بیان ژن TGF-β در سلول‌های فیبروبلاست راه‌هوایی مصدومین شیمیایی

منیره سادات میرزمانی[1و2]، صمد زارع[2]، عباسعلی ایمانی فولادی[3]، محمدرضا نورانی[1*]

[1] آزمایشگاه ژنومیک، مرکز تحقیقات آسیب‌های شیمیایی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه ا...(عج)، تهران، ایران، [2] گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران، [3]مرکز تحقیقات میکروبیولوژی کاربردی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه ا...(عج)، تهران، ایران

*نویسنده پاسخگو: Email: r.nourani@yahoo.com

چکیده

مقدمه: استفاده گسترده از سولفورموستارد به عنوان جنگ افزار شیمیایی اثرات سمی طولانی مدتی به جای گذاشته‌است. بنابراین تمام متخصصان سلامت باید دانش کافی و آمادگی مقابله با هرگونه حمله شیمیایی مشابه را داشته‌باشند. فاکتور تغییردهنده‌ی رشد (TGF-β) نقش مهمی در بیماری‌های مزمن راه‌هوایی، از جمله فرایند تغییر ساختار راه‌هوایی که منجر به انسداد راه‌هوایی می‌شود، ایفا می‌کند. این تغییرات مورفولوژیک در دیواره راه‌هوایی با افزایش سنتز ماتریکس خارج سلولی توسط فیبروبلاست‌های راه‌هوایی و رسوب در دیواره راه‌هوایی صورت می‌گیرد. TGF-β نقش قابل توجهی در تغییر فعالیت فیبروبلاست‌ها در جهت تغییر ساختار راه‌هوایی دارد. هدف از مطالعه حاضر جداسازی و دست‌یابی به سلول‌های فیبروبلاست اولیه راه‌هوایی به صورت مستقیم از نمونه‌های بیوپسی راه‌هوایی مصدومین شیمیایی و نمونه‌های کنترل و بررسی بیان ژن TGF-β1 و TGF-β2 در سلول‌های فیبروبلاست جداسازی شده، به منظور مطالعه in vitro اثرات مخرب گاز سولفوموستارد بر مجاری هوایی و درک مکانیسم های مولکولی آسیب‌های ناشی از سولفوموستارد با هدف توسعه اقدامات پزشکی به منظور درمان و پیشگیری از این آسیب‌ها می‌باشد.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه با کمک تکنیک‌های کشت سلولی سلول‌های فیبروبلاست از بافت بیوپسی راه‌هوایی جدا و کشت داده‌شدند. پس از استخراج RNA از سلول‌های فیبروبلاست و سنتز cDNA، بیان ژن های TGF-β1 و TGF-β2 در سطح mRNA، در دو گروه مصدومین شیمیایی و افراد کنترل، توسط روش RT- PCR مورد بررسی قرارگرفت.

یافته‌ها: نتایج نشان‌دادند که ایزوفروم‌های TGF-β1 و TGF-β2، در سلول‌های فیبروبلاست اولیه در هر دو گروه بیان می‌شوند. بررسی‌های آماری نشان می‌دهد که بیان ژن‌های TGF-β1 و TGF-β2 به طور معنی‌داری در نمونه‌های مصدومین شیمیایی به نسبت نمونه‌های کنترل افزایش می‌یابد.

نتیجه‌گیری: روش به کار گرفته‌شده در این مطالعه روش توانمندی در جداسازی سلول‌های فیبروبلاست از نمونه‌های بیوپسی می‌باشد و نتایج نشان داد که TGF-β1 و TGF-β2 نقش مهمی در بیماری‌های مزمن ریوی مصدومین شیمیایی، از جمله در تغییر ساختار راه‌هوایی بازی می‌کند.

کلید واژه: فیبروبلاست، TGF-β، سولفور موستارد.

تاریخ دریافت: ۱۳۹۰/۱/۲۸
تاریخ پذیرش:۱۳۹۰/۵/۳

[Downloaded from ijwph.ir on 2026-10-07]

مقدمه

استفاده گسترده از سولفوروموستارد به عنوان جنگ‌افزار شیمیایی در قرن گذشته اثرات سمی طولانی مدتی به‌جای گذاشته‌است، بعلاوه امکان استفاده مجدد از این ترکیب سیتوتوکسیک به عنوان عامل تروریستی و سلاح شیمیایی وجوددارد. بنابراین، تمام متخصصان سلامت باید دانش کافی و آمادگی مقابله با هرگونه حمله شیمیایی مشابه را داشته‌باشند (۱). سولفوروموستارد عامل تاول‌زایی است که استفاده از آن به عنوان جنگ افزار شیمیایی، مهمترین کاربرد این ترکیب محسوب می‌شود (۲). آخرین استفاده نظامی از آن در جنگ عراق علیه ایران (۱۹۸۰-۱۹۸۸) بود که توسط رژیم بعثی عراق علیه افراد نظامی و غیرنظامی مورد استفاده قرارگرفت و سبب مصدوم‌شدن حدود ۱۰۰ هزار نفرگردید. هم‌اکنون حدود یک سوم آن‌ها از عوارض مزمن ریوی آن رنج م برند. پوست، چشم، سیستم‌تنفسی، سیستم عصبی مرکزی و مغز استخوان از مهمترین اندام‌هایی هستند که درگیر عوارض کوتاه مدت گاز خردل می‌شوند، اما ضایعات سیستم تنفسی، پوست و چشم از عوارض مزمن آن می‌باشند (۷-۳).

فاکتور تغییردهنده‌ی رشد بتا یکی از زیر خانواده‌های تیپیک خانواده‌ی TGF می‌باشد. تقریبا تمام انواع سلول‌های بدن از جمله سلول‌های اندوتلیال، اپی‌تلیال، عصبی، بافت پیوندی و هماتوپویتیک، TGF-β و گیرنده‌های آن را سنتز می‌کنند (۸). TGF-β به صورت اتوکرین، پاراکرین و گاهی اندوکرین عمل می‌کند و مسئول تنظیم فرایندهای مختلفی از جمله تکثیر سلولی، تمایز، آپوپتوز، هموستاز ماتریکس خارج سلولی، تکوین جنینی، ترمیم زخم‌ها و آنژیوژنز می‌باشد (۱۰-۸). این سایتوکاین نقش مهمی در ریه بیماران مبتلا به برخی از بیماری‌های مزمن راه‌های هوایی، به ویژه در فرایند بازسازی راه‌هوایی ایفا می‌کند (۱۱). تغییرات عمده در ساختار دیواره برونش، در بسیاری از بیماران مبتلا به آسم تشخیص‌داده شده‌است که منجر به انسداد راه‌هوایی به‌صورت غیرقابل برگشت شده‌است (۱۲). اعتقاد بر این است که این تغییرات مورفولوژیک با افزایش سنتز کلاژن (نوع اول، سوم و پنجم) توسط فیبروبلاست‌های راه‌هوایی و رسوب در دیواره راه‌هوایی صورت می‌گیرد (۱۳). در میان فاکتورهای رشد متعددی که در فرایند التهاب راه‌هوایی و ترمیم بافت فعال هستند، TGF-β نقش برجسته‌ای در تغییر فعالیت فیبروبلاست‌ها، که منجر به بازسازی راه‌هوایی می‌شود، دارد (۱۴).

بازسازی راه‌هوایی با تجمع غیرطبیعی ماتریکس خارج سلولی مشخص می‌شود. TGF-β به عنوان یک مولکول میانجیگر کلیدی در تحریک تجمع ماتریکس خارج سلولی شناخته شده‌است. شواهد نشان می‌دهد که فیبروبلاست‌ها منبع اصلی رسوب ماتریکس خارج سلولی می‌باشند (۱۵). فنوتیپ غیرطبیعی فیبروبلاست در اختلالات فیبروتیک در بیماری‌های ریوی (۱۶) مشاهده و گزارش شده‌است که به نظر می‌رسد این فنوتیپ غیرطبیعی در پاسخ به یکی از مهمترین مولکول‌های سیگنالینگ در اختلالات فیبروتیک یعنی TGF–β، بوجود آمده‌باشد (۱۷).

سلول‌های راه‌هوایی، نظیر سلول‌های اپیتلیال، فیبروبلاست و سلول‌های ماهیچه‌ای صاف می‌توانند از بافت مجاری هوایی جداشده و به عنوان سلول‌های اولیه به منظور مطالعات in vitro بر روی خصوصیات و واکنش هر یک از این سلول‌ها به دنبال آسیب‌دیده‌گی استفاده‌شوند. چنین مدل‌هایی به مطالعه بیشتر ارتباط این سلول‌ها و پاسخ شان به آسیب کمک می‌کند (۱۸).

مواد و روش‌ها

مطالعه انجام‌شده از نوع تجربی بود. جامعه مورد مطالعه شامل دو گروه مصدومین شیمیائی دارای سابقه مواجهه با سولفوروموستارد و افراد کنترل بود. گروه مصدومین شامل افرادی بودند که به دلیل ناراحتی‌های ریوی ناشی از مسمومیت مستند قبلی با سولفوروموستارد در جنگ تحمیلی و با تایید پزشکان فوق تخصص ریه انتخاب شدند. گروه کنترل نیز شامل افرادی بودند که به دلیل ناراحتی ریوی و به دستور پزشک متخصص تحت عمل برونکوسکوپی قرارمی‌گرفتند، ولی براساس عکس‌های ریوی و داده‌های برونکوسکوپی هیچ‌گونه عارضه شناخته شده‌ی ریوی را نشان نمی‌دادند .افراد سیگاری، بیماران مبتلا به سرطان ریه، آسم، سل و افراد مسن از مطالعه ما حذف شدند. نمونه‌های بافت‌های ریوی این تحقیق از بخش برونکوسکوپی مجتمع بیمارستانی بقیه‌الله الاعظم جمع‌آوری شدند. نمونه‌گیری از دیواره راه‌های هوایی در فاصله زمانی خرداد ۱۳۸۹ تا آبان ۱۳۸۹ انجام‌شد. نمونه‌های مورد نظر تحت نظارت مستقیم پزشکان

[Downloaded from ijwph.ir on 2026-10-07]

فوق‌تخصص ریه و با پنس‌های مخصوص در حین برونکوسکوپی جمع‌آوری شدند. برای رعایت مسائل اخلاقی، قبل‌ازگرفتن نمونه، دلایل و علل نمونه‌گیری هم برای افراد بیمار و هم افراد کنترل کاملا تشریح‌شده و با جلب رضایت این افراد و اخذ رضایت نامه کتبی اقدام به نمونه‌گیری شد. تعداد ۵ نمونه بیوپسی مصدوم شیمیایی و ۵ نمونه کنترل جمع‌آوری و در لوله‌های فالکن استریل حاوی محیط کشت DMEM قرار داده‌شد و پس از انتقال به آزمایشگاه، مراحل کشت بافت به منظور جداسازی سلول‌های فیبروبلاست بروی نمونه‌های بیوپسی انجام‌شد. میانگین سنی افرادی که از آن‌ها نمونه دریافت‌شد در جدول ۱ آوره شده‌است.

جدول۱: میانگین سنی افرادی که از آن‌ها نمونه گرفته‌شد.

	گروه مواجهه N=۵	گروه کنترل N=۵	P-value
دامنه سن	۵۴-۴۲	۵۵-۴۳	۰,۶۷
سن (میانگین±انحراف معیار)	۴۷,۸±۵	۴۹,۴±۵,۶	

جداسازی و کشت سلول‌های فیبروبلاست مشتق از بافت برونشیال ریوی

به منظور جداسازی سلول‌های فیبروبلاست از نمونه‌های بیوپسی گرفته‌شده، از روش Explant استفاده‌شد. پس از انتقال نمونه بیوپسی برونش به آزمایشگاه، نمونه با PBS به آرامی شستشو داده‌شد. سپس نمونه بافتی با استفاده از تیغ جراحی به قطعات کوچک ۲ تا ۳ میلی‌متری بریده‌شد و در پلیت کشت شش خانه‌ای حاوی محیط کشت DMEM (۱۰٪ FBS، ۱٪ محلول بافر HEPES ۱مولار ، ۱٪ اسید آمینه غیرضروری و ۱٪ پنی‌سیلین/ استرپتومایسین) در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد در انکوباتور رطوبت‌دار با غلظت ۵٪ دی‌اکسیدکربن نگه‌داری شدند. هر ۳ روز محیط کشت سلول‌ها با محیط کشت تازه تعویض‌شد. در طی دو هفته اول اکثریت سلول‌های غیرفیبروبلاست (اپیتلیال و اندوتلیال) از بین می‌روند در حالی که فیبروبلاست‌ها به رشد و تقسیم ادامه می‌دهند در نتیجه به‌عنوان سلول‌های غالب استقرار می‌یابند. در این زمان می‌توان قطعات بافتی باقی‌مانده از ظرف کشت خارج و با استفاده از محلول تریپسین-EDTA سلول‌ها را به فلاسک‌های کشت سلولی ۲۵ سانتی‌متر مربع منتقل‌کرد.

استخراج RNA

استخراج RNA از سلول‌های فیبروبلاست، با استفاده از محلول(Trepure Isolation reagent (Roch, Germany طبق دستورالعمل انجام‌شد. ابتدا محیط کشت سلول‌ها کاملا خارج و Trepure به فلاسک اضافه و به مدت ۵ دقیقه در دمای ۲۵ درجه سانتیگراد انکوبه شد. سپس میزان ۲۰۰ ماکرولیتر کلروفورم به هر نمونه اضافه و پس از تکان‌دادن و قرارگرفتن به مدت ۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتیگراد، به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتیگراد در دور ۱۲۰۰۰ در دقیقه (rpm) سانتریفیوژ شدند. پس از سانتریفیوژ فاز رویی توسط سمپلر عاری از آنزیم‌های تجزیه‌کننده RNA (RNase free) به آرامی جدا و به میکروتیوپ‌های استریل منتقل و هم حجم آن ایزوپروپانل به آرامی مخلوط‌شد و به مدت ۱۵ دقیقه بر روی یخ قرارگرفت. سپس به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتیگراد در دور rpm ۱۲۰۰۰ سانتریفیوژ گردید. رسوب جداسازی و به آن ۱ میلی‌لیتر اتانول ۷۵ درصد اضافه‌گردید و به مدت ۸ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتیگراد در دور rpm ۷۵۰۰ سانتریفیوژ شد. در نهایت RNA در آب تیمار شده با DEPC حل شد.

ارزیابی خلوص و کیفیت RNA استخراج‌شده

پس از استخراج RNA به منظور ارزیابی کمیت RNA استخراج‌شده و تعیین غلظت و درجه خلوص آن، از دستگاه اسپکتروفتومتر نانو دراپ (NanoDrop, USA) استفاده شد. این دستگاه به طور اتوماتیک غلظت RNA را با استفاده از جذب نوری در طول موج ۲۶۰ نانومتر، محاسبه می‌کند. پس از آماده‌سازی نمونه و گذاردن آن در مکان قرارگیری نمونه، دستگاه غلظت نمونه مورد نظر رادر طول موج مربوطه، بر حسب نانوگرم برماکرولیتر، محاسبه می‌نماید.

از طرفی نمونهٔ RNA دارای کیفیت استاندارد می‌باشد که الگوی باند ویژه‌ای روی ژل آگارز نشان‌دهد. حضور

[Downloaded from ijwph.ir on 2026-10-07]

باندهای RNA ریبوزومی ۱۸S و ۲۸S نشان‌دهندهٔ سالم و دست نخورده‌بودن RNA است. در این مطالعه برای ارزیابی کیفت RNA استخراج‌شده الکتروفورز نمونه‌های RNA بروی ژل آگارز ۱٪ انجام شد.

سنتز DNA مکمل (cDNA)

۵۰۰ نانوگرم از RNA استخراج‌شده از سلول‌های فیبروبلاست، به عنوان الگو جهت سنتز cDNA، مطابق با کیت ساخت cDNA (Bioneer, Korea) استفاده‌شد. سپس برنامه زمانی-دمایی به صورت ۲۵ درجه سانتیگراد به مدت ۳۰ ثانیه، ۴۳ درجه سانتیگراد به مدت ۴ دقیقه، ۵۵ درجه سانتیگراد به مدت ۳۰ ثانیه (۱۲ سیکل) و ۹۵ درجه سانتیگراد به مدت ۵ دقیقه (دمای غیرفعال‌سازی) انجام شد. پس از اتمام سنتزcDNA، میکروتیوپ ها را به فریزر ۲۰- درجه سانتیگراد منتقل شد.

واکنش PCR، تکثیر ژن‌های مورد نظر از روی cDNA با استفاده از پرایمرهای اختصاصی

پس از انجام واکنش رونویسی معکوس، به منظور تکثیر قطعهٔ مورد نظر واکنش، از روی cDNA سنتزشده، PCR انجام شد. ۱ ماکرولیتر از cDNA سنتز شده با ۲,۵ ماکرولیتر بافر تکثیر ۱۰X، ۱ماکرولیتر مخلوط dNTP، ۰,۳ ماکرولیتر آنزیم Taq DNA polymerase، ۱ماکرولیتر $MgCl_2$، ۱ ماکرولیتر پرایمر بالا دست و پایین دست و آب دو بار تقطیر تا حجم ۲۵ ماکرولیتر، مخلوط شد. مراحل PCR توسط دستگاه (Eppendorf, asterCycler Hamburg, Germany) انجام شد. توالی پرایمرها و برنامه زمانی و دماهای لازم جهت انجام واکنش PCR در جداول ۲ و۳ ذکر شده است.

الکتروفورز محصول PCR بر روی ژل آگارز

محصولات تکثیرشده PCR، بر روی ژل آگارز ۱,۵ درصد الکتروفورزو از هم جدا شدند. سپس با رنگ اتیدیوم بروماید رنگ‌آمیزی و با تاباندن نور ماوراء بنفش توسط دستگاه UV Transluminator باندهای ایجادشده مشاهده و تفسیر گردید.

جدول۲. توالی و اطلاعات مربوط به پرایمرها

نام ژن	نوع پرایمر	توالی پرایمر	دمای اتصال C°	طول قطعه مورد نظر bp
TGF-β1	F	5'TGTGACAGCAGGGATAACAC3'	۵۹	۲۴۲
	R	5'TGAAGCAATAGTTGGTGTCC3'		
TGF-β2	F	5'TTGACGTCTCAGCAATGGAG3'	۵۷	۲۲۰
	R	5'TCAGTTACATCGAAGGAGAGC3'		
β-actin	F	5'TCATGAAGATCCTCACCGAG3	۵۹	۱۹۰
	R	5'TTGCCAATGGTGATGACCTG3'		

جدول۳. برنامه زمانی-دمایی لازم جهت انجام واکنش PCR

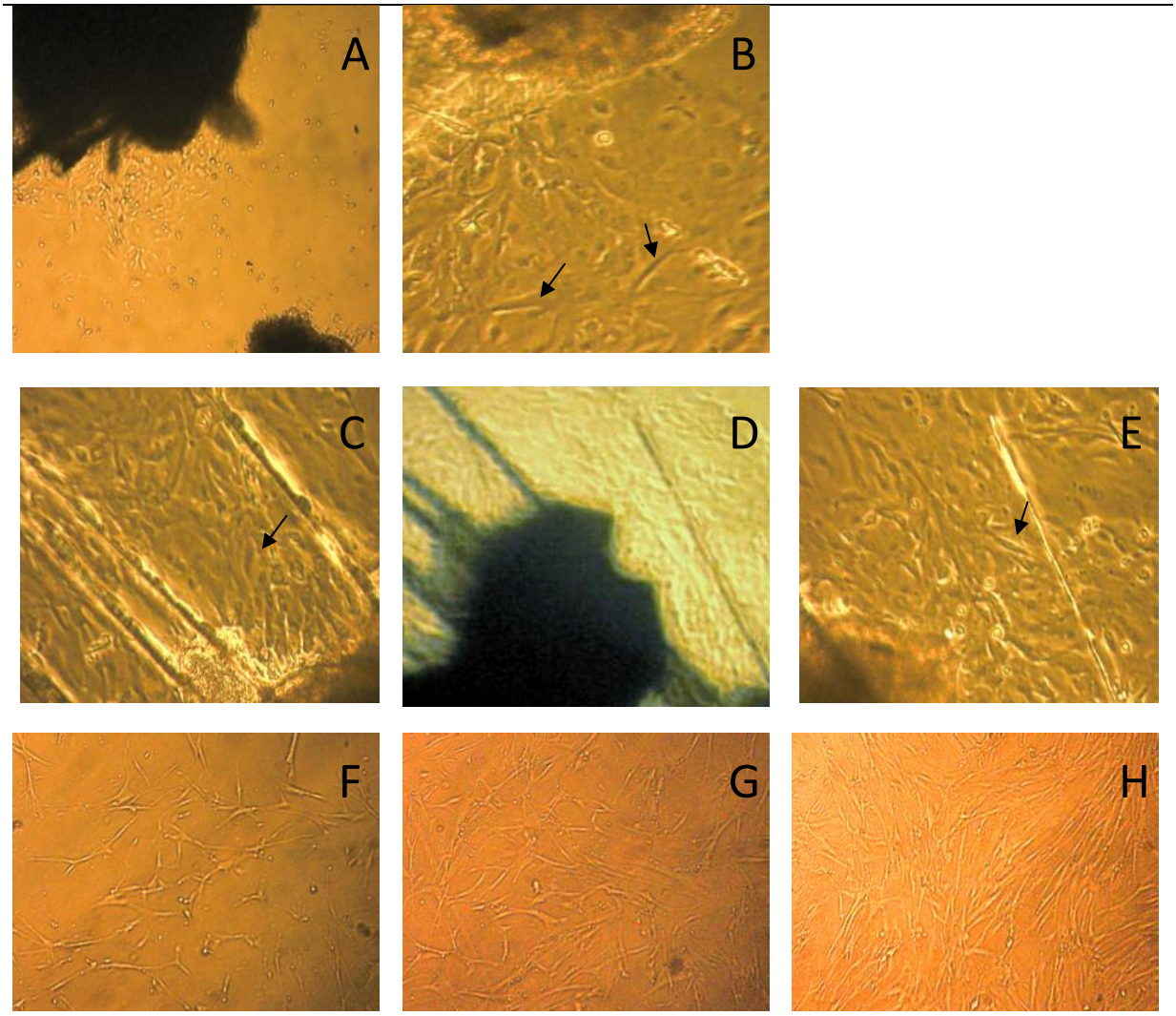
تعدادسیکل	زمان	دما (درجه سانتیگراد)	سیکل‌های واکنش
۱	۳ دقیقه	۹۵	Initiation
۳۳	۳۰ ثانیه ۳۰ ثانیه ۱ دقیقه	۹۵ ۵۱-۶۱ ۷۲	Denaturation Annealing Extension
۱	۵ دقیقه	۷۲	End terminal extension

[Downloaded from ijwph.ir on 2026-10-07]

یافته‌ها

کشت سلولی (جداسازی و کشت اولیه سلول‌های فیبروبلاست از بافت راه‌های هوایی)

یک هفته پس از کشت بافت سلول‌های فیبروبلاست از بافت جداشده و به صورت سلول‌های انفرادی در محیط کشت سلول، در اطراف بافت مشاهده شدند. دو هفته بعد از کشت، شمار فیبروبلاست‌ها به صورت چشمگیری افزایش‌یافت. پس از رسیدن سلول‌ها به تراکم مناسب، سلول‌ها به فلاسک کشت منتقل شدند و مراحل رشد و تکثیر خود را در فلاسک‌های کشت طی‌کردند. سلول‌ها در پاساژ ۳ تا ۵، پس از رسیدن به تراکم مناسب و در شرایط مناسب، برای مطالعات مولکولی استفاده شدند.



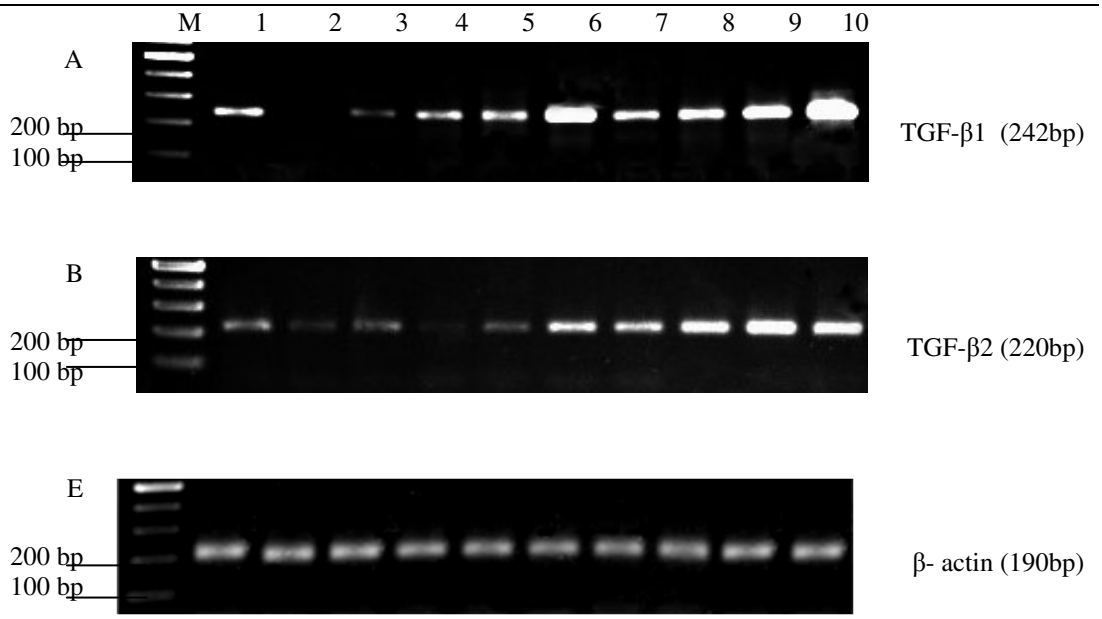
شکل ۱. شمای میکروسکوپی از کشت اولیه فیبروبلاست. سلول‌های جدا شده از بافت راه‌هوایی. در ۵ روز پس از کشت اولیه، مشاهده می‌شود تعداد کمی سلول‌های فیبروبلاستی شکل از بافت کشت داده شده جداشده و به اطراف مهاجرت‌کردند (A,B). در ده روز پس از کشت اولیه، تعداد سلول‌های فیبروبلاستی شکل قابل مشاهده بیشترشده و بعضی از آن‌ها تشکیل کلونی داده‌اند (C,D,E). رشد و تکثیر سلول‌های فیبروبلاست پس از انتقال به فلاسک: ۲۴ ساعت پس از انتقال به فلاسک(F)، روز پنجم (G) و روز چهاردهم (H). قابل ذکر است که فیبروبلاست‌ها از لبه های بافت به خارج مهاجرت می‌کنند(A,B) و به تراکم می‌رسند(C,D,E). پس از انتقال به فلاسک فیبروبلاست‌ها به کف فلاسک می‌چسبند(F)، تکثیر می‌شوند و پراکنده می‌شوند(G) و به تراکم می‌رسند(H).

میزان بیان ژن‌های TGF-β1 و TGF-β2 در سلول‌های فیبروبلاست راه‌هوایی

از نمونه‌های RNA استخراج‌شده از سلول‌های فیبروبلاست راه‌های هوایی، cDNA ساخته‌شد و با

[Downloaded from ijwph.ir on 2026-10-07]

استفاده از cDNA سنتز شده به عنوان الگو، واکنش PCR انجام شد. هم زمان با انجام PCR برای ژن‌های هدف، پرایمرهای ژن بتااکتین (ژنی که به صورت عمومی در تمام سلول‌ها وجوددارد) هم که قطعه‌ای به طول ۱۹۰ جفت‌بازی را سنتز می‌کرد، استفاده‌شد. پرایمر طراحی شده برای TGF-β1 و TGF-β2 به ترتیب توانایی سنتز قطعه‌هایی به طول ۲۴۲ و ۲۲۰ جفت باز از ژن‌های مورد نظر را داشتند. شکل ۲ نتایج حاصل از RT-PCR ژن های TGF-β1 و TGF-β2 نمونه‌های کنترل در مقایسه با نمونه‌های شیمیایی را نشان می‌دهد. چاهک‌های شماره ۱ تا ۵ ژن های TGF-β1 و TGF-β2 نمونه‌های کنترل و چاهک‌های ۶ تا ۱۰ نمونه‌های مصدومین شیمیایی را نشان می‌دهد. همانطور که مشاهده می‌شود بیان این ژن در مصدومین شیمیایی نسبت به نمونه‌های کنترل افزایش‌یافته‌است. قسمت پائین شکل ۲، ژن بتااکتین نمونه‌های کنترل و شیمیایی را نشان می‌دهد. چاهک ۱ تا ۵ شامل باند ۱۹۰ جفت باز ژن بتااکتین نمونه‌های کنترل و چاهک‌های ۶ تا ۱۰ شامل نمونه‌های مصدومین شیمیایی می‌باشد. نتایج نشان‌داد که تغییری در میزان بیان این ژن در بین دو گروه کنترل و بیمار وجودندارد.



شکل۲. الف و ب: الکتروفورز نتایج RT-PCR ژن‌های TGF-β1 و TGF-β2 در سلول‌های فیبروبلاست راه‌هوایی: چاهک (M) شاخص اندازه مولکولی 100bp (غلظت ۵۰ نانوگرم بر میکرولیتر)، چاهک شماره ۱ تا ۵ ژن‌های TGF-β1 و TGF-β2 نمونه‌های کنترل و چاهک‌های ۶ تا ۱۰ نمونه‌های بیماران شیمیایی را نشان می‌دهد. بیان هر دو ژن در بیماران شیمیایی افزایش‌یافته‌است. ج) الکتروفورز نتایج RT-PCR ژن بتااکتین از نمونه‌های دیواره راه‌های هوایی: چاهک (M) شاخص اندازه ملکولی 100bp (غلظت ۵۰ نانوگرم بر میکرولیتر)، چاهک ۱ تا ۵ شامل باند 190bp ژن بتااکتین نمونه‌های کنترل و چاهک‌های ۶ تا ۱۰ شامل نمونه‌های بیماران شیمیایی می‌باشد. نتایج نشان‌داد که تغییری در میزان بیان این ژن در بین دو گروه کنترل و بیمار وجودندارد.

آنالیز آماری مقایسه بیان ایزوفرم‌های TGF-β1 و TGF-β2 در دو گروه بیماران شیمیایی و کنترل

برای مقایسه بیان این دو ژن در بین دو گروه از آزمون آزمون T مستقل استفاده شد. نتایج حاکی از این بود که بیان TGF-β2 وTGF-β1 به طور معنی‌داری در گروه مصدومین شیمیائی افزایش یافته است ($p<0.05$).

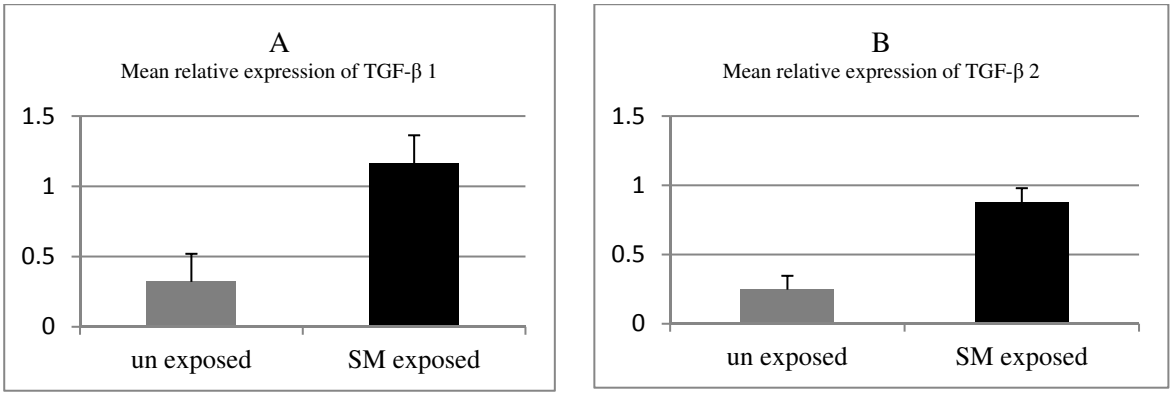
بحث

هدف از این تحقیق جداسازی مستقیم سلول‌های فیبروبلاست راه‌هوایی از نمونه‌های بیوپسی ریه، به منظور مطالعه in vitro اثرات مخرب گاز سولفوموستارد بر مجاری هوایی و میزان بیان ایزوفرم‌های یک و دو TGF-β در سلول‌های فیبروبلاست جداسازی شده بود. امروزه تمرکز آزمایشات in vitro بر روی درک

[Downloaded from ijwph.ir on 2026-10-07]

مکانیسم‌های بیوشیمیایی آسیب‌های ناشی از سولفوموستارد با هدف توسعه اقدامات پزشکی به منظور درمان و پیشگیری از این آسیب‌های می‌باشد (۱۹).

در این مطالعه بیوپسی از راه‌های هوایی جانبازان شیمیایی گرفته‌شد و با کمک تکنیک‌های کشت سلولی سلول‌های فیبروبلاست از بافت بیوپسی جداسازی و کشت داده‌شد، RNA این سلول‌ها استخراج شد و بیان ژن‌های TGF-β1 و TGF-β2 در دو گروه مصدومین شیمیایی و افراد کنترل مورد بررسی قرارگرفت. جهت بررسی بیان این ژن‌ها در گرو های مربوطه، پس از اطمینان از روش‌های بکار رفته جهت استخراج RNA و ساخت cDNA، بیان ژن‌های موردنظر در سطح mRNA توسط روش RT- PCR مورد بررسی قرارگرفت. نتایج بررسی‌ها نشان‌دادند که ایزوفروم‌های TGF-β1 و TGF-β2، در سطح mRNA در اکثر سلول‌های فیبروبلاست نمونه‌های هر دو گروه بیان می‌شوند. از آنجا که روش استفاده شده در این مرحله به صورت نیمه کمی بود، امکان مقایسه میزان بیان را بین گروه‌های مختلف فراهم می‌کند. بررسی های آماری نشان می‌دهد که بیان ژن‌های TGF-β1 و TGF-β2 به طور معنی‌داری در نمونه‌های جانبازان شیمیایی در سطح mRNA به نسبت نمونه‌های کنترل افزایش می‌یابد.



شکل ۳. میانگین شدت نسبی بیان ژن TGF-β1 و TGF-β 2 در نمونه‌های کنترل و بیمار. میانگین شدت نسبی بیان TGF-β1 در دو گروه (گروه کنترل غیرشیمیایی و گروه شیمیایی) در نمودار A و نمودار B میانگین شدت نسبی بیان TGF-β2 در دو گروه نشان می‌دهد. اندازه‌گیری در هر نمونه به صورت نسبت شدت باند ژن مورد نظر به β-actin می‌باشد. با استفاده ار آزمون مستقل T مشخص شد که بیان این در گروه بیمار به طور معنی‌داری افزایش یافته‌است (p<۰,۰۵).

تماس با گاز خردل منجر به عوارض زودرس و دیررس می‌شود که نارسائی‌های ریوی مهمترین عارضه ثانویه بوده و عامل اصلی ناتوانی و مرگ و میر در مصدومین مسمومشده با گاز خردل می‌باشد (۲۲-۲۰). مطالعات نشان می‌دهد که در این افراد، قطور شدن دیواره برونش‌ها، آمفیزم و فیبروزه‌شدن بافت‌های ریوی ناشی از آسیب وارده توسط سولفورموستارد است (۲۳). تغییر در ساختار مورفولوژیکی راه‌های هوایی به دنبال استنشاق گاز خردل در جانبازان شیمیایی با عارضه مزمن انسدادی راه‌های هوایی[I] (COPD) دیده می‌شود (۲۴). تغییر ساختار راه‌هوایی برای اولین بار ۷۵ سال پیش توسط هوبر در طی مطالعه و توصیف آسم کشنده، مورد توجه قرارگرفت (۲۵). در این بیماری در کنار افزایش لایه کلاژن، عروق و بافت الاستیک در دیواره راه‌هوایی عمدتا در میزان ماتریکس خارج سلولی نیز افزایش قابل ملاحظه‌ای مشاهده می‌شود که احتمالا به علت افزایش سنتز و ترشح و یا کاهش حذف توسط سلول‌های فیبروبلاست و سایر سلول‌های ساختاری راه‌های هوایی می‌باشد (۲۶).

بررسی‌های مختلف نشان داده‌است که TGF-β را می‌توان به عنوان یک هدف درمانی موثری در نظر گرفت، به‌طوری که در مطالعات in vitro نشان داده شده‌است مهار TGF-β منجر به کاهش تجمع ماتریکس خارج سلولی و بهبود علائم فیبروز می‌شود. TGF-β به عنوان یک سایتوکاین مهم در پیشرفت فرایند تغییر ساختار راه‌هوایی در بیماری های مختلف ریوی، شناخته

[I] chronic obstructive pulmonary disease

[Downloaded from ijwph.ir on 2026-10-07]

شده‌است (۲۷). در مطالعات مختلف انجام‌شده در شرایط in vitro و in vivo نقش TGF-β1 در افزایش بیان ژن‌های فیبروتیک مانند کلاژن و فاکتور رشد بافت همبند (CTGF)، در سلول‌های گوناگون نشان داده شده است (۲۸). Bergmann و همکاران (۱۹۹۸) با روش RT-PCR نیمه کمی نشان‌دادند که رونوشت‌های mRNA مربوط به TGF-β1 در سلول‌های مایع BAL بیماران برونشیولیت انسدادی حاصل از پیوند ریه در مقایسه با افراد کنترل افزایش می‌یابد (۲۹). علاوه بر این Batra و Vignola و همکارانشان در مطالعات جداگانه نشان‌دادند که افزایش TGF-β در مایع برونشیو آلوئولی (BAL) بیماران مبتلا به آسم و افزایش بیان TGF-β1 در سطح اپی‌تلیوم و لایه ساب‌موکوزال دیواره راه‌هوایی، وابسته به ضخامت غشاء پایه است و نشان‌دهنده نقش مستقیم TGF-β1 در تغییر ساختار راه‌هوایی می‌باشد (۳۰و۳۱). El-Gamel و همکاران با استفاده از روش ایمونو هیستوشیمی افزایش بیان TGF-β را در نمونه‌های ریوی مبتلایان به همین بیماری نشان داده‌اند اما در این بررسی نوع ایزوفرم افزایش‌یافته مشخص‌نشده است (۳۲). علاوه براین مطالعات، در مدل‌های حیوانی بیماری برونشیولیت انسدادی نیز اهمیت مسیر پیام‌رسانی TGF-β مشخص شده‌است (۳۳و۳۴).

در دو مطالعه Coker و همکاران بیان TGF-β1 را در نمونه‌های ریه افراد سالم نشان داده‌اند و در مطالعه دوم انجام‌شده توسط این گروه مشخص‌شد که بیان TGF-β1 در بیماران فیبروز ریه افزایش‌یافته و در ایجاد بیماری دخیل می‌باشد (۳۵و۳۶) این یافته‌ها با نتایج مطالعه ما همخوانی دارند.

Anthony و همکاران افزایش میزان پروتئین TGF-β1 را مایع برونشیو آلوئولی (BAL) بیماران مبتلا به آسم گزارش کرده‌اند. در این بیماری نیز تغییر ساختار وسیعی در مجاری هوایی رخ می دهد که به نوبه خود منجر به ضخیم‌شدن دیواره های مجاری هوایی و تنگی نفس می‌شود (۲۷و۳۷). در مطالعه دیگری که توسط Torrego و همکاران با استفاده از تکنیک ایمونوهیستوشیمی انجام‌شد مشخص شد که میزان پروتئین TGF-β2 به همراه TGF-β1 درریه بیماران مبتلا به آسم بعد از مواجه با آلرژن به طور معنی‌داری افزایش می‌یابد که بیانگر نقش این ایزوفرم‌ها در بیماری آسم است (۳۸)، مطالعه ما نیز این پیشنهاد را می‌کند که TGF-β1 و TGF-β2 نقشی مهمی در بیماری‌های مزمن ریوی مسدومین شیمیائی بازی می‌کند. Takizawa و همکاران با استفاده از تکنیک نیمه کمی RT-PCR و ایمونو هیستوشیمی افزایش بیان ژن TGF-β1 را در بیوپسی‌های اپی‌تلیالی افراد سیگاری و افراد مبتلا به بیماری انسداد مزمن ریه (COPD) نشان دادند (۳۹).

نتیجه‌گیری

مطابق با نتایج مطالعات ذکرشده که نشان‌دهنده افزایش میزانبیان ژن و پروتئین TGF-β1 و TGF-β2 در مصدومین شیمیائی می‌باشد، در مطالعه ما نیز مشخص شد که میزان رونوشت‌های TGF-β1 mRNA و TGF-β2 در سلول‌های فیبروبلاست جداسازی شده از بیوپسی‌های ریه مصدومین افزایش می‌یابد. این مطالعات نشان می‌دهد که TGF-β علاوه بر نقش بسیار مهمی که در بیماری‌های ریه دارد در بیماری ریوی مصدومین نیز دخالت دارد و این سیتوکین را می‌توان به عنوان هدف بالقوه‌ای برای درمان با مواد ضد سیتوکین درنظر گرفت.

[Downloaded from ijwph.ir on 2026-10-07]

منابع

1- Balali-Mood M, et al. Chronic health effects of sulphur mustard exposure with special reference to Iranian veterans. Emerging Health Threats Journal, 2008.

2. Kehe K and Szinicz L, Medical aspects of sulphur mustard poisoning toxicology. 2005. 214(3): p. 198-209

3. Nourani MR, Yazdani S, Habibi Roudkenar M, Ebrahimi M, Halabian R, Mirbagheri L, Ghanei M and Imani Fooladi A A. HO1 mRNA and Protein do not Change in Parallel in Bronchial Biopsies of Patients after long term exposure to Sulfur Mustard. Gene Regulation and Systems Biology, 2010, 4, 83–90.

4. Nourani MR, Majid Ebrahimi, Mehryar Habibi Roudkenar, Ensieh Vahedi , Mostafa Ghanei, Abbas Ali Imani Fooladi. Sulfur Mustard Induces the Expression of Metallothionein-1A in Human Airway Epithelial Cells. International Journal of General Medicine 2011 (under press)

5. Ghanei M, et al. Effect of gamma interferon on lung function of mustard gas exposed patients, after 15 years. Pulm Pharmacol Ther. 2006; 19(2):148–53.

6. Aghanouri R, et al, Fibrogenic cytokine levels in bronchoalveolar lavage aspirates 15 years after exposure to sulfur mustard. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2004, 287(6): p. L1160-4.

7. Khateri S, et al, Incidence of lung, eye and skin lesions as late complications in 34,000 Iranians with wartime exposure to mustard agent. J Occup Environ Med, 2003. 45(11): p. 1136-43.

8. Blobe, G.C., W.P. Schiemann, and H.F. Lodish, Role of transforming growth factor beta in human disease. N Engl J Med, 2000. 342(18): p. 1350-8.

9. Bassols, A. and J. Massague, Transforming growth factor beta regulates the expression and structure of extracellular matrix chondroitin/dermatan sulfate proteoglycans. J.Biol. Chem, 1988. 263: p. 3039-3045.

10. Sanford, L., I. Ormsby, and A.G.-d. Groot, TGF-β2 knockout mice have multiple developmental defects that are nonoverlapping with other TGF-β knockout phenotypes. Development 1997. 124: p. 2659-70.

11. Moore B, Murphy RF, Agrawal DK. Interaction of tgf-βeta with immune cells in airway disease. Curr Mol Med. 2008;8(5):427-36

12. Hudon C, Turcotte H, Laviolette M, Carrier G, Boulet LP. Characteristics of bronchial asthma with incomplete reversibility of airflow obstruction. Ann Allergy Asthma Immunol 1997; 78:195-202.

13. Brewster CEP, Howarth PH, Djukanovic R, Wison J, Holgate ST, Roche WR. Myofibroblasts and subepithelial fibrosis in asthma. Am J Respir Cell Mol Biol 1990; 3:507-11.

14. Christina C. Lewis, et al. Airway fibroblasts exhibit a synthetic phenotype in severe asthma. Journal of Allergy and Clinical Immunology. Volume 115, Issue 3, Pages 534-540, 2005.

15. Phan SH. Fibroblast phenotypes in pulmonary fibrosis. Am J Respir Cell
Mol Biol 2003; 29:S87–S92

16. Ihn H, Yamane K, Kubo M, Tamaki K. Blockade of endogenous transforming growth factor signaling prevents up-regulated collagen synthesis in scleroderma fibroblasts: association with increased expression of transforming growth factor _ receptors. Arthritis Rheum 2001;44:474–480

17. Phan SH. The myofibroblast in pulmonary fibrosis. Chest 2002; 122:286S–289S.

18. Bergeron C, Tulic M.K, Hamid Q, Tools used to measure airway remodeling in research. Eur Respir J 2007; 29: 596-604.

19. Claudia L, Henemyre-Harris CL, Adkins AL, Chuang AH, Graham JS. Addition of Epidermal Growth Factor Improves the Rate of Sulfur Mustard Wound Healing in an In Vitro Model. Eplasty, 2008 Mar 26; 8:e16.

20. Ghanei M et al, Tracheobronchomalacia and air trapping following mustard gas exposure. Am J Respir Crit Care Med, 2006. 173: p. 304-309.

21. Ghanei M, et al, Bronchiolitis obliterans following exposure to sulfur mustard: chest high resolution computed tomography. Eur J Radiol, 2004. 52(2): p. 164-9.

22. Ghanei M, et al, High Resolution Computerized Tomography of Chest in Patients Exposed to Sulfur Mustard. Iran. J. Radiol, 2003.

23. Beheshti J, Marka E J, Akbaei H M H, Aslani J, Ghanei M, Mustard lung secrets: Long term clinicopathological study following mustard gas exposure. Pathology. Research and Practice, 202: pp. 739–744 2006.

24. Naghibi MR, Sulfur mustard intoxication, oxidative stress, and antioxidants. Mil. Med. Jul; 167(7):573-5 2002 Review.

25. Huber H and Koessler K. The pathology of bronchial asthma. Arch Intern Med 30: 689–760, 1922.

26. Brent E. McParland,1 Peter T. Macklem,2 and Peter D. Pare´ 1 Airway Hyperresponsiveness: From Molecules to Bedside Invited Review: Airway wall remodeling: friend or foe? J Appl Physiol 95: 426–434, 2003

27. Boxall, C., S.T. Holgate, and D.E. Davies, The contribution of transforming growth factor-b and epidermal growth factor signalling to airway remodelling in chronic asthma. European Respiratory Journal, 2005. 27: p. 208-229.

[Downloaded from ijwph.ir on 2026-10-07]

28. Leask A, Abraham DJ. TGF-beta signaling and the fibrotic response. FASEB J 2004;18:816–827.
29. Bertelli, R., et al., Cell-specific regulation of alpha1 (III) and alpha2 (V) collagen by TGF-beta1 in tubulointerstitial cell models. Nephrol. Dial. Transplant, 1998. 13: p. 573-579.
30. Batra V, Musani AI, Hastie AT, Khurana S, Carpenter KA, Zangrilli JG, Peters SP. Bronchoalveolar lavage fluid concentrations of transforming growth factor (TGF)-beta1, TGF-beta2, interleukin (IL)-4 and IL-13 after segmental allergen challenge and their effects on alpha-smooth muscle actin and collagen III synthesis by primary human lung fibroblasts. Clin Exp Allergy 2004; 34:437–444.
31. Vignola AM, Chanez P, Chiappara G, Merendino A, Pace E, Rizzo A, la Rocca AM, Bellia V, Bonsignore G, Bousquet J. Transforming growth factor-beta expression in mucosal biopsies in asthma and chronic bronchitis. Am J Respir Crit Care Med 1997; 156:591–9.
32. El-Gamel, A., et al., Transforming growth factor beta (TGF-) and obliterative bronchiolitis following pulmonary transplantation - downregulation of TGF-βeta and procollagen I and III gene expression. The Journal of Heart and Lung Transplantation, 1999. 18: p. 828-837
33. Aris, R., et al., Growth factor upregulation during obliterative bronchiolitis in the mouse model. Am J Respir Crit Care Med 2002. 166: p. 417-22.
34. Ramirez, A.M., et al., Smad3 Deficiency Ameliorates Experimental Obliterative Bronchiolitis in a Heterotopic Tracheal Transplantation Model. Am J Pathol, 2004. 165: p. 1223-1232.
35. Coker, R., G. Laurent, and S. Shahzeidi, Diverse cellular TGFâ1 and TGFâ3 gene expression in normal human and murine lung. Eur Respir J, 1996. 9: p. 2501-7.
36. Coker, R.K., et al., Localisation of transforming growth factor beta1 and beta 3 mRNA transcripts in normal and fibrotic human lung. Thorax, 2001. 56: p. 549-556.
37. Anthony, E., et al., Transforming Growth Factorb1 in Asthma. Measurement in Bronchoalveolar Lavage Fluid. Am J Respir Crit Care Med, 1997. 156: p. 642–647.
38. Torrego, A., et al., Expression and activation of TGF-β isoforms in acute allergeninduced remodelling in asthma. Thorax 2007. 62: p. 307-313.
39. Hajime, T., et al., Increased Expression of Transforming Growth Factorb 1 in Small Airway Epithelium from Tobacco Smokers and Patients with Chronic Obstructive Pulmonary Disease (COPD). Am J Respir Crit Care Med, 2001. 163: p. 1476–1483.

[Downloaded from ijwph.ir on 2026-10-07]