مجله علوم پزشکی دانشگاه آزاد اسلامی
دوره ۱۵، شماره ۴، زمستان ۸۴، صفحات ۱۶۱ تا ۱۶۶

Original Article

بررسی غلظتهای مختلف گلوکز بر روند آپپتوز در سلولهای PC12: نقش پروتئین Bax و Bcl_2

مونا فرهادی[۱]، دکتر کاظم پریور[۲]، دکتر علی محمد شریفی[۳]، دکتر سیروس زینلی[۴]، دکتر سیدهادی موسوی[۵]، معصومه بخشایش[۶]

[۱] کارشناس ارشد زیست شناسی سلولی تکوینی
[۲] استاد، گروه جنین شناسی، واحد علوم تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی
[۳] دانشیار، گروه فارماکولوژی، مرکز تحقیقات سلولی ملکولی، دانشگاه علوم پزشکی ایران
[۴] استادیار، گروه ژنتیک انسانی، انستیتو پاستور ایران
[۵] دانشجوی دکتری فارماکولوژی، دانشگاه علوم پزشکی ایران
[۶] کارشناس ارشد، آزمایشگاه سلولی و مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی ایران

چکیده

سابقه و هدف: *هیپرگلیسمی که تحت شرایط دیابتیک اتفاق می‌افتد موجب نقائص متعددی از جمله نوروپاتی، نفروپاتی و رتینوپاتی می‌گردد. هنوز اطلاعات اندکی درباره اثر مستقیم سمیت گلوکز روی سلول‌های نورونی در دست است.*

روش بررسی: *در این تحقیق ابتدا توان حیاتی سلول‌ها توسط روش MTT ارزیابی شد و غلظتهای مختلف گلوکز و سپس نقش پروتئین Bax در القاء آپپتوز سلول‌های PC12 به عنوان یک مدل آزمایشگاهی از سلول‌های نورونی مورد آزمایش قرار گرفت. اثرات غلظتهای مختلف گلوکز توسط رنگ Hoechst و میزان دو پروتئین Bax و Bcl_2 مداخله‌کننده در آپپتوز به‌وسیله روش وسترن بلاتینگ مورد سنجش قرار گرفتند.*

یافته‌ها: *در روش MTT سلول‌ها در ساعات ۴۸، ۷۲و۹۶مرگ سلولی معنی‌داری را نسبت به گروههای کنترل نشان دادند ($p<۰/۰۱$). غلظت ۱۳/۵mg/ml گلوکز غلظت موثر و ۷۲ساعت زمان مناسب برای القاء آپپتوز در این سلول‌ها است. نتایج وسترن بلات نشان داد که بیان پروتئین Bax در سلول‌های تحت افزایش گلوکز به مدت۷۲ساعت، به طور معنی‌داری نسبت به گروه کنترل افزایش دارد. همچنین نسبت بین این دو پروتئین Bax/Bc 2 نیز افزایش معنی‌داری را نشان داد ($p<۰/۰۱$).*

نتیجه‌گیری: *افزایش گلوکز موجب القاء آپپتوز در سلولهای PC12 در مسیر داخلی می‌گردد. در این میان پروتئین Bax نقش مهمی ایفا می‌کند.*

واژگان کلیدی: *سمیت گلوکز، آپپتوز، سلول PC12، پروتئین Bax/Bcl2.*

مقدمه

دیابت از بیماریهای مزمن و شایع در جهان است که تمامی نژادهای انسانی را گرفتار می‌سازد. در این بیماری که نقص متابولیکی گلوکز است، ترشح انسولین از سلولهای β و بازجذب گلوکز توسط انسولین دچار اختلال می‌گردد (۱). هیپرگلیسمی که تحت شرایط دیابتیک اتفاق می‌افتد موجب القاء بیماریهای میکرووسکولار نظیر نوروپاتی، نفروپاتی و رتینوپاتی می‌گردد (۲). نوروپاتی یک عارضه شایع و خطرناک دیابت است و در مطالعات انجام شده اکثر بیماران دیابتی در بدو تشخیص دچار نوروپاتی بوده‌اند. این بیماران دچار تخریب

آدرس نویسنده مسئول: تهران، میدان پونک، انتهای بزرگراه اشرفی اصفهانی، واحد علوم و تحقیقات دانشگاه آزاد اسلامی، دکتر کاظم پریور (**email**: kazem-parivar@yahoo.com)
تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۸٤/۱۰/۲۷
تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۸٤/۱۲/۱۲

[Downloaded from tmuj.iautmu.ac.ir on 2025-08-23]

اعصاب محیطی و خودمختار می‌گردند که گاهی منجر به قطع اندام می‌گردد (۳). افزایش گلوکز عامل اصلی تخریب سیستم عصبی است (۴). شیوع آپپتوز نورونی برای تمام بیماریهای دژنراتیو نورونی با بررسیهای مدلهای حیوانی و همچنین کشت بافت نشان داده شده است (۵،۳). بررسیهای ۲۵ سال اخیر برخی از مسیرهای اصلی متابولیسم گلوکز را در نروپاتی دیابتی نشان داده و روشن شده است که افزایش گلوکز می‌تواند باعث واکنش اختصاصی اکسیژن (ROS) و همچنین افزایش فعالیت فاکتور هسته‌ای کاپای بتا (NF-kB) گردد که در بسیاری از تیپ‌های سلولی از جمله آندوتلیالی، مزانشیمال و سلول‌های بتا پانکراسی دیده شده است (۶). این فرآیند وابسته به فعالیت پروتئین‌کیناز C و ROS می‌باشد، به‌علاوه مهار تجمع سوپراکسید و یا کاهش گلوکز موجب مهار و عدم پیشرفت آپپتوز می‌گردد (۳). آپپتوز میتوکندریایی به‌وسیله تعداد زیادی از پروتئین‌هایی تنظیم می‌شود که بطور مستقیم و غیرمستقیم سیستئین پروتئازها Caspase را مهار و یا فعال می‌کنند.

Bax وBcl2 دو پروتئین مداخله‌کننده در مسیر داخلی آپپتوز و تشکیل کمپلکس آپپتوزوم و همچنین فعال‌کننده و مهارکننده Caspase ها می‌باشند. نسبت Bax/Bcl2 به عنوان فاکتور تعیین کننده بقاء و مرگ سلول شناخته شده است. تاکنون نقش این دو پروتئین در مسیر آپپتوز سلول‌های PC12 بررسی نشده است. سلول‌های PC12 که از غده آدرنال رت بدست آمده‌اند مدل مناسبی جهت نشان دادن مرگ سلولی در سلول‌های عصبی به‌شمار می‌روند (۷،۵). در این تحقیق سعی بر آن بود که نقش پروتئین آنتی‌آپپتوتیکBcl2 و پروآپپتوتیک Bax در سمیت گلوکز و القاء آپپتوز بررسی گردد.

مواد و روشها

کشت سلول: سلول‌های PC12 از انستیتو پاستور تهیه شد. سلول‌ها در دمای ۳۷ درجه، رطوبت ۹۰٪ و CO_2 ۵٪ نگهداری شدند. سلول‌ها در محیط DMEM (Dulbeccos Modified Eagles Medium) بعلاوه ۵٪ سرم جنین گاوی FBS (Fetal Bovine Serum)، ۱۰٪ سرم اسب HS (Horse Serum)، ۵۰IU/ml پنی‌سیلین و ۵۰µg/ml استرپتومایسین رشد کردند. غلظت گلوکز در این محیط ۴/۵mg/ml بود که طبق دستورالعمل ساخت جهت رشد سلول‌های PC12 مناسب بود در حالی‌که این میزان نسبت به غلظت گلوکز سرم انسان به میزان قابل توجهی بالا بود. در این تحقیق غلظت ۱۳/۵mg/mlجهت تیمار گروه تجربی در نظر گرفته شد و سلول‌ها در یک روش وابسته به زمان تحت تیمار قرار گرفتند. بعد از دو پاساژ سلولی، سلول‌ها جهت سنجش توان حیاتی روی ظروف ۹۶ خانه منتقل شده و کشت داده شدند.

سنجش MTT: پس از دو پاساژ سلولی جهت سنجش MTT، سلول‌های PC12 به میزان ۵۰۰۰ سلول در هر خانه در ظرف ۹۶ خانه در زمانهای ۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ کشت داده شد. توان حیاتی سلول‌ها با استفاده از:

3-(4,5-dimethylthiazol–2)-2,5diphenyl tetrazolium ارزیابی شد. به این ترتیب که ۱۰میکرولیتر محلول MTT حل شده در محیط DMEM به غلظت 5mg/ml به هر کدام از خانه‌های ۹۶ تایی اضافه شد و سلول‌ها برای یک ساعت در انکوباتور در حرارت ۳۷ درجه انکوبه شدند. پس از اینکه محیط سلول‌ها دور ریخته شد به رسوب (سلول‌ها و بلورهای حاصله از محلول) ۱۰۰ میکرو لیتر DMSO اضافه شد و جذب نوری آنها در ۵۷۰ نانومتر در دستگاه ELIZA reader بررسی شد.

رنگ آمیزی Hoechst 3334: به این منظور سلول‌ها در PBS (phosphate buffered saline) محتوی ۳/۷٪ پارافرم‌آلدهید به مدت ۳۰ دقیقه فیکس شدند و پس از فیکس شدن در حرارت اتاق سلول‌ها چند بار با محلول PBS شستشو شدند و سپس با ۱۰µl/ml رنگ Hoechst در حرارت اتاق به مدت ۳۰ دقیقه انکوبه شدند. پس از سه بار شستشو سلول‌ها به وسیله میکروسکوپ فلورسنت در طول موج ۳۶۰ نانومتر قابل روئیت شدند.

استخراج پروتئین: پروتئین سلول‌ها طبق روش Bradford با استفاده از سرم آلبومین گاوی استخراج شدند.

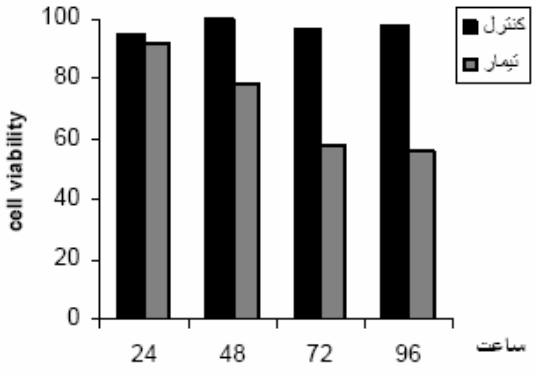
سنجش پروتئین به روش وسترن بلاتینگ: جهت آنالیز ایمونوبلات یا وسترن بلاتینگ دو پروتئین Bax وBcl2تمام سلول‌های کشت شده توسط SDS buffer لیز شدند. مقدار مساوی از پروتئین (۴۰µg/well) قرار داده شد و روی ژل پلی‌اکریل آمید ۱۰٪ با ولتاژ ۱۰۰ الکتروفورز شد. سپس به کاغذ PVDF انتقال داده شد. از آنتی بادی Rabit anti rat Bax and Bcl-2 (BD, 1:1000) به عنوان آنتی‌بادی اولیه واز Alkaline phosphates goat anti-rabit IgG (Roche, 1:1000) به عنوان آنتی‌بادی ثانویه استفاده شد. باندها با استفاده از انکوبه کردن در سوبسترای BCIP (5bromo–4-choloro-3 indolyl phpsphate) و NBT (Nitroblue tetrazolium) به مدت۵تا۲۰دقیقه دیده شدند.

[Downloaded from tmuj.iautmu.ac.ir on 2025-08-23]

استخراج و آنالیز DNA: سلول‌ها در ۱۰ml اتانول ۷۰٪ به مدت یک تا ۴ روز در °۲۰C- فیکس شدند. سلول‌ها به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ شدند و مایع رویی دور ریخته شد. رسوب سلول در ۴۰ میکرولیتر بافر فسفات سیتریک اسید حل شد، سپس به تیوب‌های اپندورف ۰/۵ml انتقال داده شد و در حرارت اتاق برای ۳۰ دقیقه نگهداری شد. مجددا در ۱۵۰۰g به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ شد. مایع رویی به یک اپندورف جدید منتقل شد و در دستگاه Concentrator به مدت ۱۵ دقیقه قرار داده شد. سپس ۳ میکرولیتر ۰/۲۵NP40٪ و ۳ میکرولیتر RNase به آن اضافه گردید و به مدت ۳۰ دقیقه در حرارت ۳۷ درجه انکوبه شد. به هرکدام از تیوپ‌ها ۱۰ میکرولیتر پروتئیناز K اضافه شده و در ۳۷ درجه به مدت ۳۰ دقیقه انکوبه شد. ژل آگاروز ۲٪ تهیه شد و نمونه‌ها یعنی گروه کنترل و گروههای تیمار شده با ۱۳/۵mg/ml گلوکز به همراه ۲ میکرولیتر Loading buffer در چاهکها قرار داده شد و به مدت ۴۰ دقیقه به ولتاژ ۱۰۰ ولت متصل شد.

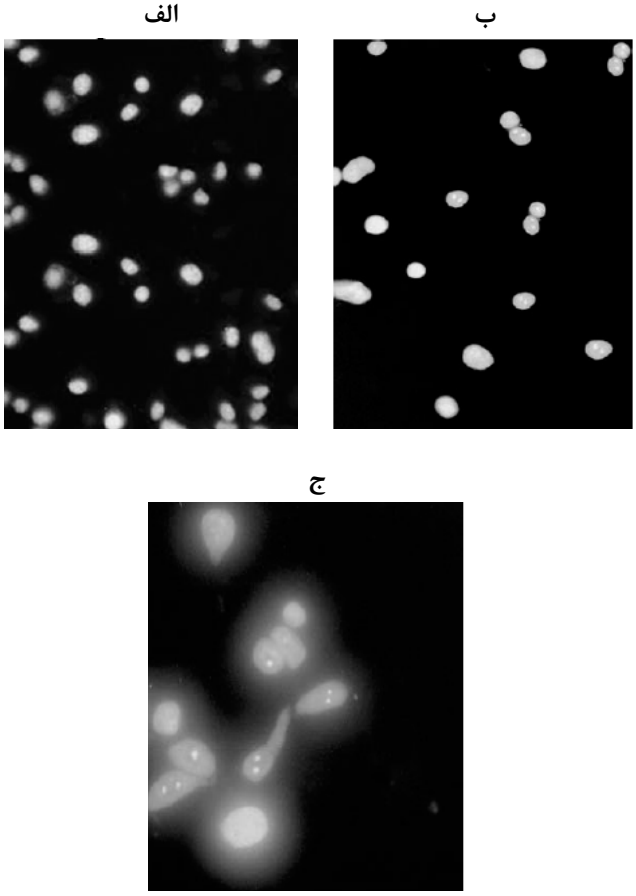
یافته‌ها

نتایج بدست آمده از سنجش MTT: در این مطالعه جهت سنجش مرگ سلولی، سلول‌ها در معرض افزایش گلوکز به میزان سه برابر حد طبیعی محیط کشت در زمانهای ۲۴، ۴۸، ۷۲ و۹۶ساعت قرار داده شدند و برای هرکدام از سلول‌ها یک گروه کنترل در نظر گرفته شد. طبق نمودار ۱ میزان جذب نوری در سنجش MTT در گروه ۲۴ ساعت تفاوت چندانی ندارد ولی در گروه ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت توان حیاتی سلولهای تحت تیمار نسبت به گروه کنترل کاهش معنی‌داری را نشان می‌دهد ($p<۰/۰۱$).



نمودار ۱- نتایج حاصل از سنجش MTT در سلولهای PC12 در زمانهای۲۴، ۴۸، ۷۲و ۹۶ ساعت درمقایسه با گروه کنترل

نتایج رنگ‌آمیزی Hoechst: مطابق شکل ۲ سلول‌های کشت داده شده در دو غلظت گلوکز هسته‌های آپپتوزی را نشان دادند که تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها پس از تبدیل زاویه‌ای $\arcsin\sqrt{x}$ با روش فاکتوریل صورت پذیرفت (جدول ۱). مقایسه میانگین غلظت و زمان به روش دانکن به عمل آمد. بر اساس جدول ۱ غلظت ۱۳/۵mg/ml بهترین غلظت و زمان۷۲ ساعت زمان مناسب در القاء آپپتوز در سلول‌های PC12 می‌باشد.



شکل۲- عکس رنگ‌آمیزی با میکروسکوپ فلورسنت. الف: گروه کنترل با غلظت ۴/۵mg/ml گلوکز، ب: گروه تیمار با ۹/۵mg/ml گلوکز، ج: گروه تیمار با غلظت۱۳/۵mg/ml گلوکز

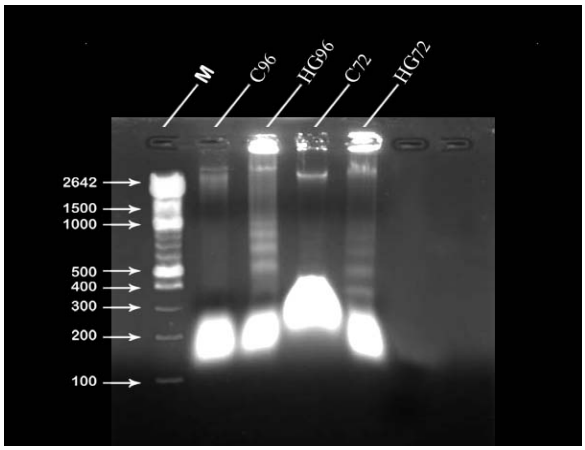
جدول ۱- تجزیه واریانس میزان درصد سلولهای آپپتوز در غلظت و زمان

منابع تغییرات	درجه‌آزادی	مجموع مربعات	میانگین مربعات	F
غلظت	۲	۳/۹۳	۷۶۵/۴۶	۱۶/۷۸*
زمان	۲	۳۷/۳۴	۱۸/۶۷	۶/۶۹*
غلظت/زمان	۴	۱۹/۶۱	۴/۹۰	۱/۷۶†
اشتباه	۳۶	۱۰۰/۳۵	۲/۷۹	

* $p<۰/۰۵$ ، † NS

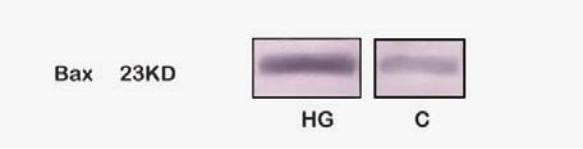
[Downloaded from tmuj.iautmu.ac.ir on 2025-08-23]

نمایش الکتروفورز DNA در گروههای افزایش گلوکز و کنترل: جهت اطمینان از غلظت و زمان مناسب و القاء آپپتوز در این تحقیق از الکتروفورز ژل آگارز استفاده شد. شکل ۳ الکتروفورز ژل آگاروز ۲٪ از DNA استخراج شده از گروههای تحت تیمار با غلظت ۱۳/۵mg/ml گلوکز در زمانهای ۷۲ و ۹۶ ساعت را نشان می‌دهد که باندها فرم نردبانی یا قطعه‌قطعه (۱۰۰۰-۳۰۰) را نسبت به Marker نشان می‌دهند و گروه کنترل فرم قطعه‌قطعه ندارد و بصورت یک باند نمایان است.



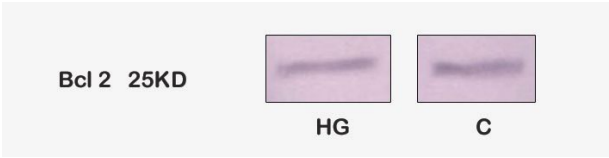
شکل ۳- نمایش قطعه‌قطعه شدن DNA سلول‌های PC12 پس از الکتروفورز ژل آگاروز ۲٪ در گروههای افزایش گلوکز (HG) در زمانهای ۷۲ و ۹۶ ساعت، M مارکر و C گروههای کنترل

نتایج حاصل از وسترن بلاتینگ: در این تحقیق میزان پروتئین Bax گروه تجربی ۱۳/۵mg/ml در زمان ۷۲ ساعت به عنوان یک زمان مناسب جهت آپپتوز سلولها در نظر گرفته شد و نسبت به گروه کنترل توسط وسترن بلات سنجیده شد. بیان پروتئین ۲۳کیلودالتونی Bax نسبت به گروه کنترل با Bonfrroni's test به میزان معنی‌داری (p<۰/۰۱) افزایش نشان داد (شکل ۴).



شکل ۴- نمایش وسترن بلاتینگ بیان پروتئین Bax استخراج شده از سلولهای گروه کنترل C و تیمار با افزایش گلوکز ۱۳/۵mg/ml در ۷۲ ساعت (HG)

شکل ۵ وسترن بلاتینگ بیان پروتئین استخراج شده Bcl2 از سلولهای گروه کنترل و گروه تحت تیمار با افزایش گلوکز ۱۳/۵mg/ml در ۷۲ ساعت را نشان می‌دهد.



شکل ۵- نمایش وسترن بلاتینگ بیان پروتئین Bcl2 استخراج شده از سلولهای گروه کنترل C و تیمار با افزایش گلوکز ۱۳/۵mg/ml در ۷۲ ساعت (HG)

در مقایسه میانگین پروتئین Bax در دو گروه کنترل و گروه تیمار با افزایش گلوکز در زمان ۴۸ ساعت میزان پروتئین Bax نسبت به گروه کنترل به میزان معنی‌داری (p<۰/۰۱) افزایش نشان می‌دهد. همچنین در مقایسه نسبت Bax/Bcl2 درگروه افزایش گلوکز نسبت به گروه کنترل به میزان معنی‌داری (p<۰/۰۱) افزایش نشان داده شد.

بحث

هیپرگلیسمی که تحت دیابت اتفاق می‌افتد نقایصی مانند نوروپاتی و رتینوپاتی ایجاد می‌کند. اگرچه مشخص شده است که هیپرگلیسمی آسیب نورونی را از طریق مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی یا آپپتوز القاء می‌کند، اما مکانیسمی که به‌وسیله آن این القاء صورت می‌گیرد، هنوز بدرستی روشن نیست.

اثر افزایش گلوکز روی بسیاری از تیپ‌های سلولی مطالعه شده و نتایج نشان داده است که سمیت سطح بالای گلوکز باعث القاء آپپتوز از طریق واکنش اختصاصی اکسیژنROS و افزایش سطح NO می‌گردد (۹،۸،۵). گلوکز تشکیل ROS را افزایش می‌دهد و مکانیسم مشترکی را ایجاد می‌کند که ممکن است فعالیت MAP Kinase ها را القاء کرده و آپپتوز را افزایش دهد (۶،۴). همچنین مطالعات دیگر پیشنهاد می‌کنند که جریان کلسیم می‌تواند روی سلول‌های نورونی اثر بگذارد (۱۱،۱۰). اما نقش پروتئین‌های Bax و Bcl2 به عنوان دو پروتئین مداخله‌کننده در مسیر داخلی آپپتوز در سلول‌های PC12 هنوز بررسی نشده است. بنابراین در این مطالعه اثر هیپرگلیسمی بر سلول‌های تمایزنیافته PC12 بعنوان یک مدل سلولی برای مطالعه نوروپاتی دیابتی و همچنین نقش دو پروتئین مذکور در القاء آپپتوز مورد بررسی قرار گرفت.

[Downloaded from tmuj.iautmu.ac.ir on 2025-08-23]

نتایج نشان داد که گلوکز می‌تواند توان حیاتی سلول‌های PC12 تحت تیمار غلظت سه برابر گلوکز (۱۳/۵mg/ml) را کاهش دهد که این نتایج مطابق با نتایج گذشته است (۱۲). سنجش MTT نشان داد که غلظت ۱۳/۵mg/ml گلوکز می‌تواند توان حیاتی سلول‌های PC12 تمایز نیافته را پس از ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت کاهش دهد درحالی‌که طبق گزارش Kushimura افزایش غلظت گلوکز باعث کاهش توان حیاتی سلول‌های تمایز یافته پس از ۷ روز گشته است (۹). این نتایج نشان می‌دهد سلول‌های تمایز یافته مقاومت بیشتری را در برابر مرگ سلولی دارا می‌باشند.

افزایش گلوکز باعث قطعه‌قطعه شدن DNA (DNA ladder) می‌گردد که سنجش آن بعنوان یک مشخصه مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی در مطالعات اخیر مورد استفاده قرار گرفته است. در این سنجش DNA بصورت قطعات ۱۸۰-۲۰۰bp مشخص می‌گرددکه این قطعات توسط الکتروفورز ژل آگارز قابل روئیت می‌باشند (۵).

در این تحقیق DNA استخراج شده از گروه کنترل و تیمار روی الکتروفورز ژل آگارز برده شد. نتایج نشان داد که گلوکز الگوی قطعه‌قطعه شدن DNA را در غلظت ۱۳/۵mg/ml پس از ۴۸ ساعت القاء می‌کند.

آپپتوز توسط تعدادی از ژن‌های پرو و آنتی‌آپپتوتیک مانند Bax و Bcl2 تنظیم می‌شود. تغییر در بیان ژن Bax و Bcl2 باعث القا آپپتوز می‌شود. نشان داده شده است که سرب باعث القا آپپتوز در هیپوکامپ رت از طریق افزایش این نسبت می‌شود همچنین این افزایش در نورون‌های مغزی رت‌های تازه متولد شده (۱۴،۱۳،۱۰) و نورون‌های دوقطبی و قرمز در محیط کشت (۱۵) نشان داده شده است.

یافته‌های پژوهش حاضر نشان می‌دهد افزایش این نسبت بوسیله هیپرگلیسمی، مرگ سلولی را از طریق افزایش بیان پروتئین Bax در مسیر آپپتوزی سلول‌های PC12 القا می‌کند. همانطور که در شکل ۲ و ۳ نشان داده شده است Bax نسبت به گروه کنترل افزایش یافته در حالی‌که پروتئین Bcl2 تغییری نشان نداده است.

تحقیقات نشان داده است Bax به هنگام اتصال به غشاء، دو لایه لیپیدی کانالهای یونی وابسته به ولتاژ و pH را اشغال می‌نماید بنابراین منافذ داخلی را تشکیل می‌دهد. فعالیت این کانالها توسط پروتئینBcl2 مهار می‌شود. Bclx1 پروتئینی است که موجب بقاء سلول شده و نشان داده شده است که مهار مرگ سلولی را بوسیله بلوک‌کردن آزادسازی سیتوکروم C و مهار Caspase فعال‌کننده Apaf 1 القاء می‌نماید (۱۶). افزایش بیان Bax نسبت به Bcl2 باعث القاء آزادسازی سیتوکروم C از میتوکندری و افزایش تشکیل کمپلکس آپپتوزوم و هدایت سلول‌ها به سمت آپپتوز از طریق تشکیل کانالهای هدایتی می‌گردد.

تشکر و قدردانی

از پشتیبانی‌های علمی و اجرایی مسئولین و کارشناسان محترم مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی دانشگاه علوم پزشکی ایران در اجرای این طرح صمیمانه قدردانی می‌شود.

REFERENCES

1. Shepered PR, Kan BB. Glucose transporters and insulin action-implication for insulin resistance and diabetes mellitus. New Eng J Med 1999;341:248-57.
2. Titus T, Badet L, Gray DW. Islet cell transplantation for insulin-dependant diabetes mellitus: perspectives from the present and prospects for the future. Expert Rev Mol Med 2000;6(2):1-28.
3. Feldman EL, Stevens MJ, Russell JW, Greene DA. Somatosensory neuropathy. In: Porte D, Sherwin RS, Baron A, editors. Ellenberg and Rifkin's diabetes mellitus. McGraw Hill. New York, USA. 2002;p:771–88, 789-804, 747-770.
4. Lelkes E, Unsworth BR, Lelkes PI. Reactive oxygen species apoptosis and altered NGF–signaling in PC12 pheochromatocytoma cells cultured in elevated glucose. Neurotox Res 2001;3(2):189-203.
5. Greene DA, Stevens MG, Obrosova I, Feldman EL. Glucose-induced oxidative stress and programmed cell death in diabetic neuropathy. Eur J Pharmacol 1999;375:217-23.
6. Alen DA, Yaghoob MM, Harwood SM. Mechanism of high glucose induced apoptosis and its relationship to diabetic complication. J Nutr Bioche (In Press).
7. Martin TF, Grishanin RN. PC12 cells as a model for studies of regulated secretion in neuronal and endocrine cells. Methods Cell Biol 2003;71:267-86.

[Downloaded from tmuj.iautmu.ac.ir on 2025-08-23]

8. Sombers LA, Colliver TL, Ewing AG. Differentiated PC12 cells: a better model system for the study of the VMAT's effects on neuronal communication. Ann NY Acad Sci 2002;971:86-88.

9. Koshimura K, Gunko T, Murakami Y, Kato Y. Involvement of nitric oxide in glucose toxicity on differentiated PC 12 cells. Neurosci Res 2002;43:31-38.

10. Nobuhisa M, Hideyuki Y, Hitoshi I, Hiroshi K, Jun K, Yataka S, et al. Altered Bcl2 and Bax expression and intracellular Ca signaling in apoptosis of pancreatic cells and the impairment of glucose induced insulin secretion. Endocrinology 1998;139(3):1429-38.

11. Kasier N, Eldman IS. Calcium dependence of glucocorticoid–induced lymphocytolysis. Proc Natl Acad Sci USA 1977;74:638-42.

12. Webb SJ, Harrison DJ, Wyllie AH. Apoptosis: an overview of the process and its relevance in disease. Adv Pharmacol 1997;41:31–34.

13. Sharifi AM, Baniasadi S, Jorjani M, Rahimi F, Bakhshayesh M. Investigation of acute lead poisoning on apoptosis in rat hippocampus in vivo. Neurosci Lett 2002;329:45-48.

14. Oberto A, Marks N, Evans HL, Guidotti A. Lead promotes apoptosis in newborn rat cerebellar neurons: pathological implications. J Pharmacol Exp Ther 1996;9:435-42.

15. He L, Poblenz AT, Medrano CJ, Fox DA. Lead and calcium produce rod photoreceptor cell apoptosis by opening the mitochondrial permeability transition pore. J Biol Chem 2000;275:12175–84.

16. Hu Y, Benedict MA, Wu D, Inohara N, Nunenz G. Bcl xl interacts with Apaf 1 dependent Caspase 9 activation. Proc Natal Acad Sci USA 1998;95:4386-91.

[Downloaded from tmuj.iautmu.ac.ir on 2025-08-23]