

## اثر فاکتور رشد مشابه انسولین (IGF-I) در آپوپتوز سلول‌های تخمدان هامستر چینی جهت تولید داروهای زیستی

سمیه پیروزمند<sup>2,1</sup>، مهران میراولیایی<sup>2</sup>، سید محمد اطمیابی<sup>1</sup>، هومن کاغذیان<sup>3</sup>، جمال مشتاقیان<sup>2</sup>، شیوا  
ایرانی<sup>4</sup>، داریوش نوروزیان<sup>3</sup>

<sup>1</sup> بخش تحقیق و توسعه، مجتمع تولیدی و تحقیقاتی انستیتو پاستور ایران  
<sup>2</sup> بخش سلولی و مولکولی، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه اصفهان  
<sup>3</sup> بخش پابلوت بیوتکنولوژی، انستیتو پاستور ایران  
<sup>4</sup> مرکز تحقیقات مهندسی زیست فناوری، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات تهران

### چکیده

**سابقه و هدف:** توانایی کاهش مرگ سلول‌ها ناشی از آپوپتوز و حفظ طولانی‌مدت بقاء آنها در محیط‌های بدون سرم در کشت سلولی، موضوعات مهمی در تولید پروتئین‌های نو ترکیب می‌باشند. فاکتور رشد مشابه انسولین (IGF-I)، فاکتور رشد انتخابی جهت تکثیر سلول‌های پستانداران در محیط‌های کشت بدون سرم است که علاوه بر فعالیت میتوژنی، دارای فعالیت آنتی‌آپوپتوزی در برابر محرک‌های القاء‌کننده مرگ می‌باشد. در این مطالعه، اثر آنتی‌آپوپتوزی غلظت‌های متفاوت IGF-I طی زمان‌های 24 و 48 ساعت بر روی رده سلول‌های تخمدان هامستر KI بررسی گردید.

**روش بررسی:** در این مطالعه تجربی، سلول‌ها در محیط کشت DMEM حاوی آنتی‌بیوتیک به همراه ده درصد سرم جنین گاوی کشت داده شدند. آپوپتوز در سلول‌ها توسط متوتروکسات القاء گردید، سرم حذف شد و در نهایت غلظت‌های 50-10 نانوگرم/میلی‌لیتر IGF-I اضافه گشت. فرایند آپوپتوز توسط کیت تشخیصی کاسپاز 3 و تکثیر سلول‌ها با روش تعیین تکثیر و بقاء سلولی (MTT) مورد بررسی قرار گرفت. **یافته‌ها:** با افزایش غلظت IGF-I، فعالیت کاسپاز 3 کاهش معنی‌داری را نشان داد، به طوری که در بالاترین غلظت IGF-I (50 نانوگرم/میلی‌لیتر) و با مقایسه با گروه کنترل منفی، پس از تیمار 24 و 48 ساعت به ترتیب 1/7 و 1/4 برابر کاهش فعالیت کاسپاز 3 مشاهده شد که موید فعالیت آنتی‌آپوپتوزی این فاکتور جهت حفظ بقاء سلول‌های کشت داده شده در برابر محرک‌های القایی آپوپتوز (متوتروکسات) می‌باشد. **نتیجه‌گیری:** IGF-I به عنوان فاکتور آنتی‌آپوپتوزی، مرگ برنامه‌ریزی شده سلول‌های CHO-K1 را در شرایط القایی آپوپتوزی کاهش داد. **واژگان کلیدی:** آپوپتوز، سلول‌های تخمدان هامستر چینی، فاکتور رشد مشابه انسولین، کاسپاز 3، کشت سلولی.

### مقدمه

فرآیندهای دفاعی و پاسخ‌های ایمنی ضروری می‌باشد (1-3). در کشت رده‌های سلولی پستانداران که از نظر صنعتی حائز اهمیت هستند، مانند سلول‌های تخمدان هامستر چینی (CHO: Chinese Hamster Ovary Cells) و سلول‌های کلیه نوزاد هامستر (BHK: Baby Hamster Kidney Cells) در بیوراکتور (دستگاهی در کشت سلولی که سلول‌ها در آن رشد می‌کنند)، آپوپتوز بسیار شایع است که می‌تواند به علت محدوده وسیعی از فاکتورهای فیزیولوژی و غیرفیزیولوژی مانند

آپوپتوز یا مرگ برنامه‌ریزی شده سلول یک فرایند ژنتیکی است که توسط محرک‌های محیطی فعال می‌شود و برای تکوین طبیعی، هموستازی موجود زنده چند سلولی،

آدرس نویسنده مسئول: تهران، بخش تحقیق و توسعه، مجتمع تولیدی و تحقیقاتی انستیتو پاستور، دکتر

سید محمد اطمیابی (email: mohammadatyabi@yahoo.com)

تاریخ دریافت مقاله: 1390/12/15

تاریخ پذیرش مقاله: 91/7/1

لیپوپتیک) می‌باشند (16، 15). اضافه کردن فاکتورهای میتوزنی مانند انسولین و IGF-I در محیط کشت بدون سرم، آپوپتوز را در سلول‌های CHO مهار، موجب افزایش رشد و حفظ بقای سلول‌ها می‌شود. IGF-I به دلیل شباهت ساختاری با انسولین در توالی‌های اسیدآمینه‌ای، ساختار سه‌بعدی و همچنین گیرنده می‌تواند به عنوان یک میتوزن، جایگزین انسولین شود و از طریق گیرنده‌اش، آپوپتوز را در کشت‌هایی که در معرض محرک‌های القاء کننده مرگ قرار گرفته‌اند، مهار نماید (18، 10). علاوه بر این IGF-I رشد سلول‌ها را در غلظت‌های بسیار پایین و در محیط کشت بدون سرم حمایت می‌کند (19). IGF-I به گیرنده تیروزین کینازی خود متصل شده، باعث فعال شدن دو مسیر سیگنالی مهم MAPK/ERK و PI3K/Akt می‌شود و در نهایت منجر به فعالیت‌های فیزیولوژی متعدد درون سلولی مانند پیشرفت چرخه سلولی، تمایز، تکثیر، حفظ بقای سلول‌ها و مهار آپوپتوز می‌شود (20، 19، 3).

هدف ما در این مطالعه، بررسی نقش IGF-I (با توجه به دو متغیر غلظت و زمان) در تکثیر، حفظ بقا و کاهش یا مهار آپوپتوز بر روی رده سلول‌های وابسته به تکیه‌گاه (Anchorage Dependent) تخمدان هامستر چینی K1 و در محیط کشت کامل همراه با داروی متوتروکسات، جهت ایجاد آپوپتوز بود. متوتروکسات باعث القاء آپوپتوز وابسته به کاسپاز گشته که این القاء به دو پارامتر غلظت و زمان بستگی دارد. استفاده از این دارو، باعث تشکیل آپوپتوزوم، فعال شدن آنزیم کاسپاز 3 و شکست سوبسترای آن، پلی‌آدنوزین دی‌فسفات ریپوز پلی‌مرز (PARP) می‌شود (21).

## مواد و روشها

### مواد و کشت سلولی

رده سلولی وابسته به تکیه‌گاه CHO-K1 (ATCC CCL61) از انستیتو پاستور تهران تهیه شد. فاکتور رشد IGF-I (13769)، MTT (I23K74156) و متوتروکسات (A6770) از شرکت سیگما (Sigma) و کیت کالریمتریک کاسپاز 3 (KHZ0022) از شرکت Invitrogen تهیه گردید. سلول‌ها در محیط کشت کامل حاوی DMEM (Gibco) (Dulbecco's Modified Eagle Medium) همراه با یک درصد آنتی‌بیوتیک پنی‌سیلین-استرپتومایسین (Sigma) و ده درصد سرم جنین گاوی (FBS: Dulbecco's Modified Eagle Medium) (Gibco) کشت داده شدند و در انکوباتور 37 درجه

اتمام مواد غذایی یا فاکتورهای رشد در محیط کشت، تجمع مواد سمی، افزایش اسمولاریته، تغییرات pH و دما، آلودگی ویروسی و تغییرات نامتعادل اکسیژن باشد (4-7).

سلول‌های پستانداران مانند سلول‌های CHO در تولید انبوه پروتئین‌های نوترکیب، مانند آنتی‌بادی‌های مونوکلونال، واکسن‌ها، پلاسماپتوزن‌ها و اینترفرون‌های مورد استفاده در درمان‌های دارویی و تشخیصی کاربرد دارند (8). به علت دست‌کاری ژنتیکی آسان، بیان مقادیر بالایی از پروتئین‌های نوترکیب و توانایی رشد نسبتاً سریع، سلول‌های CHO نسبت به سایر رده‌های سلولی برای سالیان متمادی به عنوان یک سیستم مطمئن و ارزشمند در تولید پروتئین‌های نوترکیب به شمار می‌آیند (9). در صنعت بیوتکنولوژی بسیار مهم است که آپوپتوز را به منظور افزایش زمان بقای سلول‌ها، تولید پروتئین‌های نوترکیب برای مدت طولانی و کاهش هزینه فرایند پایین دستی (Down-Stream)، در محیط کشت مهار یا به تاخیر بیندازیم. جهت افزایش مقدار پروتئین‌های نوترکیب در مرحله تولید و همچنین به منظور جلوگیری از آپوپتوز، دو روش عمده وجود دارد:

1- دست‌کاری در محیط کشت سلول (روش‌های شیمیایی و تغذیه‌ای) 2- استفاده از روش‌های مهندسی ژنتیک در داخل سلول (4).

اولین اقدام مهاری جهت تاخیر آپوپتوز سلولی، تغییر شرایط تغذیه‌ای می‌باشد که در هیبریدوما و رده‌های سلولی بیان‌کننده پروتئین‌های نوترکیب، افزایش بقای سلول‌ها را موجب می‌شود (10-13). رشد سلول‌ها در کشت بستگی به حضور فاکتورهای رشد و سیتوکین‌های موجود در سرم دارد، بنابراین در بسیاری از رده‌های سلولی در صنعت بیوتکنولوژی و در شرایط بدون سرم آپوپتوز اتفاق می‌افتد (14). وجود مشکلات استفاده از سرم در محیط کشت مانند آلودگی ویروسی، هزینه بالا و تغییر در کشت بیچ (Batch) (بیچ، سیستم کشت بسته در مقادیر بالا می‌باشد که سلول‌ها یا میکروارگانیزم‌ها در حجم معینی، تحت شرایط محیطی خاص (مانند نوع تغذیه، دما، فشار) در محیط کشت مایع مغذی رشد می‌نمایند) موجب پیشرفت محیط‌های بدون سرم شده است، این محیط‌ها بسیار پیچیده و حاوی مواد افزودنی مانند فاکتورهای رشد (انسولین، فاکتور رشد مشابه انسولین (Insulin Like Growth Factor I)، فاکتور رشد فیروبلست) و انتقال‌دهنده‌های آهن (مانند ترانسفرین)، مواد احیاء‌کننده (گلوکاتیون)، فلزات کمیاب (روی، سلنیوم)، لیپیدها یا پیش‌سازهای لیپیدی و حامل‌ها (اسید لینولئیک، اسید

تکرار شده و این آزمون براساس شرایط سلول‌ها، سه بار متوالی انجام گردید.

### سنجش فعالیت آنزیم کاسپاز 3

براساس دستورالعمل کیت کالریمتریک کاسپاز 3، فعالیت پروتئازی کاسپاز براساس شناسایی و شکست توالی آمینواسیدی DEVD-pNA سوپسترای آن، پلی آدنوزین دی فسفات ریبوز پلی مرز (PARP)، اندازه گیری می شود. تعداد  $1 \times 10^6$  سلول همراه با 5 میلی لیتر محیط کشت کامل در فلاسک‌های 25 سانتی متر مربع کشت داده شدند. در شرایط یکسان از نظر تراکم سلولی، محیط جدید به همراه ماده متوتروکسات جهت القاء آپوپتوز اضافه گردید. پس از تیمار 72 ساعت با متوتروکسات، محیط کشت جدید بدون سرم حاوی غلظت‌های 50-10 نانومولار/ میلی لیتر فاکتور رشد IGF-I به فلاسک‌ها اضافه گردید و جایگزین محیط کشت قبلی شد. پس از تیمارهای 24 و 48 ساعت، سلول‌ها با تریپسین/EDTA جدا شده، با دور RPM (Revolutions Per Minute) 1500 به مدت 5 دقیقه سانتریفوژ و شمارش شدند. با اضافه نمودن 50 میکرولیتر بافر لیزکننده، سلول‌ها به صورت سوسپانسیون در یخ، به مدت ده دقیقه انکوبه و سانتریفوژ (1 دقیقه و 10000g) گردیدند. سپس بافر واکنشی همراه با DTT و سوپسترای DEVD حاوی کروموفور نیتروانیلید (pNA: P-Nitroanilide) به سوپرناتانت حاصل از سانتریفوژ اضافه گردید و پلیت در انکوباتور 37 درجه سانتی گراد به مدت دو ساعت انکوبه شد. شکست کروموفور p-NA توسط آنزیم کاسپاز 3، موید فعالیت آنزیم می باشد که نمونه‌ها با استفاده از دستگاه رنگ‌سنجی الایزا در طول موج 405 نانومتر ثبت و نسبت به جذب 630 نانومتر سنجیده شدند. آزمون فوق سه مرتبه تکرار شده و این آزمون براساس شرایط سلول‌ها سه بار متوالی انجام گردید.

### تحلیل آماری

برای تحلیل آماری داده‌ها، از نرم‌افزار SPSS (نسخه 16) استفاده گردید. آنالیز آماری داده‌ها با روش آنالیز واریانس یک طرفه انجام شد. سطح معنی دار بین گروه‌های تحت تیمار، کوچک‌تر از 0/05 ( $p < 0/05$ ) در نظر گرفته شد.

### یافته‌ها

#### بقاء سلولی

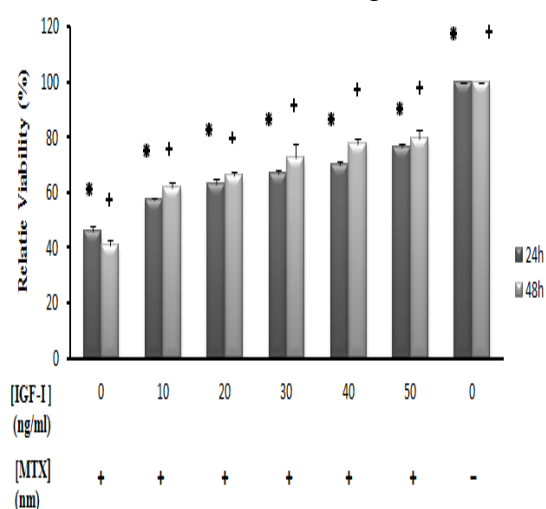
بررسی نقش IGF-I در تکثیر و بقاء سلول‌های CHO-K1 همراه با شرایط بدون سرم نشان داد که میزان بقاء سلول‌ها در

سانتی گراد، 95 درصد رطوبت و 5 درصد  $CO_2$  حفظ گردیدند. افتراق سلول‌های زنده از مرده توسط رنگ‌آمیزی با تریپان بلو و شمارش در هموسایتومتر مشخص شد. پاساژهای متعدد سلول‌ها و مورفولوژی آنها از طریق میکروسکوپ معکوس مورد بررسی قرار گرفت.

### سنجش تکثیر سلولی

این سنجش که بر پایه احیاء آنزیمی ۴،۵ دی‌متیل تیاژول 2-5 دی فنیل تترازولیوم بروماید (MTT) و تشکیل کریستال‌های فورمازان توسط آنزیم‌های دی‌هیدروژناز سلولی و میتوکندری است، شاخص بقاء سلول‌ها می‌باشد. سلول‌های CHO-K1 به تعداد  $2 \times 10^4$  سلول/چاهک همراه با 100 میکرولیتر محیط کشت کامل در میکروپلیت 96 خانه‌ای ته صاف کشت داده شدند و در انکوباتور به مدت 24 ساعت انکوبه گردیدند تا سلول‌ها به کف پلیت متصل شوند. پس از 24 ساعت، 100 میکرولیتر محیط کشت کامل همراه با متوتروکسات (به عنوان القاء کننده آپوپتوز) جایگزین محیط قبلی شد. پس از تیمار 72 ساعت با متوتروکسات، سلول‌ها با غلظت‌های 50-10 نانومولار/ میلی لیتر IGF-I طی مدت زمان 24 و 48 ساعت تیمار شدند. محیط کشت حاوی متوتروکسات و بدون IGF-I به عنوان گروه کنترل مثبت و محیط کشت بدون داروی متوتروکسات و IGF-I به عنوان گروه کنترل منفی در نظر گرفته شد. 10 میکرولیتر ماده زرد رنگ MTT (غلظت 5 میلی گرم/ میلی لیتر) به هر چاهک حاوی سلول اضافه گردید و در انکوباتور 37 درجه سانتی گراد و 5 درصد  $CO_2$  به مدت چهار ساعت قرار داده شد. سپس محتویات کشت دور ریخته شده، کریستال‌های فورمازان به مدت 5-10 دقیقه با 100 میکرولیتر حلال DMSO در دمای اتاق حل شدند و با استفاده از دستگاه رنگ‌سنجی الایزا جذب نمونه‌ها در طول موج 570 نانومتر ثبت و نسبت به جذب 630 نانومتر سنجیده شدند. آزمون فوق سه مرتبه تکرار شده و این آزمون براساس شرایط سلول‌ها، سه بار متوالی انجام گردید. علاوه بر آزمون ذکر شده، سلول‌ها به تعداد  $2 \times 10^4$  در هر چاهک از پلیت‌های 96 خانه‌ای، طی مدت زمان 24 ساعت کشت داده شدند. سپس محیط کشت قبلی با محیط کشت تازه بدون سرم حاوی غلظت‌های 50-10 نانومولار/ میلی لیتر IGF-I تعویض گردید و سلول‌ها طی مدت زمان 24 ساعت تحت تیمار قرار گرفتند. محیط کشت بدون سرم و IGF-I به عنوان گروه کنترل در نظر گرفته شد. بر طبق دستورالعمل MTT، جذب نمونه‌ها در طول موج 570 نانومتر ثبت گردید. آزمون فوق سه مرتبه

تقریباً 30 درصد سلول‌ها افزایش تکثیر را نشان دادند و میزان بقاء سلول‌ها 76/1 درصد به دست آمد ( $p < 0/001$ ). بنابراین اضافه کردن فاکتور رشد از تعداد سلول‌های در حال مرگ کاسته، باعث افزایش میزان بقاء و تکثیر در سلول‌ها گردید. نتایج حاصل از 48 ساعت تیمار با IGF-I در سلول‌های CHO-K1 تیمار شده با متوتروکسات نشان داد که همانند تیمار 24 ساعت، میزان مرگ سلول‌ها کاهش یافته، افزایش بقاء و تکثیر سلول‌ها آشکار شد، به طوری که در غلظت 50 نانوگرم/میلی‌لیتر IGF-I در مقایسه با کنترل مثبت، 79/4 درصد بقاء و تقریباً 38/5 درصد افزایش تکثیر سلولی به دست آمد ( $p < 0/001$ ) (شکل 2).

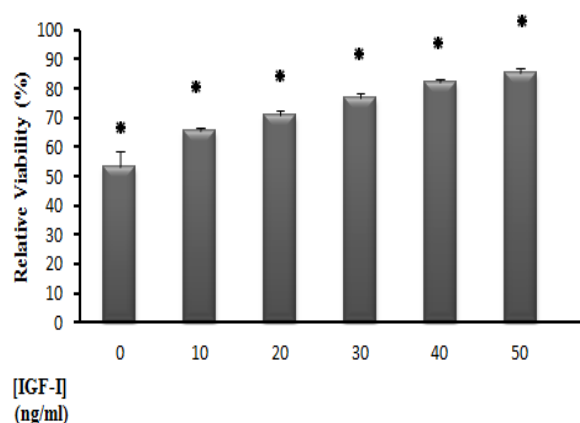


**شکل 2- مقایسه بقاء در سلول‌های CHO-K1 القاء شده با متوتروکسات و تحت تیمار قرار گرفته با IGF-I در طی زمان‌های 24 و 48 ساعت.** سلول‌های CHO-K1 به تعداد  $2 \times 10^4$  سلول/میلی‌لیتر کشت داده شدند. هر داده نشانگر میانگین و انحراف معیار حاصل از حداقل سه تکرار می‌باشد.  $p < 0/001$  و  $p < 0/001$  اختلاف معنی‌دار گروه‌های حاوی متوتروکسات و IGF-I با گروه کنترل مثبت.

### فعالیت کاسپاز 3

با مقایسه گروه کنترل مثبت (حاوی متوتروکسات و بدون IGF-I) و سلول‌های تیمار شده با غلظت‌های متفاوت IGF-I با گروه کنترل منفی (بدون داروی متوتروکسات و IGF-I)، درصد افزایش فعالیت کاسپاز 3 به دست آمد. 24 ساعت پس از تیمار با IGF-I، بالاترین درصد افزایش فعالیت کاسپاز 3 مربوط به گروه کنترل مثبت با بیش از 3/2 برابر و کمترین درصد افزایش فعالیت کاسپاز 3 با 1/7 برابر مربوط به غلظت 50 نانوگرم/میلی‌لیتر IGF-I بود.

سلول‌های تیمار شده با IGF-I نسبت به گروه کنترل (محیط کشت بدون IGF-I و سرم) طی مدت زمان 24 ساعت، اختلاف معنی‌داری را نشان داد ( $p < 0/001$ ). در گروه کنترل میزان بقاء سلول‌ها 53 درصد و با افزایش غلظت فاکتور رشد در سلول‌های تحت تیمار با IGF-I بقاء به میزان قابل توجهی افزایش یافت، به طوری که در غلظت 50 نانوگرم/میلی‌لیتر IGF-I (بالاترین غلظت استفاده شده در این مطالعه)، میزان بقاء سلول‌ها به 85 درصد رسید (شکل 1).



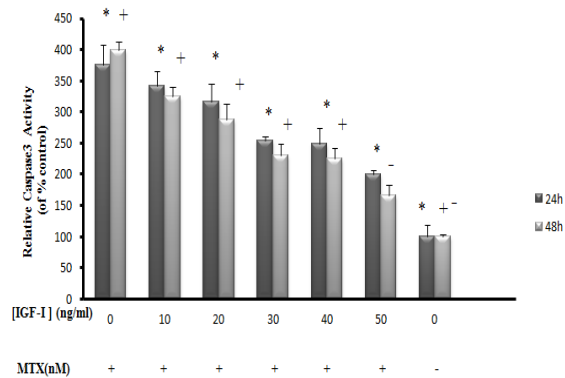
**شکل 1- مقایسه غلظت‌های متفاوت IGF-I در تکثیر و بقاء سلول‌های CHO-K1 در مدت زمان 24 ساعت.** سلول‌های CHO-K1 به تعداد  $2 \times 10^4$  سلول/میلی‌لیتر کشت داده شدند. هر داده نشانگر میانگین و انحراف معیار حاصل از حداقل سه تکرار می‌باشد.  $p < 0/001$  اختلاف معنی‌دار گروه‌های حاوی IGF-I با گروه کنترل

فاکتور رشد مشابه انسولین در غلظت‌های بالاتر، بقاء و تکثیر سلول‌ها را در محیط‌های بدون سرم افزایش داده و روی میزان مرگ سلول‌ها اثر کاهشی نشان داد. اثر این فاکتور رشد، بر روی سلول‌های CHO-K1 از الگوی وابسته به غلظت تبعیت می‌کند. بقاء سلول‌ها در گروه تیمار شده با مقادیر متفاوت IGF-I با گروه کنترل مثبت (محیط حاوی متوتروکسات و فاقد فاکتور رشد)، مقایسه شد. پس از 24 و 48 ساعت انکوباسیون با ماده IGF-I، افزایش بقاء سلول‌ها وابسته به غلظت فاکتور رشد مشاهده گردید. در سلول‌های CHO-K1 تیمار شده با متوتروکسات مشاهده شد که 24 ساعت پس از حذف ماده متوتروکسات از محیط کشت سلول و تیمار با IGF-I، با افزایش غلظت فاکتور رشد اثر متوتروکسات روی سلول‌ها کاهش یافت و همچنین افزایش بقاء سلولی مشاهده شد. این فاکتور روی رشد سلول‌ها اثرات مثبتی را نشان داد، به طوری که در غلظت 50 نانوگرم/میلی‌لیتر IGF-I در مقایسه با گروه کنترل مثبت،

موافق با نتایج Adamson و همکارانش (2007) مبنی بر افزایش نجات، حفظ بقاء و مهار آپوپتوز در سلولهای CHO که به صورت سوسپانسیون در محیط بدون پروتئین رشد می‌کنند، می‌باشد. به طوری که در غلظت 20 ng/ml این فاکتور، بقاء سلولها در محیط بدون سرم نزدیک به 100 درصد گزارش گردید و هیچ سلول آپوپتوزی پس از 72 ساعت شناسایی نشد. همچنین در حضور این فاکتور رشد بیان پروتئینهای Bax، Bcl2 و کاسپاز 1 مهار گردید (19). نتایج اثر غلظت‌های متفاوت IGF-I (5-200 ng/ml) در شرایط بدون سرم (لقاء کننده آپوپتوز) بر روی سلول‌های دیسک بین‌مهره‌ای (IVD) نشان داد که پایین‌ترین غلظت IGF-I (5 ng/ml)، ساخت DNA را به صورت کاملاً مشخص تحریک نموده و بیشترین تحریک این فاکتور رشد 100 ng/ml گزارش شد. تحریک ساخت DNA توسط این فاکتور رشد، با فعال شدن هر دو مسیر پیام‌دهی MEK/ERK و PI3K/Akt می‌باشد. نتیجه تکثیر سلول‌ها و حفظ بقاء آنها در شرایط ذکر شده با نتیجه حاصل از این مطالعه مطابقت دارد (23). علاوه بر این استفاده از سلول‌های نوترکیب بیان‌کننده IGF-I، بقاء سلول‌های CHO را پس از حذف سرم در مرحله G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> چرخه سلولی در سطح بالایی حفظ نموده و باعث مهار آپوپتوز گردید (17، 18). در مطالعه حاضر، اثر فاکتور رشد IGF-I بر روی آپوپتوز لقاء شده توسط متوتروکسات در سلول‌های CHO-K1 کاهش آشکاری را نشان داد. با حذف ماده القایی از محیط کشت و اضافه کردن فاکتور رشد از تعداد سلول‌های در حال مرگ کاسته شد، میزان بقاء سلول‌ها در حد بالایی حفظ گردید و علاوه بر این افزایش تکثیر سلول‌ها به دست آمد.

شکست پروتئولیتیک پروتئین‌های سلولی با ارزیابی فعالیت کاسپاز 3 مشخص شد، به طوری که در بالاترین غلظت IGF-I استفاده شده در این مطالعه (50 ng/ml) طی مدت زمان‌های 24 و 48 ساعت پس از تیمار، بیشترین کاهش فعالیت کاسپاز 3 به ترتیب 1/5 و 2 برابر مشخص گردید. پس با افزایش غلظت IGF-I، فعالیت کاسپاز 3 کاهش معنی‌داری را نشان داد که موید فعالیت آنتی‌آپوپتوزی این فاکتور جهت حفظ بقاء سلول‌های کشت داده شده در برابر محرک‌های القایی آپوپتوز (متوتروکسات) می‌باشد. در مطالعه‌ای که توسط Ma و همکاران در سال 2009 با بررسی نقش IGF-I در تنظیم چرخه سلولی و مهار مرگ در سلول‌های آندوتلیال ناف انسان انجام گردید، مشخص شد که پس از تیمار سلول‌ها با ماده افزایش دهنده مرگ سلولی (آنژیوتنسنین) و استفاده از غلظت‌های متفاوت IGF-I (0/01، 0/5، 2/5 میکروگرم/میلی‌لیتر)، این فاکتور

48 ساعت پس از تیمار با IGF-I، بالاترین درصد افزایش فعالیت کاسپاز 3 مربوط به گروه کنترل مثبت با بیش از 3/4 برابر و کمترین درصد افزایش فعالیت کاسپاز 3 با 1/4 برابر مربوط به غلظت 50 نانوگرم/میلی‌لیتر IGF-I بود (شکل 3).



شکل 3- درصد افزایش فعالیت کاسپاز 3 ناشی از اثر IGF-I در سلول‌های CHO-K1 لقاء شده در طی مدت زمان 24 و 48 ساعت. سلول‌های CHO-K1 به تعداد  $1 \times 10^6$  سلول/میلی‌لیتر کشت داده شدند. هر داده نشانگر میانگین و انحراف معیار حاصل از حداقل سه بار تکرار می‌باشد. \*  $p < 0/001$ ،  $p < 0/01$  اختلاف معنی‌دار گروه‌های حاوی متوتروکسات و IGF-I با گروه کنترل منفی.

## بحث

حفظ بقاء سلولها در کشت می‌تواند به علت مهار مستقیم آپوپتوز یا انعکاسی از افزایش میزان تکثیر باشد. آپوپتوز ممکن است با پاسخ مستقیم به فعالیت گیرنده‌های خاص (مانند گیرنده‌های فاکتور نکروزی توموری و گلوکورتیکوئید) یا اشعه ماوراءبنفش، مواد سمی مانند داروهای شیمی‌درمانی و اتمام مواد غذایی یا کاهش فاکتورهای رشد در محیط کشت لقاء شود. لذا حساسیت سلول‌هایی که تحت این شرایط متحمل آپوپتوز می‌شوند، به پیام‌های درون سلولی تنظیم شوند. توسط فاکتورهای رشد بستگی دارند که این فاکتورها روی فرایند آپوپتوز تاثیرگذار هستند (22). سنجش شاخص بقاء سلولی در این مطالعه نشان داد که در بالاترین غلظت IGF-I مورد مطالعه (50 ng/ml) همراه با شرایط بدون سرم، بقاء سلولی 85 درصد بوده و میزان تکثیر سلول‌ها نسبت به گروه کنترل (محیط بدون سرم) افزایش 30 درصدی را نشان داد. در نتیجه در غلظت‌های بالاتر، تکثیر سلولها در محیط‌های بدون سرم افزایش یافت و همچنین این فاکتور رشد مرگ سلول‌ها را کاهش داد؛ علاوه بر این بقاء سلول‌ها به میزان بالایی حفظ گردید. نقش IGF-I بر روی حفظ بقاء سلول‌های CHO-K1 از الگوی وابسته به غلظت تبعیت می‌کند. نتایج ما

داشته و میزان فعالیت آن را کاهش می‌دهد (28). نقش آنتی‌آپوپتوزی این فاکتور رشد جهت مهار مرگ سلولی، از طریق اتصال به گیرنده IGF-I آغاز می‌گردد که با فعال شدن مسیر PI3K /AKt دنبال می‌شود که راهبرد سلول جهت افزایش پیام‌های نجات در سلول‌های متفاوتی که در برابر القاء‌کننده‌های مختلف آپوپتوز قرار گرفته‌اند، می‌باشد (33-29). نقش فاکتور رشد IGF-I در حفظ بقاء سلول‌ها در برابر آپوپتوز، در سلول‌های متفاوتی از قبیل فیروبلاست‌های موشی (34)، سلول‌های HT29-D4 سرطان کولون انسانی (35)، سلول‌های شوان (36)، سلول‌های فیروبلاست BALB/c3T (22)، سلول‌های SH-SY5Y نوروبلاستوما (37)، سلول‌های ماهیچه (38) و سلول‌های سرطانی MCF 7 (39) مورد مطالعه قرار گرفته است و این مطالعات اثر IGF-I را در تکثیر و حفظ بقاء بسیاری از سلول‌های پستانداران تأیید می‌نماید.

پس فاکتور رشد IGF-I وابسته به غلظت و در پاسخ به شرایط القایی آپوپتوزی، افزایش چشمگیری را در بقاء سلولی نشان می‌دهد، موجب رشد و تکثیر سلول‌ها شده و با کاهش آپوپتوز نقش مهمی را در نجات سلول‌ها ایفاء می‌نماید.

### تشکر و قدردانی

این مطالعه با حمایت انستیتو پاستور ایران واحد کرج و گروه زیست‌شناسی دانشکده علوم دانشگاه اصفهان انجام گردید. بدین وسیله پژوهشگران مراتب سپاس و قدردانی خود را از خانم‌ها کریمی، رضایی، خسروی، صادق‌چهره و خانم دکتر سلیمی، همچنین آقایان اردستانیان، دکتر خان احمد و دکتر آهنگری ابراز می‌دارند.

رشد با القاء بیان پروتئین سیکلین E، مهار بیان پروتئین P21 و سرعت بخشیدن ورود سلول‌ها به مرحله S چرخه سلولی، باعث افزایش تکثیر سلول‌ها و حفظ بقاء آنها در شرایط القایی آپوپتوزی گردید که نتایج حاصل از اثر آنتی‌آپوپتوزی IGF-I این مطالعه با مطالعه حاضر مطابقت دارد (24). IGF-I از کاهش بقاء سلول‌های PC12 که تحت تاثیر MPP (1-Methyl-4-Phenylpyridinium) قرار گرفته‌اند، از طریق مسیر پیام دهی بتا 3- گلیکوژن سنتاز کیناز (GSK) جلوگیری نمود. بررسی غلظت‌های متفاوتی از IGF-I (0/33-1000nM) نشان داد که این فاکتور رشد در غلظت‌های پایین‌تر از 100 nM اثر سمی MPP را مهار نکرده، اما غلظت 1000 nM به صورت کاملاً آشکار اثرات سیتوتوکسیسیته را مهار نموده است (25). همچنین اثر این فاکتور رشد بر میزان فسفریلاسیون فاکتور Bad فعال شده توسط ماده القاء‌کننده آپوپتوز، راپامایسین مورد بررسی قرار گرفته است. 30 دقیقه پس از این که سلول‌های انسانی Rh1 توسط فاکتورهای رشد IGF-I و EGF تحریک شده بودند، بیشترین فسفریلاسیون Bad (غیرفعال شدن) مشخص گردید. این فسفریلاسیون در جایگاه سرین 112 نشان داده شد (26).

پس از تیمار سلول‌های آندوتلیال آپوپتوزی با فاکتورهای رشد IGF-I و bFGF، آپوپتوز ناشی از چهار ساعت تشعشع به ترتیب 34% و 63% مهار شد (27). در مطالعه‌ای که در سال 2003 با بررسی نقش IGF-I در مهار آپوپتوز بر روی سلول‌های ماهیچه صاف عروقی توسط جمالی و همکارانشان صورت گرفت، جهت القاء آپوپتوز در سلول‌ها، سرم از محیط کشت حذف شد. نتایج حاصل نشان داد که پس از القاء، فعالیت کاسپاز 3 افزایش نشان داده، ولی استفاده از غلظت‌های  $10^{-7}$  تا  $10^{-11}$  مولار IGF-I نقش مهار بر روی فعالیت کاسپاز 3

### REFERENCES

- Jin Z, El-Deiry WS. Overview of cell death signaling pathways. *Cancer Biol Ther* 2005; 4:139-63.
- McConkey DJ, Orrenius S. Signal transduction pathways in apoptosis. *Stem Cells* 1996; 14:619-31.
- Kooijman R. Regulation of apoptosis by insulin-like growth factor (IGF)-I. *Cytokine Growth Factor Rev* 2006;17:305-23.
- Butler M. Animal cell cultures: recent achievements and perspectives in the production of biopharmaceuticals. *Appl Microbiol Biotechnol* 2005; 68:283-91.
- Pratsinis H, Kletsas D. PDGF, bFGF and IGF-I stimulate the proliferation of intervertebral disc cells in vitro via the activation of the ERK and Akt signaling pathways. *Eur Spine J* 2007; 16:1858-66.
- Hu WS, Aunins JG. Large-scale mammalian cell culture. *Curr Opin Biotechnol* 1997; 8:148-53.
- al-Rubeai M, Singh RP. Apoptosis in cell culture. *Curr Opin Biotechnol* 1998; 9:152-56.
- Merten OW. Introduction to animal cell culture technology-past, present and future. *Cytotechnology* 2006; 50:1-7.

9. Kumar N, Gammell P, Clynes M. Proliferation control strategies to improve productivity and survival during CHO based production culture: a summary of recent methods employed and the effects of proliferation control in product secreting CHO cell lines. *Cytotechnology* 2007; 53:33-46.
10. Arden N, Betenbaugh MJ. Life and death in mammalian cell culture: strategies for apoptosis inhibition. *Trends Biotechnol* 2004; 22:174-80.
11. Hu WS, Piret JM. Mammalian cell culture processes. *Curr Opin Biotechnol* 1992; 3:110-14.
12. Goswami J, Sinskey AJ, Steller H, Stephanopoulos GN, Wang DI. Apoptosis in batch cultures of Chinese hamster ovary cells. *Biotechnol Bioeng* 1999; 62:632-40.
13. Zanghi JA, Fussenegger M, Bailey JE. Serum protects protein-free competent Chinese hamster ovary cells against apoptosis induced by nutrient deprivation in batch culture. *Biotechnol Bioeng* 1999; 64:108-19.
14. Singh RP, Finka G, Emery AN, Al-Rubeai M. Apoptosis and its control in cell culture systems. *Cytotechnology* 1997; 23:87-93.
15. Kim DY, Lee JC, Chang HN, Oh DJ. Development of serum-free media for a recombinant CHO cell line producing recombinant antibody. *Enzyme Microb Technol* 2006; 39: 426-33.
16. Makrides SC, Editor. *Gene transfer and expression in mammalian cells*. Norwood, Massachusetts: Elsevier Science; 2003.
17. Hunt SM, Pak SC, Bridges MW, Gray PP, Sleigh MJ. Chinese hamster ovary cells produce sufficient recombinant insulin-like growth factor I to support growth in serum-free medium. Serum-free growth of IGF-I-producing CHO cells. *Cytotechnology* 1997; 24:55-64.
18. Sunstrom NA, Gay RD, Wong DC, Kitchen NA, DeBoer L, Gray PP. Insulin-like growth factor-I and transferrin mediate growth and survival of Chinese hamster ovary cells. *Biotechnol Prog* 2000; 16:698-702.
19. Adamson L, Walum E. Insulin and IGF-1 mediated inhibition of apoptosis in CHO cells grown in suspension in a protein-free medium. *Altern Lab Anim* 2007; 35:349-52.
20. Jousan FD. *Insulin-like growth factor-I and apoptosis as determinants of preimplantation bovine embryonic development (Dissertation)*. Florida University; 2006.
21. Huang CC, Hsu PC, Huang YC, F LY. Ornithine decarboxylase prevents methotrexate-induced apoptosis by reducing intracellular reactive oxygen species production. *Apoptosis* 2005; 10: 895-907.
22. Sell C, Baserga R, Rubin R. Insulin-like growth factor I (IGF-I) and the IGF-I receptor prevent etoposide-induced apoptosis. *Cancer Reserch* 1995; 55: 303-6.
23. Párrizas M, Saltiel AR, LeRoith D. Insulin-like growth factor 1 inhibits apoptosis using the phosphatidylinositol 3'-kinase and mitogen-activated protein kinase pathways. *J Biol Chem* 1997; 272:154-61.
24. Ma QL, Yang TL, Yin JY, Peng ZY, Yu M, Liu ZQ, Chen FP. Role of insulin-like growth factor-1 (IGF-1) in regulating cell cycle progression. *Biochem Biophys Res Commun*. 2009 ;389:150-5.
25. Suna X, Huang L, Zhang M, Sun S, Wu Y. Insulin like growth factor-1 prevents 1-mentyl-4-phenylpyridinium-induced apoptosis in PC12 cells through activation of glycogen synthase kinase-3beta. *Toxicology* 2010; 271 5-12.
26. Thimmaiah KN, Easton JB, Houghton PJ. Protection from Rapamycin-induced apoptosis by insulin-like growth factor-I is partially dependent on protein kinase C signaling. *Cancer Res* 2010; 70:2000-2009.
27. Qiu W, Leibowitz B, Zhang L, Yu J. Growth factors protect intestinal stem cells from radiation-induced apoptosis by suppressing PUMA through the PI3K/AKT/p53 axis. *Oncogene* 2010; 29: 1622-32.
28. Jamali R, Bao M, Arnqvist HJ. IGF-I but not insulin inhibits apoptosis at low concentration in vascular smooth muscle cells. *J Endocrinol* 2003; 179: 267-74.
29. Bridgewater DJ, Ho J, Sauro V, Matsell DG. Insulin-like growth factors inhibit podocyte apoptosis through the PI3 kinase pathway. *Kidney Int* 2005; 67:1308-14.
30. Thimmaiah KN, Easton J, Huang S, Veverka KA, Germain GS, Harwood FC, et al. Insulin-like growth factor I-mediated protection from rapamycin-induced apoptosis is independent of Ras-Erk1-Erk2 and phosphatidylinositol 3-kinase-Akt signaling pathways. *Cancer Res* 2003; 63: 364-74.
31. Novosyadlyy R, Kurshan N, Lann D, Vijayakumar A, Yakar S, LeRoith D. Insulin-like growth factor-I protects cells from ER stress-induced apoptosis via enhancement of the adaptive capacity of endoplasmic reticulum. *Cell Death Differ* 2008; 15:1304-17.

32. Colón E, Zaman F, Axelson M, Larsson O, Carlsson-Skwirut C, Svechnikov KV, et al. Insulin-like growth factor-I is an important antiapoptotic factor for rat leydig cells during postnatal development. *Endocrinology* 2007; 148:128-39.
33. Massoner P, Ladurner-Rennau M, Ede I, Klocker H. Insulin-like growth factors and insulin control a multifunctional signalling network of significant importance in cancer. *Br J Cancer* 2010; 103: 1479-84.
34. Dunn SE, Hardman RA, Kari FW. Insulin-like growth factor 1 (IGF-1) alters drug sensitivity of induced by diverse anticancer drugs HBL100 human breast cancer cells by inhibition of apoptosis. *Cancer Res* 1997; 57: 2687-93.
35. Garrouste F, Remacle-Bonnet M, Fauriat C, Marvaldi J, Luis J, Pommier G. Prevention of cytokine-induced apoptosis by insulin-like growth factor-I is independent of cell adhesion molecules in HT29-D4 colon carcinoma cells ± evidence for a NF-kB-dependent survival mechanism. *Cell Death Differ* 2002; 9: 768-79.
36. Delaney CL, Cheng H-L, Feldman EL. Insulin-like growth factor-I prevents caspase-mediated apoptosis in schwann cells. *J Neurobiol* 1999; 41: 540-49.
37. Xing C, Peng Y, Chang R, Yin Y, Zuoping X. Effects of insulin-like growth factor-1 on okadaic acid-induced apoptosis in SH-SY5Y cells. *Cell Biol Int* 2005; 29: 803-808.
38. Yang SY, Hoy M, Fuller B, Sales KM, Seifalian AM, Winslet MC. Pretreatment with insulin-like growth factor I protects skeletal muscle cells against oxidative damage via PI3K/Akt and ERK1/2 MAPK pathways. *Laboratory Investigation* 2010; 90:391-401.
39. Avila-Gomez IC, Velez-Pardo C, MarleneJimenez-Del-Rio. Effects of insulin-like growth factor-1 on rotenone-induced apoptosis in human lymphocyte cells. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 2009; 106: 53-61.