Downloaded from amuj.arakmu.ac.ir at 17:43 +0430 on Monday July 23rd 2018

Arak Medical University Journal (AMUJ) *Original Article*
2014; 17(86): 21-30

Identification and characterization of colon cancer stem cells in HT-29 adenocarcinoma cell line

Khorrami S[1], Zavaran Hosseini A[2]*, Mowla J[3], Malekzadeh R[4]

1- Department of Immunology, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran
2- Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran
3- Department of Molecular Genetics, Faculty of Biological Sciences , Tarbiat Modares University, Tehran, Iran
4- Digestive Oncology Research Center, Digestive Diseases Research Institute, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

Received: 20 Apr 2014, Accepted: 11 Jun 2014

Abstract

Background: Cancer stem cells are subpopulation of cancer cells that show self-renewal potential and the capacity to differentiate into diverse populations comprising a tumor. One of the characteristics of CSCs is their ability to form floating spheroids under anchorage-independent conditions in a serum-free media. The aim of this study was isolation of colon cancer stem cells by sphere formation assay and characterization of them in human colonic adenocarcinoma HT-29.

Materials and Methods: In this experimental study, colon CSCs markers including CD44 and EPCAM in spheroid and HT-29 cells were analyzed by flow cytometry. The expression levels of stemness genes in both spheroid and HT-29 cells were investigated using real-time PCR. Tumorigenic potential of spheroid cells was evaluated using *in vivo* xenografts assay.

Results: Our data showed over 92% of spheroids were $CD44^+/EpCAM^+$, while HT-29 cells only have expressed 37% of CD44/EpCAM markers. In compared with the HT-29 cells, expression levels of ‘‘stemness’’ genes, like Sox2, Oct4, Nanog, C-myc, and Klf4 were significantly increased in spheroid cells ($p< 0.05$). Further, As little as 2500 spheroid cells were sufficient to obtain tumor growth in nude mice, while $1x10^6$ of HT-29 cells was needed to form tumor.

Conclusion: Our data suggest that spheroid formed by colon cancer cell lines highly enriched in CSCs and showed increasing expression of stemness genes and tumorigenic in nude mice.

Keywords: Cancer stem cells, CD44, EPCAM, HT-29, Spheroid.

*Corresponding Author:
Address: Department of Immunology, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran.
Email: Zavarana@modares.ac.ir

مقاله پژوهشی

مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی اراک
سال 17، شماره 5 (شماره پیاپی 86)، مرداد 1393، 30-21

Downloaded from amuj.arakmu.ac.ir at 17:43 +0430 on Monday July 23rd 2018

شناسایی وتعیین خصوصیات سلول‌های بنیادی سرطانی کولون در رده سلولی آدنوکارسینوم کولونی HT-29

سمانه خرمی[1]، احمد زواران حسینی[2*]، سید جواد مولی[3]، رضا ملک زاده[4]

1- دانشجوی دکتری ایمنی شناسی پزشکی، گروه ایمنی شناسی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
2- استاد، گروه ایمنی شناسی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
3- دانشیار، گروه ژنتیک مولکولی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
4- استاد، گروه تحقیقات سرطان ، پژوهشکده بیماری های گوارشی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران

تاریخ دریافت:93/1/31 تاریخ پذیرش: 93/3/21

چکیده

زمینه و هدف:یکی از ویژگی‌های سلول‌های بنیادی سرطانی توانایی آنها در تشکیل کلنی‌های اسفروییدی تحت شرایط غیر چسبان و در محیط فاقد سرم می‌باشد. هدف از این مطالعه جداسازی سلول‌های بنیادی سرطانی با استفاده از روش تشکیل اسفرویید و بررسی خصوصیات عملکردی آنها در رده سلولی سرطانی آدنوکارسینوم کولونی HT-29 می‌باشد.

موادو روش‌ها: در این مطالعه تجربی، شاخص‌های سلول‌های بنیادی سرطانی کولون شامل CD 44و EPCAM و میزان بیان ژن‌های مرتبط با مسیرهای اختصاصی سلول‌های بنیادی سرطانی در اسفروییدها و سلول‌های HT-29 مورد بررسی قرار گرفت. جهت تعیین توانایی تومورزایی اسفروییدها نیز، پیوند زنوگرافت در موش‌های nude انجام گردید.

یافته‌ها: بر اساس اطلاعات به دست آمده بیش از 92 درصد از اسفروییدها $EPCAM^{+}/CD\ 44^{+}$ بودند در حالی که فقط 37 درصد از سلول‌های HT-29 شاخص‌های EPCAM/CD 44 را بیان می‌کردند. در مقایسه با سلول‌های HT-29 میزان بیان ژن‌های Sox2 4,OctNanog، Klf4 و C-myc به طور قابل ملاحظه‌ای در سلول‌های اسفروییدی افزایش نشان داد($p<0/05$). هم‌چنین تزریق2500 سلول اسفروییدی برای شروع و رشد تومور در موش‌های nude کافی بود در حالی که 1×10^{6} سلول HT-29 توانایی القاء تومور را داشتند.

نتیجه‌گیری: یافته‌ها نشان می‌دهد اسفروییدهای تشکیل شده از رده سلولی سرطانی کولون HT-29 غنی از سلول‌های بنیادی سرطانی می‌باشند که بیان افزایش یافته‌ای از ژن‌های درگیر در ویژگی‌های چند قوه‌زایی و هم‌چنین توانایی تومورزایی در موش‌های nude را نشان می‌دهند.

واژگان کلیدی: اسفرویید، سلول‌های بنیادی سرطانی، CD44، EPCAM، HT-29

***نویسنده مسئول:**تهران، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم پزشکی، گروه ایمنی شناسی پزشکی
Email: Zavarana@modares.ac.ir

Downloaded from amuj.arakmu.ac.ir at 17:43 +0430 on Monday July 23rd 2018

مقدمه

در حال حاضر شواهد فراوانی نشان می‌دهند که سرطان‌های با منشا سلول‌های اپی تلیالی شامل سرطان کولورکتال از یک مجموعه کوچکی از سلول‌های دارای قدرت خود تجدید شوندگی تحت عنوان سلول‌های بنیادی سرطانی ایجاد می‌شوند. بر اساس مدل" سلول‌های بنیادی سرطانی(Cancer stem cells) "، زیر جمعیت کوچکی از سلول‌های سرطانی که ویژگی‌هایی مشابه سلول‌های بنیادی سالم را نشان می‌دهند، توانایی شروع و حفظ رشد تومور، متاستاز و مقاومت به درمان را دارا می‌باشند(1). از این رو تحقیقاتی که در جهت شناسایی و تعیین ویژگی‌های سلول‌های بنیادی سرطانی انجام می‌شود نه تنها موجب بهبود شناخت محققین از این سلول‌ها می‌گردد بلکه با شناسایی دقیق این سلول‌ها می‌توان به طراحی روش‌های درمانی در راستای هدف‌گیری این سلول‌ها اقدام نمود و بدین ترتیب از عود مجدد و متاستاز سرطان‌ها جلوگیری نمود. سلول‌های بنیادی سرطانی یا سلول‌های شروع کننده تومور اولین بار در لوسمی حاد میلوییدی و در سال‌های اخیر در بسیاری از تومورها از جمله سرطان کولون شناسایی شدند(2، 3).

اکثر روش‌های جداسازی سلول‌های بنیادی سرطانی بر اساس استفاده از شاخص‌های سطح سلولی مختلف شامل CD 133 ،CD 44 ،CD 24و ALDH می‌باشند که برای جدا سازی و غنی کردن سلول‌های بنیادی سرطانی از بافت‌های توموری اولیه با استفاده از تکنولوژی جداسازی سلولی فعال با فلوسیتومتری(FACS) و سپس آزمودن توانایی ایجاد تومور در موش‌های دارای نقص ایمنی به کار برده می‌شوند(4، 5). این روش‌ها بسیار هزینه بر بوده و به سهولت قادر به شناسایی سلول‌های بنیادی سرطانی یا ویژگی‌های عملکردی آنها نیستند. از این رو استفاده از روش‌های جایگزین قابل اطمینان در شرایط آزمایشگاهی برای شناسایی سلول‌های بنیادی سرطانی مشتق از رده‌های سلولی مزایای بسیاری خواهد داشت. برای مثال، مطالعات اثرات آنتی بادی‌ها، داروها، افزایش بیان و یا حذف ژن‌های خاص برعملکردهای اختصاصی سلول‌های بنیادی سرطانی مشتق از رده‌های سلولی را فراهم می‌سازد. روش‌های آزمایشگاهی هم‌چنین شناسایی ژن‌های اختصاصی که وضعیت سلول‌های بنیادی را کنترل می‌کنند و هنوز مشخص نشده‌اند را فراهم می‌کنند.

در مطالعات فراوانی نشان داده شده است که برخلاف بافت توموری انسانی، رده‌های سلولی سرطانی به عنوان منابع با ارزشی محسوب می‌شوند که می‌توانند به طور نامحدود و قابل تکرار استفاده شوند(6). رده‌های سلولی باتوجه به محتوی ژنتیکی به سهولت قابل شناسایی هستند و با بافت‌های استرومایی که می‌توانند بر تفسیر نتایج به دست آمده از بافت‌های انسانی اثر بگذارند آلودگی ندارند(7). شواهد مستدلی وجود دارد که رده‌های سلولی نمایان‌گر تومورهایی هستند که در ابتدا از آنها جدا شده‌اند و می‌توانند ساختارهایی مشابه آنچه که در بافت‌های اصلی یافت می‌شوند تشکیل دهند. هم‌چنین از نظر موتاسیون در ژن‌ها با سرطان‌های اولیه مشابهت دارند(8).

هدف ما در این مطالعه نشان دادن چگونگی جداسازی سلول‌های بنیادی سرطانی کولون با استفاده از روش تشکیل اسفرویید (sphere formation assay) در شرایط آزمایشگاهی و سپس بررسی شاخص‌های سطح سلولی و خصوصیات عملکردی مربوط به سلول‌های بنیادی سرطانی می‌باشد. در این مطالعه از رده سلولی HT-29 که رده سلولی آدنوکارسینوم کولون است به عنوان مدل استفاده شده است.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه تجربی رده سلولی آدنوکارسینوم کولون انسانی HT-29 از مرکز ملی ذخایر ژنتیکی خریداری شد. سلول‌ها در محیط کشت DMEM/F 12 (گیبکو- آمریکا) همراه با10 درصد سرم جنین گاوی (Fetal Bovine Serum-FBS) (گیبکو-آمریکا) و 1 درصد پنی سیلین/استرپتومایسین (اینتویتروژن- آمریکا) در انکوباتور در شرایط دمای 37 درجه سانتی‌گراد و دی اکسید کربن 5 درصد کشت داده شد. سلول‌ها با استفاده از تریپسین

Downloaded from amuj.arakmu.ac.ir at 17:43 +0430 on Monday July 23rd 2018

0/25 درصد (اینویتروژن- آمریکا) به صورت سوسپانسیون سلولی در آورده شدند.

برای تشکیل کلنی‌های اسفروییدی، سوسپانیسون سلولی به تعداد 20000-15000 سلول در هر میلی لیتر در پلیت‌های 6 خانه‌ای در محیط فاقد سرم شامل DMEM/F12 همراه با فاکتورهای رشد شامل20 نانوگرم در میلی‌لیتر فاکتور رشد اپیدرمی (Epidermal growth faetor-EGF) (سیگما- آمریکا) و 10 نانوگرم در میلی‌لیتر فاکتور رشد فیبروبلاستی (Fibroblast growth factor-FGF2) (میلیپور- آمریکا) 27و درصد ویتامین B1 کشت داده شد. برای تعیین توانایی تمایز سلول‌های اسفروییدی، اسفروییدها در محیط کشت DMEM/F12 فاقد فاکتورهای رشد و در حضور 10 درصد سرم جنین گاوی کشت داده شد.

ارزیابی شاخص‌های سطح سلولی با استفاده از فلوسیتومتری

برای این منظور، سوسپانسیون سلولی حاصل از اسفروییدها و سلول‌های HT-29 بر اساس پروتکل استاندارد رنگ آمیزی شدند. به طور خلاصه سلول‌های دو گروه تریپسینه شده و در بافر PBS حاوی 1 درصد آلبومین سرم گاوی (Bovine Serum Albumin-BSA)، به صورت سوسپانسیون سلولی در آورده شدند. بعد از 10 دقیقه، سلول‌ها با استفاده از آنتی بادی‌های انسانی شامل (بیوساینس- آمریکا) anti CD 44- APC وanti EPCAM-PE رنگ آمیزی شدند. سلول‌های رنگ آمیزی شده با کنترل‌های ایزوتایپی IgG2-APCb وIgG1 -PE به عنوان کنترل استفاده شدند. آنالیز فلوسیتومتری با استفاده از دستگاه FACS CantoII(BD, USA) انجام شد.

Real-Time PCR

ابتدا RNAاز سلول‌های اسفروییدی و سلول‌های HT-29 با استفاده از کیت جداسازی RNA (رش- آمریکا) براساس دستورالعمل استخراج شد. واکنش PCR با استفاده ازکیت light cycler RNA Master SYBR Green I (کیاژن- آمریکا) و دستگاه light cycler Roche مدل 3/5 انجام شد. توالی پرایمرها و شرایط PCR در جدول 1 به طور خلاصه آورده شده است. از HGPRT به عنوان کنترل داخلی استفاده شد. تغییرات بیان ژن‌ها با استفاده ازروش $2^{-\Delta\Delta Ct}$ محاسبه شد.

جدول 1. توالی پرایمرها و شرایط PCR

نام ژن	توالی پرایمرها	دمای Tm	دمای اتصال	طول قطعه سنتز شده
C-myc	F: 5'-AGCGACTCTGAGGAGGAAC-3' R:5'-CTGCGTAGTTGTGCTGATG-3'	58/4 57/7	59	184 جفت باز
Sox-2	F:5'-GACTGAGAGAAAGAAGAGGAG-3' R:5'-GAAAATCAGGCGAAGAATAAT-3'	59/2 58/2	60	197 جفت باز
Oct-4	F:5'-CGCCGTATGAGTTCTGTG-3' R: 5'-GGTGATCCTCTTCTGCTTC-3'	59/6 59/9	60	284 جفت باز
Nanog	F:5'-GCTAAGGACAACATTATAGAAG-3' R:5'-CTTCATCACCAATTCGTACTTG-3'	58/3 57/6	59	127 جفت باز
Klf-4	F: 5'-CCCAATTACCCATCCTTCC-3' R:5'-GTGCCTGGTCAGTTCATC-3'	58/8 59/3	59	303 جفت باز
HPRT کنترل داخلی	F:5'-CCTGGCGTCGTGATTAGTG-3' R:5'-TCAGTCCTGTCCATAATTAGTCC-3'	58/3 59/1	60	125 جفت باز

شرایط سیکل های PCR بدین ترتیب بود: 1سیکل در دمای 50 درجه سانتیگراد برای مدت زمان 10 دقیقه،1سیکل در دمای 95 درجه سانتیگراد برای مدت زمان 10 دقیقه بدنبال 40 سیکل در دمای 95 درجه برای 10 ثانیه و دمای 60 یا 59 درجه برای 1دقیقه

توانایی تومورزایی در شرایط درون تنی

Downloaded from amuj.arakmu.ac.ir at 17:43 +0430 on Monday July 23rd 2018

توانایی تومورزایی از طریق تزریق زیرجلدی سوسپانیسون سلولی اسفروییدها و سلول‌های HT-29 به موش‌های nude (8-6 هفته) ارزیابی شد. قبل از تزریق سلول‌ها به صورت هم حجم در بافر فسفات نمکی و کلاژن آماده سازی شدند. موش‌ها از آزمایشگاه حیوانات بیمارستان امام‌خمینی خریداری شده و تحت شرایط استاندارد نگه‌داری شد. مطالعه روی حیوانات توسط کمیته اخلاق پزشکی دانشگاه تربیت مدرس تصویب شد. زمانی که تومورها به حجم 1سانتی‌متر مکعب رسیدند موش‌ها کشته و نمونه‌های توموری جهت بررسی‌های پاتولوژیکی و کشت در شرایط آزمایشگاهی به دست آمد. حجم تومور با استفاده از فرمول زیر محاسبه شد.

2/(قطر بزرگ)×^{2}(قطر کوچک) =حجم تومور

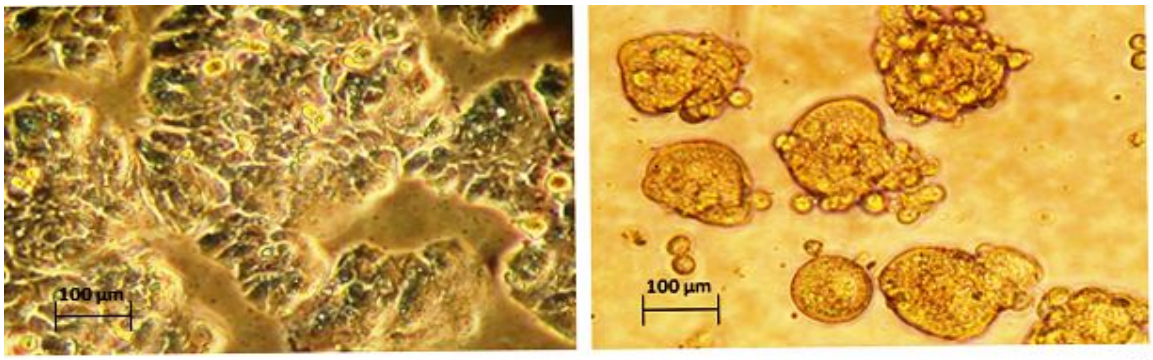
آنالیز آماری

اطلاعات به صورت میانگین±انحراف معیار ارائه گردید. از تست paired t-test برای محاسبه تغییرات میزان بیان ژن‌ها و شاخص‌ها بین گروه‌ها استفاده شد. تجزیه و تحلیل آماری با استفاده ازGraphPad Prism نسخه 3 انجام شد. همه تست‌ها به صورت تکرار سه تایی و سطح معنی‌داری نیز کمتر از 0/05 در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

تشکیل و شناسایی کلنی‌های اسفروییدی

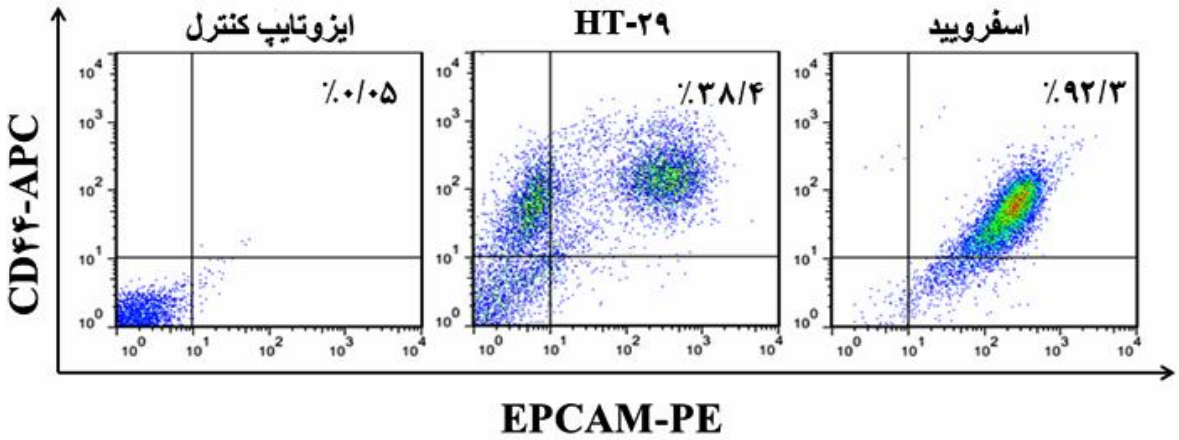
در این مطالعه نتایج نشان داد سلول‌های آدنوکارسینوم کولونی HT-29 در محیط فاقد سرم و در حضور فاکتورهای رشد می‌توانند کلنی‌های اسفروییدی غیر چسبان تشکیل دهند (شکل1 الف). جهت بررسی توانایی تمایز کلنی‌های اسفروییدی این سلول‌ها در محیط کشت حاوی 10 درصدFBS کشت داده شد. بعد از یک روز سلول‌های تمایز نیافته به تدریج از حالت اسفروییدی به سلول‌های چسبنده و تمایز یافته تبدیل شدند (شکل1ب). یافته‌ها نشان می‌دهند سلول‌های اسفروییدی ویژگی‌هایی مشابه سلول‌های بنیادی شامل خود تجدید شوندگی و توانایی تمایز را نشان می‌دهند. تحت شرایط فاقد سرم کلنی‌های اسفروییدی شاخص‌های سطح سلولی CD44 و EPCAM را در مقایسه با سلول‌های HT-29 به طور معنی‌داری بیان می‌کنند($p<0/05$). نتایج نشان می‌دهد که 92/3(4/2) درصد اسفروییدها از نظر شاخص‌های سطح سلولی $CD44^+$ / $EPCAM^+$می‌باشند در حالی که 37/4(3/9) درصد سلول‌های HT-29 شاخص‌های EPCAM/CD44 را بیان می‌کنند(شکل 2). یافته‌ها نشان می‌دهند که اسفروییدهای تشکیل شده از سلول‌های HT-29 دارای جمعیت غنی شده از سلول‌های بنیادی سرطانی می‌باشند.



الف ب

شکل 1. تشکیل سلول‌های اسفروییدی از رده سلولی HT-29. الف) سلول‌های سرطانی کولون در شرایط آزمایشگاهی به صورت اسفرویید های غیر متمایز در محیط فاقد سرم و حاوی فاکتورهای رشد فیبروبلاستی و اپیدرمی رشد می کنند.ب) سلول‌های اسفروییدی در حضور سرم جنین گاوی 10 درصد و فقدان فاکتورهای رشد به سلول‌های چسبنده و متمایز تبدیل می‌شوند. (میکروسکوپ معکوس ، بزرگنمایی 200X)

Downloaded from amuj.arakmu.ac.ir at 17:43 +0430 on Monday July 23rd 2018



شکل 2. تصاویر آنالیزهای فلوسیتومتری نشان دهنده سلول‌های $EPCAM^{+}/CD44^{+}$ در سلول‌های اسفروییدی و HT-29می‌باشد که نشان می دهد اسفروییدها به صورت معنی‌داری شاخص‌های EPCAM / CD44 را نسبت به HT-29 بیشتر بیان می کنند.

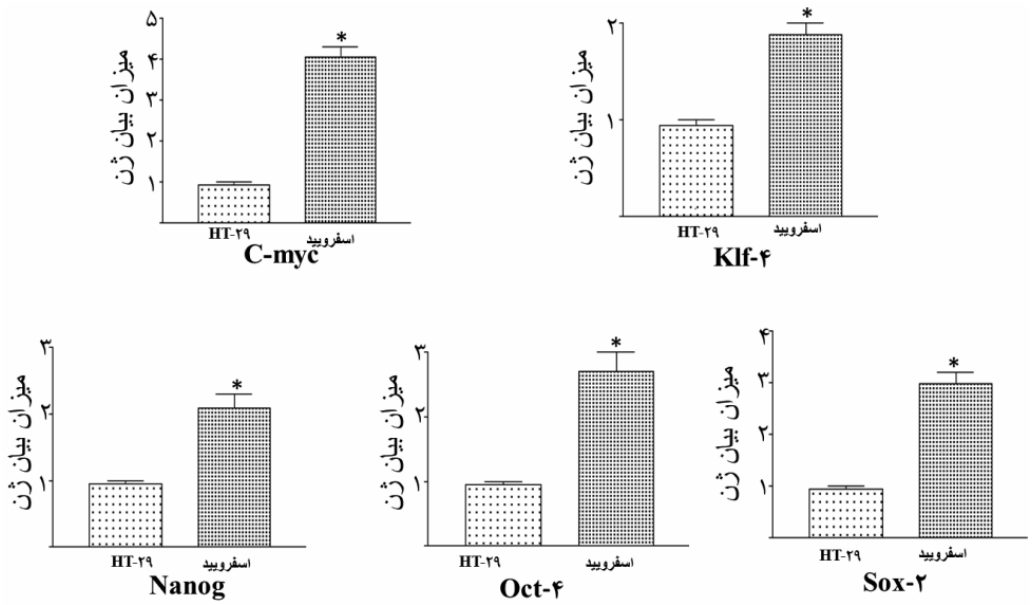
اسفروییدها ویژگی‌های سلول‌های بنیادی سرطانی را نشان می‌دهند

جهت مطالعه ویژگی‌های مولکولی سلول‌های بنیادی سرطانی کولون بیان ژن‌هایی که مرتبط با مسیرهای سلول‌های بنیادی هستند، در سلول‌های اسفروییدی و سلول‌های HT-29 به وسیله RT-PCR بررسی شدند. همان‌طور که در نمودار 1 نشان داده شده است در مقایسه با سلول‌های HT-29 میزان بیان ژن‌های Sox2 ، OctNanog4، Klf4 و C-myc به طور معنی‌داری ($p<0/05$) در سلول‌های اسفروییدی افزایش می‌یابند(نمودار 1).

اسفروییدها توانایی ایجاد تومور را نشان می‌دهند

برای تعیین توانایی تومورزایی اسفروییدها در مقایسه با سلول‌های HT-29، موش‌های nude به صورت زیرجلدی تحت تزریق قرار گرفتند. نتایج نشان داد اسفروییدها در مقایسه با سلول‌های HT-29 خاصیت تومورزایی بیشتری را نشان می‌دهند به طوری که فقط 2500 سلول اسفروییدی برای ایجاد و رشد تومور کافی می‌باشد، در حالی که 1×10^{6} سلول HT-29 قادر به تشکیل تومور در موش‌های nude می‌باشند(جدول 2).

Downloaded from amuj.arakmu.ac.ir at 17:43 +0430 on Monday July 23rd 2018



نمودار 1. بیان ژن‌های مرتبط با چند قوه زایی سلول‌های بنیادی در سلول‌های اسفروییدی و HT-29. میزان بیان ژن‌های Sox 2 ,4 OctNanog، Klf4 وC-mycبه صورت معنی‌داری در سلول‌های اسفروییدی افزایش نشان می‌دهد(p<0/05).

جدول 2.توانایی تومورزایی سلول‌های اسفروییدی و سلولهای HT-29 در موش‌های nude

نوع سلول	تعداد سلول‌های تزریق شده	تشکیل تومور	تشکیل اسفیر های از پیوند زنوگرافت
سلول‌های اسفروییدی	$2/5\times10^3$	2/2	بله
	5×10^5	2/2	بله
سلول‌های HT- 29	5×10^5	0/2	-
	1×10^6	2/2	بله

بحث

در مطالعه حاضر با استفاده از روش‌های برون تنی و درون تنی سلول‌های بنیادی سرطانی کولون در رده سلولی HT-29 شناسایی شد. کلنی‌های اسفروییدی مشتق از سلول‌های HT-29 که در شرایط فاقد سرم و در حضور فاکتورهای رشد تشکیل شدند افزایش بیان شاخص‌های سلول‌های بنیادی CD 44 وEPCAM را به طور معنی‌داری نسبت به سلول‌های HT-29 نشان دادند. هم‌چنین بیان ژن‌های اختصاصی سلول‌های بنیادی شامل Sox2 ، OctNanog4، Klf4 وC-myc در اسفروییدها در مقایسه با سلول‌های HT-29 به طور قابل ملاحظه‌ای افزایش نشان داد. علاوه بر این در شرایط درون تنی یافته‌ها نشان داد سلول‌های اسفروییدی غنی از سلول‌های بنیادی سرطانی در تعداد بسیار کم قادر به القاء تومور در موش‌های nude می‌باشند در حالی که 1×10^6 سلول HT-29 توانایی القاء تومور را داشتند.

شواهد فراوانی این واقعیت را که سلول‌های بنیادی سرطانی ممکن است منشا سرطان‌های انسانی از جمله سرطان کولون باشد را تایید می‌کنند. جداسازی سلول‌های سرطانی از بیماران مبتلا به سرطان با محدودیت‌هایی از قبیل ناهمگن بودن و تغییر پذیری بالا همراه می‌باشد. از این رو رده‌های سلولی سرطانی انسانی می‌توانند به عنوان منابع سلولی با ارزشی با ثبات ژنتیکی و قابلیت تجدید شوندگی برای مطالعه خصوصیات اساسی سلول‌های بنیادی سرطانی در نظر گرفته شوند(9، 10). علاوه براین از آنجایی که سرطان کولون در 95 درصد موارد از نوع آدنوکارسینوم می‌باشد رده سلولی آدنوکارسینوم کولون انسانی HT-29 به عنوان مدل در این مطالعه انتخاب گردید.

در این مطالعه با استفاده از ترکیبی از روش‌های کشت سلولی و بررسی شاخص‌های سطح سلولی، سلول‌های بنیادی سرطانی در رده سلولی مشتق از سرطان کولون شناسایی و خصوصیات آنها مورد بررسی قرار داده شد. یکی

Downloaded from amuj.arakmu.ac.ir at 17:43 +0430 on Monday July 23rd 2018

از ویژگی‌های سلول‌های بنیادی سرطانی مشتق از تومور که اخیرا گزارش شده است توانایی رشد آنها به صورت کلنی‌های اسفروییدی تحت شرایط غیرچسبان در محیط کشت فاقد سرم همراه با فاکتورهای رشد در شرایط آزمایشگاهی می‌باشد(11). روش تشکیل کلنی‌های اسفروییدی با هدف رشد و مطالعه سلول‌های بنیادی سرطانی برای نوروسفیرها (neurospheres)، ماموسفیرها (mammospheres) و کولونوسفیرها (colonospheres) گزارش شده است(4، 12، 13). در این تحقیق در راستای مطالعات گذشته، با استفاده از روش تشکیل اسفرویید، نشان داده شد سلول‌های سرطانی HT-29 تحت شرایط فاقد سرم توانایی رشد به صورت کلنی‌های اسفروییدی را دارند و در حضور 10 درصد سرم جنین گاوی متمایز می‌شوند که نشان دهنده قابلیت خود تجدید شوندگی و توانایی تمایز این سلول‌ها می‌باشد.

طبق یافته‌های به دست آمده،کلنی‌های اسفروییدی مشتق از رده سلولی HT-29 برای سلول‌هایی که شاخص‌های سطحی سلول‌های بنیادی سرطانی را بیان می‌کنند غنی بودند. یکی از ویژگی‌های سلول‌های بنیادی که به طور گسترده پذیرفته شده است شامل بیان آنتی ژن‌های سلول‌های بنیادی، سیکل سلولی کند و تمایز محدود یا تمایز زدایی تحت اثر ریز محیط می‌باشد(14). اخیرا سلول‌های بنیادی سرطانی کولون به وسیله بیان شاخص‌های سطح سلولی از جمله CD44، CD166، CDLGR EPCAM ، ALDH 1 و CD133 مشخص شده‌اند(17-15). کلنی‌های اسفروییدی تشکیل شده از سلول‌های HT-29 بیان افزایش یافته‌ای از شاخص سلول‌های بنیادی سرطانی کولون، CD44، همراه با شاخص اپی تلیالی EPCAM را در مقایسه با سلول‌های HT-29 نشان می‌دهند. این مشاهدات که بیش از 92 درصد اسفروییدهای مشتق از سلول‌های HT-29 شاخص‌های CD 44 و EPCAM را بیان می‌کنند که به عنوان شاخص‌هایی برای سلول‌های بنیادی سرطانی کولون پذیرفته شده است به طور مستدلی نشان می‌دهند که اسفروییدهای تشکیل شده تحت شرایط فاقد سرم عمدتا از سلول‌های بنیادی سرطانی تشکیل شده‌اند. در همین راستا، یانگ و همکاران نشان دادند که جداسازی سلول‌های $CD24^+/CD44^+$ از رده‌های سلولی HT-29 وSW1222 غنی از سلول‌های بنیادی سرطانی کولون می‌باشند که توانایی خود تجدید شوندگی در شرایط آزمایشگاهی را نشان می‌دهند و فقط 200 سلول با این ویژگی‌ها توانایی تومورزایی در موش‌های NOD/SCID را دارا می‌باشند. اگرچه جمعیت سلولی $CD24^-/CD44^+$ به میزان جزئی توانایی کلونوژنیک کمتری نسبت به جمعیت سلولی $CD24^+/CD44^+$ نشان می‌داد اما بر این عقیده هستند که سلول‌های CD 44اهمیت تعیین کننده‌ای برای غنی کردن سلول‌های بنیادی سرطانی دارد، به طوری که حذف CD44 از طریق siRNA در سلول‌های سرطانی کولون با سرکوب رشد تومور در زنوگرافت در موش‌های nude همراه می‌باشد(14). هم‌چنین در مطالعه دیگری، کانوار و همکاران نشان دادند که کلنی‌های اسفروییدی حاصل از رده‌های سلولی کولونی HT-29 و HCT-116 افزایش معنی‌داری در بیان شاخص‌های سلول‌های بنیادی سرطانی کولون شامل CD44،EPCAM،Musashi-1 و LGR-5 در مقایسه با جمعیت سلول‌های غیر اسفروییدی نشان می‌دهند(18).

مطالعات انجام شده روی سلول‌های بنیادی مطرح می‌کنند که بیان ژن‌هایی از قبیلSox2 ، Wnt 2، Oct4، ABCGNanog2 ، CXCR4، Klf4 و C-myc برای حفظ ویژگی‌های اختصاصی سلول‌های بنیادی ضروری می‌باشد. هم‌چنین دخالت بسیاری از این شاخص‌های مولکولی در تعیین خصوصیات اساسی سلول‌های بنیادی سرطانی انسانی مورد مطالعه قرار گرفته است. نتایج حاصل از این تحقیق نیز نشان داد کلنی‌های اسفروییدی مشتق از سلول‌های HT-29 به طور قابل ملاحظه‌ای بیان افزایش یافته‌ای از ژن‌های دخیل در چند قوه زایی (pluripotency) شامل Sox2 ، OctNanog4، Klf4 و C-mycرا در مقایسه با سلول‌های HT-29 دارا می‌باشند.

اسفروییدهای مشتق از سلول‌های HT-29 علاوه بر این که در شرایط درون آزمایشگاهی ویژگی‌های

Downloaded from amuj.arakmu.ac.ir at 17:43 +0430 on Monday July 23rd 2018

سلول‌های بنیادی را نشان می‌دادند در مطالعه‌ای که روی موش‌های nude جهت ارزیابی توانایی تومورزایی صورت گرفت نتایج مشابهی را نشان دادند، به طوری که تعداد محدودی از کلنی‌های اسفروییدی (2500 سلول) قادر به تشکیل تومور در موش‌های nude بودند در حالی که سلول‌های HT-29 در تعداد 1×10^6 توانایی القاء تومور را نشان می‌دادند. تومورهای القاء شده ویژگی‌های مورفولوژیکی آدنوکارسینوم را در دوگروه نشان می‌دادند. مشابه نتایج این مطالعه، تودارو و همکاران نشان دادند که تعداد 500 سلول اسفروییدی تشکیل شده از بافت توموری انسانی برای رشد تومور کافی است در حالی که تعداد 2×10^6 سلول غیراسفروییدی توانایی القاء تومور را ندارند(19).

نتیجه گیری

به طور کلی یافته‌ها نشان می‌دهند که نه تنها سلول‌های بنیادی سرطانی در رده سلولی سرطانی کولونی HT-29 وجود دارد بلکه کلنی‌های اسفروییدی غنی از سلول‌هایی هستند که خصوصیات سلول‌های بنیادی سرطانی کولون را نشان می‌دهند. از این رو به نظر می‌رسد تکنیک تشکیل کلنی‌های اسفروییدی در شرایط آزمایشگاهی جهت غنی کردن سلول‌های بنیادی سرطانی یا به عنوان جایگزینی برای تشکیل تومور می‌تواند روش مفیدی باشد.

تشکر و قدردانی

از آزمایشگاه حیوانات بیمارستان امام خمینی تهران جهت فراهم کردن موش‌های Nude تشکر و قدردانی می‌نماییم. این مطالعه با حمایت مالی دانشگاه تربیت مدرس و پژوهشکده بیماری‌های گوارشی دانشگاه علوم پزشکی تهران انجام گردید.

منابع

1. Jordan CT, Guzman ML, Noble M. Cancer stem cells. New England Journal of Medicine. 2006; 355(12):1253-61.
2. Bonnet D, Dick JE. Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. Nature medicine. 1997;3(7):730-7.
3. Vermeulen L, Felipe De Sousa EM, van der Heijden M, Cameron K, de Jong JH, Borovski T, et al. Wnt activity defines colon cancer stem cells and is regulated by the microenvironment. Nature cell biology. 2010;12(5):468-76.
4. Ricci-Vitiani L, Lombardi DG, Pilozzi E, Biffoni M, Todaro M, Peschle C, et al. Identification and expansion of human colon-cancer-initiating cells. Nature. 2006; 445(7123): 111-5.
5. O'Brien CA, Pollett A, Gallinger S, Dick JE. A human colon cancer cell capable of initiating tumour growth in immunodeficient mice. Nature. 2006;445(7123):106-10.
6. Liu Y, Bodmer WF. Analysis of P53 mutations and their expression in 56 colorectal cancer cell lines. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2006;103(4):976-81.
7. Volchenboum SL, Li C, Li S, Attiyeh EF, Reynolds CP, Maris JM, et al. Comparison of primary neuroblastoma tumors and derivative early-passage cell lines using genome-wide single nucleotide polymorphism array analysis. Cancer research. 2009;69(10):4143-9.
8. Douglas EJ, Fiegler H, Rowan A, Halford S, Bicknell DC, Bodmer W, et al. Array comparative genomic hybridization analysis of colorectal cancer cell lines and primary carcinomas. Cancer research. 2004; 64(14): 4817-25.
9. Siegel R, Naishadham D, Jemal A. Cancer statistics, 2012. CA: a cancer journal for clinicians. 2012;62(1):10-29.
10. Khalek FJA, Gallicano GI, Mishra L. Colon cancer stem cells. Gastrointestinal cancer research: GCR. 2010(Suppl 1):S16-23.
11. Sukach A, Ivanov E. Formation of spherical colonies as a property of stem cells. Cell and Tissue Biology. 2007;1(6):476-81.
12. Singh SK, Clarke ID, Terasaki M, Bonn VE, Hawkins C, Squire J, et al. Identification of a cancer stem cell in human brain tumors. Cancer research. 2003;63(18):5821-8.
13. Kakarala M, Brenner DE, Korkaya H, Cheng C, Tazi K, Ginestier C, et al. Targeting breast stem cells with the cancer preventive compounds curcumin and piperine. Breast

Downloaded from amuj.arakmu.ac.ir at 17:43 +0430 on Monday July 23rd 2018

cancer research and treatment. 2010; 122(3): 777-85.
14. Yeung TM, Gandhi SC, Wilding JL, Muschel R, Bodmer WF. Cancer stem cells from colorectal cancer-derived cell lines. Proceedings of the National Academy of Sciences. 2010;107(8):3722-7.
15. Dalerba P, Dylla SJ, Park I-K, Liu R, Wang X, Cho RW, et al. Phenotypic characterization of human colorectal cancer stem cells. Proceedings of the National Academy of Sciences. 2007; 104(24):10158-63.
16. Klonisch T, Wiechec E, Hombach-Klonisch S, Ande SR, Wesselborg S, Schulze-Osthoff K, et al. Cancer stem cell markers in common cancers–therapeutic implications. Trends in molecular medicine. 2008;14(10):450-60.
17. Huang EH, Hynes MJ, Zhang T, Ginestier C, Dontu G, Appelman H, et al. Aldehyde dehydrogenase 1 is a marker for normal and malignant human colonic stem cells (SC) and tracks SC overpopulation during colon tumorigenesis. Cancer research. 2009; 69(8): 3382-9.
18. Kanwar SS, Yu Y, Nautiyal J, Patel BB, Majumdar AP. The Wnt/β-catenin pathway regulates growth and maintenance of colonospheres. Molecular cancer. 2010; 9(1): 212-3.
19. Todaro M, Alea MP, Di Stefano AB, Cammareri P, Vermeulen L, Iovino F, et al. Colon cancer stem cells dictate tumor growth and resist cell death by production of interleukin-4. Cell stem cell. 2007;1(4):389-402.