(مقاله پژوهشی)

افزایش بیان مسیرهای پیام رسانی Notch و Wnt در سلوهای شبه بنیادی رده سلولی ملانومای متاستاتیک(A375)

مریم مهدی‌پور[1]، فائزه کیقبادی[2]، جواد فیروزی[3]، پردیس خسروانی[4]، مرضیه ابراهیمی[5*]

۱-کارشناس ارشد زیست‌شناسی جانوری گرایش علوم سلولی-تکوینی.
۲-دانشجوی کارشناس ارشد زیست‌شناسی جانوری گرایش علوم سلولی-تکوینی.
۳-کارشناس ارشد سلول‌های بنیادی و زیست-شناسی تکوینی.
٤- کارشناس ارشدسلولی و مولکولی.
۵-دانشیار گروه پژوهشگاه رویان.

۱و۲-گروه زیست‌شناسی جانوری گرایش علوم سلولی-تکوینی، دانشگاه علم و فرهنگ، تهران، ایران.
۳و٤و۵- گروه سلول‌های بنیادی و زیست‌شناسی تکوینی،مرکز تحقیقات علوم سلولی، گروه سلول-های بنیادی و زیست‌شناسی تکوینی، پژوهشکده زیست‌شناسی و فناوری سلول‌های بنیادی جهاد دانشگاهی، تهران، ایران.

*نویسندهٔ مسؤول:
مرضیه ابراهیمی؛ گروه سلول‌های بنیادی و زیست-شناسی تکوینی،مرکز تحقیقات علوم سلولی، گروه سلول‌های بنیادی و زیست‌شناسی تکوینی، پژوهشکده زیست‌شناسی و فناوری سلول‌های بنیادی جهاد دانشگاهی، تهران، ایران.
تلفن: ۰۰۹۸۲۱۲۳۵۶۲۵۱۶
Email: mebrahimi@royaninstitute.org

چکیده

زمینه وهدف: ملانومای متاستاتیک بدخیم‌ترین نوع سرطان پوست است؛ سختی‌های درمان ملانوما به وجود سلول‌های بنیادی سرطان در ملانوما نسبت داده شده‌اند. خصوصیات سلول‌های بنیادی سرطانی می‌تواند به‌وسیله به هم خوردن تنظیم مسیرهای پیام‌رسانی سلولی Notch و Wnt به دست بیاید. هدف ما از این مطالعه به دست آوردن سلول‌های بنیادی ملانوما از رده سلولی متاستاتیک A375 و سپس بررسی خودنوزایی و خصوصیات بنیادینگی و همچنین بررسی میزان بیان ژنهای مرتبط با دو مسیر Wnt و Notch در این سلول‌ها نسبت به سلول‌های چسبنده توموری است.

روش بررسی: سلول‌های اسفیری از سلول‌های چسبنده توموری جدا شدند. اسفیرزایی و کلنی زایی، بیان پروتئین‌های CD133 و Nestin، ژن‌های Nanog, NESTIN و Oct4 به‌عنوان ژن‌های مرتبط با بنیادینگی و ژن‌های مسیر Notch و Wnt در دو گروه اسفیری و سلول‌های چسبنده توموری بررسی شدند.

یافته ها: با توجه به نتایج ما، سلول‌های اسفیری قدرت اسفیرزایی و کلنی زایی و بیان پروتئین Nestin بالاتری از سلول‌های چسبنده توموری داشتند؛ درحالی‌که بیان CD133 به‌طور معنی‌داری تغییر نداشت. ژن‌های مسیر Wnt و ژن‌های فرودست آن (β-catenin, cyclinD1, c-Myc)، ژن‌های فرودست مسیر Notch شامل ژن‌های (Notch1, HES1) و ژن‌های Nanog و NESTIN در اسفیرها بیان بالایی داشت.

نتیجه‌گیری: نتایج ما شواهد محکمی برای خصوصیات شبه بنیادی بودن اسفیرها به‌عنوان مدل مؤثری در تحقیق سلول‌های بنیادی ملانوما فراهم کرد، همچنین یافته‌های ما افزایش بیان مسیرهای Notch و wnt در سلول‌های اسفیری رده سلولی ملانومای متاستاتیک A375 را به‌عنوان سلول‌های شبه بنیادی برای اولین بار تائید کرد که این یافته‌ها می‌توانند در درمان و هدف‌گیری سلول‌های بنیادی ملانوما به کار روند.

واژه‌های کلیدی: ملانوما، سلول‌های بنیادی، اسفیر، Notch، Wnt.

دریافت مقاله: ۱۳۹٦/٤/۱۸ **دریافت مقالهٔ اصلاح‌شده:** ۱۳۹٦/۹/۱ **اعلام قبولی:** ۱۳۹٦/۹/۸

Archive of SID
www.SID.ir

مقدمه

ملانوما سخت‌ترین نوع سرطان پوست است که در دنیا به‌سرعت در حال گسترش است؛ علت پیدایش ملانوما را تکثیر افسارگسیخته ملانوسیت ها می‌دانند که در کمتر از ٦ ماه سبب مرگ بیمار می‌شود (۱). با توجه به میزان کم پاسخ بیماران به درمان‌های رایج ضد سرطان، اثربخشی ناچیز داروها در سلول‌های توموری، بازگشت و گسترش سریع تومور در بدن، تحقیقات محققان به سمت یافتن سلول‌های بنیادی سرطان در ملانوما گسترده شد (۲)و نهایتاً منجر به یافتن جمعیتی از سلول‌های سرطانی شد که مسئول آغاز تهاجم، حفظ تومور و متاستاز آن به سایر نقاط بدن شد (۳-۵).

از مهم‌ترین خصوصیات سلول‌های بنیادی سرطان بیان شاخص‌های بنیادینگی است؛ بیان این شاخص‌ها در سطح سلولی، پروتئینی و ژنی افزایش قدرت تکثیر، خودنوزایی و مهاجرت سلولی را در سرطان به دنبال دارد. در ملانوما تحقیقات نشان داده است حضور CD166، Nestin،CD133 ، EpCAM به‌عنوان شاخص‌های پروتئینی و ژن‌های بنیادینگی Nanog، Oct4/3، Sox 9 و Nestin از مهم‌ترین ژن‌های بیان‌شده در هر جمعیت سلولی بنیادی سرطانی است(٦, ۷).

سلول‌های بنیادی سرطانی همانند سلول‌های بنیادی جنینی و بزرگ‌سالی افزایش بی‌رویه مسیرهای حفاظت‌شده پیام‌رسانی سلولی Wnt, Notch, SHH را از خود نشان داده‌اند که نقش این مسیرهای مهم سلولی در سلول‌های بنیادی سرطان‌های کلون، روده، پستان و گلیوبلاستوما نیز به‌عنوان تشدیدکننده مسیرهای خودنوزایی و تکثیر سلول‌های توموری به‌خوبی نشان داده‌شده است(۳). در مسیر Wnt پس از اتصال آن به Frezlled کمپلکس پیرامونی آن β-catenin را فعال و به هسته گسیل می‌دارد؛ این کمپلکس بااتصال به فاکتورها رونویسی از ژن‌های MYC، MMP-7، CD44 را به راه انداخته تا سلول به سمت تهاجم و تکثیر رهنمون گردد (۸, ۹). با فعال شدن مسیر Notch نیز قطعه سیتوپلاسمی آن NICD به هسته رفته و رونویسی از دو ژن مهم در فرآیند بنیادینگی Oct4 و Sox2 را تسریع می‌کند (۱۰, ۱۱). ازآنجاکه سلول‌های بنیادی سرطان به تعداد کم در بافت سلول‌های سرطانی وجود دارند نیاز به استفاده از روش‌های مناسب جداسازی این سلول‌ها از سلول‌های چسبنده توموری (Bulk Cells) سرطانی مکرراً احساس می‌شود. در این میان اسفیرهای منشأ گرفته از سلول‌های سرطانی به دلیل اینکه خودنوزایی سریعی دارند، می‌توانند تبدیل به غضروف، استخوان و چربی شوند و مهم‌تر اینکه نسبت به سلول‌های توموری چسبنده در موش تومورهایی با متاستاز بیشتر و اندازه بزرگ‌تر ایجاد می‌کنند که همین امر نشان از بنیادینگی این سلول‌ها دارد. به همین دلیل مدل اسفیرزایی سلول‌های سرطانی به‌عنوان مدلی برای جداسازی سلول‌های بنیادی سرطان به کار می‌رود (۱۲-١٤). جداسازی سلول‌های بنیادی سرطان با این روش، علاوه بر اینکه بازتاب‌دهنده خصوصیات سلول‌های بنیادی سرطان است، البته می‌تواند در تبیین صحیح رفتار سلول‌های سرطانی در هنگام هدف‌گیری این سلول‌ها با داروها مؤثر باشد که در مطالعه ما نیز بررسی و تبیین خصوصیات سلول‌های اسفیری ملانوما به‌عنوان مدلی از جداسازی سلول‌های بنیادی سرطان مدنظر قرار داده شد. همگام با سایر مطالعات درمانی و به‌منظور یافتن استراتژی‌های درمانی در ملانوما، در این مطالعه ما ابتدا سلول‌های شبه بنیادی سرطان از سلول‌های چسبنده توموری رده سلولی ملانومای متاستاتیک A375 را با روش تشکیل اسفیر جدا کردیم و سپس شبه بنیادی بودن آن‌ها نسبت به سلول‌های چسبنده توموری را بررسی نمودیم.

روش بررسی

۱) رده سلولی موردمطالعه

Archive of SID
www.SID.ir

در این مطالعه از سلول‌های A375 که رده متاستازی ملانوما است استفاده شد. این سلول‌ها از بخش آنکولوژی دانشگاه و بیمارستان بازل سوئیس به آزمایشگاه سلول‌های بنیادی پژوهشگاه رویان اهدا شد.

۲) کشت سلولی

برای کشت سلولی سلول‌های چسبنده توموری (Bulk)، حدود ۵۰۰۰۰۰ سلول در دمابان‌ها T25 در مجاورت محیط DMEM به همراه ۱۰ درصد سرم جنینی گاوی، ۱ درصد پنی‌سیلین/ استرپتومایسین، ۱ درصد گلوتامین و ۱ درصد اسیدآمینه‌های غیرضروری (تهیه‌شده از شرکت (GIBCO) کشت داده شدند.

۳) اسفیرزایی

برای انجام تست اسفیرزایی فلاسکهای T25 با پلی هما (یک درصد) پوشش داده شدند. سپس محیط DMEM

بدون سرم به همراه فاکتورهای رشد Bfgf،b27 و EGF در فلاسک ریخته شد (۱۵, ۱۶). برای بررسی قدرت تولید اسفیرها ۲۰ میکرو لیتر از محیط حاوی اسفیرهای جمع‌آوری‌شده از فلاسک به‌صورت قطره در ظرف‌های ویژه کشت باکتری گذاشته شد و اسفیرهای با قطر بیشتر از ۷۰ میکرومتر شمرده شدند. درصد نهایی اسفیرها در فلاسک از فرمول زیر محاسبه شد:

$$\text{درصد اسفیر زایی} = \frac{\text{میانگین تعداد اسفیرها در سه قطره}}{\text{تعداد کل سلول های ریخته شده در فلاسک}} \times ۱۰۰$$

٤) کلنی زایی

به‌منظور بررسی قابلیت کلنی زایی سلول‌های چسبنده توموری و سلول‌های اسفیری (ملانو اسفیرها) در هر خانه از پلیت ٦ خانه تعداد ۱۰۰ سلول همراه با محیط کشت کامل DMEM (DMEM حاوی ۱۰٪ سرم جنینی گاوی) ریخته شد. پس از گذشت ۷ روز کلنی‌های بزرگ‌تر از اندازه ٤۰۰ میکرومتر شمارش شدند. هم‌چنین شکل کلنی‌ها نیز موردبررسی قرار گرفت.

۵) ایمنوفنوتایپینگ

در ابتدا جهت بررسی شاخص سطحی CD133 در هر دو گروه سلولی، پس از شستشو و جداسازی آن‌ها، سلول‌ها همگن‌شده و در دو لوله ویژه فلوسایتومتری سوسپانسیونی سلولی با میزان ۱۵۰۰۰۰ تا ۲۰۰۰۰۰ سلول ریخته شد. در شرایط بدون نور یک لوله ایزوتایپ کنترل و در لوله دیگر آنتی‌بادی علیه CD133 ریخته شد. دو لوله حاوی سلول‌ها پس از انکوباسیون ۳۰ دقیقه‌ای در یخ، سانتریفیوژ و سپس برای خوانده شدن توسط دستگاه BD FACS Calibor به آزمایشگاه فلوسایتومتری منتقل شدند. جهت آماده‌سازی سلول‌ها برای شاخص درون‌سلولی Nestin ۱۰۰۰۰۰۰ سلول در لوله ریخته شده، به سلول‌ها پارافرمالدهید ٤٪ اضافه شد، پس از ۱۵ دقیقه سلول‌ها باPBS/tween(1%) شستشو داده شدند. سلول‌ها توسط TritonX100(2%) به مدت ۱۵ دقیقه نفوذپذیر شدند، پس از شستشوی دوباره، به سلول‌ها محلول بلاک کننده حاوی سرم ۱۰٪ اضافه شد و به مدت ۳۰ دقیقه این سوسپانسیون سلولی در یخچال قرار داده شدند، سپس سلول‌ها به تعداد مساوی بین دو لوله تقسیم شدند؛ به یک لوله آنتی‌بادی اولیه اضافه شد، سلول‌ها ٤۵ دقیقه در یخچال قرار داده شدند و به آن‌ها آنتی‌بادی ثانویه اضافه شد؛ نمونه‌ها پس از انکوباسیون در یخچال برای خوانده شدن توسط دستگاهBD FACS Calibor به آزمایشگاه فلوسایتومتری منتقل شدند.

Real time PCR (٦

برای بررسی بیان ژن‌های مرتبط با بنیادینگی ژن‌های Oct4, Nanog, NESTIN و از مسیر Noch ژن‌های Notch1, HES1 و HES5 و مسیر Wnt ژن‌های-c Myc، cyclinD1 و β-catenin در سلول‌های A375، در هر دو نوع سلول چسبنده توموری و اسفیر روش Real time PCR با استفاده از سایبر گرین به‌کاربرده شد. پس از جداسازی سلول‌ها و شستن آن‌ها، توسط ترایزول RNA سلول‌ها استخراج شد، به رسوب حاصل DNaseI اضافه شد و سنتز c-DNA توسط کیت فرمنتاز صورت

Archive of SID
www.SID.ir

پذیرفت. در جدول ۱ توالی پرایمرهای ژن‌های بررسی‌شده در این مطالعه قابل‌مشاهده است.

۷) آنالیز آماری:

شاخص‌های میانگین و SD برای سه تکرار بیولوژیک در این مطالعه در جهت بررسی توزیع داده استفاده شد. نتایج با تست Mann-Whitney Test با سطح معنی‌داری $p<۰/۰۵$ با استفاده از نرم‌افزار SPSS بررسی شدند.

یافته‌ها

بررسی قدرت بنیادینگی (اسفیرزایی و کلنی زایی)

سلول‌های رده سلولی ملانومای متاستاتیک A375 کشیده و چسبنده به سطح‌اند. (شکل A-۱) درحالی‌که سلول‌های اسفیری سلول‌هایی با ساختار بیضی‌شکل (خوشه‌انگوری نامنظم) و به هم چسبیده داشتند. (شکل B-۱). از مشخصه‌های سلول‌های بنیادی سرطان قدرت تولید سریع کلنی‌هایی مانند خود است؛ همچنین این سلول‌ها می‌توانند در شرایط غیر چسبنده ساختارهای سلولی اسفیر مانند را تولید کنند که هر دو این شاخصه‌ها وابسته به خصوصیت خودنوزایی سریع سلول‌های بنیادی سرطان است؛ به این معنی که در سلول‌های سرطانی هر چه قدرت تشکیل کلنی‌ها بیش‌تر باشد، آن سلول‌ها قدرت بنیادینگی بیش‌تری دارند. مطالعه ما نشان داد سلول‌های اسفیری نسبت به سلول‌های چسبنده توموری ۱/۵ برابر از قدرت اسفیرزایی بالاتری برخوردار بودند. (شکل A-۲). ضمن این‌که اسفیرها نسبت به سلول‌های توموری چسبنده ۵۰٪ قدرت کلنی زایی بیشتری از خود نشان دادند. همچنین اندازه کلنی‌های تشکیل‌شده در این سلول‌ها نیز بزرگ‌تر از اندازه کلنی‌های تشکیل‌شده از سلول‌های چسبنده توموری بود. (شکل B-۲)

بررسی بیان پروتئین‌های مرتبط با بنیادینگی

شاخص‌های پروتئینی CD133 و Nestin به‌عنوان گزینه‌های مناسب برای جداسازی و شناسایی سلول‌های بنیادی سرطان مطرح می‌باشند. CD133 شاخص پروتئینی سطح سلولی و Nestin نیز ازجمله شاخص پروتئینی درون‌سلولی است که در سلول‌های بنیادی منشأ گرفته از تاج عصبی بیان دارد. ایمنوفنوتایپینگ دو گروه سلولی ملانومایی رده سلولی A375 (شکل A,B-۳) تفاوت معنی‌داری در بیان شاخص CD133 در اسفیرها و سلول‌های چسبنده توموری نشان نداد، (شکل C,D-۳) اما بیان Nestin در اسفیرها افزایشی بیش از ده برابر در مقایسه با سلول‌های چسبنده توموری نشان داد. (شکل E,F-۳)، (شکل G, H-۳)

بررسی بیان ژن‌های مرتبط با بنیادینگی

مطالعات نشان داده‌اند که ژن‌های NESTIN، Nanog و Oct4 از مهم‌ترین ژن‌های مرتبط با بنیادینی‌اند که در شناسایی و تشخیص سلول‌های بنیادی کاربرد فراوانی دارند. بررسی میزان بیان این ژن‌ها در سلول‌های چسبنده توموری و اسفیرهای رده سلولی ملانومای متاستاتیک A375 نشان داد بیان ژن NESTIN و ژن Nanog در اسفیرها نسبت به سلول‌های توموری حدود ٦ برابر افزایش داشت اما ژن Oct4 تفاوت معنی‌داری در این دو گروه سلولی نشان نداد(شکل A-٤).

بررسی بیان ژن‌های مرتبط با مسیر Notch و مسیر Wnt در اسفیرها

مسیرهای پیام‌رسانی درون‌سلولی نقش مهمی در خودنوزایی، تکثیر و فعال‌سازی سلول‌های بنیادی سرطان ایفا می‌کنند. در مطالعات اخیر نقش مسیرهای Notch و Wnt در سلول‌های بنیادی سرطان‌های کلون، سینه، روده و سرطان‌هایی با منشأ تاج عصبی به‌عنوان مسیرهای مهم تسریع‌کننده تهاجم و متاستاز و افزاینده فعالیت‌های بازسازی‌کننده تومور اثبات‌شده است (۱۷, ۱۸). در این مطالعه نیز بررسی بیان ژن‌های مرتبط با مسیر Notch و Wnt در سلول‌های اسفیری و چسبنده توموری رده سلولی موردمطالعه ما نشان داد بیان ژن‌های مرتبط با مسیر Notch (ژن Notch1, HES1) به ترتیب ٤ و ۷ برابر در اسفیرها نسبت به سلول‌های چسبنده توموری افزایش داشت. البته

Archive of SID
www.SID.ir

بیان ژن HES5 از دیگر ژن‌های مسیر Notch تغییر تفاوت معنی‌داری در بین دو گروه سلولی موردمطالعه نشان نداد . ژن‌های مرتبط با مسیر Wnt نیز (ژن‌های β-Catenin, cyclinD1, c-Myc) همگی در اسفیرها نسبت به سلول‌های چسبنده توموری افزایش بیان معنی‌داری نشان دادند. (شکل ٤A,B,C)

بحث

ملانومای متاستاتیک سرطان بدخیمی است که در بین سرطان‌های پوستی بیشترین میزان مرگ‌ومیر را دارد. عدم پاسخ‌دهی و یا پاسخ سریع و کوتاه‌مدت به شیمی‌درمانی، ایمنی درمانی و درمان‌های دیگر رایج سلولی از مشکلات عمده درمانی ملانوما است. با قوت گرفتن نظریه سلول‌های بنیادی سرطان در ملانوما تحقیقات را به سمت شناخت رفتاری سلولی و مولکولی این سلول‌ها را پیش برده است. در این تحقیق نیز بنا بر شناخت اصولی خصوصیات سلول‌های ملانومای بدخیم با استفاده از رده سلولی ملانومای متاستاتیک A375 و جداسازی سلول‌های بنیادی سرطان با استفاده از روش اسفیر گذاشته شد. برای کسب اسفیر روش‌های متعددی در مطالعات رده‌های سلولی در سرطان سینه، دستگاه عصبی مرکزی، کلون و روده جمعیت سلولی از اسفیرها که در آن افزایش قدرت اسفیرزایی، افزایش قدرت کلنی زایی و افزایش بیان ژن‌های مرتبط با بنیادینگی صورت می‌گیرد؛ پیشنهاد شده است (٤, ۱۲, ۱۳).

نتایج ما در این مطالعه نشان داد اسفیرها نسبت به سلول‌های توموری چسبنده از قدرت کلنی زایی و اسفیرزایی بیشتری برخوردارند. میزان تشکیل کلنی از سلول‌های مشتق از اسفیرها و همچنین تشکیل اسفیر ها نشان‌دهنده قدرت خودنوزایی سلول‌های بنیادی است که در بعد سلولی بسیار حائز اهمیت و نشانگر قدرت تکثیر سریع و بالای سلول‌های شبه بنیادی ملانومایی در دره سلولی مورد مطالعه ما بود؛ این در حالی است که MO و همکارانش در مطالعه خود عنوان داشتند؛ سلول های اسفیری نسبت به سلول های چسبنده درصد بالاتری از فاکتورهای تمایزی را بیان می کردند. محیط اسفیری می تواند سلول های زایای اولیه را (progenitor cells) فعال کند که پتانسیل بیشتری را برای تمایز به ملانوسیت ها دارند. بر طبق این تحقیق مدل تولید اسفیر ممکن است روش موثری برای جداسازی سلول های بنیادی بر اساس جداسازی سول های بنیادی بر اساس فاکتورهای سطحی نباشد؛ اما ممکن است محیط متاسبی برای فعال کردن سلول های دارای پتانسیل سلول بنیادی باشد و ممکن است سلول های چسبنده در ملانوما دارای سلول های بنیادی نیز باشند و این خاصیت بنیادینگی میتواند بین سلول های چسبنده و سلول های اسفیری تغییر کند که در تحقیق ما علاوه بر بررسی فاکتورهای سطحی ژن های درون سلولی مرتبط با بنیادینگی نیز بررسی شدند (۱۵).

در مرحله بعدی، در مطالعه ما شاخص CD133 به‌عنوان شاخص سطح سلولی سرطانی اثبات‌شده در گروه‌های سلولی سرطان‌های دیگر همچنین در بافت‌های ملانومایی سرطانی بررسی شد (۱۷–۲۲). نتایج ما نشان داد در دو گروه سلولی اسفیری و سلول‌های چسبنده توموری شاخص CD133 درصد بیان کمی دارد، این درصد کم، به نظر می‌رسد؛ به این سبب است که خود سلول‌های سرطانی بیان‌کننده این شاخص سلول‌های کمی را شامل می‌شوند؛ بیان CD133 در رده‌های مختلف میزان بیان متفاوتی از ۰/۵–۹۰ درصد را نشان می‌داد (۲۳).

از سوی دیگر در مطالعه رجبی و همکارانش در ۲۰۱۳ در پژوهشگاه رویان اثبات شد که سلول‌های $CD133^+$ دارای قدرت کلنی زایی بیشتری نسبت به سلول‌های $CD133^-$ دارند اما در این سلول‌ها از میان ژن‌های مرتبط با بنیادینگی NESTIN SOX, c-Myc, Nanog تنها ژن Nanog افزایش بیان دارد و سایر ژن‌ها کاهش نشان می‌دادند(۲۱). همچنین اگرچه قدرت اسفیرزایی در سلول‌های $CD133^+$ از گروه سلولی $CD133^-$ بیشتر بود، اما قدرت اسفیرزایی زایی در این سلول‌ها نسبت به گروه کنترل (سلول‌های توموری) تفاوتی نداشت. از آنجا که برای شناسایی سلول‌های بنیادی سرطان

Archive of SID

www.SID.ir

نیاز به شاخصی پایا در تحقیقات احساس می‌شود؛ عدم‌تغییر بیان CD133 در مطالعه ما می‌تواند تائید گر این باشد که CD133 با این طیف وسیع از تغییر بیان در مطالعات متفاوت نمی‌تواند به‌عنوان شاخصی مورد اطمینان برای جداسازی سلول‌های بنیادی سرطان در ملانوما باشد.

بیان شاخص پروتئینی درون‌سلولی Nestin در مطالعه ما در اسفیرها نسبت به سلول‌های چسبنده توموری افزایشی ده برابری را نشان داد. در بررسی Setia و همکارانش بر روی نمونه‌های بیماران ملانومایی درصد بیان شاخص پروتئینی Nestin در بیماران مبتلابه ملانومای متاستاتیک درصدی مشابه مطالعه ما ذکرشده است که این امر در تائید نقش دیگر اسفیرها در شبیه بودن به شرایط تومور در بدن است (۲۴-۲۷).

در سنجش ژن‌های مرتبط با بنیادینگی، مطالعه ما میزان بالای بیان ژن‌های Nanog و NESTIN را در اسفیرها در مقایسه با سلول‌های چسبنده توموری نشان داد. پیش‌از این نیز اثبات شده بود که بیان این شاخص در سرطان‌های دارای منشأ اکتودرمی مانند ملانوما با پیشروی سرطان به فرم متاستاتیک آن افزایش چشم‌گیری نشان می‌دهد، در این راستا Klein و همکارانش نشان دادند که در ملانوما این افزایش می‌تواند ناشی از وجود سلول‌های بنیادی سرطان در فرم متاستیک ملانوما است (۲۸-۳۰). همچنین مطالعه ما نشان داد در سلول‌های اسفیری ژن‌های مرتبط با مسیر Notch و Wnt افزایش بیانی به ترتیب ٦ و ۱۰ برابری نسبت به سلول‌های چسبنده توموری دارند. همانطورکه این مسیرها در حفظ خصوصیات سلول‌های شبه بنیادی مؤثر هستند از عوامل مهم در بیماری‌زایی ملانوما نیز محسوب می‌شوند؛ اما چگونگی تغییر در مسیرهای Notch و Wnt در اسفیرها تاکنون بررسی نشده بود که در مطالعه ما اثبات شد، در مسیر مربوط به Notch ژن Notch1, HES1 و در مسیر Wnt ژن β-Catenin(CTNNB1), cyclinD1(CCND1), c-Myc افزایش بیان نشان می‌دهند.

افزایش بیان پروتئین‌ها و ژن‌های مرتبط با مسیر Notch در رده‌های سلولی ملانوما و نمونه‌های بیماران نیز مشاهده‌شده بود (۳۱). اما چگونگی تغییر این مسیر در سلول‌های بنیادی ملانومایی به‌دست‌آمده از اسفیرها تاکنون گزارش نشده است که در مطالعه ما افزایش بیان در مسیر Notch در سلول‌های اسفیری ملانوما نیز اثبات شد. در سرطان سینه و روده، گلیوبلاستوما، گلیوما البته اثبات‌شده است که افزایش مسیر Notch برای حفظ خاصیت بنیادینگی سلول‌های بنیادی این سرطان‌ها ضروری است و هدفگیری این مسیر در سلول‌های بنیادی سرطان سینه می‌تواند باعث از بین رفتن سلول‌های بنیادی شود(۱۰, ۳۰, ۳۲, ۳۳). همچنین در رده‌های سلولی و نمونه‌های بافتی تومورهای سیستم گوارشی بیان Notch1 در سلول‌های بنیادی این رده‌ها افزایش دارد و درصورتی‌که زینوگرافتهای مبتلابه تومور کلورکتال را با آنتی‌بادی علیه گیرنده Notch یعنی DLL4 تیمار شوند، قابلیت ایجاد تومور در مدل‌های حیوانی کاهش می‌یابد (۳٤, ۳۵).

اما در مطالعه ما علاوه برافزایش مسیر Notch، مسیر Wnt نیز در اسفیرها نسبت به سلول‌های چسبنده توموری افزایش نشان داده است. با فعال شدن مسیر Wnt در ملانوما پروتئین کلیدی این مسیر β-Catenin از سیتوپلاسم به هسته می‌رود و افزایش طول عمر سلول، تکثیر، مهاجرت و متاستاز را در بردارد که با خصوصیات سلول‌های بنیادی سرطان هم‌خوانی دارد. در سلول‌های بنیادی اما برای مسیر Wnt چه اتفاقی رخ می‌دهد؟ مطالعات نشان می‌دهد علاوه برافزایش بیانی که در خود مسیر Wnt دیده می‌شود، سایر مسیرهای جهش‌یافته سرطانی نیز با تأثیر بر افزایش بیان β-Catenin و یا افزایش پایداری آن در تشدید خصوصیات سرطانی β-Catenin مؤثرند (۳٦).

Agur در مطالعه‌ای اثبات کرد درصورتی‌که سلول‌های بنیادی سرطان پستان (ماموسفیرهای) را با DKK (Dickkopf1) تیمار کند، ماموسفیرهای تشکیل نمی‌شوند و بیان شاخص‌های مرتبط با بنیادینگی سرطان

Archive of SID

www.SID.ir

پستان کاهش می‌یابد. Dickkopf1 پروتئینی ترشحی است که به LRP6 متصل می‌شود و از فعال شدن مسیر Wnt جلوگیری می‌کند (۳۷).

براساس مطالعه Balin و همکارانش مشخص شد که در رده‌های سلولی و نمونه‌های بافتی ملانوما مسیر Notch می‌تواند با افزایش بیان خود باعث افزایش پایداری β-Catenin شود(۳۸).همچنین نتایج Delmas در سلول‌های ملانوما اثبات کرد که β-Catenin می‌تواند باعث افزایش طول عمر سلول‌ها شده و گذر از G1-S را با اثر افزایشی بر ژن‌هایc-Myc و cyclinD1 تسریع بخشد (۳۹). C-Myc خود به‌تنهایی در زمره ژن‌های پایه بنیادینگی است که اثر افزایشی مسیر Wnt بر آن در مطالعه ما هم اثبات شد بنابراین آن چیزی که مسلم است تسریع عملکرد مسیرها در افزایش قدرت سرطان‌زایی خود در اسفیرها صورت پذیرفته است (٤٠).

با توجه به نتایج این تحقیق، به نظر می‌رسد، فعالیت مسیر Notch و Wnt در کنار هم برای حفظ و نگهداری خصوصیات بنیادینگی در سلول‌های شبه بنیادی ملانوما مورد نیاز هستند و توانایی زیادی برای افزایش این خصوصیات دارند بنابراین می‌توان برای شناخت و جداسازی خالص‌تر سلول‌های بنیادی از پروتئین‌های ویژه این دو مسیر نیز استفاده کرد سپس برای رسیدن به یک درمان پایدار و یا حتی بهبود مدت‌زمان درمان می‌بایست ویژگی‌های هدفگیری شبکه پیام‌رسانی در این سلول‌ها امتحان شود. در پایان این بخش از مطالعه حاضر با مشخص شدن اینکه اسفیرهای جداشده از رده سلولی A375 دارای خصوصیات بنیادینگی بودند، به‌عنوان سلول‌های شبه بنیادی ملانوما در نظر گرفته شدند که البته برای تائید نهایی بنیادی بودن اسفیرها می‌بایست این آزمایش‌ها در حیوان نیز انجام شود.

قدردانی

با تشکر از همکاری کارشناس آزمایشگاه مولکولی و گرنت پژوهشگاه رویان.

منابع

1-Morton DL. Melanoma: Are we there yet? Journal of Surgical Oncology. 2011;104(4):337.
2-Thumar J, Giesen E, Kluger HM. Drug targets and predictive biomarkers in the management of metastatic melanoma. Pharmacogenomics and personalized medicine. 2012;5:139-48.
3-Hamid O, Boasberg PD, Rosenthal K, O'Day SJ. Systemic treatment of metastatic melanoma: new approaches. J Surg Oncol. 2011;104(4):425-9.
4-Schatton T, Murphy GF, Frank NY, Yamaura K, Waaga-Gasser AM, Gasser M, et al. Identification of cells initiating human melanomas. Nature. 2008;451(7176):345.
5-Doherty MR, Smigiel JM, Junk DJ, Jackson MW. Cancer Stem Cell Plasticity Drives Therapeutic Resistance. Cancers. 2016;8(1).
6-Civenni G, Walter A, Kobert N, Mihic-Probst D, Zipser M, Belloni B, et al. Human CD271-positive melanoma stem cells associated with metastasis establish tumor heterogeneity and long-term growth. Cancer research. 2011;71(8):3098-109.
7- Hsu M-Y, Yang MH, Schnegg CI, Hwang S, Ryu B, Alani RM. Notch3 signaling-mediated melanoma–endothelial crosstalk regulates melanoma stem-like cell homeostasis and niche morphogenesis. Laboratory Investigation. 2017;97(6):725.
8- Mallinger A, Crumpler S, Pichowicz M, Waalboer D, Stubbs M, Adeniji-Popoola O, et al. Discovery of potent, orally bioavailable, small-molecule inhibitors of WNT signaling from a cell-based pathway screen. Journal of medicinal chemistry. 2015;58(4):1717-35.
9- Lee H-J, Bao J, Miller A, Zhang C, Wu J, Baday YC, et al. Structure-based discovery of novel small molecule Wnt signaling inhibitors by targeting the cysteine-rich domain of frizzled. Journal of Biological Chemistry. 2015;290(51):30596-606.
10-Yahyanejad S, King H, Iglesias VS, Granton PV, Barbeau LM, van Hoof SJ, et al. NOTCH blockade combined with radiation therapy and temozolomide prolongs survival of orthotopic glioblastoma. Oncotarget. 2016;7(27):41251.

Archive of SID
www.SID.ir

11-Lee SH, Do SI, Lee HJ, Kang HJ, Koo BS, Lim YC. Notch1 signaling contributes to stemness in head and neck squamous cell carcinoma. Laboratory Investigation. 2016;96(5):508.
12-Fang D, Nguyen TK, Leishear K, Finko R, Kulp AN, Hotz S, et al. A tumorigenic subpopulation with stem cell properties in melanomas. Cancer research. 2005;65(20):9328-37.
13-Thurber A, Douglas G, Sturm E, Zabierowski S, Smit D, Ramakrishnan S, et al. Inverse expression states of the BRN2 and MITF transcription factors in melanoma spheres and tumour xenografts regulate the NOTCH pathway. Oncogene. 2011;30(27):3036.
14-de Boo J, Hendriksen C. Reduction strategies in animal research: a review of scientific approaches at the intra-experimental, supra-experimental and extra-experimental levels. ATLA-NOTTINGHAM-. 2005;33(4):369.
15-Mo J, Sun B, Zhao X, Gu Q, Dong X, Liu Z, et al. The in-vitro spheroid culture induces a more highly differentiated but tumorigenic population from melanoma cell lines. Melanoma research. 2013;23(4):254-63.
16-Wong CE, Paratore C, Dours-Zimmermann MT, Rochat A, Pietri T, Suter U, et al. Neural crest–derived cells with stem cell features can be traced back to multiple lineages in the adult skin. J Cell Biol. 2006;175(6):1005-15.
17-Howard CM, Valluri J, Alberico A, Julien T, Mazagri R, Marsh R, et al. Analysis of chemopredictive assay for targeting cancer stem cells in glioblastoma patients. Translational oncology. 2017;10(2):241-54.
18-Liu G, Yuan X, Zeng Z, Tunici P, Ng H, Abdulkadir IR, et al. Analysis of gene expression and chemoresistance of CD133+ cancer stem cells in glioblastoma. Molecular cancer. 2006;5(1):67.
19-Pfenninger CV, Roschupkina T, Hertwig F, Kottwitz D, Englund E, Bengzon J, et al. CD133 is not present on neurogenic astrocytes in the adult subventricular zone, but on embryonic neural stem cells, ependymal cells, and glioblastoma cells. Cancer research. 2007;67(12):5727-36.
20-Ernst A, Aigner M, Nakata S, Engel F, Schlotter M, Kloor M, et al. A gene signature distinguishing CD133hi from CD133− colorectal cancer cells: essential role for EGR1 and downstream factors. Pathology-Journal of the RCPA. 2011;43(3):220-7.
21-Rajabi Fomeshi M, Ebrahimi M, Mowla SJ, Sahraneshin Samani F. Evaluating the expression of cell surface markers CD133, CD44 and ABCG2 in melanoma cell lines and its relationship with cancer stem cells. Daneshvar. 2013;20(106):1-12.
22-Sharma BK, Manglik V, O'Connell M, Weeraratna A, McCarron EC, Broussard JN, et al. Clonal dominance of CD133+ subset population as risk factor in tumor progression and disease recurrence of human cutaneous melanoma. International journal of oncology. 2012;41(5):1570-6.
23-Perego M, Tortoreto M, Tragni G, Mariani L, Deho P, Carbone A, et al. Heterogeneous phenotype of human melanoma cells with in vitro and in vivo features of tumor-initiating cells. Journal of Investigative Dermatology. 2010;130(7):1877-86.
24-Setia N, Abbas O, Sousa Y, Garb JL, Mahalingam M. Profiling of ABC transporters ABCB5, ABCF2 and nestin-positive stem cells in nevi, in situ and invasive melanoma. Modern Pathology. 2012;25(8):1169.
25-Kanoh M, Amoh Y, Tanabe K, Maejima H, Takasu H, Katsuoka K. Nestin is expressed in HMB-45 negative melanoma cells in dermal parts of nodular melanoma. The Journal of dermatology. 2010;37(6):505-11.
26-Fusi A, Reichelt U, Busse A, Ochsenreither S, Rietz A, Maisel M, et al. Expression of the stem cell markers nestin and CD133 on circulating melanoma cells. Journal of Investigative Dermatology. 2011;131(2):487-94.
27-Frank NY, Margaryan A, Huang Y, Schatton T, Waaga-Gasser AM, Gasser M, et al. ABCB5-mediated doxorubicin transport and chemoresistance in human malignant melanoma. Cancer research. 2005;65(10):4320-33.
28-Klein WM, Wu BP, Zhao S, Wu H, Klein-Szanto AJ, Tahan SR. Increased expression of stem cell markers in malignant melanoma. Modern pathology. 2007;20(1):102.
29-Woo T, Okudela K, Mitsui H, Yazawa T. Prognostic value of CD133 expression in stage I lung adenocarcinomas. International journal of clinical and experimental pathology. 2011;4(1):32.
30-Grudzien P, Lo S, Albain KS, Robinson P, Rajan P, Strack PR, et al. Inhibition of Notch signaling reduces the stem-like population of breast cancer cells and prevents mammosphere formation. Anticancer research. 2010;30(10):3853-67.
31-Pinnix CC, Lee JT, Liu Z-J, McDaid R, Balint K, Beverly LJ, et al. Active Notch1 confers a transformed phenotype to primary human melanocytes. Cancer research. 2009;69(13):5312-20.
32-Xu R, Shimizu F, Hovinga K, Beal K, Karimi S, Droms L, et al. Molecular and clinical effects of notch inhibition in glioma patients: a phase 0/I trial. Clinical Cancer Research. 2016;22(19):4786-96.
33-Barat S, Chen X, Cuong Bui K, Bozko P, Götze J, Christgen M, et al. Gamma-Secretase Inhibitor IX (GSI) Impairs Concomitant Activation of Notch and Wnt-Beta-Catenin Pathways in CD44+ Gastric Cancer Stem Cells. Stem cells translational medicine. 2017;6(3):819-29.
34-Marotta LL, Almendro V, Marusyk A, Shipitsin M, Schemme J, Walker SR, et al. The JAK2/STAT3 signaling pathway is required for growth of CD44+ CD24–stem cell–like breast cancer cells in human tumors. The Journal of clinical investigation. 2011;121(7):2723-35.

Archive of SID
www.SID.ir

35-Blank CU, Hooijkaas AI, Haanen JB, Schumacher TN. Combination of targeted therapy and immunotherapy in melanoma. Cancer Immunology, Immunotherapy. 2011;60(10):1359.
36-O'Connell MP, Weeraratna AT. Hear the Wnt Ror: how melanoma cells adjust to changes in Wnt. Pigment cell & melanoma research. 2009;22(6):724-39.
37-Agur Z, Kirnasovsky OU, Vasserman G, Tencer-Hershkowicz L, Kogan Y, Harrison H, et al. Dickkopf1 regulates fate decision and drives breast cancer stem cells to differentiation: an experimentally supported mathematical model. PLoS One. 2011;6(9):e24225.
38-Balint K, Xiao M, Pinnix CC, Soma A, Veres I, Juhasz I, et al. Activation of Notch1 signaling is required for β-catenin–mediated human primary melanoma progression. The Journal of clinical investigation. 2005;115(11):3166-76.
39-Delmas V, Beermann F, Martinozzi S, Carreira S, Ackermann J, Kumasaka M, et al. β-Catenin induces immortalization of melanocytes by suppressing p16INK4a expression and cooperates with N-Ras in melanoma development. Genes & development. 2007;21(22):2923-35.
40-Castoreno AB, Eggert US. Small molecule probes of cellular pathways and networks. ACS chemical biology. 2010;6(1):86-94.

Archive of SID

www.SID.ir

Expression of Wnt and Notch Signaling Pathways are Increased in Cancer Stem-Like Cells in Metastatic Melanoma Cell Line (A375)

Maryam MehdiPour[1], Faezeh Keighobadi[2], Javad Firouzi[3], Pardis Khosravani[4], Marzieh Ebrahimi[5*]

1-Master of Science in Animal Biology, Towards Cellular-Tactile Science.
2-Student MSc in Animal Biology. Towards Cellular-Tangential Sciences.
3-Group of Stem Cells and Developmental Biology.
4-Senior Cell and Molecular Expert.
5-Associate Professor Royan Research Group.

1,2-Department of Animal Biology, Tow-Transe Science, Science & Culture University, Tehran, Iran.
3,4,5-Department of Stem Cells and Developmental Biology, Cellular Research Center, Stem Cell and Tactical Biology Department, Institute of Biology and Technology of Stem Cells, University of Tehran, Tehran, Iran.

**Corresponding author:*
Marzieh Ebrahimi; Department of Stem Cells and Developmental Biology, Cellular Research Center, Stem Cell and Tactical Biology Department, Institute of Biology and Technology of Stem Cells, University of Tehran, Tehran, Iran.
Tel: +982123562516
Email: mebrahimi@royaninstitute.org

Abstract

Backgound and Objective: Cancer stem cells assume to be responsible for increasing cancer properties such as migration, and drug sensitivity. A lot of studies revealed signaling pathways are enhanced in cancer stem cells. Melanoma is well-known as heterogeneous cancer and its severity in treatment. These can be attributed to the existence of cancer stem cells. In this study, we first aimed to separate cancer stem cells (cancer stem-like cells) by sphere formation, characterized them, and second examine the expression of Wnt and Notch signaling pathway genes related to adherent cells.

Subjects and Methods: Adherent cell were cultured in the non-adherent condition with serum-free media; spheres obtained, then sphere formation, clonogenic assay, expression of CD133 and Nestin proteins, Nanog, NESTIN and Oct4 genes as stem related genes were assessed in comparison to adherent cells. In addition, Notch and Wnt signaling pathways genes in both adherent and spheres cells evaluated.

Results: Sphere formation, clonogenic capacity, expression of Nestin protein, but not CD133 were increased in sphere cells in comparession to adherent cells. They also overexpressed β-catenin, cyclinD1, and c-Myc as Wnt down-stream genes, Notch1, HES1 as Notch down-stream genes, Nanog, and NESTIN as stem-related genes.

Conclusion: These results suggest that sphere culture model could be a proper experimental method to separate cancer stem-like cells. Our data also support two important pathways are overactivated in melanoma cancer stem-like cells which must be considered in targeting therapy.

Keywords: Melanoma, Cancer Stem Cell, Sphere, Notch, Wnt.

►*Please cite this paper as:*
MehdiPour M, Keighobadi F, Firouzi J, Khosravani P, Ebrahimi M. Expression of Wnt and Notch Signaling Pathways are Increased in Cancer Stem-Like Cells in Metastatic Melanoma Cell Line (A375). Jundishapur Sci Med J 2017; 16(6):643-652.

Received: July 9, 2017 **Revised: Nov 22, 2017** **Accepted: Nov 29, 2017**

Archive of SID
www.SID.ir