

بررسی تأثیر ضد التهابی رزبنگال در ماکروفاژهای فعال شده با لیپوپلی ساکارید در غیاب نور

دکتر سید هادی موسوی^۱ - شهرزاد زمانی تقی زاده رابع^۲ - زهرا سیادت^۳ - دکتر محمود محمودی^۴

چکیده

زمینه و هدف: رزبنگال یک رنگ گزانتینی آنیونی محلول در آب است که سابقه طولانی استفاده بی خطر از آن، نشان دهنده اثرات جانبی بسیار کم آن می باشد. با این حال تاکنون تأثیر ضد التهابی آن بررسی نشده است. مطالعه حاضر با هدف تعیین تأثیر رزبنگال بر پاسخ التهابی با واسطه تولید اکسید نیتریک و بیان آنزیم نیتریک اکساید سنتاز القایی (iNOS) در مدل ماکروفاژهای فعال شده با لیپوپلی ساکارید (LPS) در تاریکی انجام شد.

روش تحقیق: در این مطالعه تجربی، ماکروفاژهای رده J774A.1 از انستیتو پاستور خریداری و با غلظت های متفاوت رزبنگال با یا بدون LPS در تاریکی تیمار شدند. تأثیر غلظت های مختلف رزبنگال بر درصد زنده بودن ماکروفاژها با استفاده از آزمون ام.تی.تی (MTT) بررسی شد. به منظور تعیین میزان تولید اکسید نیتریک (بر حسب میکرومول) از روش رنگ سنجی گریس و برای ارزیابی میزان بیان آنزیم نیتریک اکساید سنتاز القایی، از روش لکه گذاری وسترن استفاده شد. داده ها با استفاده از آزمون آماری تی در سطح معنی داری $P < 0.05$ مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند.

یافته ها: طبق نتایج حاصل از آزمون MTT، درصد زنده بودن ماکروفاژهای تیمار شده با غلظت های مختلف رزبنگال (۱، ۱۰، ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰ و ۳۰۰ میکرومول) به ترتیب 99 ± 0.66 ، 97 ± 1.20 ، 90 ± 0.88 ، 88 ± 0.57 ، 81 ± 0.88 و 80 ± 0.57 درصد بود. میزان تولید اکسید نیتریک (بر حسب میکرومول) توسط غلظت های مختلف رزبنگال (۱، ۱۰، ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰ و ۳۰۰ میکرومول) به ترتیب $17/1 \pm 0.17$ ، $17/3 \pm 0.17$ ، $13/16 \pm 0.09$ ، $8/9 \pm 0.33$ ، $6/16 \pm 0.09$ و صفر، و در گروه شاهد $21/4 \pm 0.21$ میکرومول بود. غلظت های مختلف رزبنگال سبب کاهش بیان آنزیم iNOS شدند.

نتیجه گیری: نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که رزبنگال به طور وابسته به دوز، تولید اکسید نیتریک و نیز بیان آنزیم iNOS را در ماکروفاژهای التهابی کاهش می دهد؛ بدون این که بر درصد زنده بودن سلول ها (در غلظت های کمتر از ۲۰۰ میکرومول) تأثیر قابل توجهی داشته باشد؛ همچنین فرایند تأثیر ضد التهابی رزبنگال از طریق مهار بیان آنزیم iNOS نشان داده شد. این مطالعه رزبنگال را به عنوان یک ماده ضد التهابی بی خطر و جدید جهت بررسی در شرایط درون تنی معرفی می نماید.

واژه های کلیدی: رزبنگال؛ ماکروفاژهای رده J774A.1؛ التهاب؛ اکسید نیتریک؛ آنزیم نیتریک اکساید سنتاز القایی

مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی بیرجند. ۱۳۸۸؛ ۱۶ (۲): ۱۰-۱۷.

دریافت: ۱۳۸۶/۱۱/۴ اصلاح نهایی: ۱۳۸۷/۶/۴ پذیرش: ۱۳۸۷/۸/۲۸

^۱ استادیار گروه آموزشی فارماکولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد

^۲ کارشناس ارشد ایمونولوژی پژوهشکده بوعلی، مرکز تحقیقات ایمونولوژی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد

^۳ کارشناس ارشد تغذیه گروه آموزشی بیوشیمی و تغذیه، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد

^۴ نویسنده مسؤول؛ استاد ایمونولوژی و آلرژی، پژوهشکده بوعلی، مرکز تحقیقات ایمونولوژی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد

آدرس: مشهد- بلوار فردوسی - میدان بوعلی - پژوهشکده بوعلی

تلفن: ۰۵۱۱-۷۱۱۲۶۱۱ نمابر: ۰۵۱۱-۷۱۱۲۵۹۶ پست الکترونیکی: mahmoudim@mums.ac.ir

مقدمه

اکسید نیتریک* (NO) یک عامل فعال طبیعی مهم است و توسط آنزیم نیتریک اکسید سنتاز[†] (EC NO 1.14.13.39) از سلول‌های مختلف از جمله ماکروفاژها در بدن تولید شده و وقایع فیزیولوژیک و پاتوفیزیولوژیک مختلفی را میانجی می‌کند (۱).

سنتز اکسید نیتریک به وسیله آنزیم نیتریک اکسید سنتاز (NOS) صورت می‌گیرد. ایزوform القایی آن (iNOS)، در حالت طبیعی در ماکروفاژها بیان نمی‌شود و تولید آن نیازمند تحریک یک عامل القاکننده است. لیپوپلی ساکارید باکتریایی[‡] (LPS) از مهمترین القاکنندگان iNOS می‌باشد (۱-۴).

اکسید نیتریک یک مولکول مؤثر در فعالیت کشندگی[§] ماکروفاژها محسوب می‌شود و در دفاع میزبان و حذف عوامل بیماری‌زا، ویروس‌ها و سلول‌های توموری نقش دارد (۵-۷).

ماکروفاژها با تولید زیاد اکسید نیتریک و مشتقاتش، یعنی دی اکسید نیتروژن^{**} و پراکسی نیتريت^{††} توسط آنزیم iNOS، نقش بسیار مهمی در ایجاد التهاب ایفا می‌کنند (۸،۹).

تولید زیاد اکسید نیتریک در فرایند سرطان‌زایی^{‡‡} نیز نقش داشته (۱۰) و به بیماری‌زایی^{§§} بیماری‌های التهابی، از جمله شوک عفونی و سکت قلبی کمک می‌کند (۱۱)؛ در واقع، از طرفی تولید اکسید نیتریک توسط آنزیم iNOS در ماکروفاژها، سبب مهار رشد سلول‌های توموری و حذف پاتوژن‌های مختلف می‌شود و از طرف دیگر تولید بیش از حد و نابه‌جای آن توسط ماکروفاژها و سایر سلول‌ها، پیامدها و عوارض نامطلوبی از جمله التهاب شدید و شوک عفونی به دنبال دارد.

گرایش روزافزون علم داروسازی به ترکیبات خالص

مختلف به عنوان منبعی برای کشف داروهای جدید، لزوم شناسایی خواص ترکیبات مختلف را آشکار می‌کند. با توجه به نقش مهم آنزیم iNOS در ایجاد بیماری‌های مختلف التهابی، سرکوب بیش از حد بیان آن امری ضروری به نظر می‌رسد، ولی مهار آن توسط داروهای ضد التهابی غیراستروئیدی عوارض جانبی مختلفی دارد؛ بنابراین تلاش برای یافتن ترکیبات ضد التهابی مؤثر با حداقل عوارض جانبی ادامه دارد.

رزبنگال (RB)^{***} با ترکیب شیمیایی ۴ و ۵ و ۶ و ۷-تتراکلرو-۲ و ۳ و ۴ و ۵ و ۷-تترایدوفلئورسین دی سدیم^{†††}، یک رنگ گزانتینی آنیونی محلول در آب است که با تشعشع نور سبز و از طریق فرایند فتوکاتالیتیک^{‡‡‡} (تسهیل در تغییر مولکول‌ها در مجاورت نور)، اکسیژن مولکولی را به اکسیژن منفرد تبدیل می‌کند (۱۲،۱۳)؛ سابقه طولانی استفاده بی‌خطر از آن به عنوان یک سیستم تشخیصی عملکرد کبد (۱۴،۱۵) و نیز تشخیص بینایی توپیکال^{§§§} (۱۶،۱۷) نشان می‌دهد که رزبنگال اثرات جانبی بسیار کمی دارد (۱۸).

در یک مطالعه، تأثیر رزبنگال بر القای آپوپتوز و تغییرات میتوکندری در رده سلول‌های سرطان رحم (Hela) نشان داده شد (۱۹)؛ همچنین رزبنگال تکثیر رده سلول‌های ملانوما را با واسطه القای آپوپتوز در شرایط برون‌تنی^{****} مهار می‌کند (۲۰). در یک بررسی تأثیر تزریق زیرجلدی رزبنگال در بهبود بیماران مبتلا به ملانوما نشان داده شده است. در این بررسی، استفاده از رزبنگال سبب بهبود ضایعات ملانوما در بیماران مبتلا به ملانوما شد (۲۱). از آنجا که تزریق رزبنگال در محل یک ضایعه ملانومایی، سبب بهبود ضایعات مجاور نیز می‌شود، این طور فرض می‌شود که رزبنگال تأثیر تنظیم‌کننده بر سیستم ایمنی نیز داشته باشد؛ بنابراین در این مطالعه تأثیر رزبنگال بر روی ماکروفاژهای التهابی در شرایط برون‌تنی

*** Rose Bengal

††† 4,5,6,7-tetrachloro-2',4',5',7'-tetraiodofluorescein disodium (C₂₀H₂Cl₄I₄Na₂O₃)

‡‡‡ Photocatalytic

§§§ Topical Ophthalmic Diagnosis

**** In-vitro

* Nitric Oxide

† Nitric Oxide Synthase

‡ Bacterial Lipopolysaccharide

§ Cytotoxicity

** Nitrogen dioxide

†† Peroxynitrite

‡‡ Carcinogenesis

§§ Pathogenesis

بررسی شد. مطالعه حاضر با هدف تعیین تأثیر ضد التهابی رزبنگال در تاریکی و نه به عنوان یک ماده حساس ساز به نور* انجام شد.

روش تحقیق

در این مطالعه بنیادی، رده سلولی مونوسیت/ماکروفاژ موشی J774A.1 (NCBI C483) از بانک سلولی مؤسسه پاستور ایران تهیه شد. از سلول‌ها در فلاسک حاوی محیط کشت DMEM[†] غنی شده با سرم جنینی گاوی[‡] (FCS) ۱۰٪، ۱۰۰ U/mL پنی سیلین، ۱۰۰ µg استرپتومایسین و ۲ mM ال-گلوتامین و دمای ۳۷ درجه سانتیگراد در انکوباتور حاوی CO₂ نگهداری شد. برای انجام آزمایش‌های مختلف، زمانی که حداقل ۷۰٪ ماکروفاژ در فلاسک کشت به حالت Confluent رسیدند، از ته پلیت جدا و برای انجام آزمایش‌های مختلف استفاده شدند. تمامی غلظت‌ها در گروه‌های پنج‌تایی بررسی شدند و هر آزمون حداقل سه بار تکرار شد.

به منظور بررسی تأثیر رزبنگال بر درصد زنده بودن سلولی، از روش ام.تی.تی.[§] استفاده شد (۲۲). اساس این آزمون، شکستن نمک تترازولیوم توسط آنزیم سوکسینات دهیدروژناز میتوکندریایی^{**} سلول‌های زنده است. نتیجه این فعالیت ایجاد بلورهای فورمازان^{††} ارغوانی رنگ می‌باشد که توسط دی‌متیل سولفوکساید^{‡‡} (DMSO) به صورت محلول در می‌آیند. هر چه سلول‌ها فعال‌تر و تعدادشان بیشتر باشد، میزان رنگ ایجاد شده بیشتر است. این روش بر آزمون ال.تی.تی.^{§§} که با مواد رادیواکتیو کار می‌کند، مزیت دارد؛ بدین منظور ۱۰^۴×۱۲ عدد سلول به صورت گروه‌های مختلف

در هر چاهک میکروپلیت ۹۶ خانه‌ای ریخته و از آنها به مدت ۲۴ ساعت با غلظت‌های مختلف رزبنگال، تیمار شد. بعد از ۲۴ ساعت، ۲۵ میکرولیتر از محلول ام.تی.تی. (۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) به هر چاهک افزوده شد و پلیت به مدت ۳ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد در تاریکی تیمار شد؛ سپس ۲۰۰ میکرولیتر دی‌متیل سولفوکساید به هر چاهک اضافه گردید. پلیت به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق قرار داده شد و سپس جذب نمونه‌ها با استفاده از دستگاه خواننده الیزا^{***} در طول موج ۵۴۵ نانومتر در مقابل بلانک (DMSO) قرائت شد و درصد زنده بودن سلول‌های گروه‌های مورد، با استفاده از فرمول $100 \times (OD \text{ شاهد} / OD \text{ مورد})$ محاسبه گردید.

به منظور بررسی تأثیر رزبنگال بر تولید اکسید نیتریک و بیان آنزیم نیتریک اکساید سنتاز القایی، ماکروفاژها در تاریکی به صورت گروه‌های زیر مورد بررسی قرار گرفتند:

گروه شاهد:

- ماکروفاژهای تیمار نشده که تنها در مجاورت محیط کشت قرار داده شدند.

گروه‌های مورد:

- ماکروفاژهایی که با محیط حاوی لیپوپلی ساکارید یا LPS (Escherichia coli serotype B4: 0111) محصول شرکت سیگما)، با غلظت ۱ µg/ml تیمار شدند.

- ماکروفاژهایی که ابتدا به مدت یک ساعت با غلظت‌های مختلف رزبنگال (۱، ۱۰، ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰ و ۳۰۰ میکرومول) و سپس با LPS با غلظت ۱ µg/mL تیمار شدند. از روش رنگ سنجی گریس^{†††} برای سنجش میزان تولید اکسید نیتریک استفاده شد (۲۳). در این روش، میزان تجمع NO₂ به عنوان شاخص میزان تولید NO در مایع رویی سلول‌های کشت داده شده توسط بافر گریس و استفاده از منحنی استاندارد نیتريت سدیم تعیین شد.

ماکروفاژهای J774A.1 کشت داده شده در گروه‌های مورد و شاهد به تعداد ۸×۱۰^۵ عدد در هر چاهک پلیت ۲۴

*** Elisa reader

††† Colorimetric Griess Assay

* Photosensitizer

† Dulbecco's Modified Eagle's Medium

‡ Fetal Calf Serum

§ MTT [3-(4,5 dimethylthiazol-2-yl)-2,5 diphenyl tetrazolium bromide] Assay

** Mitochondrial Succinate Dehydrogenase

†† Formazan Crystals

‡‡ Dimethyl Sulfoxide

§§ Lymphocyte Transformation Test

خانه‌ای ریخته شدند.

پس از ۱۸ ساعت، مایع رویی ماکروفاژها با محلول حاوی ان (نفتیل) اتیلن آمید دی‌هیدروکلراید*، سولفانیل‌آمید† و اسید فسفوریك‡ ۵٪ و آب مقطر در دمای اتاق تیمار شده، سپس جذب نمونه‌ها توسط دستگاه خواننده الیزا در طول موج ۵۴۵ نانومتر قرائت شد. غلظت نیتريت تولید شده توسط ماکروفاژهای گروه شاهد و مورد بر اساس منحنی استاندارد نیتريت سدیم (بر حسب میکرومول) با استفاده از نرم‌افزار اکسل تعیین شد.

به منظور بررسی تأثیر غلظت‌های مختلف رزبنگال بر بیان آنزیم نیتريك اکساید سنتاز القایی از روش لکه‌گذاری وسترن§ استفاده شد. ماکروفاژهای J774A.1 کشت داده‌شده در گروه‌های مورد و شاهد به تعداد $1 \times 10^6 \times 1/5$ عدد در هر چاهک ۶ خانه‌ای ریخته شدند. بعد از ۲۴ ساعت انکوباسیون، سلول‌ها دو بار با بافر فسفات سالین** (PBS) سرد شستشو و در محلول لیزینگ زیر تجزیه شدند.

Tris-HCl (20mM, pH 7.5), NaF (10mM), NaCl (150mM), Nonidet P40 (1%), phenylmethylsulphonyl fluoride (1mM), Na3VO4 (1mM), protease inhibitor cocktail.

پس از یک ساعت، محلول لیزشده سلولی به مدت ۱۵ دقیقه با دور ۱۴۰۰rpm در دمای ۴ درجه سانتیگراد سانتریفوژ گردید و از محلول رویی به عنوان عصاره سیتوزولی استفاده شد. غلظت پروتئین عصاره سیتوزولی با استفاده از روش برادفورد†† و منحنی استاندارد سرم آلبومین گاوی تعیین شد. ۵۰ میکروگرم پروتئین لیزات (موجود در عصاره سیتوزولی گروه‌های مورد و شاهد) همراه بافر لاملی‡‡ (حاوی سدیم

دودسیل سولفات (SDS)§§، ۲-مرکاپتو اتانول (2-ME)*** و بلوبرموفنل††† بر روی ژل ۸٪ پلی‌آکریل آمیل‡‡‡ همراه سدیم دودسیل سولفات الکتروفورز شد.

لکه‌گذاری وسترن با انتقال پروتئین‌ها از ژل بر روی غشای پلی‌وینیلیدن فلوراید§§§ به مدت ۱۵ دقیقه و ۳۰۰ میلی‌آمپر در دمای اتاق صورت گرفت. به منظور ردیابی پروتئین iNOS، غشا به مدت ۱۸ ساعت در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد با محلول حاوی ۵٪ شیر خشک**** و بافر فسفات سالین بلوکه شد؛ سپس غشا با غلظت ۱/۲۰۰ از آنتی‌بادی علیه iNOS موشی به مدت ۲ ساعت در دمای اتاق تیمار شد. بعد از این زمان، غشا ۵ بار شستشو داده شده و به مدت یک ساعت با آنتی‌بادی ثانویه†††† با غلظت ۱/۱۰۰۰۰ در دمای اتاق تیمار شد؛ سپس بلات‌ها شستشو داده شدند و با استفاده از معرف‌های ردیابی شیمی‌لومینسنت††††† بر طبق دستور شرکت سازنده مجاور شده و باند ۱۳۰ کیلو دالتونی iNOS با استفاده از دستگاه ردیاب سیگنال‌های ECL ظاهر شد.

داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS تجزیه و تحلیل شدند. با استفاده از آزمون کولموگروف-اسمیرنوف§§§§ مشخص شد که داده‌ها دارای توزیع نرمال هستند؛ بنابراین برای بررسی داده‌ها از آزمون آماری پارامتری تی به منظور مقایسه داده‌ها بین گروه‌های مورد (ماکروفاژهای تیمار شده با LPS و غلظت‌های مختلف رزبنگال) به صورت جداگانه با گروه شاهد (ماکروفاژهای تیمار شده با LPS به تنهایی) استفاده گردید. سطح معنی‌داری $P < 0.05$ در نظر گرفته شد.

§§ Sodium Dodecyl Sulfate

*** 2-mercaptoethanol

††† Bromophenol Blue

‡‡‡ Polyacrylamide Gel

§§§ Polyvinylidene Fluoride

**** Skim Milk

†††† Anti-mouse IgG-HRP Conjugate

†††† The Amersham Biosciences ECL (Enhanced

Chemiluminescence) Western Blotting Detection System

§§§§ Kolmogorov-Smirnov Test

* N-(naphthyl)-ethylenediamine dihydrochloride

† Sulfanilamide

‡ Phosphoric Acid

§ Western Blotting Protocol

** Phosphate Buffered Saline

†† Bradford Protein Assay

‡‡ Laemmli Buffer

یافته‌ها

دادند که رزبنگال به طور وابسته به دوز، سبب کاهش بیان آنزیم iNOS شده است (شکل ۱).

جدول ۱- مقایسه میانگین میزان تولید NO توسط ماکروفاژهای J774A.1 تحریک شده با LPS بعد از ۲۴ ساعت تیمار با غلظت‌های مختلف رزبنگال

نتیجه آزمون آماری *	غلظت نیتريت توليد شده (میکرومول)	رزبنگال (میکرومول)
-	$21/4 \pm 0/21$	۰
$P=0/094$	$17/1 \pm 0/17$	۱
$P<0/05$	$14/3 \pm 0/17$	۱۰
$P<0/05$	$13/16 \pm 0/09$	۵۰
$P<0/05$	$8/9 \pm 0/32$	۱۰۰
$P<0/05$	$6/16 \pm 0/09$	۲۰۰
$P<0/05$	۰	۳۰۰

* مقادیر P ذکر شده مربوط به مقایسه هر گروه با گروه شاهد می باشد.

جدول ۲- میانگین درصد زنده بودن ماکروفاژهای J774A.1 بعد از ۲۴ ساعت تیمار با غلظت‌های مختلف رزبنگال

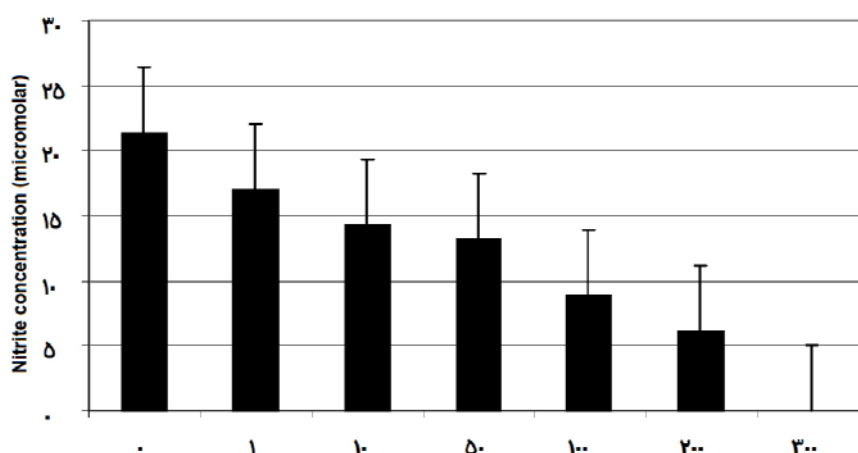
درصد زنده بودن سلول‌ها	رزبنگال (میکرومول)
$99 \pm 0/66$	۱
$97 \pm 1/20$	۱۰
$90 \pm 0/88$	۵۰
$88 \pm 0/57$	۱۰۰
$81 \pm 0/88$	۲۰۰
$80 \pm 0/57$	۳۰۰

تأثیر مهاري رزبنگال بر توليد اكسيد نيتريك در نمودار ۱ و جدول ۱ نشان داده شده است. رزبنگال به طور وابسته به دوز، توليد اكسيد نيتريك را به ميزان قابل توجهي توسط ماکروفاژهای فعال شده با LPS مهار می کند.

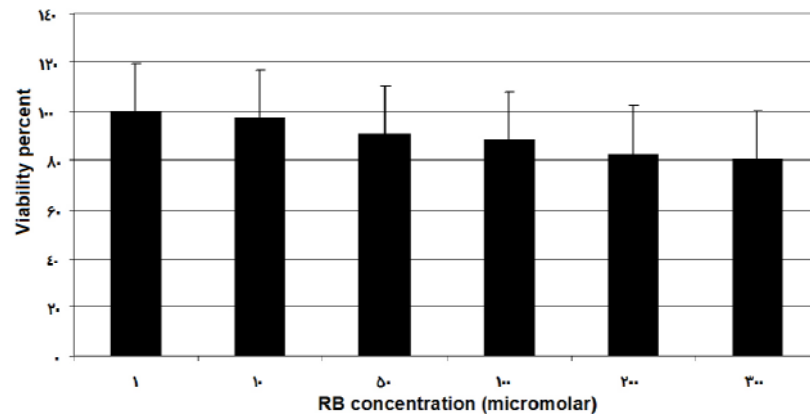
میزان تولید اکسید نیتريك (بر حسب میکرومول $\pm$ انحراف معیار خطا) توسط غلظت‌های مختلف رزبنگال (۱، ۱۰، ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰ و ۳۰۰ میکرومول) به ترتیب $17/1 \pm 0/17$ ، $14/3 \pm 0/17$ ، $13/16 \pm 0/09$ ، $8/9 \pm 0/32$ ، $6/16 \pm 0/09$ و صفر میکرومول و در گروه شاهد $21/4 \pm 0/21$ میکرومول توسط ماکروفاژهای فعال شده با LPS بود.

نتایج حاصله نشان می دهند که رزبنگال می تواند تولید اكسيد نيتريك را مهار نماید؛ همچنین، طبق نتایج حاصل از تست ام.تی.تی، درصد زنده بودن توسط غلظت‌های مختلف رزبنگال (۱، ۱۰، ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰ و ۳۰۰ میکرومول) به ترتیب $99 \pm 0/66$ ، $97 \pm 1/20$ ، $90 \pm 0/88$ ، $88 \pm 0/57$ ، $81 \pm 0/88$ و $80 \pm 0/57$ درصد بود.

این نتایج نشان دادند که غلظت‌های کمتر از ۲۰۰ میکرومول رزبنگال تأثیر سایتوتوکسیک قابل توجهی بر سلول‌های تیمار شده نداشتند (نمودار ۲ و جدول ۲). ظهور باندهای iNOS حاصل از لکه گذاری وسترن نشان

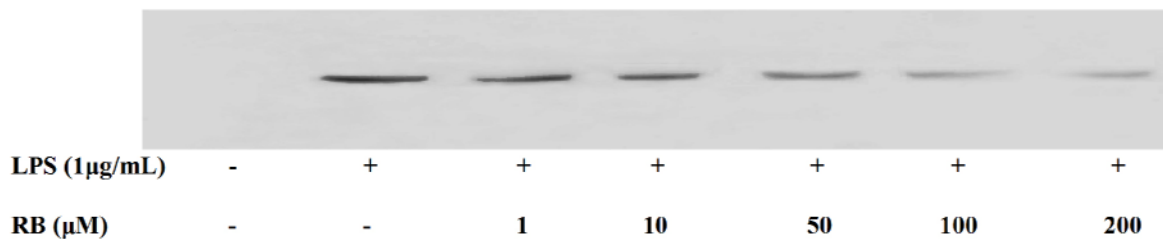


نمودار ۱- مقایسه میانگین میزان تولید NO توسط ماکروفاژهای J774A.1 تحریک شده با LPS بعد از ۲۴ ساعت تیمار با غلظت‌های مختلف رزبنگال



LPS (1μg/mL)	+	+	+	+	+	+	+
RB (μM)	-	+	+	+	+	+	+

نمودار ۲- مقایسه میانگین درصد زنده بودن ماکروفاژهای J774A.1، بعد از ۲۴ ساعت تیمار با غلظت‌های مختلف رزبنگال



شکل ۱- تنظیم بیان iNOS توسط غلظت‌های مختلف رزبنگال در ماکروفاژهای J774A.1 تحریک شده با LPS

بحث

به منظور ایجاد یک مدل التهابی، ماکروفاژها در شرایط برون تنی با لیپوپلی ساکارید ($1\mu\text{g/mL}$) تیمار شدند که محرک قوی تولید اکسید نیتریک و بیان آنزیم نیتریک اکساید سنتاز القایی می‌باشد؛ سپس غلظت‌های مختلف رزبنگال به ماکروفاژهای التهابی اضافه شد و تولید اکسید نیتریک (توسط روش گریس) و بیان آنزیم نیتریک اکساید سنتاز القایی (توسط روش لکه گذاری وسترن) ارزیابی گردید. غلظت‌های مورد استفاده رزبنگال (جز غلظت 1 میلی مولار) در سطح معنی داری تولید اکسید نیتریک را توسط ماکروفاژهای فعال شده با LPS مهار کردند و این مهار وابسته به دوز بود؛ همچنین، میزان بیان پروتئین آنزیم نیتریک اکساید سنتاز القایی که به منظور تایید تأثیر مهار رزبنگال بر تولید NO و نیز بررسی چگونگی این تأثیر ارزیابی شد، این مهار وابسته به دوز را تایید کرد؛ بنابراین غلظت‌های کمتر از 200 میلی مولار رزبنگال می‌تواند اثر ضد التهابی خوب بدون سمیت قابل

مقادیر اندک اکسید نیتریک تنظیم کننده مهم هموستاز فیزیکی می‌باشد؛ در حالی که مقادیر زیاد آن با بیماری‌ها و شرایط التهابی مختلف ارتباط نزدیکی دارد. بعد از مواجهه با القاکننده‌های مختلف از جمله لیپوپلی ساکارید باکتری‌های گرم منفی، سنتز آنزیم iNOS در بسیاری از سلول‌ها، از جمله ماکروفاژها القا شده و توانایی کشندگی سلولی، آسیب بافتی، عفونت التهابی و شوک را بر می‌انگیزد (۲۴، ۲۵)؛ بنابراین سنجش میزان تولید اکسید نیتریک می‌تواند روشی جهت ارزیابی اثرات ضد التهابی ترکیبات دارویی مختلف باشد.

در این مطالعه تأثیر رزبنگال بر تولید اکسید نیتریک و نیز بیان آنزیم iNOS در ماکروفاژهای رده J774A.1 بررسی شد. طبق نتایج حاصل از تست ام.تی.ام.تی، تیمار با غلظت‌های کمتر از 200 میکرومول رزبنگال تأثیر سیتوتوکسیک قابل توجهی بر ماکروفاژها نداشت.

توجهی بر ماکروفاژها داشته باشند. این معیارها نشان می‌دهند که رزبنگال می‌تواند به عنوان یک ماده ضد التهابی جدید و بی‌خطر در بررسی در شرایط درون تنی مورد استفاده قرار گیرد. نتیجه گیری در این مطالعه نشان داده شد که رزبنگال به طور وابسته به دوز، تولید اکسید نیتریک و نیز بیان آنزیم نیتریک اکساید سنتاز را در ماکروفاژهای التهابی کاهش می‌دهد؛ بدون این که تأثیر قابل توجهی بر زنده بودن سلول‌ها (در غلظت‌های کمتر از ۲۰۰ میکرومول) داشته باشد. همچنین چگونگی تأثیر ضد التهابی رزبنگال از طریق مهار بیان آنزیم نیتریک اکساید سنتاز القایی (iNOS) نشان داده شد. این نتایج نشان می‌دهد که رزبنگال می‌تواند یک عامل ضد التهابی جدید برای بررسی در شرایط درون تنی باشد.

منابع:

- 1- Nathan CF, Gabay J. Antimicrobial mechanisms of macrophages. *Mononuclear phagocytes*. 1992; 12: 256-267.
- 2- Marletta M. Nitric oxide synthase structure and mechanism. *J Biol Chem*. 1993; 268 (17): 12231-12234.
- 3- Albina JE, Reichner JS. Role of nitric oxide in mediation of macrophage cytotoxicity and apoptosis. *Cancer Metastasis Rev*. 1998; 17 (1): 39-53.
- 4- Ryu JH, Ahn H, Kim JY, Kim YK. Inhibitory activity of plant extracts on nitric oxide synthesis in LPS-activated macrophages. *Phytother Res*. 2003; 17 (5): 485-489.
- 5- Oshima H, Bartsch H. Chronic infectious and inflammation process as cancer risk factors: possible role of nitric oxide in carcinogenesis. *Mutat Res*. 1994; 305 (2): 253-264.
- 6- Kilbourn RG, Belloni P. Endothelial cell production of nitrogen oxides in response to interferon gamma in combination with tumor necrosis factor, interleukin-1, or endotoxin. *J Natl Cancer Inst*. 1990; 82 (9): 772-776.
- 7- Moncada S, Palmer RM, Higgs EA. Nitric oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology. *Pharmacolol Rev*. 1991; 43 (2): 109-142.
- 8- Macmicking JD, Nathan C, Hom G, Chartrain N, Fletcher DS, Trumbauer M, et al. Altered responses to bacterial-infection and endotoxic shock in mice lacking inducible nitric-oxide synthase. *Cell*. 1995; 81 (4): 641-650.
- 9- Gotoh T, Mori M. Arginase II downregulates nitric oxide (NO) production and prevents NO-mediated apoptosis in murine macrophage-derived RAW 264.7 cells. *J Cell Biol*. 1999; 144 (3): 427-434.
- 10- Hobbs AJ, Higgs A, Moncada S. Inhibition of nitric oxide synthase as potential therapeutic target. *Annu Rev Pharmacol*. 1999; 39: 191-220.
- 11- Bogdan C. Nitric oxide and the immune response. *Nature Immunol*. 2001; 2 (10): 907-916.
- 12- Ito T, Kobayashi K. A survey of in vivo photodynamic activity of xanthenes, thiazines, and acridines in yeast cells. *Photochem Photobiol*. 1997; 26 (6): 581-587.
- 13- Theodossiou T, Hothersall JS, Woods EA, Okkenhaug K, Jacobson J, MacRobert AJ. Firefly luciferin-activated rose bengal: in vitro photodynamic therapy by intracellular chemiluminescence in transgenic NIH 3T3 cells. *Cancer Res*. 2003; 63 (8): 1818-1821.
- 14- Delprat GD, Epstein NN, Kerr WJ. A new liver function test: The elimination of rose Bengal when injected into the circulation of human subjects. *Arch Intern Med*. 1924; 34 (4): 533-541.
- 15- Nordyke RA. Surgical vs. nonsurgical jaundice: Differentiation by a combination of rose Bengal I131 and standard liver-function tests. *JAMA*. 1965; 194 (9): 949-953.
- 16- Marsh RJ, Fraunfelder FT, McGill JI, Phil D. Herpetic corneal epithelial disease. *Arch Ophthalmol*. 1976; 94 (11): 1899-1902.

- 17- Argüeso P, Tisdale A, Spurr-Michaud S, Sumiyoshi M, Gipson IK. Mucin characteristics of Human Corneal-Limbal Epithelial Cells that Exclude the Rose Bengal Anionic Dye. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2006; 47 (1): 113-119.
- 18- Wachter E, Dees C, Harkins J, Scott T, Petersen M, Rush RE, et al. Topical rose Bengal: pre-clinical evaluation of pharmacokinetics and safety. *Lasers Surg Med*. 2003; 32 (2): 101-110.
- 19- Panzarini E, Tenuzzo B, Palazzo F, Chionna A, Dini L. Apoptosis induction and mitochondria alteration in human HeLa tumour cells by photoproducts of Rose Bengal acetate. *J Photoch Photobio B*. 2006; 83 (1): 39-47.
- 20- Mousavi SH, Zhang XD, Sharifi M, Hersey P. Study of rose Bengal-induced cell death in melanoma cells in the absence of light. *IJBMS*. 2006; 9 (3): 216-222.
- 21- Wiener M, Damian DL, Thompson JF. Systemic phototoxicity following intralesional rose Bengal for subcutaneous melanoma metastases. *Dermatology*. 2008; 216 (4): 361-362.
- 22- Mosmann T. Rapid colometric assay for cellular growth and survival: application to proliferation cytotoxicity assay. *J Immunol Methods*. 1983; 65 (1-2): 55-63.
- 23- Schmidt HHHW, Kelm M. In: Feelish M, Stamler J. (eds.) *Methods in Nitric Oxide Research*. New York: John Wiley & Sons Press; 1996. pp: 491-497.
- 24- Laskin DL, Pendino KJ. Macrophages and inflammatory mediators in tissue injury. *Annu Rev Pharmacol*. 1995; 35: 655-677.
- 25- Zamora R, Vodovotz Y, Billiar TR. Inducible nitric oxide synthase and inflammatory diseases. *Mol Med*. 2000; 6 (5): 347-371.

Study the anti-inflammatory effect of Rose Bengal in LPS-activated macrophages in dark

S.A. Mousavi¹, Sh. Zamani TR², Z. Siadat³, M. Mahmoudi⁴

Background and Aim: Rose Bengal is a water-soluble, anionic xanthin dye. It has been used as a safe compound for many years. But, anti-inflammatory effect of Rose Bengal has not been studied. The aim of this study was to determine the effect of Rose Bengal on nitric oxide production and its inflammatory induced response and inducible nitric oxide synthase expression in LPS-activated J774A.1 macrophages as an inflammatory model in dark.

Materials and Methods: In an experimental study, J774A.1 macrophages cell line was purchased from Pasteur's institute and the cells were treated with different concentrations of Rose Bengal with or without lipopolysaccharide (LPS) in dark. The effect of different concentrations of Rose Bengal on cell viability was studied using MTT assay. Griess reagent was used to determine production of nitric oxide (micromolar) in test and control groups. Western blotting was applied to evaluate the expression of inducible nitric oxide. Data were analyzed at the significant level of $P < 0.05$ using t student-test.

Results: MTT assay showed that cell viability of treated macrophages (1, 10, 50, 100, 200 and 300 micromolar) were 99 ± 0.66 , 97 ± 1.2 , 90 ± 0.88 , 88 ± 0.57 , 81 ± 0.88 , 80 ± 0.57 percent, respectively. The amount of nitrite oxide concentration (micromolar) $\pm$ SEM by different concentrations of Rose Bengal (1, 10, 50, 100, 200 and 300 micromolar) were 17.1 ± 0.17 , 14.3 ± 0.17 , 13.1 ± 0.09 , 8.9 ± 0.32 , 6.1 ± 0.09 and 0 micromolar respectively and 21.4 ± 0.21 in control group. Expression of iNOS was decreased in a dose dependent manner by Rose Bengal.

Conclusion: The obtained results showed that Rose Bengal (below 200 micromolar) decreased nitric oxide production and iNOS expression in inflammatory macrophages without significant decreasing in their viability. Besides, its anti-inflammatory effect is mediated by inhibition of iNOS expression. Thus, Rose Bengal could be a new and safe anti-inflammatory agent for in vivo studies.

Key Words: Rose Bengal; J774A.1 macrophages; Inflammation; Nitric oxide; Inducible nitric oxide synthase

Journal of Birjand University of Medical Sciences. 2009; 16 (2): 10-17.

Received: 24.1.2008 Last Revised: 25.8.2008 Accepted: 19.11.2008

¹ Assistant Professor, Department of Pharmacology, Faculty of Medicine, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran

² M.Sc in Immunology, Bu-Ali Research Institute, Immunology Research Center, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran

³ M.Sc in Nutrition, Department of Biochemistry and Nutrition, Faculty of Medicine, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran

⁴ Corresponding Author; Professor of Immunology and Allergy, Bu-Ali Research Institute, Immunology Research Center. Mashhad, Iran. mahmoudim@mums.ac.ir