

مقایسه اثرات هورمون rhGM-CSF ایرانی و تجاری بر روی تکثیر سلولهای دودمان HL-60 و U937

هانیه جعفری^۱، بهروز شاهسون بهبودی^{۱*}، عبدالخالق دیزجی^۲، باقر یخچالی^۲

۱ گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه علوم دانشگاه تهران

۲ مرکز ملی تحقیقات مهندسی ژنتیک و تکنولوژی زیستی

(دریافت: ۸۲/۳/۲۱؛ پذیرش: ۸۳/۳/۱۸)

چکیده

فاکتورهای رشد خونساز نقش مهمی در تکثیر سلولهای خونساز و تمایز سلولهای اجدادی خونساز دارند. GM-CSF نوترکیب انسانی در درمان نوتروپنیا (Neutropenia) که بعد از شیمی درمانی بیماران سرطانی پدید می‌آید مورد استفاده قرار می‌گیرد. نوع نوترکیب hGM-CSF که از طریق مهندسی ژنتیک در باکتری اشریشیاکلی (*E. coli*) تهیه می‌شود و در درمان نوتروپنیا مورد استفاده قرار می‌گیرد. در این تحقیق از کشت دودمانهای سلولی HL-60 و U-937 جهت بررسی اثر rhGM-CSF ایرانی که به نام (NRCGEB) تهیه شده و rhGM-CSF محصول شرکت Sandoz استفاده شده است. برای ارزیابی میزان فعالیت بیولوژیکی rhGM-CSF درمیزان تکثیر سلولی در سلولهای HL-60 از سه روش MTT assay، NBT assay و Brdu assay استفاده شد و در مورد سلولهای U-937 تنها از MTT assay استفاده گردید. سلولهای فوق در غلظتهای مختلف ۰ تا ۴۰۰۰۰۰ pg/ml کشت داده شدند. غلظت ۴۰ تا ۴۰۰ پیکوگرم در میلی‌لیتر هورمون خونساز فوق بر روی کلیه سلولها سبب حداکثر تکثیر سلولی و کلنی‌زایی گردید در حالیکه از غلظت ۴۰۰ تا ۴۰۰۰۰۰ پیکوگرم در میلی‌لیتر تقسیم سلولی و کلنی‌زایی بتدریج کاهش یافت. این نتیجه برای GM-CSF نوترکیب آزمایشگاهی و نوترکیب تجاری یکسان بوده است. با این وجود rhGM-CSF نوع تجاری اثر بیشتری در دو غلظت اول بر روی تقسیم سلولهای HL-60 داشته است. rhGM-CSF می‌تواند مدت زمان تقسیم سلولی را کوتاه کند. سلولهای U-937 در تست MTT در تمامی غلظتهای Sandoz تکثیرشان بیش از نوع NRCGEB بود. در حالیکه سلولهای HL-60 تنها در سه غلظت ۰ و ۴۰۰۰ و ۴۰۰۰۰ pg/ml نوع Sandoz تکثیرشان بیشتر بوده است. نتایج حاصل از تست MTT سلولهای HL-60 تا حدودی با تست NBT و تست Brdu متفاوت می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: U937، HL-60، rhGM-CSF، تکثیر سلولی، کلنی‌زایی.

مقدمه

امروزه پروتئینهای نو ترکیب انسانی جایگاه خاصی در درمان بعضی از بیماریها دارند و به همین دلیل محققین از روشهای بیوتکنولوژی مانند بیان ژن مربوطه در باکتریها و یا مخمرها برای تولید این پروتئینها استفاده می کنند. اما ساختمان این پروتئینها در طی استخراج و تخلیص و به علت خصوصیات سیستم بیان ژنتیکی در کلونینگ و همچنین استفاده از مواد شیمیایی، نمکها و دترجنتها در طی مراحل تولید دستخوش تغییرات متعددی می گردد (Higgins, 1999). لذا جهت مصرف دارویی لازم است خصوصیات این پروتئینها قبل از استفاده مطالعه شود.

در این تحقیق بدنبال بررسی فعالیت پروتئین نو ترکیب GM-CSF نو ترکیب انسانی می باشیم که در ایران تهیه شده و به نام (National Research Center for Genetic Engineering and Biotechnology) NRCGEB فاکتور رشد خونساز GM-CSF باعث تحریک تکثیر (Proliferation) و بلوغ (Maturation) و تمایز (Differentiation) سلولهای اجدادی (Precursor Cell) میلوئید (Myeloid) به نوتروفیل و مونوسیت و ائوزینوفیل می شود (Balkwill, 1989). تولید سلولهای بالغ خونی از سلولهای پیش ساز آنها و فعالیت این سلولها مرهون وجود همین فاکتورهای رشد خونساز است. GM-CSF میلوبلاستها و مونوبلاستها را تحریک و وادار به تمایز می کند. GM-CSF انسانی روی ماکروفاژها و گرانولوسیتهای پریماتهای غیر انسانی نیز اثر می گذارد. GM-CSF اولین بار از ریه موش توسط Burgess در سال 1977 تخلیص شد (Balkwill, 1989).

GM-CSF یک سایتوکاین گلیکوپروتئینی است که مکان ژن آن در انسان 5q23-31 می باشد. ژن GM-CSF انسانی تقریباً 2.5 Kb است که دارای ۴ اگزون است. این ژن یک پروتئین ۱۴۴ اسید آمینه ای را کد می کند که دارای 17 اسید آمینه راهنما است. دو باند دی سولفید در این پروتئین وجود دارد که برای فعالیت بیولوژیکی این پروتئین لازم و ضروری است، در حالیکه کربوهیدرات متصل به پروتئین برای فعالیتش لازم نیست. وزن مولکولی GM-CSF بر حسب درجه های مختلف گلیکوزیلاسیون بین 14-35 kDa متغیر است (Balkwill, 1989; Monroy *et al.*, 1990; Dexter, 1990).

سنتز GM-CSF توسط انواع مختلفی از سلولها مانند سلولهای اندوتلیال و سلولهای فیبروبلاست و سلولهای استروما بعد از تحریک توسط $TNF-\alpha$ (Tumor Necrosis Factor- α)، $IL-1$ (Interleukin)، IFN (Interferon) صورت می گیرد (Dexter, 1990). استخراج فاکتور GM-CSF طبیعی طاقت فرسا و از لحاظ هزینه مقرون به صرف نیست. این فاکتور در درمان دارویی کاربردهای زیادی دارد به همین دلیل از روشهای بیوتکنولوژی برای تولید

GM-CSF نوترکیب انسانی استفاده می‌کنند. با این وجود به راحتی و سرعت نمی‌توان از *rhGM-CSF* کلون شده برای درمان استفاده کرد. GM-CSF بعنوان فاکتور رشد قوی هم در *invitro* و هم در *invivo* عمل می‌کند. این فاکتور در درمان لوسمی‌ها (Leukemia) و در ازدیاد توانایی دفاعی سلولهای میزبان و بیگانه خواری و تخریب بعضی از میکروارگانیسرها و تومورها نقش دارد (Pistia, 1991; Glaspy & Gold, 1990).

GM-CSF یک جاذب شیمیایی قوی برای نوتروفیلها است که فعالیت ضد میکروبی، فعالیت فاگوسیتیک نوتروفیلها و ماکروفاژها را زیاد می‌کند (Cannistra *et al.*, 1987). می‌توان گفت که یکی از کاربردهای مهم *rhGM-CSF* در درمان عفونتهای بعد از شیمی درمانی است. هدف این تحقیق بر روی مقایسه میزان فعالیت بیولوژیکی هورمونهای فوق (نوع ایرانی و تجاری خارجی) بر روی دو دودمان سلولی می‌باشد.

مواد و روشها

۱- کشت نیمه جامد (*Semi Solid Culture*) سلولهای *HL-60* و *U-937*

به منظور مقایسه فعالیت بیولوژیکی *rhGM-CSF* نوع Sandoz و نوع NRCGEB بر روی کلنی زایی سلولهای *HL-60* و *U-937* (از سلولهای موجود در آزمایشگاه مرکز تحقیقات استفاده شد) از روش کشت نیمه جامد سلولها در محیط آگار استفاده شد. لازم به توضیح است که نوع Sandoz نمونه تجاری *rhGM-CSF* ای است که در درمان نارساییهای خونی در ایران بکار می‌رود. سلولهای *HL-60* و *U-937* در محیط DMEM حاوی ۱۰٪ FCS (Fetal Calf Serum)، داخل انکوباتور در دمای ۳۷ °C، غلظت CO₂ ۵٪ و رطوبت ۹۰٪ کشت داده شدند. این سلولها در هر هفته ۲ بار با محیط جدید پاساژ داده شدند و در هر بار پاساژ از سلولها تعیین درصد سلولهای زنده (Viability) شد. در این روش رنگ تریپان بلو (Trypan Blue) توسط سلولهایی که غشاء آنها آسیب دیده و نفوذپذیر شده و در نهایت مرده اند جذب می‌گردد. برای شمارش، سلولها با استفاده از رنگ متیل گرین (Methylen Green) رنگ آمیزی شده و سپس با لام هموسیتومتر نئوبار شمارش شدند.

هنگامیکه Viability سلولی به ۹۵٪ رسید سلولها آماده برای کشت نیمه جامد آگار می‌شوند. تعداد سلولها با استفاده از روش رنگ آمیزی بالا در میلی‌لیتر تعیین شدند، سپس به هریک از حفره‌های پلیت ۲۴ تایی، غلظتهای ۴۰، ۴۰۰، ۴۰۰۰، ۴۰۰۰۰، ۴۰۰۰۰۰ pg/ml از هر دو نوع فاکتور رشد خونساز به صورت دو تایی اضافه گردید و ۴ حفره برای کنترل نگه داشته

شد، محیطی نیز شامل محیط کشت DMEM(2x) به نسبت ۵۰٪، FCS ۲۰٪ و آگار با غلظت نهایی ۳/۰٪ با درجه حرارت ۳۷ °C ساخته شده و به ازاء هر میلی‌لیتر از این محیط، ۱۰۰۰ سلول از محیط سوسپانسیون به آن اضافه و پس از افزودن مقدار مناسب این محیط به حفره‌های حاوی rhGM-CSF با چرخش منظم، محتوی حفره‌ها مخلوط گردید. نمونه‌ها به مدت ۱۳-۱۲ روز در انکوباتور در حرارت ۳۷ °C و رطوبت ۹۰٪ قرار گرفتند تا بدین ترتیب فرصت لازم برای تشکیل کلنی به سلولها داده شود.

برای رنگ‌آمیزی کلنی‌های بدست آمده به روش زیر عمل شد. ۵ ml متانول در هر یک از حفره‌ها ریخته و بعد از ۱۰ دقیقه متانول را با کمک سمپلر از حفرات خارج کرده صبر کرده تا حفرات خشک گردید. ۵ ml رنگ گیمسا ۱:۱۰ رقیق شده با آب مقطر را صاف و سپس به هر یک از حفرات اضافه گردید، ۲۵ دقیقه صبر کرده و سپس رنگ را خارج کرده و هر حفره با آب مقطر چندین بار شستشو داده شد تا رنگ زمینه محو شود.

۲- ارزیابی تکثیر سلولی

۲-۱ تست NBT (Nitro Blue Tetrazolium)

سلولهای HL-60 با غلظت 2×10^5 در میلی‌لیتر در پلیتهای ۲۴ حفره در محیط DMEM حاوی ۱۰٪ FCS در غلظتهای مختلف دو نوع فاکتور رشد خونساز کشت داده شدند. بعد از ۹۶ ساعت انکوباسیون، پلیت به مدت ۱۵ دقیقه با ۱۵۰۰ rpm سانتریفوژ شد. سپس به هر حفره، ۵۰۰ میکرولیتر PBS اضافه و دوباره عمل سانتریفوژ انجام شد. محیط رویی را دور ریخته و رسوب در ۲۰۰ میکرولیتر محیط (1X) FCS ۲۰٪ به مدت ۱۰ دقیقه در انکوباتور قرار داده شد. محلول تهیه شده NBT نیز قبلاً در بن ماری ۳۷ °C می‌باید گرم شود. ۲۰۰ میکرولیتر NBT به حفره‌ها اضافه و به مدت ۳۰ دقیقه انکوبه شد. پلیت به مدت ۵ دقیقه در یخ گذاشته شد و دوباره به مدت ۱۰ دقیقه در ۳۰۰۰ rpm سانتریفوژ شده و سوپ رویی دور ریخته شد و سلولها با ۵۰۰ میکرولیتر PBS شستشو و سانتریفوژ شد. محیط رویی دور ریخته شد و روی رسوب متانل ۷۰٪ ریخته و ۵ دقیقه سلولها سانتریفوژ شدند تا سلولها ثابت شوند. دوباره محیط رویی دور ریخته شد و روی سلولها ۲۰۰ میکرولیتر KOH، ۲ مولار ریخته شد. در آخر کار به هر حفره، ۲۵ میکرولیتر DMSO اضافه و جذب در ۶۲۰ nm خوانده شد.

۲-۲ تست *MTT* (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl tetrazolium bromide)

نمکهای تترازولیوم مانند WST-1 و XTT و MTT را می توان برای ارزیابی تکثیر سلولهای زنده بکار برد. این رنگها فقط در سلولهای زنده به فرم رنگ فورمازان شکسته می شوند.

روش سنجش تکثیر سلولی مطابق بروشور کیت MTT (Cell Proliferation Kit I Cat. No.) (Rosh , 465 007) صورت گرفت. در این روش از ماده رادیواکتیو استفاده نمی شود و مراحل شستشو نیاز ندارد. در این روش حتی مقادیر کم تکثیر سلولی قابل اندازه گیری است.

در ابتدا سلولهای HL-60 و U-937 را با تراکم سلولی 2×10^5 در محیط DMEM حاوی FCS ۱۰٪ با غلظتهای مختلف (۰-۴۰۰۰۰ pg/ml) *rhGM-CSF* نوع Sandoz و NRCGEB و Roch در پلیتهای ۹۶ حفره با غلظت نهایی ۱۰۰ میکرولیتر در انکوباتور 37°C و رطوبت ۹۵٪ به مدت ۹۶ ساعت کشت داده شدند.

بعد از تمام شدن زمان انکوباسیون ۱۰ میکرولیتر از رنگ MTT با غلظت نهایی ۵ mg/ml به حفرهها اضافه شد و برای ۴ ساعت در انکوباتور دردمای 37°C و رطوبت ۹۰٪ انکوبه شد. بعد از انکوباسیون ۱۰۰ میکرولیتر از محلول حلال که حاوی SDS ۱۰٪ در ۰/۱ مولار HCl است به حفرهها اضافه گردید. پلیت به مدت ۲۴ ساعت در 37°C انکوبه شد. بعد از ۲۴ ساعت جذب نمونهها در 540 nm با دستگاه ELISA reader مدل Multiskan MS Labsystems خوانده شد.

۲-۳ تست *BrdU*

این روش یک روش مفید و موثر برای سنجش مقادیر زیاد سلولها می باشد. در این روش تکثیر سلولی براساس میزان سنتز DNA اندازه گرفته می شود.

از *BrdU* (5-bromo-2'-deoxyuridine) به عنوان جانشینی برای پیریمیدین استفاده می کنند. بعد از آنکه *BrdU* وارد DNA شد توسط روشهای Immunoassay قابل شناسایی و پیگیری است. در این روش میزان تکثیر سلولی که توسط فاکتورهای رشد، سایتوکاینها اثرات محرک و یا بازدارنده محیط ایجاد شده است قابل اندازه گیری باشد. می توان در اندازه گیری حساسیت یک تومور به داروهای مختلف شیمیایی از این روش نیز استفاده نمود. این روش با استفاده از کیت الیزا (Cell Proliferation ELISA Colorimetric) با Cat. No. 1 647 226 انجام شد.

۲-۳-۱ روش کار

سلولهای HL-60 با غلظت 2×10^5 در میلی لیتر در پلیت ۹۶ حفره در محیط کشت DMEM حاوی FCS ۱۰٪ در غلظتهای مختلف دو نوع فاکتور رشد خونساز ایرانی و تجاری در حجم نهایی ۲۰۰ میکرولیتر کشت داده شدند.

بعد از ۹۶ ساعت انکوباسیون از محلول ۱، که حاوی Brdu، ۱:۱۰۰ رقیق شده است ۲۰ میکرولیتر به هر یک از حفره‌ها اضافه شد. پلیت ۲۴ ساعت انکوبه گردید. بعد از انکوباسیون پلیت به مدت ۱۰ دقیقه در ۳۰۰۰ rpm سانتریفوژ شد. محیط رویی به آرامی برداشته شد بطوریکه سلولها کنده نشوند. سپس سلولها در دمای 60°C به مدت یک ساعت قرار گرفتند. ۲۰۰ میکرولیتر از بطری ۲ به هر یک از حفره‌ها اضافه کرده و مدت ۳۰ دقیقه در درجه حرارت $25-15^{\circ}\text{C}$ انکوبه گردید. بعد از انکوباسیون مایع رویی را برداشته و سه بار حفرات با محلول شستشو داده شد. سپس از محلول سوبسترا ۱۰۰ میکرولیتر به حفرات اضافه شده و بعد از ۱۵ دقیقه جذب در 340 nm خوانده شد.

برای متوقف کردن عمل آنزیم و سوبسترا میتوان از 10 میکرولیتر از H_2SO_4 ، 1 مولار به هریک از حفرات اضافه کرد، رنگ آبی که از قبل تولید شده بود با اضافه شدن اسید تبدیل به رنگ زرد می‌شود. می‌توان جذب را در این مرحله در 450 nm خواند.

۳- روشهای آماری

کلیه آزمایشات سه بار تکرار گردید و از آنها میانگین گرفته شد سپس نتایج با استفاده از برنامه Excel مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. P Value آزمایشات $0/05$ درصد گرفته شد.

نتایج

یکی از معیارهای سنجش رشد سلولهای HL-60 و U-937 استفاده از توانایی کلنی‌زایی این سلولها در محیط نیمه جامد آگار است. بعد از کشت سوسپانسیون، می‌توان این سلولها را در محیط نیمه جامد آگار با سری غلظتهای متفاوت rhGM-CSF به مدت ۱۲ روز کشت داد. نتایج اثر غلظتهای مختلف rhGM-CSF بر روی تعداد کلنی‌ها در دو نمودار الف و ب آمده است.

۳-۱ اثر GM-CSF نو ترکیب بر روی کلنی‌زایی دودمانهای سلولی

در بررسی اثر فاکتور رشد خونساز rhGM-CSF در میزان کلنی‌زایی و تکثیر سلولهای HL-60 و U-937 در غلظتهای متفاوت ۰، ۴۰، ۴۰۰، ۴۰۰۰، ۴۰۰۰۰، ۴۰۰۰۰۰ pg/ml نتایج زیر

حاصل گردید. درمقایسه تعداد کلنی های تشکیل شده HL-60 و U-937 در غلظتهای مختلف *rhGM-CSF* نوع NRCGEB سبب تشکیل تعداد بیشتری از کلنی های HL-60 در غلظتهای بالاتر از 40000 pg/ml نسبت به U-937 می گردد. به ترتیب در دو غلظت آخر در سلولهای HL-60 شاهد ۱/۲۹٪ و ۰/۶۷٪ افزایش در تعداد کلنی هستیم درحالیکه در سلولهای U-937 در همین دو غلظت به ترتیب شاهد ۰/۹۴٪ و ۰/۵۷٪ افزایش در تعداد کلنی می باشیم. تعداد کلنی های تشکیل شده در نوع Sandoz، در ۳ غلظت آخر بیشتر از تعداد کلنی های U-937 است. در سلولهای HL-60، 1.08% و ۱/۰۵٪ به ترتیب در دو غلظت آخر افزایش تعداد کلنی وجود دارد در حالیکه در سلولهای U-937، 0.94% و 0.58% به ترتیب افزایش تعداد کلنی وجود دارد. کلنی های HL-60 بسیار متراکم و فشرده می باشند در حالیکه سلولها در کلنی های U-937 بسیار پراکنده هستند.

در هفته اول *rhGM-CSF* سبب تقسیم سریع سلولهای HL-60 و U-937 می شود بطوریکه سلولها از نظر مورفولوژی چندان تفاوتی با یکدیگر نمی کنند، ولی از هفته دوم به بعد سلولها از نظر مورفولوژی با یکدیگر تفاوت پیدا کرده و متمایزتر می شوند.

۳-۲ اثر *GM-CSF* نوترکیب بر میزان تکثیر دودمانهای سلولی

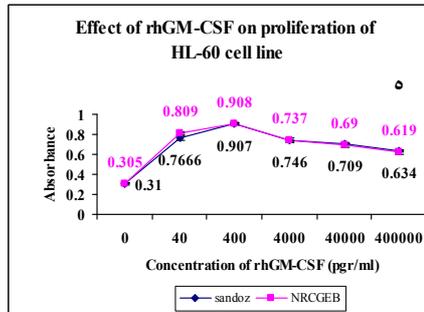
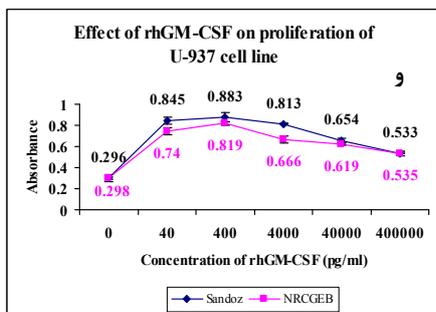
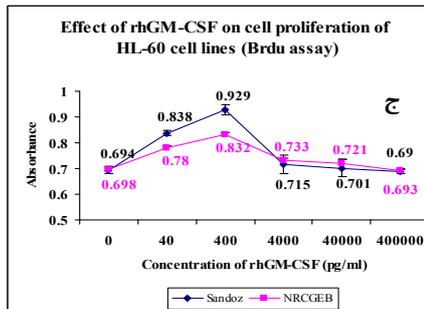
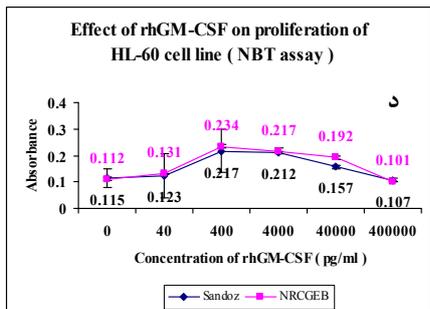
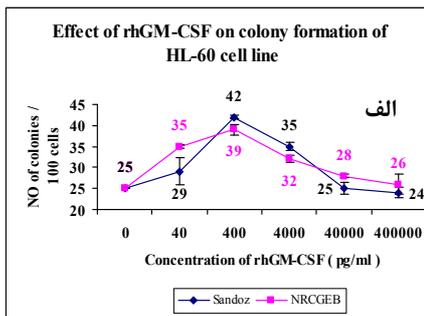
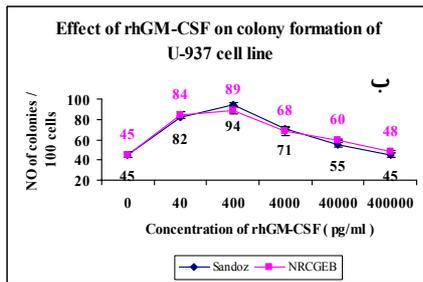
به دلیل محدودیت تنها سلولهای HL-60 در دو تست NBT assay و Brdu assay مورد استفاده قرار گرفتند. در تست NBT (نمودار د) جذب سلولها در ۶۲۰nm خوانده شد، در این طول موج در سه غلظت ۴۰، ۴۰۰ و ۴۰۰۰۰۰ pg/ml، *rhGM-CSF* نوع تجاری یعنی Sandoz اثر بیشتری در تکثیر سلولی داشته است. در غلظت ۴۰ pg/ml، نوع Sandoz ۱/۳۵٪ در نوع NRCGEB در همین غلظت ۱/۱۳۰٪، در غلظت ۴۰۰ pg/ml نوع Sandoz، ۱/۳۸٪ و در نوع NRCGEB در همین غلظت ۱/۲۱٪ در غلظت ۴۰۰۰۰۰ pg/ml نیز در نوع Sandoz ۰/۶۸٪ و در نوع NRCGEB ۰/۵۲٪ افزایش در جذب داشته است. در تست Brdu assay (نمودار ج) نیز جذب سلولها در ۳۴۰nm خوانده شد. در این طول موج نیز در غلظتهای ۴۰، ۴۰۰، ۴۰۰۰ pg/ml، *rhGM-CSF* محصول ایرانی یعنی NRCGEB اثر بیشتری نسبت به Sandoz در تکثیر سلولهای HL-60 داشته است. به ترتیب از غلظت کمتر به بیشتر در نوع NRCGEB، ۱/۱۱٪، ۱/۱۹٪، ۱/۰۵٪ و در نوع Sandoz، ۱/۲۰٪، ۱/۳۳٪، ۱/۰۳٪ افزایش جذب داشته است.

تست MTT (نمودار ه، و) در مورد هر دونوع سلول HL-60 و U-937 صورت گرفت. در این تست جذب سلولها در ۵۴۰ nm خوانده شد، سلولهای U-937 به جز غلظت ۰ pg/ml در بقیه غلظتهای rhGM-CSF نوع Sandoz افزایش تکثیر سلولی را نشان دادند که این افزایش به مراتب بیشتر از اثر نوع NRCGEB بود و سلولهای HL-60 در سه غلظت آخر نوع Sandoz به ترتیب ۲/۴۰٪، ۲/۲۸٪، ۲/۰۴٪ افزایش جذب نسبت به نمونه کنترل و در نوع NRCGEB به ترتیب در سه غلظت فوق از کم به زیاد ۲/۴۱٪، ۲/۲۶٪، ۲/۰۲٪ افزایش نسبت به نمونه کنترل داشته است. در سه روش گفته شده تنها سلولها از نظر کمیت مورد بررسی قرار گرفتند. اما در روش کشت نیمه جامد آگار علاوه بر اینکه سلولها از نظر توانایی تولید کلنی بررسی شدند از نظر مورفولوژیکی نیز مورد مطالعه قرار گرفتند. در هر یک از تستهای انجام شده P Value محاسبه شده از ۰/۰۵ بیشتر بود که این نشان دهنده عدم اختلاف اثر بین دو نوع rhGM-CSF است.

بحث

استفاده از سل لاینهای HL-60 و U-937 به عنوان مدلی مفید برای بررسی تکثیر و تمایز سلولهای لوکمیای میلوئید (Myeloid leukemia cell) در آزمایشگاه ها مورد استفاده قرار می گیرد. عوامل مختلفی می تواند سبب تمایز این سلولها به سمت سلولهای گرانولوسیتیک (Granulocytic) و یا مونوسیتیک (Monocytic) گردد. بطور مثال رتینوئیک اسید سبب تمایز سلولهای HL-60 به سمت سلولهای گرانولوسیتی می گردد و ویتامین D3 باعث تمایز این سلولها به سمت سلولهای ماکروفاژی می شود.

rhGM-CSF نیز مانند ترکیبات فوق می تواند روی مسیر تمایزی دودمانهای سلولی نظیر HL-60 و U-937 اثر گذارد، غلظتهای متفاوت rhGM-CSF منجر به تغییراتی در بیان پروتوانکوژنهای (Proto-oncogen) myc و c-fos می گردد بطوریکه می توانند سبب تغییر سیکل سلولی شوند. بیان ژن c-myc می تواند سبب وارد شدن سلول به مرحله تقسیم شود در حالیکه بیان ژن c-fos سبب تمایز سلولها می گردد (Gasson, 1991). در مراحل تمایز سلولهای HL-60 میزان بیان انکوژن c-myc به شدت کاهش پیدا می کند. شاید یکی از مهمترین دلایلی که سل لاینها تقریباً بطور نامحدودی تکثیر پیدا می کنند بیان ۳۰ بار بیشتر همین ژن نسبت به سلولهای عادی و طبیعی است. بیان هر یک از این ژنها تحت کنترل راههای پیچیده ای می باشد که هر یک زمانی وارد عمل می شوند که GM-CSF به رسپتور خود که شامل دو زیرواحد α و β است متصل شده و مسیر انتقال پیام JAK2/STAT5 به راه بیفتد (Degos & Linch, 1999).



نمودارهای الف - و: مقایسه تغییرات تعداد کلنی‌های دودمانهای سلولی HL-60 و U-937 در غلظتهای مختلف rhGM-CSF دو نوع Sandoz و NRCGEB با استفاده از تکنیک کشت نیمه جامد آگار و نیز تغییرات میزان تکثیر سلولی این دو نوع سلول در همین غلظتها با استفاده از سه تکنیک NBT، BrdU، MTT در نمودارهای فوق آمده است. (الف) - مقایسه تغییرات تعداد کلنی سلولهای HL-60 در دو نوع rhGM-CSF. (ب) - مقایسه تغییرات تعداد کلنی سلولهای U-937 در دو نوع rhGM-CSF. (ج) - میزان تغییرات تعداد سلولهای HL-60 با تکنیک BrdU assay. (د) - تغییرات میزان تکثیر سلولهای HL-60 با تکنیک NBT assay. (ه) - سنجش تغییرات تکثیر سلولهای HL-60 با تکنیک MTT assay. (و) - سنجش تغییرات تکثیر سلولهای U-937 با تکنیک MTT assay.

GM-CSF سبب بیان عملکردهایی شبیه مونوسیتها مثل کشندگی وابسته به آنتی‌بادی در سلولهای U-937 می‌گردد. GM-CSF نوترکیب سبب بیان ژن TNF می‌شود و این سلولها شروع به ترشح TNF می‌کنند. اما این ترکیب در محیط نیمه جامد آگار تاثیر چندانی بر روی تکثیر سلولها ندارد. در غلظتهای بالاتر از 400 pg/ml در کشت نیمه جامد آگار ترکیبات بازدارنده دیگری از سلولهای HL-60 و U-937 ترشح می‌شوند که مانع از تولید کلنی می‌شوند. براساس این گفته‌ها می‌توان گفت که GM-CSF یک نقش مرکزی در پاسخ سیستم ایمنی دارد، GM-CSF فاکتوری است که از سلولهای T ترشح شده و با اثر گذاشتن بر روی مونوسیتها سبب آزادسازی TNF از این سلولها می‌شود. TNF در واقع یک فاکتور بازدارنده برای رشد سلولهای پیش ساز میلوئیدی است به خصوص در حضور IFN-gamma که این فعالیت را از خود بیشتر نشان می‌دهد (Cotter, 1994).

References

- Higgins, S.J., and Hames, B.D. (1999) *Protein expression*, Oxford University press, London. pp. 20-45.
- Balkwill, F.R. (1989) *Cytokines in cancer therapy*, Oxford University press, London. pp.116-146.
- Gasson, J.C. (1991) *Molecular physiology of GM-CSF*, Blood, **77**(6), 1131-1145.
- Monroy, R.L., Davis, T.A., Macyittie, T.J. (1990) *Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor more than a haemopoetin*, Clin. Immunol. Immunopathol, **54**, 333-349.
- Dexter T.M. (1990) *Colony-Stimulating Factors: Molecular and Cellular Biology*, Marcel Dekker. New Yourk, pp.111-131.
- Pistia, V. (1991) *Chronic childhood neutropenia, studies on the invitro clonogenicity of bone marrow myeloid progenitors*. Acta Haemetol, **86**, 21-35.
- Glaspay, J.A., Gold, D.W. (1990) *Clinical trials of myeloid growth factors*, Exp, Hematology, **18**, 100-109.
- Cannistra S.A., Ramaldi A., Spriggs D. (1987) *Human Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor induces expression of the tumor necrosis factor gene by the U-937 cell line and by normal human monocytes*, The journal of American society for clinical investigation, **79**, 1720-1728.
- Degous, L., Linch P. (1999) *Text book of malignant haematology*, Martin Dunitiz, London. pp.111-126.
- Cotter, T.G. (1994) *Cell death in the myeloid lineage*. Immunological reviews, **142**, 93-111.