

بررسی اثر داروی تاموکسیفن بر روی بیان ژن *CTNNBIP1* در سلول‌های بنیادی سرطانی مشتق شده از رده‌ی سلولی MKN-45

بهاره قدرتی *M.Sc.*، حسن اکرمی *Ph.D.**

- دانشگاه رازی، دانشکده علوم، گروه زیست‌شناسی، کرمانشاه، ایران

* پست الکترونیک نویسنده مسئول: h.akrami@razi.ac.ir

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۳/۲۶

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۱۰/۱۶

چکیده

هدف: هدف از این تحقیق بررسی اثر غلظت‌های مختلفی از داروی تاموکسیفن بر روی بیان ژن *CTNNBIP1* در سلول‌های بنیادی سرطانی مشتق شده از رده‌ی سلولی MKN-45 مربوط به سرطان معده به‌عنوان یک پتانسیل درمانی است.

مواد و روش‌ها: در این تحقیق بقای سلول را با استفاده از تست تریپان بلو ارزیابی شد. پس از به‌دست آوردن IC_{50} سلول‌های بنیادی سرطانی مورد نظر را با غلظت مشخص دارو طی ۴۸ ساعت تیمار دادیم. با توجه به این اطلاعات به بررسی اثر غلظت‌های مختلفی از داروی تاموکسیفن بر روی بیان ژن *CTNNBIP1* در سلول‌های بنیادی سرطانی مشتق شده از رده‌ی سلولی MKN-45 مربوط به سرطان معده به‌عنوان یک پتانسیل درمانی پرداخته شد.

نتایج: آنالیز داده‌های Real-time RT-PCR نشان داد که غلظت ۱۰۰ میکرومولار از داروی تاموکسیفن طی تیمار ۴۸ ساعته می‌تواند بیان ژن *CTNNBIP1* را افزایش دهد.

نتیجه‌گیری: با توجه به نتایج به‌دست آمده می‌توان نتیجه گرفت که داروی تاموکسیفن از طریق افزایش بیان ژن *CTNNBIP1* بر روی مسیر سیگنالی Wnt و پروتئین بتا کاتنین اثر مهار دارد.

واژگان کلیدی: سرطان معده، سلول‌های بنیادی سرطانی، تاموکسیفن، مسیر سیگنالی wnt/β -catenin، ژن *CTNNBIP1*

مقدمه

سرطان معده (gastic cancer) یکی از عوامل اصلی تهدید سلامت در سراسر جهان است. این سرطان دومین علت مرگ و میر ناشی از سرطان پس از سرطان ریه می‌باشد (۱).

تشخیص این بیماری دیرهنگام است، زیرا مراحل اولیه‌ی بیماری از نظر بالینی خاموش می‌باشد. بالاترین میزان بروز در آسیای شرقی (کره، مغولستان، ژاپن و چین) با نرخ بروز سالانه بین ۴۰ تا ۶۰ در هر ۱۰۰، ۱۰۰۰ از ساکنان می‌باشد (۲). در ایران برخلاف کشورهای غربی و ژاپن میزان بروز سرطان معده در طی دو دهه گذشته رو به افزایش بوده است (۳). تحقیقات رایج نشان می‌دهد که عفونت هلیکوباکتر پیلوری، مصرف زیاد نمک و مصرف سیگار، فاکتورهای محیطی اصلی برای شیوع سرطان معده در ایران هستند (۴). علاوه بر این می‌دانیم که تومورها از لحاظ سلولی و مولکولی ناهمگن هستند و شامل زیر مجموعه‌ی سلول‌های سرطانی تمایز نیافته با ویژگی‌های مشابه سلول‌های بنیادی هستند. گذار اپی‌تلیال به مزانشیم (EMT) برنامه‌ای تعریف شده است که برای مورفوژنز بافت در طول تکامل جنین نیاز است. تنظیمات این فرآیند طی پیشرفت تومور به هم می‌ریزد و القای آن منجر به کسب ویژگی‌های تهاجم و متاستاز می‌شود (۵). مطالعات مشخص کرده‌اند که سلول‌های بنیادی سرطانی (cancer stem cell) طی این فرآیند از سلول‌های غیر بنیادی طبیعی و یا سرطانی به وجود می‌آیند و ویژگی‌هایی مشابه سلول‌های بنیادی را دارند (۶). این سلول‌ها در گسترش و پیشرفت تومور و همچنین تهاجم و متاستاز آن از طریق ایجاد مقاومت دارویی دخالت دارند (۷).

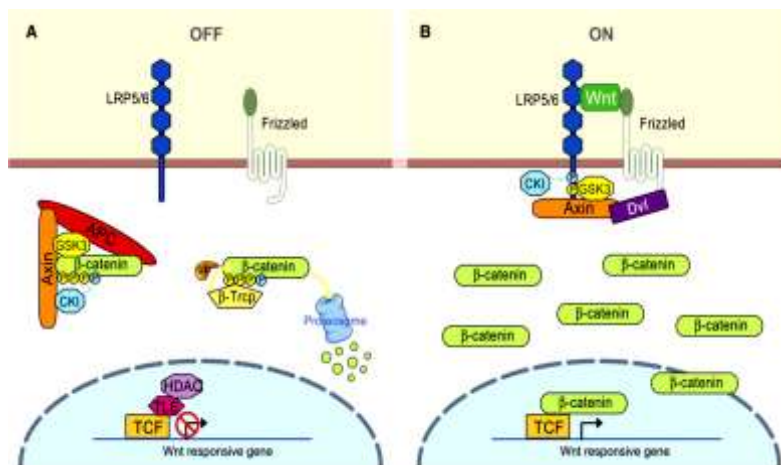
نخستین شواهد مربوط به حضور سلول‌های بنیادی سرطانی و نقش آن‌ها در بروز سرطان در سال ۱۹۹۴ طی مطالعه‌ای بر روی لوسمی حاد میلوئید انسانی به دست آمد. طی این مطالعه lapidot و همکاران (۸) موفق به شناسایی و جداسازی جمعیتی از سلول‌های AML با

نشانه‌های سطحی CD34+/CD38 از یک فرد مبتلا به لوسمی شدند. این نشانه‌های سطحی در شناسایی سلول‌های بنیادی سرطانی حائز اهمیت هستند. توانایی خودنوزایی و تمایز سلول‌های بنیادی سرطانی تحت تاثیر عوامل مختلفی از جمله مسیر سیگنالی Wnt می‌باشد (۹). این مسیر همچنین نقش مهمی در تکوین بافت‌ها طی دوران جنینی و پس از تولد و همچنین هموستازی بافت ایفا می‌کند (۱۰). مسیر سیگنالی توسط خانواده Wnt از طریق گلیکولیپوپروتئین‌های ترشح شده یکی از مکانیسم‌های اساسی می‌باشد که سلول را به سمت تکثیر سلولی، قطبیت و تعیین سرنوشت سلول در طول رشد جنین و هموستازی بافت هدایت می‌کند. در نتیجه، جهش در مسیر Wnt اغلب بانقص مادرزادی، سرطان و سایر بیماری‌های انسانی در ارتباط است. این مسیر سیگنالی حاوی پروتئین‌هایی است که باعث انتقال سیگنال و پیام از طریق گیرنده‌های سلولی به سلول می‌شوند. مسیر Wnt استاندارد، مسیر قطبش سلولی مسطح غیرکانونی و مسیر Wnt/کلسیم غیر استاندارد است (۱۱-۱۳).

درغیاب پروتئین Wnt، پروتئین سیتوپلاسمی بتاکاتین به‌طور مداوم توسط کمپلکس Axin تخریب می‌شود. کمپلکس Axin از داربست پروتئین Axin، محصول ژن سرکوب کننده‌ی تومور آدنوماتوز پولیپوسیز کلاسی (APC)، کارژین کیناز یک آلفا (CK1α) و گلیکوژن سنتاز کیناز ۳ (GSK3) تشکیل شده است. CK1α و GSK3 به ترتیب منطقه‌ی انتهایی آمینی بتا کاتین را فسفریله می‌کنند. در نتیجه، بتاکاتین توسط b-Trcp و واحد E3 یوبیکوئیتینین لیگاز شناخته شده و پس از آن بتا کاتین یوبیکوئیتینه شده و توسط پروتئازوم تجزیه می‌شود. این حذف مداوم بتا کاتین، از رسیدن بتا کاتین به هسته جلوگیری می‌کند و در نتیجه ژن‌های هدف Wnt توسط پروتئین‌های خانواده‌ی فاکتور سلول T متصل شونده به DNA/فاکتور تقویت کننده لنفوبید (TCF/LEF)

و فعال‌سازی و وارد شدن کمپلکس Axin به‌گیرنده می‌شود. این وقایع منجر به مهار فسفوریلاسیون- β catenin به‌وسیله Axin می‌شود و به‌این ترتیب باعث تثبیت β -catenin شده که در نتیجه تجمع و سفر آن به هسته برای تشکیل کمپلکس با TCF/LEF و فعال شدن ژن‌های هدف Wnt، بیان ژن هدف اتفاق می‌افتد (شکل ۱- B) (۱۴).

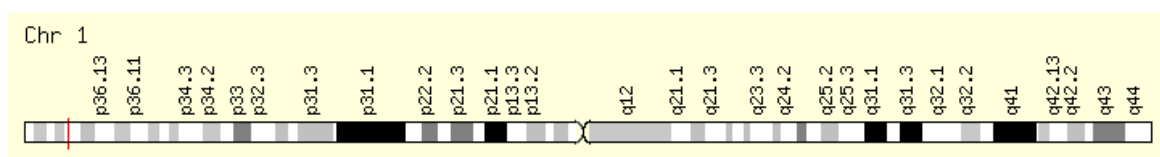
سرکوب می‌شوند. مسیر Wnt/b-catenin زمانی فعال می‌شود که لیگاند Wnt به‌گیرنده‌ی ۷ بارگذرنده از غشای Frizzled (Fz, Fzd) متصل شود و کمک‌گیرنده‌ی آن، گیرنده لیپوپروتئین با چگالی کم مرتبط با پروتئین ۶ (LRP6)، یا نزدیک LRP5 است. شکل‌گیری کمپلکس Wnt-Fz-LRP6، همراه با آمدن پروتئین داربست Dishevelled (Dvl)، منجر به فسفوریلاسیون LRP6



شکل ۱: دید کلی از مسیر سیگنالی Wnt/b-Catenin

افزایش فعالیت بتا-کاتنین در بسیاری از تومورهای انسانی از جمله کارسینوم هیپاتوسلولار (کبد)، سرطان پستان، سرطان روده بزرگ، سرطان ریه، سرطان تخمدان و سرطان مخاط رحم گزارش شده است (۱۶). پروتئین برهم‌کنش دهنده با بتاکاتنینیک (*CTNNB1*) یک پروتئین برهم‌کنش کننده با بتا کاتنین است که توسط ژن مربوطه‌ی خود کد می‌شود و به‌طور منفی مسیر سیگنالینگ Wnt/ β -catenin را کنترل می‌کند. این پروتئین فعالیت خود را با مهار تعامل بین پروتئین β -catenin و اعضای خانواده TCF انجام می‌دهد. در واقع این پروتئین نقش مهارکننده‌ی بتاکاتنین را ایفا می‌کند (شکل ۲) (۱۷).

از زمان کشف اولیه، مسیر سیگنالی Wnt با سرطان ارتباط داشته است. هنگامی که Wnt1 کشف شد، ابتدا به‌عنوان یک پروتئین کوژن در مدل موشی برای سرطان پستان شناخته شد. این واقعیت که Wnt1 همولوگ Wg می‌باشد، نشان می‌دهد که در توسعه و تکامل جنین دخالت دارد و اغلب باعث تقسیم سلولی و مهاجر تسریع می‌شود. غلبه بر این فرایندها می‌تواند منجر به رشد تومور از طریق تکثیر سلولی شود (۱۵). بتا-کاتنین (β -catenin) نام یک پروتئین است که در انسان توسط ژن *CTNNB1* کد می‌شود. بتا-کاتنین پروتئین چند کاره‌ای است که علاوه بر شرکت در اتصالات سلولی یکی از اجزا مسیر انتقال پیام Wnt است. غلظت سیتوپلاسمی این پروتئین در سلول‌های نرمال کاملاً تحت کنترل می‌باشد.



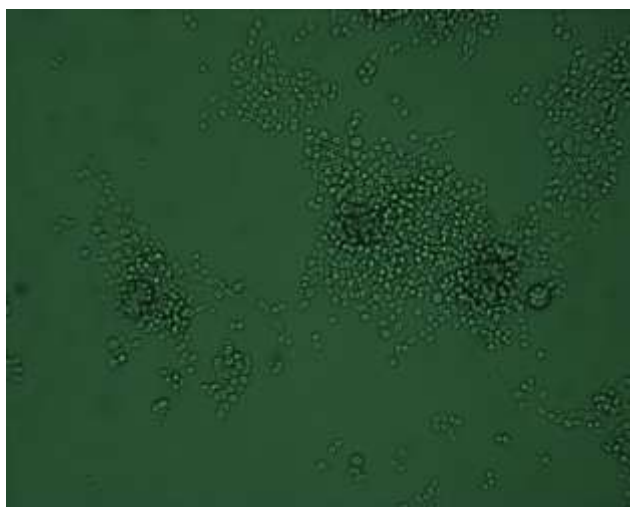
شکل ۲: موقعیت ژنومی ژن *CTNNB1*

سلول‌های بنیادی سرطانی از رده‌ی سلولی MKN-45 مربوط به سرطان معده و سپس بررسی اثر داروی تاموکسیفن بر روی بیان ژن *CTNNB1* انجام شده است.

مواد و روش‌ها

کشت سلول: برای این مطالعه، رده‌ی سلول‌های سرطان معده MKN-45 از انستیتو پاستور تهران خریداری شد. برای کشت این رده‌ی سلولی از محیط کشت DMEM/F12 حاوی ۱۰ درصد سرم جنین گاوی، یک درصد استرپتومایسین سولفات (سیگما، USA) و یک درصد پنی‌سیلین (سیگما، USA) و همچنین یک درصد ال‌گلوتامین (سیگما، USA) استفاده شد (شکل ۳).

تاموکسیفن، اولین داروی آنتی استروژنی است که برای درمان سرطان پستان وابسته به هورمون به کار رفته است (۱۸). تاموکسیفن یک داروی غیراستروئیدی از خانواده‌ی میانجی‌گرهای گیرنده‌ی استروژن انتخابی (SERM) است. این دارو هر دو خواص آگونیستی و آنتاگونیستی ER را در سلول‌ها و بافت‌های مختلف دارد و تولید استروژن را کاهش می‌دهد. این دارو از اتصال استروژن به گیرنده‌اش جلوگیری کرده و در نتیجه، تاموکسیفن مانع از بیان ژن‌های تنظیم‌کننده‌ی استروژن از جمله فاکتورهای رشد و عوامل ایجادکننده‌ی رگ‌زایی ترشح شده توسط تومور می‌شود، در نتیجه رشد و تکثیر سلول‌های سرطانی پستانی مهار می‌شود (۱۹). یافتن ژن‌هایی که به طور متمایز در شرایط و تحت تاثیر داروهای مختلف بیان می‌شوند بخش جدایی‌ناپذیر از درک مبانی مولکولی سرطان است (۲۰). این مطالعه با هدف جداسازی

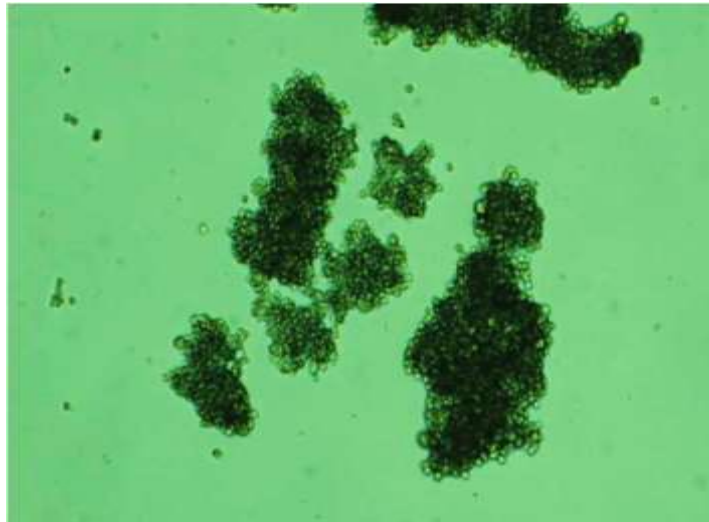


شکل ۳: مورفولوژی رده‌ی سلولی MKN-45 (این سلول‌ها اپیتلیالی هستند و از نوع سلول‌های چسبنده می‌باشند، از لحاظ ظاهری به صورت دوکی شکل هستند و از آدنوکارسینومای معده گرفته شده‌اند، بزرگنمایی 40x).

استریل پوشیده شده بود و در شرایط غیرچسبنده و سه‌بعدی کشت داده شد. برای نگهداری از سلول‌ها محیط

کشت DMEM/F12 حاوی ۱۰ درصد FBS (USA, Gibco) استفاده شد. تا زمانی که اجسام کروی تشکیل شدند، سه مرتبه در هفته، هر بار یک میلی‌لیتر محیط کشت کامل به سلول‌ها اضافه شد (شکل ۴).

جداسازی سلول‌های بنیادی سرطانی از رده سلولی MKN-45 از رده سلولی MKN-45 تعداد ۳×۱۰^۴ سلول در فلاسک T25 که قبلاً کف آن با لایه‌ی نازکی از آگارز یک درصد (Fermentas, Canada)



شکل ۴: کلنی سلول‌های بنیادی سرطانی مشتق شده از رده‌ی سلولی MKN-45. پس کشت سلول‌های رده‌ی سلولی MKN-45 در شرایط غیرچسبنده در روزهای اول مقدار آپوپتوز بیشتر بود، بعد از مدتی سلول‌ها شروع به تکثیر کردند و کلنی تشکیل دادند. این کلنی‌ها کم‌کم به هم پیوستند. پس از گذشت ۱۴ روز این سلول‌ها که سلول‌های سرطانی بنیادی محسوب می‌شدند به‌منظور مطالعات بیشتر جداسازی شدند (بزرگنمایی 40X).

کشت داده شد. ۵ میلی‌لیتر محیط کشت همراه با ۱۰ درصد سرم به سلول‌ها اضافه شد. در مرحله بعد سلول‌ها را با غلظت ۱۰۰ میکرومولار تاموکسیفن تیمار داده شد. سپس سلول‌ها به مدت ۴۸ ساعت در انکوباتور (دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، رطوبت ۹۵ درصد و غلظت CO_2 برابر ۵ درصد) نگهداری شدند و برای آنالیزهای بعدی مورد استفاده قرار گرفتند.

استخراج RNA و سنتز cDNA در این مطالعه برای استخراج RNA کل از ترايزول (NEB, England) استفاده شد و استخراج از نمونه‌های تیمار و کنترل (بدون اثر دارو) بر اساس دستورالعمل انجام شد، مواد مورد استفاده برای استخراج RNA از طریق این روش به ترتیب عبارتند از ترايزول، کروفرم، ایزوپروپانول، اتانول ۱۰۰ درصد. درستی و توزیع اندازه RNA کل استخراج شده با آگارز ۱/۵ درصد، توسط الکتروفورز ژل TAE و رنگ‌آمیزی با اتیدیوم برمایید (EtBr) بررسی شد. در صورت صحت استخراج باندهای مربوط به RNAهای ریبوزومی 28S و 18S قابل تشخیص هستند. از RNA کل با استفاده از کیت QuantiTect® Reverse Transcription نماینده‌ی کمپانی آلمانی کیاژن cDNA براساس دستورالعمل ارائه شده سنتز شد. طبق

بررسی بقای سلولی: ارزیابی میزان بقای سلول‌های بنیادی سرطانی تیمار شده با استفاده از رنگ‌آمیزی تریپان بلو به دست آمد (Sigma-Aldrich, USA). حدود ۵۰۰۰۰ سلول بنیادی سرطانی مشتق شده از رده‌ی سلولی MKN-45 در هر خانه از پلیت ۶ خانه‌ای پوشیده شده با آگارز همراه ۲ میلی‌لیتر محیط کشت DMEM/F12 و ۱۰ درصد FBS و غلظت‌های مختلف داروی تاموکسیفن شامل ۱۰۰، ۲۰۰، ۴۰۰، ۶۰۰، ۸۰۰ میکرو مولار کشت داده شد. سپس بعد از ۴۸ ساعت پس از تریپسینه، سوسپانسیون حاصل را با دور ۲۰۰g به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ و در ۱ میلی‌لیتر محیط کشت به‌طور کامل آسپیره شد. ۲۰ میکرولیتر از سوسپانسیون سلول با ۲۰ میکرو لیتر تریپان بلو ترکیب شد. پس از ۲ تا ۵ دقیقه ۱۰ میکرو لیتر از ترکیب فوق بر روی لام نئوبار قرار داده شد. شمارش سلولی در چهار مربع لام با میکروسکوپ نوری با بزرگنمایی ۴۰X انجام شد.

تیمار سلول‌های بنیادی سرطانی جدا شده از رده سلولی MKN-45 با داروی تاموکسیفن: تعداد ۴۰۰۰۰۰ سلول بنیادی سرطانی جدا شده از رده سلولی MKN-45 به صورت جداگانه در فلاسک T25 که قبلاً با لایه نازکی از آگارز استریل یک درصد پوشیده شده بود

بعد پس از تکثیر ژن *CTNNBIP1* به وسیله یک واکنش PCR به منظور بررسی صحت و عملکرد کارایی پرایمرها ژن مورد نظر ژل الکتروفورز گردید. بدین منظور از ژل ۳ درصد آگارز (که قابلیت جداسازی قطعات ۰/۱ تا ۱ کیلو باز را دارد) استفاده شد.

تکنیک *Real Time PCR* پرایمرهای ژنهای *CTNNBIP1* و *GAPDH* از مطالعات قبلی به دست آمد (جدول ۱) (۲۱).

دستورالعمل کیت، مخلوطی از بافر Prime Script، آنزیم رونویسی کننده معکوس، پرایمر Oligo-dT، پرایمر Random hexamer، مهار کننده ریبونوکلاز به آن اضافه شد و با آب RNase Free به حجم مورد نظر رسانده شد، در نهایت به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و ۵ دقیقه در دمای ۸۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. محلول cDNA حاصل، ماهها در ۲۰- درجه سانتی‌گراد قابل نگهداری است. در مرحله

Genes Name	Primers	Sequences	Primers Size (bp)	Annealing (°C)	Products size (bp)
GAPDH	Sence	5'- ACTCTGGTAAAGTGGATATTGTTGC -3'	25	54	162
	Antisence	5'- GGAAGATGGTGATGGGATTTC -3'	21		
CTNNBIP1	Sence	5'- AGACTTGACAACGGTGACAG -3'	20	58	100
	Antisence	5'- AATTAACCTCAGGCAAACAGGTG -3'	23		

جدول ۱: پرایمرهای استفاده شده برای تست Real-time RT-PCR

سیگنال PCR رونوشت هدف را در یک گروه تیمار به نمونه دیگر به عنوان کنترل تیمار نشده ارتباط می‌دهد استفاده شد. از روش $2^{-\Delta\Delta Ct}$ برای آنالیز تغییرات نسبی در بیان ژنهای حاصل از آزمایشات Real-Time PCR استفاده شد.

نتایج

تاثیر داروی تاموکسیفن بر روی بقای سلولهای بنیادی سرطانی مشتق شده از ردهی سلولی MKN-45

تاثیر داروی تاموکسیفن بر روی حیات سلولی در غلظت‌های (۱۰۰، ۲۰۰، ۴۰۰، ۶۰۰، ۸۰۰) μm نشان داد که درصد زنده ماندن سلول‌ها بستگی به غلظت داروی تاموکسیفن دارد. مقدار IC_{50} برای سلول‌های بنیادی سرطانی مشتق شده از ردهی سلولی MKN-45 ۶۸۰ میکرو مولار در تست ۴۸ ساعته بود (نمودار ۱).

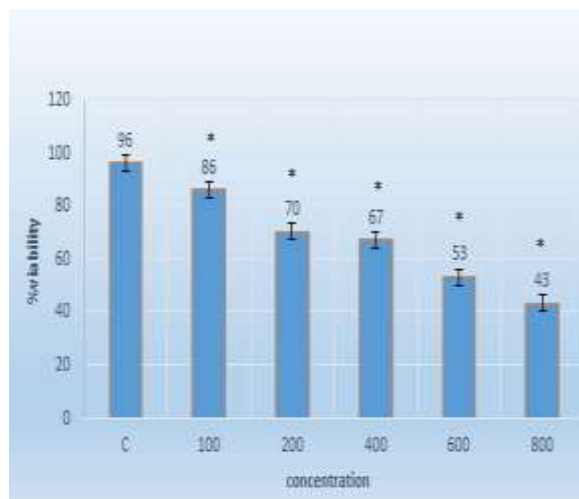
رشته cDNA حاصل از نسخه برداری معکوس تحت تاثیر آنزیم Taq DNA polymerase، پرایمرهای اختصاصی ژنهای مورد نظر و نوکلئوتیدها تحت شرایط زمانی و دمایی مشخص به منظور تائید بیان ژنهای مورد مطالعه، تکثیر شدند. به منظور بررسی کمی بیان رونوشت‌های ژن، واکنش Quantitative Real-Time PCR با شرایط یکسان برای آن در دستگاه Real-Time (Rotor-gene (Corbett, Australia) ترمال سایکلر SYBR Green PCR Quanti ۳۰۰۰ و توسط کیت Fast خریداری شده از شرکت زیست باران، نماینده کمپانی Qiagen (Germany) طبق دستورالعمل کیت انجام شد. مطالعه Real-time PCR برای بررسی بیان ژن *CTNNBIP1* در سلول‌های کنترل (بدون اثر دارو) و تیمار صورت گرفت. دو روش که عمدتاً برای آنالیز داده‌های حاصل از آزمایش‌های Real-time PCR مورد استفاده قرار می‌گیرد، تعیین مقدار مطلق و تعیین مقدار نسبی است. در این تحقیق از روش تعیین مقدار نسبی که

همچنین تصویر حاصل از ژل الکتروفورز محصول تکثیر شده‌ی ژن بیان کننده‌ی صحت و کیفیت پرایمرهای ژن مورد نظر بود (شکل ۶).



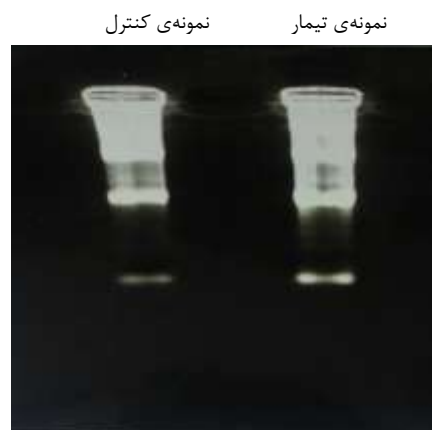
شکل ۶: ژل الکتروفورز محصول تکثیر شده‌ی ژن با استفاده از تکنیک PCR (به وسیله‌ی الکتروفورز در ژل آگارز باند مربوط به ژن *CTNNB1* با طول ۱۰۰ جفت باز در کنار DNA Ladder ۵۰ جفت بازی مشاهده شد، همچنین کیفیت و صحت عملکرد پرایمرها نیز تایید شد.

سطح بیان ژن *CTNNB1* در مسیر سیگنالی Wnt در سلول‌های بنیادی سرطانی مشتق شده از رده‌ی سلولی MKN-45 تحت تیمار با غلظت ۱۰۰ میکرومولار داروی تاموکسیفن به مدت ۴۸ ساعت تغییر کرد. نتایج حاصل از Real-time-PCR طبق محاسبات ذیل نشان داد که داروی تاموکسیفن بیان ژن *CTNNB1* را در سلول‌های بنیادی سرطانی مشتق شده از رده‌ی سلولی MKN-45 به میزان ۱/۴ برابر افزایش می‌دهد (نمودار ۲).

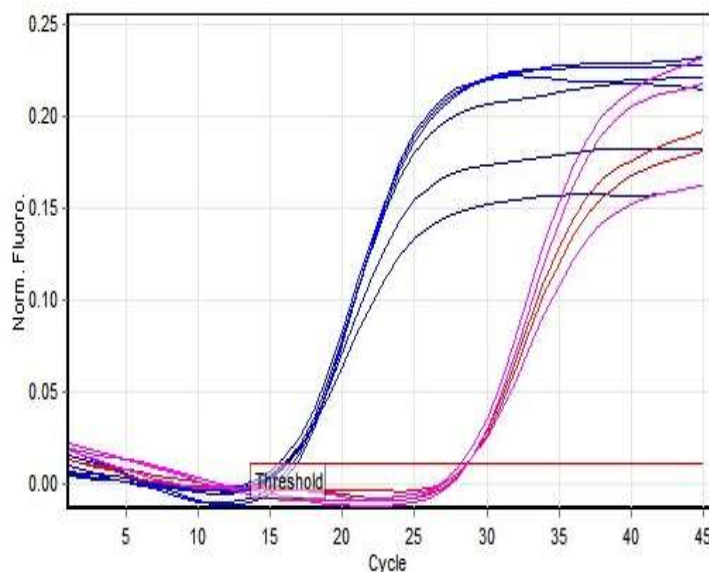


نمودار ۱: نمودار IC50 برای غلظت‌های مختلف داروی تاموکسیفن در تیمار ۴۸ ساعته با استفاده از روش تریپان بلو (IC50 ۶۸۰ میکرومولار به دست آمد).

پس از آنالیز آماری به وسیله‌ی آزمون T-test (نرم افزار spss) معنی‌داری نتایج به دست آمده تایید شد و غلظت ۱۰۰ میکرومولار به عنوان غلظت مناسب برای تیمار نهایی در ۴۸ ساعت انتخاب شد. تصویر حاصل از ژل الکتروفورز نمونه‌ی RNA کل استخراج شده نشان دهنده‌ی صحت و کیفیت RNA استخراج شده بود (شکل ۵).

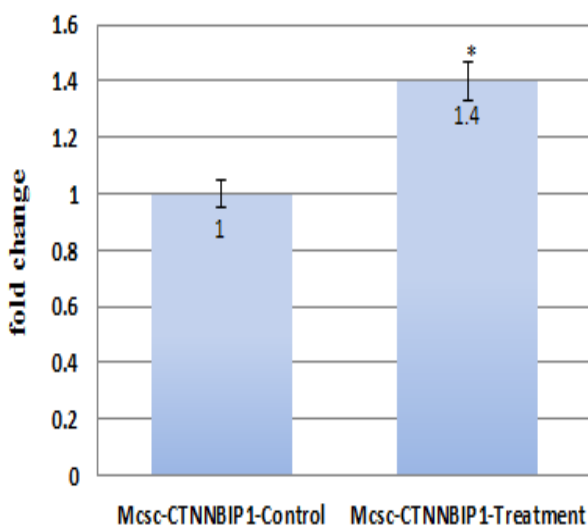


شکل ۵: نمونه‌ای از RNAهای استخراج شده نمونه‌ی کنترل و تیمار (باندهای مربوط به RNAهای ریبوزومی 28S و 18S)



نمودار ۲: نمودار تکثیر و مقایسه کمی اثر تاموکسیفن بر بیان ژن *CTNNBIP1* (بیان رونوشت ژن *CTNNBIP1* تحت تیمار با غلظت ۱۰۰ میکرومولار داروی تاموکسیفن نسبت به نمونهی کنترل افزایش یافته است، این آنالیز به صورت سه بار تکرار انجام شد).

همچنین اطلاعات حاصل از آنالیز داده‌ها با استفاده از آزمون *t-test* بررسی و مقایسه شدند و معنی‌داری این نتایج تایید شد ($p_{value} < 0.05$) (نمودار ۳).



نمودار ۳: نمودار ستونی تاثیر داروی تاموکسیفن بر روی سطح بیان ژن *CTNNBIP1* ($p_{value} < 0.05^*$ ، معنی‌داری بیان ژن نمونهی تیمار در برابر نمونهی کنترل توسط آزمون *t-test* تایید شد).

$$\begin{aligned} \Delta Ct (\text{control}) &= Ct \text{ CTNNBIP1 gene} - Ct \text{ GAPDH gene} \\ \Delta Ct (\text{control}) &= 28.64 - 15.95 = 12.69 \\ \Delta Ct (\text{treatment}) &= Ct \text{ CTNNBIP1 gene} - Ct \text{ GAPDH gene} \\ \Delta Ct (\text{treatment}) &= 28.49 - 16.28 = 12.21 \\ \Delta \Delta Ct &= \Delta Ct (\text{treatment}) - \Delta Ct (\text{control}) \\ \Delta \Delta Ct &= 12.21 - 12.69 = -0.48 \\ \text{Relative fold change} &= 2^{-\Delta \Delta Ct} \\ \text{Relative fold change} &= 2^{0.48} = 1.4 \end{aligned}$$

بحث

در سال‌های اخیر نیز نقش سلول‌های بنیادی سرطانی در گسترش، تهاجم، متاستاز و عود سرطان مورد بررسی قرار گرفته است (۲۲). همچنین این سلول‌ها در برابر درمان مقاومت ایجاد کرده که می‌تواند از این طریق در متاستاز سلول‌های سرطانی دخیل باشد (۲۳). نخستین شواهد مربوط به حضور سلول‌های بنیادی سرطانی و نقش آن‌ها در بروز سرطان در سال ۱۹۹۴ طی مطالعه‌ای بر روی لوسمی حاد میلوئید انسانی به دست آمد. طی این مطالعه lapidot و همکاران (۲۴) موفق به شناسایی و جداسازی جمعیتی از سلول‌های AML با نشانگرهای سطحی CD34+/CD38 از یک فرد مبتلا به لوسمی شدند. از این رو برای درمان سرطان، سلول‌های بنیادی سرطانی باید مورد توجه قرار بگیرند. درک و شناسایی این سلول‌ها ما را در رسیدن به این هدف کمک خواهد کرد. از طرف دیگر توانایی خود نوزایی و تمایز سلول‌های بنیادی سرطانی تحت تاثیر عوامل مختلفی از جمله مسیر سیگنالی Wnt می‌باشد (۲۵). این مسیر همچنین نقش مهمی در تکوین بافت‌ها طی دوران جنینی و پس از تولد ایفا می‌کند. مطالعات نشان داده است که مسیر کانونی Wnt که وابسته به پروتئین بتاکاتنین است نقش مهمی در کنترل سلول‌های بنیادی سرطانی دارد (۲۶). پروتئین برهم‌کنش کننده با بتا کاتنین (*CTNNBIP1*) به‌عنوان پروتئین مهارکننده‌ی تعامل بین پروتئین بتا کاتنین و اعضای خانواده‌ی TCF/LEF شناخته شده است که به‌عنوان یک تنظیم‌کننده‌ی منفی مسیر سیگنالینگ Wnt/ β -catenin نقش خود را ایفا می‌کند. در سلول‌های سرطانی بیان این پروتئین کاهش می‌یابد و بیان پروتئین بتاکاتنین نیز در داخل سلول سرطانی بیشتر از حد معمول می‌باشد (۲۷). از طرف دیگر داروی تاموکسیفن به‌عنوان یک داروی ضد استروئیدی شناخته شده است. اگرچه فعالیت ضد استروژنی این دارو هنوز به‌خوبی مشخص نشده است اما مطالعات آزمایشگاهی نشان می‌دهد که فعالیت ضد استروژنی

تاموکسیفن به‌دنبال اتصال مستقیم به گیرنده‌ی استروژن اتفاق می‌افتد و پس از ایجاد تغییرات ساختاری در این گیرنده رونویسی RNA تغییر یافته و در نهایت تکثیر سلولی کاهش می‌یابد (۲۸). هم‌چنین مطالعاتی درباره‌ی حضور گیرنده‌های استروژنی در کارسینومای معده و استفاده از ترکیبات ضد استروژنی تاموکسیفن در درمان این سرطان وجود دارد (۲۹). حضور گیرنده‌های استروژنی در کارسینومای معده اولین بار توسط Tokunaga و همکارانش گزارش شد (۳۰). بنابراین داروهای غیراستروئیدی ضد استروژنی از جمله تاموکسیفن می‌توانند کاندید خوبی برای درمان و جلوگیری از پیشرفت سرطان معده باشند. با توجه به مطالبی که ذکر شد و هم‌چنین به دلیل اهمیت مطالعه‌ی مکانیسم و عوامل دخیل در ایجاد و پیشرفت سرطان، ما به مطالعه و بررسی نتایج حاصل از تیمار سلول‌های سرطانی بنیادی مشتق شده از رده‌ی سلولی MKN-45 مربوط به سرطان معده بر روی بیان ژن *CTNNBIP1* با غلظت مشخصی از داروی تاموکسیفن پرداختیم. پس از جداسازی سلول‌های بنیادی سرطانی مشتق شده از رده‌ی سلولی MKN-45 مربوط به سرطان معده طی ۱۴ روز، قدرت بقای این سلول‌ها پس از تیمار با داروی تاموکسیفن با استفاده از تست تریپان بلو ارزیابی شد. نتایج حاصل نشان دهنده‌ی اثر مهاری داروی تاموکسیفن بر روی رشد سلول‌های بنیادی سرطانی مشتق شده از رده‌ی سلولی MKN-45 بود. پس از ارزیابی قدرت بقای سلول‌های بنیادی سرطانی مذکور و تعیین IC50 برای مشخص کردن غلظت تاثیرگذار بر روی بقای این سلول‌ها، نمونه‌های کنترل و تیمار با غلظت مشخصی از داروی تاموکسیفن به مدت ۴۸ ساعت نگهداری شدند. پس از استخراج RNA و ارزیابی کیفیت RNA استخراج شده به وسیله‌ی تست PCR در نهایت سنتز cDNA را انجام داده و به بررسی بیان ژن مورد نظر یعنی *CTNNBIP1* به وسیله‌ی آنالیز Real-Time PCR پرداختیم. با توجه به این نتایج ژن *CTNNBIP1* در نمونه‌های تیمار شده

منابع

1. Jemal A, Bray, Center MM, Ferlay J, Ward E, et al. Global cancer statistics. CA: a cancer journal for clinicians. 2011; 61(2): 69-90.
2. Kamangar F, Dawsey SM, Blaser MJ, Perez-Perez GI, et al. Opposing risks of gastric cardia and noncardia gastric adenocarcinomas associated with *Helicobacter pylori* seropositivity. Journal of the National Cancer Institute. 2006; 98(20): 1445-52.
3. Kelley JR, Duggan JM. Gastric cancer epidemiology and risk factors. Journal of clinical epidemiology. 2003; 56(1): 1-9.
4. Malekzadeh R, Derakhshan MH, Malekzadeh Z. Gastric cancer in Iran: epidemiology and risk factors. 2009; 12(6): 576-83.
5. Singh A, Settleman JE. EMT, cancer stem cells and drug resistance: an emerging axis of evil in the war on S cancer. Oncogene. 2010; 29(34): 4741-51.
6. Gupta PB, Chaffer CL, Weinberg RA. Cancer stem cells: mirage or reality?. Nature medicine. 2009; 15(9): 1010.
7. Zhou BB, Zhang H, Damelin M, Geles KG, et al. Tumour-initiating cells: challenges and opportunities for anticancer drug discovery. Nature reviews Drug discovery. 2009; 8(10): 806.
8. Lapidot T, Sirard C, Vormoor J, Murdoch B, et al. A cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation into SCID mice. Nature. 1994; 367(6464): 645.
9. Reya T, Clevers H. Wnt signalling in stem cells and cancer. Nature. 2005; 434(7035): 843-50.

با داروی تاموکسیفن افزایش بیان به میزان ۱/۴ برابری را نشان داد. با توجه به اینکه پروتئین حاصل از این ژن نقش مهارکننده بر روی پروتئین بتا-کاتنین دارد و همچنین با توجه به نقش تجمع بتا کاتنین و تاثیر آن بر روی پیشرفت سرطان معده که توسط Wilson و همکاران (۳۱) مطالعه و بررسی شده است. نقش مهارتی پروتئین *CTNNB1* می تواند بسیار موثر باشد و به عنوان یکی از اهداف درمانی در درمان سرطان معده در نظر گرفته شود.

نتیجه گیری

در یک نتیجه گیری کلی از این پروژه می توان گفت که جداسازی سلول های بنیادی سرطان معده از رده ی سلولی MKN-45 در شرایط کشت سه بعدی و بدون اضافه کردن فاکتور رشد در طی ۱۴ روز انجام شد. نتایج نشان داد که داروی تاموکسیفن که یک داروی غیراستروئیدی از خانواده ی میانجی گره های گیرنده ی استروژن انتخابی (SERM) است، می تواند تکثیر و قدرت تومورهای را در سلول های بنیادی سرطان معده کاهش دهد. همچنین تیمار با این دارو سبب افزایش بیان ژن *CTNNB1* می شود. پروتئین حاصل از این ژن مهارکننده ی پروتئین بتا کاتنین می باشد. بتا کاتنین از پروتئین های اصلی مسیر سیگنالی Wnt است و افزایش بیان ژن *CTNNB1* در نمونه ی تیمار شده با داروی تاموکسیفن نشان دهنده ی نقش مهارتی این دارو در غلظت مشخص بر روی مسیر سیگنالی می باشد.

تشکر و قدردانی

این پژوهش در آزمایشگاه تحقیقاتی سلولی مولکولی دانشگاه رازی کرمانشاه صورت پذیرفت. از آقایان بهروز مرادی و کیومرث مهدی زاده و خانم دیبا فراهانی که ما را در به پایان رساندن این پروژه یاری کردند کمال تشکر و قدردانی به عمل می آید.

10. Yang Y. Wnt signaling in development and disease. *Cell Biosci.* 2012; 2(1): 14.
11. Komiya Y, Habas R. Wnt signal transduction pathways. *Organogenesis.* 2008 1; 4(2): 68-75.
12. Clevers H. Wnt/ β -catenin signaling in development and disease. *Cell.* 2006; 127(3): 469-80.
13. Zhang H, Zhang H, Zhang Y, Ng SS, et al. Dishevelled-DEP domain interacting protein (DDIP) inhibits Wnt signaling by promoting TCF4 degradation and disrupting the TCF4/ β -catenin complex. *Cellular signalling.* 2010; 22(11): 1753-60.
14. MacDonald BT, Tamai K, He X. Wnt/ β -catenin signaling: components, mechanisms, and diseases. *Developmental cell.* 2009; 17(1): 9-26.
15. Nusse R. Wnt signaling in disease and in development. *Cell research.* 2005; 15(1): 28-32.
16. Chan TA, Wang Z, Dang LH, Vogelstein B, et al. Targeted inactivation of CTNNB1 reveals unexpected effects of β -catenin mutation. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 2002; 99(12): 8265-70.
17. Qi W, Chen J, Cheng X, Huang J, et al. Targeting the Wnt-Regulatory Protein CTNNBIP1 by microRNA-214 Enhances the Stemness and Self-Renewal of Cancer Stem-Like Cells in Lung Adenocarcinomas. *Stem Cells.* 2015; 33(12): 3423-36.
18. Sirbasku DA. Anti-estrogen and immune modulator combinations for treating breast cancer. *Google Patents;* 2012; 12:1597-611.
19. Briest S, Stearns V. Tamoxifen metabolism and its effect on endocrine treatment of breast cancer. *Clin Adv Hematol Oncol.* 2009; 7(3): 185-92.
20. Jiang M, Huang O, Zhang X, Xie Z, et al. Curcumin induces cell death and restores tamoxifen sensitivity in the antiestrogen-resistant breast cancer cell lines MCF-7/LCC2 and MCF-7/LCC9. *Molecules.* 2013; 18(1): 701-20.
21. Akrami H, Moradi B, Borzabadi Farahani D, Mehdizadeh K. Ibuprofen reduces cell proliferation through inhibiting Wnt/ β catenin signaling pathway in gastric cancer stem cells. *Cell Biol Int.* 2018; 42(8): 949-58.
22. Patocs A, Platzer P, Eng C. Breast-cancer stromal cells with TP53 mutations. *The New England journal of medicine.* 2008; 358(15): 1636.
23. Alizadeh AM, Shiri S, Farsinejad S. Metastasis review: from bench to bedside. *Tumor biology.* 2014; 35(9): 8483-523.
24. Lapidot T, Sirard C, Vormoor J, Murdoch B, et al. A cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation into SCID mice. *Nature.* 1994; 367(6464): 645.
25. Holland JD, Klaus A, Garratt AN, Birchmeier W. Wnt signaling in stem and cancer stem cells. *Current opinion in cell biology.* 2013; 25(2): 254-264.
26. Yao H, Ashihara E, Maekawa T. Targeting the Wnt/ β -catenin signaling pathway in human cancers. *Expert opinion on therapeutic targets.* 2011; 15(7): 873-87.
27. O'Brien CA, Pollett A, Gallinger S, Dick JE. A human colon cancer cell capable of initiating tumour growth in immunodeficient mice. *Nature.* 2007; 445(7123): 106.
28. Jiang M, et al. Curcumin induces cell death and restores tamoxifen sensitivity in the antiestrogen-resistant breast cancer cell lines MCF-7/LCC2 and MCF-7/LCC9. *Molecules.* 2013; 18(1): 701-720.

29. Stedman KE, Moore GE, Morgan RT. Estrogen receptor proteins in diverse human tumors. *Archives of Surgery*. 1980; 115(3): 244-248.
30. Tokunaga A, Kojima N, Andoh T, Matsukura N, et al. Hormone receptors in gastric cancer. *European Journal of Cancer and Clinical Oncology*. 1983; 19(5): 687-9.
31. Chiurillo MA. Role of the Wnt/ β -catenin pathway in gastric cancer: An in-depth literature review. *World journal of experimental medicine*. 2015; 5(2): 84-102.

Investigation the Effect of tamoxifen on *CTNNBIP1* in cancer stem cells derived from *MKN-45* cell line

ghodrati B, M.Sc., akrami H, Ph.D.*

-Department of biology, Faculty of Sciences University of Razi, Kermanshah, Iran

* Email corresponding author: h.akrami@razi.ac.ir

Received: 6 Jan. 2019

Accepted: 16 Jun. 2019

Abstract

Aim: In the current study, effect of various concentrations of tamoxifen on *CTNNBIP1* expression gene in the cancer cells derived from *MKN-45* cell line of gastric cancer was considered as a therapeutic potential.

Materials and method: The CSCs derived from the *MKN-45* cell line were treated with different concentrations of tamoxifen for 48 hours and then cell survival was evaluated by the Trypan Blue test. After obtaining IC₅₀, we examined the effect of 100 μM tamoxifen on the expression of *CTNNBIP1* in CSCs as a therapeutic potential.

Results: Analysis of Real-time RT-PCR data showed that 100 μM tamoxifen in a 48-houred treatment can increase the expression of *CTNNBIP1* gene.

Conclusions: According to the results, it was concluded that tamoxifen has an inhibitory effect on the Wnt signal pathway and beta-catenin protein by increasing the expression of the *CTNNBIP1* gene.

Keywords: gastric cancer, cancer stem cells, tamoxifen, Wnt / β-catenin signal pathway, *CTNNBIP1* gene