

## تاثیر گرلین بر نسبت بیان ژن *Bax/Bcl-2* در بافت ریه موش‌های صحرایی نگهداری شده در شرایط هیپوکسی مزمن

محمد رضا علیپرستی<sup>۱</sup>، مسعود دادخواه<sup>۲</sup>، دکتر محسن علیپور<sup>۳</sup>، شهره الماسی<sup>۱</sup>، دکتر هادی فیضی<sup>۳</sup>

نویسنده‌ی مسوول: گروه فیزیولوژی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی زنجان، زنجان hfeizik@zums.ac.ir

دریافت: ۹۴/۶/۹ پذیرش: ۹۴/۱۰/۷

### چکیده

**زمینه و هدف:** گرلین اعمال شناخته شده متعددی دارد. یکی از نقش‌های جدید آن اثر ضد آپوپتوزی می‌باشد. اما این اثر گرلین در آپوپتوز احتمالی القا شده توسط هیپوکسی محیطی در بافت ریه موجود زنده بررسی نشده است. هدف از این مطالعه بررسی اثر تیمار با گرلین بر میزان نسبت *Bax/Bcl-2* به عنوان شاخص رخداد آپوپتوز در بافت‌های ریه موش‌های صحرایی نگهداری شده در هیپوکسی مزمن می‌باشد. روش بررسی: تعداد ۲۴ سر موش‌های صحرایی نر نژاد ویستار به سه گروه کنترل (*C*)، هیپوکسی (*H*) و هیپوکسی همراه با گرلین (*H+G*) تقسیم شدند. القای هیپوکسی در اطفاک حاوی اکسیژن ۱۱ درصد به مدت ۲ هفته صورت گرفت. در طول مطالعه گروه‌های درمان، تزریق روزانه زیرجلدی سالین و گرلین دریافت نمودند. نسبت بیان ژنی *Bax/Bcl-2* توسط *Real-Time PCR* اندازه‌گیری شد. تغییرات بافت‌شناسی در عروق ریه جدا شده با رنگ آمیزی هماتوکسیلین-ائوزین مورد بررسی قرار گرفت.

**یافته‌ها:** هیپوکسی مزمن سبب افزایش ضخامت دیواره و کاهش قطر مجرای عروق ریوی گردید و درمان با گرلین این تغییرات را به شرایط نرمال برگرداند. نسبت بیان ژن *Bax/Bcl-2* در در بافت‌های ریه‌ی حیوانات هیپوکسیک در مقایسه با گروه کنترل تغییر معنی‌داری نشان نداد و در عین حال درمان با گرلین نیز نتوانست این نسبت را تغییر دهد.

**نتیجه‌گیری:** هیپوکسی مزمن، علی‌رغم تغییرات بافتی در عروق ریه الزاما به آسیب سلولی منجر نمی‌شود. درمان با گرلین اگرچه تغییرات بافتی را بهبود می‌بخشد ولی تاثیری بر میزان کلی آسیب بافت ریه ندارد. به نظر می‌رسد مطالعات بیشتری به خصوص در سطح سلول‌های اندوتلیال و عضله‌ی صاف عروق ضروری باشد.

واژگان کلیدی: گرلین، هیپوکسی مزمن، *Bax/Bcl-2*، ریه، موش‌های صحرایی

### مقدمه

تشعشعات ماوراء بنفش، داروهای ضد سرطان و عفونت‌های ویروسی نیز می‌توانند منجر به آپوپتوز و آسیب بافتی گردند (۲ و ۳). یکی از عوامل شناخته شده در القای آپوپتوز سلولی هیپوکسی است (۴). تاکنون در مسیرهای مولکولی منجر

مرگ برنامه‌ریزی شده یا آپوپتوز، یکی از فرآیندهای فیزیولوژیک است که به‌ویژه در طی تکامل جنین و تغییر و تحول بافت‌ها در طی حیات نقش مهمی ایفا می‌نماید (۱-۳). اما در عین حال عوامل پاتولوژیک مانند مواد شیمیایی،

۱- کارشناس ارشد ایمونولوژی، مرکز تحقیقات ایمنی‌شناسی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز

۲- دانشجوی کارشناسی ارشد فیزیولوژی، گروه فیزیولوژی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی زنجان، زنجان

۳- دکترای فیزیولوژی، استادیار گروه فیزیولوژی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی زنجان، زنجان

به آپوپتوز، پروتئین‌های متعددی شناخته شده‌اند که البته برخی از آن‌ها پیش برنده و برخی بازدارنده‌ی آپوپتوز محسوب می‌شوند (۵). در این میان یکی از ایندکس‌های شناخته شده، نسبت Bax/Bcl-2 می‌باشد که افزایش این نسبت سلول را به سمت آپوپتوز سوق می‌دهد (۶). شایان ذکر است که افزایش پروتئین Bax به شروع آپوپتوز و افزایش پروتئین Bcl-2 به جلوگیری از آن کمک می‌نماید (۷). مطالعات متعددی نشان داده که هیپوکسی می‌تواند در یکی از مسیرهای خود، با افزایش نسبت Bax/Bcl-2 منجر به مرگ سلولی گردد (۸-۱۰). هیپوکسی محیطی یکی از عواملی است که می‌تواند منجر به آپوپتوز در سلول‌ها از جمله بافت ریه گردد (۹-۱۳). گرلین هورمون پپتیدی حاوی ۲۸ اسید آمینه است که این هورمون از نواحی فوندوس معده و عمدتاً توسط سلول‌های انتروکرومافین مخاط اکسینتیک ترشح می‌شود ولی گیرنده‌های آن در بافت‌های مختلف بدن از جمله قلب، ریه، کبد، کلیه‌ها، معده، روده و بافت چربی وجود دارد (۱۴ و ۱۵). تاکنون مطالعات زیادی برای شناسایی نقش‌های فیزیولوژیک گرلین صورت گرفته و به نظر می‌رسد با توجه به گستردگی گیرنده‌های آن در ارگان‌های مختلف می‌توان اثرات متفاوتی را از این پپتید انتظار داشت (۱۵ و ۱۶). یکی از

نقش‌هایی که اخیراً به آن نسبت داده می‌شود، اثرات ضد آپوپتوز این پپتید می‌باشد (۱۷-۱۹). همچنین در مطالعه‌ای توسط هوانگ و همکاران، مشخص شد که گرلین نسبت Bcl-2/Bax را افزایش و از این طریق آپوپتوز را کاهش می‌دهد (۲۰). در مطالعات گذشته به خوبی نشان داده شده که تیمار با گرلین می‌تواند مانع از مرگ سلولی در بافت‌هایی چون قلب و کلیه گردد، هر چند که آپوپتوز در این مطالعات ناشی از هیپوکسی نبوده است (۲۱-۲۵). در ارتباط با نقش حمایتی گرلین در آسیب عروقی ریه طی هیپوکسی مطالعات گسترده‌ای شکل گرفته و در آن‌ها نشان داده شده که تیمار با گرلین از طریق مکانیسم‌های مختلف

روشنی بر HPV (Hypoxic Pulmonary Vasoconstriction) را تخفیف و مانع از پرفشاری ریه و هیپرتروفی بطن راست می‌گردد (۲۶-۲۹). در خصوص پاتوژنز پرفشاری ریه ناشی از HPV فرضیه‌های متعددی وجود دارد (۳۰)، اما گروهی از محققین معتقدند که هیپوکسی مزمن سبب می‌شود تا جمعیتی از سلول‌های اندوتلیال عروق ریوی به آپوپتوز مقاوم شده و این امر موجب تکثیر پیشرونده این سلول‌ها در عروق مذکور و منجر به تنگی عروقی و عوارض بعدی گردد (۱۰-۱۲). این در حالیست که دسته‌ای از مطالعات نشان داده‌اند که یک عامل افزایش ضخامت شریان‌های ریوی در طی هیپوکسی، سرکوب آپوپتوز میتوکندریایی در سلول‌های عضله صاف شریان‌های ریوی و در نتیجه تکثیر مهار نشده آن‌هاست (۳۱ و ۳۲).

### روش بررسی

**حیوانات آزمایشگاهی:** در این تحقیق تجربی از موش‌های صحرایی سفید نر بالغ نژاد ویستار با وزن تقریبی ۲۰۰ تا ۲۵۰ گرم پرورش یافته در مرکز پرورش حیوانات دانشگاه علوم پزشکی تبریز استفاده شد. حیوانات به مدت ۲۴ ساعت قبل از شروع مطالعه، به‌منظور تطابق با محیط به آزمایشگاه منتقل شدند. درجه‌ی حرارت محل نگهداری حیوانات حدود  $22 \pm 2$  درجه‌ی سانتی‌گراد تنظیم شد. ساعات روشنایی و تاریکی به‌صورت ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی تنظیم گردید. حیوانات در ۳ گروه کنترل (C)، هیپوکسی مزمن همراه سالین (H+S) و هیپوکسی مزمن به همراه گرلین (H+G)، و هر گروه شامل ۱۰ سر موش صحرایی بطور

Total RNA اندازه‌گیری شد. برای این کار RNA به نسبت ۱/۱۰۰ با آب مقطر رقیق شده و در طول موج‌های ۲۶۰، ۲۸۰ و ۳۲۰ نانو متر میزان جذب آن اندازه‌گیری شد. برای تهیهی cDNA، ۵ میکروگرم از RNA تام با استفاده از کیت استاندارد Revert Aid™ First Strand cDNA (Synthesis Kit, Fermentas) به cDNA تبدیل گردید. به‌منظور جلوگیری از آلودگی با DNA ژنومیک، قبل از ساخت cDNA از آنزیم DNaseI استفاده می‌شود. ژن‌های Bax و Bcl-2 و نیز ژن بتا اکتین به‌عنوان House keeping با استفاده از Syber Green PCR Master Mix (Roche, USA) دستگاه Rotor- Gene 6000 (Corbett, Australia) تکثیر شدند. مرحله‌ی دناچوراسیون یک سیکل ۱۰ دقیقه‌ای در دمای ۹۵ درجه‌ی سانتی‌گراد بود و مرحله‌ی آمپلیفیکاسیون ۱۵ ثانیه در دمای ۹۵ درجه‌ی سانتی‌گراد، ۳۰ ثانیه در دمای ۵۷ درجه‌ی سانتی‌گراد و ۶۰ ثانیه در دمای ۶۰ درجه‌ی سانتی‌گراد در ۴۰ سیکل انجام شد. مقادیر  $\Delta\Delta Ct$ ،  $\Delta Ct$  و Relative Quantitation (RQ) با استفاده از نرم‌افزار Excel و Ct حاصله از مرحله‌ی قبل محاسبه گردید و با استفاده از نرم‌افزار Opticon monitor 3 مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. توالی پرایمرهای اسفاده شده در جدول ۱ آورده شده است.

تصادفی تقسیم گردیدند. موش‌های نگهداری شده در هیوکسی که در مطالعه بافت شناسی تغییر ساختاری عروق ریوی آن‌ها محرز می‌شد برای انجام آزمایش PCR انتخاب می‌گردیدند که در نهایت نتایج اخذ شده از ۸ سر موش گزارش گردید.

**روش القای هیپوکسی:** جهت ایجاد شرایط هیپوکسیک، حیوانات در دستگاه هیپوکسی محیطی ساخت کمپانی Biomedtech استرالیا قرار داده شده و روزانه، به جز ۳۰ دقیقه برای تمیز کردن قفس‌ها و دادن آب و غذا و تزریقات، در محیط دارای اکسیژن ۱۱ درصد نگهداری شدند (۲۸ و ۲۹).

**تیمار با گرلین:** گرلین تهیه شده از شرکت توکریس انگلستان در گروه H+G، به‌صورت زیر جلدی و با دوز ۱۵۰ میکروگرم بر کیلوگرم روزانه به مدت ۱۴ روز تزریق گردید (۲۸ و ۲۹). از آنجایی که سالیین به‌عنوان حلال مورد استفاده قرار گرفت، حیوانات گروه H+S روزانه تزریق زیرجلدی سالیین دریافت نمودند.

**استخراج RNA، سنتز cDNA و انجام PCR:** بعد از دو هفته نگهداری حیوانات در شرایط هیپوکسی، بافت ریه‌ی آن‌ها با روش جراحی استریل خارج شده و RNA total بافت مذکور با استفاده از روش TRizol (Invitrogen) مطابق با دستور العمل شرکت سازنده استخراج گردید. سپس با استفاده از دستگاه Biofotometer (ependorf) میزان

جدول ۱: توالی نوکلئوتیدی پرایمرهای مورد استفاده در مطالعه

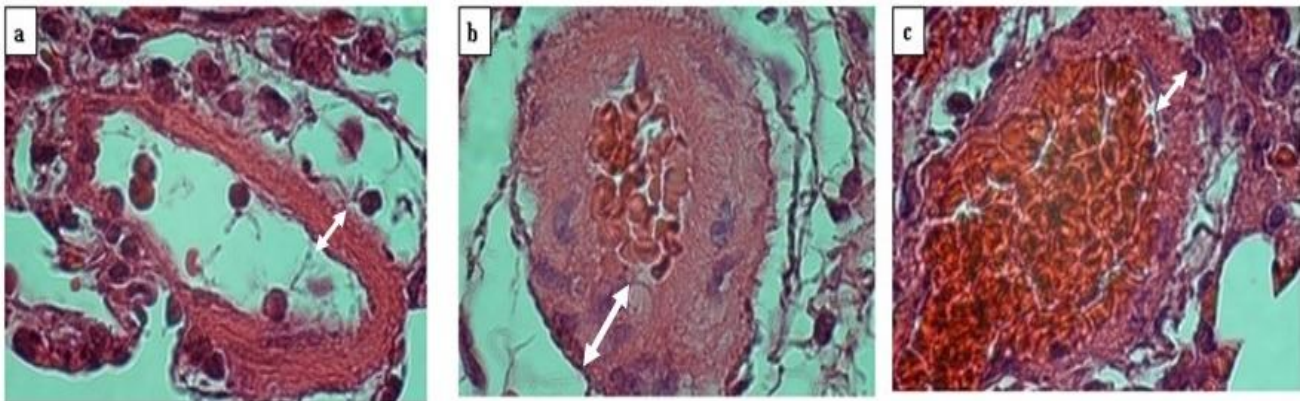
Gene	Forward Primer	Reverse Primer	Product Size [bp]
<i>Bax</i>	GACACCTGAGCTGACCTTGG	GAGGAAGTCCAGTGTCCAGC	۳۱۰
<i>Bcl-2</i>	ATCGCTCTGTGGATGACTGAGTAC	AGAGACAGCCAGGAGAAATCAAAC	۱۳۴
$\beta$ -actin	TCCTCCTGAGCGCAAGTACTCT	GCTCAGTAACAGTCCGCTAGAA	۱۵۳

بررسی بافت شناسی: لوب میانی ریه‌ی راست حیوانات در محلول فرمالین جهت فیکس شدن قرار داده شد. پس از خارج کردن از فرمالین، بافت‌ها آب‌گیری و قالب‌گیری شده و سپس از آن‌ها برش‌گیری صورت گرفت. برش‌های تهیه شده از بافت‌ها طبق روش استاندارد با هماتوکسیلین و ائوزین رنگ آمیزی شدند.

روش‌های آماری: توزیع نرمال داده‌ها با نرم‌افزار Stata (version 11) و برنامه qnorm ارزیابی شد و متغیرهایی که توزیع نرمال داشتند با میانگین و انحراف از معیار گزارش شدند. تفاوت بین گروه‌ها با استفاده از آزمون One-Way ANOVA مورد بررسی قرار گرفت و مقایسه‌ی سطح بیان ژن گروه‌های هیپوکسی یا هیپوکسی با گرلین و گروه کنترل با آزمون Independent-Samples T Test انجام شد. نتایج با استفاده از نرم‌افزار SPSS ۱۵ و

#### یافته‌ها

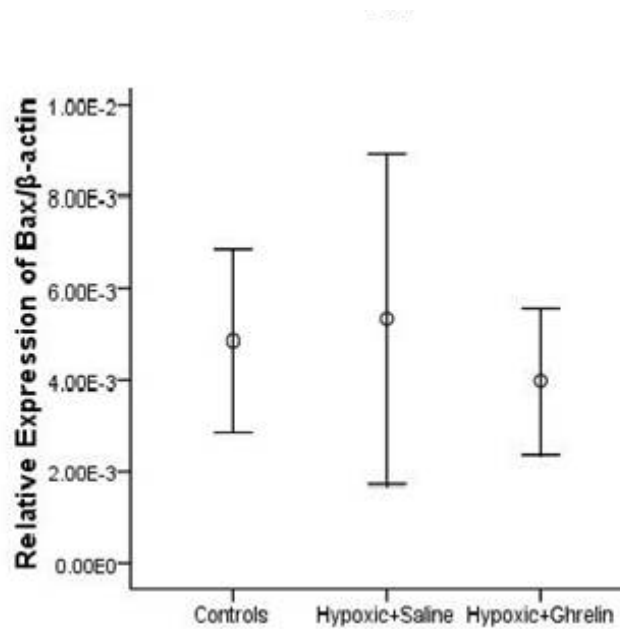
تغییرات بافت‌شناسی: همان‌گونه که در شکل ۱ نشان داده شده است، بررسی برش‌های ریه‌ی حیوانات در گروه‌های مورد آزمون و کنترل پس از رنگ آمیزی با هماتوکسیلین و ائوزین نشان می‌دهد که در گروه H+S میزان ضخامت دیواره‌ی رگ نسبت به گروه کنترل افزایش یافته و در عوض میزان قطر مجرای رگ مورد نظر کاهش نشان می‌دهد. تیمار با گرلین سبب شد تا ضخامت افزایش یافته دیواره‌ی عروق ریوی حیوانات هیپوکسیک مشابه گروه کنترل گردد.



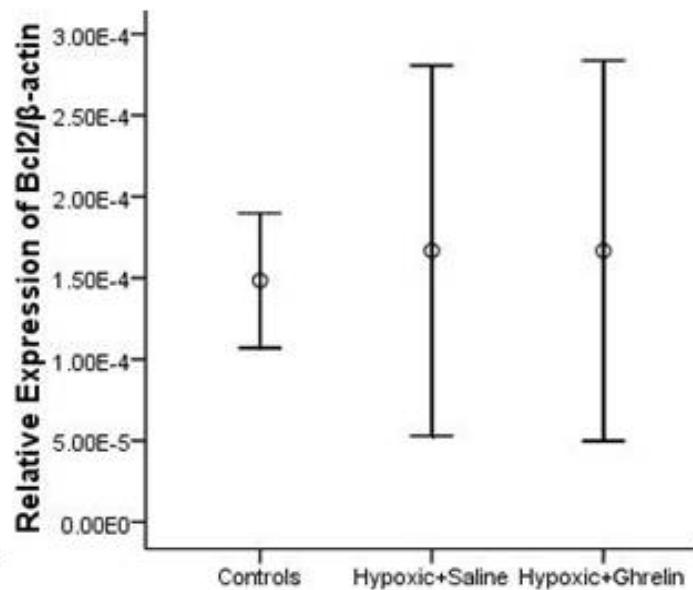
شکل ۱. فتومیکروگراف‌ها، عروق ریوی را در حیوانات گروه کنترل (a)، هیپوکسی همراه با سالین (b) و هیپوکسی همراه با گرلین (c)، با بزرگنمایی 100x نشان می‌دهند. ضخامت دیواره‌ی عروق در تصویر توسط پیکان‌ها مقایسه شده است.

این بافت‌ها، تغییر معنی‌داری در مقایسه با حیوانات گروه کنترل نشان نداد ( $P=0/725$ ) (نمودار ۲). هیپوکسی سبب تغییر در نسبت بیان ژن Bax/Bcl-2 در بافت ریه در مقایسه با رت‌های گروه کنترل نگردید (نمودار ۳).

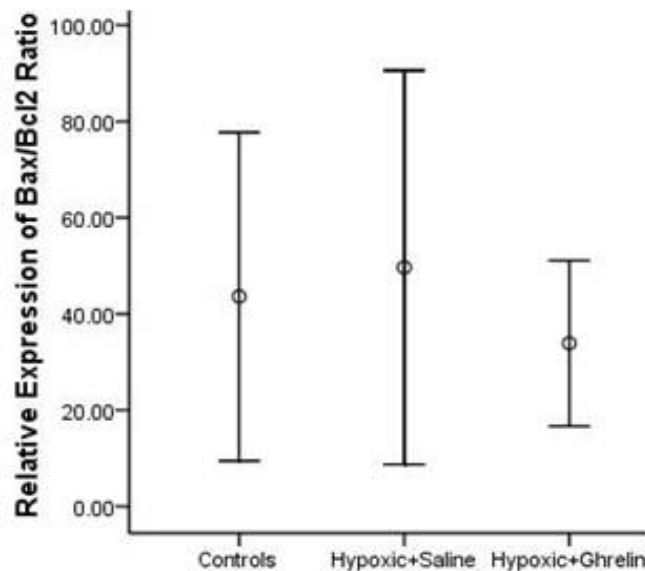
تاثیر هیپوکسی بر میزان بیان ژن‌های Bax و Bcl-2 و نیز نسبت بیان ژنی Bax/Bcl-2 در بافت‌های ریه: میزان بیان Bax در بافت ریه حیوانات هیپوکسیک، تغییر معنی‌داری در مقایسه با حیوانات گروه کنترل نداشت ( $P=0/801$ ) (نمودار ۱). از طرفی میزان بیان Bcl-2 نیز در



نمودار ۱. میانگین  $\pm$  انحراف از معیار میزان بیان ژن *Bax* در بافت ریه حیوانات گروه کنترل، هیپوکسیک+سالین و هیپوکسیک+گرلین.



نمودار ۲. میانگین  $\pm$  انحراف از معیار میزان بیان ژن *Bcl2* در بافت ریه حیوانات گروه کنترل، هیپوکسیک+سالین و هیپوکسیک+گرلین.



نمودار ۳. میانگین  $\pm$  انحراف از معیار میزان نسبت بیان ژنی Bax/Bcl2 در بافت ریه حیوانات گروه کنترل، هیپوکسیک+سالین و هیپوکسیک+گرلین

مهم HPV صورت پذیرفته است. در مطالعاتی توسط هرنيكوييس و همكارانش نشان داده شد كه تزريق زير جلدی گرلین در موش های صحرایی مبتلا به هیپرتانسیون ریوی مدل Monocrotaline سبب کاهش هیپرتانسیون ریوی، کاهش هیپرترفی بطن راست و کاهش ضخامت دیواره ی عروق ریوی می گردد (۲۷ و ۲۶). در سال ۲۰۰۸ در ادامه ی پژوهش های ذکر شده، شوانکه و همکارانش در یک تحقیق با القای هیپرتانسیون ریوی اما این بار با نگهداری موش های صحرایی در شرایط هیپوکسیک (اکسیژن ۱۰ درصد)، نشان دادند گرلین با تخفیف عوارض هیپوکسی در عروق ریوی موجب کاهش هیپرتانسیون ریوی، کاهش هیپرتروفی بطن راست و کاهش ضخامت دیواره ی عروق ریوی می شود. در این بررسی نشان داده شد که گرلین احتمالاً از طریق کاهش بیان ژن اندوتلین-۱ و نیز تنظیم بیان ژن نیتریک اکساید سنتاز اثرات بهبود دهنده ی خود را اعمال می نماید (۲۸). ما در

تاثیر گرلین بر میزان بیان ژن های Bax و Bcl-2 و نیز نسبت بیان ژنی Bax/Bcl-2 در بافت های ریه: درمان با گرلین تاثیر معنی داری بر بیان ژن Bax در بافت ریه ی حیوانات هیپوکسیک برجای نگذاشت ( $P=0/431$ ) (نمودار ۱). همچنین گرلین تاثیر معنی دار آماری بر بیان ژن Bcl-2 در بافت ریه ی حیوانات هیپوکسیک نداشت ( $P=0/999$ ) (نمودار ۲). به این ترتیب گرلین نتوانست نسبت بیان ژن Bax/Bcl-2 را تغییر دهد (نمودار ۳).

## بحث

بر اساس یافته های مطالعه حاضر، زندگی در شرایط هیپوکسی مزمن منجر به افزایش ضخامت دیواره و تنگی مجاری شریان های ریوی شد. از طرف دیگر، تیمار با گرلین سبب برگشت این تغییرات به حالت نرمال گردید. مطالعات متعددی در مورد اثرات بهبود بخش گرلین بر عوارض جانبی

پیشرفت گلیکولیز می‌تواند دلیل این اثر گرلین باشد (۳۴). از طرف دیگر، در تحقیقی دیگر نشان دادیم که در بافت کلیه رت‌هایی که زندگی در شرایط هیپوکسی مزمن را تجربه کردند، گرلین نسبت Bax/Bcl-2 را کاهش داده و تا حدودی یک اثر ضد آپوپتوزی را سبب می‌شود (۳۵). این که گرلین با چه مکانیسمی میزان Bax/Bcl-2 را تنظیم می‌کند دقیقاً معلوم نیست ولیکن مطالعاتی نشان داده‌اند که این پپتید از طریق مسیر PI3-kinase/Akt این اثر را اعمال می‌کند (۳۶ و ۲۲). به‌طور کلی شاید بتوان گفت که گرلین در بافت‌های مختلف متاثر از هیپوکسی، میزان بروز آپوپتوز را به گونه‌ای متفاوت تغییر می‌دهد.

### نتیجه‌گیری

هیپوکسی محیطی سبب تغییر معنی‌دار در نسبت Bax/Bcl-2 در بافت ریه نشده و گرلین نیز تاثیر چندانی بر این نسبت نشان نداد. به نظر می‌رسد که نتایج حاصل می‌تواند به طول دوره، شدت هیپوکسی، مقدار دوز گرلین تجویز شده و ارگان خاص بررسی شده نیز بستگی داشته باشد. از این رو به مطالعات تکمیلی جهت اثبات نقش درمانی بالقوه‌ی گرلین در مقابله با آسیب عروقی ناشی از هیپوکسی در بافت ریه نیاز می‌باشد.

### تشکر و قدردانی

نویسندگان بر خود لازم می‌دانند از همکاری صمیمانه آقای دکتر محمدرضا علیپور، عضو هیئت علمی گروه فیزیولوژی دانشگاه علوم پزشکی تبریز، سپاسگزاری نمایند.

مطالعات گذشته این اثر بهبود دهندگی گرلین را تا حدودی به کم کردن فعالیت پروتئین کیناز C که نقش شناخته شده‌ای در وساطت رشد سلول‌های عضله‌ی صاف عروق ریه‌ی هیپوکسیک دارد، نسبت داده‌ایم (۲۹).

پس از ۲ هفته زندگی در شرایط هیپوکسی، نسبت Bax/Bcl-2 در بافت ریه افزایش معنی‌داری در مقایسه با گروه کنترل نداشت. این نتیجه مشابه یافته‌ی وو و همکارانش می‌باشد (۱۳). اگرچه در این مطالعه مقدار نسبت مذکور در RNA کل بافت ریه سنجیده شده و اطلاعی از توزیع بیان ژن‌های اندازه‌گیری شده در قسمت‌های مختلف بافت ریه از جمله پارانشیم، سلول‌های آلوئولار، اندوتلیوم و عضله‌ی صاف عروق نداشتیم، ولی به نظر می‌رسد یافته‌ی ما می‌تواند تا حدودی موید نظریه‌های ارائه شده در بخش مقدمه باشد، مبنی بر اینکه در هیپوکسی مزمن احتمالاً گروهی از سلول‌های جداره عروق به آپوپتوز مقاوم شده و در نتیجه تکثیر سلول‌های اندوتلیوم/عضله صاف عروق موجب تنگی مجرا می‌گردد. از طرف دیگر، تیمار با گرلین در دوز ۱۵۰ میکروگرم بر کیلوگرم نیز تاثیر چندانی بر نسبت Bax/Bcl-2 بر جای نگذاشت و به نظر می‌رسد که گرلین تغییرات ایجاد شده در ساختمان عروق ریه‌ی هیپوکسیک را از طریق تنظیم عواملی غیر از آپوپتوز برگردانده است. لازم به ذکر است که ما در مطالعات گذشته نشان داده‌ایم که گرلین نسبت Bax/Bcl-2 را در بافت قلب حیوانات هیپوکسیک افزایش می‌دهد (۳۳). در عین حال در تحقیقی دیگر مشاهده گردید که گرلین سبب افزایش بیان ژن‌های آنزیم‌های گلیکولیز می‌شود و افزایش احتمالی تولید اسید ناشی از

### References

1- Ucker DS. Death by suicide: one way to go in mammalian cellular

development? *New Biol.* 1991; 3: 103-9.

2- Walker NI, Harmon BV, Gobe GC, Kerr JFR. Patterns of cell death. *Methods*

- Achiev Exp Pathol.* 1988; 13: 18-54.
- 3- Wyllie AH, Kerr JFR, Currie AR. Cell death: the significance of apoptosis. *Int Rev Cytol.* 1980; 68: 251-306.
- 4- Weinmann M, Jendrossek V, Handrick R, Güner D, Goecke B, Belka C. Molecular ordering of hypoxia-induced apoptosis: critical involvement of the mitochondrial death pathway in a FADD/caspase-8 independent manner. *Oncogene.* 2004; 23: 3757-69.
- 5- Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol.* 2007; 35: 495-516.
- 6- Jacobson MD, Raff MC. Programmed cell death and Bcl-2 protection in very low oxygen. *Nature.* 1995; 374: 814-6.
- 7- Salakou S, Kardamakis D, Tsamandas AC, et al. Increased Bax/Bcl-2 ratio up-regulates caspase-3 and increases apoptosis in the thymus of patients with myasthenia gravis. *In Vivo.* 2007; 21: 123-32.
- 8- Nishikawa S, Tatsumi T, Shiraiishi J, et al. Nicorandil regulates Bcl-2 family proteins and protects cardiac myocytes against hypoxia-induced apoptosis. *J Mol Cell Cardiol.* 2006; 40: 510-9.
- 9- Jung F, Weiland U, Johns RA, Ihling C, Dimmeler S. Chronic hypoxia induces apoptosis in cardiac myocytes: a possible role for Bcl-2-like proteins. *Biochem Biophys Res Commun.* 2001; 286: 419-25.
- 10- Taraseviciene-Stewart L, Kasahara Y, Alger L, Hirth P, et al. Inhibition of the VEGF receptor 2 combined with chronic hypoxia causes cell death-dependent pulmonary endothelial cell proliferation and severe pulmonary hypertension. *Faseb J.* 2011; 15: 427-38.
- 11- Weng T, Karmouty-Quintana H, Garcia-Morales L, et al. Hypoxia-induced deoxycytidine kinase expression contributes to apoptosis in chronic lung disease. *FASEB J.* 2013; 27: 2013-26.
- 12- Lu JY, Yao W, Qian GS, Yang XJ, Chen WZ, Li SP. Role of bcl-2 and bax expression in apoptosis of hypoxic pulmonary artery smooth muscle cells of rats induced by Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger isoform-1 inhibition in vitro. *Zhongguo Wei Zhong Bing Ji Jiu Yi Xue.* 2004; 16: 394-8.
- 13- Wu ZS, Hall SM, Haworth SG. Proliferation and apoptosis of lung smooth muscular cells in hypoxic pulmonary hypertension in neonatal pigs. *Hunan Yi Ke Da Xue Xue Bao.* 2002; 27: 211-4.
- 14- Kojima M, Kangava K. Ghrelin: Structure and Function. *Physiol Rev* 2005; 85: 495-522.
- 15- Holst B, Holliday N, Bach A, et al. Common structural basis for constitutive activity of the ghrelin receptor family. *J Biol Chem.* 2004; 279: 53806-817.
- 16- Van der Lely AJ, Tschop M, Heiman ML, Ghigo E. Biological, physiological, pathophysiological, pharmacological aspects of Ghrelin. *Endocrine Rev.* 2004; 25: 426-57.
- 17- Yang M, Hu S, Wu B, Miao Y, Pan H, Zhu S. Ghrelin inhibits apoptosis signal-regulating kinase 1 activity via upregulating heat-shock protein 70. *Biochem Biophys Res Commun.* 2007; 359: 373-8.



- 18- Zhang Y, Ying B, Shi L, et al. Ghrelin inhibit cell apoptosis in pancreatic beta cell line HIT-T15 via mitogen-activated protein kinase/phosphoinositide 3-kinase pathways. *Toxicology*. 2007; 237: 194-202.
- 19- Granado M, Chowen JA, García-Cáceres C, et al. Ghrelin treatment protects lactotrophs from apoptosis in the pituitary of diabetic rats. *Mol Cell Endocrinol*. 2009; 309: 67-75.
- 20- Hwang S, Moon M, Kim S, Hwang L, Ahn KJ, Park S. Neuroprotective effect of ghrelin is associated with decreased expression of prostate apoptosis response-4. *Endocr J*. 2009; 56: 609-17.
- 21- Yang C, Wang Y, Liu H, et al. Ghrelin protects H9c2 cardiomyocytes from angiotensin II-induced apoptosis through the endoplasmic reticulum stress pathway. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2012; 59: 465-71.
- 22- Baldanzi G, Filigheddu N, Cutrupi S, et al. Ghrelin and des-acyl ghrelin inhibit cell death in cardiomyocytes and endothelial cells through ERK1/2 and PI 3-kinase/AKT. *J Cell Biol*. 2002; 159: 1029-37.
- 23- Zhang GG, Cai HQ, Li YH, et al. Ghrelin protects heart against ERS-induced injury and apoptosis by activating AMP-activated protein kinase. *Peptides*. 2013; 48: 156-65.
- 24- Xu YP, Zhu JJ, Cheng F, et al. Ghrelin ameliorates hypoxia-induced pulmonary hypertension via phospho-GSK3  $\beta$ / $\beta$ -catenin signaling in neonatal rats. *J Mol Endocrinol*. 2011; 47: 33-43.
- 25- Cheung W, Mak R H. Ghrelin in chronic kidney disease. *Int J Peptides*.
- 26- Henriques-Coelho T, Correia-Pinto J, Roncon-Albuquerque R, et al. Endogenous production of ghrelin and beneficial effects of its exogenous administration in monocrotaline-induced pulmonary hypertension. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2004; 287: 2885-90.
- 27- Henriques Coelho T, Roncon-Albuquerque Júnior R, Lourenço AP, et al. Ghrelin reverses molecular, structural and hemodynamic alterations of the right ventricle in pulmonary hypertension. *Rev Port Cardiol*. 2006; 1: 55-63.
- 28- Schwenke DO, Tokudome T, Shirai M, Hosoda H, Horio T, Kishimoto I. Exogenous ghrelin attenuates the progression of chronic hypoxia-induced pulmonary hypertension in conscious rats. *Endocrinology*. 2008; 149: 237-44.
- 29- Alipour MR, Aliparasti MR, Keyhanmanesh R, et al. Effect of Ghrelin on PKC- $\epsilon$  and PKC- $\delta$  gene expression in the pulmonary arterial smooth muscles of chronic hypoxic rats. *J Endocrinol Invest*. 2011; 34: e369-e373.
- 30- Humbert M, Morrell NW, Archer SL, et al. Cellular and molecular pathobiology of pulmonary arterial hypertension. *J Am Coll Cardiol*. 2004; 43: 13S-24S.
- 31- McMurtry MS, Bonnet S, Wu X, et al. Dichloroacetate prevents and reverses pulmonary hypertension by inducing pulmonary artery smooth muscle cell apoptosis. *Circ Res*. 2004; 95: 830-40.

- 32- Huang X, Zou L, Yu X, et al. Salidroside attenuates chronic hypoxia-induced pulmonary hypertension via adenosine A2a receptor related mitochondria-dependent apoptosis pathway. *J Mol Cell Cardiol.* 2015; 82: 153-66.
- 33- Aliparasti MR, Alipour MR, Almasi S, Feizi H. Ghrelin administration increases the bax/bcl-2 gene expression ratio in the heart of chronic hypoxic rats. *Adv Pharm Bull.* 2015; 5: 195-99.
- 34- Aliparasti MR, Alipour MR, Almasi S, Feizi H. Effect of ghrelin on aldolase gene expression in the heart of chronic hypoxic rat. *Int J Endocrinol Metab.* 2012; 10: 553-7.
- 35- Almasi S, Shahsavandi B, Aliparasti MR, Alipour MR, Rahnama B, Feizi H. The anti-apoptotic effect of ghrelin in the renal tissue of chronic hypoxic rats. *Physiol Pharmacol.* 2015;19: 114-20.
- 36- Yang D, Liu Z, Zhang H, Luo Q. Ghrelin protects human pulmonary artery endothelial cells against hypoxia-induced injury via PI3-kinase/Akt. *Peptides.* 2013; 42: 112-7.

## Effect of Ghrelin on Bax/Bcl-2 Gene Expression Ratio in Lung Tissue of Rats with Chronic Hypoxia

Aliparasti MR<sup>1</sup>, Dadkhah M<sup>2</sup>, Alipour M<sup>2</sup>, Almasi SH<sup>1</sup>, Feizi H<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Immunology Research Center, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran

<sup>2</sup>Dept. of Physiology, Faculty of Medicine, Zanjan University of Medical Sciences, Zanjan, Iran

**Corresponding Author:** Feizi H, Dept. of Physiology, Faculty of Medicine, Zanjan University of Medical Sciences, Zanjan, Iran

**E-mail:** hfeizik@zums.ac.ir

**Received:** 31 Aug 2015    **Accepted:** 28 Dec 2015

**Background and Objective:** Ghrelin has different functions in the body and one of its newly known roles is the antiapoptotic effect. However, this effect of ghrelin has not been considered in the probable hypoxia induced apoptosis in the animal lung tissue. The aim of this study was to examine the effect of ghrelin treatment on Bax/Bcl-2 gene expression in the lung tissue of rats with chronic hypoxia.

**Materials and Methods:** Twenty four male Wistar rats were divided in three experimental groups of normal, hypoxic+saline and hypoxic+ghrelin and were treated for 2 weeks. The expression level of Bax and Bcl-2 genes were assessed using Real-Time PCR in isolated lung tissues of all animals. In addition, histological changes of pulmonary arteries were examined following Hematoxylin-Eosin staining of the isolated tissues.

**Results:** Chronic hypoxia caused pulmonary artery wall thickness and treatment with ghrelin reversed the changes to the normal. Keeping animals under chronic hypoxia treated or not with ghrelin had no significant effect on Bax/Bcl-2 gene expression ratio as measured in the total lung.

**Conclusion:** Ghrelin treatment restores the histological changes induced by chronic hypoxia in rats. However, no significant changes in Bax/Bcl-2 gene expression ratio as a marker of cell apoptosis seem to occur in the isolated lung tissues, even after ghrelin treatment. Further similar studies especially in vascular endothelial and smooth muscle cells are recommended.

**Keywords:** Ghrelin, Chronic Hypoxia, Lung, Bax/Bcl-2, Rat