

## اثر اگزندین ۴ بر فعالیت حیاتی، تولید نیتریک اکساید و TNF- $\alpha$ در کشت ماکروفاژ صفاقی موش C57BL/6

نویسندگان: حدیثه توسلی<sup>۱</sup>، محمدرضا جلالی ندوشن<sup>۲</sup>، بتول رحمتی<sup>۳</sup>، رؤیا یارایی<sup>۴\*</sup>

۱. کارشناسی ارشد ایمنی شناسی، دانشکده پزشکی دانشگاه شاهد، تهران، ایران
۲. استاد گروه علوم تشریح، دانشکده پزشکی دانشگاه شاهد، تهران، ایران
۳. استادیار گروه فیزیولوژی، دانشکده پزشکی دانشگاه شاهد، تهران، ایران
۴. دانشیار گروه ایمنی شناسی، دانشکده پزشکی دانشگاه شاهد، تهران، ایران

E-mail: ryaraee@yahoo.com

\* نویسنده مسئول: رؤیا یارایی

### چکیده

مقدمه و هدف: پپتید مشابه گلوکاگون-۱۱ پپتید کوچکی است که در روده تولید شده و عملکرد اصلی آن، تحریک ترشح انسولین است؛ ولی گیرنده آن در بسیاری سلول‌ها از جمله ماکروفاژهای انسانی و موشی وجود دارد. ماکروفاژها با توجه به عملکردهای متنوعی که دارند، در تنظیم فرایندهای پیش‌التهابی و پاسخ‌های سیستم ایمنی بسیار مؤثرند. در این مطالعه اثر اگزندین ۴ که آنالوگ GLP-1 است، بر فعالیت حیاتی، تولید نیتریک اکساید و TNF- $\alpha$  ماکروفاژهای صفاقی بررسی شده است.

مواد و روش‌ها: ماکروفاژهای صفاقی از موش C57BL/6 جدا شده و در ۲ گروه تحریک شده با LPS و بدون تحریک به مدت ۲۴ ساعت کشت شده و غلظت‌های ۰/۰۳-۳ نانومولار Exendin-4 را دریافت کردند. فعالیت حیاتی به روش MTT، نیتريت به روش گریس و TNF- $\alpha$  با الیزا سنجیده شد.

نتایج: Exendin-4 در غلظت‌های ۳ و ۰/۳ نانومولار با اثر بر ماکروفاژهای (در حال استراحت) موجب کاهش معنادار MTT و در ماکروفاژهای تحریک‌شده با LPS در غلظت ۳ نانومولار، موجب افزایش فعالیت می‌شود. غلظت‌های ۰/۱ و ۰/۰۳ نانومولار Exendin-4 در ماکروفاژهای در حال استراحت موجب کاهش نیتريت می‌شود؛ اما در ۳ نانومولار تولید نیتريت را در ماکروفاژهای تحریک‌شده افزایش می‌دهد. همچنین افزایش تولید TNF- $\alpha$  در غلظت‌های ۳ و ۱ نانومولار Exendin-4 در ماکروفاژهای تحریک‌شده و در ۳ نانومولار در ماکروفاژ در حال استراحت مشاهده می‌شود.

نتیجه‌گیری: تأثیر Exendin-4 بر تولید نیتريت و TNF در شرایط *in vitro* علاوه بر غلظت آن به وضعیت سلول از نظر تحریک نیز بستگی دارد و ممکن است به جای اثر ضدالتهابی، موجب تشدید التهاب گردد.

واژگان کلیدی: GLP-1، Exendin-4، ماکروفاژ، MTT، نیتريت اکساید، TNF- $\alpha$

دوماهنامه علمی-پژوهشی  
دانشگاه شاهد  
سال بیست‌وچهارم-شماره ۱۲۸  
اردیبهشت ۱۳۹۶

دریافت: ۱۳۹۵/۱۲/۱۶

آخرین اصلاح‌ها: ۱۳۹۶/۰۲/۰۳

پذیرش: ۱۳۹۶/۰۲/۱۰

## مقدمه

پپتید مشابه گلوکاگون-۱ یا GLP-1 پپتید کوچکی است که در شرایط طبیعی توسط سلول‌های L روده تولید می‌شود و نقش اصلی آن در تنظیم متابولیسم انسولین است (۱، ۲). GLP-1 توسط پروتئازای به نام dipeptidyl peptidase-IV (DPP-IV) در بدن شکسته شده و نیمه‌عمر آن کاهش می‌یابد. یکی از آنالوگ‌های آن که عملکرد طولانی‌مدت و سکانس مشابه دارد، Exendin-4 (Ex-4) است که به DPP-IV مقاوم بوده و در حوزه تحقیقات درمانی، جایگزین آن به کار می‌رود (۱، ۳). همچنین نوع سنتتیک آن به نام Exenatide در حال حاضر جهت تنظیم قند خون در درمان دیابت نوع ۲ استفاده می‌گردد (۱). برخی نتایج امیدوارکننده GLP-1 و آگونیست‌های آن موجب میل تحقیقات بیشتر و استفاده این دارو در بیماری‌های مختلف التهابی، نورودژنراتیو و قلبی عروقی شده است (۴-۷).

گیرنده GLP-1 و آگونیست‌های آن در بافت‌ها و سلول‌های بسیاری از جمله بافت‌های موش و همچنین روی لنفوسیت‌های T Cell و B Cell و ماکروفاژ انسانی و موشی حضور دارد (۸، ۹). ماکروفاژها سلول‌های ایمنی ذاتی هستند که خط اول دفاعی علیه پاتوژن‌ها را به عهده دارند. ماکروفاژها علاوه بر شناسایی، فاگوسیتوز و تخریب میکروارگانیسم‌ها، در عرضه آنتی‌ژن و ترشح محصولات گوناگون شامل آنزیم‌ها، فاکتورهای انعقادی، سایتوکاین‌ها و کموکاین‌ها نقش دارند (۱۰، ۱۱). به علاوه، این سلول‌ها نقش اصلی را در هموستاز بافتی، هماهنگی پاسخ تطبیقی سیستم ایمنی، التهاب و ترمیم به عهده دارند. این سلول‌ها در کبد، ریه، ارگان‌های لنفاوی، دستگاه گوارش، سیستم عصبی مرکزی، استخوان و پوست حاضرند و می‌توانند در انواع فرایندهای فیزیولوژیک و پاتوفیزیولوژیک فعال باشند (۸). به دلیل عملکردهای متنوع ماکروفاژ، این سلول‌ها در فرایند بسیاری بیماری‌ها از جمله آرتریت روماتوئید، بیماری‌های اتوایمن، نقص ایمنی اولیه، آترواسکلروز، انواع تومور و بهبودی زخم نقش دارند (۱۰).

ماکروفاژها می‌توانند فنوتیپ‌های مختلف التهابی یا ضدالتهابی به خود بگیرند و به این ترتیب، نقش چشمگیری در سرنوشت بیماری داشته باشند (۱۰). در مطالعات *in vitro* ماکروفاژ کلاسیک (M1) با لیپولی ساکارید (LPS) یا اینترفرون گاما (IFN- $\gamma$ ) تحریک شده و سطح بالای گونه‌های فعال اکسیژن reactive oxygen species (ROS) و نیتریک اکساید (NO) nitric oxide که با افزایش آنزیم القا می‌شود induced nitric oxide synthase (iNOS) همراه است و سایتوکاین‌های پیش‌التهابی از قبیل IL-1 $\beta$  (interlukin-1 $\beta$ ) و TNF- $\alpha$  Tumor necrosis factor- $\alpha$  را تولید می‌کند. دسته دیگر ماکروفاژها که به عنوان آلترناتیو نامیده شده‌اند (M2) با ویژگی‌های ضدالتهابی شناخته می‌شوند (۴، ۱۲، ۱۳).

تا به حال چند مطالعه محدود در مورد اثر GLP-1 یا آگونیست‌های آن بر روی ماکروفاژها صورت گرفته است. از جمله مشاهده شده GLP-1 با اثر بر مونوسیت‌های CD14+ انسانی منجر به تمایز ماکروفاژها به فنوتیپ M2 می‌گردد (۱۲). همچنین Exendin-4 در مطالعه بر رده سلولی ماکروفاژ Raw264-7، بیان iNOS القا شده توسط LPS را در سطح پروتئین مهار می‌کند (۱۵) و در مطالعه جدیدی در سال ۲۰۱۶ با اثر Exenatide بر ماکروفاژ/ منوسیت انسانی تخلیص شده، افزایش IL10 interlukin-10) و کاهش سطح IL-1 $\beta$  و TNF- $\alpha$  و همچنین iNOS مشاهده شده است (۴).

با توجه به اطلاعات محدود موجود، به نظر می‌رسد بررسی تأثیر غلظت‌های مختلف Exendin-4 بر ماکروفاژ و در نظر گرفتن شرایط استراحت و فعالیت این سلول‌ها ضروری باشد. در این پژوهش اثر غلظت‌های مختلف Exendin-4 بر تولید نیتریک اکساید و میزان فعالیت حیاتی ماکروفاژهای صفاقی موش C57BL/6 در تحریک با LPS و در حال استراحت در محیط کشت بررسی شده است.

### روش بررسی

#### تهیه و کشت ماکروفاژ

ماکروفاژهای صفاقی از موش C57BL/6 ماده که از

قرار گرفتند. در طی این مدت تحت تأثیر فعالیت‌های متابولیک سلول از جمله آنزیم دهیدروژناز میتوکندری این ماده که زردرنگ و محلول است به کریستال‌های تیره‌رنگ فورمازان که ترکیبی نامحلول است تبدیل می‌شود. سپس محلول رویی هر چاهک به آرامی با سمپلر کشیده شده و ۱۰۰ میکرولیتر محلول ایزوپروپانول اسیدی (اسید کلریدریک ۴٪ نرمال در ایزوپروپانول) اضافه شد. با حل شدن کریستال‌های بنفش‌رنگ، جذب نوری چاهک‌ها در طول موج ۴۹۲ نانومتر خوانده شد.

#### سنجش نیتريت

برای بررسی نیتريت (به عنوان متابولیت NO) از روش گریس استفاده شد. به‌طور خلاصه پس از گذشت ۱۶ ساعت، ۵۰ میکرولیتر از مایع رویی هر چاهک برداشته و به پلیت‌های ۹۶ خانه اضافه شد. سپس ۵۰ میکرولیتر محلول سولفانیل آمید ۱٪ و ۵۰ میکرولیتر محلول (N-(1-Naphthyl)ethylenediamine) NEDA ۱٪ به هر چاهک اضافه شد. هم‌چنین غلظت‌های منحنی استاندارد شامل ۰، ۵، ۱۰، ۱۵، ۲۰، ۳۰، ۴۰ و ۱۰۰ در نانومول/ میلی‌لیتر بود. تغییر رنگ حاصل شده با دستگاه جذب‌سنج خوانده‌ایزا در طول موج ۴۹۲ نانومتر خوانده شد.

#### سنجش TNF- $\alpha$

پس از ۱۲ ساعت از زمان کشت، ۵۰ میکرولیتر سوپرناتانت سلولی برای سنجش TNF- $\alpha$  جمع‌آوری شده و در یخچال با دمای ۷۰- درجه سانتیگراد تا زمان سنجش نگهداری شد. برای سنجش TNF- $\alpha$ ، از کیت سنجش TNF- $\alpha$  موشی (Promokine - آلمان) با تکنیک ساندویچ ایزا استفاده شد. برای آماده‌کردن غلظت‌های لازم از آنتی‌بادی اول، آنتی‌بادی دوم، کونژوگه Avidin-HRP (horseradish peroxidase) و استانداردها طبق راهنمای کیت عمل شد. به این ترتیب، پلیت ایزا طبق دستورالعمل کیت با آنتی‌بادی اول پوشیده شده و پس از مرحله بلاک و شست‌وشو، نمونه‌های سوپرناتانت و استانداردهای مربوطه اضافه شد. پس از انکوباسیون و شست‌وشوی پلیت، آنتی‌بادی دوم که نشاندار با آنزیم

انستیتو پاستور کرج با وزن تقریبی ۲۰ گرم و سن ۸ تا ۱۰ هفته خریداری شده بودند، تهیه شد. به این منظور ۸ تا ۱۰ میلی‌لیتر سرم فیزیولوژی سرد (در دو مرحله) به داخل صفاق هر موش تزریق شد. پس از ماساژ آهسته به‌منظور رهاشدن سلول‌ها از جداره صفاق، سلول‌ها به لوله‌های آماده بر یخ انتقال یافت. سوسپانسیون به‌دست‌آمده از صفاق هر موش، به مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ۱۵۰۰rpm و در دمای ۸ درجه سانتیگراد سانتریفوژ شده و محیط رویی دور ریخته شد. سپس سلول‌ها با ۲ میلی‌لیتر محیط RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Institute) (سیگما - آمریکا) سرد شست‌وشو شدند و نهایتاً RPMI حاوی ۱۰٪ FBS (Fetal bovine serum) (گیبوکو - آمریکا) به سلول‌ها اضافه شد و سلول‌ها با لام نئوبار و استفاده از تریپان بلو شمارش شدند. تعداد  $4 \times 10^5$  سلول در هر چاهک پلیت ۹۶ خانه با محیط RPMI 1640 حاوی FBS ۱۰٪ کشت داده شد. سلول‌ها به مدت ۲ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتیگراد و ۵٪ CO<sub>2</sub> انکوبه شدند. سپس برای جداشدن سلول‌های غیرماکروفاژی، به آرامی به وسیله سرم فیزیولوژی ۳۷ درجه سانتیگراد شسته شدند و به هر چاهک حاوی ماکروفاژ، ۰/۲ میلی‌لیتر RPMI حاوی FBS ۱۰٪ اضافه شد.

برای تحریک ماکروفاژها از غلظت ۱۰ میکروگرم در میلی‌لیتر LPS (سیگما) استفاده گردید. Exendin-4 (از شرکت Santa Cruz - آمریکا) در غلظت‌های ۰/۱، ۰/۰۳، ۰/۱ و ۰/۳ نانومولار (nM) به کار گرفته شد. برای بررسی هر غلظت یا حالت (فعال/ غیرفعال) ۵ چاهک جداگانه در نظر گرفته شد. تعداد ۵ چاهک نیز بدون تیمار با Exendin-4 و تنها با اثر LPS و ۵ چاهک نیز بدون LPS و Exendin-4 کشت داده شدند.

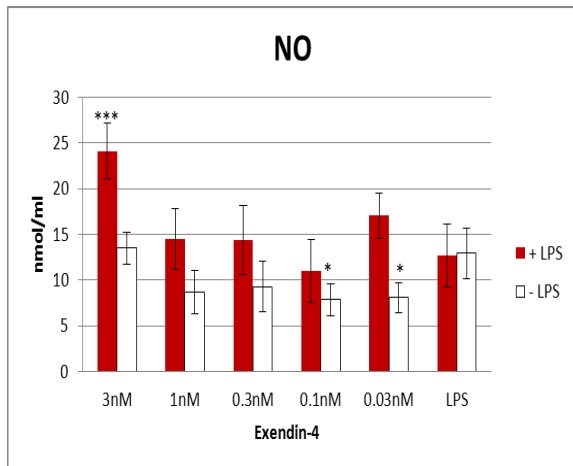
#### سنجش فعالیت ماکروفاژهای صفافی (آزمایش متیل تیازون تترازولین)

بعد از گذشت ۲۰ ساعت، ۱/۱۰ حجم چاهک محلول ۵٪ از MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide) به هر چاهک اضافه شد و پلیت‌ها به مدت ۴ ساعت دوباره داخل انکوباتور

ماکروفازهای صفاقی از موش C57BL/6 استخراج شده و برای هر چاهک  $10^5 \times 2$  سلول در نظر گرفته شد. سپس با غلظت‌های مختلف Exendin-4 (۳-۰/۳ نانومولار) در دمای  $37^\circ\text{C}$  درجه سانتیگراد انکوبه شدند. برای تحریک سلول‌ها از LPS به میزان ۱۰ میکروگرم/میلی‌لیتر استفاده شد. فعالیت حیاتی ماکروفازها با تست MTT پس از ۲۴ ساعت بررسی شد. ( $P < 0.05$ : (\*),  $P < 0.01$ : (\*\*))

#### نیتریت (به‌عنوان متابولیت NO)

برای بررسی اثر غلظت‌های Exendin-4 بر تولید نیتریک اکساید، میزان نیتریت در محلول رویی کشت ماکروفاز در تحریک با LPS و بدون آن (فعال و درحال استراحت)، بعد از ۱۶ ساعت سنجیده شد. (نمودار ۲)



نمودار ۲. اثر Exendin-4 بر تولید NO (نیتریت) در کشت ماکروفازهای صفاقی موش C57BL/6 در تحریک با LPS (۱۰ میکروگرم در میلی‌لیتر) و در حال استراحت (بدون LPS).

ماکروفازهای صفاقی از موش C57BL/6 ۸ تا ۱۰ هفته استخراج شده و برای هر چاهک  $10^5 \times 2$  سلول در نظر گرفته شد. سپس برای تیمار با غلظت‌های مختلف Exendin-4 (۳-۰/۳ نانومولار) در  $37^\circ\text{C}$  انکوبه شدند. میزان نیتریت ۱۶ ساعت بعد از شروع تیمار سلول‌ها به روش گریس سنجیده شد.

$P < 0.05$ : (\*),  $P < 0.001$ : (\*\*\*)

با توجه به نمودار ۲، Exendin-4 موجب کاهش تولید نیتریت در ماکروفازهای فاقد LPS (در حال استراحت) شده است که این کاهش در غلظت‌های ۰/۳ و ۰/۱ نانومولار از نظر آماری معنادار است؛ ولی در

است، اضافه شده و در مرحله آخر پس از شست‌وشو، سوبسترا اضافه گردید. واکنش با اضافه کردن اسید سولفوریک (۲ نرمال) متوقف و رنگ ایجادشده توسط دستگاه الیزا ریدر در ۴۰۵ نانومتر خوانده شد. از منحنی استاندارد برای محاسبه غلظت TNF- $\alpha$  استفاده گردید.

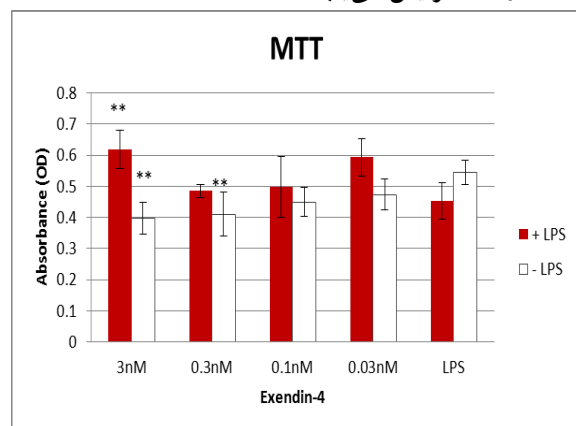
#### آنالیز آماری

جهت مقایسه میانگین‌ها، از نرم‌افزار G-instat و تست ANOVA و آزمون‌های تکمیلی جهت بررسی معنادار بودن داده‌ها استفاده گردید. سطح معناداری  $p < 0/05$  در نظر گرفته شد.

#### یافته‌ها

##### فعالیت حیاتی ماکروفازها

مقایسه فعالیت حیاتی و پاسخ تکثیری در کشت ماکروفازهای صفاقی فعال (در حضور LPS) و غیرفعال در غلظت‌های مختلف Exendin-4، با تست MTT انجام گرفت (نمودار ۱). همان‌طور که مشاهده می‌شود، Exendin-4 در غلظت‌های ۳ و ۰/۳ نانومولار با اثر بر ماکروفازهای فاقد LPS (در حال استراحت) موجب کاهش معنادار فعالیت حیاتی نسبت به گروه کنترل (بدون Exendin-4) شده است (به ترتیب ۲۷٪ و ۲۵٪ کاهش). اما در ماکروفازهای تحریک‌شده با LPS که با Exendin-4 مواجهه شده‌اند، در غلظت ۳ نانومولار، فعالیت حیاتی سلول‌ها به‌طور معنادار به میزان ۳۶/۱ درصد افزایش می‌یابد.



نمودار ۱. اثر غلظت‌های مختلف Exendin-4 (۳-۰/۳ نانومولار) بر میزان بقای سلولی در کشت ماکروفازهای صفاقی موش C57BL/6 در تحریک با LPS و استراحت.

LPS تیمار با Exendin-4 در غلظت‌های ۳ و ۱ نانومولار موجب افزایش معنادار تولید TNF- $\alpha$  به ترتیب به میزان ۱/۶ و ۱/۳ برابر نسبت به ماکروفاژهای تحریک شده بدون تیمار شده است. (به ترتیب  $P < 0.001$  و  $P < 0.05$ ) ولی در سایر غلظت‌ها تفاوت معنی‌داری مشاهده نمی‌شود.

#### بحث

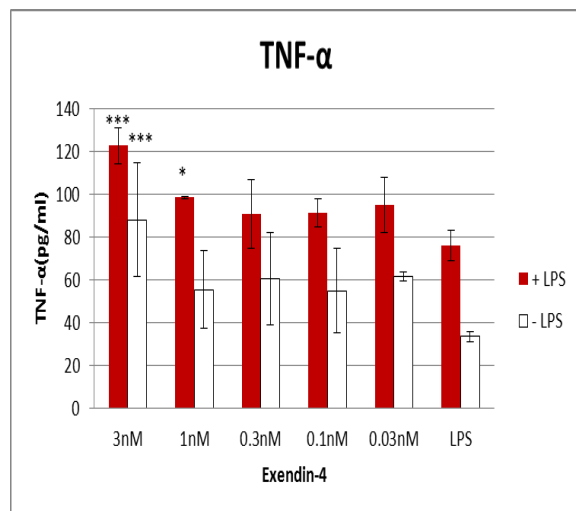
GLP-1 به‌عنوان یک شبه‌هورمون با اثر بر سلول‌های  $\beta$  پانکراس، موجب تحریک ترشح انسولین و کاهش گلوکز محیطی می‌شود (۴، ۹) گیرنده آن علاوه بر پانکراس، بر روی بسیاری بافت‌ها از جمله بافت‌های سیستم ایمنی و ماکروفاژ بیان شده است (۸، ۹). در سال‌های اخیر تحقیقات گسترده‌ای در زمینه ویژگی ضدالتهابی این پپتید و آنالوگ‌های آن انجام شده است (۴). با توجه به اهمیت ماکروفاژها در تنظیم بسیاری فرایندهای پیش‌التهابی و پاسخ سیستم ایمنی (۱۱، ۱۶، ۱۷)، مطالعه حاضر به بررسی اثر غلظت‌های مختلف Exendin-4 (آنالوگ GLP-1) بر فعالیت حیاتی و تولید نیتريت (به‌عنوان متابولیت NO) و TNF- $\alpha$  توسط ماکروفاژ صفاقی موش C57BL/6 در دو وضعیت فعال و غیرفعال پرداخته است و مشاهده شد که Exendin-4 بسته به شرایط هم می‌تواند موجب افزایش فعالیت‌های فوق و هم کاهش آن‌ها شود.

بر اساس این نتایج، Exendin-4 موجب کاهش فعالیت ماکروفاژهای در حال استراحت می‌شود (غلظت‌های ۳ و ۰/۳ نانومولار) ولی در مورد ماکروفاژهای تحریک شده، افزایش فعالیت مشاهده می‌گردد (نمودار ۱). مطالعات دیگری که اثر آنالوگ‌های GLP-1 را بر فعالیت حیاتی ماکروفاژ یا سایر سلول‌ها بررسی کرده‌اند نیز نتایج متفاوتی را گزارش نموده‌اند. مثلاً در مطالعه انجام شده توسط بوداک و همکاران در سال ۲۰۱۶ نشان داده شده است که در حضور Exenatide در غلظت ۱۰ نانومولار و LPS (۰/۵ میکروگرم در میلی‌لیتر)، فعالیت حیاتی (تست MTT) در ماکروفاژهای انسانی تغییر معناداری نمی‌کند (۴). البته

ماکروفاژهای تحریک شده کاهش معناداری دیده نمی‌شود و حتی در غلظت ۳ نانومولار Exendin-4، افزایش تولید نیتريت نیز دیده می‌شود ( $P < 0.001$ ).

#### تولید TNF- $\alpha$

جهت بررسی اثر Exendin-4 بر ماکروفاژهای صفاقی جهت سنجش TNF- $\alpha$ ، میزان تولید آن در ۱۲ ساعت پس از کشت بررسی شد. میانگین میزان TNF- $\alpha$  در چاهک‌ها با غلظت‌های متفاوت Exendin-4 و چاهک‌های کنترل بدون Exendin-4 در نمودار ۳ نشان داده شده است.



نمودار ۳. بررسی مقایسه سطح TNF- $\alpha$  در کشت ماکروفاژهای صفاقی موش C57BL/6 ماده در غلظت‌های Exendin-4 در ماکروفاژهای تحریک شده با LPS و بدون LPS.

ماکروفاژهای صفاقی از موش C57BL/6 ۸ تا ۱۰ هفته استخراج شده و برای هر چاهک  $2 \times 10^5$  سلول در نظر گرفته شد. سپس برای تیمار با غلظت‌های مختلف Exendin-4 (۳-۰/۰۳ نانومولار) در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد برای ۲۴ ساعت انکوبه شدند. در سلول‌های تحریک شده، LPS به میزان ۱۰ میکروگرم/میلی‌لیتر استفاده شد. میزان TNF- $\alpha$  ۱۲ ساعت بعد از شروع تیمار سلول‌ها به روش الیزا سنجیده شد. ( $P < 0.05$ ; (\*\*),  $P < 0.001$  (\*\*\*)

با توجه به نمودار (۳)، تیمار ماکروفاژها با Exendin-4 در غلظت ۳ نانومولار موجب افزایش ۲/۶ برابری TNF- $\alpha$  نسبت به ماکروفاژهای کنترل شده است. ( $P < 0.001$ ) همچنین در ماکروفاژهای تحریک شده با

وجود دارند مثل لیو و همکاران در سال ۲۰۱۵ که نشان می‌دهند GLP-1 می‌تواند در سلول‌های اندوتلیال، موجب افزایش بیان نیتریک اکساید سنتاز (NOS) شود (۲۰). ضمن اینکه به نظر می‌رسد کنترل تولید نیتریت بسیاری اوقات در سطح بیان ژن نیست. مثلاً در مطالعه چانگ و همکاران در سال ۲۰۱۳، Exendin-4 با اینکه موجب کاهش بیان iNOS در سطح پروتئین شده است ولی فعالیت اتصال NF- $\kappa$ B (nuclear factor kappa B) به پروموتور iNOS را تغییر نداده است و هم‌راستا با این نتیجه، فسفوریلاسیون Ik-B $\alpha$  القاشده توسط LPS نیز مهار نشده است (۱۵).

از آنجا که مکانیسم اصلی عملکرد Exendin-4 (و GLP-1) افزایش cAMP (Cyclic adenosine monophosphate) داخل سلولی است (۲)، باید توجه داشت که افزایش cAMP می‌تواند مسیرهای متفاوتی را به راه اندازد و نتایج مختلفی در پی داشته باشد. Mittal و همکاران گزارش کرده‌اند که اگر همزمان با القای NO توسط IFN $\gamma$  و LPS، افزایش در cAMP هم ایجاد کنیم، می‌تواند اثر معکوس داشته و موجب افزایش تولید NO شود (۲۱) و احتمالاً در مطالعه ما دوز زیاد LPS نیز چنین نقشی داشته است. حتی برخی آنالوگ‌های cAMP (مثل DB-cAMP) می‌توانند سنتز NO را در ماکروفاژها به صورت سیگنالی مستقل از LPS فعال نمایند (۲۲) و این نحو اثر cAMP به دوز LPS بستگی زیادی دارد (۲۳).

در مطالعه ما Exendin-4 در برخی غلظت‌ها، موجب افزایش تولید TNF- $\alpha$  در ماکروفاژها شد (نمودار ۳). در حالی که در چند مطالعه محدودی که در این مورد انجام شده، نتایج متفاوتی گزارش شده است. در مطالعه انجام شده توسط Disuke و همکاران اثر (۱۰) نانومولار GLP-1 را بر ماکروفاژ انسانی استخراج شده از خون محیطی در تحریک با (۱۰۰ نانوگرم/میلی‌لیتر) LPS بررسی کرده و تولید IL10، IL12 و TNF- $\alpha$  را به وسیله ایزا سنجیدند. نتایج افزایش معنادار IL10 را نشان داد؛ اما میزان IL12 و TNF- $\alpha$  در دو گروه تغییر معناداری را نشان نداد (۱۲). این نتیجه با نتیجه ما در تولید TNF- $\alpha$

همان‌طور که مشاهده می‌شود در این مطالعه غلظت LPS به کاررفته بسیار کم است. از طرف دیگر فنگ و همکاران مشاهده کرده‌اند که Exendin-4 موجب افزایش فعالیت استئوبلاست‌ها (از مسیر MAPK) می‌شود (۱۸). زی و همکاران نیز افزایش فعالیت MTT را در سلول‌های پروژنیاتور اندوتلیال تحت اثر GLP-1 مشاهده نموده‌اند (۱۹). با توجه به تفاوت در گزارش‌ها، به نظر می‌رسد تأثیر Exendin-4 بر فعالیت حیاتی هم به غلظت آن و هم به وضعیت سلول از نظر فعالیت ارتباط دارد؛ مثلاً در شرایطی که ماکروفاژها با تحریک قوی توسط LPS مواجهند، فعالیت آن‌ها تحت اثر Exendin-4 افزایش می‌یابد، ولی در تحریک ملایم LPS یا بدون تحریک، Exendin-4 موجب کاهش فعالیت می‌شود.

در مطالعه ما میزان تولید نیتریت (شاخصی از تولید NO) در ماکروفاژهای در حال استراحت، در غلظت‌های ۰/۱ و ۰/۳ نانومولار Exendin-4 کاهش معناداری داشته است. ولی در ماکروفاژ تحریک شده در حضور غلظت نسبتاً بالای Exendin-4 (۳ نانومولار) تولید NO افزایش می‌یابد (نمودار ۲). این نتایج با فعالیت حیاتی همخوانی خوبی دارد (کاهش در ماکروفاژهای در حال استراحت و افزایش در ماکروفاژهای فعال شده). مطالعات متعددی حاکی از کاهش تولید نیتریت از ماکروفاژ تحت اثر Exendin-4 هستند. چانگ و همکاران در سال ۲۰۱۳، مهار بیان پروتئین iNOS توسط Exendin-4 را در ماکروفاژها مشاهده کردند (۱۵). همچنین در مطالعه بوداک و همکاران در سال ۲۰۱۶ نیز کاهش معنادار نیتریت در غلظت ۱۰ نانومولار Exendin-4 و غلظت کم LPS (۰/۵ میکروگرم در میلی‌لیتر) در ماکروفاژهای انسانی مشاهده شد (۴). البته از آنجا که میزان LPS به کاررفته در مطالعه ما ۱۰ میکروگرم در میلی‌لیتر بود و در این شرایط Exendin-4 (در غلظت ۳ نانومولار) موجب افزایش تولید نیتریت گردید، می‌توان اشاره کرد که اثر Exendin-4 وقتی با تحریک قوی در ماکروفاژها مواجهیم متفاوت با ماکروفاژهای در حال استراحت یا تحت تحریک خفیف است. البته مطالعات دیگری هم

می‌شود افزایش cAMP می‌تواند بسته به شرایط، نتایج متفاوتی به دنبال داشته باشد. در برخی گزارش‌ها دیده شده که اثر Exendin-4 بر مونوسیت‌های به دست آمده از افراد دیابتی و غیردیابتی متفاوت است. در گروه اول تشکیل foam cell و حتی بیان سایتوکاین‌های التهابی را القا و در گروه دوم مهار می‌کند (۲۵). حتی افزایش فعالیت ماکروفاژ تحت اثر Exendin-4 از طریق جابه‌جایی NF- $\kappa$ B نیز در گزارشات وجود دارد (۲۶). بنابراین فعالیت Exendin-4 بسته به غلظت و شرایط فعالیت، ممکن است موجب افزایش یا کاهش فعالیت سلول و همچنین تولید نیتريت و TNF- $\alpha$  در سلول‌های ماکروفاژ صفاقی موش C57BL/6 گردد و مطالعات بیشتر، به ویژه بررسی مکانیسم‌ها و مسیرهای سیگنالینگ، در این خصوص می‌تواند به نتایج مفیدی منجر گردد.

نهایتاً با وجود اثرات ضدالتهابی که در Exendin-4 دیده می‌شود، در مورد تأثیر آن در غلظت‌های بالا و یا بر سلول‌های فعال شده باید توجه بیشتری صورت گیرد.

#### تقدیر و تشکر

این مطالعه مستخرج از پایان‌نامه دانشجویی دوره کارشناسی ارشد گروه ایمنی‌شناسی دانشکده پزشکی دانشگاه شاهد می‌باشد و به این وسیله از زحمات کارشناس گروه جناب آقای جمالی نیز قدرانی می‌گردد.

#### منابع

1. Kalra S, Baruah MP, Sahay RK, Unnikrishnan AG, Uppal S, Adetunji O. Glucagon-like peptide-1 receptor agonists in the treatment of type 2 diabetes: Past, present, and future. *Indian Journal of Endocrinology and Metabolism* 2016; 20(2):254-67.
2. Salcedo I, Tweedie D, Li Y, Greig NH. Neuroprotective and neurotrophic actions of glucagon-like peptide-1: an emerging opportunity to treat neurodegenerative and cerebrovascular disorders, *British Journal of Pharmacology*. 2012; 166: 1586-1599.
3. Akdissi A, Ghanim H, Vora M, Green K, Abuaysheh S, Chaudhuri A, Dhindsa S, Dandona P. Sitagliptin Exerts an Antiinflammatory Action, *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 2012; 97(9):3333-3341.

هم‌راستا است و ممکن است در مطالعه ما نیز Exendin-4 با افزایش فاکتورهای ضدالتهابی در کاهش التهاب نقش داشته باشد. در مطالعه Arakawa و همکاران در سال ۲۰۱۰ کاهش TNF- $\alpha$  در غلظت‌های ۰/۳، ۰/۳ و ۳ نانومولار Exendin-4 و در حضور ۱ میکروگرم در میلی‌لیتر LPS مشاهده شد. البته سنجش فاکتورهای مورد نظر ۲ ساعت پس از تیمار انجام شد (۶). درحالی‌که در بررسی ما هم مقدار LPS خیلی بالاتر بود (۱۰ برابر) و هم اینکه سنجش TNF- $\alpha$  بعد از گذشت ۱۲ ساعت صورت گرفت. Buldak و همکاران در سال ۲۰۱۶ نیز کاهش معنادار TNF- $\alpha$  ماکروفاژهای انسانی در غلظت ۱۰ نانومولار Exendin-4 و LPS (با غلظت ۰/۵ میکروگرم در میلی‌لیتر) مشاهده نمودند که باز هم غلظت LPS بسیار کمتر از مطالعه ماست (۴). شاید در اینجا نیز اشاره به مسیرهای مهم در سیگنالینگ cAMP مفید باشد؛ از جمله مسیر فعال‌شدن پروتئین کیناز A (یا PKA) و دیگری مسیر Epac (exchange factor directly activated by cAMP). افزایش فعالیت PKA تحت اثر افزایش cAMP، باعث مهار تولید TNF- $\alpha$  می‌شود ولی مسیر Epac نمی‌تواند این اثر را داشته باشد. از طرف دیگر، در صورتی‌که مسیر Epac فعال گردد، می‌تواند به صورت وابسته به دوز، فاگوسیتوز را مهار نماید (ولی مسیر PKA این اثر را ندارد). البته هر دو مسیر می‌توانند تولید متابولیت‌های اکسیژن مثل H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> را مهار کنند (۲۴)؛ بنابراین همان‌طور که دیده

4. Buldak L, Machnik G, Buldak RJ, Labuzek K, Boldys A, Belowski D, Basiak M, Okopień B. Exenatide (a GLP-1 agonist) expresses anti-inflammatory properties in cultured human monocytes/macrophages in a protein kinase A and B/Akt manner. *Pharmacological Reports* 2016; 68(2):329-37.
5. Dai Y, Dai D, Wang X, Ding Z, Mehta JL. DPP-4 Inhibitors Repress NLRP3 Inflammasome and Interleukin-1 $\beta$  via GLP-1 Receptor in Macrophages Through Protein Kinase C Pathway, *Cardiovascular Drugs and Therapy* 2014; 28:425-32.
6. Arakawa M, Mita T, Azuma K, Ebato C, Goto H, Nomiya T, Fujitani Y, Hirose T, Kawamori R, Watada H. Inhibition of Monocyte Adhesion to Endothelial Cells and Attenuation of Atherosclerotic Lesion by a Glucagon-like

- Peptide-1 Receptor Agonist, Exendin-4. *Diabetes* 2010; 59(4):1030-7.
7. Kappe C, Tracy LM, Patrone C, Iverfeldt K, Sjöholm Å. GLP-1 secretion by microglial cells and decreased CNS expression in obesity. *Journal of Neuroinflammation* 2012; 9:276.
  8. Hogan AE, Tobin AM, Ahern T, Corrigan MA, Gaoatswe G, Jackson R, . Glucagon-like peptide-1 (GLP-1) and the regulation of human invariant natural killer T cells: lessons from obesity, diabetes and psoriasis. *Diabetologia* 2011; 54(11):2745-54.
  9. Iwai T, Ito S, Tanimitsu K, Udagawa S, Oka J. Glucagon-like peptide-1 inhibits LPS-induced IL-1beta production in cultured rat astrocytes. *Neuroscience Research* 2006; 55(4):352-60.
  10. Embleton M J. The Macrophage (2nd Edn). *British Journal of Cancer* 2003; 89(2): 421.
  11. Parameswaran N, Patial S. Tumor necrosis factor- $\alpha$  signaling in macrophages. *Critical Reviews<sup>TM</sup> in Eukaryotic Gene Expression* 2010; 20(2):87-103.
  12. Shiraishi D, Fujiwara Y, Komohara Y, Mizuta H, Takeya M. Glucagon-like peptide-1 (GLP-1) induces M2 polarization of human macrophages via STAT3 activation. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2012; 425(2):304-8.
  13. Liu L, Wang Y, Fan Y, Li CL, Chang ZL. IFN-gamma activates cAMP/PKA/CREB signaling pathway in murine peritoneal macrophages. *Journal of Interferon & Cytokine Research* 2004;24(6):334-42.
  14. Porcheray F, viaud s, rimaniol A-C, Leone C, Samah B, et al. Macrophage activation switching: an asset for the resolution of inflammation. *Clinical & Experimental Immunology* 2005; 142(3): 481-489.
  15. Chang SY, Kim DB, Ryu GR, Ko SH, Jeong IK, Ahn YB, Jo YH, Kim MJ. Exendin-4 inhibits iNOS expression at the protein level in LPS-stimulated Raw264.7 macrophage by the activation of cAMP/PKA pathway. *Journal of Cellular Biochemistry* 2013; 114(4):844-53.
  16. Hibbs JB, Taintor RR, Varin Z, Rachilin EM. Nitric Oxide: acytotoxic activated macrophage, effect to molecule. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 1989; 157:87-96.
  17. Jorens Pj, Mattys Ke, Bult H. modulation of Nitric Oxide synthase activity in macrophage. *Mediators of Inflammation* 1995; 4:75-89.
  18. Feng Y, Su L, Zhong X, Guohong W, Xiao H, Li Y, Xiu L. Exendin-4 promotes proliferation and differentiation of MC3T3-E1 osteoblasts by MAPKs activation. *Journal of Molecular Endocrinology* 2016; 56(3):189-99.
  19. Xie X, Mo Z, Chen K, He H, Xie Y. Effect of glucagon like peptide-1 on proliferation and differentiation of endothelial progenitor cells and its mechanism. *Zhong Nan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban* 2010; 35(12):1254-60.
  20. Liu L, Liu J, Huang Y. Protective Effects of Glucagon-like Peptide 1 on Endothelial Function in Hypertension. *Journal of Cardiovascular Pharmacology* 2015; 65(5):399-405.
  21. Mittal J, Dogra N, Dass R, Majumdar S. In vitro effects of cAMP-elevating agents and glucocorticoid either alone or in combination on the production of nitric oxide, interleukin-12 and interleukin-10 in IFN-gamma- and LPS-activated mouse peritoneal macrophages. *Folia Microbiologica* 2002; 47(6):709-16.
  22. Park YC, Park SJ, Jun CD, Kim GE, Park KI, Kim HD, Park RK, Chung HT. Cyclic AMP analogue as a triggering signal for the induction of nitric oxide synthesis in murine peritoneal macrophages. *Cellular Immunology* 1997; 179(1):41-7.
  23. Sato S, Yanagawa Y, Hiraide S, Iizuka K. Cyclic AMP signaling enhances lipopolysaccharide sensitivity and interleukin-33 production in RAW264.7 macrophages. *Microbiology and Immunology* 2016; 60(6):382-9.
  24. Aronoff DM, Canetti C, Serezani CH, Luo M, Peters-Golden M. Cutting edge: macrophage inhibition by cyclic AMP (cAMP): differential roles of protein kinase A and exchange protein directly activated by cAMP-1. *Jurnal of Immunology* 2005; 174(2):595-9.
  25. Tanaka M, Matsuo Y, Yamakage H, Masuda S, Terada Y, Muranaka K, et al. Differential effects of GLP-1 receptor agonist on foam cell formation in monocytes between non-obese and obese subjects. *Metabolism* 2016; 65(2):1-11.
  26. Ma GF, Chen S, Yin L, Gao XD, Yao WB. Exendin-4 ameliorates oxidized-LDL-induced inhibition of macrophage migration in vitro via the NF- $\kappa$ B pathway. *Acta Pharmacologica Sinica* 2014; 35(2):195-202.



## The effect of exendin-4 on vital activity, nitric oxide and TNF- $\alpha$ production of murine peritoneal macrophages

Hanieh Tavasoli<sup>1</sup>, MohammadReza Jalali Nadooshan<sup>2</sup>, Batool Rahmati<sup>3</sup>, Roya Yaraee<sup>4\*</sup>

1. School of Medicine, Shahed University, Tehran, Iran.
2. Department of Pathology, School of Medicine, Shahed University, Tehran, Iran.
3. Department of Physiology, School of Medicine, Shahed University, Tehran, Iran.
4. Department of Immunology, School of Medicine, Shahed University, Tehran, Iran.

\* Corresponding author e-mail: ryaraee@yahoo.com

### Abstract

**Background and Objective:** Glucagon like peptide 1 (GLP-1) is a peptide released from the small intestine and mainly enhances glucose-induced insulin secretion, although its receptor (GLP-1R) is distributed on various cells including mice and human macrophages. Regarding important functions of macrophage in regulating pro-inflammatory and immune responses, in this study, the effect of exendin-4 (an analog of GLP-1) on vital activity, nitric oxide and TNF- $\alpha$  production of peritoneal macrophages was investigated.

**Materials and Methods:** Peritoneal macrophages were isolated from C57BL/6 mice and cultured with or without LPS for 24 hours and 0.03 to 3 nM exendin-4. The vital activity was evaluated by MTT, nitrite by Griess method and TNF- $\alpha$  by ELISA.

**Results:** Exendin-4 at 3 and 0.3 nM significantly reduced MTT of macrophages (resting), but increased it in stimulated macrophages at 3 nM. Exendin-4 at 0.3 and 0.03 nM reduced nitrite in resting macrophages, although it (3 nM) induced an increase in LPS stimulated macrophages. An increase in TNF- $\alpha$  production of and resting (3 nM) and stimulated macrophages (1 and 3 nM) was also observed.

**Conclusion:** The effect of exendin-4 on nitrite and TNF production of macrophages *in vitro* is dependent on the cell status of activation (besides its concentration) and it may function as pro- or anti-inflammatory.

**Key words:** GLP-1, Exendin-4, Macrophage, MTT, NO, TNF- $\alpha$