The Journal of Qazvin Univ. of Med. Sci.
Vol. 10, No. 4, Winter 2007

مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی قزوین
سال دهم، شماره ۴ (پی‌درپی ۴۱)، زمستان ۱۳۸۵

بررسی اتصال پرولاکتین نشان‌دار شده با مولکول فلوئورسین ایزوتیوسیانات به گیرنده پرولاکتین از طریق فلوسیتومتری

دکتر مجید سیرتی ثابت* دکتر فاطمه کرمی تهرانی**

Evaluation of binding of FITC-prolactin conjugate to prolactin receptor

M Sirati Sabet✡ F Karami Tehrani

دریافت : ۸۴/۹/۱۹ پذیرش : ۸۵/۷/۱۰

✱Abstract

Background: Prolactin is an important mammalian hormone and the associated receptor is recognized in many different cells. Radioligand and histochemical methods are both used for assaying prolactin receptor.

Objective: To produce FITC-prolactin conjugate and also to study the ability of conjugate to bind prolactin receptor.

Methods: In this experimental study FITC was bound to prolactin in alkaline solution. FITC-prolactin conjugate was separated from free FITC by chromatographic method. Later, the ability of FITC-prolactin conjugate to bind prolactin receptor of peripheral blood mononuclear cells (PBMC) was assessed by flowcytometry.

Findings: Fluorescence emission was detected in 2.1% of the cells in absence of FITC-prolactin. Following the addition of FITC-prolactin conjugate to cells for one hour and further washing, the fluorescence emission was detected in 27.8% of cells. For PBMC, these data were 0.02% and 11.8%, respectively.

Conclusion: Regarding the data obtained in our study, FITC-prolactin conjugate can bind prolactin receptor. Therefore, this conjugate could be used for assessing prolactin receptor by fluorometric method.

Keywords: Prolactin, Prolactin Receptor, FITC, Peripheral Blood Mononuclear Cells, Prolactin Conjugate, Flowcytometry

✱ چکیده

زمینه : پرولاکتین یکی از هورمون‌های مهم پستانداران است که گیرنده آن در بسیاری از سلول‌ها تشخیص داده شده است. برای سنجش گیرنده پرولاکتین از دو روش رادیولیگاند و بافت شیمیایی استفاده می‌شود.

هدف : مطالعه به منظور تولید کنژوگه FITC- پرولاکتین و ارزیابی توانایی اتصال این کنژوگه به گیرنده پرولاکتین انجام شد.

مواد و روش‌ها : در این مطالعه تجربی FITC در محیط قلیایی به پرولاکتین متصل شد. کنژوگه FITC- پرولاکتین به روش کروماتوگرافی از FITC آزاد جدا شد. توانایی اتصال کنژوگه FITC- پرولاکتین به گیرنده پرولاکتین سلول‌های تک‌هسته‌ای خون محیطی (PMBC) به وسیله روش فلوسیتومتری ارزیابی شد.

یافته‌ها : در غیاب FITC- پرولاکتین ۲/۱٪ از سلول‌ها دارای نشر فلوئورسانس بودند. بعد از افزودن FITC- پرولاکتین به سلول‌ها به مدت یک ساعت و شستشوی سلول‌ها، ۲۷/۸٪ از سلول‌ها نشر فلوئورسانس داشتند. این مقادیر برای PMBC به ترتیب ۰/۰۲٪ و ۱۱/۸٪ بود.

نتیجه‌گیری : با توجه به یافته‌ها کنژوگه FITC- پرولاکتین می‌تواند به گیرنده پرولاکتین متصل شود. لذا از این کنژوگه می‌توان جهت بررسی گیرنده پرولاکتین به روش فلوئورومتری استفاده نمود.

کلیدواژه‌ها : پرولاکتین، گیرنده پرولاکتین، مولکول فلوئورسین ایزوتیوسیانات، سلول‌های تک‌هسته‌ای خون محیطی، کنژوگه پرولاکتین، فلوسیتومتری

* استادیار بیوشیمی دانشگاه علوم پزشکی قزوین ** دانشیار بیوشیمی دانشگاه تربیت مدرس
آدرس مکاتبه : قزوین، دانشگاه علوم پزشکی، بخش بیوشیمی، تلفن ۳۳۳۶۰۰۱-۰۲۸۱
✡E.mail: sirati_m@Yahoo.com

Downloaded from journal.qums.ac.ir at 21:21 +0430 on Monday April 22nd 2019

Downloaded from journal.qums.ac.ir at 21:21 +0430 on Monday April 22nd 2019

*** مقدمه :**

در سال‌های اخیر تحقیقات چشمگیری در ارتباط با نقش و عملکرد هورمون پرولاکتین انجام شده است.[۱و۲و۳] این مطالعه‌ها دیدگاه‌های جدیدی را در مورد این هورمون به خصوص نقش اتوکرینی و پاراکرینی پرولاکتین در بافت پستان و نیز مشارکت پرولاکتین در تعدیل فعالیت سیستم ایمنی مطرح نموده‌اند.[۴و۵و۶]

اولین مرحله در عملکرد هورمون پرولاکتین، اتصال آن به گیرنده ویژه خود است که گیرنده‌ای غشایی است.[۷و۸] تاکنون گیرنده‌های مختلف غشایی پرولاکتین شناسایی و شبیه‌سازی شده‌اند.[۹و۱۰و۱۱]

روش معمول سنجش گیرنده پرولاکتین استفاده از اتصال رادیولیگاند یا روش ایمونوهیستوشیمی با استفاده از آنتی‌بادی منوکلونال است.[۱۲و۱۳] با توجه به مشکلات کار با رادیولیگاند استفاده از روش‌های دیگر جهت سنجش گیرنده پرولاکتین مطرح شده است. یکی از روش‌های حساس که می توان برای این سنجش از آن بهره گرفت روش فلوئورومتری است.

به طور معمول در روش فلوئورومتری از آنتی‌بادی منوکلونال استفاده می‌شود. ولی با توجه به هزینه بالای تهیه آنتی‌بادی منوکلونال می‌توان از مولکول پرولاکتین جهت اتصال به گیرنده پرولاکتین استفاده کرد. بدین منظور باید مولکولی که دارای خاصیت فلوئورسانس باشد به عنوان ردیاب فلوئورسانس به پرولاکتین متصل شود. یکی از ردیاب‌های فلوئورسانس مولکول فلوئورسین ایزوتیوسیانات (FITC) است که در طول موج حدود ۴۹۵ نانومتر جذب حداکثر دارد و طول موج نشر آن حدود ۵۲۰ نانومتر است. این مولکول در محیط قلیایی به گروه آمین موجود در پپتیدها متصل می‌شود و آنها را نشان‌دار می‌کند.[۱۴]

این مطالعه به منظور تولید کنژوگه FITC- پرولاکتین و ارزیابی توانایی اتصال این کنژوگه به گیرنده پرولاکتین انجام شد.

*** مواد و روش‌ها :**

این مطالعه تجربی در سال ۱۳۷۸ در گروه بیوشیمی بالینی دانشگاه تربیت مدرس انجام شد. تمام مواد شیمیایی مورد استفاده از نوع خالص بود که از شرکت سیگما و مرک تهیه شدند.

جهت اتصال FITC به پرولاکتین به یک ویال ۱/۵ میلی‌لیتری، ۰/۵ میلی‌لیتر محلول ۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر پرولاکتین (۰/۰۲۲ میکرومول) و ۰/۵ میلی‌لیتر محلول ۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر FITC (۱/۲ میکرومول) به صورت متناوب در تاریکی اضافه شد. هر دو محلول در بافر کربنات ۵۰ میلی‌مولار با pH برابر ۹/۵ تهیه شدند. محتویات ویال به مدت یک شب در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت.[۱۴]

برای جداسازی مولکول‌های FITC واکنش نداده از کنژوگه FITC- پرولاکتین از کروماتوگرافی ژل فیلتراسیون به وسیله ژل سفادکس G25 با سرعت جریان ۱۴ میلی‌لیتر بر ساعت استفاده شد. جهت شستشوی ستون از بافر فسفات ۵۰ میلی‌مولار با pH برابر ۷/۴ استفاده شد. میزان جذب نوری اجزای خارج شده از ستون در طول موج ۲۸۰ و ۴۹۵ نانومتر اندازه‌گیری شد.

برای تهیه سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی (PMBC) ۵ میلی‌لیتر از خون دارای ماده ضد انعقاد در لوله سانتریفوژ ریخته شد و به آرامی ۲ میلی‌لیتر فایکول به آن اضافه و سپس محتویات لوله به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفوژ شد. با استفاده از پیپت پاستور به آرامی سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی که به صورت لایه‌ای کدر رنگ بین پلاسما و فایکول قرار می‌گیرند جدا شدند. سوسپانسیون حاصل سانتریفوژ شد. محلول رویی دور ریخته شد و سلول‌های راسب شده در یک میلی‌لیتر محیط کشت RPMI1640 به حالت سوسپانسیون درآمدند. سوسپانسیون حاصل سانتریفوژ شد و سلول‌های راسب شده در مقدار کمی محیط کشت RPMI1640 حل شد. با استفاده از لام نئوبار تعداد سلول‌ها شمارش شد.[۱۵]

برای فلوسیتومتری به ویال‌های مخصوص فلوسیتومتری ۱۰۰ میکرولیتر از سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی اضافه شد که دارای حدود ۳۰۰۰۰۰ سلول بودند. ویال‌های شاهد فقط حاوی سلول بودند و به ویال‌های دیگر ۱۰ میکرولیتر FITC- پرولاکتین اضافه شد. ویال‌ها به آرامی مخلوط و به مدت یک ساعت در تاریکی قرار گرفتند. سپس ویال‌ها سانتریفوژ شده و

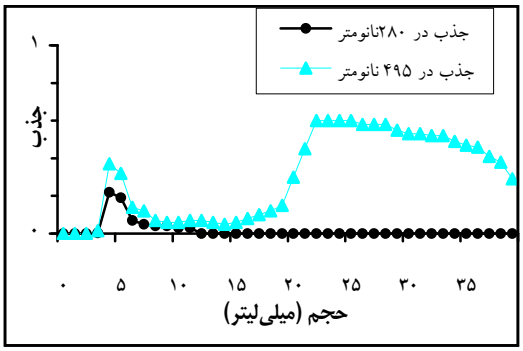
Downloaded from journal.qums.ac.ir at 21:21 +0430 on Monday April 22nd 2019

محلول رویی به آرامی خالی شد، سلول‌های راسب شده در یک میلی‌لیتر بافر فسفات ـ سالین (PBS) به صورت سوسپانسیون درآمدند. بعد از تنظیم دستگاه فلوسیتومتری (FACSCaliburBD) سوسپانسیون حاصل وارد دستگاه و جمعیت سلولی و شدت فلوئورسانس بررسی شد. از نرم‌افزار CellQuest جهت تجزیه و تحلیل یافته‌های دستگاه فلوسیتومتر استفاده شد. طول موج تحریک مولکول‌های FITC ۴۸۸ نانومتر بود و میزان نشر توسط فیلتر (FL1) در محدوده ۳۰±۵۳۰ نانومتر بررسی شد.

*** یافته‌ها :**

بررسی میزان جذب نور در طول موج‌های ۲۸۰ و ۴۹۵ نانومتر نشان داد که اولین پیک خارج شده از ستون کروماتوگرافی متعلق به FITC- پرولاکتین است (نمودار شماره ۱).

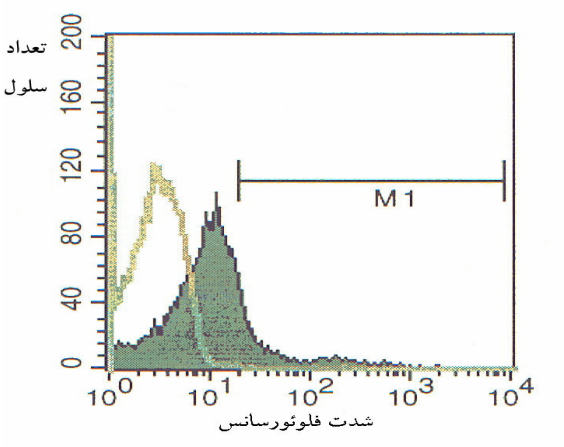
نمودار ۱- جداسازی کنژوگه FITC- پرولاکتین با استفاده از روش کروماتوگرافی غربالی توسط ژل سفادکس G25



هنگامی که سلول‌ها به عنوان شاهد وارد دستگاه فلوسیتومتری شدند از بیست هزار سلول مورد بررسی، ۴۲۲ سلول دارای فلوئورسانس در ناحیه M1 بودند که معادل ۲/۱۱ درصد کل سلول‌ها بود. بعد از یک ساعت نگه‌داری سلول‌ها با کنژوگه FITC- پرولاکتین وقتی که سلول‌ها شسته شده وارد دستگاه فلوسیتومتری شدند از بیست هزار سلول مورد بررسی ۵۵۲۷ سلول دارای فلوئورسانس در ناحیه مورد نظر بودند که معادل ۲۷/۸ درصد کل سلول‌ها بود.

برای بررسی دقیق‌تر با استفاده از منحنی پراش جانبی (SSC) / پراش مستقیم (FSC) که جهت تعیین گرانولیستی سلول‌ها و حدود اندازه سلولی به کار می‌رود، محدوده مناسب انتخاب شد. از ۱۵۰۳۵سلول مورد بررسی در این ناحیه سه سلول که ۰/۰۲ درصد را تشکیل می‌دهند در نمونه شاهد دارای فلوئورسانس در ناحیه M1 بودند. در مورد نمونه انکوبه شده با FITC- پرولاکتین این مقدار ۱۱/۸ درصد بود(نمودار شماره ۲).

نمودار ۲- میزان شدت فلوئورسانس (FL1-H) سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی در غیاب کنژوگه FITC – پرولاکتین (منحنی روشن) و در حضور کنژوگه FITC – پرولاکتین (منحنی تیره)



*** بحث و نتیجه‌گیری :**

نتایج این مطالعه بیان‌گر توانایی اتصال کنژوگه تهیه شده به گیرنده پرولاکتین بود و می‌توان اظهار داشت که شرایط واکنش و اتصال FITC به مولکول پرولاکتین تأثیری در اتصال پرولاکتین به گیرنده پرولاکتین نداشت.

در این مطالعه جهت بررسی توانایی اتصال کنژوگه FITC- پرولاکتین تهیه شده به گیرنده پرولاکتین از روش فلوسیتومتری استفاده شد. با توجه به محدودیت

Downloaded from journal.qums.ac.ir at 21:21 +0430 on Monday April 22nd 2019

دستگاه فلوسیتومتری در به کارگیری سلول‌های مختلف از نظر اندازه و مجزا بودن سلول‌ها، از سلول‌های تک‌هسته‌ای خون محیطی که دارای گیرنده پرولاکتین هستند استفاده شد.[۱۵]

برای ارزیابی گیرنده پرولاکتین به وسیله خاصیت نشر فلوئورسانس باید مولکولی که دارای خاصیت فلوئورسانس باشد به پرولاکتین متصل شود. به این جهت در این تحقیق از مولکول فلوئورسین ایزوتیوسیانات (FITC) استفاده شد. با توجه به روش اتصال FITC به مولکول‌های ایمونوگلوبین G (IgG) و فاکتور رشد اپیتلیال (EGF)، شیوه مناسبی تهیه شد که در آن نسبت مولی FITC به پرولاکتین پنجاه و چهار برابر است.[۱۴و۱۶و۱۷]

با توجه به نتایج این تحقیق و راحتی تهیه این کنژوگه و هزینه کم آن در مقایسه با کنژوگه آنتی‌بادی منوکلونال، می‌توان از FITC- پرولاکتین برای شناسایی گیرنده پرولاکتین در روش ایمونوهیستوشیمی استفاده کرد. به هنگام استفاده از کنژوگه آنتی‌بادی منوکلونال فقط میزان گیرنده تام پرولاکتین اندازه‌گیری می‌شود، در حالی که به هنگام استفاده از کنژوگه FITC- پرولاکتین هم میزان گیرنده آزاد و هم مقدار گیرنده تام پرولاکتین را می‌توان اندازه‌گیری نمود.[۱۸] همچنین با استفاده از این روش می‌توان از طریق فلوسیتومتری اطلاعات دقیق‌تری در مورد سلول‌های دارای گیرنده پرولاکتین و اثر شرایط مختلف روی میزان گیرنده پرولاکتین و تمایل آن به پرولاکتین به دست آورد.

پیشنهاد می‌شود با توجه به اهمیت پرولاکتین و گیرنده آن در ارزیابی سلول‌های سرطان پستان این شیوه سنجش گیرنده پرولاکتین با روش اتصال رادیو لیگاند مقایسه شود.

* سپاسگزاری :

بدین وسیله از خانم دکتر فرزانه آشتیانی برای انجام آزمایش‌های فلوسیتومتری قدردانی می‌شود.

* مراجع :

1. Ben-Jonathan N, Mershon JL, Allen DL, Steinmetz R. Extrapituitary prolactin: distribution, regulation, function, and clinical aspects. Endocr Rev 1996; 17(6): 639-69

2. Bole-Feysot C, Gooffin V, Edery M, Binart N, Kelly P. Prolactin and its receptor. Endocr Rev 1998; 19(3): 225-68

3. Clevenger CV, Furth PA, Hankinson SE, Schuler LA. The role of prolactin in mammary carcinoma. Endocr Rev 2003; 24(1): 1-27

4. Clevenger CV, Freier DO, Kline JB. Prolactin receptor signal transduction in cells of the immune system. J Endocrinol 1998; 157: 187-97

5. Ginsburg E, Vonderhaar BK. Prolactin synthesis and secretion by human breast cancer cells. Cancer Res 1995; 55: 2591-5

6. Reynolds C, Montone KT, Powell CM, Tomaszewski JE, Clevenger CV. Expression of prolactin and its receptor in human breast carcinoma. Endocrinol 1997; 138: 5555-60

7. Guillaumot P, Cohen H. Hetrogeneity of the prolactin receptor in the rat mammary gland and liver during various physiological states. J Endocrinol 1994; 141: 271-8

8. Okamura H, Raguet S, Bell A, Gagnon J, Kelly PA. Purification and protein sequence analysis of rat liver prolactin receptor. J Biol Chem 1989; 264(10): 5904-11

9. Kline JB, Rycyzyn MA, Clevenger CV. Characterization of a novel and functional human prolactin receptor isoform (ΔS1PRLr) containing only one extracellular fibronectin-like domain. Mol Endocrinol 2002; 16(10): 2310-22

10. Hu ZZ, Meng J, Dufau ML. Isolation and characterization of two novel forms of the

Downloaded from journal.qums.ac.ir at 21:21 +0430 on Monday April 22nd 2019

human prolactin receptor generated by alternative splicing of a newly identified exon 11. J Biol Chem 2001; 276(44): 41086-94

11. Meng J, Tasi-Morris CH, Dufau ML. Human prolactin receptor variants in breast cancer. Cancer Res 2004; 64: 5677-82

12. Clevenger CV, Chang WP, Ngo W, Pasha TL, Montone KT, Tomaszewski JE. Expression of prolactin and prolactin receptor in human breast carcinoma: evidence for an autocrine/ paracrine loop. Am J Pathol 1995; 146: 695-705

13. Shiu RP, Kelly PA, Friesen HG. Radioreceptor assay for prolactin and lactogenic hormones. Science 1973; 180: 968-70

14. Weir DM. Handbook of experimental immumology. NewYork, Blackwell Scientific Publications, 1990, 1-8

15. Leite-de-Moraes MC, Touraine P, Kelly PA, Kuttenn F, Dardenne M. Prolactin receptor expression in lymphocytes from patients with hyperprolactinemia or acromegaly. J Endocri 1995; 147: 353-9

16. Carraway KL, Koland JG, Cerione RA. Visualization of epidermal growth factor (EGF) receptor aggregation in plasma membranes by fluorescence resonance energy transfer, correlation of receptor activation with aggregation. J Biol Chem 1989; 264: 8699-707

17. Carraway KL. Loctation of the epidermal growth factor binding site on the EGF receptor. Biochem 1990; 29: 8741-7

18. Kelly PA, Leblanc G, Djiane J. Estimation of total prolactin-binding sites after in vitro desaturation. Endocrinol 1979; 104: 1631-8