

آمیزه مناسبی از اکتینیدین میوه کیوی و تریپسین برای جداسازی و کشت سلول‌های اندوتلیال آنورت موش صحرایی

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۸۸/۱۱/۰۳ تاریخ پذیرش: ۱۳۸۹/۰۱/۱۷

چکیده

زمینه و هدف: آنزیم‌های پروتئولیتیک، خصوصاً کلاژنازها برای هضم ماتریکس خارج سلولی، جداسازی سلول‌ها و کشت اولیه مورد استفاده قرار می‌گیرند. با توجه به مشکلات تخلیص و مقدار کم کلاژنازها در منابع باکتریایی یا جانوری، یافتن منابع جدید و کم هزینه این آنزیم‌ها اهمیت دارد. به همین جهت در این مطالعه اکتینیدین که فراوان‌ترین پروتئین میوه کیوی است، تخلیص شد و مخلوط مناسبی از آن و تریپسین برای جداسازی سلول‌های اندوتلیال آنورت موش صحرایی به کار رفت. **روش بررسی:** سلول‌های اندوتلیال آنورت با استفاده از محلول هضمی شامل غلظت‌های متفاوت اکتینیدین (دو تا ۱۶ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) و تریپسین (۰/۳، ۰/۶، ۱/۲ و ۲/۴ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) در زمان‌های مختلف (۱۵ تا ۹۰ دقیقه) جدا شدند و در محیط کشت DMEM کشت داده شدند. سلول‌های جدا شده به واسطه خصوصیات مورفولوژیک و رنگ‌آمیزی ایمونوسیتوشیمی شناسایی شدند و درصد بقا به کمک آزمون تریپان بلو تخمین زده شد. **یافته‌ها:** اکتینیدین در غلظت ۱۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر به همراه تریپسین با غلظت ۱/۲ میلی‌گرم در میلی‌لیتر به مدت ۶۰ دقیقه توانست سلول‌های اندوتلیال آنورت موش صحرایی را جدا کند. درصد بقای سلول‌های ذکر شده در این شرایط ۹۰٪ تخمین زده شد. خصوصیات مورفولوژیک و ایمونوسیتوشیمی ماهیت سلول‌های جدا شده به عنوان سلول‌های اندوتلیال را تأیید نمود. **نتیجه‌گیری:** یافته‌ها نشان داد که مخلوط بهینه اکتینیدین و تریپسین اثرات سمی محسوس بر سلول‌های جدا شده نداشته و گزینه‌ای مناسب و جدید برای جداسازی سلول‌های اندوتلیال آنورت موش صحرایی است.

کلمات کلیدی: اکتینیدین، تریپسین، سلول‌های اندوتلیال، آنورت، موش صحرایی، کلاژناز.

مهوش حصاری^۱، کامران منصوری^۲
علی مصطفایی^{۳*}، علی بیدمشکی پور^۴

۱- کارشناس ارشد بیولوژی سلولی ملکولی

۲- کارشناس ارشد هماتولوژی

۳- گروه ایمونولوژی

مرکز تحقیقات بیولوژی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه

۴- گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه رازی کرمانشاه

* نویسنده مسئول: کرمانشاه، مرکز تحقیقات بیولوژی

پزشکی، سرخه لیزه، صندوق پستی: ۱۵۶۸

تلفن: ۰۸۳۱-۴۲۷۶۲۳۳

email: amostafaie@kums.ac.ir

مقدمه

زیادی دارند.^۵ در نتیجه این ناهمگونی، طراحی مدل‌های آزمایشگاهی واقعی‌تر در محیط آزمایشگاهی نیازمند جداسازی و کشت سلول‌های اندوتلیال از انواع بافت‌ها است.^۶ تکنیک‌های کشت سلول‌های اندوتلیال در محیط آزمایشگاهی و بررسی جزئیات عملکرد این سلول‌ها از سال ۱۹۷۰ گسترش یافت.^{۷-۹} کشت سلول‌های اندوتلیال شرایط را برای مطالعه مکانیسم‌های خاص سلولی و ملکولی، فیزیولوژی، پاتوفیزیولوژی، فارماکولوژی و آنژیوژنز مهیا می‌سازد. سلول‌های اندوتلیال آنورت موش صحرایی یک مدل آزمایشگاهی مناسب برای مقایسه با محیط درون تن می‌باشد. این سلول‌ها به عنوان مدلی برای مطالعه آترواسکلروزیس و محصولات سنتز شده توسط اندوتلیوم مورد استفاده قرار می‌گیرند.^{۱۰} همچنین از این سلول‌ها برای بررسی اثرات نوسانات سطوح گلوکز خون بر عملکرد سلول‌های

سیاهرگ‌ها، سرخرگ‌ها و مویرگ‌ها توسط یک لایه سلولی به نام سلول‌های اندوتلیال (Endothelial cells) مفروش می‌شوند که ارتباط بافت‌ها و خون را به عهده دارند. این سلول‌ها در حفظ هموستاز بدن، تبادل مواد، نفوذ پذیری عروق و تنظیم اعمال مهمی همچون آنژیوژنز و فشار خون نقش کلیدی دارند.^{۱-۳} به علاوه سلول‌های اندوتلیال دارای اعمال حیاتی ترشحی، تولیدی، متابولیک و ایمونولوژیک هستند.^۴ سلول‌های اندوتلیال عروق اعضای مختلف بدن و حتی نواحی متفاوت یک عضو دارای عملکردهای متفاوتی هستند. به عنوان مثال سلول‌های اندوتلیال سیاهرگ و سرخرگ از نظر پتانسیل میتوزی، تمایل به لایه زیری (Substratum)، ذخیره لیپید در سیتوپلاسم، حساسیت نسبت به روش‌های آزمایشگاهی و قابلیت بقا تفاوت‌های

تخلیص نمود. با توجه به پیچیده بودن مراحل تخلیص و مقادیر کم کلاژنازها از منابع باکتریایی یا جانوری، اکتینیدین به تنهایی یا همراه سایر پروتئازها گزینه مناسبی برای جداسازی انواع مختلف سلولها است. به همین جهت در مطالعه حاضر برای اولین بار مخلوط بهینه‌ای از آنزیم اکتینیدین و تریپسین که یک سرین پروتئاز حیوانی شناخته شده است، برای جداسازی و کشت سلولهای اندوتلیال آئورت موش صحرائی به کار رفت.

روش بررسی

این مطالعه تجربی بین سالهای ۱۳۸۸-۱۳۸۷ در مرکز تحقیقات بیولوژی پزشکی کرمانشاه انجام گردید. مواد مورد استفاده شامل DTT، استرپتومایسین و پنی سیلین (شرکت اپلیکم، آلمان)، کلاژناز نوع IV، EDTA، تریپسین، آنتی‌بادی ضد فاکتور ون ویلبراند از خرگوش (Anti-von-willebrand factor from rabbit)، آنتی‌بادی ضد IgG خرگوش کونزوگه با آنزیم پراکسیداز (Goat anti-rabbit IgG-HRP) و سویسترای دی آمینونیزیدین (شرکت سیگما، آمریکا)، محیط کشت DMEM، محلول ۰/۴ درصد تریپان بلو و سرم جنین گاو (FCS) (شرکت گیپکو، هلند)، محلول پنج درصد اسید سولفوریک، بافر فسفات نمکی (PBS)، محلول ثبوت (متانول- استون به نسبت ۳:۱)، سیستین و پراکسید هیدروژن (شرکت مرک، آلمان)، DEAE سفارز (شرکت فارماسیا، آمریکا) بودند. موش‌های صحرائی مورد استفاده در این تحقیق شامل ۴۰ سر موش سفید نژاد ویستار (Wistar) با وزن ۲۵۰-۲۰۰ گرم بودند که از موسسه تحقیقاتی سرم‌سازی رازی کرج تهیه و در حیوان خانه دانشکده داروسازی دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه نگهداری شدند.

تخلیص اکتینیدین: اکتینیدین براساس روش Boland و Hardman با بعضی تغییرات از میوه کیوی خالص شد.^{۲۵} به‌طور خلاصه بخش آنزیمی توسط سولفات آمونیوم ۶۰٪ اشباع از عصاره کیوی جدا و در ستون تعویض یون ستون DEAE سفارز خالص گردید.

سنجش خلوص و غلظت پروتیین: غلظت پروتیین با روش Bradford و با استفاده از آلبومین سرم گاوی به‌عنوان استاندارد تخمین زده شد.^{۲۶} بررسی خلوص آنزیم به‌دست آمده با روش الکتروفورز در ژل پلی اکریل آمید (SDS-PAGE) بر اساس روش لاملی انجام شد.

اندوتلیال آئورت و مکانیسم اثرات آن در محیط کشت استفاده می‌شود.^{۱۱} بنابراین باید به‌دنبال روش‌های کار آمد و مؤثری برای جداسازی و کشت سلولهای اندوتلیال از انواع رگ‌ها بود که این سلولها بتوانند در محیط آزمایشگاهی خواص عملکردی همانند سلولهای اندوتلیال در شرایط درون تن داشته باشند. لازمه جداسازی سلولها از بافت‌های مختلف، تجزیه ماتریکس خارج سلولی است که شامل پروتیین‌های رشته‌ای مختلف، گلیکوپروتیین‌ها و پروتئوگلیکانها است. کلاژن‌ها به عنوان فراوان‌ترین پروتیین‌های ماتریکس خارج سلولی، گروهی ناهمگونی از پروتیین‌ها هستند. تقریباً ۲۷ نوع کلاژن وجود دارد که بر اساس ساختار و اندازه زنجیره آلفا و توزیع بافتی تقسیم شده‌اند.^{۱۲} اجزای اصلی دیواره آئورت شامل انواعی از کلاژن، سلولهای عضلانی صاف و رشته‌های الاستین است.^{۱۳} کلاژن‌های عمده‌ای که در دیواره آئورت حضور دارند از نوع I و III هستند.^{۱۴} فیبرهای کلاژن داربستی را برای اتصال سلولها فراهم کرده و شکل بافت‌ها را حفظ می‌کنند.^{۱۵} به‌علاوه، خصوصیات الاستیک اغلب بافت‌ها از جمله عروق خونی بزرگ به جهت حضور رشته‌های الاستیک در فضای خارج سلولی است. کلاژنازها تنها آنزیم‌هایی هستند که قادرند پیوندهای پپتیدی را در نواحی ماریچ‌های سه تایی کلاژن برش دهند.^{۱۶،۱۷} کلاژنازهای شناخته‌شده عبارتند از (۱) کلاژنازهای باکتریایی که معمولاً هر زنجیره پلی پپتیدی کلاژن را در چندین جایگاه برش می‌دهند، و (۲) کلاژنازهای مهره داران که یک برش در جایگاه ویژه‌ای از هر سه زنجیره آلفا ایجاد می‌کنند.^{۱۸} اکتینیدین یک سیستمین پروتئاز گیاهی است که متعلق به خانواده پاپائین از تیول پروتئازها است. این آنزیم در سال ۱۹۵۹ برای اولین بار توسط Arcus معرفی گردید.^{۱۹} در چند مطالعه به هدف بررسی فعالیت کلاژنازی این آنزیم، اثرات هیدرولازی اکتینیدین بر اشکالی از کلاژن گزارش شده است.^{۲۰-۲۲} برای مثال، Morimoto گزارش کرد که آتلوکلاژن (کلاژن هیدرولیزشده با پپسین) سویسترای برای اکتینیدین در شرایط اسیدی است.^{۲۲} Mostafaie نشان داد که اکتینیدین قادر است کلاژن‌های نوع I و II را در شرایط بافری بازی ضعیف و خشی هیدرولیز کند^{۲۳} و انتخاب مناسبی برای جداسازی و کشت سلولهای اندوتلیال از بند ناف انسان، هپاتوسیت‌ها از کبد و سلولهای اپیتلیال تیموسی از موش صحرائی است.^{۲۳،۲۴} اکتینیدین را می‌توان در مقادیر بالا با روشی ساده و کم‌هزینه از میوه کیوی جدا و

تا ۹۰ دقیقه قرار گرفت و در انکوباتور ۳۷ درجه در حال به هم خوردن نگهداری شد. در زمان‌های مختلف نمونه در زیر میکروسکوپ معکوس بررسی شد. در نهایت هضم متوقف، قطعات آنورت خارج و نمونه به مدت سه دقیقه در ۳۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد و رسوب سلولی بررسی گردید.

بررسی اثر مخلوط اکتینیدین و تریپسین: روند ذکر شده در بالا تکرار شد و قطعات آنورت به دست آمده تحت تأثیر محلول هضمی حاوی غلظت‌های متغیری از آنزیم اکتینیدین (دو تا ۱۶ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) و آنزیم تریپسین با غلظت‌های ۰/۳، ۰/۶، ۱/۲ و ۲/۴ میلی‌گرم در میلی‌لیتر و زمان‌های ۱۵ تا ۹۰ دقیقه در انکوباتور ۳۷ درجه در حال به هم خوردن نگهداری شد و در زمان‌های مختلف نمونه در زیر میکروسکوپ معکوس بررسی شد. پس از طی زمان انکوباسیون، هضم متوقف شد و مخلوط سلولی به مدت سه دقیقه در ۳۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد. رسوب در محیط کشت DMEM حاوی ۲۰٪ FCS، پنی سیلین (۱۰۰ واحد در میلی‌لیتر) و استرپتومایسین (۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر) به حالت تعلیق در آمده و در پلیت چهار خانه پوشیده از کلاژن کشت داده شده و در انکوباتور ۳۷ درجه با ۵٪ CO₂ و ۹۵٪ O₂ نگهداری شد.

شناسایی سلول‌های اندوتلیال جدا شده از آنورت موش صحرائی: برای شناسایی سلول‌های اندوتلیال از شواهد مورفولوژیک و رنگ‌آمیزی اختصاصی ایمونوسیتوشیمیایی کمک گرفته شد. روش ایمونوسیتوشیمیایی براساس تشخیص فاکتور ون ویلبراند در سلول‌های اندوتلیال بود. برای این کار سلول‌ها به کمک محلول متانول-استن (به نسبت ۳:۱) در کف میکرو پلیت تثبیت شدند. سپس به کمک آنتی‌بادی اولیه (آنتی‌بادی علیه فاکتور ون ویلبراند تهیه شده در خرگوش) با رقت ۱/۱۰۰۰ و آنتی‌بادی ثانویه (آنتی‌بادی بزنی علیه IgG خرگوش کونژوگه با پراکسیداز) با رقت ۱/۵۰۰ و سوبسترای دی آمینو بنزیدین و پراکسید هیدروژن، وجود فاکتور ون ویلبراند در این سلول‌ها مورد ارزیابی قرار گرفت.

ارزیابی میزان بقا: سلول‌های جدا شده با PBS شستشو داده شدند و مجدداً در این بافر به حالت تعلیق درآوردند. ۵۰ میکرولیتر از محلول تریپان بلو با ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون سلولی مخلوط و دو دقیقه در دمای اتاق نگهداری شد سپس مخلوط سلولی برای سنجیدن درصد بقای سلول‌ها مطابق با فرمول مربوطه مورد ارزیابی قرار گرفت.

تعیین فعالیت آنزیم اکتینیدین: فعالیت آنزیم اکتینیدین به روش Boland و Hardman تعیین شد.^{۲۵} برای این کار فعالیت آنزیم در غلظت ۵۰ نانومولار در حضور سوبسترای صنایعی N- α -Cbz-L-Lys P-Nitrophenyl Ester با غلظت ۳۰۰ میکرومولار در بافر فسفات سدیم ۲۰ میلی‌مولار (pH=۶/۵) در حضور EDTA یک میلی‌مولار و دمای ۲۵ °C اندازه‌گیری شد.

جداسازی و کشت سلول‌های اندوتلیال آنورت موش صحرائی: برای افزایش فعالیت آنزیم اکتینیدین به آن ۴mM EDTA، دی تیو تریتول (DTT) ۲mM و سیستین ۰/۴mM اضافه شد و pH در محدوده ۷/۲-۷/۴ تنظیم شد. ابتدا حیوان با استفاده از اتر بیهوش شد، سپس قفسه‌سینه باز شد و آنورت خارج گردید. پس از چند بار شستشو با بافر فسفات نمکی (PBS)، ادونتین به کمک پنس جدا گردید. به کمک تیغ جراحی یک برش طولی در آنورت ایجاد گردید و آنورت به قطعات ۲-۱ میلی‌متری بریده شد. هضم آنزیمی در شرایط مختلف صورت گرفت. بدین ترتیب که ابتدا اثر کلاژناز نوع IV با غلظت چهار میلی‌گرم در میلی‌لیتر همراه با تریپسین با غلظت ۱/۲ میلی‌گرم در میلی‌لیتر مطابق روش Blose^۵ با پاره‌ای تغییرات انجام شد. سپس اثر اکتینیدین و تریپسین هریک به‌تنهایی مورد بررسی قرار گرفت و بعد از آن اثر مخلوط اکتینیدین و تریپسین در جداسازی سلول‌های اندوتلیال آنورت بررسی شد.

بررسی اثر آنزیم اکتینیدین: قطعات آنورت در غلظت‌های مختلف آنزیم اکتینیدین (۱۶-۲ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) و زمان‌های مختلف ۱۵ تا ۹۰ دقیقه در انکوباتور ۳۷ درجه در حال به هم خوردن نگهداری شدند. در زمان‌های مختلف نمونه در زیر میکروسکوپ معکوس بررسی شد. در نهایت هضم متوقف شد و قطعات آنورت خارج شد. نمونه به مدت سه دقیقه در ۳۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد. رسوب سلولی در محیط کشت DMEM حاوی ۲۰٪ FCS، پنی سیلین (۱۰۰ واحد در میلی‌لیتر) و استرپتومایسین (۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر) به حالت تعلیق در آمده و در پلیت چهار خانه پوشیده از کلاژن کشت داده شده و در انکوباتور ۳۷ درجه با ۵٪ CO₂ و ۹۵٪ O₂ نگهداری شد.

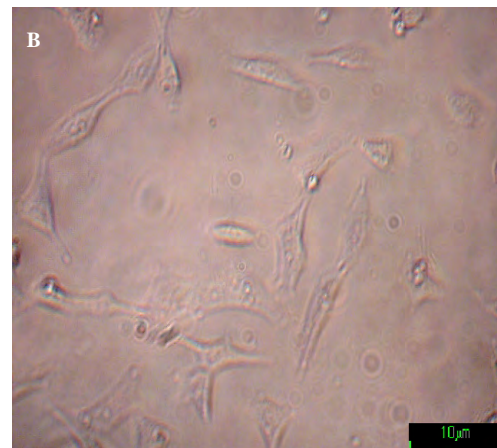
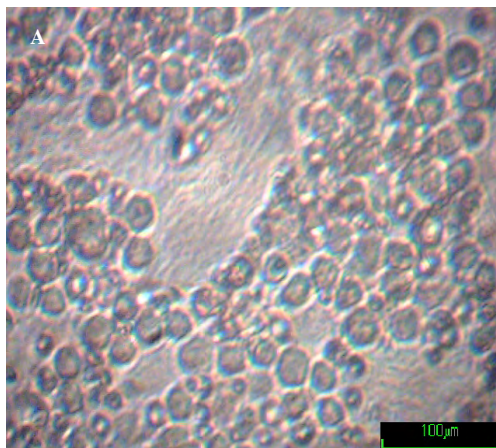
بررسی اثر آنزیم تریپسین: روند ذکر شده در بالا تکرار شد و قطعات آنورت به دست آمده تحت تأثیر آنزیم تریپسین با غلظت‌های ۰/۳، ۰/۶، ۱/۲ و ۲/۴ میلی‌گرم در میلی‌لیتر در زمان‌های مختلف ۱۵

یافته‌ها

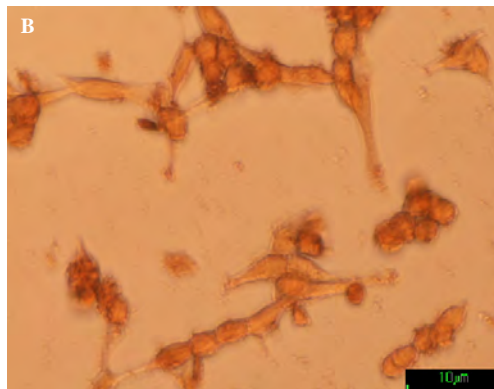
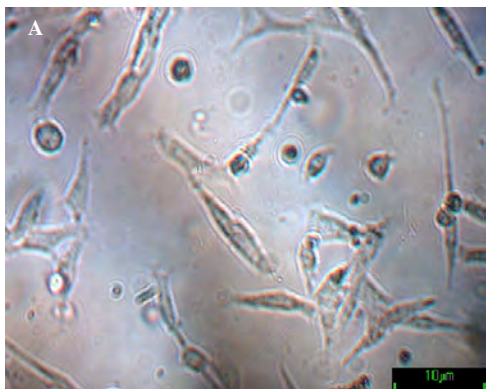
سلول‌های اندوتلیال مورد استفاده قرار گرفت. در بررسی اثر مخلوط آنزیم اکتینیدین و تریپسین نتایج نشان داد که غلظت ۱۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر آنزیم اکتینیدین همراه با غلظت ۱/۲ میلی‌گرم در میلی‌لیتر تریپسین در مدت ۶۰ دقیقه قادر است، سلول‌های اندوتلیال آنورت را با حداقل آلودگی با دیگر جمعیت‌های سلولی جدا کند. با توجه به نتایج حاصل از شمارش سلول، درصد بقای سلول‌های جدا شده در شرایط ذکر شده ۹۰ درصد تخمین زده شد. مرفولوژی سلول‌های جدا شده در زیر میکروسکوپ معکوس بررسی شد. این سلول‌ها ابتدا در محیط کشت به صورت شناور بودند. در اواخر روز اول به تدریج ته‌نشین شدند و تعدادی از آن‌ها به کف پلیت چسبیدند (شکل ۱ قسمت A).

در روز دوم و سوم سلول‌های زنده و سالم ظاهری دوکی شکل پیدا کردند و اتصال خود به کف پلیت را محکم‌تر ساختند (شکل ۱ قسمت B و شکل ۲ قسمت A). رنگ‌آمیزی ایمونوسیتوشیمیایی بر روی سلول‌های جدا شده و چسبیده به کف میکروپلیت پس از تثبیت سلول‌ها با محلول متانول، استن انجام شد. نتایج نشان داد که سلول‌های چسبیده به کف میکروپلیت از نظر وجود فاکتور ون ویلبراند مثبت هستند و پس از افزودن سوبسترای پراکسیداز به چاهک‌ها، رنگ قهوه‌ای به خود می‌گیرند که مؤید وجود سلول‌های اندوتلیال است (شکل ۲ قسمت B). نتایج حاصل از رنگ‌آمیزی ایمونوسیتوشیمیایی نشان داد که سلول‌های جدا شده از درصد خلوص بالای ۹۰ درصد برخوردار هستند.

در بررسی اثر آنزیم کلاژناز و تریپسین مشخص شد که آنزیم کلاژناز با غلظت چهار میلی‌گرم در میلی‌لیتر همراه با تریپسین با غلظت ۱/۲ میلی‌گرم در میلی‌لیتر قادر است در مدت زمان ۹۰ دقیقه سلول‌های اندوتلیال را جدا کند. درصد بقای سلول‌های جدا شده ۹۰ درصد محاسبه گردید. برای یافتن غلظت مناسب آنزیم پروتئاز و زمان لازم برای جداسازی سلول‌های اندوتلیال آنورت موش صحرایی، غلظت‌های مختلف آنزیم اکتینیدین از ۱۶-۲ میلی‌گرم در میلی‌لیتر و زمان‌های مختلف از ۱۵ تا ۹۰ دقیقه مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که در غلظت‌های کمتر از ۱۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر از آنزیم اکتینیدین تعداد سلول‌های جدا شده بسیار کم هستند و در غلظت‌های بالای ۱۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر میزان بقای سلول‌ها کمتر از ۸۰ درصد است. در رابطه با اثر آنزیم تریپسین با غلظت‌های ۰/۳، ۰/۶، ۱/۲ و ۲/۴ میلی‌گرم در میلی‌لیتر در زمان‌های مختلف ۱۵ تا ۹۰ دقیقه، سوسپانسیون هضمی در زیر میکروسکوپ معکوس بررسی شد. در این شرایط ظاهراً سلولی جدا نشده بود. این سوسپانسیون سانتریفیوژ شد ولی رسوبی در بر نداشت. با توجه به نتایج به دست آمده در این دو آزمون که بیانگر ضعیف بودن عملکرد آنزیم اکتینیدین در غلظت‌های کمتر از ۱۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر و عدم توانایی تریپسین با غلظت‌های ذکر شده در جداسازی سلول‌های اندوتلیال آنورت بود، ترکیبی از این دو آنزیم برای جداسازی



شکل-۱: مورفولوژی سلول‌های اندوتلیال آنورت موش صحرایی جدا شده با مخلوط آنزیم اکتینیدین و تریپسین A: چهار ساعت پس از جداسازی (میکروسکوپ معکوس با بزرگ‌نمایی $\times 100$) و B: ۲۴ ساعت پس از جداسازی (میکروسکوپ معکوس با بزرگ‌نمایی $\times 400$)



شکل-۲: مورفولوژی سلول‌های اندوتلیال آئورت موش صحرایی جداشده با آمیزه اکتینیدین و تریپسین A: ۷۲ ساعت پس از جداسازی (میکروسکوپ معکوس با بزرگ‌نمایی $\times 400$). B: پس از رنگ‌آمیزی ایمونوسیتوشیمیایی (میکروسکوپ معکوس با بزرگ‌نمایی $\times 400$)

بحث

امکان تفکیک و جداسازی سلول‌ها فراهم می‌گردد.^{۳۶ و ۳۷} گزارش شده که پاپابین تحت شرایط خنثی فعالیت هیدرولازی خوبی روی الاستین دارد.^{۳۸} در مطالعه دیگری، پاپابین نسبت به کلاژن، فعالیت هیدرولازی بیشتری روی الاستین دارد.^{۳۹} از طرفی آنالیز ساختار سه بعدی اکتینیدین و پاپابین با اشعه X حاکی از تشابه زیاد این دو آنزیم است.^{۳۰} علی‌رغم تفاوت‌هایی که بین جایگاه فعال این دو آنزیم وجود دارد،^{۴۰} این احتمال وجود دارد که اکتینیدین نیز قادر به هضم الاستین باشد. تریپسین یک سرین پروتئاز است که در پروتئین‌ها و پپتیدها، پیوند آمیدی را در سمت انتهایی کربوکسیل باقیمانده‌های لیزین و آرژنین هیدرولیز می‌کند. از طرفی اکتینیدین یک سیستمین پروتئاز است که فعالیت استرازی و پپتیدازی از خود نشان داده و پیوندهای استری و آمیدی را در سمت باقیمانده لیزین هیدرولیز می‌کند.^{۴۱} می‌توان گفت این دو آنزیم قادرند در هیدرولیز پیوندهای پپتیدی اثر سینرژسم داشته باشند. تریپسین بعد از باقیمانده‌های لیزین و آرژنین را برش می‌دهد که در الاستین هم دیده می‌شود.^{۴۲} سرین پروتئازها مثل تریپسین، کیموتریپسین و الاستاز در جایگاه فعالشان به یک سرین نیاز داشته و مکانیسم مشابهی برای کاتالیز دارند.^{۴۳} بین رشته‌های الاستیک پل‌های پروتئوگلیکانی وجود دارد. پروتئوگلیکان‌ها ژلی می‌سازند که رشته‌های کلاژن و الاستیک در آن قرار گرفته و برای پایداری ماتریکس خارج سلولی لازم هستند.^{۴۴} تریپسین قادر است هسته پروتئینی پروتئوگلیکان‌ها را هضم کند.^{۴۵} در نتیجه باعث شکسته شدن ارتباط بین رشته‌های الاستیک و تغییر خصوصیات و مکانیک ماتریکس خارج سلولی می‌گردد و زمینه را

اکتینیدین یک تیول پروتئاز است که در میوه کیوی به وفور یافت می‌شود.^{۳۷} این آنزیم شباهت ساختاری و عملکردی قابل توجهی با دیگر تیول پروتئازهای گیاهی همچون پاپابین دارد.^{۲۸-۳۰} اثر اکتینیدین روی سوبسترای طبیعی و سنتزی در چندین مطالعه مورد بررسی قرار گرفته است^{۱۷، ۳۱ و ۳۲} و چند مطالعه فعالیت کلاژنازی این پروتئاز را بررسی نموده‌اند.^{۲۰-۲۲ و ۳۳} برای مثال Ohyama نشان داد که عصاره ناخالص اکتینیدین قادر است در دمای 27°C و $\text{pH}=3$ ، در مدت زمان ۶۰ دقیقه کلاژن تاندون و پوست موش را هضم کند.^{۲۰} Wada نشان داد که اکتینیدین قادر است در $\text{pH} 3/3$ و شش و دمای 20°C کلاژن تاندون آشیل گاو را هضم کند و به نظر می‌رسد که قسمت اعظم قطعات پپتیدی، حاصل هضم الاستین باشد.^{۳۳} Mostafaie آنزیم اکتینیدین را با روشی ساده و کم هزینه از چهار وارپته مختلف کیوی خالص نمود و نشان داد که اکتینیدین قادر است دو نوع کلاژن نوع I و II را در pH معادل هفت و $1/5$ هضم کند ولی در بافرهای اسیدی خصوصاً بافر استات با pH معادل چهار بر روی این سوبستراها اثر محسوسی ندارد.^{۳۴ و ۳۵} به علاوه آن‌ها نشان دادند که اکتینیدین به‌طور مؤثرتری کلاژن نوع I را نسبت به II هضم می‌کند و قادر است کلاژن را در چندین جایگاه بشکند.^{۳۳} این نتایج نمایانگر آن بود که اکتینیدین احتمالاً مشابه کلاژنازهای باکتریایی عمل می‌کند. رشته‌های کلاژن نوع I و II دارای جایگاه‌هایی برای اتصال دیگر انواع فیبرها و پروتئوگلیکان‌ها هستند. بنابراین با تجزیه این دو نوع اصلی کلاژن

است. اثر مخلوط اکتینیدین و تریپسین بر روی آئورت در شرایط مختلف نشان داد که شرایط مناسب برای جداسازی انتخابی سلول‌های اندوتلیال آئورت موش صحرایی غلظت 10mg/ml اکتینیدین همراه با غلظت $1/2\text{mg/ml}$ تریپسین و مدت زمان ۶۰ دقیقه است. در غلظت‌های پایین‌تر از این غلظت، تعداد سلول کمتری جدا شد و در غلظت‌ها و زمان‌های بیشتر میزان بقای سلول‌های جدا شده مناسب نبود. در شرایط بهینه درصد بقای سلول‌های جدا شده حدود ۹۰ درصد بود و بررسی‌های مورفولوژیک و ایمونوسیتولوژیک حاکی از کمترین آلودگی با دیگر جمعیت‌های سلولی بود. این نتایج قابل مقایسه با نتایج حاصل از جداسازی سلول‌های اندوتلیال آئورت موش صحرایی با جداسازی این سلول‌ها به کمک آنزیم کلاژناز و تریپسین در این مطالعه و دیگر مطالعات مشابهی است که با روش‌های آنزیمی، سلول‌های اندوتلیال را از عروق بزرگ و کوچک با موفقیت جدا کرده‌اند. نتایج مطالعه حاضر به وضوح نشان داد که اکتینیدین در کنار تریپسین قادر به جدا سازی مطلوب سلول‌های اندوتلیال آئورت موش صحرایی است که به دلیل استحکام و ساختار متفاوت بافت پشتیبان آن با سایر عروق، از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. این آنزیم در مقایسه با آنزیم کلاژناز در مدت زمان کمتری سلول‌های اندوتلیال آئورت موش صحرایی را جدا نمود. سلول‌های جدا شده با آنزیم اکتینیدین و تریپسین از نظر قدرت بقا و تعداد سلول‌های جدا شده مشابه سلول‌های جدا شده با آنزیم کلاژناز و تریپسین بودند. با توجه به فعالیت کلاژنازی اکتینیدین، این پروتئاز دارای قابلیت جداسازی جمعیت‌های سلولی مختلف از بافت‌های مختلف است. به علاوه اکتینیدین با روشی ساده و کم‌هزینه و بدون ریسک آلودگی، در مقایسه با کلاژنازهای باکتریایی و جانوری، از میوه کیوی قابل جداسازی است. جمیع این خصوصیات نمایانگر یک کلاژناز مناسب و جدید برای جداسازی سلول از بافت‌های مختلف است. هرچند که روش دقیق عملکرد اکتینیدین روی کلاژن تیپ I و II، الاستین و دیگر گلیکوپروتئین‌های ماتریکس خارج سلولی به تحقیقات کمی بیشتری نیاز دارد. *سپاسگزاری:* با سپاس از راهنمایی‌ها و مساعدت‌های خانم‌ها چلبی، کیانی، سهرابی، مهنام و آقایان پروانه و محمدی مطلق. با تشکر از مرکز تحقیقات بیولوژی پزشکی دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه به جهت فراهم آوردن امکانات این تحقیق.

برای عملکرد بهتر اکتینیدین فراهم می‌کند. سازگاری اکتینیدین و تریپسین با EDTA (به عنوان شيلات در شل نمودن بافت) از دیگر مزیت‌های همکاری این دو آنزیم برای اهداف مورد نظر از جمله تجزیه ماتریکس بافت‌ها است. Khan با مطالعه دیواره شریان موش صحرایی نشان داد که درایتیمای آئورت لایه زیر اندوتلیال (Subendothelial) نامشخص بوده و لایه الاستیک آن حالت موج دارد. غلاف مدیای آئورت شامل فیبرهای عضله اسکلتی است که به حالت مدور آرایش یافته‌اند و غلاف ادونتیتیا شامل فیبرهای کلاژن و الاستیک است.^{۴۶} در مطالعه‌ای دیگر، کلاژن غالب در دیواره آئورت از نوع I و III است.^{۱۴} به طور کلی برای جداسازی سلول‌های اندوتلیال آئورت از تکنیک‌های مختلفی استفاده شده است: از جمله تکنیک کاشت قطعات آئورت در ماتریکس کلاژن و یاماتریژل.^{۴۷،۴۸} در بعضی مطالعات هم از روش‌های مکانیکی همچون خراشیدن سطح لومینال آئورت همراه با هضم آنزیمی برای جدا کردن سلول‌ها استفاده شده است.^{۴۹،۵۰} که به جهت صدمات احتمالی به سلول‌های اندوتلیال گزینه مناسبی برای انجام تحقیقات بر روی این سلول‌ها نیست. تکنیک دیگر هضم آنزیمی است که برای جداسازی این سلول‌ها به کار برده می‌شود. به جهت مقاوم بودن بافت اندوتلیال آئورت برای جداسازی سلول‌های اندوتلیال، معمولاً استفاده از یک مجموعه آنزیمی نتایج بهتری به دنبال دارد. جداسازی سلول‌های اندوتلیال آئورت با پاپائین،^{۵۱} کلاژنازها،^{۲۵،۲۶،۳۳} کلاژناز و دیسپاز،^{۱۳،۵۲} کلاژناز و الاستاز^{۵۵،۵۶} و کلاژناز و تریپسین^۵ صورت گرفته که نتایج مختلفی از نظر تعداد سلول جدا شده و میزان بقا داشته است. به صورت هم‌زمان از تکنیک هضم آنزیمی کلاژناز و تکنیک کاشت قطعات آئورت در ماتریکس کلاژن، برای جداسازی سلول‌های اندوتلیال آئورت استفاده کرد.^{۵۷} با توجه به اثرات تردکنندگی گوشت اکتینیدین و خصوصیات کلاژنازی^{۳۳} و احتمالاً الاستازی این پروتئاز و در نظر گرفتن این مسأله که کلاژن موجود در ماتریکس خارج سلولی آئورت موش صحرایی عمدتاً از نوع I و III است،^{۱۴} در این مطالعه، اکتینیدین به همراه تریپسین برای جداسازی سلول‌های اندوتلیال آئورت موش صحرایی استفاده شد. جداسازی و کشت سلول‌های اندوتلیال به جهت نقش آن‌ها در بیماری‌های عروقی، ترمیم عروق خونی، آنژیوژنز، مطالعات فیزیولوژیکی، پاتوفیزیولوژی، فارماکولوژی و ملکولی مورد توجه

References

- Cole OF, Fan TPD, Lewis GP. Isolation, characterization, growth and culture of endothelial cells from the rat aorta. *Cell Biol Inter Rep* 1986;10(6):399-405.
- Nistri S, Mazzetti L, Failli P, Bani D. High-yield method for isolation and culture of endothelial cells from rat coronary blood vessels suitable for analysis of intracellular calcium and nitric oxide biosynthetic pathways. *Biol Proced* 2002;4(1):32-7.
- Huang TY, Chu TF, Chen HI, Gen C. Heterogeneity of $[Ca^{+2}]_i$ signaling in intact rat aortic endothelium. *FASEB J* 2000;14(5):797-80.
- Cines DB, Pollak ES, Buck CA, Loscalzo J, Zimmerman GA, McEver RP, et al. Endothelial cells in physiology and in the pathophysiology of vascular disorders. *Blood* 1998;91(10):3527-61.
- Blose SH, Chacko S. In vitro behavior of guinea pig arterial and venous endothelial cells. *Dev Growth Differ* 1975;17(2):153-65.
- Mahabeleshwar GH, Somanath PR, Byzova TV. Methods for isolation of endothelial and smooth muscle cells and in vitro proliferation assays. *Methods Mol Med* 2006;129:197-208.
- Jaffe EA, Nachman RL, Becker CG, Minick CR. Culture of human endothelial cells derived from umbilical veins. Identification by morphologic and immunologic criteria. *J Clin Invest* 1973;52(11):2745-56.
- Gimbrone MA Jr, Cotran RS, Folkman J. Human vascular endothelial cells in culture. *Growth and DNA Synthesis* 1974;60(3):673-84.
- Lewis LJ, Hoak JC, Maca RD, Fry GL. Replication of human endothelial cells in culture. *Science* 1973;181:453-54.
- McGuire PG, Twietmeyer TA. Transcytosis of ferritin and increased production of subendothelial matrix components by aortic endothelial cells during the development of hypertension. *Microcirc Endothelium Lymphatics* 1985;2(2):129-49.
- Ye XY, Tu Q, Tong Z, Weng YJ, Wang YF. Effects of glucose concentration fluctuation on function of cultured bovine arterial endothelial cells. *Zhonghua Xin Xue Guan Bing Za Zhi* 2010;38(3):264-7.
- Boot-Handford RP, Tuckwell DS, Plumb DA, Rock CF, Poulosom R. A novel and highly conserved collagen (pro(α)1(XVII)) with a unique expression pattern and unusual molecular characteristics establishes a new clade within the vertebrate fibrillar collagen family. *J Biol Chem* 2003;278(33):31067-77.
- Hlavackova L, Janega P, Cerna A, Pechanova O, Andriantsitohaina R, Babal P. Red wine polyphenols affect the collagen composition in the aorta after oxidative damage induced by chronic administration of CCl₄. *Physiol Res* 2009;58(3):337-44.
- Satta J, Juvonen T, Haukipuro K, Juvonen M, Kairaluoma MI. Increased turnover of collagen in abdominal aortic aneurysms, demonstrated by measuring the concentration of the aminoterminal propeptide of type III procollagen in peripheral and aortal blood samples. *J Vasc Surg* 1995;22(2):155-60.
- Kadler KE, Holmes DF, Trotter JA, Chapman JA. Collagen fibril formation. *Biochem J* 1996;316 (Pt 1):1-11.
- Hulboy DL, Rudolph LA, Matrisian LM. Matrix metalloproteinases as mediators of reproductive function. *Mol Hum Reprod* 1997;3(1):27-45.
- Hayashi T, Nakamura T, Hori H, Nagai Y. The degradation rates of type I, II, and III collagens by tadpole collagenase. *J Biochem* 1980;87(3):809-15.
- Goldberg GI, Wilhelm SM, Kronberger A, Bauer EA, Grant GA, Eisen AZ. Human fibroblast collagenase. Complete primary structure and homology to an oncogene transformation-induced rat protein. *J Biol Chem* 1986;261(14):6600-5.
- Arcus AC. Proteolytic enzyme of *Actinidia chinensis*. *Biochim Biophys Acta* 1959;33(1):242-4.
- Ohyama H, Enomoto T, Mitsunaga S. Variety of kiwifruit protease and their collagenolytic activity. *J Jpn Soc Nutr Food Sci* 1997;50:57-62.
- Sugiyama S, Ohtsuki K, Sato K, Kawabata M. Enzymatic properties, substrate specificities and pH-activity profiles of two kiwifruit proteases. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)* 1997;43(5):581-9.
- Morimoto K, Kunii S, Hamano K, Tonomura B. Preparation and structural analysis of actinidain-processed atelocollagen of yellowfin tuna (*Thunnus albacares*). *Biosci Biotechnol Biochem* 2004;68(4):861-7.
- Mostafaie A, Bidmeshkipour A, Shirvani Z, Mansouri K, Chalabi M. Kiwifruit actinidin: a proper new collagenase for isolation of cells from different tissues. *Appl Biochem Biotechnol* 2008;144(2):123-31.
- Bidmeshkipour A, Shirvani Farsani Z, Mansouri K, Mostafaei A. Isolation of human umbilical vein endothelial cells using kiwifruit actinidin. *Yakhteh Med J* 2007;9(2):151-6.
- Boland MJ, Hardman MJ. Kinetic studies on the thiol protease from *Actinidia chinensis*. *FEBS Lett* 1972;27(2):282-4.
- Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976;72:248-54.
- Boyes S, Strubi P, Marsh H. Actinidin levels in fruit of actinidia species and some actinidia arguta rootstock-scion combination. *Lebensm-Wiss U-Technol* 1997;30:379-89.
- Baker EN. Structure of actinidin details of the polypeptide chain conformation and active site from an electron density map at 2.8 Å resolution. *J Mol Biol* 1977;115:263-77.
- Brocklehurst K, Carey PR, Lee HH, Salih E, Storer AC. Comparative resonance Raman spectroscopic and kinetic studies of acyl-enzymes involving papain, actinidin and papaya peptidase II. *Biochem J* 1984;223(3):649-57.
- Kamphuis IG, Drenth J, Baker EN. Thiol proteases. Comparative studies based on the high-resolution structures of papain and actinidin, and on amino acid sequence information for cathepsins B and H, and stem bromelain. *J Mol Biol* 1985;182(2):317-29.
- Varughese KI, Su Y, Cromwell D, Hasnain S, Xuong NH. Crystal structure of an actinidin-E-64 complex. *Biochemistry* 1992;31(22):5172-6.
- Vazquez-Lara L, Tello-Solis SR, Gomez-Ruiz L, Garcia-Garibay M, Rodriguez-Serrano G. Degradation of α-lactalbumin and β-lactoglobulin by Actinidin. *Food Biotechnol* 2003;17:117-28.
- Wada M, Hosaka M, Nakazawa R, Kobayashi Y, Hasegawa T. The solubilization of unheated cattle Achilles tendon with actinidin under neutral and acidic conditions. *Food Sci Technol Res* 2004;10(1):35-7.
- Mostafaie A, Chalabi M. Kiwifruit actinidin: its purification and examination of amount in different varieties. *J Sci Technol Agric Natur Resour* 2006;10(3):223-30.
- Mostafaie A, Chalabi M, Ferdosi ME. Purification of kiwifruit actinidin and examination of its proteolytic activity. Medical Biology Research Center, Kermanshah University of Medical Sciences, 2004.
- Marchant JK, Hahn RA, Linsenmayer TF, Birk DE. Reduction of type V collagen using a dominant-negative strategy alters the regulation of fibrillogenesis and results in the loss of corneal-specific fibril morphology. *J Cell Biol* 1996;135(5):1415-26.
- Blaschke UK, Eikenberry EF, Hulmes DJ, Galla HJ, Bruckner P. Collagen XI nucleates self-assembly and limits lateral growth of cartilage fibrils. *J Biol Chem* 2000;275(14):10370-8.

38. Takagi H, Kondou M, Hisatsuka T, Nakamori S, Tsai YC, Yamasaki M. Effects of an alkaline elastase from an alkalophilic bacillus strain on the tenderization of beef meat. *J Agric Food Chem* 1992;40:2364-8.
39. Senior RM, Bielefeld DR. The activity of papain against native collagen and elastin. *Am Rev Respir Dis* 1972;105:998.
40. Brocklehurst K, Baines BS, Malthouse JP. Differences in the interactions of the catalytic groups of the active centres of actinidin and papain. *J Biochem* 1981;197(3):739-46.
41. Morimoto K, Furuta E, Hashimoto H, Inouye K. Effects of high concentration of salts on the esterase activity and structure of a kiwifruit peptidase, actinidin. *J Biochem* 2006;139(6):1065-71.
42. Olsen JV, Ong SE, Mann M. Trypsin cleaves exclusively C-terminal to arginine and lysine residues. *Mol Cell Proteomics* 2004;3(6):608-14.
43. Kraut J. Serine proteases: structure and mechanism of catalysis. *Annu Rev Biochem* 1977;46:331-58.
44. Ritter MC, Jesudason R, Majumdar A, Stamenovic D, Buczek-Thomas JA, Stone PJ, et al. A zipper network model of the failure mechanics of extracellular matrices. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009;106(4):1081-6.
45. Rapraeger A, Bernfield M. Cell surface proteoglycan of mammary epithelial cells. Protease releases a heparan sulfate-rich ectodomain from a putative membrane-anchored domain. *J Biol Chem* 1985;260(7):4103-9.
46. Khan H, Khan AA, Faruqi NA. Comparative history of coronary arteries in mammals. *J Anat Soc India* 2006;55(1):27-30.
47. Hanashiro K, Nakamura M, Nakasone T, Tokeshi Y, Kosugi T. Permeability of rat IgE across rat aortic endothelial cell is enhanced by histamine. *Allergology Int* 2007;50:223-30.
48. Iwashima F, Yoshimoto T, Minami I, Sakurada M, Hirono Y, Hirata Y. Aldosterone induces superoxide generation via Rac1 activation in endothelial cells. *Endocrinology* 2008;149(3):1009-14.
49. Buonassisi V, Root M. Enzymatic degradation of heparin-related mucopolysaccharides from the surface of endothelial cell cultures. *Biochim Biophys Acta* 1975;385(1):1-10.
50. Gimbrone MAJR. Culture of vascular endothelium. In: Spaet TH, editor. *Progress In Hemostasis and Thrombosis*. New York: Grune and Stratton; 1976. p. 1-28.
51. Rusko J, Tanzi F, van Breemen C, Adams DJ. Calcium-activated potassium channels in native endothelial cells from rabbit aorta: conductance, Ca²⁺ sensitivity and block. *J Physiol* 1992;455:601-21.
52. Howson KM, Aplin AC, Gelati M, Alessandri G, Parati EA, Nicosia RF. The postnatal rat aorta contains pericyte progenitor cells that form spheroidal colonies in suspension culture. *Am J Physiol Cell Physiol* 2005;289(6):C1396-407.
53. Teng B, Ansari HR, Oldenburg PJ, Schnermann J, Mustafa SJ. Isolation and characterization of coronary endothelial and smooth muscle cells from A1 adenosine receptor-knockout mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2006;290(4):H1713-20.
54. Cheung WY, Young EW, Simmons CA. Techniques for isolating and purifying porcine aortic valve endothelial cells. *J Heart Valve Dis* 2008;17(6):674-81.
55. Fowler S, Shio H, Wolinsky H. Subcellular fractionation and morphology of calf aortic smooth muscle cells: studies on whole aorta, aortic explants, and subcultures grown under. *J Cell Biol* 1977;75(1):166-84.
56. Matsumoto S, Kobayashi T, Katoh M, Saito S, Ikeda Y, Kobori M, et al. Expression and localization of matrix metalloproteinase-12 in the aorta of cholesterol-fed rabbits: relationship to lesion development. *Am J Pathol* 1998;153(1):109-19.
57. Lincoln DW 2nd, Larsen AM, Phillips PG, Bove K. Isolation of murine aortic endothelial cells in culture and the effects of sex steroids on their growth. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 2003;39(3-4):140-5.

An optimized mixture of kiwifruit actinidin and trypsin for isolation and culture of endothelial cells from rat aorta

Received: January 23, 2010 Accepted: April 06, 2010

Abstract

Mahvash Hesari M.Sc.¹
Kamran Mansouri M.Sc.²
Ali Mostafaie Ph.D.^{3*}
Ali Bidmeshkipour Ph.D.⁴

1- M. Sc. of Cellular and Molecular
Biology
2- M. Sc. of Hematology
3- Department of Immunology

Medical Biology Research Center,
Kermanshah University of Medical
Sciences.

4- Department of Biology, Faculty of
Sciences, Razi University.

Background: Proteolytic enzymes, especially collagenases, are used for digestion of extracellular matrix, cell isolation and primary culture. Because of the problems in purification and low amount of collagenases in bacterial or animal sources, it is important to find new sources of the enzymes. So, in the present study actinidin, a plentiful protein in kiwifruit was purified and a mixture of actinidin and trypsin was applied to isolate rat aortic endothelial cells.

Methods: Aortic endothelial cells were isolated using digestion solution containing different concentrations of actinidin (from 2 to 16 mg/ml) and trypsin (0.3, 0.6, 1.2 and 2.4 mg/ml) in different times (from 15 to 90 minute). Isolated cells were cultured in DMEM culture medium. Isolated cells were identified by morphological characteristics and immunocytochemical staining; viability of separated cells was estimated by trypan blue exclusion test.

Results: Actinidin in concentration of 10 mg/ml with trypsin in concentration of 1.2 mg/ml for one hour could isolate rat aortic endothelial cells. In this condition the viability of cells was estimated 90%. Morphological and immunocytochemical characteristics confirmed the isolated cells as endothelial cells.

Conclusion: The results showed that the mentioned mixture of actinidin and trypsin has not considerable toxic effects on separated cells and is a novel and suitable option for isolation of rat aortic endothelial cells.

Keywords: Actinidin, trypsin, endothelial cells, aorta, rat, collagenase.

* Corresponding author: Medical Biology
Research Center, Kermanshah University
of Medical Sciences, Sorkheh Lizheh,
Kermanshah, Iran, PO. Box 1568
Tel: +98-831-4276473
email: amostafaie@kums.ac.ir