

## Original Article

# The Expression Changes of the *Mcl-1* Gene Following Cholestasis and Treatment by Neuroaid in Striatum of Male Rats

Sepehr Torabinejad<sup>1</sup>, Mehrdad Hashemi<sup>2\*</sup>, Mohammad Nasehi<sup>2</sup>

<sup>1</sup>MSC Student in Genetics, Department of Genetics, Faculty of Advanced Sciences, and Technology, Tehran Medical Sciences, Islamic Azad University, Tehran, Iran

<sup>2</sup>Department of Genetics, Faculty of Advanced Sciences, and Technology, Tehran Medical Sciences, Islamic Azad University, Tehran, Iran

\*Corresponding author; E-mail: mhashemi@iautmu.ac.ir

Received: 16 January 2017      Accepted: 9 March 2017      First Published online: 20 May 2019  
Med J Tabriz Uni Med Sciences Health Services. 2019 June-July; 41(2):22-29

## Abstract

**Background:** Cholestasis is a consequence of disordered bile secretion which may change the level of apoptosis through affecting the expression of responsible genes. The present study was planned to investigate the effects of Cholestasis and Neuroaid (a drug which protects and repairs neurons) on the expression of *Mcl-1* gene (anti apoptotic gene) in the male rat's brain (the striatum region).

**Methods:** A total number of 16 rats were divided into four groups as follows: 1- BDL group; the rats which were just operated for bile duct ligation. 2- BDL-Neuroaid group; the rats which received both operation and Neuroaid. 3- Sham-Neuroaid group; the rats which were not operated, but received the operation stress and Neuroaid. 4- Control group; the rats which were not treated at all. Following the treatments, the rats were killed and their striatums were removed from their brains. Afterwards, RNA was extracted from the striatum cells, cDNA was synthesized, and the Real time PCR was performed to measure the gene expression.

**Results:** The *Mcl-1* expression in the BDL group was more than in the control group. It was also four times as much as the *Mcl-1* expression in the BDL-Neuroaid group. The *Mcl-1* expression in the BDL-Neuroaid and Sham-Neuroaid groups was slightly more than in the control group; however, the difference was not statistically significant.

**Conclusion:** Cholestasis causes a large increase in the expression of *Mcl-1* gene in the striatums of rats' brain. Neuroaid can invert this process and decrease the *Mcl-1* expression whilst it has no effects on the *Mcl-1* expression in normal rats.

**Keyword:** Apoptosis, Cholestasis, *Mcl-1* Gene Expression Changes, Neuroaid, Striatum.

**How to cite this article:** Torabinejad S, Hashemi M, Nasehi M. [The Expression Changes of the *Mcl-1* Gene Following Cholestasis and Treatment by Neuroaid in Striatum of Male Rats]. Med J Tabriz Uni Med Sciences Health Services. 2019 June-July; 41(2):22-29. Persian.

## مقاله پژوهشی

تغییرات بیان ژن *Mcl-1* متعاقب کلستاز و تیمار با نورواید در استریاتوم رت‌های نرسپهر ترابی نژاد<sup>۱</sup>، مهرداد هاشمی<sup>۲\*</sup>، محمد ناصحی<sup>۲</sup>

<sup>۱</sup> دانشجوی کارشناسی ارشد ژنتیک، گروه ژنتیک، دانشکده علوم و فن آوری های نوین، علوم پزشکی تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران  
<sup>۲</sup> گروه ژنتیک، دانشکده علوم و فن آوری های نوین، علوم پزشکی تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران  
 \*نویسنده مسئول: ایمیل mhashemi@iautmu.ac.ir

دریافت: ۱۳۹۵/۱۰/۲۷ پذیرش: ۱۳۹۵/۱۲/۱۹ انتشار برخط: ۱۳۹۸/۲/۳۰  
 مجله پزشکی دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی - درمانی تبریز. خرداد و تیر ۱۳۹۸؛ ۴۱(۲): ۲۲-۲۹

## چکیده

**زمینه:** کلستاز، نتیجه اختلال در روند ترشح صفرا است که می‌تواند بر بیان ژن‌های دخیل در آپوپتوز تاثیرگذار باشد. این پژوهش به بررسی اثرات کلستاز و داروی نورواید بر تغییرات بیان ژن آنتی‌آپوپتوتیک *Mcl-1* در ناحیه استریاتوم مغز رت‌های نر پرداخته‌است.

**روش کار:** تعداد ۱۶ سر رت به ۴ گروه BDL، BDL-نورواید، شم-نورواید و کنترل تقسیم شدند. رت‌های گروه BDL تحت جراحی BDL (بستن مجرای صفراوی)، و گروه BDL-نورواید علاوه بر جراحی تحت تیمار با نورواید قرار گرفتند؛ در حالی که حیوانات گروه شم-نورواید فقط استرس جراحی دریافت کرده و با دارو تیمار شدند و گروه کنترل هیچ‌گونه جراحی و تیمار دارویی نداشتند. سپس استریاتوم از مغز رت‌ها خارج شد و پس از طی مراحل استخراج RNA و سنتز cDNA، سطح بیان ژن‌ها توسط تکنیک Real Time PCR مورد بررسی قرار گرفت.

**یافته‌ها:** بیان ژن *Mcl-1* در گروه BDL نسبت به گروه کنترل افزایش یافت. مقایسه گروه‌های BDL و BDL-نورواید نیز نشان داد که بیان این ژن در گروه BDL چهار برابر گروه BDL-نورواید بوده است. ولی بیان این ژن در گروه‌های BDL-نورواید و شم-نورواید نسبت به گروه کنترل تفاوت معنی‌داری را نشان نداد، هر چند مقدار آن در این گروه‌ها اندکی بیش از گروه کنترل بود.

**نتیجه‌گیری:** کلستاز مصنوعی (BDL) باعث افزایش بیان ژن *Mcl-1* در استریاتوم مغز رت‌ها می‌شود. داروی نورواید می‌تواند افزایش بیان ژن *Mcl-1* ناشی از کلستاز را جبران کرده و بیان آن را به حالت عادی بازگرداند، اما تاثیری بر بیان این ژن در رت‌های نرمال نمی‌گذارد.

**کلید واژه‌ها:** آپوپتوز، استریاتوم، تغییرات بیان ژن *Mcl-1* کلستاز، نورواید.

**نحوه استناد به این مقاله:** ترابی نژاد س، هاشمی م، ناصحی م. تغییرات بیان ژن *Mcl-1* متعاقب کلستاز و تیمار با نورواید در استریاتوم رت‌های نر. مجله پزشکی دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی-درمانی تبریز. ۱۳۹۸؛ ۴۱(۲): ۲۲-۲۹

حق تألیف برای مؤلفان محفوظ است.

این مقاله با دسترسی آزاد توسط دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی - درمانی تبریز تحت مجوز کرییتیو کامنز (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0>) منتشر شده که طبق مفاد آن هرگونه استفاده تنها در صورتی مجاز است که به اثر اصلی به نحو مقتضی استناد و ارجاع داده شده باشد.

## مقدمه

تولید و ترشح صفرا یکی از وظایف کبد پستانداران است که گاهی دچار اختلال شده و در نتیجه منجر به وقوع بیماری‌های کبدی می‌شود (۱). انسداد مجرای صفراوی (BDL-Bile Duct Ligation) در حیوانات، مدلی تیپیک برای مطالعه بیماری‌های صفراوی است. BDL منجر به بسته‌شدن کامل مجرای صفراوی شده و نتیجه آن بروز بیماری کبد کلستاتیک می‌باشد (۲). کلستاز نتیجه اختلال در ترشح صفرا است که باعث نگهداری ترکیبات سمی صفراوی در داخل سلول‌ها شده و در صورت عدم درمان، سبب ایجاد فیروز، سیروز و نارسایی کبدی و در نهایت نیاز به پیوند کبدی می‌شود (۱). کلستاز را می‌توان به دو دسته درون کبدی و برون کبدی تقسیم کرد. کلستاز درون کبدی به طور اولیه شامل درگیری مجاری درون کبدی و کانالیکولی صفراوی است، در حالی که کلستاز برون کبدی شامل درگیری مجاری خارجی، مجرای کبدی مشترک و یا مجرای صفراوی مشترک می‌باشد (۳). یکی از تبعات مستقیم آسیب‌های ناشی از تجمع اسیدهای صفراوی، آپوپتوز است که باعث آسیب‌دیدن کبد مبتلایان به کلستاز می‌شود (۴). آپوپتوز معمول‌ترین نوع مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی بوده و بیشترین مطالعات بر روی آن انجام گرفته است. دو مسیر اصلی برای القای آپوپتوز وجود دارد. یکی مسیر خارجی و دیگری مسیر داخلی. مسیر خارجی توسط برهم‌کنش مولکول‌های سیگنالینگ پروآپوپتوتیک با گیرنده‌های سطحی، سبب القای آپوپتوز می‌شود. در گام بعد، فعال‌شدن آبشار کاسپازی سیتوزولی موجب پیشبرد آپوپتوز می‌گردد. در مسیر داخلی، آبشار کاسپازی درون سیتوزول فعال می‌شود. در این مسیر پروتئین‌هایی از اندامک‌های گوناگون مانند میتوکندری، شبکه اندوپلاسمی و جسم‌گلژی آزاد شده و یا این که آپوپتوز توسط بیان ژن‌هایی که پروتئین‌های پروآپوپتوتیک را بیان می‌کنند القا می‌شود (۵). مسیر داخلی آپوپتوز به وسیله اجزای پروتئینی خانواده *Bcl2* تنظیم می‌گردد. این خانواده شامل پروتئین‌های موافق یا مخالف آپوپتوز (پروآپوپتوتیک یا آنتی‌آپوپتوتیک) می‌باشد (۸-۶). یکی از داروهای ضد آپوپتوز نورواید است (۱۰-۹) که در طب سنتی، در مناطقی نظیر چین، جنوب شرق آسیا و خاورمیانه مورد استفاده قرار گرفته است. تحقیقات *Heurteaux* و *Quintard* و همکاران نشان داد که این دارو بر بیمارانی که دچار سکتة مغزی شده‌اند اثرات مفیدی می‌گذارد؛ به خصوص اینکه عوارض پس از سکتة را کاهش می‌دهد. دلیل این اثر، خاصیت محافظت و تکثیر کنندگی نورونی نورواید می‌باشد (۱۲-۱۱). این دارو دارای دو نوع MLC901 و MLC601 می‌باشد (۱۱). MLC601 مرکب از ۹ ترکیب گیاهی و ۵ ترکیب جانوری است؛ در حالی که MLC901 تنها از ترکیبات گیاهی تهیه شده است (۹). با توجه به تاثیر کلستاز و نورواید بر فرایند آپوپتوز، در این پژوهش اثر کلستاز مصنوعی (BDL) و

نورواید (نوع MLC901) بر بیان یک ژن شرکت‌کننده در آپوپتوز (ژن *Mcl-1*) در ناحیه استریاتوم مغز رت‌ها مورد بررسی قرار گرفته است. *Mcl-1* یک ژن آنتی‌آپوپتوتیک است که از طریق جلوگیری از بیان عوامل پروآپوپتوتیک، در جهت جلوگیری از وقوع آپوپتوز فعالیت می‌کند (۱۳).

## روش کار

در این مطالعه از تعداد ۱۶ سر رت نر نژاد ویستار به وزن ۲۲۰ تا ۲۴۰ گرم که از دانشکده فارماکولوژی دانشگاه تهران تهیه شد، استفاده گردید. حیوان‌ها به حیوان‌خانه تحقیقاتی منتقل شده و در هر قفس چهار سر رت قرار داده شد. در طول آزمایش‌ها آب و غذای کافی در اختیار رت‌ها قرار گرفت و هر سه روز یک بار قفس آن‌ها تمیز شد. دما در حیوان‌خانه بین ۲۰ تا ۲۵ درجه سانتی‌گراد متغیر بود. به مدت یک هفته به رت‌ها اجازه داده شد که خود را با شرایط حیوان‌خانه قبل از جراحی وفق بدهند. در طول یک هفته هر روز حیوان‌ها نوازش شدند تا در موقع آزمایش استرس ناشی از گرفتن و کار با آن‌ها وجود نداشته باشد. هر حیوان فقط یک بار استفاده شده و در هر گروه چهار حیوان قرار داده شد. تمام آزمایش‌ها در طول روز انجام شدند. تمامی مراحل آزمایش و کار با حیوانات بر اساس تایید کمیته اخلاق دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم پزشکی تهران انجام شده است. رت‌ها به چهار گروه تقسیم شدند که شامل گروه‌های BDL-نورواید، BDL-شم-نورواید و کنترل می‌باشند. الف) گروه BDL-نورواید: در رت‌های این گروه انسداد مجرای صفراوی ایجاد شده و متحمل دریافت داروی نورواید نیز شدند. ب) گروه BDL: در تمام رت‌های این گروه انسداد مجرای صفراوی ایجاد شد اما هیچ کدام از حیوان‌ها در این گروه دارویی را دریافت نکردند. ج) گروه شم-نورواید: این رت‌ها علاوه بر آن که در معرض استرس جراحی (باز و بسته شدن شکم، بدون مسدود کردن مجرای صفراوی) قرار گرفتند، داروی نورواید را هم دریافت کردند. بنابراین با قرار دادن این گروه، تاثیر استرس ناشی از جراحی به همراه دریافت نورواید مورد بررسی قرار گرفت. د) گروه کنترل: رت‌های این گروه تنها دارای رژیم آب و غذا بوده و هیچ‌گونه تیمار دارویی یا جراحی نداشتند. حیوان‌ها توسط تزریق درون صفاقی کتامین هیدروکلراید ۱۰٪ (۵۰ mg/kg) و زایلزین ۲٪ (۵۰ mg/kg) بیهوش شده، بعد از بیهوشی سطح شکمی حیوان شکافته و با استفاده از نخ بخیه استریل غیرجذبی، دو گره در دو نقطه از مجرای صفراوی مشترک زده شد. حد فاصل بین این دو گره با استفاده از قیچی برش زده شد تا از صحت قطع جریان صفراوی اطمینان حاصل شود. جهت بازگرداندن حیوان به حالت همئوستاتیک و جبران خون از دست رفته و استرس وارده، به مقدار ۱۰۰ واحد انسولین، سرم فیزیولوژی

تک رشته‌ای سنتز شود. در این مطالعه *Mcl-1* و *Gapdh* به ترتیب به عنوان ژن‌های هدف و کنترل داخلی انتخاب شدند. سکانس پرایمر *Gapdh* از مقاله بهروز اقدم و همکاران (۱۵) به دست آمد. سکانس ژن *Mcl-1* از پایگاه‌های اطلاعاتی NCBI و UCSC استخراج شده و سپس با استفاده از این سکانس‌ها و نرم افزار GeneRunner (Version 6.1.23) یک جفت پرایمر جهت انجام واکنش‌های Real time PCR برای این ژن طراحی شد. در ادامه پرایمرهای این دو ژن به وسیله NCBI BLAST و نرم‌افزار GeneRunner (Version 6.1.23) مورد آنالیز قرار گرفتند. آنالیزهای انجام شده نشان‌دهنده عدم همولوژی پرایمرها با مناطق ژنومی و رونوشت‌های دیگر و همچنین عدم ایجاد ساختار دوم در این پرایمرها بود. بنابراین تمامی پرایمرها مورد تایید قرار گرفتند. سکانس این پرایمرها به همراه طول، دمای ذوب و طول قطعه تکثیر شونده در جدول ۱ آورده شده است. غلظت cDNA و پرایمرها جهت واکنش PCR به ترتیب برابر با ۱۵ ng/μl و ۰/۲ pmol/μl بود. در انتها (x, 7.5 μl) Master Mix (RealQ Plus, Applied Biosystems, USA) در حجم ۱۵.۵ μl در چاهک‌های پلیت ۹۶ خانه‌ای دستگاه Applied Biosystems، USA StepOnePlus Real Time PCR Biosystems، USA به یکدیگر اضافه، و در این مرحله طبق پروتکل Master Mix عمل شد. طراحی پلیت به گونه‌ای انجام گرفت که از هر نمونه به صورت دو بار تکرار، جهت افزایش دقت، استفاده شود. جداسازی اولیه در دمای ۹۵ °C به مدت ۱۵ دقیقه و تکثیر در ۴۰ سیکل که شامل جداسازی در دمای ۹۵ °C به مدت ۱۵ ثانیه و مرحله اتصال و تکثیر در دمای ۶۴ °C به مدت ۶۰ ثانیه است صورت گرفت. جهت رسم منحنی‌های استاندارد تکثیر، ابتدا cDNA های گروه کنترل با یکدیگر مخلوط شده و از مخلوط حاصل رقت‌های سری ۷۵ng، ۱۵، ۳ و ۰/۶ تهیه شد. سپس واکنش Real time PCR به صورت دو بار تکرار، برای این رقت‌ها همراه با هر کدام از پرایمرها به صورت جداگانه، انجام گرفت. در پایان، منحنی استاندارد برای هر پرایمر، بر اساس مقادیر Ct به دست آمده در مقابل رقت‌های مورد استفاده رسم گردید. با استفاده از شیب خط منحنی به دست آمده و رابطه  $E = 10^{(-1/slope)} - 1$ ، بازده واکنش برای هر پرایمر محاسبه شد (بازده واکنش = E، شیب خط منحنی = Slope) (۱۶). با استفاده از نرم افزار REST 2009 و رابطه Pfaffl میزان بیان ژن *Mcl-1* در گروه تیمار به گروه کنترل به دست آمد (۱۷). جهت بررسی معنی‌داری نسبت‌های بیان ژن نیز از نرم‌افزار REST 2009 و به منظور تایید نهایی آن از SPSS 19.00 و روش تجزیه واریانس یک طرفه-آزمون توکی (Tukey) استفاده شده و ارزش P کمتر از ۰/۰۵ معنی‌دار در نظر گرفته شد.

به صورت داخل صفاقی به حیوان تزریق گردید. در ادامه هر کدام از حیوان‌ها به صورت جداگانه در قفس‌های پلاستیکی قرار داده شدند تا به سطح هوشیاری کامل برسند. پس از رسیدن رت‌ها به این سطح از هوشیاری، آن‌ها درون قفس‌های اصلی که هر کدام مخصوص نگهداری چهار سر حیوان بود، قرار داده شدند (۱۴). نورواید با دوز mg/ml ۰/۴ (۱۰)، و به ازای هر کیلوگرم وزن حیوان به میزان ۱ml به صورت داخل صفاقی به رت‌ها تزریق شد. تمامی تزریق‌ها از روز بعد از جراحی آغاز و به صورت یک روز در میان تا روز ۲۸ پس از جراحی (۱۴ تزریق) ادامه یافت. یک روز پس از آخرین تزریق رت‌ها با استفاده از کلروفورم بیهوش شده و سر آن‌ها با دستگاه گیوتین جدا گردید. سپس به وسیله قیچی، برش طولی از پوست سر رت داده شد. در ادامه مجموعه از شکاف نخاعی برش خورده و کنار زده شد تا کل مغز استخراج گردد. برای جدا کردن ناحیه استریاتوم، برشی در شیار اول از سمت لوب پیشانی زده شد. سپس برش دیگری از سمت شیار دوم داده شد. بعد از این برش، قشر خارجی مغز، بخش‌های میلین دار و هسته اکومینس با تیغ جراحی جدا شدند تا ناحیه استریاتوم به دست آید. RNA تام توسط تریزول (Qiagen, Germany) از بافت استریاتوم رت‌ها به روش زیر استخراج گردید. ابتدا ۵ mg بافت هموژنایز شده در ۱ ml تریزول حل شد. سپس ۲۰۰ μl کلروفورم به آن اضافه شده و سانتریفیوژ انجام گرفت (با دور ۱۲۰۰۰RPM به مدت ۱۵ دقیقه و در دمای ۴ °C). فاز آبی حاصل از سانتریفیوژ جدا شده و معادل حجمش به آن ایزوپروپانول سرد اضافه گردید. محلول حاصل به مدت ۴۵ دقیقه در دمای ۲۰ °C- انکوبه و مجدداً با شرایط فوق سانتریفیوژ گردید. رسوب بدست آمده که شامل RNA تام بود، سه مرتبه توسط اتانول ۷۰٪ سرد شستشو داده شد. برای هر مرحله شستشو، سانتریفیوژ در دمای ۴ °C و به مدت ۱۰ دقیقه با دور ۱۱۰۰۰RPM انجام شده و محلول رویی دور ریخته شد. به این ترتیب ایزوپروپانول از رسوب RNA حذف گردید. سپس چگالی نوری (A 260/230 و A 260/280) و غلظت RNA های استخراج شده توسط دستگاه نانوفومتر (BioTeck, USA) اندازه‌گیری شد. از RNA های استخراج شده جهت سنتز تک رشته cDNA بهره گرفته شد. برای این کار از کیت سنتز cDNA (SinaClon, Iran) استفاده گردید. مقدار RNA ورودی به کیت ۱۵۰۰ ng و غلظت cDNA ساخته شده برابر با ۷۵ ng/μl بود. جهت ساخت Master سنتز cDNA از 100 μM، (X Buffer M-MuLV (2 μl ۱۰، (0.5 μg/μl، 1 μl M-MuLV Reverse Transcriptase (200 u/μl، dNTP Mix (0.5 μl، (0.5 μl، (0.5 μl، (40 u/μl، (0.5 μl، (0.5 μl، (0.5 μl، (5 μl) DEPC استفاده شد. سپس Master حاصل شده به ۹ μl RNA اضافه شد و داخل ترموسایکلر در دمای ۴۲ °C به مدت یک ساعت و دمای ۸۵ °C به مدت ۵ دقیقه قرار گرفت تا cDNA

قطعات ژنی مورد نظر است. داده‌های به دست آمده از واکنش Real time PCR و آنالیزهای انجام شده، نشان‌دهنده افزایش معنی‌دار بیان ژن *Mcl-1* در گروه BDL نسبت به گروه کنترل ( $P < 0/05$ ) و کاهش معنی‌دار آن در گروه BDL-نورواید نسبت به گروه BDL است ( $P < 0/05$ ). بیان ژن مورد نظر در گروه‌های BDL-نورواید و شم-نورواید نسبت به گروه کنترل تفاوت معنی‌داری ندارد ( $P > 0/05$ ). این نتایج در نمودار شکل ۳ نمایش داده شده‌اند.

داده‌ها به صورت میانگین نسبت بیان ژن در گروه تیمار به گروه کنترل + خطای انحراف از معیار (Mean+SEM) بیان شدند.

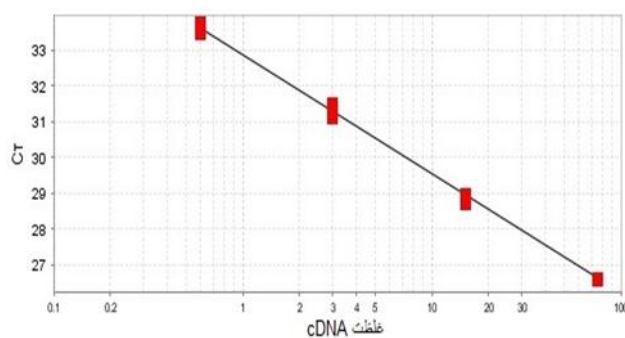
## یافته‌ها

شیب خط منحنی استاندارد برای ژن‌های رفرنس و هدف به ترتیب برابر با  $-3/339$  و  $-3/329$  بود (شکل ۱). بنابراین بازده PCR برای ژن‌های مذکور  $0/99 = E_{Gapdh}$  و  $0/99 = E_{Mcl-1}$  محاسبه شد. (شکل ۲) منحنی‌های ذوب ژن‌های *Mcl-1* و *Gapdh* را نشان می‌دهد. تک قله‌ای بودن هر دو منحنی، بیانگر تکثیر اختصاصی

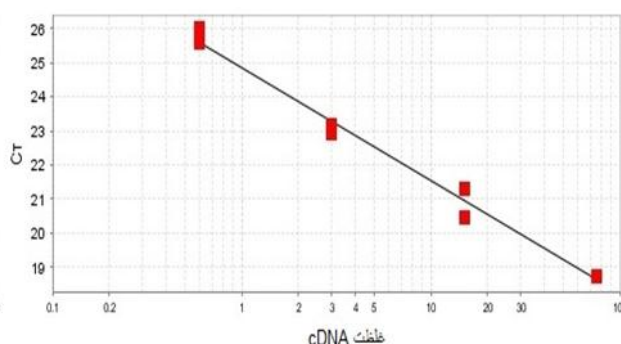
جدول ۱: پرایمرهای ژن‌های مورد نظر

نام ژن	سکانس پرایمر ۵'→۳'	طول قطعه تکثیر شونده	طول پرایمر	دمای ذوب پرایمر
<i>Gapdh</i>	F: AAGTTCAACGGCACAGTCAAGG R: CATACTCAGCACCAGCATCACC	۱۲۱	F۲۲ R۲۲	F۶۱/۵۸ R۶۱/۳۲
<i>Mcl-1</i>	F: CGTAACAAACTGGGGCAGG R: GAAGAACTCCACAAACCCATCC	۱۸۷	F۱۹ R۲۲	F۵۸/۷۵ R۵۹/۱۸

\* پرایمر Forward † پرایمر Revers

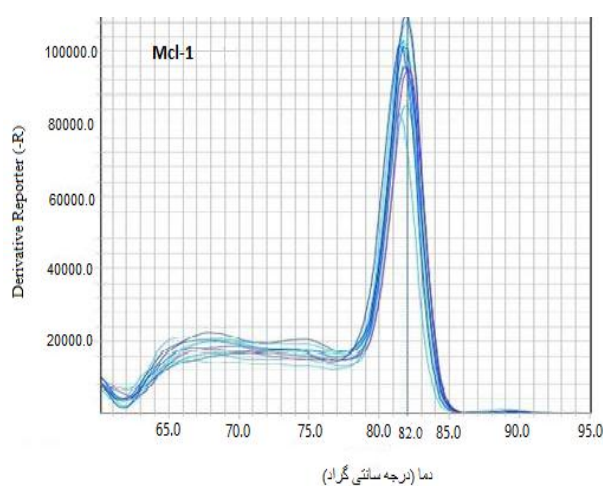


ب

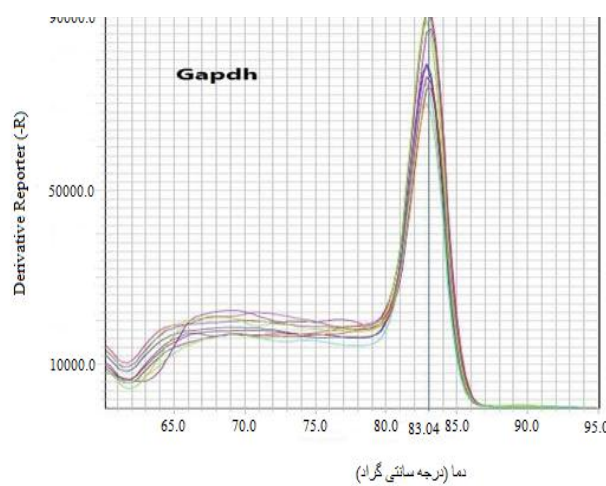


الف

شکل ۱: منحنی‌های استاندارد تکثیر الف) ژن *Gapdh*. شیب خط:  $-3/339$  بازده:  $0/99$  ب) ژن *Mcl-1*. شیب خط:  $-3/329$  بازده: ۱

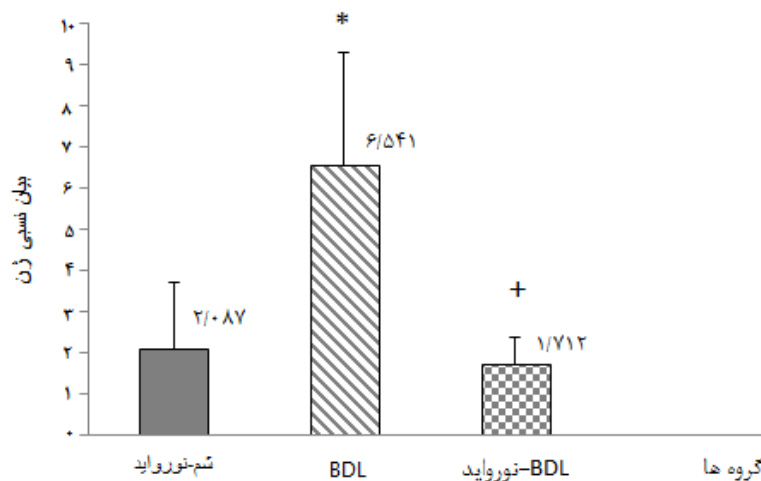


ب



الف

شکل ۲: منحنی‌های ذوب قطعات تکثیر شده الف) ژن *Gapdh* با نقطه ذوب  $83/04^{\circ}\text{C}$  ب) ژن *Mcl-1* با نقطه ذوب  $82^{\circ}\text{C}$



شکل ۳: نمودار بیان نسبی ژن *Mcl-1* در گروه‌های مختلف نسبت به گروه کنترل (\* نشانگر معنی‌داری با گروه کنترل و + نشان‌دهنده معنی‌داری با گروه BDL). هر گروه شامل چهار سر رت بوده و واکنش Real time PCR به صورت دوبار تکرار انجام شده است.

## بحث

حدی کاهش می‌دهد که به میزان نرمال برساند. این در حالی است که نورواید هیچ تاثیری بر بیان این ژن در رت‌های سالم ندارد. این نتایج تنها مربوط به ناحیه استریاتوم مغز رت است و قابل تعمیم به سایر بافت‌ها نمی‌باشد. مطالعات بسیاری به تاثیر عواقب کلستاز (مانند تجمع نیتریک اکساید (۲۷) و اپیوئیدها (۱۹)) بر بیان ژن‌های پروآپوپتوتیک یا آنتی‌آپوپتوتیک پرداخته‌اند. به عنوان مثال Chae و همکاران با مطالعه روی اثر نیتریک اکساید بر بیان ژن‌های *Bax* (پروآپوپتوتیک) و *Bcl2* (آنتی‌آپوپتوتیک) در سلول‌های ماهیچه‌ای صاف رت‌ها دریافتند که نسبت *Bax/Bcl2* در این سلول‌ها افزایش یافته است (۲۸). Hayashi و همکاران در پژوهشی تاثیر افزایش بلند مدت اپیوئیدها را بر آپوپتوز نورون‌ها مورد بررسی قرار دادند. این بررسی حاکی از افزایش پروتئین *Bax* و کاهش پروتئین *Bcl2* بود (۲۹). در رابطه با تاثیر داروی نورواید نیز می‌توان به مطالعه تحقیقاتی Quintard و همکاران و همچنین Heurteaux و همکاران اشاره کرد. هر دو مطالعه نشان‌دهنده کاهش بیان ژن *Bax* در نورون‌های رت‌های ایسکمیک بودند که تحت تیمار با نورواید قرار داشته‌اند (۹). با وجود آن که تحقیقات متعددی در رابطه با تاثیر کلستاز و نورواید بر بیان برخی از ژن‌های آپوپتوتیک وجود دارد؛ اما به غیر از مطالعه حاضر، تنها یک پژوهش نشان‌دهنده وجود ارتباط بین کلستاز و بیان ژن *Mcl-1* می‌باشد. یافته‌های Kahraman و همکاران نشان داد که افزایش بیان ژن *Mcl-1* در موش‌ها قادر است عوارض ناشی از کلستاز را کاهش دهد (۳۰). اگرچه که هر دوی ژن‌های *Mcl-1* و *Bcl2* آنتی‌آپوپتوتیک هستند؛ اما الزاماً نمی‌توان انتظار داشت که نتایج بیان ژن *Mcl-1* نیز مشابه *Bcl2* باشد؛ همان‌طور که در مقایسه نتایج این مطالعه با مطالعات دیگر، تاثیر کلستاز بر بیان این دو ژن کاملاً عکس هم مشاهده شد.

تحقیقات نشان داده‌اند که کلستاز قادر است باعث آسیب به بافت مغزی (۱۸)، ایجاد سمیت در کلیه (۱۹) و القای آپوپتوز در اندام‌هایی همچون قلب موش (۲۰)، کبد رت (۲۱) و موش (۲۲) و نیز کبد در افراد مبتلا به کلستاز شود (۲۳). آسیب ناشی از کلستاز به مغز و سیستم عصبی مرکزی، حیات و کیفیت زندگی بیمار را تحت تاثیرات جدی قرار می‌دهد. استریاتوم بخشی از عقده‌های قاعده‌ای مغز می‌باشد و به عنوان ساختاری برای ورودی داده‌ها به این بخش از مغز شناخته شده و در کنترل فعالیت‌های حرکتی و ادراک نقش ایفا می‌کند (۲۴). همچنین این بخش به همراه سایر نواحی عقده‌های قاعده‌ای در یادگیری چگونگی انتخاب فعالیت‌هایی که منجر به خروجی‌های پاداش می‌شوند، مشارکت می‌کند (۲۵). لذا اگر تحت تاثیر کلستاز دچار اختلال شود، عوارض شدیدی را به همراه خواهد داشت. مطالعه حاضر به منظور بررسی اثرات کلستاز بر ناحیه استریاتوم مغز رت طراحی شد. از آنجا که کلستاز موجب آپوپتوز می‌شود، برای بررسی تاثیر آن بر ناحیه استریاتوم، تفاوت بیان ژن آنتی‌آپوپتوتیک *MCL-1* در ناحیه استریاتوم رت‌های سالم و رت‌های BDL اندازه‌گیری و مورد مقایسه قرار گرفت. *MCL-1* با ممانعت از پیام‌رسانی یون کلسیم با میتوکندری و جلوگیری از آزاد شدن سیتوکروم c نهایتاً مانع وقوع آپوپتوز از طریق مسیر داخلی آن می‌شود (۲۶). همچنین با توجه به مطالبی که قبلاً گفته شد، چون داروی نورواید دارای خاصیت ترمیم آسیب‌های وارده بر نورون‌هاست و می‌تواند موجب تکثیر آن‌ها شود، پس تاثیر تیمار رت‌های بیمار و سالم با داروی نورواید بر بیان این ژن نیز هدف دیگر این مطالعه بود. نتایج حاصل از این پژوهش نشان می‌دهند که BDL بیان ژن *Mcl-1* را افزایش داده و داروی نورواید بیان آن را در رت‌های BDL تا

### قدردانی

این مقاله حاصل بخشی از پایان نامه کارشناسی ارشد (کد ۱۳۶۳۰۵۰۳۹۴۲۰۰۹) انجام شده در دانشگاه آزاد اسلامی واحد پزشکی تهران می باشد. نویسندگان از معاونت پژوهشی دانشگاه مذکور تشکر می نمایند.

### ملاحظات اخلاقی

پروتکل این مطالعه در کمیته اخلاق پزشکی دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم پزشکی تهران به شماره مرجع ۱۳۶۳۰۵۰۳۹۴۲۰۰۹ به تایید رسیده است.

### منابع مالی

هزینه‌های این پروژه وابسته به هیچ سازمانی نبوده است.

### منافع متقابل

نویسندگان منافع متقابلی از تالیف یا انتشار این مقاله ندارند.

### مشارکت مولفان

س ت، م ه و همکاران، طراحی، اجرا و تحلیل نتایج مطالعه را بر عهده داشته و همچنین مقاله را تالیف نموده و نسخه نهایی آن را خوانده و تایید کرده‌اند.

این اختلاف اثر را علاوه بر تفاوت ژن‌ها، می‌توان به متفاوت بودن نوع بافت‌های مورد مطالعه نیز نسبت داد. با توجه به اینکه تاکنون هیچ پژوهشی تاثیر نورواید را بر بیان ژن *Bcl2* بررسی نکرده است، پس نمی‌توان در رابطه با تاثیر نورواید بر بیان دو ژن *Mcl-1* و *Bcl2* مقایسه‌ای انجام داد.

### نتیجه‌گیری

بر اساس نتایج این مطالعه، BDL باعث افزایش بیان ژن *Mcl-1* در ناحیه استریاتوم مغز رت می‌شود و داروی نورواید می‌تواند این تغییر را خنثی نموده و بیان ژن *Mcl-1* را در رت‌های BDL کاهش دهد. به طوری که بیان ژن *Mcl-1* در رت‌های BDL که دارو دریافت کرده بودند با گروه کنترل تفاوتی نداشت. از سوی دیگر نتایج نشان دادند که نورواید نمی‌تواند بیان ژن *Mcl-1* در رت‌های سالم را تغییر دهد. از آن‌جا که در وقوع آپوپتوز، برآیند بیان تمامی ژن‌های آپوپتوتیک تعیین‌کننده می‌باشد، بنابراین نمی‌توان تنها بر اساس بیان یک یا چند ژن موثر در آپوپتوز درباره سرنوشت آن نتیجه‌گیری کرد. با توجه به این موضوع، پیشنهاد می‌شود در تحقیقات آینده جهت تعیین وقوع یا عدم وقوع آپوپتوز بیان تعداد بیشتری از ژن‌های آپوپتوتیک مورد بررسی قرار گیرد و با نتایج تحقیق حاضر مقایسه گردد.

## References

- Ghonem N S, Assis D N, Boyer J L. Fibrates and cholestasis. *Hepatology* 2015; **62**(2): 635-643. doi: 10.1002/hep.27744.
- Saleh H, Soliman A M, Mohamed A S, Marie M A. Antioxidant Effect of Sepia Ink Extract on Extrahepatic Cholestasis Induced by Bile Duct Ligation in Rats. *Biomed Environ Sci* 2015; **28**(8): 582-594. doi: 10.3967/bes2015.082.
- Nguyen K D, Sundaram V, Ayoub W S. Atypical causes of cholestasis. *World J Gastroenterol* 2014; **20**(28): 9418-9426. doi: 10.3748/wjg.v20.i28.9418.
- Castro R E, Rodrigues C M. Cell Death and microRNAs in Cholestatic Liver Diseases: Update on Potential Therapeutic Applications. *Curr Drug Targets* 2015; **18**(8): 921-931.
- Savitskaya M A, Onishchenko G E. Mechanisms of Apoptosis. *Biochemistry (Mosc)* 2015; **80**(11): 1393-1417. doi: 10.1134/S0006297915110012.
- Renault T T, Chipuk J E. Death upon a kiss: mitochondrial outer membrane composition and organelle communication govern sensitivity to *BAK/BAX*-dependent apoptosis. *Chem Biol* 2014; **21**(1): 114-123. doi: 10.1016/j.chembiol.2013.10.009.
- Westphal D, Dewson G, Czabotar P E, Kluck R M. Molecular biology of *Bax* and *Bak* activation and action. *Biochim Biophys Acta* 2011; **1813**(4): 521-531. doi: 10.1016/j.bbamcr.2010.12.019.
- Khazaei Koohpar Z, Entezari M, Movafagh A, Hashemi M. Anticancer Activity of Curcumin on Human Breast Adenocarcinoma: Role of *Mcl-1* Gene. *Iranian Journal of Cancer Prevention* 2015; **8**(3): e2331. doi: 10.17795/ijcp2331.
- Quintard H, Borsotto M, Veyssiere J, Gandin C, Labbal F, Widmann C, et al. MLC901, a traditional Chinese medicine protects the brain against global ischemia. *Neuropharmacology* 2011; **61**(4): 622-631. doi: 10.1016/j.neuropharm.2011.05.003.
- Tsai M C, Chang C P, Peng S W, Jhuang K S, Fang Y H, Lin M T, et al. Therapeutic efficacy of Neuro Aid (MLC 601), a traditional Chinese medicine, in experimental traumatic brain injury. *J Neuroimmune Pharmacol* 2015; **10**(1): 45-54. doi: 10.1007/s11481-014-9570-0.
- Heurteaux C, Gandin C, Borsotto M, Widmann C, Brau F, Lhuillier M, et al. Neuroprotective and neuroproliferative activities of NeuroAid (MLC601, MLC901), a Chinese medicine, in vitro and in vivo. *Neuropharmacology* 2010; **58**(7): 987-1001. doi: 10.1016/j.neuropharm.2010.01.001.

12. Quintard H, Lorivel T, Gandin C, Lazdunski M, Heurteaux C. MLC901, a Traditional Chinese Medicine induces neuroprotective and neuro-regenerative benefits after traumatic brain injury in rats. *Neuroscience* 2014; **277**: 72-86. doi: 10.1016/j.neuroscience.2014.06.047.
13. Craig R W. MCL1 provides a window on the role of the *BCL2* family in cell proliferation, differentiation and tumorigenesis. *Leukemia* 2002; **16**(4): 444-454. doi: 10.1038/sj.leu.2402416.
14. Reza Zarrindast M, Eslimi Esfahani D, Oryan S, Nasehi M, Torabi Nami M. Effects of dopamine receptor agonist and antagonists on cholestasis-induced anxiolytic-like behaviors in rats. *Eur J Pharmacol* 2013; **702**(1-3): 25-31. doi: 10.1016/j.ejphar.2013.01.023.
15. Behroozaghdam M, Hashemi M, Javadi G, Mahdian R, Soleimani M. Expression of *bax* and *bcl2* Genes in MDMA-induced Hepatotoxicity on Rat Liver Using Quantitative Real-Time PCR Method through Triggering Programmed Cell Death. *Iran Red Crescent Med J* 2015; **17**(11): e24609. doi: 10.5812/ircmj.24609.
16. Hashemi M. The Study of Pentoxifylline Drug Effects on Renal Apoptosis and *BCL-2* Gene Expression Changes Following Ischemic Reperfusion Injury in Rat. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research: IJPR* 2014; **13**(1): 181-189.
17. Fraga D, Meulia T, Fenster S. Real-time PCR. *Current Protocols Essential Laboratory Techniques* 2008; **10**(3): 1-3. doi: 10.1002/9780470089941.et1003s00.
18. Zarrindast M R, Hoseindoost S, Nasehi M. Possible interaction between opioidergic and cholinergic systems of CA1 in cholestasis-induced amnesia in mice. *Behav Brain Res* 2012; **228**(1): 116-124. doi: 10.1016/j.bbr.2011.11.039.
19. Deroee A F, Nezami B G, Mehr S E, Hosseini R, Salmasi A H, Talab S S, et al. Cholestasis induced nephrotoxicity: the role of endogenous opioids. *Life Sci* 2010; **86**(13-14): 488-492. doi: 10.1016/j.lfs.2010.02.005.
20. Shafaroodi H, Ebrahimi F, Moezi L, Hashemi M, Doostar Y, Ghasemi M, et al. Cholestasis induces apoptosis in mice cardiac cells: the possible role of nitric oxide and oxidative stress. *Liver Int* 2010; **30**(6): 898-905. doi: 10.1111/j.1478-3231.2010.02249.x.
21. Tiao M M, Lin T K, Chen J B, Liou C W, Wang P W, Huang C C, et al. Dexamethasone decreases cholestatic liver injury via inhibition of intrinsic pathway with simultaneous enhancement of mitochondrial biogenesis. *Steroids* 2011; **76**(7): 660-666. doi: 10.1016/j.steroids.2011.03.002.
22. Bird M A, Lange P A, Schrum L W, Grisham J W, Rippe R A, Behrns K E. Cholestasis induces murine hepatocyte apoptosis and DNA synthesis with preservation of the immediate-early gene response. *Surgery* 2002; **131**(5): 556-563.
23. Ersoy A O, Kirbas A, Ozler S, Ersoy E, Ozgu-Erdinc AS, Ergin M, et al. Maternal and fetal serum levels of caspase-cleaved fragments of cytokeratin-18 in intrahepatic cholestasis of pregnancy. *J Matern Fetal Neonatal Med* 2016; **29**(4): 562-566. doi: 10.3109/14767058.2015.1011116.
24. Tewari A, Jog R, Jog M S. The Striatum and Subthalamic Nucleus as Independent and Collaborative Structures in Motor Control. *Front Syst Neurosci* 2016; **10**: 17. doi: 10.3389/fnsys.2016.00017.
25. Wendler E, Gaspar J C, Ferreira T L, Barbiero J K, Andreatini R, Vital M A, et al. The roles of the nucleus accumbens core, dorsomedial striatum, and dorsolateral striatum in learning: performance and extinction of Pavlovian fear-conditioned responses and instrumental avoidance responses. *Neurobiol Learn Mem* 2014; **109**: 27-36. doi: 10.1016/j.nlm.2013.11.009.
26. Beilke L D, Aleksunes L M, Olson E R, Besselsen D G, Klaassen C D, Dvorak K, et al. Decreased apoptosis during CAR-mediated hepatoprotection against lithocholic acid-induced liver injury in mice. *Toxicology letters* 2009; **188**(1): 38-44. doi: 10.1016/j.toxlet.2009.03.005.
27. Mani A R, Nahavandi A, Moosavi M, Safarinejad R, Dehpour A R. Dual nitric oxide mechanisms of cholestasis-induced bradycardia in the rat. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2002; **29**(10): 905-908.
28. Chae I H, Park K W, Kim H S, Oh B H. Nitric oxide-induced apoptosis is mediated by *Bax/Bcl-2* gene expression, transition of cytochrome c, and activation of caspase-3 in rat vascular smooth muscle cells. *Clin Chim Acta* 2004; **341**(1-2): 83-91. doi: 10.1016/j.cccn.2003.11.009.
29. Hayashi H, Naoi S, Hirose Y, Matsuzaka Y, Tanikawa K, Igarashi K, et al. Successful treatment with 4-phenylbutyrate in a patient with benign recurrent intrahepatic cholestasis type 2 refractory to biliary drainage and bilirubin absorption. *Hepatol Res* 2016; **46**(2): 192-200. doi: 10.1111/hepr.12561.
30. Kahraman A, Mott J L, Bronk S F, Werneburg N W, Barreyro F J, Guicciardi M E, et al. Overexpression of *mcl-1* attenuates liver injury and fibrosis in the bile duct-ligated mouse. *Dig Dis Sci* 2009; **54**(9): 1908-1917. doi: 10.1007/s10620-008-0583-5.