خون
فصلنامه پژوهشی
دوره ۳ شماره ۱ بهار ۸۵ (۸- ۱)

بررسی اثرات سیتوتوکسیک پروتئین هیبرید نوترکیب StxA1-GM-CSF بر رده‌های مختلف سلول‌های سرطانی دارای گیرنده GM-CSF

مهریار حبیبی رودکنار[۱]، دکتر مانا علومی[۲]، دکتر محمدعلی شکرگذار[۳]، دکتر نادر شاهرخی[۲]، آمنه محمدی روشنده[۴]، دکتر یوشیکازو کوواهارا[۵]، دکتر مانابو فوکوموتو[۶]

چکیده

سابقه و هدف

برنامه‌های جدیدی برای درمان سرطان مدنظر محققین بوده و یکی از این رویکردها، تحویل هدف دار مواد سمی به سلول‌های سرطانی می‌باشد. در ایمونوتوکسین‌ها از قسمت سیتوتوکسیک توکسین (دومین کاتالیتیک) باکتری یا گیاه و حذف قسمت اتصال دهنده و جایگزینی آن با یک لیگاند اختصاصی برای یک گیرنده سلولی استفاده می‌شود. در مطالعه قبلی یک ایمونوتوکسین جدید، شیگاتوکسین ـ GM ـ CSF ، طراحی و در سیستم باکتریایی از طریق مهندسی ژنتیک بیان شد. در تحقیق حاضر فعالیت سیتوتوکسیک شیگاتوکسین ـ GM ـ CSF برده‌های مختلف سلول‌های سرطانی که گیرنده فاکتور محرک کلونی گرانولوسیت ـ ماکروفاژ (GM ـ CSF) را بیان می‌کنند مورد مطالعه قرار گرفت. به علاوه اثر آنتی‌بادی ضد گیرنده GM-CSF در مهار فعالیت سیتوتوکسیک شیگاتوکسین ـ GM ـ CSF بر رده‌های مختلف سلول‌های سرطانی دارای گیرنده مذکور ارزیابی‌شد.

مواد و روش‌ها

مطالعه انجام شده از نوع تجربی بود. رده‌های مختلف سلول‌های سرطانی خونی و جامد که گیرنده فاکتور محرک کلونی گرانولوسیت ـ ماکروفاژ (GM-CSF) را بیان می‌کردند، در محیط کشت RPMI کشت داده شدند.سیتوتوکسیسیتی با استفاده از روش‌های رنگ سنجی تریپان‌بلو وMTT ارزیابی شد. اثر دراز مدت سیتوتوکسیسیتی با استفاده از سنجش کلونوژنیک برای رده‌های سلول‌های سرطانی جامد انجام شد.گیرنده GM-CSF با استفاده از آنتی‌بادی آنتیGM ـ CSF مهار شد.

یافته‌ها

در بین رده‌های سلولی تومورهای خون ساز، K562 و در بین رده‌های سلولی تومورهای جامد، LS174T بیشترین سیتوتوکسیسیتی را در غلظت ۴۰ng/ml و در۲۴ ساعت نشان دادند.

MCF-7،PC-3 وDU145 بیشترین توکسیسیتی را در زمان ۷۲ ساعت و در غلظت ۱۶۰ng/ml نشان دادند. خنثی‌سازی(StxAl-GM-CSF(Neutralization با آنتی بادیGM-CSF منجر به از بین رفتن اثر توکسیسیتی شد.

نتیجه گیری

پروتئین نوترکیب هیبرید جدید، شیگاتوکسین ـ GM_CSF ، فعالیت بیولوژیک خود را حفظ نموده و بر رده‌های مختلف سلول‌های سرطانی که گیرنده فاکتور محرک کلونی گرانولوسیت ـ ماکروفاژ (GM-CSF) را بیان می‌کردند به طور اختصاصی اثر سیتوتوکسیسیتی را اعمال می‌کند و می‌تواند به عنوان یک رویکرد جدید برای درمان سرطان در نظر گرفته شود.

کلمات کلیدی: شیگاتوکسین، محرک کلونی گرانولوسیت، ماکروفاژ، سیتوتوکسیسیتی، سلول‌های سرطانی

تاریخ دریافت : ۸۴/ ۶/ ۷
تاریخ پذیرش : ۸۴/۱۲/ ۷

۱- مؤلف مسؤول : دانشجوی PhD فرآورده‌های بیولوژیک انستیتو پاستور ایران- خیابان پاستور ـ پلاک ۶۹ ـ کدپستی: ۱۳۱۶۴
۲- PhD فرآورده‌های بیولوژیک ـ استادیار گروه بیولوژی مولکولی، انستیتو پاستور ایران
۳- PhD فرآورده‌های بیولوژیک ـ استادیار بانک سلولی ایران ، انستیتو پاستور ایران
۴- دانشجوی PhD آناتومی، دانشگاه علوم پزشکی تهران
۵- PhD پاتولوژی ـ استادیار دانشگاه توهوکو ژاپن
۶- PhD پاتولوژی ـ استاد دانشگاه توهوکو ژاپن

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-06-24]

مقدمه

هدف نهایی درمان سرطان، حذف سلول‌های توموری با کمترین آسیب به سلول‌های طبیعی است. رویکردهای موجود در این مورد شامل جراحی توده توموری، از بین بردن تومور توسط اشعه و درمان سیستماتیک به‌وسیله شیمی درمانی می‌باشند. تقریباً نیمی از سرطان‌ها با روش‌های فوق درمان نمی‌شوند و علاوه بر این مقاومت دارویی از مهم‌ترین مشکلات در درمان سرطان می‌باشد. بنابراین استراتژی‌های جدیدی برای درمان سرطان مدنظر محققین بوده و یکی از این رویکردها تحویل هدف دار مواد سمی به سلول‌های سرطانی است (۲، ۱). سلول‌های سرطانی گیرنده‌های سطحی یا مولکول‌های ویژه دیگری را بروز می‌دارند که آن‌ها را از سلول‌های اطراف خود متمایز می‌سازد. یکی از این روش‌های جدید، از بین بردن اختصاصی سلول‌های سرطانی با استفاده از سم‌های گیاهی و باکتریایی است (۱).

ایمونوتوکسین‌ها شامل توکسین‌ها و آنتی‌بادی‌ها می‌باشند که البته این مفهوم اولیه آن‌ها بوده است. اما امروزه ایمونوتوکسین شامل مفهوم بسیار وسیعی است و لیگاندهای دیگر از جمله سیتوکین، فاکتور رشد و هورمون را که به توکسین متصل می‌شوند دربر می‌گیرند(۳). در ایمونوتوکسین‌ها از قسمت سیتوتوکسیک توکسین (دومین کاتالیتیک) باکتری یا گیاه، حذف قسمت اتصال دهنده و جایگزینی آن با یک لیگاند اختصاصی برای یک گیرنده سلولی استفاده می‌شود. شیگاتوکسین و توکسین‌های مشابه آن متعلق به خانواده بزرگی از گروه پروتئین‌های AB (دارای یک دومین کاتالیتیک A و دومین اتصالی به نام B هستند) از سموم گیاهی و باکتریایی هستند که سلول‌های هدف را از طریق اتصال به سطح سلول توسط گیرنده‌های خاصی اندوسیتوز کرده، سپس وارد سیتوزول شده و در نهایت با مهار سنتز پروتئین و مرگ سلولی آن را از بین می‌برند(۳).

فاکتور محرک کلونی گرانولوسیت- ماکروفاژ (GM-CSF) یک تنظیم کننده مهم تکثیر و تمایز پیش‌سازهای میلوئید است و سبب افزایش عملکرد گرانولوسیت‌های بالغ و فاگوسیت‌های منونوکلئر می‌شود. گیرنده GM-CSF از دو زیر واحد آلفا و بتا تشکیل شده است. زیر واحد آلفا به GM-CSF با میل ترکیبی پایین (۱ nmol/l تا ۱۷ nmol/l) متصل می‌شود. زیر واحد بتا به تنهایی به GM-CSF متصل نمی‌شود، بلکه توأم با زیر واحد آلفا تشکیل گیرنده، با میل ترکیبی بالا را می‌دهد (۲۰pmol/l تا ۱۰۰pmol/l)(۵، ۴).

GM-CSF نه تنها برای تضعیف اثرات میلوساپرسیو شیمی درمانی در سرطان‌های هماتوپویتیک بلکه در تومورهای جامد هم استفاده می‌شود. همچنین مطالعات نشان داده است که GM-CSF معمولاً باعث تحریک سلول‌های سرطانی جامد نمی‌شود. همانند انواع لوکمیا، تومورهای جامد مثل کارسینومای معده ای ـ روده ای، کلیه، ریه، سینه و پروستات، گیرنده GM-CSF یا حداقل زیر واحد آلفای آن را بیان می‌کنند(۴). مطالعات اخیر نشان داده است که گیرنده GM-CSF در اکثر پیش نیازهای سلول‌های هماتوپویتیک وجود ندارد بلکه در طی بلوغ، بیان آن‌ها افزایش می‌یابد(۶). یافته‌های فوق می‌تواند بیانگر این نکته باشد که گیرنده GM-CSF یک هدف مناسب برای ایمونوتوکسین است. در مطالعه قبلی ما یک ایمونوتوکسین جدید، شیگاتوکسین ـ GM_CSF ، طراحی و در سیستم باکتریایی از طریق مهندسی ژنتیک بیان شد (۷). در تحقیق حاضر فعالیت بیولوژیکی آن بر رده‌های مختلف سلول‌های سرطانی مطالعه شد.

مواد و روش‌ها

مطالعه انجام شده از نوع تجربی بود. پروتئین هیبرید نوترکیب StxA1-GM-CSF در *E.coli* تولید شد(۷). به طور خلاصه دومین کاتالیتیک شیگاتوکسین و GM-CSF از طریق PCR هم پوشانی به یکدیگر متصل و دروکتور PBAD کلون و به TOPT۱۰ ترانسفورم شدند و با استفاده از آرابینوز بیان صورت گرفت و سپس با استفاده از برچسب هیستیدین تخلیص شد. رده‌های U937، HL60، LCL (مشتق از خون) از بانک سلولی انستیتو پاستور ایران (NCBI) و رده‌های سلولی LS174T (کولون) ، K562 (خون) ، PC3، DU145 (پروستات) ، HepG2 (کبد) از انستیتو سرطان دانشگاه توهوکو ژاپن تهیه شدند.

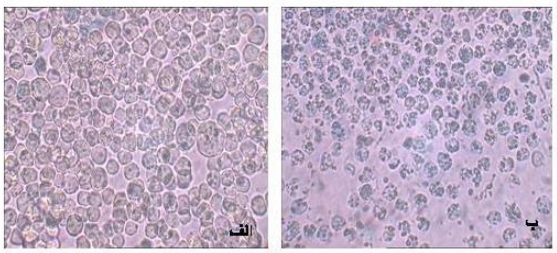
[Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-06-24]

کلیه رده‌های سلولی در محیط کشت RPMI (سیگما، Roswell Park Memorial Institute Medium) غنی شده با ۱۰ تا ۲۰ درصد FBS(Gibco-BRL) در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و رطوبت حاوی ۵٪ دی اکسید کربن کشت داده شدند(۸).

ارزیابی سیتوتوکسیسیته با استفاده از روش‌های رنگ سنجی

الف ـ تریپان بلو

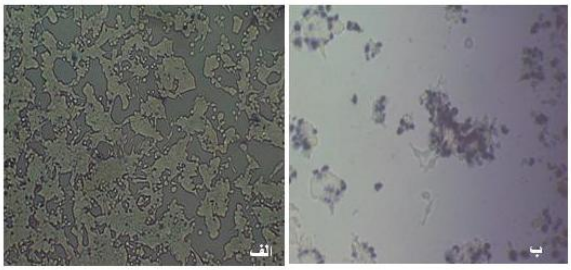
$10^5 \times 3$ – ۲ سلول در پلیت‌های ۹۶ چاهکی کشت داده‌شدند. پس از تیمار سلول‌ها با غلظت‌های مختلف Al-GM-CSF (۱۶۰ ng/ml–۵) در زمان‌های ۲۴ ، ۴۸ ، ۷۲ ساعت و یک هفته ، تریپان بلو (سیگما) به میزان ۲ ng/ml به سلول‌ها اضافه شد و سپس با استفاده از میکروسکوپ فاز کنتراست مورد مطالعه قرار گرفتند. سلول‌های مرده به صورت آبی و سلول‌های زنده به صورت بی رنگ قابل انتظار بودند (شکل های ۱ تا ۵)(۹).



شکل۱: رنگ آمیزی تریپان بلو رده سلولی HL60

الف) تیمار شده با PBS (کنترل)

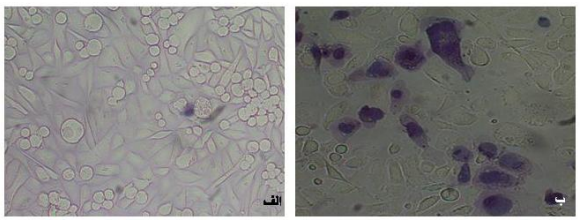
ب) تیمار شده با ۱۶۰ng/ml پروتئین هیبرید نوترکیب بعد از ۴۸ ساعت



شکل ۲: رنگ آمیزی تریپان بلو رده سلولی LS174T

الف) تیمار شده با PBS (کنترل)

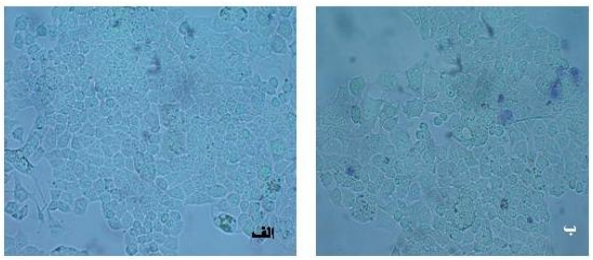
ب) تیمار شده با ۴۰ng/ml پروتئین هیبرید بعد از ۲۴ ساعت



شکل۳: رنگ آمیزی تریپان بلو رده سلولی PC3

الف) تیمار شده با PBS (کنترل)

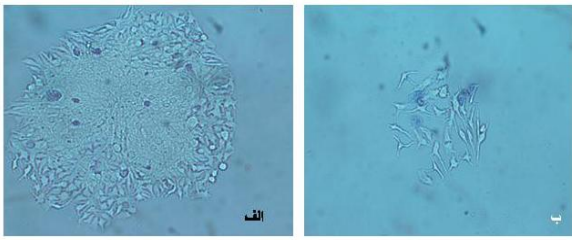
ب) تیمار شده با ۱۶۰ng/ml پروتئین هیبرید نوترکیب بعد از ۷۲ ساعت



شکل۴: رنگ آمیزی تریپان بلو رده سلولی HepG2

الف) تیمار شده با PBS (کنترل)

ب) تیمار شده با ۱۶۰ng/ml پروتئین هیبرید نوترکیب بعد از ۴۸ ساعت



شکل ۵: رنگ آمیزی تریپان بلو رده سلولی MCF-7 حاصل از سنجش کلونی بعد از یک هفته

الف) MCF-7 تیمار شده با PBS (کنترل)

ب) تیمار شده با ۱۶۰ng/ml پروتئین هیبرید نوترکیب بعد از یک هفته . در گروه کنترل اندازه کلونی بزرگ، متراکم و سلول‌ها زنده، در حالی‌که در گروه آزمون تعداد کلونی‌ها کوچک، تراکم پایین و سلول‌های مرده نیز مشاهده می‌شود.

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-06-24]

ب- MTT

(Dimethyl Thiazol diphenyl tetrazolium bromide)

به منظور تأیید نتایج حاصل از تریپان بلو، میزان زنده ماندن یا سیتوتوکسیسیتی با استفاده از آزمون MTT مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. ۲۰ تا ۳۰ هزار سلول از رده‌های مختلف در محیط RPMI کشت داده شدند، ۲۴ ساعت بعد غلظت‌های مختلف از پروتئین‌های متفاوت AL - GM-CSF , GM-CSF / AL - GM-CSF, AL, GM-CSF, و Layset باکتریایی وکتور خالی محلول در PBS ، در غلظت‌های متفاوت و زمان‌های مختلف به آن‌ها اضافه شد. سپس ۱۰ میکرولیتر از MTT (۰/۵ng/ml ، سیگما) به هر کدام از چاهک‌ها اضافه شد و به مدت ۲ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد انکوبه شدند. در این حالت سلول‌های زنده قادر به تبدیل MTT به فورمازان می‌شوند، در حالی که سلول‌های مرده قادر نیستند این تغییر متابولیک را ایجاد کنند (۱۰).

میزان جذب نوری در ۵۷۰ OD با استفاده از قرائت‌کننده میکروپلیت (Lab system) انجام شد. میزان سیتوتوکسیسیتی هر کدام از گروه آزمون نسبت به کنترل مقایسه شد .

سیتوتوکسیسیتی با استفاده از روش سنجش کلونی

۱۰۰۰ سلول از رده‌های مختلف در دیش ۵ سانتی‌متری در دو گروه کنترل و آزمون، ۱۶۰ ng/ml (Al-GM-CSF) به مدت یک هفته در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و دی‌اکسیدکربن ۵ درصد نگهداری شدند. بعد از آن تعداد کلونی‌ها (بیشتر از ۱۰ سلول) شمارش شدند (۱۱).

مهار گیرنده

۱ ng/ml آنتی بادی منوکلونال Anti-Goat GM-CSF (R and D) و ۱۰۰ ng/ml پروتئین هیبرید نوترکیب در طول شب در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند و سپس به رده سلولی HL60 اضافه شد. ۴۸ ساعت بعد سیتوتوکسیسیتی از طریق سنجش MTT انجام شد.

یافته‌ها

جدول ۱،LC50 با غلظتی از توکسین که در آن ۵۰ درصد سلول‌ها می‌میرند را نشان می‌دهد. در بین رده‌های سلولی تومورهای هماتوپویتیک، K562 و در بین رده‌های سلولی تومورهای جامد،LS174T بیشترین سیتوتوکسیسیتی را در غلظت ۴۰ng/ml و در ۲۴ ساعت نشان دادند.

MCF -7 ، PC-3 و DU145 سه رده سلولی بودند که فقط گیرنده با میل ترکیبی را ابراز کردند. این سلول‌ها بیشترین توکسیسیتی را در زمان ۷۲ ساعت و در غلظت ۱۶۰ ng/ml نشان دادند.

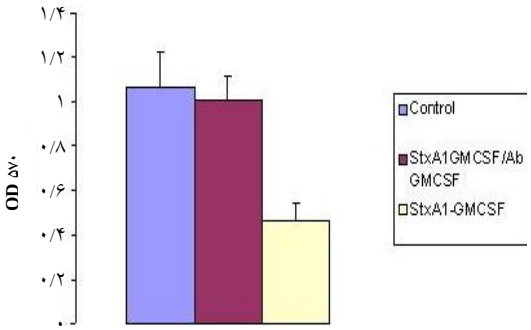
جدول ۱: LC50 رده‌های مختلف سلول‌های سرطانی خونی و جامد حاوی گیرنده فاکتور محرک کلونی گرانولوسیت ـ ماکروفاژ (GM-CSF)

رده سلولی	نوع سلول	LC50(ng/ml) ± SD
HL60	پرومیلوسایتیک	۹۱/۶۶ ± ۷/۶۳
LCL	لنفوسیت‌های محیطی	۷۵ ± ۵
U937	منوسیت	۱۳۱/ ۶۶ ± ۱۰/۴۰
K562	هماتوپوئیتیک	۱۸ ± ۲/۸۴
LSL74T	کولون	۲۰ ± ۳/۸۱
DU145	پروستات	>۱۶۰ ng/ml
PC3	پروستات	>۱۶۰ ng/ml
MCF-7	سینه	۱۵۰ng/ml± ۴/۶۶

رده سلولی HepG2 به پروتئین هیبرید حساسیت نشان نداد. این رده سلولی ، گیرنده GM-CSF را بیان نمی‌کند. به‌منظور تعیین این‌که آیا سیتوتوکسیسیتی StxAl-GM-CSF مستلزم وارد شدن پروتئین هیبرید به داخل سلول از طریق گیرنده GM-CSF است ، آزمون خنثی سازی انجام شد. خنثی سازی StxAl-GM-CSF (Neutralization) با آنتی‌بادی GM-CSF منجر به از بین رفتن اثر توکسیسیتی شد (شکل۶).

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-06-24]

شکل ۶: نتایج حاصل از مهار گیرنده GM-CSF با استفاده از سنجش MTT



درصد سیتوتوکسیسیتی در غلظت۴۰ng/ml برای LS174 T و ۱۶۰ ng/ml برای MCF-7 بعد از یک هفته در سنجش کلونوژنیک، اندکی بیشتر از میزان سیتوکسیسیتی در سنجش MTT بود. (۳/۵ ± ۵۸ به ۴ ± ۶۳ برای MCF-7 و ۴/۳ ± ۸۳ به ۴/۶ ± ۸۸ برای LS174 T).

DU145 و PC-3کلون‌های واضح و مجزایی تشکیل ندادند لذا در سنجش کلونی لحاظ نشدند.

علاوه بر کاهش تعداد کلونی در گروه آزمون نسبت به کنترل ، رنگ آمیزی تریپان بلو کلون‌های MCF-7 بعد از یک هفته نتایج دیگری را آشکار کرد. برخی از سلول‌ها به رنگ آبی درآمدند که بیانگر مرگ سلولی بود. اندازه و تراکم کلون‌ها نیز کاهش یافته بود.

نتایج مذکور بیانگر این است که MCF-7 به عنوان یک رده سلولی که گیرنده با میل ترکیبی پایین را ابراز می‌کند سیتوتوکسیسیتی StxA1-GM-CSF در دراز مدت در آن به وجود می‌آید.

بحث

در این تحقیق اثر سیتوتوکسیسیتی پروتئین هیبرید نوترکیب بر ۸ رده سلول سرطانی که گیرنده GM-CSF را بیان می‌کردند، مورد مطالعه قرار گرفت. این سلول‌ها عبارت بودند از K562 ، LCL ، U937 ،HL60 (رده سلول‌های مشتق از سیستم هماتوپویتیک) و LS174 T (کولون) ،MCF-7 (سینه) ، DU145 و PC3 (پروستات) و رده سلولی HepG2 (کبد) به عنوان کنترل منفی برای گیرنده GM-CSF استفاده شدند. K562 ، LCL ،U937، HL60 ، LS174 T گیرنده با میل ترکیبی بالای GM-CSF و MCF-7 ، DU145 و PC-3 گیرنده با میل ترکیبی پایین را بیان می‌کردند (۴،۱۲).

LS174 T و K562 دو رده سلولی بودند که بیشترین حساسیت را نسبت به StxA1-GM-CSF نشان دادند.

در مطالعات قبلی پروتئین هیبریددیفتری(DT- GM-CSF) در غلظت ng/ml ۱۸ ± ۷۰ و در مدت ۴۸ ساعت، ۵۰٪ (LC50)خاصیت سیتوتوکسیسیته پروتئین را بروز داد اما پروتئین هیبرید در مطالعه اخیر در غلظت ng/ml ۲۰ و در مدت ۲۴ ساعت ۵۰ درصد سیتوتوکسیسیته را دارا بود(۴). DT-GM-CSF اثر قابل ملاحظه ای بر K562 نشان‌نداد اما توکسین هیبرید StxAl-GM-CSF در غلظت ng/ml ۴۰ و در ۲۴ ساعت دارای سیتوتوکسیسیته نزدیک به ۱۰۰ درصد بود. سیتوتوکسیسیته StxAl-GM-CSF در مقایسه با DT-GM-CSF بر رده‌های سلولی HL60 و DU937 کمتربود(۴). هر چند در مطالعه‌ای دیگر که DT-GM-CSF در سیستم باکولو ویروس بیان شده بود، بر روی HL60 در غلظت ng/ml ۳۰ تقریباً ۱۰۰ درصد اثر سیتوتوکسیسیته وجود داشت اما در این مطالعه در غلظت ng/ml ۱۶۰ از پروتئین هیبرید تقریباً مشابه مطالعه قبلی بود (۱۳). در مطالعه قبلی از سیستم باکولو ویروس برای بیان استفاده گردید، حال این‌که در مطالعه اخیر از سیستم پروکاریوت استفاده شد، تفاوت در میزان سیتوتوکسیسیتی ، علاوه بر تفاوت توکسیسیتی توکسین دیفتری و شیگا، می‌تواند به خاطر استفاده از دو سیستم متفاوت باشد.

سیتوتوکسیسیته HL60 در مقایسه با U937 علیرغم این‌که گیرنده GM-CSF کمتری بیان می‌دارد، بیشتر بود. همچنین حساسیت متغیری برای DT-GM-CSF (توکسین دیفتری) گزارش شده است که در آن LC50 برای U937 ۱۵۴ برابر در مقایسه با HL60 کمتر بود(۴).

مطالعات خنثی سازی نیز نشان داد که برای سیتوتوکسیستی نیاز به اتصال GM-CSF به گیرنده آن در سطح سلول‌ها است . در مطالعه مشابه که در آن دومین کاتالیتیک شیگاتوکسین به CD4 متصل شد، مهار CD4 (Blocking) از اتصال آن به gp۱۲۰ ممانعت به عمل آورده و در نهایت از سیتوتوکسیسیتی جلوگیری کرد (۱۴).

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-06-24]

رده‌های سلولی LS174 T ، K562، U937 ، HL60 و LCL گیرنده با میل ترکیبی بالا و رده‌های سلولی ، PC3 DU145 و MCF-7 گیرنده با میل ترکیبی پایین (زیر واحد آلفا) را بیان می‌کردند. به طور کلی سیتوتوکسیسیته در این رده‌های سلولی در مقایسه با رده‌های سلولی که گیرنده با میل ترکیبی بالا را بیان می‌کردند کمتر بود.

این اولین مورد مطالعه اثر یک ایمونوتوکسین بر روی سلول‌هایی است که گیرنده با میل ترکیبی پایین را بیان می‌کنند. همان‌طوری‌که قبلاً ذکر شده است، گیرنده GM-CSF از دو زیر واحد α و β تشکیل شده است. اتصال گیرنده با میل ترکیبی بالا به لیگاند خود ، GM-CSF ، باعث داخل شدن سریع کمپلکس Al-GM-CSF به داخل سلول می‌شود(۱۵).

اتصال گیرنده با میل ترکیبی بالا(Kd=۱۰تا۵۰pmol/l) در مقایسه با گیرنده با میل ترکیبی پایین(۰/۷تا۲nmol = Kd) از قدرت اتصال بالاتری برخوردار است (۶، ۴). بنابراین رده‌های سلولی PC3 ، MCF-7 و DU145 در غلظت بیشتر و در زمان بیشتری نسبت به رده‌های سلولی که گیرنده با میل ترکیبی بالا را بیان می‌دارند اثر سیتوتوکسیسیته دارند .

اتصال GM-CSF در پروتئین هیبرید به گیرنده با میل ترکیبی پایین باعث داخل شدن (Internalization) سریع نمی‌شود و احتمالاً در طی recycling گیرنده، کمپلکس گیرنده ـ لیگاند وارد سلول شده و در آن‌جا اثر سیتوتوکسیسیته خود را اعمال می‌کند. این پدیده در مورد سایر گیرنده‌ها نیز گزارش شده است(۱۶). علت دیگر سیتوتوکسیسیته پایین رده‌های سلولی DU145 و PC3، ترشح GM-CSF توسط این سلول‌ها است (۱۷). به نظر می‌رسد این رده‌های سلولی برای تکثیر یا تولید کلونی به GM-CSF نیاز دارند. مطالعات نشان داده است که حضور هم زمان GM-CSF و DT-GM-CSF منجر به کاهش یا بلوکه کردن اثر سیتوتوکسیسیته بر رده‌های سلولی که گیرنده GM-CSF را بیان می‌کنند، می‌شود. بنابراین GM-CSF تولید شده توسط این سلول‌ها می‌تواند در غلظت بهینه برای سیتوتوکسیسیته تأثیر گذار باشد. رده سلولی MCF-7 ، GM_CSF تولید نمی‌کند(۱۸). بنابراین نسبت به DU145 و PC3 حساس‌تر می‌باشد. مطالعات بیشتری نیاز است تا کاربرد این پروتئین هیبرید نوترکیب در مرحله کارآزمایی بالینی را نشان دهد اما با وجود این، نتایج به‌دست‌آمده نوید دهنده کاربرد آن در آینده است.

نتیجه گیری

در مجموع می‌توان نتیجه گرفت که هیبرید شیگاتوکسین_GM _CSF فعالیت بیولوژیک مناسبی داشته و با اتصال به گیرنده GM-CSF بر رده‌های مختلف سلول‌های سرطانی، فعالیت سیتوتوکسیک شیگاتوکسین به طور اختصاصی اعمال می‌شود. در همین ارتباط سلول‌های سرطانی دارای گیرنده با میل ترکیبی پایین، توکسیسیتی شدیدتری را بروز می‌دهند. همچنین استفاده از آنتی بادی ضد GM-CSF از اتصال اختصاصی هیبرید به رسپتور اختصاصی ممانعت کرده و از اثر کشندگی هیبرید شیگاتوکسین_CSF ــ GM بر سلول‌های سرطانی دارای گیرنده اختصاصی GM-CSF جلوگیری به عمل می‌آورد.

تشکر و قدردانی

به این وسیله از دکتر امیر امانزاده محقق محترم بخش بانک سلولی انستیتو پاستور ایران که در تهیه برخی از تصاویر سلولی در این مطالعه ما را یاری کرده‌اند قدردانی می‌نمایم .

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-06-24]

References :

1- Reiter Y. Recombinant immunotoxins in targeted cancer cell therapy**.** Adv Cancer Res 2001; 81: 93-124.
2- Fracasso G, Bellisola G, Castelletti D, Tridente G, Colombatti M. Immunotoxins and ther conjugates: preparation and general characteristics**.** Mini Rev Med Chem 2004; 4(5):545-62.
3- Stirpe F.Ribosome-inactivating proteins.Toxicon 2004; 44: 371-383.
4- Kreitman RJ,Pastan I.Recombinant toxins containing human granulocyte- macrophage colony-stimulating factor and either pseudomonas exotoxin or diphtheria toxin kill gastrointestinal cancer and leukemia cells**.** Blood 1997; 90(1): 252-259.
5- Chiba S, Shibuya K, Piao Y, Tojo A, Sasaki N, Matsuki S, *et al*. Identification and cellular distribution of distinct proteins forming human GM-CSF receptor. Cell Reg 1990; 1(4): 327-335.
6- Wognum AW, Westerman W, Visser TP, Wagemaker G. Distribution of receptors for granulocyte-macrophage colony-simulating factor on immature $CD34^+$ bone marrow cells, differentiating monomyeloid progenitors, and mature blood cell subsets. Blood 1994; 84: 764-774.
7- Habibi Roudkenar M, Bouzari S, Oloomi M, Jafari A,Shahrokhi A,Shokrgozar MA.Expression of a chimeric protein containing the catalytic domain of Shiga-like toxin and human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (hGM-CSF) in Escherichia coli and its recognition by reciprocal antibodies. Iran Biomed J 2005; 32(4): 143-148.
8- Mahdian R, Shokrgozar MA**,** Amanzadeh A.Human monocyte-derived dendritic cells efficiently take up autologous and allogenic tumor cell lysate as confirmed by flowcytometry. Irn J Med Sci 2003; 28: 75-80.
9- Moldeus T, Hogberg J, Orrhenius S,Fleischer S, Packer L. Trypan blue dye exclusion method. Meth enz 1978; 52: 60-71.
10- Tada H, Shiho O, Kuroshima K, Koyama M, Tsukamoto K. An improved colorimetric assay for interleukin 2. J Immunol Methods 1986; 9: 157-165.
11- Frankel AE, Hall PD, Burbage C, Vesely J, Willingham M, Bhalla K, *et al*. Of the apoptotic response of human myeloid leukemia cells to a Diphtheria toxin granulocyte-macrophage colony stimulating factor fusion protein. Blood 1997; 90: 3654-3661.
12- Chen Z, Yang Y, Xiao Y, Zhao J. Expression and significance of granulocyte- macrophage colony-stimulating factor receptors in human prostatecancer.Zhonghua Nan Ke Xue 2004;10(9): 655-7.
13- Williams MD, Rostovtsev A, Narla RK, Uckun FM. Production of recombinant $DT_{ct}GMSF$ in a Baculovirus expression vector system for biotherapy of GM-CSF - receptor sensitive hematologic malignancies. Protein Express Purif 1998; 13: 210-221.
14- Al-Jaufy AY, Haddad JA, King SR, McPhee RA, Jackson MP. Cytotoxicity of a Shiga toxin A subunit-CD4 fusion protein to human immunodeficiency virus-infected cells. Infect Immun 1994; 62: 956-960.
15- Frankel AE, Hall PD, Burbage C, Vesely J, Willingham M, Bhalla K, *et al*. Modulation of the apoptotic response of human myeloid leukemia cells of a diphtheria toxin granulocyte-macrophage colony-stimulating factor fusion protein. Blood 1997 (90): 3654-3661.
16- Mitchell H, Choudhury A, Pagano RE, Leof EB. Ligand-dependent and –independent transforming Growth Factor β Receptor recycling regulated by Claterin- mediated endocytosis and Rab11. Mol Biol Cell 2004; 15: 4166-4177.
17- Savarese DM , Valinski H , Quesenberry P, Savarese T.Expression and function of colony-stimulating factors and their receptors in human prostate carcinoma cell lines . Prostate 1998 ; 34 (2) : 80 - 91.
18- Morgan H,Tumber PA.Breast cancer cells induce osteoclast formation by stimulating host IL-11 production and down regulating Granulocyte / Macrophage Colony - Stimulating actor. Int J Cancer 2004;109:635-660 .

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-06-24]

Cytotoxic evaluation of stxA1-GM-CSF recombinant hybrid on different cancer cell lines expressing GM-CSF receptor

Habibi Roudkenar M.[1] (MS), Oloomi M.[2] (PhD) , Shokrgozar M.A.[3](PhD) , Shahrokhi N.[2](MS), Mohammadi Roushandeh A.[4] (MS), Kuwahara Y.[5] (PhD), Fukumoto M.[5](MD-PhD)

[1] *Pasteur Institute of Iran*
[2] *Pasteur Institute of Iran, Department of Molecular Biology*
[3] *Pasteur Institute of Iran, National Cell Bank of Iran(NCBI)*
[4] *Medical University of Tehran*
[5] *Tohoku University- Japan*

Abstract

Background and Objectives
Immunotoxins are comprised of cell targeting and cell killing moieties. Immunotoxins have been proposed as new strategy for cancer treatment. In this study, catalytic domain of Shiga-toxin (A1) was fused to human Granulocyte Macrophage-Colony Stimulating Factor (h GM-CSF) . The fused gene was already expressed in E.coli and the expressed protein was analysed for its cytotoxic activity on human cancer cell lines expressing GM-CSF receptor (GM-CSFR). Moreover, the impact of GM-CSF receptor on inhibition of cytotoxic effect of Shiga-toxin-GM-CSF recombinant hybrid in cell lines expressing GM-CSF receptor (GM-CSFR) was evaluated.

Materials and Methods
Cell lines were grown in RPMI-1640 medium supplemented with 10-20% heat inactivated fetal bovine serum (Gibco-BRL). Cytotoxic activity was checked on the cell lines and was measured by trypan blue staininig and MTT assay. GM-CSF receptor was blocked by anti-GM-CSF antibody.

Results
Cytotoxicity studies revealed that the chimeric protein induced cytotoxic effect on different cell lines. This effect was found to be specific due to the presence of killing moiety (A1) that exerts its effect through specific cell targeting domain i.e. GM-CSF, by binding to its receptor present on those cell lines. K562 and LS174T were the most sensitive.

Conclusions
Our results revealed that the hybrid protein is toxic to the cancer cell lines bearing GM-CSF receptor; this effect could be a potential factor for further consideration of hybrid protein as a therapeutic agent.

Key words: Shiga-toxin , Granulocyte macrophage - colony stimulating factor (GM–CSF) , Cytotoxicity, Cancer cells
SJIBTO 2006; 3(1):1-8

Received: 29 Aug 2005
Accepted: 26 Feb 2006

Correspondence: Habibi Roudkenar M. (MS), PhD student of Biotechnology, Pasteur Institute of Iran
No. 69, Pasteur Avenue, Tehran, Iran.Tel: (+9821) 66468761-9 ; Fax : (+9821) 66468761-9
E-mail: *mhr376@ yahoo.com*

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-06-24]