Archive of SID

مقاله پژوهشی

مجله سلول و بافت (علمی - پژوهشی)
جلد۹، شماره ٤، زمستان ۱۳۹۷

بررسی اثر هورمون رشد انسانی نوترکیب و جمسیتابین بر تکثیر و روند چرخه سلولی سلول‌های طبیعی فیبروبلاست شش

مهسا میرزایی فرد .M.Sc ، آسیه آرام وش .Ph.D*

- دانشگاه صنعتی مالک اشتر، دانشکده علوم پایه، گروه بیوشیمی، تهران، ایران.

* پست الکترونیک نویسنده مسئول: Aramvash@ibb.ut.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۸/۲ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۱۰/۲

چکیده

هدف: در این بررسی اثر هورمون رشد انسانی نوترکیب و جمسیتابین به‌تنهایی و در ترکیب با یکدیگر بر سلول‌های فیبروبلاست شش انسانی مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها: هورمون رشد انسانی در مقادیر ۱۰ تا ۴۰۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر و داروی جمسیتابین نیز در غلظت‌های ۱ تا ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر با سلول‌های فیبروبلاست شش انسانی تیمار و بررسی‌ها با آزمون MTT، فلوسیتومتری به‌واسطه رنگ‌آمیزی با پروپیدیوم یدید و روش خراش سلولی انجام شد.

نتایج: مطالعات و آنالیزهای چرخه سلولی و MTT نشان دهنده تاثیر هورمون رشد در پیشبرد چرخه سلولی و خروج از فاز G_1 و تکثیر سلول‌ها نسبت به نمونه کنترل، و اثرات مهاری روند چرخه سلولی و رشد توسط جمسیتابین بود. نتایج حاصل از آزمون خراش سلولی نشان داد که هورمون رشد در غلظت‌های موثر خود سبب مهاجرت سلولی افزایش یافته نسبت به کنترل شد درحالی‌که داروی جمسیتابین مهاجرت سلولی را نسبت به کنترل کاهش داد.

نتیجه گیری: با مصرف هم‌زمان هورمون رشد در دوره شیمی درمانی با جمسیتابین به‌نظر می‌رسد می‌توان روند مرگ و میر سلول‌های طبیعی را کاهش داد. زیرا سلول‌های طبیعی نسبت به سلول‌های سرطانی نسبت به هورمون رشد حساس‌تر می‌باشند.

واژگان کلیدی: تکثیر، چرخه سلولی، هورمون رشد، جمسیتابین، فیبروبلاست انسانی

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

جمسیتابین (Gemcitabin) از جمله داروهای ضدسرطان می‌باشد که در درمان سرطان ریه سلول‌های غیر کوچک، کارسینومای پانکراس، تومورهای جامد، سرطان خون، سرطان مثانه، سرطانه سینه و سرطان تخمدان استفاده می‌شود (۱،۲). این دارو در مقادیر کم پس از فعال شدن توسط کیناز، با مهار آنزیم DNA پلیمراز سبب مهار سنتز DNA، (۳) توقف چنگال همانندسازی در فاز S و نگه‌داری سلول‌ها در فاز G_1 می‌شود (۴)، در حالی‌که در مقادیر بالا سبب توقف تمامی فازهای چرخه سلولی و در نهایت آپوپتوزیس می‌شود (۵).

مطالعات مختلف تائید کننده اثرات مهاری این دارو در رشد و تکثیر سلول‌ها می‌باشند. به‌عنوان مثال اثر جمسیتابین به‌تنهایی و در ترکیب با پوشش لیپوزومی بر سلول‌های تیروئید آناپلاستیک انسانی نشان‌دهنده اثر سمیت این دارو پس از ۴۸ و ۷۲ ساعت انکوباسیون بود. نرخ مرگ و میر سلول‌ها پس از ۷۲ ساعت، ۴/۶ و ۷/۹ برابر نسبت به نمونه‌های کنترل به‌ترتیب برای دارو و داروی لیپوزومی گزارش شد (۶). در بررسی دیگر اثر جمسیتابین به‌تنهایی و در ترکیب با سورافنیب (یک مولتی کیناز مهاری) بر سلول های سرطانی NSCLC (PC-9 و A5490) مورد بررسی قرار گرفت. نتایج MTT نشان دهنده عملکرد ضد تکثیری بر هر دو رده‌ی سلولی وابسته به غلظت سورافنیب و جمسیتابین بود. از طرفی حساسیت هر دو رده‌ی سلولی به سورافنیب و جمسیتابین یکسان ارزیابی شد. همین سلول‌ها پس از ۷۲ ساعت تیمار با جمسیتابین و سورافنیب جهت بررسی تغییرات چرخه سلولی با فلوسایتومتری مورد بررسی قرار گرفتند. سورافنیب سبب افزایش سلول‌ها در فاز G_0/G_1 شد در حالی‌که سلول‌های در معرض جمسیتابین در فاز S تجمع یافتند (۸،۷).

هورمون رشد انسانی یک پروتئین با اثرات پیشبرنده رشد است که اثرات خود را به‌صورت مستقیم از طریق گیرنده‌ها در بافت‌ها و یا از طریق تحریک ترشح سایر عوامل رشد می‌گذارد. هورمون رشد از هیپوفیز قدامی ترشح شده و سپس وارد جریان خون می‌شود و به گیرنده‌های سطح سلول متصل و سبب فعال شدن مسیر GHR/JAK2 می‌شود. این هورمون دارای عملکردهای مختلفی از جمله ایجاد تعادل مثبت نیتروژن و سنتز پروتئین در سلول های عضلانی، بازجذب اسید آمینه به عضله‌ی اسکلتی و تنظیم رشد طولی استخوان‌ها می‌باشد (۹،۱۰).

اثرات بهبود دهنده هورمون رشد نیز همواره مورد علاقه محققان بوده و تحقیقات مختلفی در رابطه با اثرات این هورمون بر تکثیر سلول‌ها به‌عنوان عامل حفاظت کننده و کاهش دهنده اثرات عوامل تخریب‌گر صورت گرفته است. دانشمندان در دانشگاه UQ به بررسی اثرات هورمون رشد بر رده سلولی BaFB2B2 بر پایه‌ی تکثیر گیرنده‌های سطح هورمون رشد پرداختند. نتایج نشان داد، این هورمون تاثیرات به‌سزایی در افزایش روند تکثیر دارد و در رده سلولی ذکر شده، حدود ۶۰۰۰ گیرنده در سطح هر سلول برای هورمون رشد وجود دارد (۱۱). در مطالعه‌ای دیگر در رده سلولی Ba/F3 نیز مشخص شد که هورمون رشد انسانی درغلظت‌های ۱ و ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر سبب تحریک تکثیر سلولی، بهبود زخم و افزایش مهاجرت سلولی می‌شود (۱۲).

هورمون رشد منجر به پیشبرد چرخه‌ی سلولی و کاهش تعداد سلول‌های مانا در فازهای G_0/G_1 می‌شود. همچنین مطالعات بسیاری نشان داده است که میزان گیرنده‌های این هورمون در سطح سلول‌های سالم حدود ۵ برابر سلول‌های سرطانی می‌باشد. از سوی دیگر مشخص شده است که برخی از سلول‌های سرطانی در فاز G_0 هستند و این نوع عمدتا سبب متاستاز شدیدی و تشدید بیماری می‌شوند، در حالی‌که کمتر تحت تاثیر اثرات مهاری داروهای شیمی درمانی قرار می‌گیرند. به‌همین دلیل برخی پیشنهاد می‌کنند که به‌دلیل اثرات تحریکی هورمون رشد جهت پیشبرد چرخه سلولی و تاثیرات اثبات شده آن در خروج سلول‌ها از فاز G_0، بهتر است جهت

www.SID.ir

Archive of SID

افزایش اثر بخشی داروهای شیمی درمانی از هورمون رشد به‌عنوان داروی تکمیلی در روند درمان بیماران استفاده شد (۱۳،۱۴).

هدف از این مطالعه بررسی اثر تکثیری و چرخه سلولی هورمون رشد انسانی و جمسیتابین بر سلول‌های فیبروبلاستی به‌تنهایی و در ترکیب با یکدیگر می باشد. این قبیل مطالعات کمک شایانی در زمینه بهبود اثرات جانبی داروهای ضدسرطانی در بیماران می‌نماید.

مواد و روش‌ها

آزمون MTT و تیمار سلول‌ها با هورمون رشد و جمسیتابین: روش MTT یک روش رنگ سنجی است که بر اساس احیا و شکسته شدن کریستال‌های زرد رنگ تترازولیوم توسط آنزیم سوکسینات دهیدروژناز و تشکیل کریستال‌های آبی رنگ نامحلول انجام می‌شود. در طی زمان انکوباسیون MTT، توسط سیستم سوکسینات دهیدروژناز سلول‌ها که یکی از آنزیم‌های چرخه‌ی تنفسی میتوکندری‌هاست احیا می‌شود. احیا و شکسته شدن این حلقه موجب تولید کریستال‌های آبی رنگ فورمازان می‌شود که در زیر میکروسکوپ به‌راحتی قابل تشخیص هستند. میزان رنگ تولید شده در ۴۹۲ نانومتر با تعداد سلول‌های زنده رابطه‌ی مستقیم دارد.

کشت سلول‌های فیبروبلاست در محیط کشت DMEM (Gibco) با FBS ۱۰درصد در انکوباتور با CO_2، ۵ درصد و رطوبت ۹۰ درصد و دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انجام شد.

میزان LC_{50} داروی جمسیتابین (Ireland, Actavis) در مطالعات اولیه به‌طور تقریب ۱۵۰میکروگرم بر میلی‌لیتر تعیین شد. جهت انجام آزمون MTT ابتدا سلول‌ها (۱۰۰۰۰۰ سلول) در پلیت‌های ۹۶ خانه‌ای کشت شدند و پس از چسبیدن سلول‌ها، محیط کشت با محیط جدید حاوی هورمون رشد (Genotropin®) (با غلظت‌های مختلف (۱۰، ۲۰، ۴۰، ۶۰، ۸۰، ۱۲۰، ۱۶۰، ۲۴۰، ۳۰۰، ۳۶۰ و ۴۰۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر) جایگزین و تیمار به‌مدت ۲۴ و ۴۸ ساعت انجام شد. آزمایش‌های جمسیتابین نیز به‌همین ترتیب با غلظت‌های (۱، ۵، ۱۰، ۵۰، ۱۰۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر) صورت پذیرفت. در آزمایش‌ها که هر دو عامل تیمار شدند. غلظت های مرتبط با جمسیتابین مطابق موارد ذکر شده در فوق در سه سری افزوده شد. دسته اول به‌عنوان کنترل و دسته دوم با غلظت ۸۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر و سوم با غلظت ۱۶۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر هورمون رشد انسانی تیمار شدند (انتخاب دو غلظت از هورمون رشد انسانی پس از انجام آزمایش‌های اولیه بر هورمون رشد به‌تنهایی و تعیین غلظت مناسب صورت گرفت تا از پیچیدگی آزمایش‌ها جلوگیری شود). پس از گذشت زمان‌های مورد نظر، به‌هر چاهک ۱۰ میکرولیتر محلول MTT (غلظت ۵ mg/ml) (Sigma, USA) اضافه شد. پس از ۴ ساعت محیط روئی خارج و با DMSO (Merck,USA) جایگزین شد. در نهایت جذب نمونه‌ها در ۴۹۲ نانومتر در دستگاه الایزا ریدر Stat Fax-2100 model) Spain) قرائت شد (۱۵). توان زیستی سلول‌های تیمار شده با دارو (در هر غلظت از دارو) به‌شکل نسبت درصد جذب نوری فورمازان تولیدی در نمونه در مقایسه با میزان جذب نوری فورمازان تولیدی در کنترل (سلول‌های بدون تیمار دارویی) تعیین و در یک منحنی دوبعدی ترسیم شد. نمونه کنترل شامل سلول‌ها به‌همراه محیط کشت بود.

آنالیز نمونه‌ها با استفاده از فلوسایتومتری: جهت آنالیز سلول‌ها با روش فلوسایتومتری لازم است سلول‌ها کاملا به‌صورت تک تک باشند. به این معنی که هیچکدام به‌هم نچسبیده باشند. سلول‌های فیبروبلاست از دید کشت سلولی، در رده سلول‌های چسبان قرار می‌گیرند. برای به‌کارگیری روش فلوسایتومتری در این گونه سلول‌ها، نخست می‌بایست آن‌ها را از کف فلاسک دارای محیط کشت جدا کرد و آنگاه با پیپتاژ شدید با کمترین آسیب به سلول‌ها آن‌ها را به‌صورت تک در آورد. سلول‌های

www.SID.ir

Archive of SID

رنگ‌آمیزی شده برای آنالیز به‌درون کووت‌های ویژهای ریخته شده، درون دستگاه جای می‌گیرند.

پروپیدیوم یداید رنگدانه‌ای می‌باشد که قادر به برهم کنش با DNA سلول‌های مرده می‌باشد و از این خاصیت می‌توان با استفاده از فلوسایتومتری به درصد سلول‌های مرده پی برد. چرا که این DNA سلول‌ها با پرویدیوم یداید برهم کنش داده و از خود نور فلورسانس تابش می‌کنند. در این تحقیق، با به‌کارگیری PI و دستگاه فلوسایتومتر محتوای DNA سلولی سنجیده شد و از روی این محتوا و با توجه به نمودار به‌دست آمده توسط نرم افزار مخصوص درصد سلول‌ها در فازهای مختلف چرخه سلولی حاصل شد (۱۶). ابتدا در هر چاهک از پلیت‌های شش تائی ۰/۵ میلیون سلول به‌مدت ۴۸ ساعت در محیط کشت، کشت داده شد. سپس محیط پیشین با محیط جدید حاوی FBS ۱ درصد جایگزین شد و غلظت‌های موثر هورمون رشد و داروی جمسیتابین به‌هر چاهک اضافه شد و تیمار به‌مدت ۴۸ ساعت ادامه یافت. در نمونه‌های کنترل هورمون رشد و جمسیتابین افزوده نشد. غلظت‌های تیمار به‌شرح زیر بود:

هورمون رشد ۸۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر + جمسیتابین ۱۵۰میکروگرم بر میلی‌لیتر، هورمون رشد ۱۶۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر+ جمسیتابین ۱۵۰میکروگرم بر میلی‌لیتر، هورمون رشد ۸۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر + جمسیتابین ۴۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر، هورمون رشد ۱۶۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر + جمسیتابین ۴۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر.

سلول‌ها پس از سپری شدن مدت زمان لازم تریپسینه شدند. به رسوب سلولی ۵۰۰ میکرولیتر PBS افزوده شد و به سوسپانسیون حاصل اتانول ۷۰ درصد اضافه شد.

سلول‌ها، سپس با رنگ پروپیدیوم یدید (PI) رنگ آمیزی و با دستگاه فلوسایتومتری (بکتون دیکینسون (Dickinson-Becton))، آنالیز شدند و DNA سلولی سنجیده شد. از سنجش DNA می‌توان تعداد سلولها در مراحل گوناگون را به‌دست آورد که معیاری جهت پی بردن به‌طول چرخه سلولی و تغییرات آن می‌باشد. داده های حاصل ازدستگاه با نرم افزار Flowj آنالیز می‌شدند.

آزمون خراش: در هر چاهک از پلیت های شش تائی ۰/۵ میلیون سلول به‌همراه محیط کشت و FBS ۱۰ درصد اضافه شد. پس از سپری شدن ۲۴ ساعت با سر اسکالپر به‌صورت قطری خراشی در تمامی چاهک‌ها ایجاد شد. سپس سلول‌های با بافر PBS شستشو داده شدند و سلول‌ها با محیط (حاوی FBS ۱ درصد) حاوی غلظت‌های ۸۰ و ۱۶۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر هورمون رشد و ۲۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر دارو تیمار شدند و یک خانه به‌عنوان کنترل بدون دارو در نظر گرفته شد. سپس هر از نمونه‌ها در زمان صفر و پس از تیمار ۲۴ ساعت با دوربین عکس‌برداری شد. به‌طور کلی میزان بسته شدن خراش به‌صورت کیفی با پوشاندن محل خراش توسط سلول‌ها بررسی شد (۱۷).

آنالیز آماری

تمامی آزمایشات با سه بار تکرار بـه انجـام رسـید و داده‌های گزارش شده، نشان دهنده میانگین این سه با افـزایش و کـاهش انحراف معیار است. جهت محاسبه میانگین، انحراف معیار و ضریب همبستگی از نـرم افـزار SPSS استفاده شد که داده‌های با مقادیر احتمال $p<۰/۰۵$ معنی‌دار در نظر گرفته شد.

نتایج

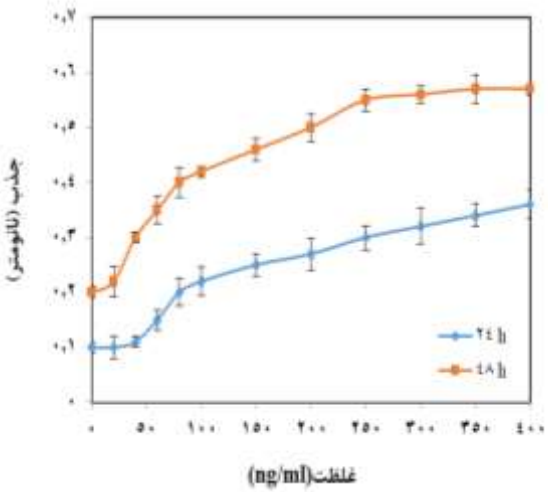
تاثیر هورمون رشد انسانی بر روند تکثیر سلول‌ها با استفاده از روش رنگ سنجی MTT

در این پژوهش نیز به‌منظور انجام این روش مطابق آنچه در مواد و روش‌ها ذکر شد سلول‌ها با هورمون رشد انسانی در غلظت‌های ذکر شده تیمار شدند و میزان بقا سلول‌ها اندازه‌گیری شد. نتایج در شکل ۱ نشان داده شده است. همان‌گونه که در شکل ۱ دیده می‌شود به‌طور کلی می‌توان گفت با افزایش غلظت هورمون رشد تا مقادیر ۴۰۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر رشد سلول‌ها نیز افزایش

www.SID.ir

Archive of SID

می‌یابد. در زمان ۲۴ ساعت این هورمون تا غلظت ۶۰ نانو گرم بر میلی‌لیتر تاثیر چندانی بر میزان تکثیر سلول‌ها ندارد ($p>0/05$). اما پس از این میزان تکثیر سلولی متناسب با غلظت هورمون دیده می‌شود ($p<0/01$). مقادیر کم هورمون (کمتر از۵۰ نانو گرم بر میلی‌لیتر) در زمان ۴۸ ساعت تاثیر خود بر تکثیر سلولی را القا می‌نمایند. با توجه به‌این‌که میزان FBS محیط ۱ درصد بود، بنابراین می‌توان گفت تنها عامل تحریک کننده تکثیر هورمون رشد می‌باشد. با توجه به‌نتایج می‌توان گفت غلظت‌های تاثیر گذار از ۸۰ تا ۴۰۰ نانو گرم بر میلی‌لیتر می‌باشد و بهترین زمان تاثیر برای این شرایط ۴۸ ساعت می‌باشد. آزمایش‌ها تا ۷۲ ساعت و ۹۶ ساعت نیز انجام شد که رشد سلول‌ها در این زمان‌ها به‌علت کمبود محیط و فضا جهت تکثیر متوقف شده بود. بنابراین سایر آزمایشات در زمان ۴۸ ساعت و در دو غلظت ۸۰ و ۱۶۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر صورت گرفت.

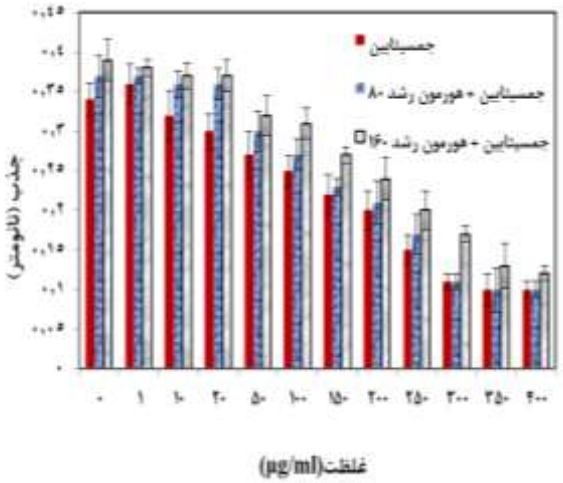


شکل ۱: تاثیر هورمون رشد انسانی نوترکیب با استفاده از آزمون MTT برسلول‌های فیبروبلاست در زمان‌های مختلف.

بررسی تاثیر داروی جمسیتابین و هورمون رشد با استفاده از روش MTT

با توجه به مشخص شدن قدرت تکثیر هورمون رشد انسانی در غلظت‌های بالاتر از ۸۰ نانو گرم بر میلی‌لیتر، در مرحله بعد تصمیم بر آن شد که از داروی جمسیتابین به‌صورت همزمان با هورمون رشد نیز استفاده شد. هدف از انجام این آزمایش این بود که مشخص گردد استفاده از هورمون رشد انسانی تا چه میزان می‌تواند تاثیرات سو، جانبی داروهای شیمی درمانی را کاهش دهد. بدین منظور ابتدا سلول‌های فیبروبلاست با غلظت‌های مختلف جمسیتابین تیمار شد تا تاثیر دارو در زمینه مهار رشد سلول‌های طبیعی اثبات شد. نتایج در شکل ۲ نشان داده شده است. همان‌طور که در این شکل دیده می شود با افزایش غلظت جمسیتابین میزان رشد سلول‌ها کاهش می‌یابد و افزایش غلظت این دارو تا حد زیادی سبب مرگ سلول‌ها نیز می‌شود. با افزایش غلظت دارو از۲۰۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر تاثیرات کشندگی چندان افزایش معنی‌داری نداشته اند ($p>0/05$).

در مرحله بعد تاثیر هورمون رشد انسانی در غلظت های ۱۶۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر و ۸۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر در کشت همزمان با جمسیتابین با استفاده از روش MTT مورد بررسی قرار گرفت. همانگونه که در شکل ۲ دیده می‌شود هورمون رشد توانسته است میزان مرگ و میر ناشی از داروی جمسیتابین را کاهش دهد. در این زمینه غلظت ۱۶۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر هورمون رشد تاثیرات شاخص‌تری اعمال نموده است.



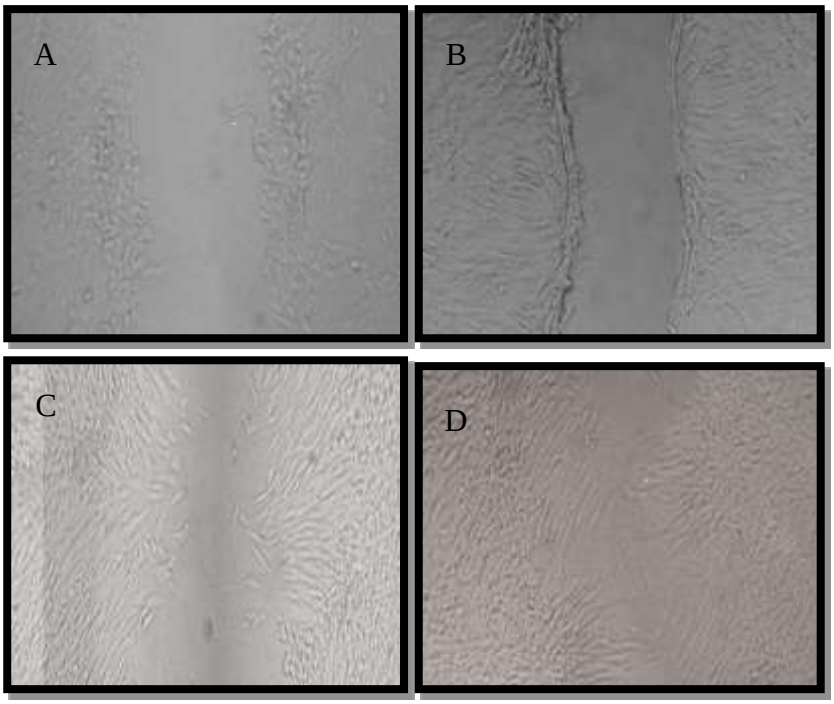
شکل ۲: تاثیر داروی جمسیتابین به‌تنهایی و در حضور هورمون رشد با غلظت‌های ۱۶۰ و ۸۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر با استفاده از آزمون MTT برسلول‌های فیبروبلاست در غلظت‌های مختلف.

www.SID.ir

Archive of SID

آزمون خراش

در این بخش جهت انجام آزمون خراش از غلظت‌های ۸۰ و ۱۶۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر هورمون رشد و دارو در غلظت ۲۰۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر به‌عنوان غلظت میانی استفاده شد. یک نمونه نیز تحت تاثیر دارو به‌تنهایی قرار گرفت. سپس از هر نمونه در محل خراش در لحظه صفر و ۲۴ ساعت بعد از خراش با دوربین متصل به میکروسکوپ عکس‌برداری شد. مهاجرت سلولی به‌درون فضای خراش در ساعت‌های مذکور با کاهش فاصله میان دو لبه تعیین شد. به‌طور کلی میزان بسته شدن خراش به صورت کیفی مشاهده گردید. نتایج در شکل ۳ نشان داده شده است.

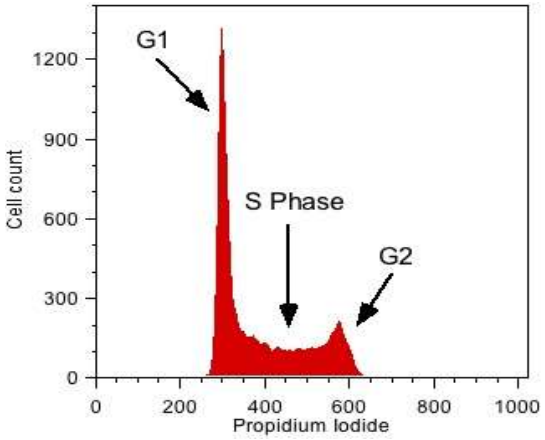


شکل ۳: آزمون خراش سلولی A) نمونه کنترل B) نمونه جمسیتابین با غلظت ۱۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر C) نمونه جمسیتابین با غلظت ۱۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر میکروگرم بر میلی‌لیتر و هورمون رشد با غلظت ۸۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر D) نمونه جمسیتابین با غلظت ۱۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر و هورمون رشد با غلظت ۱۶۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر

نتایج نشان دهنده‌ی آن است که پس از ۲۴ ساعت سلول‌ها که در پاساژ دوم بودند در هر دو غلظت هورمون رشد مهاجرت را نشان دادند. اما سلول‌ها در معرض جمسیتابین مهاجرتی نداشته‌اند. میزان مهاجرت سلولی با افزایش غلظت هورمون رشد افزایش یافته بود.

مطالعات چرخه سلولی با استفاده از فلوسایتومتری

برای نمایش شمار سلول‌ها در مراحل گوناگون چرخه سلولی باید هیستوگرام پروفایل DNA نسبت به شمار سلول‌های رنگ آمیزی شده با پروپیدیوم یدید را رسم نمود (شکل۴). در این نمودار دو قله وجود دارد. از آنجاکه بیشتر سلول‌ها در مراحل G_0 و G_1 هستند پس قله نخست که بیشینه‌ای را در شمار سلول‌ها نشان می‌دهد، نشان‌دهنده این مرحله از چرخه سلولی است.



شکل ۴: هیستوگرام طبیعی DNA که سلول‌ها در اتانول فیکس شده‌اند و با پروپیدیوم یدید رنگ آمیزی شده‌اند.

www.SID.ir

Archive of SID

قله دوم که کوتاه‌تر از قله پیشین است، سلول‌هایی را کـه در مراحل G_2 و M هستند نمایش می‌دهد. بخشی از نمودار که در میان این دو جـای مـی‌گیـرد نـشان دهنـده مرحلـه S می‌باشد (۱۸).

نتایج حاصل از نمودارهای هیستوگرامی فلوسایتومتری در جدول ۱ آورده شده است. مطابق نتایج موجود در جدول، هورمون رشد در غلظت‌های ۸۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر و ۱۶۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر بر سلول‌های فیبروبلاست به‌ترتیب باعث کاهش حدودا ۳/۲۳ و ۲/۵۴ درصدی این سلول‌ها در فاز G_1 نسبت به کنترل شد ($p<۰/۰۵$). اعمال هورمون رشد در همین غلظت‌ها بر سلول‌های فیبروبلاست به‌ترتیب باعث افزایش ۴/۹۷ و ۲/۱۴ درصدی سلول‌ها در فاز S می‌شد ($p<۰/۰۵$). این تغییرات در غلظت ۱۶۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر هورمون رشد نسبت به غلظت ۸۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر بیشتر می‌باشد. نتایج مربوط به فاز G_2 در غلظت ۱۶۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر هورمون رشد نشان‌دهنده افزایش ۲/۰۳ درصدی این سلول‌ها نسبت به کنترل می‌باشد ($p<۰/۰۵$).

اما در غلظت ۸۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر اختلاف معنی‌داری نسبت به کنترل حاصل نشد. داروی جمسیتابین نیز در غلظت‌های ۱۵۰، ۲۰۰ و ۴۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر اعمال شد، نتایج فلوسایتومتری در فاز G_1 تغییرات شدیدی را در حضور دارو نسبت به نمونه کنترل نشان داد و سبب افزایش تعداد سلول‌ها در فاز G_1 به‌صورت وابسته به دوز در این فاز نسبت به نمونه کنترل شد ($p<۰/۰۵$). از طرفی نتایج مربوط به فاز S در همین غلظت‌ها نشان دهنده کاهش قابل ملاحظه سلول‌ها در فاز S نسبت به کنترل می‌باشد ($p<۰/۰۵$). نتایج مربوط به فاز G2در غلظت ۱۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر داروی جمسیتابین اختلاف معنی‌داری با کنترل نشان نداد، اما در غلظت‌های ۲۰۰ و ۴۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر کاهش معنی‌داری را نشان داد ($p<۰/۰۵$).

جدول ۱: درصد سلول‌های فیبروبلاست در مراحـل گونـاگون چرخـه سلولی پس از تیمـار بـا جمسیتابین و هورمون رشد انسانی.

نمونه	G0/G1	S	G2/M
کنترل	۹۱/۲۸	۱/۶۹	۷/۰۵
هورمون رشد ۸۰ ng/ml	۸۸/۰۷	۳/۴۲	۸/۵۱
هورمون رشد ۱۶۰ ng/ml	۸۸/۷۵	۶/۱۶	۵/۰۹
جمسیتابین ۱۵۰ µg/ml	۶۵/۷۲	۲۶/۰۴	۸/۲۵
جمسیتابین ۲۰۰ µg/ml	۷۱/۸۷	۲۳/۲۱	۴/۹۳
جمسیتابین ۴۰۰ µg/ml	۷۳/۷۸	۱۹/۴۲	۶/۸
هورمون رشد ۸۰ ng/ml + جمسیتابین ۱۵۰ µg/ml	۷۶/۵۷	۱۳/۳۷	۱۰/۰۶
هورمون رشد ۱۶۰ ng/ml + جمسیتابین ۱۵۰ µg/ml	۷۵/۱۸	۱۱/۴۵	۱۳/۳۷
هورمون رشد ۸۰ ng/ml + جمسیتابین ۴۰۰ µg/ml	۷۸/۶۲	۱۶/۱۴	۵/۲۴
هورمون رشد ۱۶۰ ng/ml + جمسیتابین ۴۰۰ µg/ml	۷۳/۴	۱۶/۶۶	۹/۹۴

با اعمال هورمون رشد و داروی جمسیتابین با چهار غلظت متفاوت شامل هورمون رشد ۸۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر+ جمسیتابین ۱۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر، هورمون رشد ۱۶۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر + جمسیتابین ۱۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر، هورمون رشد ۸۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر + جمسیتابین ۴۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر، هورمون رشد ۱۶۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر+ جمسیتابین ۴۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر به‌ترتیب منجر به‌کاهش ۱۵/۶۳، ۱۴/۶۷، ۱۲/۶۰، ۱۷/۷۷ میزان سلول‌ها در فاز G_1 نسبت به نمونه کنترل شد ($p<۰/۰۵$).

از طرفی نتایج مربوط به فاز S در غلظت های ۸۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر + جمسیتابین ۱۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر ، هورمون رشد ۱۶۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر+ جمسیتابین ۱۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر، هورمون رشد ۸۰ نانوگرم بر

www.SID.ir

Archive of SID

میلی‌لیتر+ جمسیتابین ۴۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر ، هورمون رشد ۱۶۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر+ جمسیتابین ۴۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر نشان دهنده به‌ترتیب افزایش ۱۲/۳۲، ۱۰/۲۱ ،۱۴/۹۱، ۲۲/۲۰ درصدی این سلول‌ها نسبت به نمونه کنترل می‌باشد ($p<۰/۰۵$).

نتایج مربوط به‌فاز G_2 در غلظت‌های ۸۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر+ جمسیتابین ۱۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر ، هورمون رشد ۱۶۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر + جمسیتابین ۱۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر ، هورمون رشد ۸۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر + جمسیتابین ۴۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر ترکیب از داروی جمسیتابین و هورمون رشد منجر به کاهش ۲/۹۹، ۶/۱۰، ۱/۴۱ درصدی سلول‌ها نسبت به کنترل شد.

اما در غلظت هورمون رشد ۸۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر + جمسیتابین ۴۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر منجر به افزایش ۱/۲۳ درصدی این سلول‌ها شد ($p<۰/۰۵$).

بحث

هورمون رشد، با توجه به ترشح در خون و عملکردهای متعدد زیستی، اثرات مستقیم و غیر مستقیمی بر رشد می‌گذارد و به‌عنوان موثرترین هورمون بدن مورد توجه محققین، پزشکان و حتی ورزشکاران قرار گرفته است. همچنین با توجه به اهمیت دارویی این هورمون در درمان بسیاری از نارسایی‌های ناشی از کمبود آن، تولید این هورمون به‌صورت نوترکیب در داخل و خارج کشور مورد توجه بسیار است. در این پژوهش تلاش جهت ارزیابی فعالیت زیستی هورمون رشد بر اساس کشت سلول انجام شد. ابتدا آزمون MTT انجام شد. نتایج گویای اثر بخشی قطعی هورمون رشد در زمان‌های بیشتر از ۲۴ ساعت است. در مطالعه‌های انجام شده (۱۲،۱۳)، رشد و تکثیر سلول‌های فیبروبلاست تحت اثر هورمون رشد با آزمون MTT انجام شد و در غلظت‌های ۱۰۰، ۴۰۰ و ۷۰۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر رشد سلول‌های فیبروبلاست در مقایسه با نمونه کنترل دیده شد.

از آنجایی‌که هورمون رشد سبب افزایش تکثیر سلول‌های طبیعی و هم سلول‌های سرطانی می‌شود، برخی از دانشمندان بر این باورند که این هورمون در غلظت‌های بالا سبب افزایش خطر سرطان خون و تومورهای جامد شود. برخی دیگر نیز در افزایش خطر ایجاد سرطان روده در غلظت‌های بالای هورمون رشد تاکید کردند. هاورکمپ و همکارانش (۱۹) اثر هورمون رشد را در افزایش سلول‌های آنیپلوئیدی در سندرم ترنر عنوان کردند. با وجود مطالعاتی که بر عملکرد افزاینده‌ی تومور توسط هورمون رشد انجام شده است، هریسون (۲۰) بیان کرد که هورمون رشد نمی‌تواند سبب تسریع کارسینومای پانکراس شود. همچنین تک و همکارانش (۲۱) بیان کردند که درمان با هورمون رشد در دوره‌ی کوتاه سبب بهبود سریع‌تر عملکرد سیستم ایمنی، افزایش سلول‌های کشنده طبیعی و مهار بازگشت تومور می شود. در مطالعه‌ی دیگری در شرایط آزمایشگاهی و هم شرایط داخل بدن شواهد حاکی از عدم تاثیر هورمون رشد بر رشد تومور بود. بارتلت پیشنهاد داد که هورمون رشد مهارکننده‌ی رشد تومور در حیوانات با کمبود پروتئین است. البته مطالعات دیگری هم در جهت عدم رشد تومور توسط هورمون رشد وجود دارد (۲۴-۲۲).

جمسیتابین اثرات سمیت خود بر DNA که عمدتا مهار تشکیل DNA است، از طریق جمسیتابین سه فسفات و با اتصال به رشته‌های DNA انجام می‌دهد. همچنین جمسیتابین دی فسفات به‌شدت مهار کننده‌ی ریبونوکلئوتید ردوکتاز است، که منجر به کاهش رقابت میان دئوکسی ریبونوکلئوتیدهای لازم جهت تشکیل DNA می شود. (۲۲).

در مرحله‌ی بعد اثر داروی ضد سرطان جمسیتابین بر سلول‌های فیبروبلاست پوستی با استفاده از تست MTT انجام شد. رشد سلول ها نسبت به نمونه‌ی کنترل کمتر بود. در مطالعه‌ایی که پیش تر بر سلول‌های سرطانی تیروئید انجام شده بود داروی جمسیتابین پس از ۷۲ ساعت در غلظت‌های ۱ و ۱۰۰ میکرومولاری منجر به

www.SID.ir

Archive of SID

مرگ سلولی شده است و زمانی که با یک پوشش مانند لیپوزوم یا داروی دیگر مانند سیس پلاتین یا سورافنیب همراه شود در ۲۴ ساعت نیز اثر کشندگی خود را بر سلول‌های سرطانی می‌گذارد (۲۴). نتایج این بررسی نیز حکایت از توقف رشد دارو داشت که می‌توان به‌عنوان اثرات جانبی دارو در نظر گرفت. در مطالعه‌ایی که پیش تر بر سلول های سرطانی تیروئید انجام شده بود داروی جمسیتابین پس از ۷۲ ساعت در غلظت‌های ۱ و ۱۰۰ میکرومولار منجر به مرگ سلولی شده است (۲۳، ۲۵).

اولین بار آزمون خراش توسط لی و همکارانش (۲۶) به‌منظور سنجش مهاجرت سلول‌ها ارائه شد. سنجش ترمیم زخم به‌وسیله آزمون خراش به‌طور گسترده‌ای به‌منظور بررسی اثر انواع شرایط تجربی مانند مواد شیمیایی، در مهاجرت سلول‌های پستانداران و تکثیر سلول ها استفاده می‌شود. در آزمون خراش ابتدا، یک شکاف در یک تک لایه ی سلول ایجاد می‌شود. ترمیم این شکاف، با مهاجرت سلولی و رشد به سمت مرکز شکاف تحت نظر قرار می‌گیرند. عوامل تغییر دهنده تحرک و رشد سلول می‌توانند سرعت ترمیم شکاف را افزایش یا کاهش دهند (۲۷). مطالعات نشان داده‌اند که فاکتورهای رشد و عوامل آنکوژنیک سبب افزایش مهاجرت سلولی و ترمیم زخم می‌شوند. در حالی‌که عوامل سرکوب کننده‌ی تومور و داروهای ضد سرطانی سبب کاهش مهاجرت سلولی و کاهش ترمیم زخم در کشت‌های سلولی می‌شوند (۱۷). نتایج این مطالعه نیز در راستای مطالعات گذشته می‌باشد که هورمون رشد به عنوان یک فاکتور رشد سبب افزایش مهاجرت سلولی می‌شود.

علت انتخاب سلول‌های فیبروبلاست برای این آزمون نقش اصلی و مهم این سلول‌ها در کنار کراتینوسیت‌ها در ترمیم زخم است. در آزمونی که مشابه این پژوهش که بر سلول‌های فیبروبلاست و کراتینوسیت‌ها انجام شد پس از ۲۴ ساعت شکاف نمونه‌های تحت اثر هورمون رشد نسبت به نمونه‌ی کنترل کاهش یافت. به‌عبارتی هورمون رشد محرک مهاجرت کراتینوسیت‌ها و سلول‌های فیبروبلاست است که با نتایج MTT و تکثیر سلول‌ها که قبلا هم بیان شده بود مطابقت داشته است (۲۸،۲۹).

حال با استناد بر این یافته‌ها می توان گفت:

۱- نتیجه استفاده از هورمون رشد خروج سلول‌ها از فاز G_1 به S و در نهایت تکمیل چرخه‌ی سلولی بود که تقریبا با یک روند ثابتی انجام شد. همچنین در تمام غلظت‌ها این پروسه تغییر چشمگیری نداشت.

۲- در مرحله‌ی بعد اعمال اثر جمسیتابین بود که طبق مطالعاتی قبلی سبب توقف تکثیر سلول‌ها در فاز S می شود. در مطالعات ما نیز توقف سلولی بیشتر در فاز S مشاهده شد. از طرفی ورود به فاز G_2 نسبت به نمونه‌ی کنترل کاهش داشت. که این مشاهدات در راستای مطالعات قبلی بوده است.

۳- در مرحله ی بعد جهت کاهش عوارض جانبی داروی جمسیتابین و بررسی عملکرد هورمون رشد از جنبه‌ی دیگر، سلول‌های تحت تیمار هر دو دارو به‌صورت همزمان قرار گرفتند. می‌دانیم عموما، سلول‌هایی که در فاز G_0 هستند حساسیت کمتری به داروهای شیمی درمانی برای درمان سرطان نشان می‌دهند و در بیشتر مواقع سبب متاستاز سلولی و تشدید بیماری می‌شوند. مطالعات پیشین نیز نشان داده‌اند که مکانیسم عمل جمسیتابین عمدتا از طریق فاز S و مهار این مرحله می‌باشد. به‌نظر می‌رسد هورمون رشد سبب تحریک سلول‌های مهار شده توسط جمسیتابین در فاز S می‌شود. در مطالعات فلوسیتومتری نیز اثبات شد، اثر مهاری جمسیتابین بیشتر در فاز S می باشد. استفاده همزمان از هورمون رشد و جمسیتابین سبب می‌شود که سلول‌های مهار شده تحریک شوند و فاز S را گذرانده و وارد فاز G_2 شوند که در نهایت سلول وارد مرحله میتوز می‌شود که البته این مشاهده

www.SID.ir

Archive of SID

جهت کاهش اثرات سو داروهای شیمی درمانی برای سلول‌های طبیعی مفید می‌باشد. در زمینه سلول‌های سرطانی مطالعات حاکی از نبود گیرنده‌های هورمون رشد در سطح سلول‌های سرطانی می‌باشد که این امر نیاز به تحقیقات بیشتری دارد (۲،۳).

۴- نتایج آزمون همبستگی نشان می‌دهد که میان آزمایش‌های MTT و فلوسیتومتری همبستگی معنی‌داری وجود دارد ($R2 > ۹۶$).

نتیجه‌گیری

مطالعات مختلف و نتایج حاصل از این پژوهش نشان داده است که هورمون رشد منجر به تکثیر و پیشبرد چرخه‌ی سلولی با روندی ثابت می‌گردد. به‌عبارتی هورمون رشد در سلول‌ها منجر به کاهش سلول‌ها در فاز G_0/G_1 و افزایش سلول‌ها در فاز S/M می‌شود. در تحقیقات اخیر مشخص شد که بیان گیرنده‌ی هورمون رشد در سلول‌های سرطانی ۳ تا ۶ درصد است در حالی‌که در سلول‌های سالم بیان این گیرنده به‌میزان ۳۵ تا ۵۰ درصد می‌باشد. از طرفی سلول‌هایی که در فاز G_0 هستند حساسیت کمتری به داروهای شیمی درمانی جهت درمان سرطان دارند و در بیشتر مواقع سبب متاستاز سلولی و تشدید بیماری می‌شوند. از این‌رو همراه کردن هورمون رشد انسانی توانست سلول‌ها را از فاز G_0 خارج کند و از این رو هورمون رشد انسانی اثر بخشی داروهای شیمی درمانی را افزایش می‌دهد (۲).

جمسیتابین توانایی متوقف سازی چرخه سلولی در بیشتر فازها بویژه در فاز G_1 و کاهش میزان سلول‌ها در فاز G_2 را دارد (۲۰،۲۱) همچنین این دارو موجب توقف و یا تاخیر چنگال همانندسازی در فاز S چرخه‌ی سلولی می‌شود. مدل سازی‌ها و نتایج آزمایشگاهی از این دارو بیانگر توقف فاز S چرخه‌ی سلولی در غلظت‌های پایین دارو است در حالی‌که در غلظت‌های بالا باعث توقف تمام فازهای چرخه سلولی می‌شود. همچنین منجر به آپوپتوزیس سلول‌ها در غلظت‌های حداقلی در طول دوره‌ی زمانی شده است (۳۰).

تشکر و قدردانی

نویسندگان مقاله از حمایت‌های مالی دانشگاه صنعتی مالک اشتر که انجام این مطالعه را ممکن ساخته‌اند، سپاسگزاری می‌نمایند.

منابع

1. Lekic P, McCulloch C. Periodontal ligament cell populations: the central role of fibroblasts in creating a unique tissue. The Anatomical Record. Anat Rec. 1996; 245(2): 327-41.

2. Xinyang H, Geliang X, Rongnan X. .Effect of reorganized-human growth hormone on cell cycle kinetics in liver cancer in vitro. Hepatobiliary Pancreat Dis Int. 2002; 1(2): 224-7.

3. Almeida AA, Ramos F. Acute myeloid leukemia in the older adults.Leuk Res Rep. 2016; 6: 1–7.

4. D Ross DD, Chen SR, Cuddy DP. Effects of 1-Beta-D-arabinofuranosylcytosine on DNA replication intermediates monitored by pH-step alkaline elution. Cancer research Cancer Res. 1990; 50(9): 2658-66.

5. Bergman AM, Adema AD, Balzarini J, Bruheim S, Fichtner I, et al. ntiproliferative activity .mechanism of action and oral antitumor activity of CP- 1116 ، a fatty acid derivative of gemcitabine .in in vitro and in vivo tumor models .Invest New Drugs. 2011; 29(3): 456-66

6. Li J, Pan Y-Y, Zhang Y. Synergistic interaction between sorafenib and gemcitabine in EGFR–TKI–sensitive and

www.SID.ir

Archive of SID

EGFR−TKI−resistant human lung cancer cell lines. Oncol Lett. 2013; 5(2): 440–446.

7. Ferrandina G, Ludovisi M, Lorusso D, Pignata S, et al. Phase III trial of gemcitabine compared with pegylated liposomal doxorubicin in progressive or recurrent ovarian cancer.J Clin Oncol. 2008; 26(6):890-6.

8. Hamamoto J, Yasuda H, Aizawa K, Nishino M, et al. Non-small cell lung cancer PC-9 cells exhibit increased sensitivity to gemcitabine and vinorelbine upon acquiring resistance to EGFR-tyrosine kinase inhibitors. Oncol Lett. 2017; 14(3): 3559-3565.

9. Waters MJ, Brooks AJ. JAK2 activation by growth hormone and other cytokines. Biochem J. 2015; 466(Pt 1): 1–11.

10. Ikeda M, Wada M, Fujita Y, Takahashi S, et al. A novel bioassay based on human growth hormone (hGH) receptor mediated cell proliferation: measurement of 11K-hGH and its modified forms. Growth Horm IGF Res. 2000; 10(5): 248-55.

11. Ishikawa M, Nimura A, Horikawa R, Katsumata N. et al. A novel specific bioassay for serum human growth hormone .J Clin Endocrinol Metab. 2000; 85(11):4274-9.

12. Lee SW, Kim SH, Kim JY, Lee Y. The effect of growth hormone on fibroblast proliferation and keratinocyte migration. J Plast Reconstr Aesthet Surg. 2010; 63(4): e364-9.

13. Lincoln DT, Sinowatz F, Temmim-Baker L, Baker HI, et al. Growth hormone receptor expression in the nucleus and cytoplasm of normal and neoplastic cells. Histochem Cell Biol. 1998; 109(2): 141-59.

14. He XY, Xu GL, Xu RN, Ze ZM. Effect of reorganized-human growth hormone on cell cycle kinetics in liver cancer in vitro. Hepatobiliary Pancreat Dis Int. 2002; 1(2): 224-7.

15. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. J. Immunol. Methods. 1983; 65:55–63.

16. Jelinek T, Bezdekova R, Zatopkova M, Burgos L, et al. Current applications of multiparameter flow cytometry in plasma cell disorders. Blood Cancer J. 2017; 20; 7(10) e617.

17. Liang CC, Park AY, Guan JL. In vitro scratch assay: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration in vitro. Nat Protoc. 2007; 2(2): 329-33.

18. Potter AJ, Gollahon KA, Palanca BJA, Harbert MJ, et al. Flow cytometric analysis of the cell cycle phase specificity of DNA damage induced by radiation, hydrogen peroxide and doxorubicin. Carcinogenesis. 2002; 23(3):389–401.

19. Haverkamp F, Wolfle J, Zerres K, et al. Growth retardation in Turner syndrome: aneuploidy, rather than specific gene loss, may explain growth failure. J Clin Endocrinol Metab. 1999;84: 4578–82.

20. Harrison LE, Blumberg D, Berman R, Ng B, Hochwald S, Brennan MF, Burt M. Effect of human growth hormone on human pancreatic carcinoma growth, protein, and cell cycle kinetics. J Surg Res. 1996;61: 317–322.

21. Tacke J, Bolder U, Herrmann A, Berger G, Jauch KW. Long-term risk of gastrointestinal tumor recurrence after postoperative treatment with recombinant human growth hormone. JPEN J Parenter Enteral Nutr. 2000; 24:140–144.

22. Hamed SS, Straubinger RM, Jusko WJ. Pharmacodynamic modeling of cell cycle and apoptotic effects of gemcitabine on pancreatic adenocarcinoma cells. Cancer Chemother Pharmacol. 2013; 72(3): 553-63.

23. Celano M, Calvagno MG, Bulotta S, Paolino D, et al. Cytotoxic effects of gemcitabine-loaded liposomes in human anaplastic thyroid carcinoma cells. BMC Cancer. 2004 Sep; 13; 4(1):63.

24. da Silva GN, de Castro Marcondes JP, de Camargo EA, da Silva Passos Júnior GA, et al. Cell cycle arrest and apoptosis in TP53 subtypes of bladder carcinoma cell lines treated with cisplatin and gemcitabine. Exp Biol Med (Maywood). 2010; 235(7): 814-24.

www.SID.ir

Archive of SID

25. Meriggi F. Zaniboni A. Gemox: a widely useful therapy against solid tumors-review and personal experience. Journal of Chemotherapy. 2010; 22(5): 298-303.
26. Li W, Henry G, Fan J, Bandyopadhyay B, et al. Signals that initiate, augment, and provide directionality for human keratinocyte motility. J Invest Dermatol. 2004; 123(4): 622-33.
27. Lampugnani M.G. Cell migration into a wounded area in vitr. Methods Mol Biol. 1999; 96: 177-82.
28. Ding j, Wirostko B, Sullivan DA. Human Growth Hormone Promotes Corneal Epithelial Cell Migration in Vitro. Cornea. 2015; 34(6): 686–692.
29. Zare-Mirakabadi A, Sarzaeem A, Moradhaseli S, Sayad A, et al. Necrotic Effect versus Apoptotic Nature of Camptothecin in Human Cervical Cancer Cells. Iran J Cancer Prev. 2012; 5(3): 109–116.
30. Affram K, Udofot O, Agyare E. Cytotoxicity of gemcitabine-loaded thermosensitive liposomes in pancreatic cancer cell lines. Integr Cancer Sci Ther. 2015; 2(2): 133–142.

www.SID.ir

Archive of SID

Journal of Cell & Tissue (JCT) *Original Article*
Winter 2019; 9(4)

Evaluating the effect of recombinant human growth hormone and Gemcitabine on the proliferation and cell cycle progression of Normal lung fibroblast cells

Mirzaei Fard M, M.Sc., Aramvash A, Ph.D. *

-Department of bioscience, Malek Ashtar University of Tehran, Tehran, Iran

* Email corresponding author: Aramvash@ibb.ut.ac.ir

Received: 24 Oct. 2018 Accepted: 23 Dec. 2018

Abstract

Aim: In this study, the effects of recombinant human growth hormone and Gemcitabine alone and in combination with each other were investigated on the lung fibroblast cell lines.

Material and methods: Human growth hormone at 10-400 ng/ml and Gemcitabine at 1-100 μg/ml concentrations were treated with the human lung fibroblast cells and the analysis were performed with MTT assay, propidium iodide staining and scratch assay.

Results: Studies of the cell cycle and MTT assay revealed the effect of growth hormone on the progression of the cell cycle and exit of G1 phase and the cell proliferation, and the inhibitory effects of the cell cycle and growth process by Gemcitabin compared with the control sample. The results of the scratch test indicated that the growth hormone at its effective concentrations caused increased the cell migration compared to control, while the Gemcitabin reduced the migration of the cell to the control.

Conclusions: Using growth hormone in combination to gemcitabin during chemotherapy treatment, it seems that we can reduce the rate of the neem normal cells death. Since these cells are more sensitive to growth hormone´s effect than cancer cells.

Keywords: Proliferation, Cell cycle, Growth hormone, Gemcitabine, Human fibroblast

www.SID.ir