

تنظیم رفتار سلول‌های MCF7 با تیمار محیط کاندیشنال سلول‌های بنیادی چربی انسانی

فاطمه متقی مریدانی^۱، M.Sc.، مریم حاجی قاسم کاشانی^{۲*}، محمد تقی قربانیان^۳ Ph.D.

- ۱- کارشناس ارشد بافت شناسی - جنین شناسی، دانشگاه دامغان، دانشکده زیست شناسی، دامغان، ایران
 ۲- دانشگاه دامغان، دانشکده زیست شناسی و پژوهشکده علوم زیستی، گروه سلولی و ملکولی، دامغان، ایران

* پست الکترونیک نویسنده مسئول: kashani@du.ac.ir

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۵/۲

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۹/۱۹

چکیده

هدف: در این مطالعه اثر ضد سرطانی CM بر سلولهای MCF7 در شرایط کشت آزمایشگاهی بررسی شد.

مواد و روش‌ها: سلول‌های بنیادی چربی از چربی ناحیه شکم خانم‌های سزارینی بیمارستان ولایت دامغان و با کسب رضایت نامه استخراج شد. CM از کشت پاساژ چهارم hASCs در مدیوم فاقد سرم پس از ۷۲ ساعت، تهیه شد. سلولهای MCF7 در معرض CM به مدت ۲۴ و ۴۸ ساعت قرار گرفتند و سپس سرعت تکثیر و میزان بقای سلول‌ها و همچنین بیان ژن‌های آپوپتوتیک با روش‌های MTT، شمارش سلولی (هموسایتومتر) و RT-PCR بررسی شد.

نتایج: سلول‌هایی که با CM به مدت ۲۴ و ۴۸ ساعت تیمار شده بودند، کاهش معنی‌داری در سرعت تکثیر و میزان بقا در مقایسه با سلول‌هایی که در محیط حاوی سرم کشت داده شده بودند (کنترل)، نشان دادند. همچنین افزایش معنی‌داری در بیان ژن کاسپاز ۳، در مقایسه با سلول‌هایی که در محیط حاوی سرم کشت داده شده بودند مشاهده شد. در حالیکه بیان ژن کاسپاز ۹ فقط پس از ۲۴ ساعت القا، افزایش معنی‌داری را نشان داد.

نتیجه‌گیری: محیط کاندیشنال از طریق فعال کردن کاسپازها، آپوپتوزیس را در سلول‌های سرطانی MCF7 القا کرده، سرعت تکثیر و بقا را نیز کاهش داد. بنابراین محیط کاندیشنال به‌عنوان مکمل می‌تواند به‌همراه دیگر روش‌های درمانی ضد سرطانی به‌کار برده شود.

واژگان کلیدی: MCF7، محیط کاندیشنال، تکثیر، کاسپاز

مقدمه

سرطان پستان شایع‌ترین و دومین سرطان در زنان است، که با متاستاز به نقاط دیگر بدن مثل کبد، مغز، ریه و استخوان منجر به مرگ می‌شود (۱-۲). تحقیقات نشان می‌دهد که طی ۲۰ سال اخیر بروز سرطان پستان ۵۰ تا ۱۰۰ درصد افزایش یافته است. هنوز علت سرطان پستان به‌طور کامل شناخته نشده اما عوامل گوناگونی مثل فاکتورهای ژنتیکی، محیطی و هورمون‌ها در ابتلا به سرطان نقش دارند (۳). همچنین چاقی با افزایش خطر سرطان پستان در ارتباط است (۴). سلول‌های MCF7 (Michigan Cancer Foundation-7) مخفف از بنیاد سرطان میشیگان ۷ است و برای اولین بار در سال ۱۹۷۰ از تومور پستان یک زن ۶۹ ساله استخراج شد (۵-۶). این سلول‌ها، در شرایط کشت آزمایشگاهی ساختار منسجمی داشته و چسبندگی بین سلولی محکمی را نشان می‌دهند (۲). این سلول‌ها دارای گیرنده‌های استروژنی و پروژسترونی هستند و از سرعت تکثیر بسیار بالایی برخوردارند. به‌طوری‌که تکثیر سلول‌ها می‌تواند از طریق تیمار با ضد استروژن‌ها مهار شود (۲، ۶). بیان گیرنده‌های استروژنی در سطح سلول‌های MCF7، باعث شده که این سلول‌ها اغلب به شیمی درمانی پاسخ دهند (۲). امروزه پس از برداشتن کل پستان، به‌منظور بازگرداندن فرم طبیعی و حفظ آناتومی ارگان از بافت چربی خود بیمار به محل جراحی پیوند زده می‌شود (۷). از آنجاکه بافت پیوند شده حاوی سلول‌های بنیادی است، مشاهده شده ریزمحیطی که این سلول‌ها در محل پیوند ایجاد می‌کنند می‌تواند بر سلول‌های سرطانی تاثیر گذاشته و مانع از بدخیم شدن آن‌ها شود (۷).

سلول‌های بنیادی چربی انسانی Adipose-derived stem cells (ASCs) اولین بار توسط Zuk و همکارانش شناسایی شدند (۸). فراوان‌ترین و در دسترس‌ترین سلول‌های ASCs، از چربی شکم و از طریق لیپوساکشن به‌دست می‌آید که بسیار آسان، امن و بی‌خطر است و

مشکلات اخلاقی و عفونتی را ایجاد نمی‌کند (۷، ۹-۱۰). مطالعات اخیر نشان داده هر گرم بافت چربی، ظرفیت تولید سلول‌های بنیادی بیشتری در مقایسه با همان میزان از مغزاستخوان یا بند ناف را دارد (۱، ۱۱). ASCها به آسانی استخراج می‌شوند و سرعت تکثیر بالایی دارند، درحالی‌که پتانسیل تمایزیشان را حفظ می‌کنند و چندتوان هستند (۱، ۱۱-۱۲) و همچنین خاصیت چسبندگی به کف ظرف کشت را دارند (۱۳). Chen و همکارانش، وجود سیتوکین‌ها در محیط کاندیشنال جمع‌آوری شده از سلول‌های بنیادی مزانشیمی در شرایط هیپوکسی را گزارش دادند. مطالعات نشان داده در محیط کاندیشنال فاکتورهای زیادی از جمله VEGF، bFGF، EGF، TGF- β ، HGF، HGF، PDGF، KGF، TNF و IL-6 وجود دارند (۱۴). این فاکتورها که میکروویکول (Microvesicles)، سکروتوم (Secretome) یا اگزوزوم (Exosome) نام دارند، در محیط کشت سلول‌های بنیادی شناسایی شده اند که به این محیط، محیط کاندیشنال (CM مخفف Conditioned Medium) می‌گویند. از آنجا که محیط کاندیشنال فاقد سلول است، از وقوع واکنش‌های ایمنی جلوگیری می‌کند و مشکل رد پیوند نیز وجود ندارد. همچنین محیط کاندیشنال دارای اثر آنتی‌اکسیدانتی و ضد توموری است (۷، ۱۵-۱۶). تعداد سلول، نوع سلول، شرایط کشت، نوع محیط کشت و تعداد پاساژها بر کیفیت محیط کاندیشنال تاثیر می‌گذارند. محیط کاندیشنال مزیت‌های زیادی دارد از جمله اینکه به‌راحتی تولید، فریز، بسته بندی شده و قابل انتقال است که به‌خاطر این ویژگی‌ها، از محیط کاندیشنال برای تولید دارو استفاده می‌شود و همچنین نیاز به حفاظت ویژه مثل آنچه که در مورد سلول‌های بنیادی باید رعایت شود، را ندارد (۱۶). از طرفی برخلاف سلول‌های بنیادی که جوش خورد نشان در محل پیوند، بسیار پایین بوده و احتمال خطر گسترش سرطان در آن‌ها بالاست، محیط کاندیشنال این مشکل‌ها را ندارد. همچنین برای

همچنین تاثیر محیط کاندیشنال بر بیان ژنهای کاسپاز ۳ و ۹ در سلول‌های MCF7 مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

کشت سلول‌های سرطانی MCF-7 سلول‌های سرطانی از انستیتو پاستور تهران خریداری شد و در محیط کشت DMEM-F12 حاوی سرم ۱۰ درصد و در انکوباتور (دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، رطوبت ۹۵ درصد و CO₂ پنج درصد) نگهداری شدند (۲۴-۲۵). زمانیکه تراکم سلول‌ها به ۸۰ درصد می‌رسید، پاساژ سلولی انجام می‌شد. زمان تقریبی دو برابر شدن جمعیت این رده از سلول‌های سرطانی حدود ۳۸ ساعت بود.

تهیه و جمع‌آوری محیط کاندیشنال سلول‌های

بنیادی چربی انسانی: سلول‌های بنیادی چربی از بافت چربی زیر جلدی شکم خانمهای سزارینی و با کسب رضایت نامه کتبی تهیه شد. محیط کاندیشنال، از پاساژ چهارم سلول‌های بنیادی چربی انسانی جدا شد. با این روش که تعداد 5×10^5 سلول در یک فلاسک کشت داده شد و پس از آن که سلول‌ها ۷۰ درصد فلاسک را پر کردند، محیط رویی خارج و دو مرتبه با PBS شستشو داده شد، سپس حدود ۱/۵ تا ۲ میلی‌لیتر محیط DMEM تازه و فاقد سرم روی سلول‌ها ریخته شد و مجدداً فلاسک‌ها به انکوباتور انتقال داده شدند. پس از گذشت ۷۲ ساعت محیط رویی سلول‌ها جمع‌آوری و به مدت ۵ دقیقه با دور ۲۰۰۰rpm سانتریفوژ شد. سپس محیط به دست آمده را با فیلتر سرنگی ۰/۲۲ میکرومتر فیلتر کرده تا عاری از هرگونه سلول مرده یا قطعات سلولی باشد و به منظور استفاده بعدی در فریزر ۷۰- درجه سانتی‌گراد ذخیره شد (۱۳).

ارزیابی زمان دو برابر شدن سلول‌ها با نشانگر

MTT سلول‌ها با تراکم 2×10^4 در هر خانه پلیت ۹۶

درمان بیماران سریعاً در دسترس بوده، بدون آنکه نیازی به جداسازی سلول‌های بنیادی از بیمار باشد. البته برای به دست آوردن محیط کاندیشنال بهتر است از محیط کشت مناسب حاوی ویتامین‌ها، آمینواسیدها، گلوکز و سرم انسانی که از خون انسان به دست می‌آید استفاده شود، که در موارد بالینی مناسب‌تر است (۱۷). تنها نقص محیط کاندیشنال طول عمر کوتاه آن است (۱۶). از کاربردهای درمانی محیط کاندیشنال می‌توان به ترمیم زخم (۱۴)، بهبود چین و چروک و پیری زودرس پوست در اثر اشعه ماوراء بنفش (۹)، آلویسی، رشد مو، بهبود اختلالات عصبی، نقص‌های دستگاه اسکلتی و ریه، بیماری‌های کلیوی، آسیب‌های مربوط به کبد، التهاب نورونی (۱۶)، سکنه‌های مغزی (۱۰) و قلبی (۱۸) اشاره نمود و همچنین به عنوان محیط مناسبی در بلوغ اووسیت (۱۹) و درمان برخی سرطان‌ها از جمله سرطان پستان اشاره نمود. تحقیقات دیگری نیز نشان داده در سرطان پانکراس، که یک بیماری بسیار تهاجمی و کشنده است، تیمار با محیط کاندیشنال از طریق مهار بقای سلول‌های سرطانی و توقف سلول‌ها در مرحله G0/G1 باعث بهبود بیماری می‌شود. همچنین محیط کاندیشنال توانست میزان بقای سلول‌های سرطان کولون و پروستات را نیز مهار کند (۲۰). تیمار با محیط کاندیشنال به طور موثر تکثیر و بقای سلول‌های سرطانی کبد را مهار کرده و باعث آپوپتوزیس می‌شود (۲۰-۲۱).

محیط کاندیشنال چربی، تکثیر سلول‌های سرطان پستان MCF7 را نسبت به محیط کاندیشنال بند ناف، با سرعت بیشتری مهار می‌کند (۲۲). گزارش دیگر مبنی بر آن است که محیط کاندیشنال مغزاستخوان، سرعت تکثیر را در سلول‌های MCF7 افزایش می‌دهد (۲۳). در رابطه با تاثیر محیط کاندیشنال سلول‌های ASC انسانی بر سلول‌های سرطانی MCF7 گزارشات ضد و نقیضی وجود دارد و هنوز مکانیسم دقیق آن مشخص نشده. لذا در این تحقیق از محیط کاندیشنال سلول‌های بنیادی چربی انسانی، به منظور کاهش سرعت تکثیر، بقا استفاده شد و

شمارش سلولی به وسیله میکروسکوپ نوری انجام شد. تریپان بلو با تخریب غشا در سلول‌های مرده نفوذ می‌کند. از این رو سلول‌های مرده به رنگ آبی و سلول‌های زنده بی‌رنگ دیده می‌شوند. سپس میزان حیات سلولی بر اساس فرمول (میانگین سلول‌های رنگ نشده $\times 10000 \times$ درجه رقت = تعداد کل سلول‌های زنده) محاسبه شد.

بررسی بیان ژن‌ها با روش RT-PCR

استخراج RNA ابتدا استخراج RNA بر اساس کیت RNAX Plus صورت گرفت. غلظت RNA به دست آمده با استفاده از جذب نوری در طول موج ۲۶۰ نانومتر با دستگاه اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری شد. هم چنین کیفیت RNA نیز با الکتروفورز ژل آگارز بررسی شد.

سنتز DNA مکمل (cDNA): این مرحله با توجه به دستورالعمل کیت ساخت cDNA نوع Fermentas-K1622 انجام شد. ابتدا یک میکروگرم RNA (معادل ۱۰ میکرولیتر) به همراه یک میکرولیتر الیگوپرایمر در میکروتیوپ ریخته و به مدت ۵ دقیقه در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. سپس با افزودن بافر واکنش، dNTP، ۵X و مهارکننده ریبونوکلاز به محلول فوق، به مدت ۵ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. با اضافه کردن آنزیم Reverse transcriptase ۶۰ دقیقه در دمای ۴۲ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد و در نهایت ۱۰ دقیقه در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت.

بررسی بیان ژن‌ها با روش PCR: واکنش PCR در حجم ۲۵ میکرولیتر انجام شد. برای اطمینان از توزیع یکسان مواد، ابتدا مخلوط مستر همه‌ی اجزا آماده شد و سپس همراه با الیگوپرایمر و cDNA به میکروتیوپ منتقل شد. PCR در دستگاه ترمال سایکلر به این صورت انجام شد: ۲ دقیقه در ۹۴ درجه، دمای ۹۴ و ۷۲ درجه

خانه و در ۲۰۰ میکرولیتر محیط کشت حاوی سرم ۱۰ درصد کشت داده شدند. زمانیکه تراکم سلولی به ۷۰ درصد رسید، سرعت تکثیر سلول‌ها در زمان‌های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت با روش MTT بررسی شد. در این روش، محیط قبلی خارج شده و به هر کدام از خانه‌ها ۱۰۰ میکرولیتر محیط کشت به همراه ۱۰ میکرولیتر محلول MTT (Sigma، ۵mg/ml) افزوده و به مدت ۴ ساعت در شرایط ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. سپس ۸۵ میکرولیتر از محیط رویی برداشته شده و ۵۰ میکرولیتر DMSO اضافه شد و به مدت ۱۰ دقیقه انکوبه شده و در نهایت میزان جذب، در طول موج ۵۴۰ نانومتر با دستگاه ELIZA reader (BioTek) اندازه‌گیری شد. گروه‌های آزمایشی مورد مطالعه در این تحقیق به قرار زیر بود:

محیط کشت: سلول‌های MCF7 که در محیط کشت اختصاصی DMEM-F12 و در غیاب سرم کشت داده شدند. محیط کشت و سرم: سلول‌های MCF7 که در محیط کشت اختصاصی و حاوی سرم ۱۰ درصد کشت داده شدند. محیط کاندیشنال: سلول‌های MCF7 که در محیط کاندیشنال سلول‌های بنیادی چربی انسانی قرار گرفته بودند. محیط کاندیشنال و سرم: سلول‌های MCF7 که در محیط کاندیشنال حاوی سرم ۱۰ درصد کشت داده شدند.

ارزیابی میزان بقا سلول‌های MCF7 با روش

هموسایتومتری: سلول‌های MCF7 تریپسینه شده و با تراکم 10^4 سلول در میلی‌لیتر در هر خانه‌ی پلیت ۹۶ خانه‌ای کشت داده شد. انکوباسیون در ۳۷ درجه سانتی‌گراد صورت گرفت، تا جایی که میزان تراکم سلولی به حدود ۸۰ درصد رسید. سوسپانسیون سلولی به نسبت مساوی با رنگ تریپان بلو مخلوط شد (ده میکرولیتر سوسپانسیون سلولی و ده میکرولیتر تریپان بلو) و

پرایمرهای مورد استفاده در این تحقیق، در جدول ۱ آورده شده است. پرایمرها به صورت لیوفلیزه از شرکت سیناژن تهیه گردید و براساس دستور ساخت شرکت سازنده تهیه شدند. به منظور آماده‌سازی پرایمرها برای استفاده در واکنش به غلظت ۱۰ پیکومولار به ترتیب زیر عمل شد:

- ۱- افزودن مقدار آب تزریقی ذکر شده در چارت پرایمرها به هر تیوپ حاوی پرایمر
- ۲- اسپین به مدت چند دقیقه تا کاملاً حل شود.
- ۳- افزودن آب تزریقی تا غلظت نهایی به ۱۰ پیکومولار برسد.

سانتی‌گراد هر کدام ۳۰ ثانیه. پس از اتمام ۳۰ سیکل، ۱۰ دقیقه در ۷۲ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. دمای Annealing بر اساس Tm پرایمرها تعیین می‌شود. (Tm پرایمر ژن‌های کاسپاز ۳ و کاسپاز ۹ به ترتیب ۶۰ و ۵۶ درجه سانتی‌گراد تعیین شد. از ژن GAPDH به عنوان ژن کنترل داخلی استفاده شد. برای مشخص شدن تکثیر قطعه مورد نظر و بیان ژن، محصول PCR به روش الکتروفورز با ژل آگارز ۱/۵ درصد بررسی شد. تمامی ژل‌های آگارز تهیه شده با استفاده از دستگاه نمایشگر ژل بررسی شدند. تصویر ژل‌های محصولات PCR با نرم افزار ImageJ بررسی شد (۲۶-۲۷).

جدول ۱: مشخصات پرایمرهای مورد استفاده برای PCR

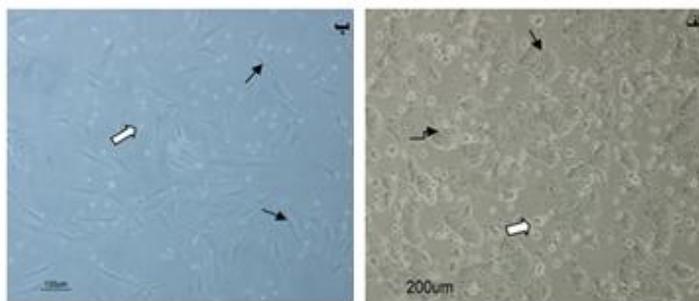
Primer	Sequence	Gene size
CAspAse3-f	5'-TTCATGCTGCAGAGGGTAC-3'	100 bp
CAspAse3-r	5'-TAATTC AATTGCAACTACCTGAC-3'	
CAspAse9-f	5'-CTGCTTAGGGTCGCTAATGC-3'	113 bp
CAspAse9-r	5'-GGGCCCTGGCCTTATGATG-3'	
GAPDH-f	5'-GCTGGGGCTCATTTGCAGG-3'	258 bp
GAPDH-r	5'-CGGAGGGGCCATCCACAGT-3'	

نتایج

مورفولوژی سلول‌ها در شرایط کشت آزمایشگاهی:

در (شکل ۱-ب) نیز پاساژ چهارم سلول‌های ASCs انسانی مشاهده می‌شود که ظاهر دوکی شکلی دارند و کاملاً به کف ظرف کشت چسبیده‌اند و سلول‌های شناور به شکل کروی می‌باشند.

سلول‌های MCF7 در محیط کشت ظاهری چندوجهی و یا تقریباً کروی داشته، به شکل کلونی‌هایی که از تراکم سلولی بالایی برخوردار می‌باشند رشد می‌کنند. سلول‌ها از سرعت تکثیر بسیار بالایی برخوردار بودند، به طوری که هسته سلول‌ها و حتی تقسیم هسته‌ها به وضوح در آن‌ها مشاهده می‌شد (شکل ۱-الف).

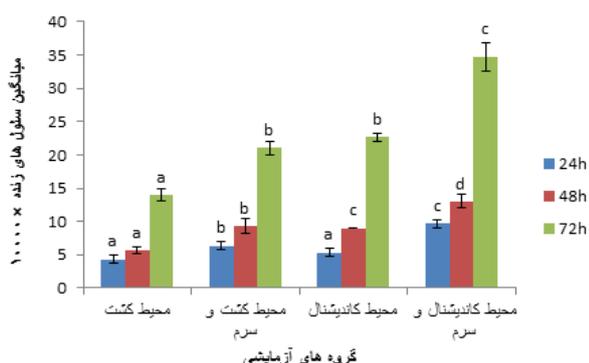


شکل ۱: بررسی سلول‌ها در شرایط کشت آزمایشگاهی با میکروسکوپ اینورت. سلول‌ها را در پاساژهای بالا نشان می‌دهد که به شکل کلونی‌هایی متشکل از سلول‌های چندوجهی و یا کروی شکل می‌باشند و به کف فلاسک کشت چسبیده اند (فلش)، سلول‌های مرده نیز به صورت شناور می‌باشند (سر فلش).

بررسی میانگین سلول‌های MCF7 زنده پس از القا با محیط کاندیشنال

در این تحقیق میانگین سلول‌های MCF7 زنده، پس از القا با محیط کاندیشنال در زمان‌های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت مورد بررسی قرار گرفت. با توجه به (نمودار ۱)، میانگین تعداد سلول‌های MCF7 زنده که به مدت ۲۴ ساعت در معرض محیط کاندیشنال قرار گرفته بودند، کاهش معنیداری را در مقایسه با سلول‌هایی که در محیط DMEM حاوی سرم ۱۰ درصد کشت داده شده بودند، نشان داد. به طوری که اختلاف معنی‌داری بین سلول‌هایی که در معرض محیط کاندیشنال بودند و سلول‌هایی که در محیط کشت فاقد سرم بودند، مشاهده نشد. تعداد

سلول‌های MCF7 زنده که در محیط کاندیشنال، مدت ۴۸ ساعت قرار گرفته بودند، کاهش معنی‌داری را نسبت به سلول‌هایی که در محیط حاوی سرم بودند نشان داد. در حالی که در این گروه تعداد سلول‌های زنده در محیط کاندیشنال نسبت به سلول‌هایی که در محیط بدون سرم کشت داده شده بودند، افزایش معنی‌داری را نشان داد. همچنین افزایش معنی‌داری در تعداد سلول‌های MCF7 زنده‌ای که در محیط کاندیشنال به مدت ۷۲ ساعت کشت داده شده بودند در مقایسه با سلول‌هایی که در محیط بدون سرم بودند مشاهده شد. همچنین در این گروه اختلاف معنی‌داری بین دو گروه CM و سلول‌های کشت شده در محیط حاوی سرم مشاهده نشد.



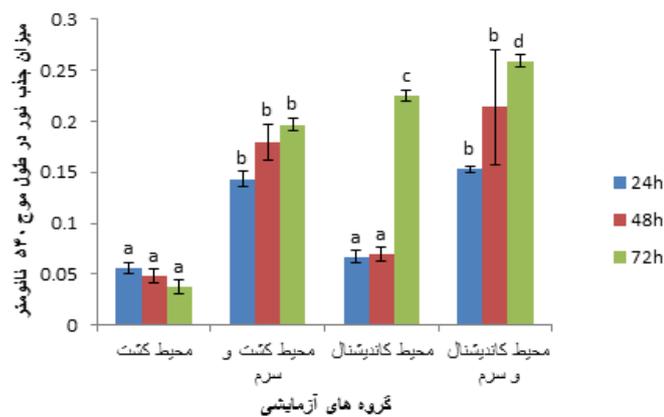
نمودار ۱: میانگین سلول‌های MCF7 زنده پس از القا با محیط کاندیشنال (حروف غیر مشابه، معنی‌دار بودن و حروف مشابه غیر معنی‌دار بودن را نشان می‌دهند).

محیط کشت: سلول‌های سرطانی که در محیط کشت بدون سرم قرار داده شدند.
 محیط کشت و سرم: سلول‌های سرطانی که در محیط کشت حاوی سرم بودند.
 محیط کاندیشنال: سلول‌های سرطانی که در محیط کاندیشنال فاقد سرم قرار گرفته بودند.
 محیط کاندیشنال و سرم: سلول‌های سرطانی که در محیط کاندیشنال حاوی سرم کشت داده شدند.

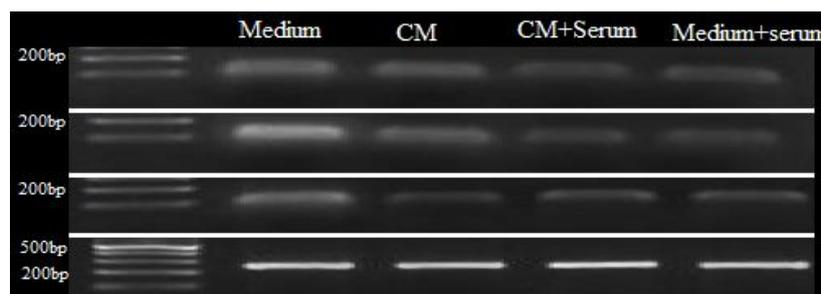
سرعت تکثیر سلول‌های MCF7 پس از القا با محیط کاندیشنال به مدت ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت

مشاهده شد که نشان‌دهنده سرعت تکثیر پایین سلول‌ها در محیط کاندیشنال است. در حالیکه، اختلاف معنی‌داری بین دو گروه مذکور و سلول‌هایی که در محیط بدون سرم کشت داده شده بودند، مشاهده نشد. از طرفی پس از ۷۲ ساعت، افزایش معنی‌داری در سلول‌هایی که در محیط کاندیشنال بودند در مقایسه با سلول‌هایی که در محیط بدون سرم و محیط حاوی سرم کشت داده شده بودند، مشاهده شد.

سرعت تکثیر سلول‌های MCF7 القاء شده با محیط کاندیشنال با روش MTT بررسی شد. همانطور که در (نمودار ۲) مشاهده می‌شود، کاهش معنی‌دار میزان OD در سلول‌های MCF7 تحت القا با محیط کاندیشنال در مقایسه با سلول‌های کشت داده شده در محیط حاوی سرم در زمان‌های ۲۴ و ۴۸ ساعت



نمودار ۲: بررسی سرعت تکثیر در MCF7 پس از القا با محیط کاندیشنال پس از ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت با روش MTT. بررسی میزان بیان ژن‌های کاسپاز ۳ و ۹ با استفاده از تکنیک PCR. بیان ژن کاسپاز ۳، پس از القا با محیط کاندیشنال در زمان‌های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت



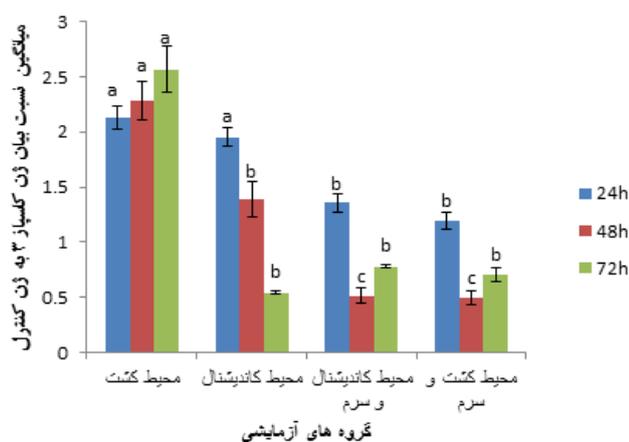
شکل ۲: تصویر ژل آگارز محصول PCR ژن کاسپاز ۳ در گروه‌های مورد مطالعه. اندازه محصول PCR ژن کاسپاز ۳، ۱۰۰ bp است. ژن GAPDH به‌عنوان رفرنس داخلی جهت نرمال کردن به کار رفت. اندازه ژن ۲۵۸ bp است.

معرض محیط کاندیشنال به مدت ۲۴ ساعت قرار گرفتند نسبت به سلول‌هایی که در محیط حاوی سرم کشت داده شده بودند مشاهده شد. در حالی که اختلاف معنی‌داری بین دو گروه محیط کشت و محیط کاندیشنال مشاهده

با آزمون آنالیز واریانس یک طرفه و تست Tukey بیان ژن کاسپاز ۳ در گروه‌های مورد مطالعه مقایسه شد. همانطور که در (نمودار ۳) مشاهده می‌شود، افزایش معنی‌دار در بیان ژن کاسپاز ۳ در سلول‌هایی که در

کاهش معنی‌داری در بیان ژن کاسپاز ۳ در سلول‌هایی که در معرض محیط کاندیشنال به مدت ۷۲ ساعت قرار گرفتند نسبت به سلول‌هایی که در محیط فاقد سرم بودند، مشاهده شد. در حالی که اختلاف معنی‌داری بین سلول‌هایی که در محیط کاندیشنال و سلول‌هایی که در محیط کشت حاوی سرم بودند، مشاهده نشد.

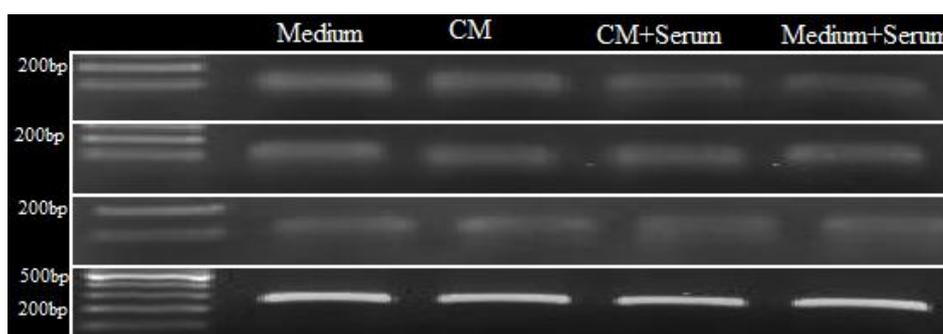
افزایش معنی‌داری در بیان ژن کاسپاز ۳ در سلول‌هایی که به مدت ۴۸ ساعت در معرض محیط کاندیشنال قرار گرفتند نسبت به سلول‌هایی که در محیط کشت حاوی سرم کشت داده شده بودند، مشاهده شد. از طرفی بیان ژن مربوطه کاهش معنی‌داری در سلول‌هایی که در معرض محیط کاندیشنال بودند نسبت به سلول‌هایی که در محیط کشت بدون سرم بودند نشان داد. همچنین



نمودار ۳: مقایسه بیان ژن کاسپاز ۳ در سلول‌های تحت القا محیط کاندیشنال پس از ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت

ژن GAPDH به عنوان رفرنس داخلی جهت نرمالایز کردن به کار رفت. اندازه ژن ۲۵۸ bp است.

بیان ژن کاسپاز ۹، پس از القاء با محیط کاندیشنال در زمان‌های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت اندازه محصول PCR ژن کاسپاز ۹، ۱۱۳ bp است.



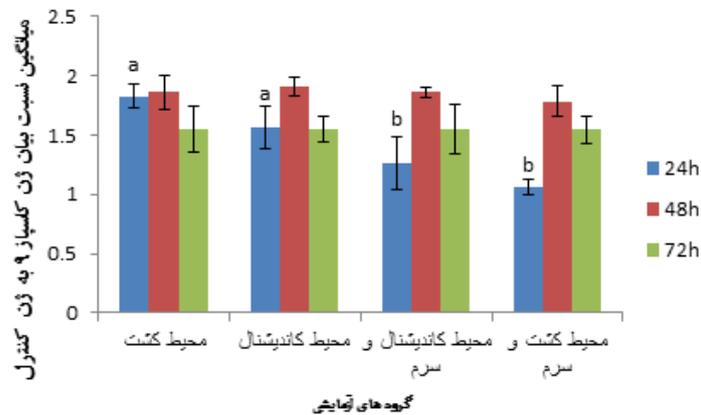
شکل ۴: تصویر ژل آگارز محصول PCR ژن کاسپاز ۹ در گروه‌های مورد مطالعه

بوندند، مشاهده شد. در حالی که اختلاف معنی‌داری در بین گروه‌های محیط کاندیشنال و محیط کشت مشاهده نشد. همانطور که در (نمودار ۴) مشاهده می‌شود، اختلاف

افزایش معنی‌داری در بیان ژن کاسپاز ۹ در سلول‌هایی که در معرض محیط کاندیشنال به مدت ۲۴ ساعت قرار گرفتند نسبت به سلول‌هایی که در محیط حاوی سرم

گرفته بودند، بین هیچکدام از گروه‌ها مشاهده نشد.

معنی‌داری در بیان ژن کاسپاز ۹ در سلول‌هایی که در معرض محیط کاندیشنال به مدت ۴۸ و ۷۲ ساعت قرار



نمودار ۴: مقایسه بیان ژن کاسپاز ۹ در سلول‌های تحت القا محیط کاندیشنال. پس از ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت

بحث

درمانی، تا حدودی علائم بالینی بیمار را بهبود می‌بخشد ولی با توجه به از بین رفتن تعداد زیادی از سلول‌ها در محل پیوند و به‌علاوه، خطر بالقوه ایجاد سرطان بعد از پیوند، توجه بسیاری از محققین به استفاده از محیط کاندیشنال (CM) معطوف شد (۱۷).

درک بهتر ویژگی‌های محیط کاندیشنال کمک مهمی به انتخاب استراتژی استفاده درمانی از این محیط می‌کند. استفاده از CM در مقایسه با سلول‌های بنیادی چندین مزیت دارد، به طوری که CM به آسانی تهیه، فریز، بسته‌بندی و حمل‌ونقل می‌شود. علاوه بر این به دلیل اینکه CM عاری از سلول است نیاز به مطابقت اهدا کننده و دریافت کننده برای جلوگیری از مشکلات رد پیوند وجود ندارد. همچنین CM محتوای سیتوکین‌ها و فاکتورهای رشد متفاوت و عوامل ترمیم بافتی متنوع است، که به‌وسیله سلول‌های بنیادی ترشح شده‌اند. در نهایت محیط کاندیشنال به‌عنوان کاندید مناسبی برای این تحقیق انتخاب شد.

اخیرا CM در مطالعات پیش بالینی به‌عنوان یک جایگزین برای درمان‌های متعدد سلولی از جمله بهبود زخم استفاده می‌شود (۱۴). به‌همین جهت، در این پژوهش

سرطان با ترکیبی از روش‌های شیمی‌درمانی، رادیوتراپی، ایمونوتراپی و جراحی درمان می‌شود. اما این درمان‌ها محدودیت‌های خودشان را دارند و نمی‌توانند به‌طور اختصاصی سلول‌های سرطانی را هدف قرار دهند و همچنان میزان مرگ و میر در بیماران مبتلا به سرطان بالا می‌باشد که خود حکایت از ناکارآمدی این راهکارهای درمانی است (۲۸).

MSC ها در ریز محیط تومور، در دو نقش سلول‌های پیش توموری و سلول‌های ضد توموری ظاهر می‌شوند. اینکه MSC ها کدام نقش را ایفا کنند بستگی به فاکتورهای بسیاری دارد از آن جمله می‌توان به انواع MSC، منبع استخراج آن‌ها، نوع رده سلول سرطانی مورد بررسی، داخل بدن یا شرایط آزمایشگاهی، فاکتورهای ترشح شده توسط MSCها، تعاملات بین MSCها، سلول‌های ایمنی میزبان و سلول‌های سرطانی اشاره نمود

(۲۸). MSC ها همچنین می‌توانند خاصیت ضد تکثیری و آپوپتوزی را در سلول‌های سرطانی القا کنند و مانع تکثیر سلول‌های سرطانی شوند (۲۹-۳۰). اگر چه سلول

حاوی سرم کشت داده شده بودند، نشان دادند. به طوری که در زمان ۲۴ و ۴۸ ساعت، محیط کاندیشنال توانسته بود میزان سلول‌های زنده را به حدی کاهش دهد که دیگر اختلاف معنی‌داری با سلول‌هایی که در معرض محیط بدون سرم کشت داده شده بودند نشان ندادند. بنابراین محیط کاندیشنال، بدون حضور سرم باعث مرگ سلول‌های سرطانی شده بود. ولی در زمان ۷۲ ساعت محیط کاندیشنال همانند محیط سرم‌دار عمل کرد و نتوانسته بود میزان سلول‌های زنده را در مقایسه با سلول‌هایی که در محیط سرم‌دار کشت داده شده بودند، کاهش دهد و همانند سرم عمل کرده بود.

بیماری گلیوم یک تومور مغزی شایع است که در حالت بسیار تهاجمی رشد کرده و به بافت مجاور نفوذ می‌کند. درمان‌های فعلی این بیماری: جراحی، پرتودرمانی و شیمی‌درمانی است اما این موارد به ندرت دارای خواص درمانی هستند (۲۲، ۳۲). در این تحقیق که توسط یانگ (yang) و همکارانش (۲۲) انجام شد، استفاده از محیط کاندیشنال باعث افزایش کاسپازهای ۳ و ۹ شده و در نتیجه باعث افزایش آپوپتوز در این سلول‌ها شده است. به طوری که تیمار با محیط کاندیشنال باعث افزایش تعداد سلول‌ها در فاز G0/G1 شد. همچنین در سرطان ریه و رکتوم نیز تیمار با محیط کاندیشنال باعث کاهش تکثیر سلول‌ها شد.

سرطان کبد اغلب در مراحل پیشرفته تشخیص داده می‌شود و بسیار تهاجمی است. کاسین و همکاران (۲۰-۲۱) نشان دادند که تیمار با محیط کاندیشنال به طور مؤثر زنده ماندن، تکثیر و تقسیم سلولی را مهار کرده و باعث القای آپوپتوزیس در سلول‌های تومور کبد شد. آپوپتوزیس فرم فعال مرگ سلولی است که نقش اساسی در تکوین و بقا از طریق از بین بردن سلول‌های آسیب آپوپتوزیس در پیشرفت تومور و درمان متمرکز شده و گزارش شد، آپوپتوز نقش مهمی در حذف سلول‌های تومور اولیه (Pre-neoplastic cells) بازی می‌کند و در

از محیط کاندیشنال مشتق از سلول‌های بنیادی چربی زیر جلدی انسانی استفاده شده است. در این مطالعه تلاش بر این بود که اثر محیط کاندیشنال بر تکثیر، بقا و مرگ و میزان بیان ژن‌های کاسپاز ۳ و ۹ در سلول‌های سرطانی MCF7 بررسی شود.

در تحقیقی که در سال ۲۰۱۵ انجام شد، برای درمان بیماری ملانوما، که یک تومور بدخیم پوستی است، از محیط کاندیشنال استفاده گردید، lee و همکاران (۱۳) مشاهده کردند که سرعت تکثیر سلول‌های رده B16 تومور ملانوم کاهش یافته و سلول‌ها در فاز G1 تقسیم سلولی متوقف شدند. همچنین حجم تومور در بیمارانی که با CM تیمار شده بودند نسبت به گروه کنترل کاهش معنی‌داری را نشان داد. همچنین yu و همکاران (۳۱) مشاهده کردند که درمان با محیط کاندیشنال در سرطان مثانه باعث افزایش آپوپتوزیس در سلول‌های سرطانی شده و مهاجرت و تکثیر سلول‌ها را نیز کاهش داد. تحقیقات دیگری نیز توسط کاسین (Cousin) و همکاران (۲۰) انجام شده بود، نشان داد، تیمار با محیط کاندیشنال در سرطان پانکراس که یک بیماری بسیار تهاجمی و کشنده است، از طریق مهار بقای سلول‌های سرطانی و افزایش تعداد سلول‌ها در مراحل G0/G1 باعث بهبود بیماری گردید. همچنین محیط کاندیشنال توانست میزان زنده ماندن سلول‌های سرطان کولون و پروستات را نیز مهار کند.

در این تحقیق سلول‌های MCF7 در معرض محیط کاندیشنال قرار گرفتند، نتایج حاصل از شمارش سلول‌های MCF7 زنده‌ای که در شرایط کشت آزمایشگاهی به مدت ۲۴ و ۴۸ ساعت در معرض محیط کاندیشنال قرار گرفته بودند، کاهش معنی‌داری را در مقایسه با سلول‌هایی که در محیط کشت DMEM-F12 دیده و یا ناخواسته دارد (۳۳). آپوپتوزیس با فعالیت کاسپازهای آغازگر شروع می‌شود و متعاقباً کاسپازهای اجرایی را فعال می‌کنند (۳۴). اخیراً توجه به اهمیت

- or adipose tissue. *Stem cells*. 2006; 24(5): 1294-301.
2. Holliday DL, Speirs V. Choosing the right cell line for breast cancer research *Breast Cancer Res*. 2011; 13(4): 215.
3. Brédart A, Kop JL, De Pauw A, Caron O, et al. Effect on perceived control and psychological distress of genetic knowledge in women with breast cancer receiving a BRCA1/2 test result. *Breast*. 2017 ;31(2):121-127.
4. Kolahdoozan S, Sadjadi A, Radmard AR, Khademi H. Five common cancers in Iran. *Arch Iran Med*. . 2010 ; 13(2): 143-6.
5. Ghasemi F, Rostami S, Nabavinia MS, Meshkat Z, et al. Developing Michigan Cancer Foundation 7 Cells with Stable Expression of E7 Gene of Human Papillomavirus Type 16. *Iranian Journal of Pathology*, 2016; 11(1):41-6.
6. Lee AV, Oesterreich S, Davidson NE. MCF-7 Cells—Changing the Course of Breast Cancer Research and Care for 45 Years. *Journal of the National Cancer Institute*. 2015; 107(7): 1-4.
7. Schweizer R, Tsuji W, Gorantla VS, Marra KG, et al. The Role of Adipose-Derived Stem Cells in Breast Cancer Progression and Metastasis. *Stem cells international*. 2015; 2015(3): 17-41.
8. Liu G, Chen X. Isolating, Characterizing Adipose-Derived Stem Cells. *Methods Mol Biol*. 2018;1842:193-201.
9. Kim WS, Park BS, Sung JH. Protective role of adipose-derived stem cells and their soluble factors in photoaging. *Arch Dermatol Res*. 2009; 301(5):329-36.

نتیجه از پیشرفت بیماری جلوگیری می‌کند (۲۵).
تحقیقاتی که توسط یانگ و همکاران (۲۲) انجام شد در سرطان پستان مشاهده شده که تیمار با محیط کاندیشنال باعث کاهش تکثیر سلول‌های سرطانی MCF7 می‌شود. محیط کاندیشنال حاوی فاکتورهایی است که منجر به افزایش حساسیت شیمیایی سلول‌های سرطان پستان نسبت به داروهای شیمیایی می‌شود. همچنین اینترفرون موجود در محیط کاندیشنال یک سیتوکین چند منظوره است که فعالیت ضد توموری دارد و رشد تومور را مهار و آپوپتوز را القا کرده و باعث می‌گردد سلول‌ها در فاز G0/G1 باقی بمانند (۳۵).
نتایج به دست آمده در این تحقیق نیز نشان داد که، کاهش تعداد سلول‌های سرطانی پس از القا با محیط کاندیشنال به مدت ۲۴ و ۴۸ ساعت احتمال دارد در اثر بیان ژن‌های کاسپاز ۳ و ۹ بوده باشد.

نتیجه گیری

سرعت تکثیر و میزان بقای سلول‌های سرطانی MCF7 پس از القاء با محیط کاندیشنال سلول‌های بنیادی چربی انسانی به مدت ۲۴ و ۴۸ ساعت کاهش یافت. همچنین آپوپتوزیس با بیان ژن‌های کاسپاز ۳ و ۹ در سلول‌های سرطانی القا شده، تحریک شد.

تشکر و قدردانی

این مقاله حاصل بخشی از پایان نامه خانم فاطمه متقی مریدانی، کارشناس ارشد بافت شناسی جنین شناسی از دانشگاه دامغان بود. بدین وسیله از دانشکده زیست شناسی و پژوهشکده علوم زیستی دانشگاه دامغان به خاطر پرداخت هزینه مواد، وسایل و در اختیار گذاشتن امکانات آزمایشگاهی تشکر و قدردانی می‌شود.

منابع

1. Kern S, Eichler H, Stoeve j, Kluter h, et al. Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood,

10. Egashira Y, Sugitani, Suzuki Y, Mishiro K, et al. The conditioned medium of murine and human adipose-derived stem cells exerts neuroprotective effects against experimental stroke model. *Brain research*. 2012; 21(1461): 87-95 .
11. Nakao N, Nakayama T, Yahata T, Muguruma Y, et al. Adipose tissue-derived mesenchymal stem cells facilitate hematopoiesis in vitro and in vivo: advantages over bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Am J Pathol*. 2010;177(2):547-554.
12. Bunnell BA, Flaata M, Gagliardi CH, Patel B, et al. Adipose-derived stem cells: isolation, expansion and differentiation. *Methods*. 2008; 45(2):115-20.
13. Lee JH, Park CH, Chun KH, Hong SS. Effect of adipose-derived stem cell-conditioned medium on the proliferation and migration of B16 melanoma cells. *Oncol Lett*. 2015; 10(2): 730-736.
14. Chen L, Xu Y, Zhao J, Zhang Z, et al. Conditioned medium from hypoxic bone marrow-derived mesenchymal stem cells enhances wound healing in mice. *PLoS One*. 2014;9(4):1-3.
15. Fontanilla CV, Gu H, Liu Q, Zhu TZ, et al. Adipose-derived Stem Cell Conditioned Media Extends Survival time of a mouse model of Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Sci Rep*. 2015;(5): 1-10.
16. Pawitan J. Prospect of Stem Cell Conditioned Medium in Regenerative Medicine. *Biomed Res Int*. 2014; 2014(2): 1-14.
17. Bhang SH, Lee S, Shin JY, Lee TJ, et al. Efficacious and clinically relevant conditioned medium of human adipose-derived stem cells for therapeutic angiogenesis. *Mol Ther*. 2014; 22(4): 862-72.
18. Timmers L, Lim SK, Hoefler IE, Arslan F, et al. Human mesenchymal stem cell-conditioned medium improves cardiac function following myocardial infarction. *Stem cell research*. 2011; 6(3):206-14.
19. Ghiasi M, Fazaely H, Asaie E, Sheykhasan M. In Vitro Maturation of Human Oocytes using Conditioned Medium of Mesenchymal Stem Cells and Formation of Embryo by Use of ICSI. *In Vitro*. 2014; 41(11):978-85.
20. Cousin B, Ravet E, Poglio S, De Toni F, et al. Adult stromal cells derived from human adipose tissue provoke pancreatic cancer cell death both in vitro and in vivo. *PloS one*. 2009; 4(7): 1-10.
21. Zhao W, Ren G, Zhang L, Zhang Zh, et al. Efficacy of mesenchymal stem cells derived from human adipose tissue in inhibition of hepatocellular carcinoma cells in vitro. *Cancer Biother Radiopharm*. 2012; 27(9):606-13.
22. Yang C, Lei D, Ouyang W, Ren J, et al. Conditioned media from human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells and umbilical cord-derived mesenchymal stem cells efficiently induced the apoptosis and differentiation in human glioma cell lines in vitro. *Biomed Res Int*. 2014;2014: 1-13.
23. Zhang C, Zhai W, Xie Y, Chen Q, et al. Mesenchymal stem cells derived from breast cancer tissue promote the proliferation and migration of the MCF- 7 cell line in vitro. *Oncol Lett*. 2013;6(6):1577-1582.
24. Al-Fatlawi, AA, Rizvi MMA , and Ahmad A. Anticarcinogenic activity of rice bran phytic acid against human breast cancer cell line (MCF-7). *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*. 2014; 7: 151-155.
25. Hashemi M, Karami-Tehrani F, and Ghavami S. Cytotoxicity effect of Cladribine

- on the MCF-7 human breast cancer cell line. Iran Biomed J. 2004; 8(4): 7-12.
26. Santos CFd, Sakai VT, Machado MAAM, Schippers DN, et al. Reverse transcription and polymerase chain reaction principles and applications in dentistry. J Appl Oral Sci. 2004;12(1):1-11.
27. Freeman WM, Walker SJ, and Vrana KE. Quantitative RT-PCR: pitfalls and potential. Biotechniques. 1999; 26(1):112-22.
28. Romeiro MF, de Souza WM, Tolardo AL, Vieira LC, et al. A real-time RT-PCR for rapid detection and quantification of mosquito-borne alphaviruses. Arch Virol. 2016;161(11):3171-7.
29. Ramdasi S, Sarang S, Viswanathan C. Potential of Mesenchymal Stem Cell based application in Cancer. Int J Hematol Oncol Stem Cell Res. 2015; 9(2):95-103.
30. Glavaski-Joksimovic A, Bohn MC. Mesenchymal stem cells and neuroregeneration in Parkinson's disease. Exp Neurol. 2013; 247(3): 25-38.
31. Lee J. Mesenchymal Stem Cell Therapy for Bone Regeneration. Clin Orthop Surg. 2018; 10(3):271-278.
32. Yu X, Su B, Ge P, Wang Z, et al. Human Adipose Derived Stem Cells Induced Cell Apoptosis and S Phase Arrest in Bladder Tumor. Stem Cells Int. 2015;2015:1-12.
33. Sai K, Yang QY, Shen D, Chen ZP. Chemotherapy for gliomas in mainland China: an overview. Oncol lett, 2013; 5(5):1448-52.
34. Ren W, Qiao Zh, Wang H, Zhu L, et al. Flavonoids: promising anticancer agents. Med Res Rev. 2003; 23(4):519-34.
35. Sylvester PW, and Shah S. Antioxidants in dietary oils: their potential role in breast cancer prevention. Malay J Nutr. 2002; 8(1):1-11.
36. Ryu H, Oh JE, Rhee KJ, Baik SK, et al. Adipose tissue-derived mesenchymal stem cells cultured at high density express IFN- β and suppress the growth of MCF-7 human breast cancer cells. Cancer letters. 2014; 352(2): 220-7.

Modulation of MCF7 behavior treated by human adipose stem cells conditioned medium

Motaghi Moridani F, M.Sc.¹, Haji Ghasem Kashani M, Ph.D.^{1*}, Ghorbanian MT, Ph.D.¹

1. School of Biology, Damghan University, Damghan, Iran
2. Institute of Biological Sciences, Damghan University, Damghan, Iran

* Email corresponding author: kashani@du.ac.ir

Received: 10 Dec. 2017

Accepted: 24 Jul. 2018

Abstract

Aim: In the present study, the anticancer function of CM on MCF7 cells was investigated in vitro.

Material and Methods: Adipose stem cells were extracted from cesarean women abdominal fat with their written informed consent at the Velayat hospital in Damghan. CM was prepared from fourth passage of hASCs cultured in serum-free medium for 72h. MCF7 cells were exposed to CM for 24 and 48 hours. Then cell proliferation rate, survival and apoptotic genes expression were determined using MTT, cell counting (hemocytometer) and RT-PCR.

Results: CM-treated MCF7 for 24 and 48h, showed significant decreased of cell proliferation and viability as compared to the cells cultured in medium containing serum (control). In addition, caspase3 gene expression of CM-induced cells was increased significantly at 24 and 48h as compared to the control group. While CM-treated cells showed a significant increase of caspase9 gene expression after 48h induction. It was concluded that CM induced apoptosis by activation of caspases and reduced proliferation rate and survival of MCF7 cancer cells.

Conclusion: Then conditioned medium is good candidate to be combined with other anti-cancer therapies.

Key words: MCF7, Conditioned medium, Proliferation, Caspase