

## Characterization of Stemness Properties of Colonospheres in Colon Adenocarcinoma Patients

Samaneh Khorrami<sup>1</sup>, Ahmad Zavaran Hosseini<sup>2</sup>, Seyed Javad Mowla<sup>3</sup>, Reza Malekzadeh<sup>4</sup>

<sup>1</sup> PhD Student of Immunology, Department of Immunology, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

<sup>2</sup> Professor, Department of Immunology, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

<sup>3</sup> Associate Professor, Department of Molecular Genetics, Faculty of Biological Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

<sup>4</sup> Professor, Digestive Oncology Research Center, Digestive Diseases Research Institute, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

### ABSTRACT

#### **Background:**

Proliferation and expansion of cancer stem cells as spheroids were proved in previous studies. But, capability of primary tumor-derived stem cells to keep their unique properties in vitro is still disputed. So, the goal of this study was to isolate, expand and characterize of colon cancer-derived stem cells.

#### **Materials and Methods:**

In the present work, colon cancer stem cells markers including CD44 and EPCAM in spheroid and parental cells were analyzed by flow cytometry. The expression levels of stemness genes in both spheroid and parental cells were investigated using real-time PCR. Tumorigenic potential of spheroid cells was evaluated and used implantation of tumor xenografts into nude mice.

#### **Results:**

Our data shows 79% of spheroids were CD44+/EpCAM+, while parental cells only expressed 20% of CD44/EpCAM markers ( $p < 0.01$ ). In compared with the parental cells, the expression levels of “stemness” genes, like Sox2, Oct4, Nanog, C-myc, and Klf4 were significantly increased in spheroid cells ( $p < 0.05$ ). Furthermore, as little as 1000 spheroid cells were sufficient to obtain tumor growth in nude mice, while  $1 \times 10^6$  of parental cells was needed to generate tumor.

#### **Conclusion:**

Sphere formation assay is a useful method to enrich cancer stem cells. Spheroid cells showed increasing expression of stemness genes and tumorigenic activity in nude mice.

**Keywords:** Cancer stem cells, Colon cancer, Spheroid, CD44, EPCAM

*please cite this paper as:*

Khorrami S, Zavaran Hosseini A, Mowla SJ, Malekzadeh R. Characterization of stemness properties of colonospheres in colon adenocarcinoma patients. *Govaresh* 2014;19:167-74.

#### **Corresponding author:**

Ahmad Zavaran Hosseini, MD

Department of Immunology, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

Tel: + 98 21 82883090

Fax: + 98 21 88220144

E-mail: Zavarana@modares.ac.ir

Received: 15 Apr. 2014

Edited: 12 Jul. 2014

Accepted: 13 Jul. 2014

## تعیین ویژگی‌های بنیادین کولونوسفرهای حاصل از بیماران مبتلا به آدنوکارسینوم کولون

سمانه خرمی<sup>۱</sup>، احمد زواران حسینی<sup>۲</sup>، سید جواد مولی<sup>۳</sup>، رضا ملک زاده<sup>۴</sup>

<sup>۱</sup> دانشجوی دوره دکتری ایمنی شناسی پزشکی، گروه ایمنی شناسی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران  
<sup>۲</sup> استاد، دکتری تخصصی ایمنی شناسی پزشکی، گروه ایمنی شناسی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران  
<sup>۳</sup> دانشیار، دکتری تخصصی علوم اعصاب، گروه ژنتیک مولکولی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران  
<sup>۴</sup> استاد، فوق تخصص گوارش، گروه تحقیقات سرطان، پژوهشکده بیماریهای گوارش و کبد، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران

### چکیده

#### زمینه و هدف:

مطالعات گذشته، تکثیر و گسترش سلول‌های بنیادی سرطانی را به صورت سلول‌های اسفرویدی نشان داده‌اند. اما توانایی سلول‌های بنیادی سرطانی در حفظ ویژگی‌های اختصاصی شان در کشت آزمایشگاهی همچنان مورد بحث می‌باشد. از این رو هدف از این مطالعه جداسازی، تکثیر و ارزیابی ویژگی‌های اختصاصی سلول‌های بنیادی سرطانی در بافت توموری سرطان کولون می‌باشد.

#### روش بررسی:

سلول‌های سرطانی مشتق از بافت توموری سه بیمار مبتلا به آدنوکارسینوم کولون با استفاده از محیط کشت انتخابی به صورت اسفروید تکثیر شدند. شاخص‌های CD44 و EPCAM در اسفرویدها و سلول‌های اولیه کولون (مادری) با فلوسیتومتری مورد بررسی قرار گرفت. بیان ژن‌های مرتبط با ویژگی‌های اختصاصی سلول‌های بنیادی در دو گروه اسفرویدها و سلول‌های مادری با روش Real-time PCR ارزیابی شد. جهت تعیین توانایی القاء تومور در اسفرویدها، پیوند زئوگرافت در موش‌های nude انجام گرفت.

#### یافته‌ها:

بر اساس نتایج، ۷۹٪ از اسفرویدها و ۲۰٪ از سلول‌های مادری شاخص‌های EPCAM<sup>+</sup> / CD44<sup>+</sup> را بیان کردند ( $P < 0.01$ ). میزان بیان ژن‌های Sox 2, Oct4, Nanog, Klf4, C-myc به طور قابل ملاحظه‌ای در سلول‌های اسفرویدی افزایش نشان داد ( $P < 0.05$ ). همچنین تزریق ۱۰۰۰ سلول اسفرویدی برای شروع و رشد تومور در موش‌های nude کافی بود در حالی که  $1 \times 10^6$  سلول مادری توانایی القاء تومور را داشتند.

#### نتیجه‌گیری:

تکنیک تشکیل اسفرویدها در شرایط کشت انتخابی روش مفیدی جهت غنی‌سازی سلول‌های بنیادی سرطانی می‌باشد. به طوری که اسفرویدها در محیط کشت، ویژگی‌های اختصاصی سلول‌های بنیادی را حفظ کرده و توانایی ایجاد تومور در موش‌های دارای نقص ایمنی را نشان می‌دهند.

**کلید واژه:** سلول‌های بنیادی سرطانی، سرطان کولون، اسفروید، EPCAM، CD44

گوارش / دوره ۱۹، شماره ۳ / پاییز ۱۳۹۳ / ۱۶۷-۱۷۴

#### نویسنده مسئول: احمد زواران حسینی

تهران، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم پزشکی، گروه ایمنی

شناسی پزشکی

تلفن: ۰۲۱-۸۲۸۸۳۰۹۰

نمابر: ۰۲۱-۸۸۲۲۰۱۴۴

پست الکترونیک: Zavarana@modares.ac.ir

تاریخ دریافت: ۹۳/۱/۲۶

تاریخ اصلاح نهایی: ۹۳/۴/۲۱

تاریخ پذیرش: ۹۳/۴/۲۲

#### زمینه و هدف:

سرطان کولورکتال دومین علت مرگ ناشی از سرطان در جهان می‌باشد. علی‌رغم پیشرفت‌های قابل توجه در روند درمانی، همچنان میزان مرگ و میر در بین بیماران به علت مقاومت به درمان و یا عود بیماری بالا گزارش می‌شود. (۱) شواهد فراوانی نشان می‌دهند که تشکیل تومور، عود و متاستاز آن وابسته به زیر جمعیت کوچکی از سلول‌های توموری تحت عنوان سلول‌های بنیادی سرطانی است. سلول‌های بنیادی سرطانی مشابه سلول‌های بنیادی سالم با دو ویژگی قدرت خود تجدید شونده

و توانایی تمایز به جمعیت های مختلف تشکیل دهنده تومور مشخص می شوند. (۲)

اولین بار سلول های بنیادی سرطانی در لوکمی حاد میلویدی مشخص شد. به طوری که فقط سلول هایی که از نظر شاخص های سطحی به صورت  $CD38^+/CD44^+$  بودند توانایی تکثیر به طور گسترده، خودتجدید شوندگی و تشکیل تومور را داشتند. (۳) مطالعات بعدی در تومورهای جامد نشان داد که زیر جمعیت های  $CD24^+/CD44^+$  و  $CD133^+$  به ترتیب حاوی سلول های بنیادی سرطانی در سرطان پستان و گلیوما می باشد. (۴، ۵) شواهد اخیر وجود این سلول ها را در ملانوما (۶)، پروستات (۷)، پانکراس (۸)، و کولون (۹) نیز نشان داده اند. روش های استاندارد برای جداسازی سلول های بنیادی سرطانی از بافت های توموری انسانی شامل جداسازی سلولی براساس شاخص های سطح سلولی و تایید توانایی رشد تومور در پیوند زونگرافت می باشد. علاوه بر این، تکثیر سلول های بنیادی سرطانی در شرایط آزمایشگاهی با استفاده از شرایط کشت ویژه سلول های بنیادی در مطالعات زیادی گزارش شده است. کشت موفقیت آمیز سلول های بنیادی سرطانی در شرایط آزمایشگاهی نه تنها ما را قادر می سازد که سلول های بنیادی سرطانی را در یک وضعیت انعطاف پذیری مطالعه کنیم بلکه مدلی برای آزمایش فعالیت ضد سرطانی کاندیداهای دارویی را فراهم می کند. تکثیر و گسترش سلول های بنیادی سرطانی همچنین فرصتی برای شناسایی شاخص های سطح سلولی جهت سهولت ردیابی، غنی سازی و هدف های درمانی بر مبنای آنتی بادی های مونوکلونال فراهم می کنند. (۱۰، ۱۱)

تحقیقات انجام شده نشان می دهند که سلول های بنیادی سرطانی از انواعی از تومورها شامل گلیوبلاستوما (۱۲)، ملانوما (۱۳)، پستان (۱۴)، تخمدان (۱۵)، ریه (۱۶) و کولون (۹) جدا و تکثیر شدند که اغلب به صورت کلنی های اسفرویدی غیر چسبان تحت شرایط فاقد سرم رشد می کنند. علی رغم این شواهد، این که سلول های بنیادی سرطانی کشت داده شده در شرایط آزمایشگاهی فوتوتیپ اصلی شان را حفظ می کنند همچنان مورد بحث می باشد.

هدف ما در این مطالعه تشکیل و گسترش اسفروید های توموری از نمونه های بافتی بیماران مبتلا به آدنوکارسینوم کولون تحت شرایط کشت فاقد سرم و سپس تایید ویژگی های اختصاصی سلول های بنیادی سرطانی شامل بررسی بیان ژن های مرتبط با چند قوه زایی این سلول ها و توانایی تومورزایی آنها در موش های nude می باشد.

### روش بررسی:

**آماده سازی بافت های توموری و کشت سلول های حاصل از هضم بافتی**

بافت های توموری کولون از سه بیمار مبتلا به آدنوکارسینوم کولون

(stage II، زن، محدوده سنی ۶۵-۵۸) بعد از پرکردن فرم رضایت نامه مصوب کمیته اخلاق پزشکی دانشگاه تربیت مدرس بدست آمد. تشخیص بافت شناسی بر اساس ویژگی های میکروسکوپی سلول های سرطانی توسط پاتولوژیست انجام شد. بیماران مورد مطالعه هیچ نوع درمان ادجوانتی قبل از جراحی دریافت نکردند. بافت های توموری چندین مرتبه در محلول بافری فسفات (PBS) حاوی آنتی بیوتیک شستشو داده شده و سپس به مدت یک شبانه روز در محیط (GIBCO) DMEM/F ۱۲ حاوی پنی سیلین (۵۰۰ واحد/میلی لیتر، Invitrogen)، استرپتومایسین (۵۰۰ میلی گرم/ میلی لیتر، Invitrogen) و آمفوتریسین B (۱/۲۵ میلی گرم/میلی لیتر، Sigma) در یخچال نگه داری شد.

بافت های توموری به وسیله روش های مکانیکی و آنزیمی بعد از ۲ ساعت انکوباسیون با کلاژناز نوع IV در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد هضم و به سوسپانسیون سلول تبدیل شدند. سپس بخشی از سلول های حاصل از هضم بافتی در محیط DMEM/F ۱۲ همراه با ۱۰٪ سرم جنین گاوی (FBS, GIBCO) برای بدست آوردن سلول های اولیه کولون کشت داده شدند که تحت عنوان سلول های مادری نامیده شدند و بخش دیگری از سلول های کولون که در محیط اختصاصی سلول های بنیادی (محیط DMEM/F ۱۲ فاقد سرم و دارای فاکتورهای رشد) کشت داده شدند سلول های اسفرویدی نام گرفتند.

### تعیین توانایی تشکیل کلنی های اسفرویدی در محیط اختصاصی سلول های بنیادی

جهت ارزیابی توانایی تشکیل کلنی های اسفرویدی، سوسپانسیون سلولی به تعداد ۵۰۰۰ سلول/میلی لیتر در پلیت های ۶ خانه ای در محیط اختصاصی سلول های بنیادی شامل DMEM/F ۱۲ همراه با فاکتور های رشد شامل ۲۰ نانوگرم/میلی لیتر فاکتور رشد اپیدرمی (EGF, Sigma) و ۱۰ نانوگرم/میلی لیتر فاکتور رشد فیبروبلاستی (EGF, Millipore)، ۱Bx27 (Invitrogen) اسیدهای آمینه غیر ضروری ۱٪ وزنی/حجمی، سدیم پیروات ۱٪ وزنی/حجمی، ال-گلوتامین ۱٪ وزنی/حجمی (GIBCO)، هپارین ۴ میلی گرم/میلی لیتر، گلوکز ۶ میلی گرم/میلی لیتر، آپوترانسفرین ۱۰۰ میلی گرم/میلی لیتر، پوترسین ۹/۶ میلی گرم/ میلی لیتر، پوروزسترون ۲۰ نانومولار، سدیم سلنیت ۳۰ نانومولار (Sigma Alderich) کشت داده شد. برای تعیین توانایی تمایز سلول های اسفرویدی، اسفرویدها در محیط کشت DMEM/F ۱۲ فاقد فاکتور های رشد و در حضور ۱۰٪ سرم جنین گاوی کشت داده شد.

### اندازه گیری شاخص های سطح سلولی با استفاده از فلوسیتومتری

به منظور بررسی بیان شاخص های اختصاصی سلول های بنیادی که در مطالعات گذشته ارتباط آنها با سلول های بنیادی سرطانی کولون اثبات شده است، سوسپانسیون سلولی حاصل از اسفرویدها و سلول های مادری

تزریق زیرجلدی به موش‌های nude (۸-۶ هفته) با هدف تعیین توانایی تومورزایی انجام شد. قبل از تزریق سلول‌ها بصورت هم حجم در بافر فسفات نمکی و کلژن آماده سازی شدند. موش‌ها از آزمایشگاه حیوانات بیمارستان امام خمینی خریداری شده و تحت شرایط استاندارد نگه داری شد. مطالعه روی حیوانات توسط کمیته اخلاق پزشکی دانشگاه تربیت مدرس تصویب شد. زمانی که تومورها به حجم ۱ سانتی متر مکعب رسیدند موش‌ها کشته و نمونه‌های توموری جهت بررسی‌های پاتولوژیکی و کشت در شرایط آزمایشگاهی بدست آمد. حجم تومور با استفاده از فرمول زیر محاسبه شد.

$$\frac{2}{3} \times (\text{قطر بزرگ})^2 \times (\text{قطر کوچک}) = \text{حجم تومور}$$

### آنالیز آماری

اطلاعات به صورت میانگین  $\pm$  انحراف معیار ارائه گردیده است. آنالیز آماری با استفاده از GraphPad Prism<sup>۳</sup> انجام شد. از تست Unpaired t test برای محاسبه تغییرات میزان بیان ژن‌ها بین گروه‌ها استفاده شده است. همه تست‌ها به صورت تکرار سه تایی و  $p < 0.05$  از نظر آماری معنی دار تلقی شده است.

### یافته‌ها:

#### شناسایی شاخص‌های اختصاصی سلول‌های بنیادی در کلنی‌های اسفریویدی

در راستای مطالعات گذشته، یافته‌های ما نیز نشان داد سلول‌های توموری کولون حاصل از هضم بافتی در محیط اختصاصی سلول‌های بنیادی به صورت کلنی‌های اسفریویدی غیر چسبان رشد می‌کنند (۱۷) (شکل ۱ الف). جهت بررسی توانایی تمایز کلنی‌های اسفریویدی این سلول‌ها در محیط کشت حاوی ۱۰٪ سرم جنین گاوی کشت داده شد بعد از یک روز سلول‌های تمایز نیافته به تدریج از حالت اسفریویدی به سلول‌های چسبیده و تمایز یافته تبدیل شدند (شکل ۱ ب). یافته‌ها نشان می‌دهند سلول‌های اسفریویدی ویژگی‌هایی مشابه سلول‌های بنیادی شامل خودتجدید شوندگی و توانایی

بر اساس پروتکل استاندارد رنگ آمیزی شدند. به طور خلاصه سلول‌های دو گروه تریپسینه شده و در بافر فسفات نمکی (PBS) حاوی ۱٪ آلبومین سرم گاوی (BSA)، به صورت سوسپانسیون در آورده شدند. بعد از ۱۰ دقیقه، سلول‌ها با استفاده از آنتی بادی‌های انسانی شامل APC (anti-CD44<sup>-</sup>) (eBioscience) و anti EPCAM-PE (Abcam) رنگ آمیزی شدند. سلول‌های رنگ آمیزی شده با کنترل‌های ایزوتایپی IgG2b-APC و IgG1-PE به عنوان کنترل استفاده شدند. آنالیز فلوسیتومتری با استفاده از دستگاه FACS CantoII انجام شد.

#### بررسی میزان بیان ژن‌های مرتبط با ویژگی‌های سلول‌های بنیادی با روش Real-time-PCR

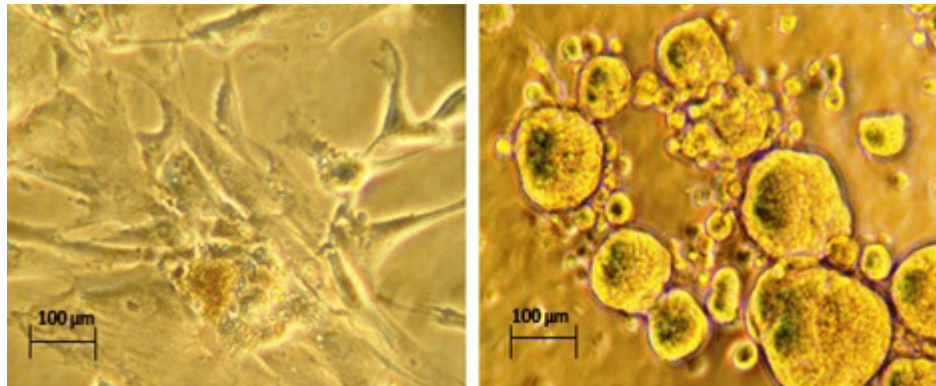
برای این کار RNA از سلول‌های اسفریویدی و سلول‌های مادری با استفاده از کیت جداسازی RNA (Roche) طبق دستورالعمل کیت استخراج شد. واکنش PCR با استفاده از کیت (light cycler RNA Master SYBR Green I (QIAGEN) و دستگاه light cycler Roche مدل ۳/۵ انجام شد. شرایط سیکل‌های PCR بدین ترتیب بود: ۱ سیکل در دمای ۵۰ درجه سانتی گراد برای مدت زمان ۱۰ دقیقه، ۱ سیکل در دمای ۹۵ درجه سانتی گراد برای مدت زمان ۱۰ دقیقه بدنبال ۴۰ سیکل در دمای ۹۵ درجه برای ۱۰ ثانیه و دمای ۶۰ درجه برای ۱ دقیقه . توالی و ویژگی پرایمرهای طراحی شده برای آزمایش Real time-PCR در جدول ۱ به طور خلاصه آورده شده است. از HGPRT به عنوان کنترل داخلی استفاده شد. تغییرات بیان ژن‌ها با استفاده از روش  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  محاسبه شد.

#### تعیین توانایی سلول‌های اسفریویدی و مادری برای القاء تومور در موش‌های nude

سوسپانسیون سلولی حاصل از سلول‌های اسفریویدی و مادری از طریق

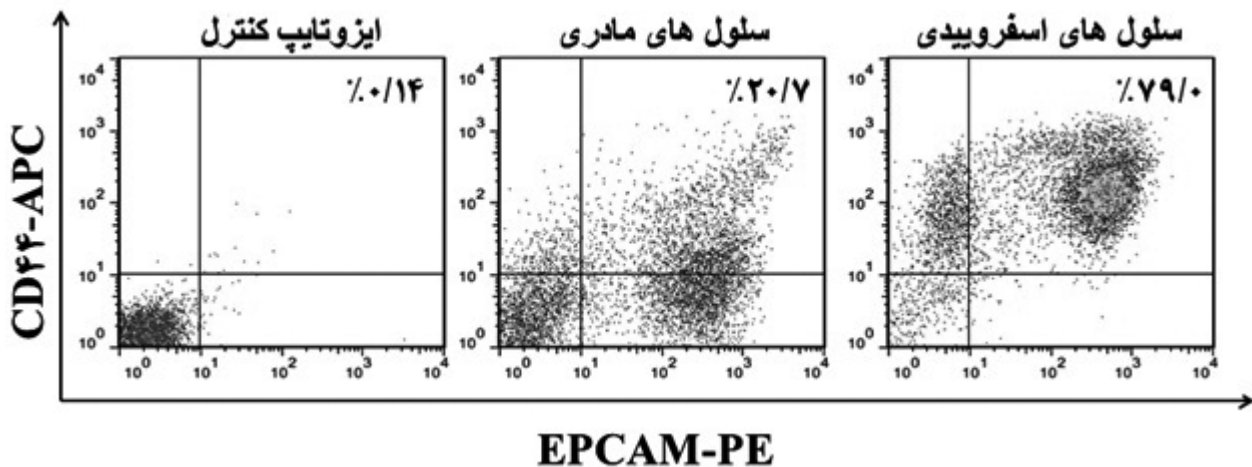
جدول ۱: توالی و ویژگی پرایمرهای طراحی شده برای آزمایش Real time-PCR

نام ژن	توالی پرایمرها	دمای Tm	دمای اتصال	طول قطعه سنتز شده
C-myc	F: 5'-AGCGACTCTGAGGAGGAAC-3' R: 5'-CTGCGTAGTTGTGCTGATG-3'	۵۸/۴ ۵۷/۷	۶۰ درجه سانتی گراد	۱۸۴ جفت باز
Sox-2	F: 5'-GACTGAGAGAAAGAAGAGGAG-3' R: 5'-GAAAATCAGGCGAAGAATAAT-3'	۵۹/۲ ۵۸/۲	۶۱ درجه سانتی گراد	۱۹۷ جفت باز
Oct-4	F: 5'-CGCCGTATGAGTTCTGTG-3' R: 5'-GGTGATCCTCTTCTGCTTC-3'	۵۹/۶ ۵۹/۹	۶۱ درجه سانتی گراد	۲۸۴ جفت باز
Nanog	F: 5'-GCTAAGGACAACATTATAGAAG-3' R: 5'-CTTCATCACCAATTCGTAAGT-3'	۵۸/۸ ۵۷/۶	۶۰ درجه سانتی گراد	۱۲۷ جفت باز
Klf-4	F: 5'-CCCAATTACCCATCCTTCC-3' R: 5'-GTGCCTGGTCAGTTCATC-3'	۵۸/۸ ۵۹/۳	۶۰ درجه سانتی گراد	۳۰۳ جفت باز
HPRT کنترل داخلی	F: 5'-CCTGGCGTCGTGATTAGTG-3' R: 5'-TCAGTCTGTCCATAATTAGTCC-3'	۵۸/۳ ۵۹/۱	۶۰ درجه سانتی گراد	۱۲۵ جفت باز



الف ب

شکل ۱: توانایی تشکیل کولونوسفر در سلول های توموری الف) تصویر نشان دهنده کولونوسفرهای مشتق از سلول های توموری می باشد که در شرایط فاقد سرم و در حضور فاکتورهای رشد تشکیل شده اند این تصویر مربوط به روز ۷ کشت کولونوسفر ها می باشد. ب) تصویر نشان دهنده تمایز کولونوسفرها در حضور ۱۰٪ FBS و حذف فاکتورهای رشد می باشد که کولونوسفرها بتدریج شروع به چسبیدن به پلکت و تمایز کردند. (میکروسکوپ معکوس، بزرگنمایی ۲۰۰ X)



شکل ۲: مقایسه میزان بیان شاخص های سلول های بنیادی (EPCAM/CD44<sup>+</sup>) در سلول های اسفرویدی و مادری مشتق از سلول های توموری اولیه. شاخص های سلول های بنیادی در کولونوسفرها در مقایسه با سلول های مادری بطور معنی داری افزایش نشان می دهد ( $p < 0.01$ ). نتایج آنالیز فلوسایتمتری نشان داد ۲۰٪ سلول های مادری EPCAM<sup>+</sup>/CD44<sup>+</sup> می باشند. در حالی که ۷۹٪ کولونوسفرها شاخص های EPCAM/CD44 را بیان می کنند.

اسفرویدها ویژگی های سلول های بنیادی سرطانی را نشان می دهند

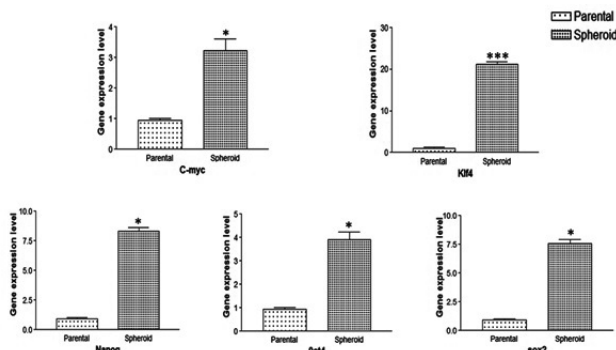
جهت مطالعه ویژگی های مولکولی سلول های بنیادی سرطانی کولون بیان ژن هایی که مرتبط با مسیرهای سلول های بنیادی هستند، در سلول های اسفرویدی و سلول های مادری به وسیله RT-PCR بررسی شدند. همان طور که در (شکل ۳) نشان داده شده است در مقایسه با سلول های مادری میزان بیان ژن های Oct4، Sox2، Nanog، Klf4 و C-myc به طور معنی داری در سلول های اسفرویدی افزایش می یابند ( $p < 0.05$ ).

تمایز را نشان می دهند. تحت شرایط فاقد سرم، کلنی های اسفرویدی شاخص های سطح سلولی CD44 و EPCAM را در مقایسه با سلول های مادری به طور قابل ملاحظه ای بیان می کردند ( $p < 0.01$ ). نتایج نشان می دهد که حدود ۷۹/۲±۴/۴۶٪ اسفرویدها از نظر شاخص های سطح سلولی EPCAM<sup>+</sup>/CD44<sup>+</sup> می باشند در حالی که ۲۰/۶±۲/۱٪ سلول های مادری شاخص های EPCAM/CD44<sup>+</sup> را بیان می کنند (شکل ۲). یافته ها نشان می دهند که اسفرویدهای تشکیل شده از سلول های اولیه کولونی دارای جمعیت غنی شده از سلول های بنیادی سرطانی هستند.

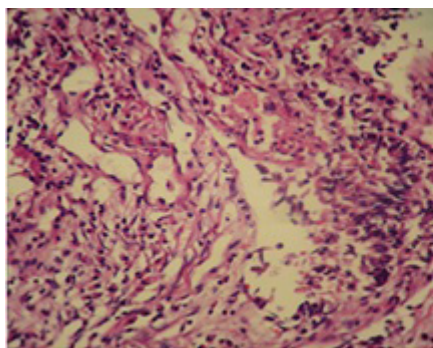
جدول ۲: توانایی تومورزایی سلول های اسفرویدی و سلولهای مادری در موش های nude

نوع سلول	بیماران	تعداد سلول های تزریقی	تشکیل تومور	تشکیل اسفروید از پیوند زئوگرافت	بله
سلول های اسفرویدی (تومور کولون)	P1, P2, P3	$1 \times 10^2$ $2/5 \times 10^5$ $5 \times 10^2$	$1/3^*$ $3/3$ $3/3$		بله بله بله
سلول های مادری (تومور کولون)	P1, P2, P3	$5 \times 10^5$ $1 \times 10^6$	$0/3$ $3/3$		- بله

\* تزریق  $1 \times 10^2$  سلول اسفرویدی حاصل از سلول های توموری بیمار ۱ و ۲ منجر به القاء تومور در هر ۳ موش nude شد در حالیکه در مورد بیمار ۳، تومور در ۱ موش از ۳ موش ایجاد گردید.



شکل ۳: مقایسه میزان بیان ژن های C-myc و Klf4، Nanog، Oct4، Sox2 در سلول های اسفرویدی و مادری مشتق از تومور کولون. میزان بیان ژن های مرتبط با ویژگی های سلول های بنیادی بطور معنی داری در اسفرویدها نسبت به سلول های مادری افزایش نشان می دهد ( $p < 0.05$ ). نتایج بصورت Mean±SEM نشان داده شده است.



ب



الف

شکل ۴: تومورزایی اسفرویدها در موش های nude (الف) عکس نمایش داده شده، تومور ایجاد شده از اسفرویدها در موش را نشان می دهد (ب) رنگ آمیزی همانوکسیلین-آنوزین بافت توموری حاصل از اسفرویدها که ویژگی های مورفولوژیکی آدنوکارسینوم را نشان می دهد. (میکروسکوپ نوری، بزرگنمایی  $400 \times$ )

عود و مقاومت دارویی شناسایی و فهم ویژگی های بیولوژیکی شان در جهت طراحی روش های درمانی با هدف حذف آنها از اهمیت به سزایی برخوردار می باشد. (۱۸)

سلول های بنیادی سرطانی در ابتدا با استفاده از شاخص های سطح سلولی و بدنبال آن تایید تومورزایی شان در موش های دارای نقص ایمنی مانند NOD/SCID یا Nude جداسازی شده اند. برای مثال، در سرطان پستان زیر جمعیت سلولی CD24<sup>+</sup>/CD44<sup>+</sup> که ۳۵-۱۱ درصد کل جمعیت سلولی را تشکیل می دهند نشان داده شد که توانایی تشکیل تومور با تعداد بسیار کم (۲۰۰ سلول) را دارند. (۴) متعاقباً در سرطان های مغز، کولون و ریه نشان داده شد که زیر جمعیت سلولی با شاخص های سطحی CD ۱۳۳ ویژگی های سلول های بنیادی سرطانی را دارا می باشند و قادرند در پیوند زئوگرافت تشکیل تومور دهند. (۵، ۹، ۱۶) علی رغم موفقیت روش های جداسازی سلولی بر اساس شاخص های سطحی و تکثیر و گسترش سلول های بنیادی سرطانی در موجود زنده برای تعیین خصوصیات این سلول ها در انواع مختلفی از تومورها، این سیستم محدودیت هایی برای مطالعات مولکولی و سلولی فراهم می کند. شرایط

### اسفرویدها توانایی القاء تومور را در موش های nude نشان می دهند

برای تعیین توانایی تومورزایی اسفرویدها در مقایسه با سلول های مادری در موجود زنده، موش های nude به صورت زیرجلدی تحت تزریق قرار گرفتند. نتایج نشان داد اسفرویدها در مقایسه با سلول های مادری خاصیت تومورزایی بیشتری را نشان می دهند (جدول ۲). به طوری که فقط ۱۰۰۰ سلول اسفرویدی برای ایجاد و رشد تومور کافی می باشد. در حالی که  $1 \times 10^6$  سلول مادری قادر به تشکیل تومور در موش های nude می باشند (شکل ۴ الف). همچنین بررسی های پاتولوژیکی روی بافت های توموری ایجاد شده از سلول های اسفرویدی و مادری نشان داد تومورهای بدست آمده ویژگی های مورفولوژیکی آدنوکارسینوم را دارا می باشند که مشابه بافت های توموری اولیه بیماران بود (شکل ۴ ب).

### بحث:

با توجه به نقش سلول های بنیادی سرطانی در تشکیل تومور، گسترش،

کشت فاقد سرم همراه با فاکتورهای رشد اصولاً برای تکثیر سلول‌های بنیادی جنینی و بالغ در شرایط آزمایشگاهی طراحی شده بود، که به صورت موفقیت آمیزی برای کشت سلول‌های بنیادی مشتق از تومورهای توپر نیز بکار برده شد. اولین بار در تومورهای مغزی نشان داده شد که شرایط محیط کشتی استفاده شده برای تایید کشت سلول‌های بنیادی مغزی منجر به جداسازی موفقیت آمیز نورواسفیرهای سه بعدی شد که در بردارنده ویژگی‌های سلول‌های بنیادی سرطانی مشتق از تومورهای مغزی انسانی می باشند. (۱۲، ۱۵) به طور مشابه کلنی‌های اسفرویدی توموری غنی برای جمعیت‌های سلولی بنیادی سرطانی در سرطان‌های پستان، ملانوما، ریه، تخمدان و کولون نشان داده شده است.

در این مطالعه، شرایط کشت فاقد سرم که قبلاً در سیستم‌های سلول‌های بنیادی سالم و سرطانی اثبات شده بود برای کشت سلول‌های بنیادی سرطانی کولون از بافت‌های توموری بکار برده شد. (۱۳) تشکیل اسفرویدهای توموری از نمونه‌های توموری کولون در مدت ۱۰-۸ هفته مشاهده شد. هم‌چنین به عنوان کنترل، کشت‌های اولیه سلول‌های چسبیده تحت شرایط کشتی حاوی سرم حاصل شد. باتوجه به گزارش‌های اخیر مبنی بر ارتباط بیان شاخص‌های CD ۴۴ و EPCAM با سلول‌های بنیادی سرطانی کولون آنالیز فلوسیتومتری برای تعیین میزان بیان این دو شاخص روی دو گروه سلول‌های اسفرویدی و مادری انجام شد. (۱۹) در اسفرویدها، میزان بیان CD ۴۴ و EPCAM ۷۹٪ در مقایسه با ۲۰٪ در سلول‌های چسبیده مشاهده شد که نتایج در راستای مطالعه آقای کانوار و همکاران بود که مشابهت داشتند حدود ۸۰٪ کلنی‌های اسفرویدی حاصل از رده‌های سلولی کولونی HT-۲۹ و HCT-۱۱۶ شاخص‌های CD ۴۴ و EPCAM را بیان می کنند. علاوه بر این، اسفرویدها بیان افزایش یافته‌ای از شاخص‌های دیگری مانند Musashi-۱ و LGR-۵ که به عنوان شاخص‌های سلول‌های بنیادی سرطانی کولون معرفی شده‌اند را نسبت به سلول‌های مادری نشان دادند. (۱۹) هم‌چنین در مطالعه دیگری نشان داده شد که سلول‌های اسفرویدی مشتق از بافت توموری بیان کننده شاخص‌های سلول‌های بنیادی شامل CD ۱۳۳، Lgr5، CD ۲۴، CD ۲۹، CD ۴۴، CD ۱۶۶ می باشند که توانایی تومورزایی در موش‌های nude را نشان می دهند. در ادامه در این مطالعه نشان داده شد در شرایط کشت همراه سرم اسفرویدها متمایز شده و توانایی القاء تومور را از دست می دهند. براساس نتایج، با شروع تمایز، بیان شاخص‌های CD ۲۴، CD ۴۴ و CD ۱۳۳ در طی زمان کوتاهی کاهش می یابند در حالی که بیان شاخص‌های CD ۱۶۶ و CD ۲۹ تغییرات اندکی را نشان می دهند که تایید کننده این یافته می باشد که سلول‌های اسفرویدی CD ۴۴/CD ۱۳۳ دارای جمعیت سلولی نابالغ می باشند که توانایی کلنی زایی بیشتری را نشان می دهند. (۲۰) این شواهد مطرح می کند روش کشت در آزمایشگاه برای تکثیر و گسترش انتخابی سلول‌های بنیادی با فنوتیپ سلول‌های نابالغ و بدون تغییر الگوی بیان شاخص‌های سطحی می تواند روش مفیدی در نظر گرفته شود.

در این مطالعه با بهره‌گیری از یک روش بسیار ساده تر و کم هزینه تر جداسازی سلول‌های بنیادی سرطانی کولون با موفقیت انجام شد در حالی که جداسازی این سلول‌ها براساس شاخص‌های سلولی به سهولت امکان پذیر نمی باشد. هم‌چنین در این تحقیق با بکاربردن اکثر تکنیک‌های رایج، جهت شناسایی سلول‌های بنیادی سرطانی نشان داده شد ویژگی‌های سلول‌های بنیادی در کولونوسفیرها در شرایط *in vitro* حفظ می شوند. تحقیق حاضر برای اولین بار در ایران انجام گردیده است و می تواند در مطالعات آینده روی سلول‌های بنیادی سرطانی کولون راه گشا باشد.

#### نتیجه گیری:

در مجموع یافته‌های بدست آمده نشان می‌دهند تحت شرایط کشت انتخابی سلول‌های بنیادی، اسفرویدهای غنی از سلول‌های بنیادی سرطانی تشکیل می‌گردند که مشابه سلول‌های بنیادی سالم خصوصیات اساسی سلول‌های بنیادی را نشان می‌دهند و توانایی ایجاد تومور با ویژگی‌های مورفولوژیکی مشابه تومور اولیه را دارا می‌باشند. از این رو تکنیک تشکیل

در این مطالعه، علاوه بر تایید بیان شاخص‌های سلول‌های بنیادی سرطانی کولون در اسفرویدها، ویژگی‌های مرتبط با چند قوه زایی سلول‌های بنیادی و همچنین توانایی شان در القاء تومور در موش‌های nude نیز مورد بررسی قرار گرفت. مطالعات فراوانی مطرح می‌کنند که بیان ژن‌هایی شامل Oct ۲، nanog ۲، ABCG ۲، CXCR ۴، Klf ۴

در این مطالعه، شرایط کشت فاقد سرم که قبلاً در سیستم‌های سلول‌های بنیادی سالم و سرطانی اثبات شده بود برای کشت سلول‌های بنیادی سرطانی کولون از بافت‌های توموری بکار برده شد. (۱۳) تشکیل اسفرویدهای توموری از نمونه‌های توموری کولون در مدت ۱۰-۸ هفته مشاهده شد. هم‌چنین به عنوان کنترل، کشت‌های اولیه سلول‌های چسبیده تحت شرایط کشتی حاوی سرم حاصل شد.

باتوجه به گزارش‌های اخیر مبنی بر ارتباط بیان شاخص‌های CD ۴۴ و EPCAM با سلول‌های بنیادی سرطانی کولون آنالیز فلوسیتومتری برای تعیین میزان بیان این دو شاخص روی دو گروه سلول‌های اسفرویدی و مادری انجام شد. (۱۹) در اسفرویدها، میزان بیان CD ۴۴ و EPCAM ۷۹٪ در مقایسه با ۲۰٪ در سلول‌های چسبیده مشاهده شد که نتایج در راستای مطالعه آقای کانوار و همکاران بود که مشابهت داشتند حدود ۸۰٪ کلنی‌های اسفرویدی حاصل از رده‌های سلولی کولونی HT-۲۹ و HCT-۱۱۶ شاخص‌های CD ۴۴ و EPCAM را بیان می کنند. علاوه بر این، اسفرویدها بیان افزایش یافته‌ای از شاخص‌های دیگری مانند Musashi-۱ و LGR-۵ که به عنوان شاخص‌های سلول‌های بنیادی سرطانی کولون معرفی شده‌اند را نسبت به سلول‌های مادری نشان دادند. (۱۹) هم‌چنین در مطالعه دیگری نشان داده شد که سلول‌های اسفرویدی مشتق از بافت توموری بیان کننده شاخص‌های سلول‌های بنیادی شامل CD ۱۳۳، Lgr5، CD ۲۴، CD ۲۹، CD ۴۴، CD ۱۶۶ می باشند که توانایی تومورزایی در موش‌های nude را نشان می دهند. در ادامه در این مطالعه نشان داده شد در شرایط کشت همراه سرم اسفرویدها متمایز شده و توانایی القاء تومور را از دست می دهند. براساس نتایج، با شروع تمایز، بیان شاخص‌های CD ۲۴، CD ۴۴ و CD ۱۳۳ در طی زمان کوتاهی کاهش می یابند در حالی که بیان شاخص‌های CD ۱۶۶ و CD ۲۹ تغییرات اندکی را نشان می دهند که تایید کننده این یافته می باشد که سلول‌های اسفرویدی CD ۴۴/CD ۱۳۳ دارای جمعیت سلولی نابالغ می باشند که توانایی کلنی زایی بیشتری را نشان می دهند. (۲۰) این شواهد مطرح می کند روش کشت در آزمایشگاه برای تکثیر و گسترش انتخابی سلول‌های بنیادی با فنوتیپ سلول‌های نابالغ و بدون تغییر الگوی بیان شاخص‌های سطحی می تواند روش مفیدی در نظر گرفته شود.

در این مطالعه، علاوه بر تایید بیان شاخص‌های سلول‌های بنیادی سرطانی کولون در اسفرویدها، ویژگی‌های مرتبط با چند قوه زایی سلول‌های بنیادی و همچنین توانایی شان در القاء تومور در موش‌های nude نیز مورد بررسی قرار گرفت. مطالعات فراوانی مطرح می‌کنند که بیان ژن‌هایی شامل Oct ۲، nanog ۲، ABCG ۲، CXCR ۴، Klf ۴

موش های nude تشکر و قدر دانی می نماییم. از دکتر نصیری (بیمارستان دکتر شریعتی، دانشگاه علوم پزشکی تهران)، دکتر عالم رجیبی و دکتر محجوب (بیمارستان حضرت رسول (ص)، دانشگاه علوم پزشکی تهران) جهت فراهم کردن نمونه های توموری سپاسگزاریم. این مطالعه با حمایت مالی دانشگاه تربیت مدرس و پژوهشکده بیماریهای گوارشی دانشگاه علوم پزشکی تهران انجام شد.

کلنی های اسفروبییدی در شرایط آزمایشگاهی می تواند روش مفیدی برای شناسایی شاخص های سطحی دیگر، تعیین ویژگی های بیولوژیکی و بررسی اثرات کاندیداهای دارویی با هدف درمانی در نظر گرفته شود.

#### سپاسگزاری:

از آزمایشگاه حیوانات بیمارستان امام خمینی تهران جهت فراهم کردن

## REFERENCES

1. Siegel R, Naishadham D, Jemal A. Cancer statistics, 2012. *CA Cancer J Clin* 2012; 62: 10-29.
2. Jordan CT, Guzman ML, Noble M. Cancer stem cells. *N Engl J Med* 2006; 355:1253-61.
3. Bonnet D, Dick JE. Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nature Med* 1997; 3:730-7.
4. Al-Hajj M, Wicha MS, Benito-Hernandez A, Morrison SJ, Clarke MF. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;100:3983-8.
5. Singh SK, Hawkins C, Clarke ID, Squire JA, Bayani J, Hide T, et al. Identification of human brain tumour initiating cells. *Nature* 2004; 432: 396-401.
6. Schatton T, Murphy GF, Frank NY, Yamaura K, Waaga-Gasser AM, Gasser M, et al. Identification of cells initiating human melanomas. *Nature* 2008; 451: 345-9.
7. Patrawala L, Calhoun T, Schneider-Broussard R, Li H, Bhatia B, Tang S, et al. Highly purified CD44+ prostate cancer cells from xenograft human tumors are enriched in tumorigenic and metastatic progenitor cells. *Oncogene* 2006; 25: 1696-708.
8. Li C, Heidt DG, Dalerba P, Burant CF, Zhang L, Adsay V, et al. Identification of pancreatic cancer stem cells. *Cancer Res* 2007;67:1030-7.
9. O'Brien CA, Pollett A, Gallinger S, Dick JE. A human colon cancer cell capable of initiating tumour growth in immunodeficient mice. *Nature* 2007;445:106-10.
10. Clarke MF, Dick JE, Dirks PB, Eaves CJ, Jamieson CH, Jones DL, et al. Cancer stem cells perspectives on current status and future directions: AACR Workshop on cancer stem cells. *Cancer Res* 2006;66:9339-44.
11. Gupta PB, Onder TT, Jiang G, Tao K, Kuperwasser C, Weinberg RA, et al. Identification of selective inhibitors of cancer stem cells by high-throughput screening. *Cell* 2009;138:645-59.
12. Hemmati HD, Nakano I, Lazareff JA, Masterman-Smith M, Geschwind DH, Bronner-Fraser M, et al. Cancerous stem cells can arise from pediatric brain tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;100:15178-83.
13. Fang D, Nguyen TK, Leishear K, Finko R, Kulp AN, Hotz S, et al. A tumorigenic subpopulation with stem cell properties in melanomas. *Cancer Res* 2005;65: 9328-37.
14. Ponti D, Costa A, Zaffaroni N, Pratesi G, Petrangolini G, Coradini D, et al. Isolation and in vitro propagation of tumorigenic breast cancer cells with stem/progenitor cell properties. *Cancer Res* 2005; 65: 5506-11.
15. Zhang S, Balch C, Chan MW, Lai HC, Matei D, Schilder JM, et al. Identification and characterization of ovarian cancer-initiating cells from primary human tumors. *Cancer Res* 2008; 68: 4311-20.
16. Eramo A, Lotti F, Sette G, Pilozzi E, Biffoni M, Di Virgilio A, et al. Identification and expansion of the tumorigenic lung cancer stem cell population. *Cell Death Differ* 2008;15: 504-14.
17. 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; 1:389-402.
18. Dick JE. Looking ahead in cancer stem cell research. *Nat Biotechnol* 2009; 27: 44-6.
19. Kanwar SS, Yu Y, Nautiyal J, Patel BB, Majumdar AP. The Wnt/beta-catenin pathway regulates growth and maintenance of colonospheres. *Mol Cancer* 2010; 9: 212.
20. Vermeulen L, Todaro M, de Sousa Mello F, Sprick MR, Kemper K, Perez Alea M, et al. Single-cell cloning of colon cancer stem cells reveals a multi-lineage differentiation capacity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008;105:13427-32.
21. Zhang H, Li W, Nan F, Ren F, Wang H, Xu Y, et al. MicroRNA expression profile of colon cancer stem-like cells in HT29 adenocarcinoma cell line. *Biochem Biophys Res Commun* 2011; 404: 273-8.
22. Fang DD, Kim YJ, Lee CN, Aggarwal S, McKinnon K, Mesmer D, et al. Expansion of CD133(+) colon cancer cultures retaining stem cell properties to enable cancer stem cell target discovery. *Br J Cancer* 2010;102: 265-75.