Arc

مقاله پژوهشی *مجله سلول و بافت (علمی - پژوهشی)*
جلد۱۰، شماره ۱، بهار ۱۳۹۸

بررسی اثرداروی تاموکسیفن برروی 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 زیست شناسی، کرمانشاه، ایران

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

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۱۰/۱۶ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۳/۲۶

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 سلولیMKN-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 IC50 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 سلولیMKN-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.

نتیجه گیری: 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 مهاری دارد.

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

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

سرطان معده (gasteric cancer) یکی ازعوامل اصلی تهدید سلامت در سراسرجهان است. این سرطان دومین علت مرگ‌ومیر ناشی ازسرطان پس ازسرطان ریه می‌باشد (۱).

تشخیص این بیماری دیرهنگام است، زیرا مراحل اولیه‌ی بیماری ازنظر بالینی خاموش می‌باشد. بالاترین میزان بروز در آسیای شرقی (کره، مغولستان، ژاپن و چین) با نرخ بروز سالانه بین ۴۰ تا۶۰ 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 درایران هستند (۴). علاوه بر این می‌دانیم که تومورها ازلحاظ 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 درطول 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 به‌وجود 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).

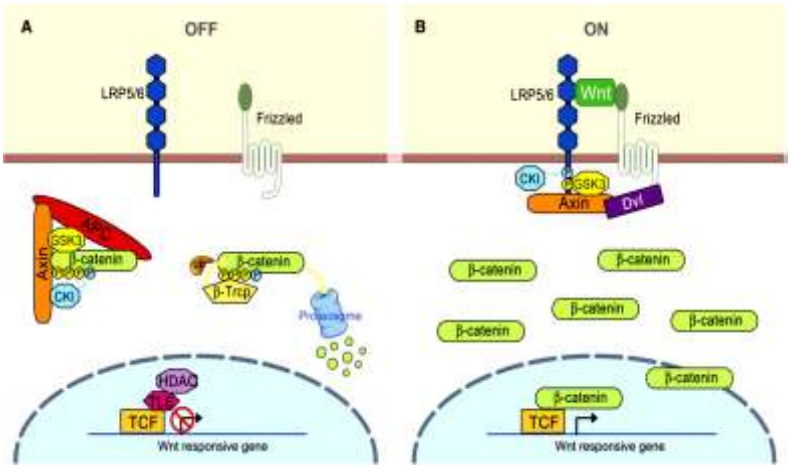
نخستین شواهد مربوط به حضور سلول‌های بنیادی سرطانی و نقش آن‌ها در بروز سرطان در سال ۱۹۹۴ طی مطالعه‌ای بر روی لوسمی حاد میلوئید انسانی به‌دست آمد. طی این مطالعه lapidot و همکاران (۸) موفق به شناسایی و جداسازی جمعیتی از سلول‌های AML با نشانگرهای سطحی CD34+/CD38 از یک فرد مبتلا به لوسمی شدند. این نشانگرهای سطحی در شناسایی سلول‌های بنیادی سرطانی حائز اهمیت هستند. توانایی خودنوزایی و تمایز سلول‌های بنیادی سرطانی تحت تاثیر عوامل مختلفی ازجمله 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 می‌باشدکه سلول را به سمت تکثیر سلولی، قطبیت و تعیین سرنوشت سلول درطول رشد جنین و هومئوستازی بافت هدایت می‌کند. درنتیجه، جهش درمسیر Wnt اغلب بانقص مادرزادی، سرطان و سایر بیماری‌های انسانی در ارتباطاست. این مسیر سیگنالی حاوی پروتئین‌هایی است که باعث انتقال سیگنال و پیام از طریق گیرنده‌های سلولی به سلول می‌شوند. مسیرWnt استاندارد، مسیر قطبش سلولی مسطح غیرکانونی و مسیر Wnt /کلسیم غیر استاندارد است (۱۱-۱۳).

درغیاب پروتئین Wnt، پروتئین سیتوپلاسمی بتاکاتنین به‌طور مداوم توسط کمپلکس Axin تخریب می‌شود. کمپلکس Axin از داربست پروتئین Axin، محصول ژن سرکوب کننده‌ی تومور آدنوماتوزپولیپوسیزکلای (APC)، کازئین کیناز یک آلفا (CK1α) وگلیکوژن سنتاز کیناز ۳ (GSK3) تشکیل‌شده است. CK1α و GSK3 به‌ترتیب منطقه‌ی انتهای آمینی بتا کاتنین را فسفریله می‌کنند. درنتیجه، بتاکاتنین توسط b-Trcp و واحدE3 یوبیکوئیتینین لیگاز شناخته شده و پس از آن بتا کاتنین یوبیکوئیتینه شده و توسط پروتئازوم تجزیه می‌شود. این حذف مداوم بتا کاتنین، از رسیدن بتا کاتنین به هسته جلوگیری می‌کند و در نتیجه ژن‌های هدف Wnt توسط پروتئین‌های خانواده‌ی فاکتور سلول T متصل شونده به DNA/فاکتور تقویت‌کننده لنفوید (TCF/LEF)

www.SID.ir

Archive of SID

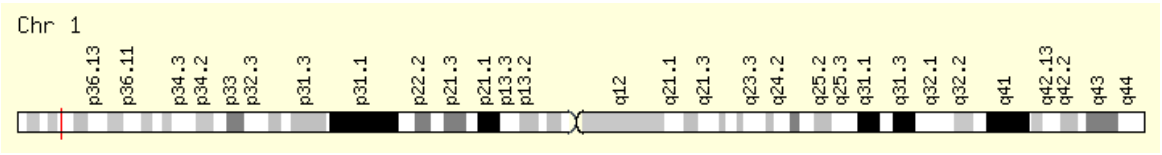
سرکوب می‌شوند. مسیر Wnt/b-catenin زمانی فعال می‌شود که لیگاند Wnt به‌گیرنده‌ی ۷ بارگذرنده از غشای Frizzled (Fz, Fzd) متصل شود و کمک گیرنده‌ی آن، گیرنده لیپوپروتئین با چگالی کم مرتبط با پروتئین ۶ (LRP6)، یا نزدیک LRP5 است. شکل‌گیری کمپلکس Wnt-Fz-LRP6، همراه با آمدن پروتئین داربست Dishevelled (Dvl)، منجر به فسفوریلاسیونLRP6 و فعال‌سازی و وارد شدن کمپلکس Axin به‌گیرنده می‌شود. این وقایع منجر به مهار فسفوریلاسیون-β catenin به‌وسیله Axin می‌شود و به‌این‌ترتیب باعث تثبیت β–catenin شده که درنتیجه تجمع و سفر آن به هسته برای تشکیل کمپلکس باTCF /LEF و فعال شدن ژن‌های هدفWnt، بیان ژن هدف اتفاق می‌افتد (شکل۱-B) (۱۴).



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

از زمان کشف اولیه، مسیر سیگنالی Wnt با سرطان ارتباط داشته است. هنگامی‌که Wnt1 کشف شد، ابتدا به‌عنوان یک پروتوآنکوژن در مدل موشی برای سرطان پستان شناخته شد. این واقعیت‌که 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 به‌رشد 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 کاملا تحت کنترل می‌باشد.

افزایش فعالیت بتا-کاتنین در بسیاری از تومورهای انسانی از جمله کارسینوم هپاتوسلولار (کبد)، سرطان پستان، سرطان روده بزرگ، سرطان ریه، سرطان تخمدان و سرطان مخاط رحم گزارش‌شده است (۱۶). پروتئین برهم‌کنش دهنده با بتاکاتنینیک (*CTNNBIP1*) 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 (شکل۲) (۱۷).



شکل ۲: موقعیت ژنومی ژن *CTNNBIP1*

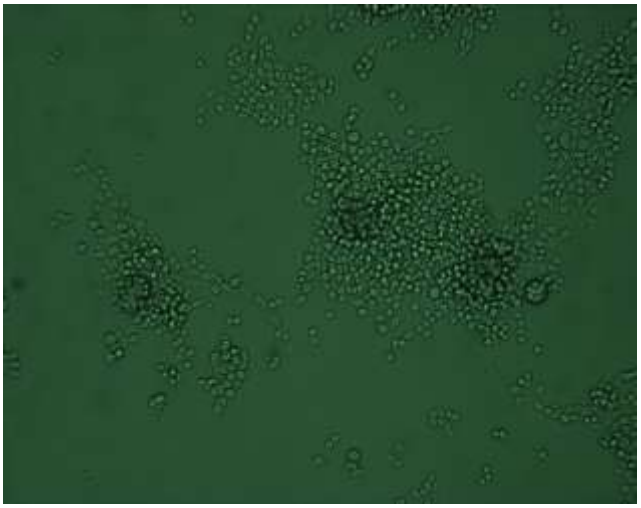
www.SID.ir

Archive of SID

تاموکسیفن، اولین داروی آنتی استروژنی است که برای درمان سرطان پستان وابسته به هورمون به‌کار 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 ازجمله فاکتورهای رشد و عوامل ایجادکننده‌ی رگ‌زایی ترشح شده توسط تومور می‌شود، درنتیجه رشد و تکثیر سلول‌های سرطانی پستانی مهار می‌شود (۱۹). یافتن ژن‌هایی که به‌طور متمایز در شرایط و تحت تاثیر داروهای مختلف بیان می‌شوند بخش جدایی‌ناپذیر از درک مبانی مولکولی سرطان است (۲۰). این مطالعه با هدف جداسازی سلول‌های بنیادی سرطانی از رده‌ی سلولی MKN-45 مربوط به سرطان معده و سپس بررسی اثر داروی تاموکسیفن بر روی بیان ژن *CTNNBIP1* 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 (شکل۳).

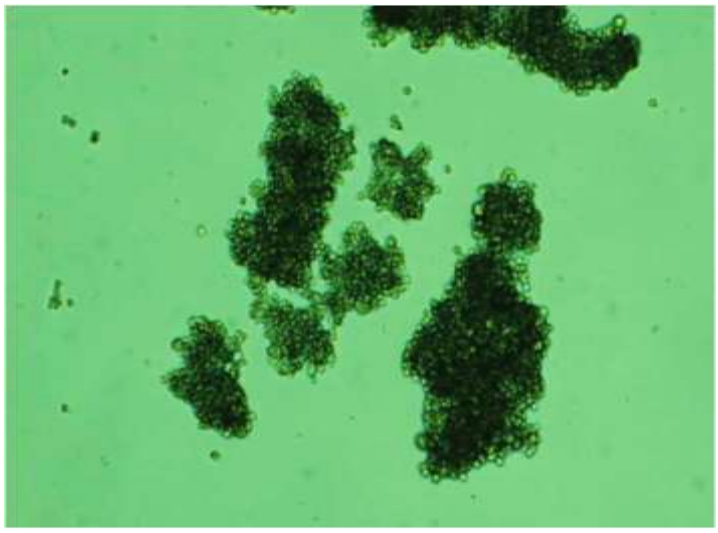


شکل۳: مورفولوژی رده‌ی سلولیMKN-45 (این سلول‌ها اپیتلیالی هستند و از نوع سلول‌های چسبنده می‌باشند، از لحاظ ظاهری به‌صورت دوکی شکل هستند و از آدنوکارسینومای معده گرفته شده‌اند، بزرگنمایی 40x).

جداسازی سلول‌های بنیادی سرطانی از رده سلولی MKN-45: از رده سلولی MKN-45 تعداد ۳×۱۰۴ سلول در فلاسک T25 که قبلا کف آن با لایه ی نازکی از آگارز یک درصد (Fermentas, Canada) 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 (Gibco، USA) 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).

www.SID.ir

Archive of SID



شکل۴: 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 به‌هم پیوستند. پس از گذشت ۱۴ روز این سلول‌ها که سلول‌های سرطانی بنیادی محسوب می‌شدند به‌منظور مطالعات بیشتر جداسازی شدند (بزرگنمایی 40x).

بررسی بقای سلولی: ارزیابی میزان بقای سلول‌های بنیادی سرطانی تیمار شده با استفاده از رنگ‌آمیزی تریپان بلو به‌دست 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 مولارکشت داده شد. سپس بعد از ۴۸ پس از تریپسینه، سوسپانسیون حاصل را با دور ۲۰۰g به‌مدت 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 جداشده از رده-سلولی MKN-45 با داروی تاموکسیفن: تعداد ۴۰۰۰۰۰ سلول بنیادی سرطانی جدا شده از رده سلولی MKN-45 به‌صورت جداگانه در فلاسک T25 که قبلا با لایه نازکی از آگارز استریل یک درصد پوشیده شده بود 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 به‌مدت 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 استخراجRNA کل از ترایزول (NEB, England) استفاده شد و استخراج از نمونه‌های تیمار و کنترل (بدون اثر دارو) بر اساس دستوالعمل انجام شد، مواد مورد استفاده برای استخراج RNA از طریق این روش به‌ترتیب عبارتند از ترایزول، 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 برماید (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 ارائه‌شده سنتز شد. طبق

www.SID.ir

Archive of SID

دستورالعمل کیت، مخلوطی از بافر Prime Script، آنزیم رونویسی کننده معکوس، پرایمرOligo-dT، پرایمرRandom hexamer، مهار کننده ریبونوکلئاز به‌آن اضافه شد و با آب RNase Free به‌حجم مورد نظر رسانده شد، در نهایت به‌مدت 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 مرحله‌ی بعد پس از تکثیر ژن *CTNNBIP1* به‌وسیله یک واکنش PCR به‌منظور 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 به‌دست آمد (جدول ۱) (۲۱).

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'-AATTAACTTCAGGCAAACAGGTG -3'	23		

جدول۱: پرایمر های استفاده شده برای تست Real-time RT-PCR

رشته cDNA حاصل از نسخه‌برداری معکوس تحت تاثیر آنزیم Taq DNA polymerase، پرایمرهای اختصاصی ژن‌های مورد نظر و نوکلئوتیدهاتحت شرایط زمانی و دمایی مشخص به‌منظور تائید بیان ژن‌های موردمطالعه، تکثیر شدند. به‌منظور بررسی کمی بیان رونوشت‌های ژن، واکنش Quantitative Real-Time PCR با شرایط یکسان برای آن در دستگاه Real-Time ترمال سایکلر Rotor-gene (Corbett, Australia) ۳۰۰۰ و توسط کیت SYBR Green PCR Quanti Fast خریداری شده از شرکت زیست باران، نماینده کمپانی(Qiagen (Germany طبق دستورالعمل کیت انجام شد. مطالعهReal-time PCR برای بررسی بیان ژن *CTNNBIP* در سلول‌های کنترل (بدون اثر دارو) و تیمار صورت گرفت. دو روش که عمدتا 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 سیگنال PCR رونوشت هدف را در یک گروه تیمار به نمونه دیگر به‌عنوان 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.

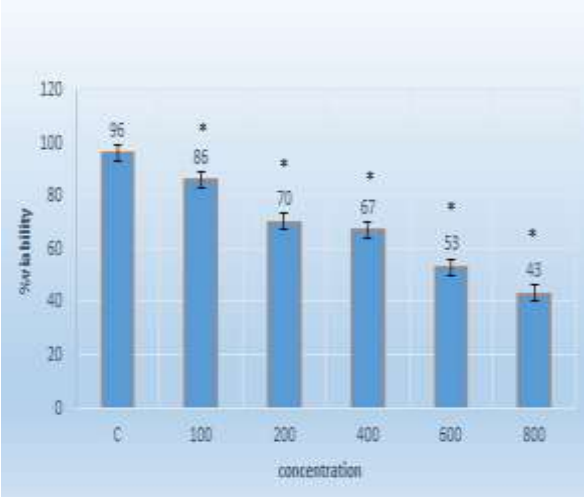
نتایج

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 IC50 برای سلول‌های بنیادی سرطانی مشتق شده از رده‌ی سلولی MKN-45 ۶۸۰ میکرو مولار در تست ۴۸ ساعته بود (نمودار ۱).

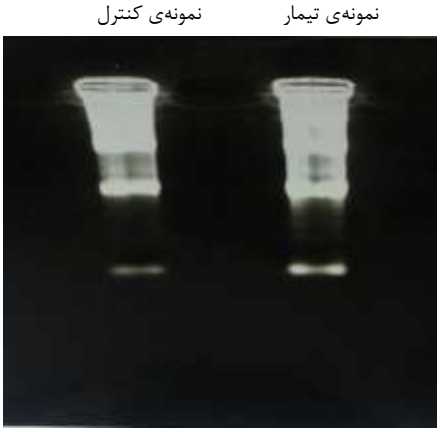
www.SID.ir

Archive of SID



نمودار۱: نمودار IC50 برای غلظت‌های مختلف داروی تاموکسیفن در تیمار ۴۸ ساعته با استفاده ازروش تریپان بلو (IC50 ۶۸۰ میکرومولار به‌دست آمد).

پس از آنالیز آماری به‌وسیله ی آزمون T-test (نرم افـزار spss) معنی‌داری نتایج به دست آمده تایید شد و غلظـت ۱۰۰ میکرومولار به‌عنوان غلظت مناسب برای تیمار نهایی در ۴۸ ساعت انتخاب شد. تصویر حاصل از ژل الکتروفـورز نمونه ی RNA کل استخراج شده نشان دهنده‌ی صـحت 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)

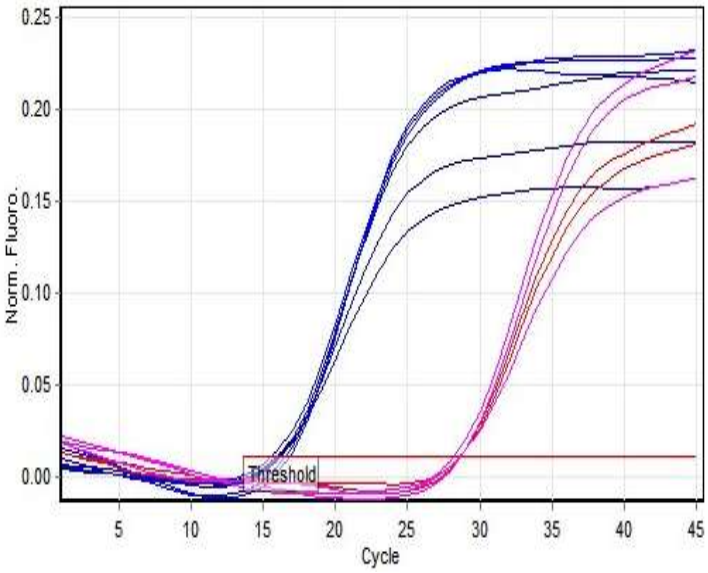
همچنین تصویر حاصل از ژل الکتروفـورز محصـول تکثیـر شده‌ی ژن بیان کننده ی صحت و کیفیت پرایمرهـای ژن مورد نظر بود (شکل ۶).

شکل ۶: ژل الکتروفورز محصول تکثیر شده‌ی ژن با استفاده از تکنیک PCR (به‌وسیله‌ی الکتروفورز در ژل آگارز باند مربوط به ژن *CTNNBIP1* با طول ۱۰۰ جفت باز درکنار DNA Ladder ۵۰ جفت بازی مشاهده شد، همچنین کیفیت و صحت عملکرد پرایمرها نیز تایید شد.

سطح بیان ژن *CTNNBIP1* در مسـیر سـیگنالی Wnt در سلول‌های بنیادی سرطانی مشتق شده از رده‌ی سلولی MKN-45 تحت تیمار با غلظت۱۰۰میکرومـولار داروی تاموکسیفن به‌مدت ۴۸ ساعت تغییـر کـرد. نتـایج حاصـل ازReal-time-PCR طبق محاسبات ذیل نشان داد کـه داروی تاموکسـیفن بیـان ژن *CTNNBIP1* را در سـلول‌هـای بنیـادی سـرطانی مشـتق شـده از رده‌ی سلولیMKN-45 بـه‌میـزان ۱/۴برابـر افـزایش مـی‌دهـد (نمودار۲).

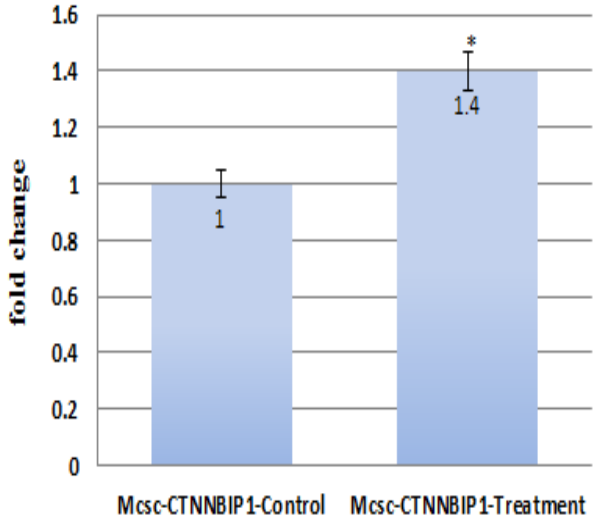
www.SID.ir

Archive of SID



نمودار۲: نمودارتکثیر و مقایسه ی 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 به‌صورت سه بار تکرار انجام شد).

همچنین اطلاعات حاصل از آنـالیز داده‌هـا بـا اسـتفاده از آزمون t-test بررسی و مقایسه شدند و معنی‌داری این نتایج تایید شد ($p_{value}<0.05$) (نمودار ۳).



نمودار۳: 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).

ΔCt (control) = Ct CTNNBIP1 gene – Ct GAPDH gene
ΔCt (control) = 28.64 – 15.95 = 12.69
ΔCt (treatment) = Ct CTNNBIP1 gene – Ct GAPDH gene
ΔCt (treatment) = 28.49 – 16.28 = 12.21
$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct$ (treatment) – ΔCt (control)
$\Delta\Delta Ct$ = 12.21 – 12.69 = – 0.48
Relative fold chang = $2^{-\Delta\Delta Ct}$
Relative fold chang = $2^{0.48}$ = 1.4

www.SID.ir

Archive of SID

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 به‌حضور 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. ازاین‌رو برای درمان سرطان، سلول‌های بنیادی سرطانی باید موردتوجه 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 ازجمله 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 شناخته‌شده 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 شناخته‌شده 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 به‌گیرنده‌ی استروژن اتفاق می‌افتد و پس از ایجاد تغییرات ساختاری در این گیرنده رونویسی RNA تغییریافته 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 ازجمله 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 سلول های 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 سلولیMKN-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 به‌مدت ۴۸ ساعت نگهداری شدند. پس از استخراج RNA و ارزیابی کیفیت RNA استخراج شده به‌وسیله‌ی تست PCR درنهایت سنتز cDNA را انجام داده و به بررسی بیان ژن موردنظر یعنی *CTNNBIP1* به‌وسیله‌ی آنالیز Real-Time PCR پرداختیم. با توجه به این نتایج ژن *CTNNBIP1* در نمونه‌های تیمار شده

www.SID.ir

Archive of SID

با داروی تاموکسیفن افزایش بیان به‌میـزان ۱/۴ برابـری را نشان داد. با توجه بـه اینکـه پـروتئین حاصـل از ایـن ژن نقـش مهارکننـده بـر روی پـروتئین بتـا-کـاتنین دارد و همچنین با توجه به نقش تجمع بتا کاتنین و تـاثیر آن بـر روی پیشـرفت سـرطان معـده کـه توسـط Wilson و همکاران (۳۱) مطالعه و بررسی‌شده اسـت. نقـش مهـاری پـروتئین *CTNNBIP1* مـی‌توانـد بسـیار مـوثر باشـد و به‌عنوان یکی از اهداف درمانی در درمان سرطان معـده در نظر گرفته شود.

نتیجه‌گیری

در یک نتیجه‌گیری کلی از این پروژه مـی‌تـوان گفـت کـه جداسازی سلول‌های بنیادی سرطان معده از رده‌ی سلولی MKN-45 در شرایط کشـت سـه‌بعـدی و بـدون اضـافه کردن فاکتور رشد در طی ۱۴ روز انجام شد. نتـایج نشـان داد که داروی تاموکسیفن که یک داروی غیراستروئیدی از خـانواده‌ی میـانجی‌گرهـای گیرنـده‌ی اسـتروژن انتخـابی (SERM) است، می‌تواند تکثیر و قدرت تومورهایی را در سلول‌های بنیادی سرطان معـده کـاهش دهـد. همچنـین تیمار با این دارو سـبب افـزایش بیـان ژن *CTNNBIP1* می‌شود. پروتئین حاصل از این ژن مهارکننده‌ی پـروتئین بتا کاتنین می‌باشد. بتا کاتنین از پروتئین‌های اصلی مسیر سیگنالی Wnt است و افـزایش بیـان ژن *CTNNBIP1* در نمونه‌ی تیمار شده با داروی تاموکسیفن نشان‌دهنده‌ی نقش مهاری این دارو در غلظـت مشـخص بـر روی مسـیر سیگنالی می‌باشد.

تشکر و قدردانی

ایـن پـژوهش در آزمایشـگاه تحقیقـاتی سـلولی مولکـولی دانشگاه رازی کرمانشاه صـورت پـذیرفت. از آقایـان بهـروز مرادی و کیومرث مهدی زاده و خانم دیبا فراهانی که ما را در به‌پایان رساندن این پروژه یاری کردنـد کمـال تشـکر و قدردانی به‌عمل می‌آید.

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 onS 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.

www.SID.ir

Archive of SID

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.

www.SID.ir

Archive of SID

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.

www.SID.ir

Archive of SID

Journal of Cell & Tissue (JCT) *Original Article*
Spring 2019; 10(1)

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

www.SID.ir