

Effects of Insulin like growth factor IGF- 1 on the viability of human HepG2 Liver cancer cells

Dr. Hasen naser AL- Deen^{*}
Dr. Abdul Qader abbady^{**}
Lamis AL- Homs^{***}

(Received 20 / 8 / 2019. Accepted 15 / 9 /2019)

□ ABSTRACT □

Insulin like growth factor (IGF-1) is a unique peptide that functions in an endocrine/paracrine and autocrine manner in most tissues. IGF-1 functions as both a circulating hormone and as a tissue growth factor. The binding of IGF1 to its cell surface receptor IGF-1R activates a signaling pathway leading to important physiological aspects in the cell.

In this work, we used the human liver cancer cell line HepG2 to test the effects of a homemade recombinant fusion protein *sf*GFP-IGF-1 on the growth and viability of the cells after treatment with different concentrations. One efficient strategy to extend protein half-life is through recombinant fusion with stable moieties like the green fluorescent protein (GFP).

The results show a significant efficacy on the viability of the treated cells by increasing the concentration of the recombinant pure protein *sf*GFP-IGF-1. The results confirm increasing in gene expression of some target genes using qPCR.

The results indicate the significant effect of the recombinant fusion protein *sf*GFP-IGF1 on HepG2 cells viability and on target genes activation.

Keywords: HepG2 cells, IGF- 1, IGF-1R, proliferation.

^{*} Professor, philosophy, department of Animal Biology, Faculty of Sciences, Damascus University, Syria

^{**}Recearsher, department of Molecular Biology and Biotechnology, Atomic Energy Commission of Syria (AECS), Damascus, Syria

^{***}PhD student, department of Animal Biology, Faculty of Sciences, Damascus University, Syria

تقصي فعالية العامل IGF-1 في زيادة حيوية الخلية عند الخلايا السرطانية البشرية الكبدية HepG2

د. حسن ناصر الدين*

د. عبد القادر عبادي**

لميس الحمصي***

(تاريخ الإيداع 20 / 8 / 2019. قبل للنشر في 15 / 9 / 2019)

□ ملخص □

يُعد عامل النمو الشبيه بالأنسولين IGF-1 (Insulin-Like growth factor 1) من الببتيدات الفريدة التي تعمل بعدة طرق endocrine/paracrine and autocrine في معظم الانسجة، إذ تتمثل وظائفه كهرمون جوال في الدم وعامل نمو نسيجي. يؤدي IGF-1 أفعاله من خلال تنشيط النكاثر الخلوي وتنشيط الاستموات الخلوي وذلك بعد ارتباطه بمستقبله الخاص IGF-1R على أغشية الخلايا ليتم تفعيل شلال الإشارة المؤدي إلى العديد من الظواهر الفيزيولوجية الهامة في الخلية.

استخدم الخط الخلوي السرطاني البشري HepG2 لدراسة تأثير البروتين المؤشب المندمج sfGFP-IGF-1 (super folder Green fluorescent protein) المحضّر محلياً في نمو وحيوية الخلايا وذلك بمعالجتها بعدة تراكيز. إذ تكمن إحدى الاستراتيجيات الناجعة في إطالة نصف عمر البروتينات في إنتاجها بشكل مؤشب مندمج مع أجزاء شديدة الاستقرار مثل البروتين الأخضر المتألق GFP.

أظهرت نتائجنا قدرة البروتين المؤشب المنقى sfGFP-IGF-1 على زيادة حيوية الخلايا المعالجة بازدياد معامل التركيز. كما أثبتنا حصول زيادة في التعبير المورثي لعدد من المورثات الهدف باستخدام تقنية qPCR. بينت هذه النتائج أن البروتين المؤشب المندمج sfGFP-IGF-1 له تأثير فعال في زيادة حيوية الخلايا HepG2 وتفعيل عدد من المورثات الهدف المسؤولة عن النمو الخلوي.

الكلمات المفتاحية: الخلايا السرطانية البشرية الكبدية HepG2، عامل النمو شبيه الأنسولين IGF-1، زيادة النكاثر، مستقبل IGF1.

*أستاذ، قسم علم الحياة الحيوانية، كلية العلوم، جامعة دمشق، سورية

**باحث رئيسي، قسم البيولوجيا الجزيئية والتقانة الحيوية، هيئة الطاقة الذرية السورية

***طالبة دكتوراه، قسم علم الحياة الحيوانية، كلية العلوم، جامعة دمشق، سورية

مقدمة:

يشتمل نظام IGF1 على عائلة من الببتيدات المساهمة في نمو الثدييات، التطور، والاستقلاب، وأيضاً في العمليات الخلوية مثل التكاثر، البقاء Survival، وهجرة الخلايا metastasis والتمايز. تتضمن هذه العائلة ثلاث ربائط (IGF1, IGF2, Insulin) Ligand ومستقبلاتها على سطح الخلايا (IGF-1R, IGF-2R, IR) وستة بروتينات رابطة عالية الألفة (IGFBP 1-6) [1]

تقوم معظم أنسجة الجسم بالتعبير عن IGF1 حيث يجول في الدم على شكل سلسلة مفردة عديدة الببتيد تتضمن 70 حمضاً أمينياً موزعة ضمن 4 مجالات A، B، C، D. يُشتق IGF1 الجوال في الدم من الكبد وبمشاركة بعض الأنسجة كالنسيج الشحمية [2].

يقوم العامل IGF-1 بتنظيم وظائف الخلايا من خلال تفاعله مع مستقبله IGF-1R الخاص على سطح الخلية لتفعيل شلال من الإشارات الداخلة خلوية [3]. يمتاز IGF-1R بفعالية أنزيم تيروسين كيناز ويتم تفعيله عند ارتباط العامل بالجزء خارج الخلوي من المستقبل، حيث تظهر تغيرات بنيوية في شكل البروتين المستقبل تؤدي إلى تفعيله وانطلاق مسارات نقل الإشارة الخاصة به والمؤدية إلى سلاسل متعددة من عمليات الفسفرة داخل الخلية والتي غالباً ما تنتهي بإحدى الظواهر الفيزيولوجية الهامة مثل حركة الخلايا ونموها وتكاثرها وإيقاف الاستموات الخلوي [4].

من بين العديد من الأدوار الفيزيولوجية لـ IGF، دوره الهام في التسبب بالاورام الخبيثة [5]. بالإضافة إلى ذلك تؤكد الدراسات الحديثة وجود علاقة بين مستوى مكونات نظام IGF في المصل ومخاطر الإصابة بالسرطان والبقاء على قيد الحياة عند البشر [1].

يلعب IGF1 دوراً هاماً في تطور السرطان من خلال تنظيم تولد الأوعية الدموية وتولد الأوعية اللمفية وانحلال المطرق خارج الخلوي ECM، وغزو الورم في ECM والأوعية الدموية، والحفاظ على البقاء وتكاثر الخلايا السرطانية [6، 7]. فقد أظهرت العديد من الدراسات أن IGF1 يقوم بتنظيم تولد الأوعية الدموية واللمفية من خلال تفعيل عامل نمو بطانة الأوعية الدموية VEGF [8].

وإن دور IGF1 أصبح موثقاً في مختلف أمراض الكبد المزمنة Chronic liver diseases CLDs، فقد تحققت العديد من الدراسات من إمكانية استخدام مستوى IGF1 المصلي في تنبؤ سرطان الكبد [9، 10]. إذ يُعد انخفاض مستوى IGF1 المصلي وانخفاض تعبير الأنسجة عن IGF1 وزيادة إنتاج IGF-1R من التغيرات السابقة للورم وحتى مرحلة متقدمة منه. ويُعزى الانخفاض في مستوى IGF1 المصلي إلى انخفاض القدرة الإنتاجية للخلايا الكبدية السليمة والتي استُبدلت بالخلايا السرطانية [11، 12].

أكدت الدراسات في الزجاج invitro دور مكونات نظام IGF في المظاهر الخلوية لسرطان الكبد مثل: تقدم الدارة الخلوية cell cycle progression، التكاثر الخارج عن السيطرة، البقاء الخلوية، الهجرة، تثبيط الاستموات الخلوي، اصطناع البروتينات والنمو الخلوي، وتبين أن تقديم IGF1 بشكل جهازي ممكن أن يقلل من تليف الكبد ويحسن وظائف الكبد بشكل عام [13، 14].

أهمية البحث وأهدافه

نظراً للأهمية الصيدلانية للعامل IGF1 كهرمون حيوي متورط في العديد من الظواهر الفيزيولوجية والاعتلالات المرضية وفي تشخيص بعض أنواع السرطان وعلاجها مستقبلاً. فمن الأهمية بمكان اثبات فعالية البروتين *sfGFP*-IGF-1 المحضر محلياً على الخلايا السرطانية للتأكيد على دوره الفعال في زيادة تكاثر الخلايا.

أهداف البحث:

دراسة التأثير الحيوي للبروتين المؤشب المنقى *sfGFP*-IGF-1 والمحضر محلياً على نمو الخط الخلوي السرطاني الكبدى HepG2

دراسة التغير في التعبير المورثي لعدد من المورثات الهدف للبروتين IGF-1 في الخلايا السرطانية HepG2.

طرائق البحث ومواده:

أولاً: الزراعات الخلوية:

استُتبت الخط الخلوي السرطاني البشري HepG2 في وسط الزراعة RPMI-1640 والمحتوي على 10% من السيروم البقري الجنيني (FBS)، 50 وحدة/مل من المضادات الحيوية بنسيلين - ستريبتومايسين، و2 مللي مول من مادة الغلوتامين. تُميت الخلايا بدرجة حرارة 37°C وبوجود 5% من غاز ثاني أكسيد الكربون CO₂. كانت جميع المواد المستخدمة في الزراعات الخلوية مزودة من شركة Gibco®.

ثانياً: تحضير المنحني المعياري لخلايا HepG2:

من أجل معرفة العدد المتوافق من الخلايا مع صبغ XTT، تم استنبات الخلايا في صفيحة زراعة 96 بئراً بأعداد خلوية متزايدة (0, 4000, 8000, 16000, 32000, 64000) خلية/100 ميكروليتر (خمس مكررات لكل تعداد) من الخلايا السرطانية HepG2 حضنت لمدة 24 ساعة على حرارة 37°C، ثم أضيف الصبغ XTT لكل بئر وحضن لمدة 4 ساعات (وذلك بحسب تعليمات الشركة المصنعة للطاغم (Roche®))، يعد اختبار XTT طريقة فعالة لقياس حيوية وتكاثر الخلايا وحساسيتها لمركبات قيد الاختبار، حيث تحول الخلايا الحية مركب XTT (صبغ التترازوليوم Tetrazolium) إلى مركب ذو لون برتقالي (فورمازان formazan)، تمت قراءة التغير اللوني في الصبغ عند طول موجة 450nm و690nm (والذي يعطي امتصاصية معدومة لصبغ XTT) بواسطة جهاز قارئ الصفائح (Thermo Labsystems™). تم طرح قيم امتصاصية عند طول الموجة 690 نانومتر من قيم الامتصاصية عند طول الموجة 450 نانومتر لاستبعاد أثر لامتصاصية الصفيحة ووسط الاستنبات ثم حُسب متوسط قيم الامتصاصية لكل تركيز خلوي. ثم الربط بين كل من قيمة الامتصاصية وعدد الخلايا التابع لها بمنحني معياري ومن ثم تحديد معادلة المنحني المعياري (الشكل 1A).

ثالثاً: البروتين IGF-1 المؤشب:

تم تحضير عامل النمو الشبيه بالأنسولين IGF-1 بالشكل المؤشب والمدمج مع البروتين المتفلور الأخضر عالي الطي *sfGFP*-IGF-1 بالشكل *sfGFP*-IGF-1 وفقاً للطريقة المذكورة في الدراسة "Al- Homs et al" - قيد النشر - حيث تم اصطناع مورثة العامل IGF-1 بتفاعل البوليمراز السلسلي المتراكم، ومن ثم تم تنسيل الشدفة الناتجة ضمن بلاسميد

prSET-sfGFP [15] والتعبير عن البروتين المدمج sfGFP-IGF-1 ضمن بكتريا *E.coli* وتفتيته باستخدام كروماتوغرافيا الألفة. خزّن البروتين المنقى بتركيز 1 ملغ/مل ضمن الغليسول بدرجة حرارة 20°C- لحين الاستخدام. رابعاً: اختبار حيوية الخلايا (XTT):

استئبنت الخلايا بتركيز 15×10^3 خلية/بئر في صفيحة زراعة 96 بئراً لمدة 24 ساعة، ومن ثم عُولجت بتراكيز مختلفة من البروتين النقي sfGFP-IGF-1 (10, 100, 1000) نانوغرام/مل لمدة 48 ساعة بوجود خلايا شاهدة. قيست حيوية الخلايا باستخدام الطاقم الخاص XTT. تم خلال الاختبار قراءة التغير اللوني في الصباغ عند طول موجة 450nm بواسطة جهاز قارئ الصفائح. بعد ذلك تم إسقاط نتائج الامتصاصية على منحنى معياري مُحضّر مسبقاً بغية تحديد العدد الخلوي التابع لكل قيمة امتصاصية بدقة. أُخذت القيمة الوسطية لمكررات الخلايا المعالجة بالبروتين النقي ومن ثم طبقت معادلة المنحنى المعياري لكل قيمة من قيم الامتصاصية ومن ثم حُسب عدد الخلايا الحية وحددت حيوية الخلايا باعتبار أن الخلايا الشاهدة تمثل نسبة 100% للحيوية الخلوية. تمثل النتائج المعروضة متوسط القراءات لخمس مكررات للتجربة.

خامساً: التصوير بمجهر التآلق fluorescence microscope بعد الصبغ بصباغ DAPI:

تم استئبنت الخلايا السرطانية بتركيز 1×10^6 خلية على صفيحة زجاجية موضوعة في طبق بتري 10cm -قبل الاستئبنت كي تلتصق عليها الخلايا- لمدة 24 ساعة ومن ثم عُولجت بالتركيز 100 نانوغرام/مل من البروتين المدمج sfGFP-IGF-1 لمدة 24 ساعة. بعدها لونت الخلايا بالصباغ DAPI (صباغ متخصص بتلوين الخلية يصدر فلورة بلون أزرق) ومن ثم صوّرت باستعمال مجهر التآلق Nikon ECLIPSE 80i. سادساً: دراسة توزع أطوار الدارة الخلوية:

استئبنت الخلايا السرطانية HepG2 بتركيز 2×10^5 خلية/مل على علب زراعة 25 سم² لمدة 24 ساعة. ثم عُولجت بالتركيز 100 نانوغرام/مل من البروتين النقي sfGFP-IGF-1 لمدة 24 ساعة بوجود خلايا شاهدة. جمعت بعدها الخلايا ودرس محتواها النووي. حيث تم تلوين النوى بالبروبيديوم أيودايد (Propidium Iodide (PI الذي يرتبط بالDNA كاشفاً المحتوى النووي للخلية، ويتم تحليل العينة باستخدام جهاز قياس التدفق الخلوي BD Flow cytometry FACS Calibur.

سابعاً: تحضير الرنا من الخلايا المزروعة وتحويله إلى الدنا المتمم

استئبنت الخلايا بتركيز 1×10^5 خلية/مل على علب زراعة 25 سم² لمدة 24 ساعة. ثم عُولجت بالتركيز 100 نانوغرام/مل من البروتين النقي sfGFP-IGF-1 لمدة 48 ساعة بوجود خلايا شاهدة. استُخلص الرنا الكلي total RNA من الخلايا باستخدام طاقم خاص (RNeasy kit) من شركة Qiagen، حيث تم تحطيم الخلايا بإجراء عملية (up- down) في الأنبوب عبر تمريرها من 5- 6 مرات في إبرة زجاجية معقمة قياس 19G، وبعد الاستخلاص تم حساب تركيز الرنا المعزول باستخدام جهاز قراءة الامتصاصية NanoVue PlusTM من شركة (GE Healthcare) حيث تتم قراءة الامتصاصية عند طول الموجة 260 نانومتر و280 نانومتر لعينات الرنا total RNA المعزول بعد معايرة الجهاز عند طول الموجة نفسه بواسطة الماء المستعمل في حل الرنا. تم التأكد من جودة العزل وأن الرنا المعزول غير مشوب بـgdDNA (الدنا الجينومي) وذلك من خلال الرحلان الكهربائي لـ1 ميكروغرام من الرنا لكل عينة على هلامه أغاروز 1% بوجود الاثيديوم برومايد. تم تحويل 3 µg من الرنا إلى دنا متمم cDNA، باستخدام الطاقم

37°C (Reverse transcription kit) من شركة Invitrogen، وأنجز التفاعل في حاضنة حرارية على الدرجة 37°C لمدة ساعتين.

ثامناً: التضخيم الكمي الآلي (qPCR) : quantitative- PCR

تم التأكد من تحويل الرنا RNA إلى الدنا المتمم cDNA وذلك بإجراء تفاعل qPCR للمورثة المرجعية *GAPDH* لكل من العينات الشاهدة والمعاملة. ثم تمت دراسة نوعية المرئسات المستخدمة في الدراسة من خلال تطبيق تفاعل qPCR لتحديد منحني الانصهار (melting curve) لكل مرئس. بعدها حُددت مستويات التغير في التعبير المورثي للمورثات (*SLC7A11*, *SLC7A5*, *VEGF*) بإجراء تفاعل qPCR وذلك باستخدام المرئسات النوعية (جدول رقم 1). تم من خلال التفاعل تحديد قيمة Ct (Cycle Threshold) لكل مورثة مدروسة في كل من الخلايا الشاهدة والمعالجة، ثم تم حساب قيمة $\Delta\Delta Ct$ لكل مورثة والتي تمكنا من حساب التغير النسبي الكمي (Relative Quantitative) RQ في التعبير عن هذه المورثات إثر المعالجة بالمركبات المطبقة على الخلايا باستخدام جهاز qPCR, StepOnePlus system من شركة Applied BioSystems اذ حدد: $RQ=2^{-\Delta\Delta Ct}$ التغير في مستويات التعبير المورثي بالمقارنة مع المورثة المرجعية.

الجدول (1): التسلسل النكليوتيدي للمرئسات التي تم استخدامها في تفاعل RT-PCR

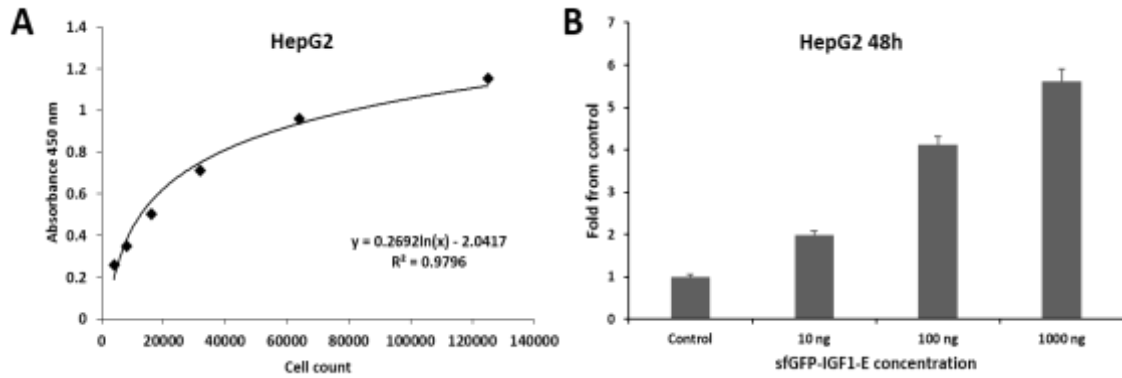
اسم المورثة	تسلسلات المرئسات (5'-3')	طول منتج PCR	درجة الانصهار Tm	Accession number
<i>SLC7A11</i>	F- TCCTGCTTTGGCTCCATGAACG	122 أساس قاعدي	79.48° مئوية	NM_014331
	R- AGAGGAGTGTGCTTGC GGACAT			
<i>SLC7A5</i>	F- GCCACAGAAAGCCTGAGCTTGA	136 أساس قاعدي	83.36° مئوية	XM_011523354
	R- ATGGTGAAGCCGATGCCACACT			
<i>VEGF</i>	F- TTGCCTTGCTGCTCTACCTCCA	126 أساس قاعدي	81.27° مئوية	Ay-047581
	R- GATGGCAGTAGCTGCGCTGATA			
<i>GAPDH</i>	F- ATGACCCCTTCATTGACC	131 أساس قاعدي	78.29° مئوية	NM_002046
	R- GAAGATGGTGAATGGGATTTC			

النتائج والمناقشة:

النتائج:

أولاً: تأثير البروتين المندمج *sfGFP-IGF-1* على نمو الخلايا HepG2:

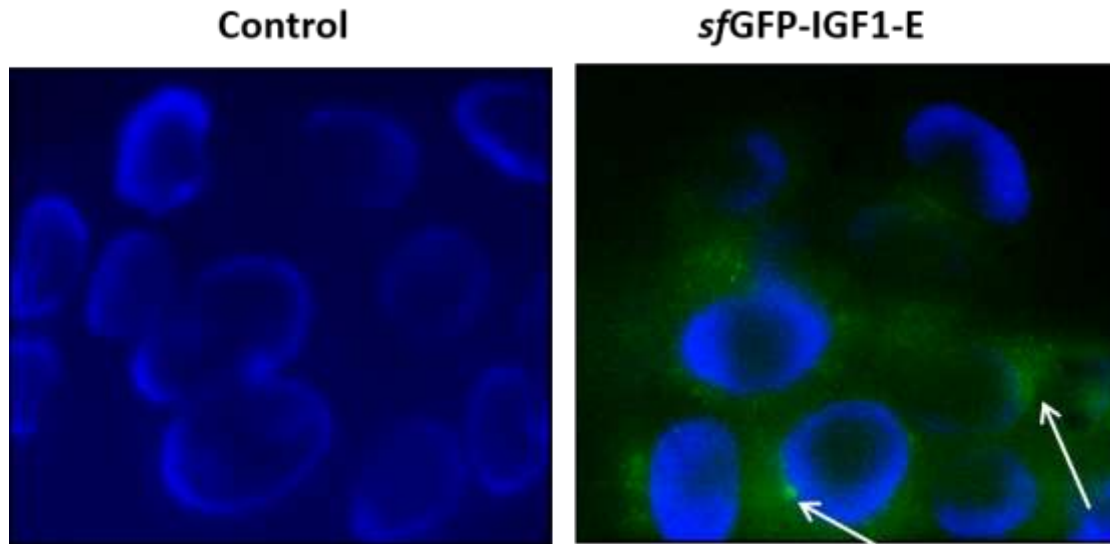
بعد استنبات الخلايا البشرية السرطانية HepG2 في صفيحة الاستنبات ومعالجتها بتركيز مختلفة من البروتين المؤشب المنقى *sfGFP-IGF-1*، تم قياس الحيوية الخلوية باستخدام صباغ XTT، وذلك بالاعتماد على المنحني المعياري للخلايا HepG2 (الشكل 1A). أظهرت الخلايا HepG2 المعالجة لمدة 48 ساعة بالبروتين النقي *sfGFP-IGF-1* ازدياداً واضحاً في عدد الخلايا المعالجة بازدياد تركيز البروتين المستخدم في المعالجة بالمقارنة مع الخلايا الشاهدة (الشكل 1B). تبين هذه المعطيات قدرة البروتين المؤشب *sfGFP-IGF-1* على تنشيط نمو الخلايا بشكل معتمد على التركيز، مما يشير إلى تأثير واضح في زيادة نمو الخلايا السرطانية إما من خلال كبح الاستموات الخلوي أو من خلال التأثير على الدارة الخلوية.



الشكل (1). اختبار حيوية الخلايا السرطانية HepG2

يظهر المخطط (A) المنحني المعياري للخط الخلوي السرطاني البشري HepG2. (B) مخطط بياني لتأثير البروتين المؤشب sfGFP-IGF-1 على حيوية الخلايا السرطانية HepG2 عند معالجتها بتركيزات مختلفة لمدة 48 ساعة. تمت معالجة الخلايا بخمسة تراكيز متدرجة (10, 100, 1000) نانوغرام/مل من البروتين المؤشب. قيست حيوية الخلايا عن طريق اختبار الحيوية الخلوية XTT. عُبر عن حيوية الخلايا بنسبة مئوية مقارنة مع الخلايا الشاهدة الحية. ثانياً: دراسة المجهر المتألق:

تمت دراسة ارتباط البروتين المؤشب المنقى sfGFP-IGF-1 بمستقبله على سطح الخلية وذلك من خلال وسم الخلايا بصباغ DAPI وتصويرها بواسطة المجهر المتألق، لوحظ باستعمال صباغ DAPI توضع البروتين sfGFP-IGF-1 الموسوم بـsfGFP (البروتين المتألق الأخضر) على سطح الخلية وذلك يدل على ارتباطه بمستقبله على سطح الخلية (الشكل 2).

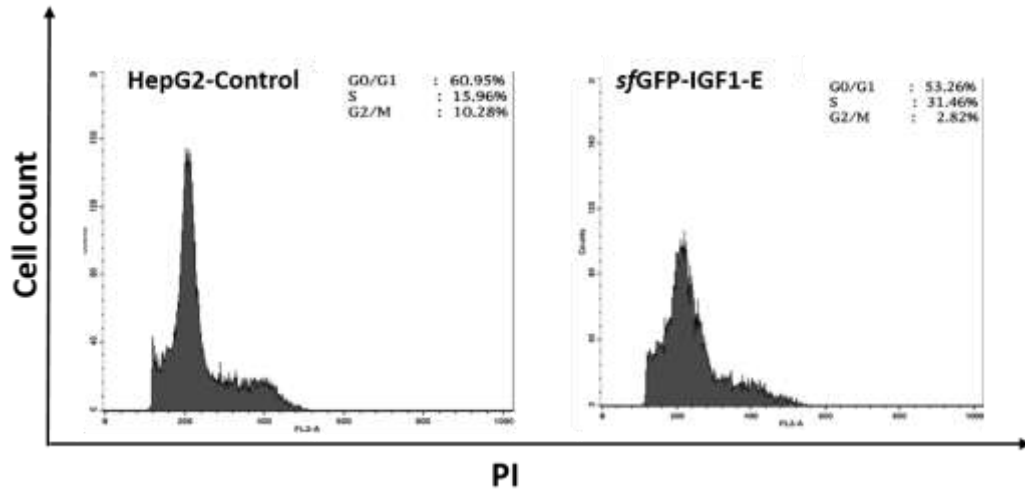


الشكل (2). صور مجهرية باستعمال المجهر المتألق

يظهر الشكل الخلايا HepG2 باستعمال المجهر المتألق والمولونة بصباغ DAPI، عولجت الخلايا بالبروتين sfGFP-IGF-1 بتركيز 100 نانوغرام/مل لمدة 24 ساعة. تشير الأسهم إلى البروتين المتألق المتوضع على سطح الخلية وهو ما يدل على ارتباطه بمستقبله على السطح مقارنة بالخلايا الشاهدة.

ثالثاً: دراسة توزع أطوار الدارة الخلوية:

تمت دراسة توزع أطوار الدارة الخلوية بوسم الخلايا HepG2 بالصبغ المتفلور (PI) الذي يرتبط بالمادة النووية للخلية ويعكس محتواها من الدنا. أظهرت نتائج معالجة الخلايا بالبروتين المؤشب المنقى *sfGFP-IGF-1* بتركيز 100 نانوغرام/مل، ازدياداً واضحاً في نسبة الخلايا في الطور S (الذي يمثل تضاعف الدنا) والذي يشير إلى انقسام الخلايا بشكل متزايد وذلك يدل على حيوية ونمو الخلايا. حيث بلغت النسبة 31% عند المعالجة مقارنة مع الخلايا الشاهدة التي بلغت 15% (الشكل 3).

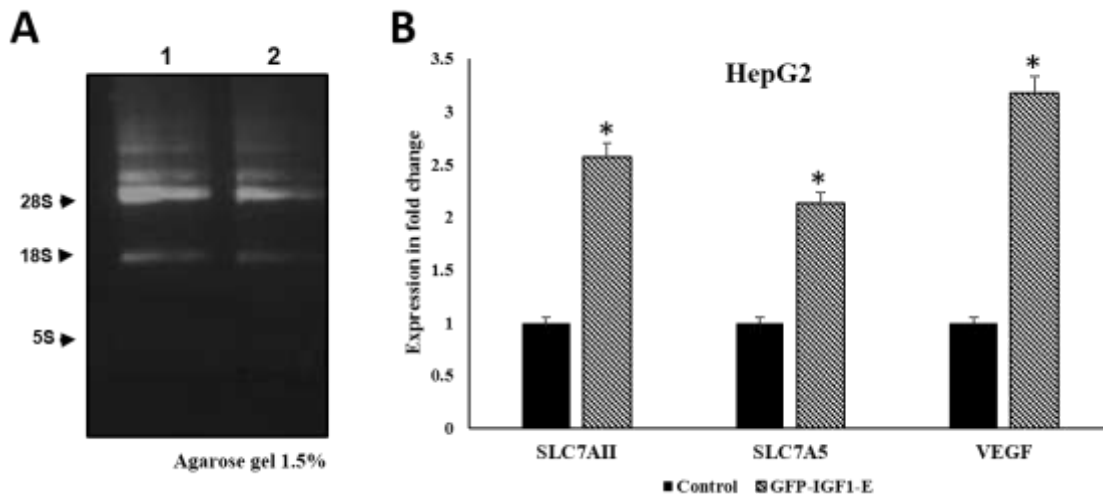


الشكل (3). دراسة توزع أطوار الدارة الخلوية

يظهر الشكل توزع أطوار الدارة الخلوية للخلايا HepG2 المعالجة بالبروتين *sfGFP-IGF-1* بتركيز 100 نانوغرام/مل مدة 24 ساعة، حيث تبين ازدياد النسبة المئوية لطور اصطناع الدنا (S) في الخلايا المعالجة مقارنة مع الخلايا الشاهدة.

رابعاً: تغيّر التعبير المورثي لبعض المورثات الهدف في الخلايا HepG2 المعالجة بالبروتين المؤشب المنقى *sfGFP-IGF-1*:

تمت معالجة الخط الخلوي السرطاني بـ *sfGFP-IGF-1* بالتركيز 100 نانوغرام/مل مدة 48 ساعة ثم جمعت الخلايا وتم عزل الرنا totalRNA وترحيله على هلامة الأغاروز 1%، حيث ظهر لدينا عصبانان تمثلان الرنا الريبوزومي، 28S, 18S (الشكل 4A)، حوّل بعدها الرنا RNA إلى دنا متمم cDNA، وبعد التأكد من جودته أُجري تفاعل qPCR للمورثة المرجعية *GAPDH*. وللتأكد من نوعية المرئسات لكل مورثة أُجري تفاعل qPCR لكل مرئس وحددت منحنيات الانصهار لكل منها حيث ظهرت ذروة واحدة لكل منحنى تؤكد نوعية المرئس للمورثة المدروسة. دُرُس بعدها التغير في النسبة الكمية لتعبير المورثات الهدف لتأكيد أثر البروتين المؤشب *sfGFP-IGF-1* في تكاثر ونمو الخلايا المعالجة. بينت النتائج أن المعالجة بالبروتين النقي *sfGFP-IGF-1* بتركيز 100ng/ml لمدة 48 ساعة تسبب زيادة في التعبير عن المورثات المدروسة (*SLC7A11*, *SLC7A5*, *VEGF*) بالمقارنة مع الخلايا الشاهدة. حيث ازداد التعبير عن المورثة *SLC7A11* بمقدار



الشكل (4). تفاعل qPCR للمورثات المدروسة مع المورثة المرجعية.

(A): مخطط بياني يبين تغير التعبير المورثي للمورثات المدروسة (*SLC7AII*, *SLC7A5*, *VEGF*) في الخلايا المعالجة بالتركيز 100 نانوغرام/مل من البروتين المؤشب *sfGFP-IGF-1* لمدة 48 ساعة. (B) هلامة اغاروز 1% لفصل نواتج عزل totalRNA من الخلايا السرطانية البشرية HepG2 المعالجة بالبروتين المؤشب *sfGFP-IGF-1* بتركيز 100 نانوغرام/مل بالمسار 2، بالمقارنة مع الخلايا الشاهدة المسار 1.

2.6 ضعف (Fold) والمورثة *SLC7A5* بمقدار 2.1 ضعف والمورثة *VEGF* بمقدار 3.1 ضعف عند المعالجة بالتركيز 10 نانوغرام/مل (الشكل 4B).

المناقشة:

يلعب نظام الإشارة لعامل النمو شبيه الانسولين IGF أدواراً صماوية Endocrine وذاتية Autocrine ومجاورة Paracrine هامة في تعزيز نمو العديد من الأعضاء والنسج. وقد أصبح أي تغير في نظام IGF مرتبط بالعديد من الاعتلالات المرضية والأورام الخبيثة، إذ أكدت الدراسات ان التركيز المرتفع من IGF1 يرتبط بزيادة خطر الإصابة بسرطان البروستات والثدي والقولون [16-18]. بالمقارنة مع العديد من الدراسات السريرية التي أكدت انخفاض تركيز IGF1 في سرطان الكبد [19].

ومن أجل مراقبة فعالية المعالجة المستهدفة وتسهيل الكشف عن الآثار الجانبية السلبية المحتملة، فمن الأهمية بمكان تحديد هوية المورثات والمؤشرات الحيوية التي يتم تحفيزها من قبل IGF1 على المدى الطويل [20]. قمنا في هذا العمل بدراسة تأثير البروتين المؤشب المنقى IGF-1-sfGFP على نمو الخط الخلوي السرطاني البشري الكبدي HepG2 بهدف إثبات الفعالية الحيوية لهذا البروتين بشكله المدمج مع البروتين المتقنور الأخضر sfGFP، المصنّع محلياً في مخابر هيئة الطاقة الذرية السورية (AI- Homs *et al*، قيد النشر). بينت النتائج أن التأثير المنشط لهذا البروتين المؤشب على نمو الخلايا ناتج عن تنشيط تكاثر الخلايا. حيث يقوم IGF1 بتنظيم تعبير غالبية المورثات المسؤولة بشكل مباشر عن الاستقلاب ونقل الأحماض الأمينية والاصطناع الحيوي للبروتينات وأسس الأحماض النووية والغلوتامين. تُعد جميع العمليات السابقة شرطاً لازماً من أجل تنظيم كل من معدلات النمو والتكاثر الخلوي، وهي من السمات الأساسية للخلايا السرطانية [20].

تم في هذه الدراسة انتقاء بعض المورثات الهدف للعامل IGF-1 من أجل تأكيد أثره في زيادة تكاثر الخلايا على المستوى الجزيئي باستخدام تقانة qPCR ومنها: مورثة VEGF التي تعد من المورثات الهدف التي يتم تنظيمها من قبل IGF1 خاصة في سرطان الكبد والقولون، وذلك يعود لتأثيراتها في تشكل وتمايز الأوعية الدموية حيث تلعب دوراً في تشكيل الأورام [21، 22]، توافقت نتائجنا مع الدراسة التي أثبتت زيادة تعبير المورثة VEGF في خلايا HepG2 بعد المعالجة بـ IGF-1 حيث يشارك التنظيم الإيجابي لها بتأثيرات IGF-1 في تعزيز مقدار خباثة الورم [22].

كما يقوم IGF-1 بتنظيم عمل مورثات نواقل الأحماض الأمينية مثل SLC7A5, SLC7A2 التي ترتبط مع البروتين المحفز SLC3A2 (والذي يقوم IGF-1 بتنظيم عمله أيضاً). حيث تُعد مورثة SLC7A5 ناقلاً للأحماض الأمينية المعتدلة الكبيرة وخاصة المتفرعة والعطرية مثل الغلوتامين والهيستيدين والايروزولوسين واللوسين والميثيونين والفينيل الانين والترتوفان والتيروزين [23-25]. كما تلعب المورثة SLC7A2 دوراً هاماً في سرطان، حيث يتم التعبير عنها في معظم الأورام والخطوط الخلوية السرطانية، وتتمثل وظيفتها في تبادل الحمض الأميني السيسئين السالب خارج الخلوي مع الغلوتامات داخل الخلوي [23، 26]. توافقت نتائجنا مع الدراسة [27] التي أكدت زيادة التعبير عن مورثات نواقل الأحماض الأمينية في معظم السرطانات ومنها سرطان الكبد تحت تأثير IGF-1.

أظهرت معطياتنا التجريبية أن البروتين المؤشب المدمج محلياً IGF-1-sfGFP يملك القدرة على زيادة نمو الخلايا السرطانية HepG2. وهنا نجد أن نتائجنا تتطابق في محتواها مع العديد من الدراسات التي تبين زيادة في نمو الخلايا بعد المعاملة بـ IGF-1 [28، 29].

وقد تم توضيح الارتباط بين البروتين المؤشب ومستقبله على سطح الخلية من خلال التصوير بالمجهر بالمتألق بالاعتماد على فلورة البروتين sfGFP المدمج مع العامل IGF-1 المحضّر. وقد دعمنا نتائج الأثر الفعال للبروتين المؤشب على الخلايا HepG2 من خلال دراسة توزع أطوار الدارة الخلوية باستخدام تقانة التدفق الخلوي Flow

cytometry التي أوضحت ازدياداً معنوياً في نسبة الخلايا في الطور S (الذي يمثل تضاعف الدنا) وهذا دليل على حيوية ونمو الخلايا.

الاستنتاجات والتوصيات

لقد أثبت البروتين المؤشب sfGFP-IGF-1 المحضّر محلياً sfGFP-IGF-1 كفاءته حيث زاد حيوية الخلايا السرطانية البشرية HepG2 من خلال زيادة التعبير عن بعض المورثات الهدف لـ IGF1. وهذه الدراسة جزء من بحث مسجل للحصول على درجة الدكتوراه حيث تم العمل في مخابر هيئة الطاقة الذرية السورية. ونوصي بما يلي:

- إجراء دراسات معمقة أكثر على خطوط خلوية أخرى.
- دراسة إمكانية تطبيقه في النظم الحيوية المعقدة لحيوانات التجربة (*in vivo*).

المراجع

1. MOSCHOS SJ, MANTZOROS CS. *The role of the IGF system in cancer: from basic to clinical studies and clinical applications*. Oncology; 63(4), 2002,317-32.
2. LE ROITH D. *The insulin-like growth factor system*. Experimental diabetes research; 4(4), 2003,205-12.
3. CLEMMONS DR. *Value of insulin-like growth factor system markers in the assessment of growth hormone status*. Endocrinology and metabolism clinics of North America; 36(1), 2007,109-29.
4. DELAFONTAINE P, SONG YH, LI Y. *Expression, regulation, and function of IGF-1, IGF-1R, and IGF-1 binding proteins in blood vessels*. Arterioscler Thromb Vasc Biol; 24(3), 2004,435-44.
5. DIGIOVANNI J, KIGUCHI K, FRIJHOFF A, WILKER E, BOL DK, BELTRAN L, et al. *Deregulated expression of insulin-like growth factor 1 in prostate epithelium leads to neoplasia in transgenic mice*. Proc Natl Acad Sci U S A; 97(7), 2000,3455-60.
6. SAMANI AA, YAKAR S, LEROITH D, BRODT P. *The role of the IGF system in cancer growth and metastasis: overview and recent insights*. Endocr Rev; 28(1), 2007,20-47.
7. CHAMBERS AF, GROOM AC, MACDONALD IC. *Dissemination and growth of cancer cells in metastatic sites*. Nat Rev Cancer; 2(8), 2002,563-72.
8. FUKUDA R, HIROTA K, FAN F, JUNG YD, ELLIS LM, SEMENZA GL. *Insulin-like growth factor 1 induces hypoxia-inducible factor 1-mediated vascular endothelial growth factor expression, which is dependent on MAP kinase and phosphatidylinositol 3-kinase signaling in colon cancer cells*. J Biol Chem; 277(41), 2002,38205-11.
9. SU WW, LEE KT, YEH YT, SOON MS, WANG CL, YU ML, et al. *Association of circulating insulin-like growth factor 1 with hepatocellular carcinoma: one cross-sectional correlation study*. J Clin Lab Anal; 24(3), 2010,195-200.
10. STUVER SO, KUPER H, TZONOU A, LAGIOU P, SPANOS E, HSIEH CC, et al. *Insulin-like growth factor 1 in hepatocellular carcinoma and metastatic liver cancer in men*. Int J Cancer; 87(1), 2000,118-21.
11. DONAGHY AJ, DELHANTY PJ, HO KK, WILLIAMS R, BAXTER RC. *Regulation of the growth hormone receptor/binding protein, insulin-like growth factor ternary complex system in human cirrhosis*. J Hepatol; 36(6), 2002,751-8.

12. JONES JI, CLEMMONS DR. *Insulin-like growth factors and their binding proteins: biological actions*. *Endocr Rev*; 16(1), 1995,3-34.
13. ADAMEK A, KASPRZAK A. *Insulin-Like Growth Factor (IGF) System in Liver Diseases*. *International journal of molecular sciences*; 19(5), 2018.
14. KASPRZAK A, ADAMEK A. *The insulin-like growth factor (IGF) signaling axis and hepatitis C virus-associated carcinogenesis (review)*. *Int J Oncol*; 41(6), 2012,1919-31.
15. AL-HOMSI L, ASSAAD JM, KWEIDER M, AL-OKLA S, ABBADY AQ. *Construction of pRSET-sfGFP Plasmid for Fusion-Protein Expression, Purification and Detection*. *Jordan Journal of Biological Sciences*; 5(4), 2012,279-88.
16. YU H, SPITZ MR, MISTRY J, GU J, HONG WK, WU X. *Plasma levels of insulin-like growth factor-I and lung cancer risk: a case-control analysis*. *J Natl Cancer Inst*; 91(2), 1999,151-6.
17. MA J, POLLAK MN, GIOVANNUCCI E, CHAN JM, TAO Y, HENNEKENS CH, et al. *Prospective study of colorectal cancer risk in men and plasma levels of insulin-like growth factor (IGF)-I and IGF-binding protein-3*. *J Natl Cancer Inst*; 91(7), 1999,620-5.
18. POLLAK M. *IGF-I physiology and breast cancer*. *Recent Results Cancer Res*; 152, 1998,63-70.
19. DE SOUZA AT, HANKINS GR, WASHINGTON MK, ORTON TC, JIRTLE RL. *M6P/IGF2R gene is mutated in human hepatocellular carcinomas with loss of heterozygosity*. *Nat Genet*; 11(4), 1995,447-9.
20. PACHER M, SEEWALD MJ, MIKULA M, OEHLER S, MOGG M, VINATZER U, et al. *Impact of constitutive IGF1/IGF2 stimulation on the transcriptional program of human breast cancer cells*. *Carcinogenesis*; 28(1), 2007,49-59.
21. WU Y, YAKAR S, ZHAO L, HENNIGHAUSEN L, LEROITH D. *Circulating insulin-like growth factor-I levels regulate colon cancer growth and metastasis*. *Cancer Res*; 62(4), 2002,1030-5.
22. CHOI SB, HAN HJ, KIM WB, SONG TJ, CHOI SY. *VEGF Overexpression Predicts Poor Survival in Hepatocellular Carcinoma*. *Open medicine*; 12, 2017,430-9.
23. VERREY F, CLOSS EI, WAGNER CA, PALACIN M, ENDOU H, KANAI Y. *CATs and HATs: the SLC7 family of amino acid transporters*. *Pflugers Archiv : European journal of physiology*; 447(5), 2004,532-42.
24. YANAGIDA O, KANAI Y, CHAIROUNGDUA A, KIM DK, SEGAWA H, NII T, et al. *Human L-type amino acid transporter 1 (LAT1): characterization of function and expression in tumor cell lines*. *Biochim Biophys Acta*; 1514(2), 2001,291-302.
25. WOLF DA, WANG S, PANZICA MA, BASSILY NH, THOMPSON NL. *Expression of a highly conserved oncofetal gene, TAI/E16, in human colon carcinoma and other primary cancers: homology to Schistosoma mansoni amino acid permease and Caenorhabditis elegans gene products*. *Cancer Res*; 56(21), 1996,5012-22.
26. VERREY F. *System L: heteromeric exchangers of large, neutral amino acids involved in directional transport*. *Pflugers Archiv : European journal of physiology*; 445(5), 2003,529-33.
27. ZHAO Y, WANG L, PAN J. *The role of L-type amino acid transporter 1 in human tumors*. *Intractable & rare diseases research*; 4(4), 2015,165-9.
28. ZHAO C, WANG Q, WANG B, SUN Q, HE Z, HONG J, et al. *IGF-1 induces the epithelial-mesenchymal transition via Stat5 in hepatocellular carcinoma*. *Oncotarget*; 8(67), 2017,111922-30.
29. LEI T, LING X. *IGF-1 promotes the growth and metastasis of hepatocellular carcinoma via the inhibition of proteasome-mediated cathepsin B degradation*. *World J Gastroenterol*; 21(35), 2015,10137-49.