشان داده‌اند که BPA در پلاستیک برای همیشه ثابت نمی‌ماند [۱]. گرما و شرایط اسیدی به هیدرولیز پیوند استری مونومر BPA سرعت می‌بخشد و باعث انتشار آن در محیط می‌شود [۲]. شواهد روز افزون نشان می‌دهد که BPA به عنوان یک عامل استرس اکسیداتیو باعث آسیب به DNA می‌شود که در پاسخ به این آسیب سلول‌ها دچار آپوپتوز یا توقف سیکل سلولی می‌شوند

بیسفنول آ (BPA) یک ترکیب شیمیایی الیل فنولی است که دارای فرمول شیمیایی $C_{15}H_{16}O_2$ می‌باشد. این ماده نخستین بار در دهه ۱۹۳۰ به عنوان یک ترکیب استروژنی سنتز شد. سپس شیمی‌دانان پلیمر دریافتند که می‌توان از آن در محصولات پلاستیک استفاده کرد و امروزه این ترکیب یکی از

* نویسنده مسئول مکاتبات: ronak6410@yahoo.com

وبگاه مجله: <http://ijpp.phypha.ir>

ijpp@phypha.ir

پست الکترونیکی:

شرایط استریل، مغز استخوان توسط محیط کشت (Gibco Germany) DMEM Dulbecco's Modified Fetal Bovin Serum (Eagle Medium) حاوی ۱۵٪ [FBS] (Gibco, Germany) و ۱۰۰ واحد بین‌المللی پنی‌سیلین و ۱۰۰ واحد بین الملل استرپتومایسین (Gibco, Germany) در لوله فالکون ۱۵ میلی لیتری تحت عمل فلاشینگ خارج شد. لوله فالکون با ۲۵۰۰ دور در دقیقه به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ و رسوب سلولی حاصل با یک میلی لیتر محیط کشت هموژن و به فلاسک ۲۵ میلی لیتری منتقل گردید. بعد از ۲۴ ساعت محیط رویی که دارای سلول‌های غیرچسبیده بود، خارج شده و شستشوی سلول‌ها با بافر فسفات انجام گرفت. سپس به مدت ۱۴ روز هر سه روز یکبار محیط سلول‌ها تعویض گردید. زمانی که کف فلاسک به تراکم ۸۰٪ از سلول رسید، سلول‌ها با کمک Trypsin/EDTA از کف فلاسک جدا و به فلاسک‌های جدید منتقل شدند. برای بدست آوردن خلوص بالایی از این سلول‌ها سه مرحله پاساژ تکرار شد.

سلول‌های پاساژ سوم به تعداد 10^4 سلول در هر خانه پلیت ۹۶ با غلظت‌های ۰، ۰/۵، ۱، ۵، ۱۰، ۲۵، ۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰، ۲۰۰ و ۲۵۰ میکرومولار BPA به مدت ۱۲، ۲۴، ۳۶، ۴۸، ۶۰ ساعت و ۳ روز تیمار شدند. پس از این تیمارها قدرت زیستی سلول‌ها با روش متیل تiazول تترازولیوم (MTT) ارزیابی گردید. در این روش فعالیت آنزیم دهیدروژناز میتوکندری سلولی و نهایتاً میزان احیای نمک تترازولیوم که شاخصی از رشد و بقای سلولی است مورد بررسی قرار می‌گیرد. برای انجام این تست محیط کشت رویی پلیت با محلول MTT (۵ g/ml) تعویض گردید. پس از ۱-۱/۵ ساعت انکوباسیون در ۳۷ درجه سانتیگراد و ۵٪ CO_2 کریستال‌های فورمازون تشکیل شده در ۳۰۰ میکرولیتر حلال دی متیل سولفوکسید (DMSO) حل و میزان جذب محلول حاصل در طول موج ۵۷۰ نانومتر توسط دستگاه ELISA-reader اندازه‌گیری شد. تعداد سلول‌ها از طریق منحنی استاندارد رسم شده برای تعداد مشخصی سلول، تعیین گردید. با توجه به نتایج آزمون MTT دوزهای ۵۰ و ۱۵۰ میکرومولار BPA و زمان ۳ روز برای تیمار همزمان سلول‌ها با BPA و EGCG انتخاب شد. پس از تکرار روش MTT در گروه‌های سلولی تیمار شده با BPA و غلظت‌های مختلف EGCG بر اساس نتایج به دست آمده دوز ۵۰ میکرومولار BPA و ۵۰ میکرومولار EGCG برای انجام

[۳]. بیسفنول آ با مهار انتقالات عصبی از تکثیر و تمایز سلول‌های بنیادی عصبی جلوگیری می‌کند [۴]. همچنین تحقیقات نشان می‌دهد که بیسفنول آ با اکسید کردن اسیدهای چرب غیر اشباع در سلول، باعث بهم ریختگی تمامیت غشا و مرگ سلول می‌شود [۵]. این ماده آپوپتوز را از طریق فعال کردن کاسپاز-۳، تغییرات مورفولوژی در غشا، متلاشی شدن سیتواسکلتون و جمع شدن کروماتین القاء می‌کند [۶] و نیز باعث افزایش بیان ژن‌های پرو-آپوپتوتیک از جمله Bax می‌شود و کیناز JNK را از طریق افزایش رادیکال آزاد فعال می‌کند [۷]. به این ترتیب ترکیبات آنتی اکسیدانی با خنثی سازی رادیکال‌های آزاد می‌توانند نقش قابل توجهی در مقابل اثرات سوء این ماده داشته باشند.

اپی‌گالوکاتچین-۳-گالات (EGCG) از جمله مهمترین پلی فنول‌های آنتی اکسیدانی موجود در چای سبز می‌باشد. این ماده با افزایش آنتی اکسیدان‌های درون سلولی مانند گلوکاتینون، اسید اوریکو بیلی روبین و افزایش ظرفیت آنزیم‌های آنتی اکسیدان درون سلولی نظیر گلوکاتینون ردوکتاز، گلوکاتینون پراکسیداز و کاتالاز در محافظت سلول در برابر تخلیه گلوکاتینون احیا، می‌تواند ظرفیت و توان آنتی اکسیدانی را افزایش دهد [۸]. اپی گالوکاتچین-۳-گالات به خاطر داشتن گروه‌های هیدروکسیل، می‌تواند به عنوان دهنده الکترون یا هیدروژن عمل کند و باعث خنثی‌سازی رادیکال‌های آزاد شود [۹]. سلول‌های بنیادی مزانشیم سلول‌های پرتوانی بوده که به راحتی تخلیص و تکثیر می‌شوند و نیز مجاورت این سلول‌ها با خون محیطی، سبب شده است که این سلول یک انتخاب مناسب برای بررسی اثر مواد سمی بر روی خواص بنیادی، تکثیر و تمایز آنها باشد [۱۰]. با توجه به حضور گسترده BPA در محیط زیست و ورود آن به زنجیره غذایی و تهدید سلامت انسان، این مطالعه با هدف بررسی اثر EGCG بر مهار سیتوتوکسیسیته القا شده توسط BPA در سلول‌های بنیادی مزانشیم مغز استخوان رت به عنوان یک مدل آزمایشگاهی انجام شد.

مواد و روش‌ها

پس از کسب مجوز از کمیته اخلاق دانشگاه اراک و رعایت اصول اخلاقی، موشهای صحرایی نژاد ویستار به کمک اثر بیهوش شده، استخوان‌های ران و ساق پا جدا و تحت

اسپکتروفوتومتر (T80+ PG instrument Ltd, England) در طول موج ۵۷۵ نانومتر اندازه گیری شد. با استفاده از نرم افزار SPSS، از روش آماری آنالیز واریانس یک طرفه (One way ANOVA) و تست تکمیلی Tukey داده‌های بدست آمده تجزیه و تحلیل شد و تفاوت میانگین‌ها در سطح $p < 0/05$ معنی دار در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

تیمار با BPA باعث کاهش معنی‌داری ($p < 0/05$) در توانایی زیستی سلول‌های مزانشیم مغز استخوان رت بالغ به صورت وابسته به دوز می‌گردد (جدول ۱). با توجه به نتایج به دست آمده از روش رنگ‌سنجی MTT، دوز ۵۰ و ۱۵۰ میکرومولار BPA در زمان ۳ روز به ترتیب باعث کاهش ۵۰ و ۷۵ درصدی توانایی زیستی سلول‌های مزانشیم شد. لذا برای بررسی اثر BPA و EGCG بر سلول‌های بنیادی مزانشیم، سلول‌های بنیادی مزانشیم همزمان با دوزهای انتخابی BPA و دوزهای ۱۰، ۳۰، ۵۰ و ۱۰۰ میکرومولار EGCG تیمار شد و مجدداً توانایی زیستی سلول‌ها با تست رنگ‌سنجی MTT به منظور مشخص کردن دوز مؤثر EGCG بررسی شد.

تست‌های بعدی انتخاب شد. سلول‌های چسبیده به پلیت ۲۴ خانه با دوز ۵۰ میکرومولار BPA و EGCG به مدت ۳ روز در ۴ گروه کنترل، BPA، EGCG، BPA + EGCG تیمار شدند. سپس رنگ‌آمیزی کروماتین با هوخست برای مطالعه مورفولوژی هسته، پروپیدیم آبوداید همراه با هوخست برای تمایز بین سلول مرده و زنده، و آکریدین اورانژ برای بررسی مورفولوژی سیتوپلاسم انجام شد و عکس‌برداری توسط میکروسکوپ فلورسنس (Olympus IX 70) صورت گرفت.

کلسیم با کرزول فتالین ایجاد کمپلکسی می‌نماید که در محیط قلیایی، ارغوانی رنگ است و شدت رنگ حاصله متناسب با غلظت کلسیم می‌باشد. در این سنجش از کیت کلسیم شرکت درمان‌کاو استفاده گردید. سلول‌های بنیادی مزانشیم پس از پاساژ سوم در پلیت‌های ۲۴ خانه قرار گرفت و تیمار سلول‌ها در ۴ گروه مذکور انجام گردید. سلول‌ها در گروه‌های جداگانه پس از شستشو با بافر فسفات به کمک اسکراپر و ۵۰ میکرولیتر بافر استخراج کلسیم (۰/۶ HCL نرمال) از کف پلیت جدا شدند و به لوله اپندورف منتقل شدند. پس از ۲۴ ساعت در دمای ۴ درجه سانتیگراد، به همه نمونه‌ها ۱۰۰ میکرولیتر محلول رنگزا اضافه شد. سپس به هر ویال ۳۰ میکرولیتر از نمونه سلولی اضافه گردید و جذب توسط دستگاه

جدول ۱- میانگین تعداد سلول‌های مزانشیمی زنده (با ضریب ۱۰ هزار سلول در میلی لیتر) پس از تیمار با دوزهای مختلف بیسفنول آ در زمان‌های متفاوت.

زمان (ساعت)	۲۴	۳۶	۴۸	۶۰	۷۲
۰	۲۴/۵۴ ^a ± ۱/۳۲	۲۳/۱۵ ^a ± ۰/۳۸	۲۳ ^a ± ۰/۷۱	۲۲/۵۴ ^a ± ۰/۶	۲۲/۹۶ ^a ± ۰/۶۶
۰/۵	۲۳/۶۲ ^{ab} ± ۰/۶۷	۲۲/۸۳ ^{ab} ± ۰/۴۲	۲۲/۵۴ ^a ± ۰/۶۷	۲۱/۹۸ ^{ab} ± ۰/۳۸	۲۱/۴۶ ^b ± ۲/۲۵
۱	۲۲/۸۳ ^{abc} ± ۰/۱۶	۲۲/۰۴ ^{bc} ± ۰/۲۲	۲۱/۵۴ ^a ± ۰/۸۳	۲۰/۵۸ ^b ± ۰/۲۸	۲۰/۶۴ ^b ± ۰/۲۳
۵	۲۲/۰۸ ^{bc} ± ۱۶/۰	۲۰/۸۱ ^{cd} ± ۰/۲۸	۱۹/۷۹ ^b ± ۰/۵۹	۱۸/۵۴ ^c ± ۰/۴۱	۱۷/۲۵ ^c ± ۰/۶۶
۱۰	۲۱/۲۵ ^{cd} ± ۰/۲۸	۱۹/۱۹ ^{cde} ± ۰/۵۴	۱۷/۳۹ ^c ± ۰/۵۳	۱۷/۱۹ ^c ± ۱/۰۶	۱۵/۵۴ ^d ± ۰/۳۴
۲۵	۲۰/۲۱ ^{de} ± ۰/۰۹	۱۷/۴۸ ^{def} ± ۰/۶۲	۱۵/۱۶ ^d ± ۰/۹۴	۱۴/۳۱ ^d ± ۰/۸۵	۱۳/۹۶ ^e ± ۰/۶۹
۵۰	۱۹/۲۵ ^{ef} ± ۰/۶۱	۱۶/۱۶ ^{ef} ± ۰/۳۵	۱۳/۴۸ ^{de} ± ۰/۶۹	۱۲/۶۶ ^d ± ۰/۳۴	۱۱/۸۳ ^f ± ۰/۳۱
۱۰۰	۱۸/۶۴ ^{ef} ± ۰/۷۳	۱۴/۵۶ ^f ± ۰/۵۵	۱۲/۷۱ ^e ± ۰/۳۴	۱۰/۵۶ ^e ± ۰/۷	۱۰/۱۴ ^g ± ۰/۱۹
۱۲۵	۱۸/۲۱ ^f ± ۰/۵۲	۱۱/۸۳ ^g ± ۰/۸۱	۱۰/۲۵ ^f ± ۰/۱۲	۹/۵۴ ^{ef} ± ۰/۵۸	۹/۳۱ ^{gh} ± ۰/۴۷
۱۵۰	۱۶/۴۹ ^g ± ۰/۵۳	۹/۵۶ ^{gh} ± ۰/۳۵	۸/۹۴ ^{fg} ± ۰/۲۲	۸/۳۵ ^{fg} ± ۰/۳۱	۸/۴۴ ^h ± ۰/۲۲
۲۰۰	۱۴/۱۰ ^h ± ۰/۶۹	۸/۸۹ ^h ± ۰/۲۲	۸/۰۶ ^{gh} ± ۰/۵۱	۷/۵ ^{gh} ± ۰/۳۵	۷/۱۴ ⁱ ± ۰/۱۶
۲۵۰	۱۲/۸۹ ^h ± ۰/۵۴	۸/۳۳ ^h ± ۰/۴۱	۶/۹۶ ^h ± ۰/۳۵	۶/۶۲ ^h ± ۰/۲۸	۵/۹۱ ^j ± ۰/۳۴

مقادیر Mean ± SD می‌باشند. میانگین‌های با کد حرف‌های متفاوت در یک ستون دارای تفاوت معنی‌دار با $p < 0/05$ می‌باشند.

جدول ۲- توانایی زیستی سلول‌های بنیادی مزانشیم پس از تیمار ۳ روزه با بیسفنول آ و اپی‌گالوکاتچین-۳-گالات.

تیمار	توانایی زیستی (۱۰ هزار سلول در میلی لیتر)
کنترل	$23/96^{ab} \pm 1/29$
BPA (۵۰ μ M)	$11/64^g \pm 0/54$
BPA (۱۵۰ μ M)	$8/44^h \pm 0/22$
EGCG (۱۰ mM)+BPA (۵۰ μ M)	$18/29^{de} \pm 1/17$
EGCG (۳۰ μ M)+BPA (۵۰ μ M)	$20/29^{cd} \pm 0/84$
EGCG (۵۰ mM)+BPA (۵۰ μ M)	$23/23^{ab} \pm 0/22$
EGCG (۱۰۰ mM)+BPA (۵۰ μ M)	$25/21^a \pm 0/81$
EGCG (۱۰ μ M)+BPA (۱۵۰ μ M)	$15/33^f \pm 0/87$
EGCG (۳۰ μ M)+BPA (۱۵۰ μ M)	$18/04^e \pm 0/75$
EGCG (۵۰ μ M)+BPA (۱۵۰ μ M)	$20/98^c \pm 0/5$
EGCG (۱۰۰ μ M)+BPA (۱۵۰ μ M)	$22/20^{ab} \pm 0/35$

مقادیر Mean \pm SD می‌باشند. میانگین‌های با کد حرف‌های متفاوت در یک ستون دارای تفاوت معنی‌دار با $p < 0/05$ می‌باشند. BPA: بیسفنول آ، EGCG: اپی-گالوکاتچین-۳-گالات.

شده است اما در گروه تیمار با EGCG، BPA و EGCG کاهش قطر هسته و شکستگی هسته توسط BPA را کاهش داد (شکل ۲). رنگ آمیزی آکریدین اورنژ تغییرات رخ داده در سیتوپلاسم و موقعیت هسته و سیتوپلاسم را نسبت به هم نشان داد که طبق نتایج حاصل در گروه‌های کنترل، شکل سیتوپلاسم چند وجهی و زوائد سلولی قابل تشخیص بود و هسته‌های آن‌ها در موقعیت مرکزی نسبت به سیتوپلاسم قرار داشتند. در گروه تیمار با BPA، چروکیدگی و کوچک شدن سیتوپلاسم و گرد شدن سلول‌ها مشهود بود. اما در گروه تیمار ترکیبی، EGCG توانست اثرات تخریبی BPA را مهار نماید (شکل ۳).

با توجه به جدول ۴، تیمار سلول‌های بنیادی مزانشیم مغز استخوان با دوز ۵۰ میکرومولار BPA برای ۳ روز سبب افزایش معنی‌دار میزان کلسیم داخل سلولی نسبت به گروه کنترل شد ($p < 0/05$). در گروه تیمار با EGCG + BPA میزان رسوب کلسیم داخل سلولی با گروه کنترل تفاوت معنی‌داری نداشت ($p > 0/05$).

بحث

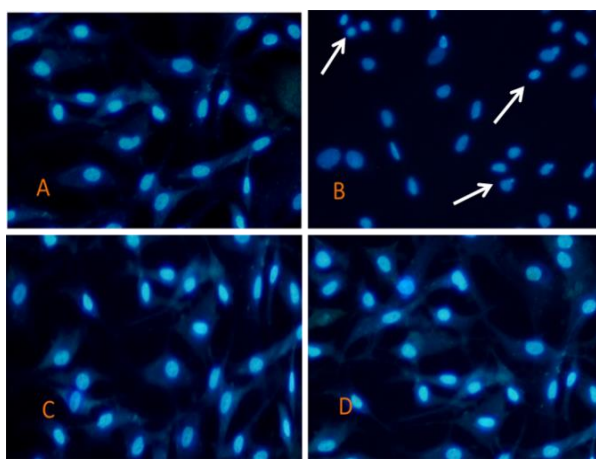
نتایج این مطالعه نشان داد تیمار سلول‌های مزانشیمی بنیادی مغز استخوان رت با BPA موجب کاهش معنی‌دار وابسته به دوز و زمان در توانایی زیستی این سلول‌ها می‌شود. در زمان ۲۴ ساعت، BPA ۲۰۰ میکرومولار باعث ۵۰ درصد کاهش در توانایی حیات شد در حالی که این مقدار کاهش توانایی، در زمان ۳۶ ساعت توسط ۱۵۰ میکرومولار و در زمان ۳ روز توسط ۵۰ میکرومولار BPA مشاهده شد. همچنین به دنبال تیمار با ۵۰ میکرومولار BPA در مدت زمان ۳ روز تغییرات مورفولوژیک از قبیل تغییر شکل و تراکم هسته، واکوتلدار شدن سیتوپلاسم از شواهد وقوع آپوپتوزیس در این سلول‌ها و همچنین افزایش مرگ و میر نیز مشاهده شد. از آنجائیکه سایر تحقیقات انجام شده نشان می‌دهد که BPA، آپوپتوزیس را در رده‌های سلولی گوناگون مثل نورون، HL-60 و سرتولی القا می‌کند [۶، ۱۱، ۱۲]. بنابراین تغییرات مورفولوژیک مشاهده شده در تحقیق حاضر می‌تواند به دلیل القاء آپوپتوزیس در سلول‌های بنیادی مزانشیم مغز استخوان رت توسط BPA باشد که باعث افزایش مرگ سلولی شده است. Bredhult در سال

آنالیز داده‌ها نشان داد که افزایش توانایی زیستی سلول‌های مزانشیم در حضور گروه کنترل، BPA (۵۰ و ۱۵۰ میکرومولار)، EGCG (۱۰، ۳۰، ۵۰ و ۱۰۰ میکرومولار) و EGCG + BPA، وابسته به دوز است (جدول ۲). در ادامه بررسی اثر همزمان EGCG و BPA بر سلول‌های بنیادی مزانشیم مغز استخوان، بر اساس نتایج حاصل از آزمون MTT، دوز ۵۰ میکرومولار BPA به همراه دوز ۵۰ میکرومولار EGCG و زمان ۳ روز انتخاب و ادامه‌ی مطالعات بر اساس دوزهای انتخابی در چهار گروه کنترل، BPA (۵۰ میکرومولار)، BPA (۵۰ میکرومولار) + EGCG (۵۰ میکرومولار) و EGCG (۵۰ میکرومولار) انجام شد.

مقایسه نتایج نشان داد طی روند ۳ روزه، تیمار با ۵۰ میکرومولار BPA سبب کاهش معنی‌دار توانایی زیستی نسبت به گروه کنترل شد ($p < 0/05$) در حالیکه تیمار EGCG (۵۰ میکرومولار) + BPA (۵۰ میکرومولار) با گروه کنترل دارای تفاوت معنی‌دار نبود ($p < 0/05$). بنابر این EGCG باعث جبران اثرات تخریبی بیسفنول آ بر قدرت حیات سلول‌ها شده است (جدول ۳). نتایج حاصل از رنگ آمیزی پروپودیوم آبیوداید افزایش تخریب غشا و مرگ سلول‌ها در مقایسه با کنترل را نشان داد (شکل ۱).

رنگ‌آمیزی هوخست سلول‌های تیمار شده با BPA در مقایسه با گروه کنترل نشان داد که هسته سلول‌ها دچار تغییرات مورفولوژیک از قبیل فشردگی کروماتین و شکستگی

همچنین در سال ۲۰۱۳ Ran Liu و همکارانش با بررسی اثر BPA بر سلول‌های مغز میانی نشان دادند که این ماده در غلظت ۱۰۰ میکرومولار با افزایش بیان P53 که از ژن‌های کلیدی در آپوپتوز است باعث افزایش بیان ژن‌های پیش آپوپتوتیک از جمله Bax می‌شود. همچنین این ماده موجب فعال شدن کینازها از جمله JNK از طریق افزایش ROS در این سلول‌ها می‌شود [۱۴]. JNK با فسفریله کردن BCL-2 باعث خنثی شدن اثر مهار کننده Bax می‌شود. افزایش Bax باعث آزاد شدن سیتوکروم C و متعاقباً فعال شدن کاسپازها و



شکل ۲- رنگ‌آمیزی هوست سلول‌های بنیادی مزانشیم پس از تیمار با بیسفنول آ و اپی‌گالوکاتچین-۳-گالات. (A) کنترل، (B) تیمار شده با غلظت ۵۰ میکرومولار اپی‌گالوکاتچین-۳-گالات، (C) تیمار شده با اپی‌گالوکاتچین-۳-گالات + بیسفنول آ و (D) تیمار شده با ۵۰ میکرومولار اپی‌گالوکاتچین-۳-گالات. پیکان فشردگی کروماتین در سلول‌های تیمار شده با بیسفنول آ را نشان می‌دهد.

ایجاد آپوپتوز می‌شود [۱۵]. BPA علاوه بر القاء آپوپتوزیس، توانایی تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژن را نیز داشته و می‌تواند با اکسید کردن اسیدهای چرب غیر اشباع در غشای سلول، باعث بهم‌ریختگی در تمامیت غشا شده و منجر به مرگ سلول شود [۵، ۶]، بنابراین تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژن نیز می‌تواند به عنوان دلیل دیگری بر افزایش مرگ و میر در سلول‌های مزانشیم مغز استخوان رت توسط BPA در نظر گرفته شود. این ترکیب شیمیایی علاوه بر مکانیزم توضیح داده شده در بالا باعث افزایش کلسیم داخل سلولی نیز می‌شود که فعال شدن آندونوکلیتازهای وابسته به کلسیم و منیزیم را دنبال داشته و در نهایت می‌تواند ایجاد شکستگی در DNA سلول را باعث شود [۱۶].

در این مطالعه تیمار با EGCG توانست اثرات سوء BPA

۲۰۰۹ نشان داد که غلظت ۵۰ میکرومولار BPA بعد از گذشت ۲۴ ساعت منجر به کاهش قابل توجه قدرت زیستی و توان تکثیر سلول‌های اندوتلیال اندومتری نمی‌شود [۱۳].

جدول ۳- میانگین تعداد سلول‌های زنده پس از ۳ روز تیمار با بیسفنول آ و اپی‌گالوکاتچین-۳-گالات.

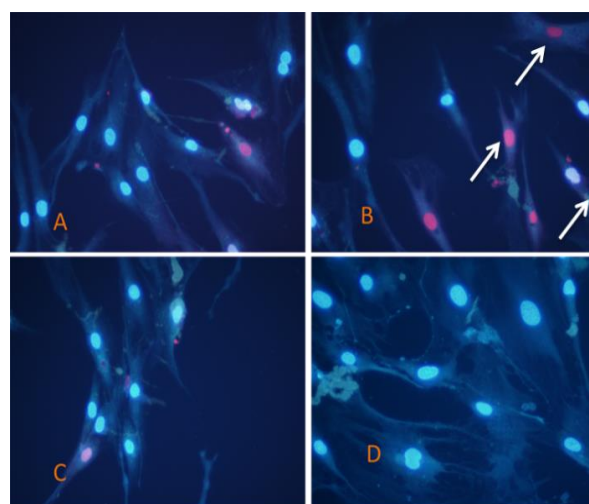
تعداد سلول‌های زنده (۱۰ هزار سلول در میلی لیتر)	میکرومولار (تیمار)
۲۷/۰۶ ^b ± ۰/۷۸	کنترل
۱۲/۸۹ ^c ± ۰/۵۹۴	BPA (۵۰)
۲۶/۹۳ ^b ± ۱/۲۸۲	EGCG (۵۰) + BPA (۵۰)
۳۱/۶۷ ^a ± ۰/۹۸۲	EGCG (۵۰)

مقادیر Mean ± SD می‌باشند. میانگین‌های با کد حرف‌های متفاوت در یک ستون دارای تفاوت معنی‌دار با $p < ۰/۰۵$ می‌باشند. BPA: بیسفنول آ، EGCG: اپی-گالوکاتچین-۳-گالات.

جدول ۴- میزان کلسیم داخل سلولی در سلول‌ها پس از ۳ روز تیمار با ۵۰ میکرومولار بیسفنول آ و اپی‌گالوکاتچین-۳-گالات.

غلظت کلسیم داخل سلولی (µg/dL)	تیمار
۰/۷۲ ^a ± ۰/۰۵۱	کنترل
۱/۲۱ ^b ± ۰/۰۵۴	BPA
۰/۷۱ ^a ± ۰/۰۶۲	EGCG + BPA
۰/۷۴ ^a ± ۰/۰۶۵	EGCG

مقادیر Mean ± SD می‌باشند. میانگین‌های با کد حرف‌های متفاوت در یک ستون دارای تفاوت معنی‌دار با $p < ۰/۰۵$ می‌باشند. بیسفنول آ، EGCG: اپی‌گالوکاتچین-۳-گالات.



شکل ۱- رنگ‌آمیزی پروپیدیوم آیداید سلول‌های بنیادی پس از تیمار با بیسفنول آ و اپی‌گالوکاتچین-۳-گالات. (A) سلول‌های کنترل، (B) سلول‌های تیمار شده با غلظت ۵۰ میکرومولار بیسفنول آ، (C) سلول‌های تیمار شده با اپی‌گالوکاتچین-۳-گالات + بیسفنول آ، (D) سلول‌های تیمار شده با ۵۰ میکرومولار اپی‌گالوکاتچین-۳-گالات. پیکان هسته سلول‌های مرده را نشان می‌دهد.

اکروتوکسین A خنثی کرده و از شکست DNA توسط آن‌ها جلوگیری کند [۱۹]. همچنین Wen-Bin Wu در سال ۲۰۰۶ با بررسی اثر این ماده بر سلول‌های کراتینوسیت که تحت اشعه‌ی فرابنفش بودند دریافتند که EGCG با خنثی کردن رادیکال‌های آزاد باعث مهار فعالیت JNK در این سلول‌ها می‌شود [۲۰].

نتیجه گیری

این تحقیق نشان داد که آلودگی با BPA باعث کاهش توانایی حیات، تغییرات مرفولوژیکی از قبیل متراکم شدن هسته، حضور واوکولها در سیتوپلاسم و افزایش کلسیم داخل سلولی در سلول‌های مزانشیم مغز استخوان رت می‌شود. EGCG به عنوان یک آنتی‌اکسیدان قوی می‌تواند اثرات نامطلوب ناشی از BPA را خنثی کند و از سلول‌ها در برابر این ماده محافظت کند.

سپاسگزاری

با تشکر از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه اراک که با پشتیبانی مالی انجام این پروژه تحقیقاتی را امکان پذیر نمود.

تعارض در منافع

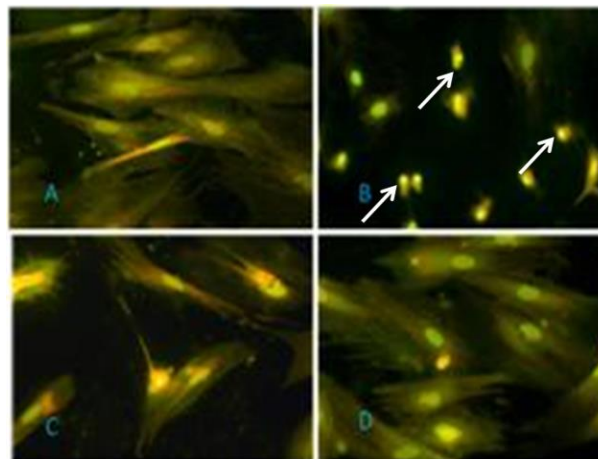
نویسندگان این مقاله تعارض در منافع ندارند.

سهام نویسندگان

م.س.م: انجام مطالعه و نگارش مقاله؛ م.م: انجام مطالعه و نگارش مقاله؛ رج: ایده، طراحی، و نظارت بر حسن اجرای مطالعه.

فهرست منابع

- [1] Li D, Fan H, Ye W.J, Hou H.F, Development toxicity of bisphenol A on post implantation rat embryo cultured in vitro. *J Health Sci* 56 (2010) 57-64.
- [2] Steinmetz R, Mitchner N, Grant A, Allen D, Bigsby R, The xenoestrogen bisphenol A induces growth differentiation and *C. fos* gene expression in the female



شکل ۳- رنگ‌آمیزی آکریدین اورانژ سلول‌های بنیادی مزانشیم پس از تیمار با بیسفنول آ و اپی‌گالوکاتچین-۳-گالات. (A) کنترل، (B) تیمار شده با غلظت ۵۰ میکرومولار اپی‌گالوکاتچین-۳-گالات، (C) تیمار شده با اپی‌گالوکاتچین-۳-گالات + بیسفنول آ و (D) تیمار شده با ۵۰ میکرومولار اپی‌گالوکاتچین-۳-گالات. پیکان چروکیدگی و کوچک شدن سیتوپلاسم و گرد شدن سلول‌های تیمار شده با بیسفنول آ را نشان می‌دهد.

بر سلول‌ها را تا حد زیادی جبران کند. EGCG یکی از ترکیبات اصلی چای سبز است که با داشتن ساختمان شیمیایی ویژه و گروه‌های هیدروکسیل زیاد نقش بسزایی در خنثی سازی رادیکال‌های آزاد دارد [۱۷]. این ماده با افزایش آنتی‌اکسیدان‌های درون سلولی مانند گلووتاتیون، اسید اوریکو بیلی روبین و افزایش ظرفیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان درون سلولی نظیر گلووتاتیون ردوکتاز، گلووتاتیون پراکسیداز و کاتالاز ظرفیت و توان آنتی‌اکسیدانی را بالا می‌برد [۸]. EGCG روند پراکسیداسیون لیپیدی را از طریق کاهش تولید رادیکال آزاد کاهش می‌دهد و با اتصال به عنصر مس و جلوگیری از اتصال این عنصر به لیپوپروتئین‌ها به طور قابل ملاحظه‌ای از کاهش غلظت توکوفرول در پلاسما جلوگیری می‌کند و باعث تاخیر در شروع پراکسیداسیون لیپیدی می‌شود [۱۸]. Costa و همکاران در سال ۲۰۰۷ نشان دادند که دوز ۳۰ میکرومولار EGCG می‌تواند رادیکال‌های آزاد را در سلول‌های کلیه تیمار شده با

reproductive tract. *Endocrinology* 139 (1998) 2741-2747.

- [3] Chang H, Ho Y, Sheu M, Lin Y, Tseng M, Wu S, Huang G, Chang Y, Antioxidant and free radical scavenging activities of *Phellinus merrillii* extracts. *Botanical Studies* 48 (2007) 407-417.
- [4] Ishido M, Suzuki J, Quantitative analyses of inhibitory effect of BPA on neural stem cell migration using neurosphere assay in vitro. *J Health Sci* 56 (2010) 175-181.

- [5] Wu H, Liu C, Duan W, Xu S, He M, Chen C, Wang Y, Zhou Z, Yu Z, Zhang L, Chen Y, Melatonin ameliorates bisphenol A-induced DNA damage in the germ cells of adult male rats. *Mutat Res* 752 (2013) 57–67.
- [6] Iida H, Maehara K, Doiguchi M, Mori T, Yamada F, Bisphenol A-induced apoptosis of cultured rat sertoli cell. *Reprod Toxicol* 17 (2003) 457–464.
- [7] Benachour N, Aris A, Toxic effects of low doses of Bisphenol-A on human placental cells. *Toxicol Appl Pharmacol* 241(2009) 322–328.
- [8] RaihanSZ, Chowdhury AK, Rabbani GH, Marni F, Ali MS, Nahar L, Effect of aqueous extracts of black and green teas in arsenic induced toxicity in rabbits. *Phytother Res* 23(2009) 1603-1608.
- [9] Singh B, Shankar S, Srivastava R, Green tea catechin, epigallocatechin-3-gallate (EGCG): mechanisms, perspectives and clinical applications. *Biochem Pharmacol* 82 (2011) 1807–1821.
- [10] Kermani S, Karbalaie K, Madani H, Jahangirnejad AA, Eslaminejad MB, Nasr-Esfahani MH, Baharvand H, Bone marrow-mesenchymal stem cells as a suitable model for assessment of environmental pollution. *J Arak Univ Med Sci* 11 (2008) 117-125 [in Persian].
- [11] Hiroshi T, Yoshinori K, Hiroshi S, Seiichiro F, Cytotoxicity and apoptosis-inducing activity of bisphenol A and hydroquinone in HL-60 cells. *Anticancer Res* 25 (2005) 2241-2248.
- [12] Lee S, Suk K, Kim IK, Jang IS, Park JW, Johnson VJ, Kwon TK, Choi BJ, Kim SH, Signaling pathways of bisphenol A-induced apoptosis in hippocampal neuronal cells: role of calcium-induced reactive oxygen species, mitogen-activated protein kinases, and nuclear factor- κ B. *J Neurosci Res* 86(2008) 2932-2942.
- [13] Bredhult C, Sahlin L, Olovsson M, Gene expression analysis of human endometrial endothelial cells exposed to Bisphenol A. *Reprod Toxicol* 28 (2009)18-25.
- [14] Liu R, Xing L, Kong D, Jiang J, Shang L, Hao W, Bisphenol A inhibits proliferation and induces apoptosis in micro mass cultures of rat embryonic midbrain cells through the JNK, CREB and p53 signaling pathways. *Food Chem Toxicol* 52 (2013) 76–82.
- [15] Ferrari D, Pinton P, Campanella M, Callegari MG, Pizzirani C, Rimessi A, Di Virgilio F, Pozzan T, Rizzuto R, Functional and structural alterations in the endoplasmic reticulum and mitochondria during apoptosis triggered by C2-ceramide and CD95/APO-1/FAS receptor stimulation. *Biochem Biophys Res Commun* 391 (2010) 575-581.
- [16] Chien LY, Hairnet H, Lowering extracellular calcium content protects cells from arsenite-induced killing and micronuclei formation. *Mutagenesis* 11 (1996) 75-78.
- [17] Katunuma N, Ohashi A, Sano E, Ishimaru N, Hayashi Y, Murata E, Catechin derivatives: Specific inhibitor for caspases-3, 7 and 2, and the prevention of apoptosis at the cell and animal levels. *FEBS Lett* 580 (2006) 741–746.
- [18] Oliva J, Bardag-Gorce F, Tillman B, French S, Protective effect of quercetin, EGCG, catechin and betaine against oxidative stress induced by ethanol in vitro. *Exp Mol Pathol* 90 (2011) 295–299.
- [19] Costa S, Utan A, Cervellati R, Speroni E, Guerra M.C, Catechins: natural free-radical scavengers against ochratoxin A-induced cell damage in a pig kidney cell line (LLC-PK1). *Food Chem Toxicol* 45 (2007) 1910–1917.
- [20] Wu WB, Chiang HS, Fang JY, Chen SK, Huang CC, Hung CF, (+)-Catechin prevents ultraviolet B-induced human keratinocyte death via inhibition of JNK phosphorylation. *Life Sci* 79 (2006) 801–807.

Research paper

Inhibitory effect of (–)-epigallocatechin-3-gallate (EGCG) on toxicity induced by bisphenol A in bone marrow mesenchymal stem cell in adult rat

Malek Soleimani-Mehranjani, Majid Mahdiyeh, Ronak Heidarian*

Department of Biology, Faculty of Sciences, Arak University, Arak, Iran

Received: 23 May 2015

Accepted: 7 June 2015

Abstract

Background and aim: Bisphenol A (BPA), known as a xenoestrogen, is widely used in industry and dentistry. Epigallocatechin-3-gallate (EGCG) is a strong antioxidant playing important role in scavenging of free radicals. This study aims to investigate the protective role of EGCG on BPA-induced oxidative stress in mesenchymal stem cells (MSCs).

Methods: After isolation and culture of MSCs from adult rats, cells divided into 4 groups: control, BPA, EGCG, and BPA+EGCG. Then cells were treated for 24, 36, 48, 60, and 72 h and viability, cell morphology and calcium content of cells were evaluated.

Results: BPA caused significant dose- and time-dependent reduction of viability and calcium content. In addition, morphological changes such as cytoplasm shrinkage were observed in the group treated by BPA. EGCG inhibited the cytotoxicity and morphogenic changes induced by BPA.

Conclusion: BPA reduces the viability of mesenchymal stem cells and the antioxidant EGCG reduces the BPA-induced toxic effects.

Keywords: Bisphenol A, Epigallocatechin-3-gallate, Mesenchymal stem cell

Please cite this article as follows:

Soleimani-Mehranjani M, Mahdiyeh M, Heidarian R, Inhibitory effect of (–)-epigallocatechin-3-gallate (EGCG) on toxicity induced by bisphenol A in bone marrow mesenchymal stem cell in adult rat. *Iran J Physiol Pharmacol* 1 (2017) 1-8.

*Corresponding author e-mail: ronak6410@yahoo.com
Available online at: <http://ijpp.phypha.ir>
E-mail: ijpp@phypha.ir