تعیین مکان بیان کننده گیرنده HCA2 در لوله گوارش موش صحرایی با استفاده از روش ایمونوهیستوشیمی

پوریا شعبانی[۱]، سمیه حامدی[۱*]

چکیده

گیرنده هیدروکسی کربوکسیلیک اسید۲ (HCA2) هدف داروی نیاسین است. در این مطالعه الگوی بیان این گیرنده ها در سلول های بخش های مختلف لوله گوارش (از دهان تا مری) موش صحرایی با روش ایمونوهیستوشیمی توصیف شده است. ٦ موش صحرایی نر بالغ از نژاد ویستار تحت بیهوشی آسان کشی شدند. مقاطع بارافینی عرضی ۵ میکرونی از مری، معده، دئودنوم، ژژونوم، ایلئوم، سکوم، کولون ها و رکتوم تهیه شد. آنتی بادی اولیه جهت رنگ آمیزی ایمونوهیستو شیمی، آنتی بادی چند دودمانی خرگوشی ضد HCA2 موش صحرایی (غلظت ۱:۳۰۰ و انکوباسیون به مدت یک شب در ٤ درجه سانتی گراد) بود. آنتی بادی ثانویه با HRP کونژوگه شده بود. واکنش ایمنی ضعیف در سلول های ابی تلیال مری و معده غیر غده ای، واکنش ایمنی قوی مربوط به گیرنده های HCA2 در سلول های ابی تلیال دئودنوم، ژژونوم، ایلئوم و لایه عضلانی ژژونوم دیده شد. بعلاوه واکنش بذیری در کولون اندک بوده و در رکتوم هیچگونه واکنش بذیری دیده نشد. در قاعده سکوم رنگ پذیری سلول های پوششی شدید بود. در کل، بروتئین گیرنده های HCA2 به فراوانی در ابی تلیوم روده باریک و قاعده سکوم موش صحرایی حضور دارد، این امر موش صحرایی را به یک حیوان آزمایشگاهی مناسب جهت مطالعه بر روی این گیرنده ها در دستگاه گوارش تبدیل می کند.

واژگان کلیدی: *لوله گوارش، موش صحرایی، گیرنده HCA2، ایمونوهیستوشیمی*

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۳/۳۰ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۸/۲۱

مقدمه

دستگاه گوارش نه تنها مسیری برای عبور مواد غذایی فراهم می آورد؛ بلکه دارای سلول هایی با عملکرد های ترشحی، مکانیکی، حسی و دیگر فرایندهای تنظیمی است. تعداد زیادی هورمون و میانجی در تنظیم اعمال فیزیولوژیک دستگاه گوارش نقش دارند که عمل آنها با واسطه گیرنده-های مختلفی میانجیگری می شود. گیرنده های جفت شده با پروتئین G از جمله گیرنده هایی هستند که نقش مهمی در حس کردن مواد غذایی در دستگاه گوارش دارند. این گیرنده‌ها در پاسخ بدن نسبت به مواد غذایی حایز اهمیت بوده و به همین دلیل اهداف دارویی مهمی نیز به شمار می روند (۱). گیرنده‌های هیدروکسی کربوکسیلیک اسید ۲ (گیرنده های HCA2 یا GPR109A) نوعی گیرنده جفت شده با پروتئین G هستند که به عنوان هدف داروی اسید نیکوتینیک یا نیاسین که یک داروی ضد دیس لیپیدمی است شناخته می شوند. این گیرنده ها عمدتا روی سلولهای چربی (سفید و قهوه‌ای) مشاهده شده و مهار لیپولیز را سبب می شوند(۲-٤). سلولهای ایمنی شامل ماکروفاژها، مونوسیت ها، نوتروفیل ها و سلول های دندریتیک پوستی (ولی نه لنفوسیت ها) نیز این گیرنده ها را بیان می کنند(٦،۵). گیرنده های HCA2 همچنین در سلول های اپیتلیال رنگی شبکیه (٤)، کراتینوسیت ها (۷) و میکروگلیا (۸) وجود دارند.

در سال ۲۰۱۱Titgemeyer و همکاران گیرنده HCA2 را در کبد، ماهیچه و مغز گاو شناسایی کردند(۹). توزیع بافتی mRNA گیرنده HCA2 در همستر و خوکچه هندی توسط آزمون کمی PCR، به وسیله Torhan و همکاران در سال ۲۰۰۷ تعیین شده است. این محققین گزارش دادند که بیان این گیرنده نسبتا گسترده بوده و بیشترین بیان در همستر در بافتهای ریه، طحال، چربی و بیضه و در خوکچه هندی

۱- گروه علوم پایه، واحد کرج، دانشگاه آزاد اسلامی، کرج، ایران
(sahar_hamedi@yahoo.com)

مربوط به بافتهای طحال، ریه، معده، ماهیچه اسکلتی، تخمدان و چربی بوده است(۱۰).

شواهدی وجود دارد که بر طبق آنها گیرنده های HCA2 می توانند در ایجاد اثرات مفید فیبرهای غذایی نقش داشته باشند. در واقع اثرات مفید فیبرها ناشی از تولید واسطه های حاصل از تخمیر میکروبی در روده هاست که عمدتا شامل اسیدهای چرب کوتاه زنجیر نظیر بوتیرات، استات و پروپیونات هستند. گیرنده های HCA2 می توانند میانجی اثرات مفید بوتیریک اسید در روده ها باشند (۱۱).

بیان گیرنده های HCA2 در دستگاه گوارش موش سوری چه در سطح پروتئین و چه در سطح mRNA نشان داده شده است (۱۲و۱۳). هر چند موش های صحرایی به نحو گسترده ای به عنوان حیوان آزمایشگاهی در مطالعات فیزیولوژیک و فار ماکولوژیک کاربرد دارند، اطلاعاتی در زمینه بیان احتمالی این گیرنده ها در دستگاه گوارش موش صحرایی در دسترس نبود تا اینکه Shomali و همکاران در سال ۲۰۱٤ ارگانهای مختلف موش صحرایی را از نظر وجود HCA2 گیرنده HCA2 با روش PCR بررسی کردند. در این مطالعه حضور mRNA این گیرنده در ارگانهای مختلف شامل بخشهایی از لوله گوارش مانند مری، معده غده ای، پیش معده، روده ها و کولون نشان داده شد. در این پژوهش امکان تعیین دقیق نوع سلول های بیان کننده گیرنده HCA2 وجود نداشت(۱٤).

با توجه به اهمیت و نقش گیرنده های HCA2 در دستگاه گوارش و نیز عدم تعیین و شناسایی سلول های بیان کننده این گیرنده ها در لوله گوارش موش صحرایی، هدف از پژوهش حاضر شناسایی و تعیین نوع سلول های بیان کننده گیرنده HCA2 در بخش‌های متفاوت لوله گوارش موش صحرایی بعنوان یک حیوان آزمایشگاهی مهم با استفاده از روش ایمونوهیستوشیمی می باشد.

مواد و روش‌کار

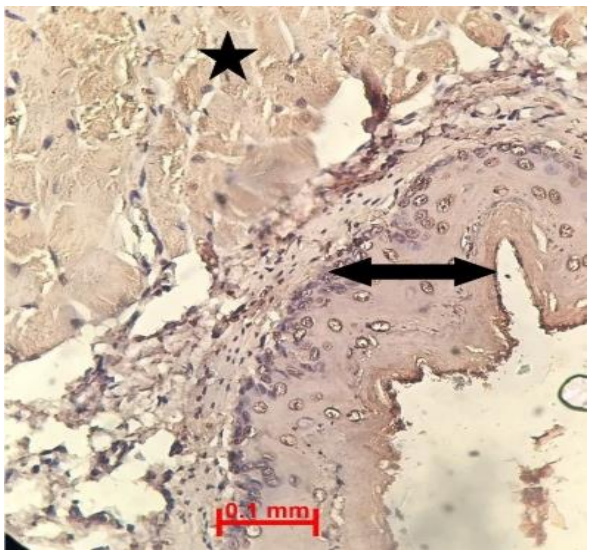
در این مطالعه شش موش صحرایی نر بالغ از نژاد ویستار با وزن ۲۰۰-۲۵۰ گرم که از نظر بالینی سالم بودند مورد استفاده قرار داده شدند. موش های صحرایی به مدت یک هفته تحت شرایط یکسان محیطی از نظر رطوبت، دما و طول مدت نوردهی (دوازده ساعت روشنایی و دوازده ساعت تاریکی متناوب) و دسترسی آزاد به آب و غذا نگهداری شدند. سپس موش ها تحت بیهوشی عمیق با دی اتیل اتر آسان کشی شده و بلافاصله از قسمت های مختلف لوله گوارش آنها نمونه گیری شد. نمونه ها در بافر فرمالین ۱۰ درصد قرار گرفت. سپس برش های پنج میکرونی از نمونه ها تهیه گردید. پراکسیدازهای درون زاد به وسیله انکوباسیون به مدت ۳ دقیقه در پراکسید هیدروژن ۳٪ در متانول غیرفعال شدند.

آنتی بادی اولیه برای رنگ آمیزی ایمونوهیستوشیمیایی آنتی بادی GPR109A چند دودمانی خرگوش بود (غلظت۱:۳۰۰، انکوباسیون برای یک شب در ٤ درجه سانتیگراد) که با گیرنده HCA2 موش صحرایی واکنش می دهد. آنتی بادی ثانویه یک آنتی بادی چند دودمانی موش بر ضد آنتی بادی IgG خرگوش بود که با Horse radish peroxidase (HRP) کونژوگه شده بود (غلظت۱:۲۰۰، انکوباسیون برای ۳۰ دقیقه در دمای اتاق). هر دوی این آنتی بادیها توسط شرکت Biorbyt در بریتانیا ساخته شده اند. آشکارسازی توسط کیت سوبسترا DAB انجام شد (Abcam®, Cambridge, USA) ، (۲-۵ دقیقه انکوباسیون در دمای اتاق). کنترلهای منفی فقط با آنتی بادی ثانویه انکوبه شدند. بافت ریه با توجه به توصیه

شرکت تولید کننده آنتی بادی به عنوان کنترل مثبت برای وجود گیرنده استفاده شد. فتومیکروگراف های تهیه شده از اسلایدها مورد ارزیابی با میکروسکوپ نوری جهت شناسایی سلولهای بیان کننده گیرنده قرار گرفتند. موارد مثبت از نظر رنگ پذیری در رنگ آمیزی ایمونوهیستوشیمی بر اساس شدت رنگ به چهار دسته عدم مشاهده (-)، واکنش ضعیف (+)، متوسط (++) و شدید (+++) طبقه بندی شدند. تمام مراحل کار منطبق بر دستورالعمل های اتحادیه اروپا در مورد نگهداری و بکارگیری حیوانات آزمایشگاهی در پژوهش های زیستی انجام شد.

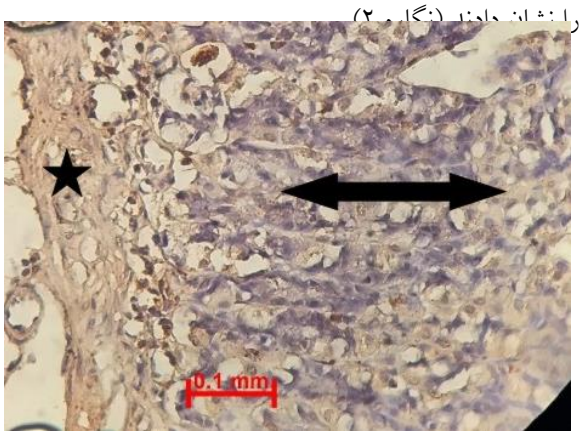
نتایج

در مقاطع بافتی مری. رنگ پذیری ضعیفی در اپی تلیوم سنگفرشی مطبق و ماهیچه دیده شد درحالیکه اندوتلیوم مویرگ‌های خونی رنگ پذیری متوسط تا شدیدی نشان دادند (نگاره ۱).



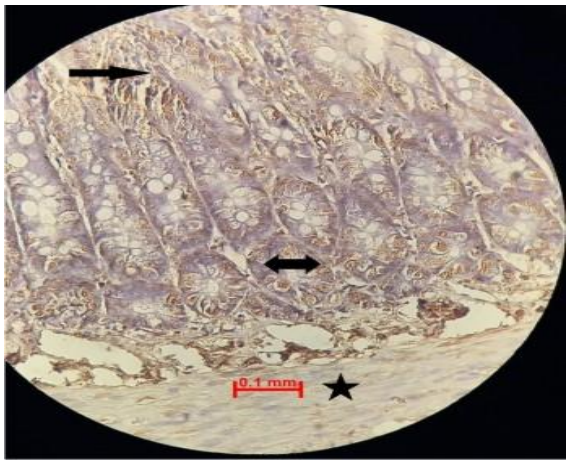
نگاره ۱: بافت مری موش صحرایی. نشان دهنده رنگ پذیری ضعیف در اپیتلیوم (فلش دوطرفه) و ماهیچه (ستاره)(رنگ آمیزی ایمونوهیستوشیمی با استفاده از آنتی بادی ضد گیرنده HCA2)

در بافت معده، اپیتلیوم غده ای واکنش ضعیف و اپیتلیوم سنگفرشی واکنش ضعیف (ناحیه کاردیا) تا متوسط (ناحیه فوندوس) نشان داد. همچنین عضلات در همه قسمت ها رنگ پذیری ضعیف و آندوتلیوم عروق رنگ پذیری متوسط را نشان دادند (نگاره ۲).

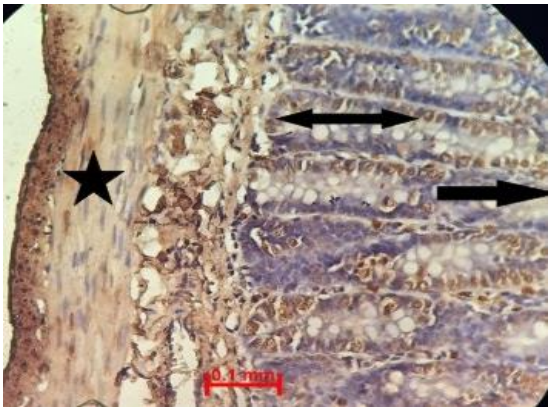


نگاره ۲: بافت غده ای معده موش صحرایی. نشان دهنده رنگ پذیری ضعیف در مخاط (فلش دوطرفه) و ماهیچه صاف (ستاره)(رنگ آمیزی ایمونوهیستوشیمی با استفاده از آنتی بادی ضد گیرنده HCA2)

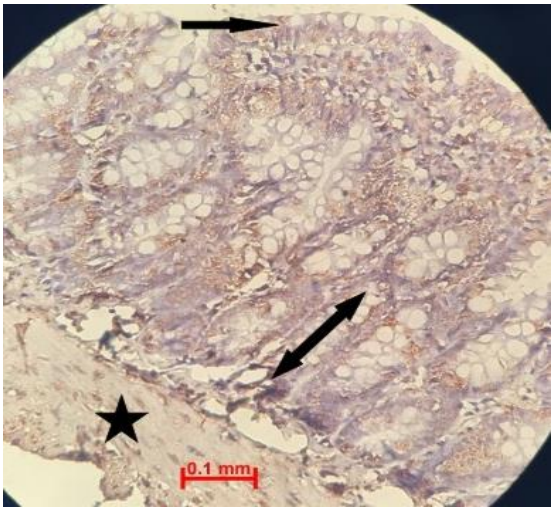
در روده باریک قسمت های مختلف دئودنوم، ژژونوم و ایلئوم بررسی شدند که اپیتلیوم و غدد لیبرکوهن مخاط در هر سه قسمت رنگ پذیری شدید را نشان داد و ماهیچه صاف رنگ پذیری متوسط داشت (بجز در ژژونوم که رنگ پذیری ماهیچه صاف نیز شدید بود).(نگاره۳ و ٤و ٥).



نگاره ۳: بافت دئودنوم موش صحرایی. نشان دهنده رنگ پذیری شدید دراپیتلیوم(فلش یک طرفه) و غدد لیبرکوهن مخاط (فلش دوطرفه)و رنگ پذیری متوسط ماهیچه صاف (ستاره)(رنگ آمیزی ایمونوهیستوشیمی با استفاده از آنتی بادی ضد گیرنده HCA2).

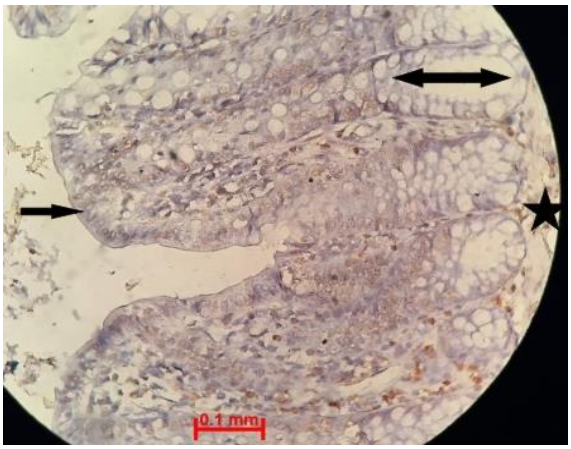


نگاره ٤: بافت ژژونوم موش صحرایی. نشان دهنده رنگ پذیری شدید دراپیتلیوم (فلش یک طرفه)و غدد لیبرکوهن مخاط (فلش دوطرفه)و ماهیچه صاف (ستاره) (رنگ آمیزی ایمونوهیستوشیمی با استفاده از آنتی بادی ضد گیرنده HCA2)

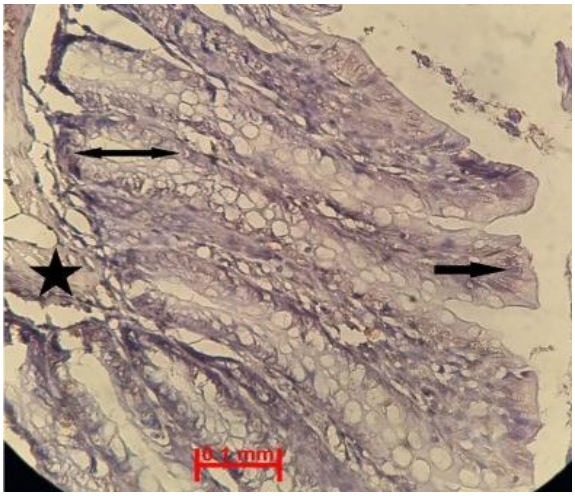


نگاره ٥: بافت ایلئوم موش صحرایی. نشان دهنده رنگ پذیری شدید دراپیتلیوم (فلش یک طرفه) و غدد لیبرکوهن مخاط(فلش دو طرفه) و رنگ پذیری متوسط ماهیچه صاف (ستاره)(رنگ آمیزی ایمونوهیستوشیمی با استفاده از آنتی بادی ضد گیرنده HCA2)

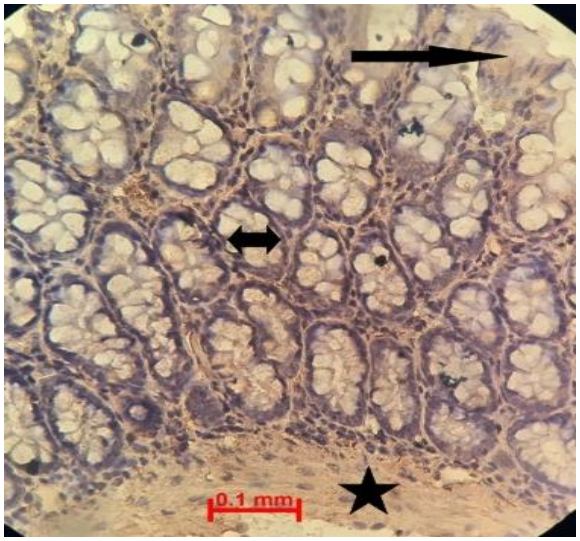
در روده بزرگ، قسمت های مختلف سکوم (قاعده و راس) همچنین کولون (بالارو ، پایین رو) و رکتوم مورد بررسی قرار گرفتند. در سکوم رنگ پذیری متوسط در ماهیچه و آندوتلیوم عروق قسمت قاعده و راس دیده شد در حالیکه اپیتلیوم و غدد لیبرکوهن دارای رنگ پذیری شدید در قاعده و رنگ پذیری متوسط در راس بودند (نگاره ٦). در قسمت های مختلف کولون رنگ پذیری ضعیف در اپیتلیوم دیده شد در حالیکه ماهیچه صاف و عروق کولون بالارو رنگ پذیری متوسط را نشان دادند (نگاره ۷). همچنین اپیتلیوم در رکتوم هیچ گونه رنگ پذیری نداشت ولی در ماهیچه رنگ پذیری ضعیف و در عروق رنگ پذیری متوسط دیده شد (نگاره ۸).



نگاره ٦: بافت راس سکوم موش صحرایی. نشان دهنده رنگ پذیری متوسط دراپیتلیوم(فلش یک طرفه)، غدد لیبرکوهن مخاط(فلش دوطرفه) و ماهیچه صاف (ستاره)(رنگ آمیزی ایمونوهیستوشیمی با استفاده از آنتی بادی ضد گیرنده HCA2)



نگاره ۷: بافت کولون پایین رو موش صحرایی. نشان دهنده رنگ پذیری ضعیف دراپیتلیوم(فلش یک طرفه)، غدد لیبرکوهن مخاط(فلش دوطرفه) و ماهیچه صاف (ستاره)(رنگ آمیزی ایمونوهیستوشیمی با استفاده از آنتی بادی ضد گیرنده HCA2)



نگاره ۸: بافت رکتوم موش صحرایی. نشان دهنده عدم رنگ پذیری اپیتلیوم(فلش یک طرفه)، غدد لیبرکوهن مخاط (فلش دو طرفه)و رنگ پذیری ضعیف ماهیچه صاف(ستاره)(رنگ آمیزی ایمونوهیستوشیمی با استفاده از آنتی بادی ضد گیرنده HCA2)

بحث

گیرنده های جفت شده با پروتئین G که حساس به انواع مختلفی از مواد غذایی و سایر ترکیبهای موجود در دستگاه گوارش هستند شناسایی شده اند. نشان داده شده است که این گیرنده ها به تعداد زیاد در سلولهای کموسنسور (حساس به مواد شمیایی) در روده بیان شده و پیامهای هورمونی و عصبی را به مغز و بافت های پیرامونی می رسانند (۱۵).

اسیدهای چرب از جمله موادی هستند که توسط این سلول ها احساس می شوند. تا به امروز، داده های جدید نشان دهنده نقش گیرنده های اسید چرب در شرایط طبیعی و پاتولوژیک است. عملکرد کلی این گیرنده ها تنظیم فعالیت های حرکتی روده، ترشح هورمون، حفظ سد اپی تلیال و عملکرد سلول های ایمنی است. علاوه بر این نقش، مهم این گیرنده ها در تنظیم پاسخ های التهابی و ایمنی در طی شرایط پاتولوژیک در روده نشان داده شده است (۱۶).

در لوله گوارش، تخمیر باکتریایی باعث تولید اسیدهای چرب کوتاه زنجیر (SCFAs) یعنی طبقه ای از مواد مغذی می شود که توسط گیرنده های ویژه اسید چرب زنجیرکوتاه که جزو گیرنده های غشایی هستند تشخیص داده می شوند (۱۶).

HCA2 به عنوان نوع خاصی از گیرنده های اسید چرب زنجیرکوتاه عمل می کند؛ بدین شکل که که توسط SCFA های با زنجیر نسبتا بلندتر، به ویژه بوتیرات، پنتانوات و هگزانوات فعال می شود، اما نشان داده شده است که فعالسازی این گیرنده همچنین توسط بتا هیدروکسی بوتیرات (BHB) نیز انجام می شود. بتا هیدروکسی بوتیرات، یک جسم کتونی درون زاد است که زمانی که منابع کربوهیدرات ها کم باشد، توسط اکسیداسیون اسیدهای چرب در میتوکندری های کبد تولید می شود (۱۷).

نخستین بار Thangaraju و همکاران در سال ۲۰۰۹ نشان دادند که mRNA گیرنده HCA2 در دئودنوم، ژژونوم ، ایلئوم و کولون موش سوری بیان می شود. این دانشمندان نشان دادند که میزان mRNA از دئودنوم به سمت کولون افزایش می یابد. به گونه ای که بالاترین میزان بیان مربوط به کولون است. بیان پروتئین این گیرنده نیز توسط روش ایمونو هیستو شیمی در بخش راسی سلول های اپی تلیوم ژژونوم و ایلئوم و نیز کولون موش سوری نشان داده شد(۱۳). Cresci و همکاران نیز در سال ۲۰۱۰ نشان دادند که گیرنده های HCA2 در موش های سوری دارای میکروفلور نرمال، توسط اپیتلیوم کولون و ایلئوم بیان می شوند. در صورتیکه در موش های سوری فاقد فلور (germ free) بیان این گیرنده ها به نحو محسوسی کمتر بود(۱۲).

تقریبا همسو با این مطالعات در مطالعه حاضر، بیان قابل توجه پروتئین گیرنده HCA2 در روده باریک موش های

صحرایی دیده شد. اما بر خلاف موش سوری در موش های صحرایی بیان این گیرنده توسط سلول های اپی تلیال کولون ضعیف بود. جالب اینکه سلول های اپی تلیال در قاعده سکوم بیان بالایی از این گیرنده را نشان دادند. در موش صحرایی سکوم بسیار بزرگ بوده و عملکرد تخمیری بالایی دارد که می تواند دلیل حضور این گیرنده در سکوم را توجیه کند. لازم به ذکر است که در مطالعات پیشین (۱۲و۱۳) سکوم موش سوری مورد ارزیابی قرار داده نشده بود. در کل می توان چنین نتیجه گیری نمود که پروتئینهای گیرنده HCA2 در اپیتلیوم روده باریک و قاعده سکوم موشهای صحرایی به وفور وجود دارند که آنها را به حیوانات آزمایشگاهی مناسب برای مطالعات آتی در مورد این گیرنده ها در دستگاه گوارش تبدیل می کند.

فهرست منابع

1. Blad CC, Tang C, Offermanns S. G protein-coupled receptors for energy metabolites as new therapeutic targets. Nature Reviews Drug Discovery.2012; 11: 603-619.
2- Tunaru S, Kero J, Schaub A, Wufka C, Blaukat A, Pfeffer K, et al. PUMA-G and HM74 are receptors for nicotinic acid and mediate its anti-lipolytic effect. Nature Medicine. 2003; 9(3): 352-5.
3- Wise A, Foord SM, Fraser NJ, Barnes AA, Elshourbagy N, Eilert M, et al. Molecular identification of high and low affinity receptors for nicotinic acidJournal of Biological Chemistry. 2003; 278(11): 9869-74.
4- Yu AL, Birke K, Lorenz RL, Welge-Lussen U. Constitutive expression of HCA(2) in human retina and primary human retinal pigment epithelial cells. Current Eye Research. 2014; 39(5): 487-92.
5- Kostylina G, Simon D, Fey MF, Yousefi S, Simon HU. Neutrophil apoptosis mediated by nicotinic acid receptors (GPR109A). Cell Death Differ. 2008; 15(1):134-42.
6- Schaub A, Fütterer A, Pfeffer K. PUMA-G, an IFN-gamma-inducible gene in macrophages is a novel member of the seven transmembrane spanning receptor superfamily. European Journal of Immunology. 2001; 31(12):3714-25.
7- Parodi B, Rossi S, Morando S, et al. Fumarates modulate microglia activation through a novel HCAR2 signaling pathway and rescue synaptic dysregulation in inflamed CNS. Acta Neuropathologica. 2015; 130(2):279–295.
8- Hanson J, Gille A, Zwykiel S, Lukasova M, Clausen BE, Ahmed K, Tunaru S, Wirth A, Offermanns S. Nicotinic acid- and monomethyl fumarate-induced flushing involves GPR109A expressed by keratinocytes and COX-2-dependent prostanoid formation in mice. Journal of Clinical Investigation. 2010; 120(8):2910-9.
9- Titgemeyer EC, Mamedova LK, Spivey KS, et al. An unusual distribution of the niacin receptor in cattle. Journal of Dairy Science 2011; 94:4962–7.
10- Torhan AS, Cheewatrakoolpong B, Kwee L, Greenfeder S. Cloning and characterization of the hamster and guinea pig nicotinic acid receptors. Journal of Lipid Research. 2007; 48(9):2065-71.
11- Offermanns S. Hydroxy-Carboxylic Acid Receptor Actions in Metabolism. Trends in Endocrinology & Metabolism. 2017; 28(3):227-236.
12- Cresci GA, Thangaraju M, Mellinger JD, Liu K, Ganapathy V. Colonic gene expression in conventional and germ-free mice with a focus on the butyrate receptor GPR109A and the butyrate transporter SLC5A8. Journal of Gastrointestinal Surgery. 2010; 14(3):449-61.
13- Thangaraju M, Cresci GA, Liu K, Ananth S, Gnanaprakasam JP, Browning DD et al. GPR109A is a G-protein-coupled receptor for the bacterial fermentation product butyrate and functions as a tumor suppressor in colon. Cancer Research. 2009; 69(7):2826-32.

14- Shomali T, Mosleh N, Kamalpour M. Screening of Different Organs of Rats for HCA2 Receptor mRNA. International Journal of Molecular and Cellular Medicine. 2014; 3(2):126-9.
15- Reimann F, Tolhurst G, Gribble FM. G-protein-coupled receptors in intestinal chemosensation. Cell Metabolis. 2012; 4:15(4):421-31.
16- Priyadarshini M, Kotlo KU, Dudeja PK, Layden BT. Role of Short Chain Fatty Acid Receptors in Intestinal Physiology and Pathophysiology. Comprehensive Physiology. 2018; 8(3):1091-1115.
17- Trotta MC, Maisto R, Guida F, Boccella S, Luongo L, Balta C, D'Amico G, Herman H, Hermenean A, Bucolo C, D'Amico M. The activation of retinal HCA2 receptors by systemic beta-hydroxybutyrate inhibits diabetic retinal damage through reduction of endoplasmic reticulum stress and the NLRP3 inflammasome. PLoS One. 2019; 14(1):e0211005.