

تغییرات بیانی ژن CD44 و افزایش میزان آپوپتوز در رده سلولی MCF-7 سرطان پستان در شرایط بی‌وزنی شبیه سازی شده

نویسندگان:

زهرا حاج ابراهیمی^{*}، مریم صلواتی^۱

۱- استادیار پژوهشی، دکتری تخصصی، پژوهشگاه هوافضا، وزارت علوم، تحقیقات و فناوری، تهران، ایران

Pars Journal of Medical Sciences, Vol.17, No.3, Fall 2019

چکیده:

مقدمه: مولکول CD44 در چسبندگی سلولی، هدایت رشد و مسیرهای سیگنالی سلول نقش داشته و در بسیاری از انواع سرطان‌ها از جمله سرطان پستان دخالت دارد، به گونه‌ای که بیان آن در تومورهای بازال تهاجمی بسیار زیاد است. بی‌وزنی شبیه سازی شده بر تکثیر و متاستاز سلول‌های توموری اثر می‌گذارد و در سال‌های اخیر به عنوان یک روش جدید برای مطالعه رشد و تکثیر سلول‌های سرطانی معرفی شده است. هدف از مطالعه حاضر بررسی بیان ژن CD44 و میزان آپوپتوز در رده سلولی MCF-7 سرطان پستان در شرایط بی‌وزنی شبیه سازی شده بود.

روش کار: رده سلولی MCF-7 در شرایط جاذبه طبیعی و بی‌وزنی (۱ و ۳ روز) توسط دستگاه کلینواست تکثیر شد. بیان ژن و میزان آپوپتوز با استفاده از روش Real-time PCR و کیت رنگ آمیزی انکسین ۵ اندازه‌گیری شد.

یافته‌ها: نتایج نشان داد که بی‌وزنی پس از یک روز بیان ژن را ۵۰ درصد کاهش و پس از ۳ روز به میزان ۴ برابر افزایش می‌دهد. همچنین میزان آپوپتوز به میزان ۴۰ درصد پس از یک روز بی‌وزنی افزایش یافت.

نتیجه‌گیری: به نظر می‌رسد که پاسخ سلول‌های سرطانی به بی‌وزنی می‌تواند وابسته به زمان باشد و اعمال بی‌وزنی روی رده سلولی MCF-7 برای مدت یک روز ممکن است اثرات مثبتی بر کاهش فنوتیپ سرطانی در این رده سلولی داشته باشد و بتواند به عنوان روشی جدید برای درمان سرطان مورد توجه قرار گیرد.

واژگان کلیدی: سرطان پستان، بی‌وزنی، CD44، آپوپتوز

Pars J Med Sci 2019;17(3):26-34

مقدمه:

و چسبندگی سلولی موجب از بین رفتن ساختار بافتی می‌شود و یک ویژگی از تغییرات نئوپلاستی محسوب می‌شود [۲]. سرطان پستان شایع‌ترین سرطان در بین زنان است و مطالعه آن از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. مولکول CD44 می‌تواند سیگنال‌های داخل سلولی را برای رشد و حرکت هدایت کرده و در بسیاری از انواع سرطان‌ها از جمله سرطان پستان دخالت دارد [۲]. در سرطان پروستات و نوروبلاستوما، مولکول CD44 به

مولکول CD44 توسط یک ژن بسیار محافظت شده ۵۰ کیلوبازی کد می‌شود که در انسان روی کروموزوم ۱۱ قرار دارد [۱]. این مولکول عضو خانواده‌ای بزرگ از مولکول‌های چسبندگی سلولی است که مسئول برقراری ارتباط و چسبندگی بین سلول‌های مجاور و ماتریکس خارج سلولی (ECM) است. چسبندگی سلولی و تشکیل بافت یکی از ویژگی‌های اساسی بافت‌های طبیعی است و برای حفظ یک پارچگی بافت ضروری است. اختلال در ارتباط

* نویسنده مسئول، نشانی: شهرک غرب، خ مهستان، کوچه پانزدهم (هوافضا)، پژوهشگاه هوافضا، تهران، ایران.

پست الکترونیک: hajehbrahimi@ari.ac.ir

تلفن تماس: ۰۲۱-۸۸۳۶۶۰۳۰ فاکس: ۰۲۱-۸۸۳۶۲۰۱۱

اصلاح: ۱۳۹۸/۸/۱ پذیرش: ۱۳۹۸/۸/۱۳

دریافت: ۱۳۹۷/۸/۲

روش کار:

مطالعه حاضر از نوع تجربی بوده و در آزمایشگاه زیست شناسی، پژوهشگاه هوافضا در سال ۱۳۹۶ انجام شده است. رده سلولی MCF-7 از مرکز ملی ذخایر ژنتیکی و زیستی ایران، کرج تهیه و در شرایط استاندارد و استریل به آزمایشگاه تحقیقاتی زیست پزشکی پژوهشگاه هوافضا منتقل شده است.

کشت و تکثیر سلول‌های MCF-7

سلول‌ها پس از انتقال به آزمایشگاه در شرایط استاندارد در فلاسک T25 (TPP, Switzerland) در انکوباتور ۳۷ درجه سلیوس با ۵٪ گاز دی اکسید کربن کشت و تکثیر شدند. محیط کشت استفاده شده DMEM با گلوکز بالا (Dulbecco's Modified Eagle Medium; Biowest, France) به همراه ۱۰٪ سرم گاوی (FBS; Biowest, France) و ۱٪ آنتی بیوتیک‌های پنی سیلین / استرپتومایسین بود. پس از پرشدن بیش از ۸۰٪ کف فلاسک، پاساژدهی با آنزیم تریپسین-EDTA (Biowest, France) ۰/۰۵ درصد انجام شد. شمارش سلولی با لام هماتوسایتومتر انجام شد. بعد از دو تا سه پاساژ، سلول‌ها برای تحلیل‌های بعدی مورد استفاده قرار گرفتند.

تیمار بی‌وزنی

به منظور اعمال تیمار بی‌وزنی، ابتدا سلول‌ها به تعداد 2×10^6 در لوله‌های کشت سلول (tissue culture tube=TPP) کشت داده شدند. نمونه‌های مورد مطالعه شامل دو گروه بودند: سلول‌های کنترل (۱G یا بدون بی‌وزنی) و نمونه‌های بی‌وزنی (۱ روز و ۳ روز بی‌وزنی). هر دو گروه در لوله‌های کشت سلولی کشت شدند. پس از چسپیدن سلول‌ها، برای جلوگیری از حضور حباب و ایجاد نیروهای برشی، لوله‌های کشت کاملاً با محیط کشت پر شدند. برای ثابت ماندن pH محیط کشت، از غلظت ۱۵ میلی مولار HEPES در محیط کشت استفاده شد. برای ایجاد بی‌وزنی از دستگاه کلینواست تک محوره در پژوهشگاه هوافضا که از سازمان ملل گرفته شده بود، استفاده شد. چرخش دستگاه کلینواستت به صورتی است که جاذبه برای سلول‌ها قابل تشخیص نیست. میزان بی‌وزنی اعمال شده ۰/۰۱G بود.

مراحل ایجاد بی‌وزنی به شرح زیر بود: دستگاه کلینواستت پس از استریل کردن توسط نور ماوراءبنفش و الکل ۷۰ درصد، در داخل انکوباتور کشت سلولی قرار داده شد. دور دستگاه کلینواستت بر روی ۳۰rpm تنظیم شد و سپس نمونه‌ها در مرکز کلینواستت تثبیت شدند. در زمان‌های ۱ و ۳ روز پس از روشن کردن دستگاه، آن را خاموش کرده و نمونه‌ها برای استخراج RNA خارج شدند. لازم به ذکر است نمونه‌های کنترل هم زمان در داخل انکوباتور

عنوان ژن سرکوب گر متاستاز معرفی شده است [۳، ۴]، هرچند که به تازگی نشان داده شده است که می‌تواند در رشد سرطان پروستات نقش داشته باشد [۵]. نقش این مولکول در سرطان پستان نامشخص و بحث برانگیز است. این مولکول در محیط آزمایشگاه، هم سیگنال‌های پیشرفت و هم سیگنال‌های ضد توموری را میانجی‌گری می‌کند و می‌تواند موجب مهار و یا پیشرفت متاستاز در محیط *in vivo* از طریق القای آپوپتوز با فعال کردن کاسپاز ۳ شود [۹-۶].

گران‌ش یک نیروی همیشگی در زمین است که همه موجودات زنده تحت تاثیر ثابت آن تکامل یافته‌اند. در شرایط بی‌وزنی و نبود نیروی گران‌ش، بدن انسان تغییرات فیزیولوژیکی را متحمل می‌شود. از دهه ۱۹۶۰، صدها فضانوردی که مدت زمانی را در فضا سپری کرده‌اند، تغییرات فیزیولوژیکی مانند آتروفی عضلانی-اسکلتی، اختلال در سیستم ایمنی و عملکرد غیرطبیعی سلولی را نشان داده‌اند [۱۰، ۱۱]. مطالعات نشان داده است که بی‌وزنی شبیه سازی شده موجب تغییر اسکلت سلولی و پروتئین‌های ماتریکس خارج سلولی می‌شود [۱۲-۱۴]. بی‌وزنی شبیه‌سازی شده همچنین بر چسبندگی سلول‌های توموری، تکثیر، مهاجرت و متاستاز تاثیر می‌گذارد و موجب القای اتوفاژی در سلول‌ها می‌شود [۱۹-۱۴]. با این حال، سازوکارهای مولکولی آن هنوز به درستی مشخص نشده‌اند. به تازگی در یک مطالعه نشان داده شده است که بی‌وزنی شبیه‌سازی شده با دستگاه کلینواستت، موجب کاهش تکثیر و چسبندگی و مهاجرت سلول‌های سرطانی ملانوما در محیط *in vitro* و کاهش متاستاز آنها به ریه در شرایط *in vivo* می‌شود [۲۰].

به طور کلی، مطالعه سلول‌های سرطانی در شرایط بی‌وزنی می‌تواند هم در فهم سازوکارهای ایجاد و پیشرفت سرطان و هم در توسعه روش‌های درمانی جدید برای درمان سرطان مفید باشد. از آن جا که قرارگیری در شرایط فضا و بی‌وزنی واقعی پرهزینه و مشکل است، اکثر مطالعات از دستگاه‌های شبیه ساز بی‌وزنی و انجام مطالعات در شرایط *in vitro* استفاده می‌کنند.

رده سلولی MCF-7 به طور گسترده‌ای برای مطالعه سرطان در شرایط بی‌وزنی استفاده شده است. از طرف دیگر، این رده سلولی در شرایط شبیه‌سازی شده بی‌وزنی بسیار قوی است و از این لحاظ برای مطالعه سلول‌های سرطانی در شرایط شبیه سازی شده بی‌وزنی بسیار مناسب است [۲۳-۲۱]. باتوجه به مطالب بیان شده، هدف از مطالعه حاضر بررسی تغییرات بیانی ژن CD44 و میزان آپوپتوز در شرایط بی‌وزنی شبیه سازی شده با دستگاه کلینواستت در رده سلولی MCF-7 سرطان پستان است. این مطالعه برای اولین بار انجام شده است.

و خارج از کلینواستت قرار داشتند. همه آزمایش ها سه بار تکرار شدند.

آزمایش انکسین برای بررسی میزان آپوپتوز

برای تشخیص سلول‌های در حال آپوپتوز در یک جمعیت سلولی از کیت Annexin-V-FIUCS Staining kit استفاده شد. این کیت امکان تشخیص و تمیز دادن سلول‌های در حال آپوپتوز را از سلول‌های نکروز می‌سازد. برای این کار، محیط کشت سلول‌ها در یک ظرف تمیز تخلیه و نگهداری و سطح سلول‌ها دو مرتبه با PBS شستشو داده شد. سپس سلول‌ها تریپسین شدند تا به طور کامل از کف لوله کشت جدا شوند. محیط روئی به سوسپانسیون سلولی اضافه شد. سوسپانسیون سلولی در دور ۲۰۰g به مدت شش دقیقه در دمای محیط سانتیفریوژ شد. محلول روئی تخلیه و رسوب در ۰/۵ میلی لیتر PBS حل شد. سپس ۴/۵ میلی لیتر اتانول ۷۰٪ سرد به نمونه‌ها افزوده و به شدت پینتاژ شد. سلول‌های تثبیت شده در دور ۲۰۰g به مدت شش دقیقه در دمای محیط سانتیفریوژ شدند. محلول روئی تخلیه شد و رسوب در ۵ میلی لیتر بافر PBS حل شد. مجدداً سلول‌ها در دور ۲۰۰g به مدت شش دقیقه در دمای محیط سانتیفریوژ شدند. محلول روئی تخلیه شد. در نهایت ۲۰ میکرولیتر ماده Annexin-V-Fluos در ۱ میلی لیتر بافر انکوباسیون حل و به آن ۲۰ میکرولیتر محلول PI اضافه شد. ۱۰۰ میکرولیتر از محلول حاصل به سلول‌های آماده شده افزوده شد. سلول‌ها برای مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۱۵ تا ۲۵ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. نمونه‌ها با استفاده از دستگاه فلوسایتومتری Cyflow Space (Partec, Germany) و نرم افزار FloMax (version 2.70) تحلیل شدند.

تحلیل بیان ژن به روش Real-time PCR

میزان بیان ژن CD44 قبل و بعد از تیمار بی‌وزنی به روش Real-time quantitative PCR بررسی شد. RNA کل سلولی از سلول‌های کنترل و سلول‌های کشت شده در شرایط بی‌وزنی با استفاده از کیت استخراج RNA (RNX-Plus; Sinaclon, Iran) استخراج شدند. به طور خلاصه، مراحل استخراج RNA به شرح زیر بود: ۱ میلی لیتر از محلول RNX-Plus روی رسوب سلولی اضافه، به مدت ۵ الی ۱۰ ثانیه ورتکس و در دمای اتاق به مدت ۵ دقیقه انکوبه شد. سپس ۲۰۰ میکرولیتر کلروفورم به آن اضافه و پس از انکوباسیون به مدت ۵ دقیقه روی یخ (یا در دمای ۴°C)، با دور ۱۲۰۰۰rpm و در دمای ۴°C به مدت ۱۵ دقیقه سانتیفریوژ شد. فاز آبی (محلول روئی) به میکروتیوب جدید منتقل شده و هم حجم با آن، ایزوپروپانل اضافه و پس از ۱۵ دقیقه انکوباسیون روی یخ، به مدت ۱۵ دقیقه، با دور ۱۲۰۰۰rpm و در دمای ۴°C

سانتریفیوژ شد. یک میلی لیتر اتانل ۷۵ درصد روی رسوب ریخته و به مدت ۸ دقیقه، با دور ۷۵۰۰rpm و در دمای ۴°C سانتیفریوژ شد. رسوب حاصل در دمای اتاق خشک شد و سپس میزان ۵۰ میکرولیتر آب عاری از RNase به آن افزوده شد و به مدت ۱۰ دقیقه در ۵۵-۶۰°C قرار گرفت تا رسوب RNA حل شود و در دمای ۷۵- درجه سلسیوس تا زمان استفاده نگهداری شد. صحت و تمامیت RNA استخراج شده از طریق الکتروفورز ژل آگارز، اسپکتروفوتومتری در طول موج ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر و همچنین PCR برای ژن مرجع تایید شد.

یک میکروگرم از RNA کل برای سنتز cDNA و با استفاده از کیت تجاری Prime Script™ RT reagent (Takara, Japan) در حجم واکنش ۲۰ میکرولیتر و مطابق پروتکل شرکت سازنده استفاده شد. بدین منظور ۲ میکروگرم از RNA کل استخراج شده با ۴ میکرولیتر بافر تکثیر ۵x، ۰/۵ میکرولیتر آنزیم رونویسی معکوس، ۰/۵ میکرولیتر از هر کدام از پرایمرهای فوروارد و ریورس (۱۰ پیکومول) در حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر مخلوط و به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۳۷°C انکوبه شد. سپس به منظور غیر فعال نمودن آنزیم نسخه‌بردار معکوس، ویال‌ها به مدت ۵ ثانیه در ۸۵°C قرار گرفت. محصول واکنش تا زمان استفاده در دمای ۲۰-°C درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

برای تکثیر ژن‌های CD44 و مرجع، واکنش Real time PCR با استفاده از ۲ میکرولیتر از محصول cDNA، پرایمرهای مخصوص هر ژن، کیت SYBR Green Real Time Master Mix (Takara, Japan) و دستگاه StepOnePlus Real-Time PCR (Applied Biosystems, USA) انجام شد. شرایط دمایی مورد استفاده شامل یک مرحله فعال سازی اولیه در دمای ۹۵°C به مدت ۳۰ ثانیه و در ادامه ۴۰ سیکل به صورت ۵ ثانیه در دمای ۹۵°C برای دناتوراسیون و ۳۴ ثانیه در دمای ۶۰°C برای گسترش هم زمان بود. برای اطمینان از اختصاصی بودن محصولات، منحنی ذوب برای ژن‌ها بعد از انجام واکنش Real time PCR رسم شد و محصولات PCR توسط الکتروفورز ژل آگارز کنترل شد. میزان بیان ژن با روش کمی نسبی و تعیین $\Delta\Delta CT$ با استفاده از فرمول $2^{-\Delta\Delta CT}$ محاسبه شد. از GAPDH به عنوان ژن مرجع استفاده شد. پرایمرهای اختصاصی با نرم افزار OLIGO7 طراحی و توسط شرکت Macrogen (South Korea) سفارش داده شدند. توالی پرایمرها در جدول ۱ آورده شده است. آزمایش ها سه مرتبه تکرار شدند.

تحلیل آماری

رسم نمودارها و تحلیل آماری داده ها به کمک نرم افزار GraphPad Prism نسخه ۷ و با استفاده از آزمون آماری

ژن با استفاده از نرم افزار آماری رسم (شکل ۴) و داده‌ها تحلیل شدند.

تی انجام گرفت. سطح معناداری آماری $P < 0.05$ در نظر گرفته شد. پس از انجام واکنش PCR و تکثیر ژن‌های موردنظر، $2^{-\Delta\Delta Ct}$ محاسبه و نمودار بیان نمونه‌ها وارد نرم افزار اکسل شد و

جدول ۱: ترادف و مشخصات پرایمرهای به کار گرفته شده در مطالعه

نام ژن	شماره RefSeq	توالی پرایمر (۵ به ۳)	طول محصول PCR (bp)
GAPDH	NG_007073.2	Forward: ACGACCACTTTGTCAAGCTCAT Reverse: TCCACCACCCTGTTGCTGTA	101
CD44	NM_001202556.1	Forward : GCTTCAATGCTTCAGCTCCAC Reverse : GGGTTGCTGGGGTAGATGTC	166

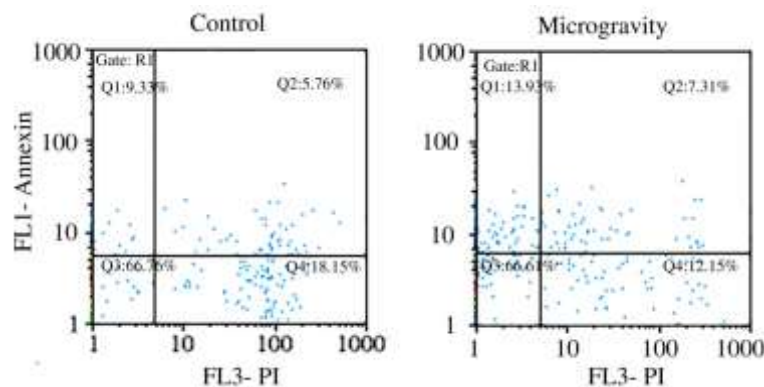
یافته‌ها:

تکثیر قطعات اختصاصی و بررسی عدم وجود قطعات غیر اختصاصی در محصول PCR، نمودار منحنی ذوب (شکل ۲) برای هر دوی ژن‌های CD44 و GAPDH به صورت جداگانه توسط دستگاه PCR رسم شد. همچنین محصولات PCR روی ژل آگارز یک درصد الکتروفورز شد (شکل ۳). نتایج منحنی ذوب حاکی از اتصال صحیح پرایمرها و اختصاصیت محصول PCR برای ژن‌های موردنظر بود همچنین در الکتروفورز ژل آگارز تنها یک باند دیده شد که بیانگر عدم تکثیر محصول غیراختصاصی در محصول PCR می‌باشد.

نتایج نشان داد که بیان ژن CD44 در رده سلولی MCF-7 سرطان پستان پس از یک روز قرارگیری در معرض بی‌وزنی شبیه سازی شده به میزان نصف در مقایسه با نمونه‌های کنترل (جاذبه طبیعی) کاهش می‌یابد ($P=0/0009$). ادامه یافتن بی‌وزنی منجر به افزایش بیان ژن CD44 در این رده سلولی شد به طوری که پس از سه روز اعمال بی‌وزنی، بیان ژن CD44 تقریباً به میزان ۴/۵ برابر میزان بیان آن در نمونه‌های کنترل رسید ($P=0/0008$).

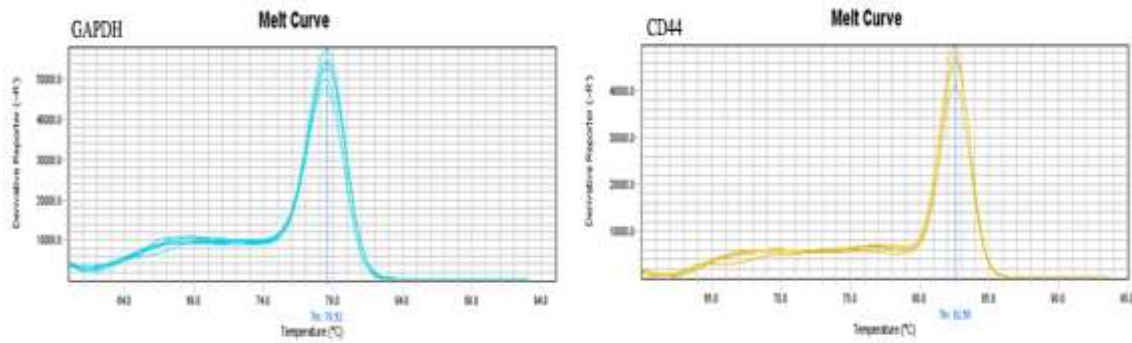
در مطالعه حاضر، برای بررسی میزان مرگ برنامه ریزی شده سلولی (آپوپتوز) در دو شرایط طبیعی زمینی و بی‌وزنی از آزمون انکسین استفاده شد (شکل ۱). در این شکل مشاهده می‌شود که در سلول‌های گرفته شده تحت شرایط طبیعی زمینی (۱G)، میزان نکروزه شدن سلول‌ها ۱۸/۱۵٪، میزان آپوپتوز اولیه ۹/۳۳٪ و میزان آپوپتوز دیر هنگام ۵/۷۶٪ است. بنابراین، به طور کلی ۱۵٪/۰۹ سلول‌ها پس از گذشت یک روز دچار آپوپتوز می‌شوند، اما در سلول‌هایی که در شرایط بی‌وزنی قرار گرفته بودند، میزان نکروزه شدن سلول‌ها ۱۲/۱۵٪، میزان آپوپتوز اولیه ۱۳/۹۳٪ و میزان آپوپتوز دیر هنگام ۷/۳۱٪ بود که در نهایت ۲۱٪/۲۴ سلول‌ها پس از گذشت یک روز دچار آپوپتوز شدند. بنابراین، بی‌وزنی به طور معناداری (۴۰٪) میزان آپوپتوز را در سلول‌های رده MCF-7 سرطان پستان در مقایسه با نمونه‌های کنترل افزایش داده است.

در پژوهش حاضر از رنگ فلورسانت سایبرگرین برای بررسی تغییرات بیانی ژن CD44 استفاده شد. به منظور بررسی اختصاصیت پرایمرها و رنگ فلورسانس سایبرگرین و اطمینان از

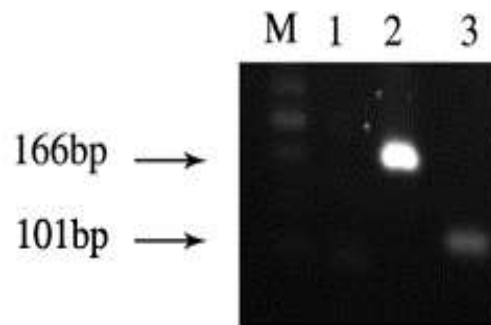


شکل ۱: اندازه‌گیری میزان آپوپتوز با استفاده از آزمون انکسین V. بی‌وزنی میزان آپوپتوز را در سلول‌های رده MCF-7 سرطان پستان به طور معناداری در مقایسه با نمونه‌های کنترل افزایش داده است.

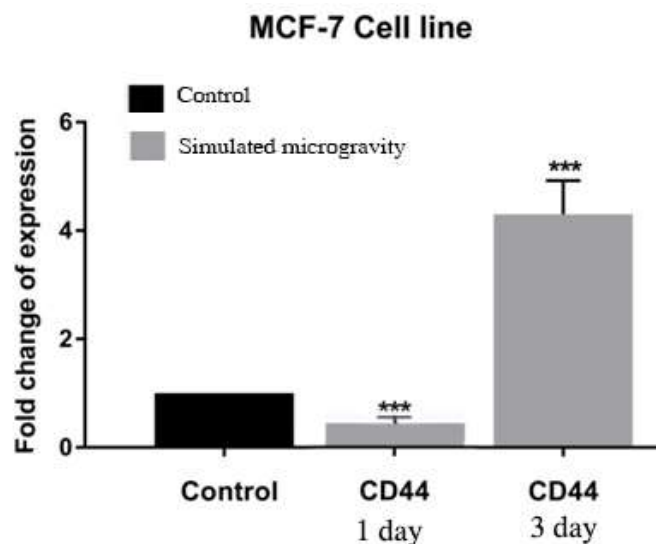
Q1: سلول‌ها در مراحل اولیه آپوپتوز، Q2: سلول‌ها در مراحل انتهایی آپوپتوز، Q3: سلول‌های زنده، Q4: سلول‌های نکروزه.



شکل ۲: نمودار منحنی ذوب ژن های GAPDH و CD44



شکل ۳: الکتروفورز ژل آگارز محصول PCR؛ چاهک M: DNA مارکر ۵۰bp، چاهک شماره ۲: محصول PCR ژن CD44 و چاهک شماره ۳: محصول PCR ژن GAPDH



شکل ۴: تغییرات بیانی ژن CD44 در رده سلولی MCF-7 پس از یک و سه روز کشت در محیط بی‌وزنی شبیه سازی شده

بحث:

مطالعات قبلی نشان داده است که بی‌وزنی بر چسبندگی سلول‌های توموری، تکثیر، مهاجم و متاستاز تاثیر می‌گذارد [۱۴]، [۱۵-۱۷] و موجب القای اتوفازی در سلول‌ها می‌شود [۱۸]. با این حال، سازوکارهای مولکولی که منجر به تغییرات مذکور می‌شود

مطالعات قبلی نشان داده است که بی‌وزنی بر چسبندگی سلول‌های توموری، تکثیر، مهاجم و متاستاز تاثیر می‌گذارد [۱۴]، [۱۵-۱۷] و موجب القای اتوفازی در سلول‌ها می‌شود [۱۸]. با این حال، سازوکارهای مولکولی که منجر به تغییرات مذکور می‌شود

رده سلولی پس از یک روز قرارگیری در شرایط بی‌وزنی شبیه‌سازی شده به میزان قابل توجهی (۵۰ درصد) کاهش یافت. بنابراین، به نظر می‌رسد که پاسخ سلول‌های سرطانی به بی‌وزنی می‌تواند وابسته به زمان بوده و با تغییر مدت زمان بی‌وزنی تغییر یابد. به نظر می‌رسد که اعمال بی‌وزنی روی رده سلولی MCF-7 برای مدت یک روز ممکن است اثرات مثبتی بر کاهش فنوتیپ سرطانی در این رده سلولی داشته باشد. تغییرات فنوتیپی رده‌های سلولی سرطان سینه بر اثر تغییرات بیانی ژن‌ها تحت تاثیر عامل‌های محیطی در مطالعات دیگری نیز نشان داده شده است. در سال ۲۰۰۷، بایلیس و همکارانش نشان دادند که مهار بیان ژن MAPK (mitogen-activated protein kinase) در رده‌های سلولی سرطان پستان فاقد گیرنده استروژن، منجر به بیان این گیرنده در این سلول‌ها می‌شود [۲۷]. بررسی تغییرات بیانی مولکول CD44 در رده سلولی سرطان پستان در شرایط شبیه‌سازی شده بی‌وزنی برای اولین بار در این مطالعه انجام شده است. پیش از این مطالعات بسیار دیگری نیز به بررسی تغییرات بیانی ژن‌های دیگر در رده‌های سرطانی پستان در شرایط بی‌وزنی پرداخته‌اند [۲۱-۲۳]. کوپ و همکاران در سال ۲۰۱۶ بیان ۲۹ ژن را در شرایط شبیه‌سازی بی‌وزنی با دستگاه ماشین تغییر وضعیت اتفاقی در رده سلولی MCF-7 بررسی کردند. آنها نشان دادند که بیان ژن‌های اسکلت سلولی که مسئول ایجاد فرم اسفروئید هستند در زمان‌های کوتاه قرارگیری سلول در شرایط شبیه‌سازی بی‌وزنی تغییر نمی‌کند. بیان ژن‌های IL-8، VEGFA و FLT1 پس از ۲ تا ۴ ساعت قرارگیری سلول در شرایط شبیه‌سازی بی‌وزنی افزایش می‌یابد و بیان ژن‌های ACTB، TUBB، EZR، RDX، FN1، VEGFA، Casp9، FLK1، Casp3 و PRKCA پس از ۵ روز قرارگیری سلول در شرایط شبیه‌سازی بی‌وزنی کاهش می‌یابد. در مطالعه دیگر روی همین رده سلولی در سال ۲۰۱۸ توسط کوپ و همکاران به کمک ماشین تغییر وضعیت اتفاقی مشخص شد که بیان آنزیم‌های تجزیه کننده heme شامل ANXA1، ANXA2، CTGF، CAV2 و همچنین بیان ژن‌های ICAM1، FAS، Casp8، BAX، p53، CYC1 و PARP1 پس از ۲۴ ساعت قرارگیری سلول در شرایط شبیه‌سازی بی‌وزنی به طور معناداری افزایش می‌یابد.

در بخش دیگر مطالعه حاضر، میزان آپوپتوز در رده سلولی MCF-7 پس از یک روز قرارگیری در شرایط بی‌وزنی شبیه‌سازی شده با دستگاه کلینواستت بررسی شد. آپوپتوز، مرگ برنامه‌ریزی شده سلول است که در پاسخ به عامل‌های تنش‌زای گوناگون مانند عامل‌های فیزیولوژیک، پاتولوژیک و یا محرک‌های سیتوتوکسیک در بدن رخ می‌دهد. آپوپتوز در مراحل متفاوت تکامل زیستی یک موجود زنده ایفای نقش کرده و اگر از

هنوز به درستی مشخص نشده‌اند. در این مطالعه نشان داده شد که بی‌وزنی شبیه‌سازی شده منجر به تغییر بیان ژن CD44 می‌شود. اعمال بی‌وزنی منجر به کاهش ۵۰ درصدی ژن CD44 در رده سلولی MCF-7 سرطان پستان پس از یک روز کشت سلول‌ها روی دستگاه کلینواستت شد. ادامه یافتن شرایط بی‌وزنی منجر به افزایش بیان این ژن شده به طوری که پس از سه روز قرارگیری سلول‌ها در شرایط بی‌وزنی شبیه‌سازی شده، بیان این ژن به میزان قابل توجهی افزایش یافت و به چهار برابر میزان بیان آن در سلول‌های کنترل رسید. مولکول CD44 عضو خانواده‌ای بزرگ از مولکول‌های چسبندگی سلولی است که مسئول برقراری ارتباط و چسبندگی بین سلول‌های مجاور و بین سلول و ماتریکس خارج سلولی است. این مولکول، علاوه بر داشتن نقش در چسبندگی سلولی، می‌تواند سیگنال‌های داخل سلولی را برای رشد و حرکت هدایت کند و بنابراین در بسیاری از انواع سرطان‌ها شامل سرطان پستان، ریه، پروستات، تخمدان، سرطان دهانه رحم، کولورکتال و نوروبلاستوما دخالت دارد [۲]. در سرطان پروستات و نوروبلاستوما، مولکول CD44 به عنوان ژن سرکوب‌گر متاستاز معرفی شده است [۳، ۴]. رده سلولی MCF-7 سرطان پستان از نظر طبقه بندی در گروه لومینال A (Luminal A) قرار دارد. مطالعات نشان داده است که سلول‌های سرطانی در این رده، دارای گیرنده استروژن، گیرنده پروژسترون و فاقد گیرنده ۲ عامل رشد اپیدرمی انسان می‌باشند [۲۴]. برخی از گزارش‌ها بیانگر این است که بیان ژن مذکور در رده سلول‌های لومینال سرطان سینه بسیار پایین است، در حالی که رده سلول‌های بازال سرطان سینه مانند رده سلولی MDA-MB-468 غنی از مولکول CD44 هستند [۲۵، ۲۶]. رده سلول‌های بازال سه گانه منفی هستند و فاقد گیرنده‌های استروژن، پروژسترون و گیرنده ۲ عامل رشد اپیدرمی انسان می‌باشند. ژن CD44 به طور معناداری در تومورهای بازال و تومورهای بازال تهاجمی بیان می‌شود و به شدت با مارکرهای بازال (EGFR، CK5، P-cadherin، CK14 و vimentin) مرتبط است. این تومورها دارای پیش‌آگهی ضعیفی هستند [۲۷]. همچنین مشخص شده است که سلول‌هایی که برای مولکول CD44 مثبت هستند، پروفایل سلول‌های مزانشیمی را نشان می‌دهند و غنی از ژن‌هایی اند که مرتبط با تکثیر، تحرک و رگ‌زایی می‌باشد و مثبت بودن این سلول‌ها همرا با کاهش بقای بیمار می‌باشد [۲۸]. افزایش بیان ژن CD44 در رده سلولی MCF-7 پس از سه روز قرارگیری در شرایط بی‌وزنی ممکن است بیانگر تغییر فنوتیپ سلول‌های این رده از نوع لومینال به نوع بازال باشد. این امر نیازمند مطالعات بیشتر و بررسی تغییرات بیانی گیرنده‌های استروژن و پروژسترون در این رده سلولی پس از قرارگیری در شرایط بی‌وزنی است. در مقابل، بیان این ژن در این

بهتری در مقایسه با اعمال بی‌وزنی برای مدت سه روز داشت و باعث افزایش میزان آپوپتوز در این سلول‌ها و کاهش بیان ژن CD44 شد. مطالعه بیشتر تغییرات بیانی ژن‌ها و فنوتیپ رده‌های سلول‌های سرطانی در شرایط بی‌وزنی ممکن است در توسعه روش‌های درمانی جدید برای درمان بیماری سرطان موثر باشد.

تشکر و قدردانی:

این مقاله بر اساس نتایج حاصل از طرح پژوهشی با عنوان "مطالعه بیان ژن CD44 در شرایط بی‌وزنی شبیه سازی شده در رده سلولی MCF-7" انجام شده در سال ۱۳۹۶ در آزمایشگاه زیست فضایی پژوهشگاه هوافضا نگارش شده است. نویسندگان مقاله مراتب تشکر و قدردانی خود را از مسئولین محترم پژوهشی آن مرکز ابراز می‌دارند.

تعارض منافع:

هیچ گونه تعارض منافع توسط نویسندگان بیان نشده است.

References:

- Naor D, Sionov RV, Ish-Shalom D. CD44: structure, function, and association with the malignant process. *Adv Cancer Res* 1997;71: 241-319.
- Naor D, Nedvetzki S, Golan I, Melnik L, Faitelson Y. CD44 in cancer. *Crit Rev Clin Lab Sci* 2002; 39 (6):527-79.
- Gao AC, Lou W, Dong JT, Isaacs JT. CD44 is a metastasis suppressor gene for prostatic cancer located on human chromosome 11p13. *Cancer Res* 1997; 57 (5):846-9.
- Horak CE, Lee JH, Marshall JC, Shreeve SM, Steeg PS. The role of metastasis suppressor genes in metastatic dormancy. *APMIS* 2008; 116 (7-8):586-601.
- Liu C, Kelnar K, Liu B, Chen X, Calhoun-Davis T, Li H, et al. The microRNA miR-34a inhibits prostate cancer stem cells and metastasis by directly repressing CD44. *Nat Med* 2011; 17 (2):211-5.
- Al-Hajj M, Wicha MS, Benito-Hernandez A, Morrison SJ, Clarke MF. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100 (7):3983-8.
- Yu Q, Stamenkovic I. Localization of matrix metalloproteinase 9 to the cell surface provides a mechanism for CD44-mediated tumor invasion. *Genes Dev* 1999; 13 (1):35-48.
- Yu Q, Stamenkovic I. Cell surface-localized matrix metalloproteinase-9 proteolytically activates TGF-beta and promotes tumor invasion and angiogenesis. *Genes Dev* 2000; 14 (2):163-76.
- Ghatak S, Misra S, Toole BP. Hyaluronan oligosaccharides inhibit anchorage-independent growth of tumor cells by suppressing the phosphoinositide 3-kinase/Akt cell survival pathway. *J Biol Chem* 2002;277 (41):38013-20.
- Williams D, Kuipers A, Mukai C, Thirsk R. Acclimation during space flight: effects on human physiology. *CMAJ* 2009;180 (13):1317-23.
- Moos PJ, Fattaey HK, Johnson TC. Cell proliferation inhibition in reduced gravity experimental cell research 1994, 213 (2): 458-462.
- Jessup JM, Goodwin TJ, Spaulding G. Prospects for use of microgravity-based bioreactors to study three-dimensional host tumor interactions in human neoplasia. *J Cell Biochem* 1993; 51 (3): 290-300.
- Hughes-Fulford M. Function of the cytoskeleton in gravisensing during spaceflight. *Adv Space Res* 2003; 32 (8); 1585-1593.
- Infanger M, Kossmehl P, Shakibaei M, Bauer J, Kossmehl-Zorn S, Cogoli A, et al. Simulated weightlessness changes the cytoskeleton and extracellular matrix proteins in papillary thyroid carcinoma cells. *Cell Tissue Res* 2006; 324: (2), 267-77.
- Guignandon A, Usson Y, Laroche N, Lafage-Proust MH, Sabido O, Alexandre C, et al. Effects of intermittent or continuous gravitational stresses on cell-matrix adhesion: quantitative analysis of focal contacts in osteoblastic ROS 17/2.8 cells. *Exp Cell Res* 1997; 236 (1): 66-75.
- Vassy J, Portet S, Beil M, Millot G, Fauvel-Lafève F, Gasset G, et al. Weightlessness acts on human breast cancer cell line MCF-7. *Adv Space Res* 2003; 32 (8): 1595-1603.
- Chang D, Xu H, Guo Y, Jiang X, Liu Y, Li K, et al. Simulated microgravity alters the metastatic potential

- of a human lung adenocarcinoma cell line. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 2013; 49 (3): 170–177.
18. Ryu HW, Choi SH, Namkoong S, Jang IS, Seo DH, Choi I, et al. Simulated microgravity contributes to autophagy induction by regulating AMP-activated protein kinase. *DNA Cell Biol* 2014; 33 (3): 128–135.
 19. Wickstead B, Gull K. The evolution of the cytoskeleton. *J Cell Biol* 2011; 194 (4): 513–525.
 20. Tan X, Xu A, Zhao T, Zhao Q, Zhang J, Fan C, et al. Simulated microgravity inhibits cellfocal adhesions leading to reduced melanoma cell proliferation and metastasis via FAK/RhoA-regulated mTORC1 and AMPK pathways. *Sci Reports* 2018; 8 (1): 3769–80.
 21. Kopp S, Slumstrup L, Corydon TJ, Sahana J, Aleshcheva G, Islam T, et al. Identifications of novel mechanisms in breast cancer cells involving duct-like multicellular spheroid formation after exposure to the Random Positioning Machine. *Sci Rep* 2016; 6: 26887.
 22. Kopp S, Sahana J, Islam T, Petersen AG, Bauer J, Corydon TJ, et al. The role of NFkappaB in spheroid formation of human breast cancer cells cultured on the Random Positioning Machine. *Sci Rep* 2018; 8(1): 921.
 23. Sahana J, Nassef MZ, Wehland M, Kopp S, Krüger M, Corydon TJ, et al. Decreased E-Cadherin in MCF7 Human Breast Cancer Cells Forming Multicellular Spheroids Exposed to Simulated Microgravity. *Proteomics* 2018; 18(13): e1800015.
 24. Prat A, Karginova O, Parker JS, Fan C, He X, Bixby L, et al. Characterization of cell lines derived from breast cancers and normal mammary tissues for the study of the intrinsic molecular subtypes. *Breast Cancer Res Treat* 2013; 142 (2): 237–255.
 25. Fillmore CM, Kuperwasser C. Human breast cancer cell lines contain stem-like cells that self-renew, give rise to phenotypically diverse progeny and survive chemotherapy. *Breast Cancer Res* 2008; 10 (2): R25–37.
 26. Sheridan C, Kishimoto H, Fuchs RK, Mehrotra S, Bhat-Nakshatri P, Turner CH, et al. CD44+/CD24– breast cancer cells exhibit enhanced invasive properties: an early step necessary for metastasis. *Breast Cancer Res* 2006; 8 (5): R59–71.
 27. Bayliss J, Hilger A, Vishnu P, Diehl K, El-Ashry D. Reversal of the estrogen receptor negative phenotype in breast cancer and restoration of antiestrogen response. *Clin Cancer Res* 2007; 13(23): 7029–7036.
 28. Ricardo S, Filipe Vieira A, Gerhard R, Leitão D, Pinto R, Cameselle-Teijeiro JF, et al. Breast cancer stem cell markers CD44, CD24 and ALDH1: expression distribution within intrinsic molecular subtype. *J Clin Pathol* 2011; 64 (11): 937–946.
 29. Reed JC. Apoptosis-based therapies. *Nat Rev Drug Discov* 2002; 1 (2): 111–21.

CD44 expression changes and increased apoptosis in MCF-7 cell line of breast cancer in simulated microgravity condition

Zahra Hajebrahimi^{1*}, Maryam Salavatifar¹

Received: 2018.10.24

Revised: 2019.10.23

Accepted: 2019.11.04

1. Aerospace Research Institute, Ministry of Science Research and Technology, Tehran, Iran

Pars Journal of Medical Sciences, Vol.17, No.3, Fall 2019

Pars J Med Sci 2019;17(3):26-34

Abstract:

Introduction:

CD44 molecule plays a role in cell adhesion and conduction of growth and cell signaling pathways and is involved in many types of cancers including breast cancer, which is highly expressed in invasive basal tumors. Simulated microgravity (weightlessness) affects tumor cell proliferation and metastasis and has been introduced in recent years as a new method to study the growth and proliferation of cancer cells. Therefore, the aim of the present study was to investigate the gene expression of CD44 and the level of apoptosis in MCF-7 breast cancer cell line under simulated microgravity condition.

Materials and Methods:

MCF-7 cell line was proliferated under normal gravity and microgravity (1 and 3 days) using clinostat apparatus. Gene expression and apoptosis was measured using real-time PCR technique and Annexin V staining kit.

Results:

The results showed that microgravity reduce gene expression (50%) after 1 day and increased it four times after 3 days. Also, the level of apoptosis was increased 40% after 1 day of microgravity.

Conclusion:

It seems that the response of cancer cells to microgravity can be time dependent and microgravity treatment for 1 day on MCF-7 cell line may have positive effects on reducing the phenotype of cancer in this cell line and can consider as a new way for cancer therapy.

Keywords: Breast Cancer, Weightlessness, CD44, Apoptosis

* Corresponding author Email: hajebrahimi@ari.ac.ir