Original Article

Identification and Characterization of Cancer Stem Cells in Mouse Malignant Melanoma

Amir Dashti[1], Marziyeh Ebrahimi[2], Jamshid Hadjati[3], Seyed Mohammad Moazzeni[4*]

1- Ph.D. Candidate, Department of Immunology, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran
2- Assistant Professor, Department of Stem Cells and Developmental Biology at Cell Science Research Center, Royan Institute for Stem Cell Biology and Technology, ACECR, Tehran, Iran
3- Professor, Department of Immunology, Faculty of Medical Sciences, Tehran University, Tehran, Iran
4- Professor, Department of Immunology, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

**Corresponding Address: P.O.Code: 1411713116, Department of Immunology, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran*
Email: moazzeni@modares.ac.ir

Received: 26/Apr/2014, Accepted: 10/Jun/2014

Abstract

Objective: Recent evidences suggest that tumors arise from a small subpopulation of cells, the cancer stem cells (CSCs) or tumor initiating cells. CSCs are able to resist the conventional methods of cancer therapy due to existence of ABC transporters on their surface. This leads to CSC resistance and maintenance resulting in post-treatment relapse and metastasis. Therefore, precise identification and characterization of these cells as a target for new therapeutic regimens is the goal of numerous studies. This study, with the intent to design a new method of immunotherapy for targeting cancer stem cells in mouse malignant melanoma, initially characterized the cancer stem cells in this malignancy.

Methods: In order to identify the CSCs we induced a melanoma tumor using the B16F10 cell line in C57BL/6 mice. The tumor bulk was dissociated by an enzymatic method and homogeneous tumor cells were sorted using anti-CD44 and anti-CD24 antibodies. The sorted tumor cell subpopulations were compared according to their ability to form cell spheres in serum free medium (SFM). We determined the tumor formation ability of all cell subpopulations by transplanting serial dilutions of B16-F10 and all sorted cells sub-populations into C57/BL6 mice.

Results: The results showed that although all separated cell subpopulations and B16-F10 cells formed non-adherent spheroids in SFM in the presence of B-27, but the $CD24^+$ cells presents a significantly higher ability to produce spheroids. The B16F10 cell line, $CD44^+CD24^-$ and $CD44^-CD24^-$ cells showed equal potencies in tumor induction (1 in 21730 cells). The $CD44^-CD24^+$ cells tumor induction potency was 1 in 17426 and this ability for the double positive cells ($CD44^+CD24^+$) was 1 in 11295.

Conclusion: Collectively, the double positive ($CD24^+CD44^+$) cells were more potent in both spheroid formation and tumorogenicity. Hence they might be the CSC population of mouse melanoma.

Keywords: Cancer stem cells, Tumor, Melanoma cell line B16F10, Identification

Modares Journal of Medical Sciences: *Pathobiology*, Vol 17, No 2, Summer 2014, Pages: 27-37

مقاله اصیل

شناسایی و تعیین خصوصیت سلول های بنیادین سرطانی در ملانومای بدخیم موشی

امیر دشتی[1]، مرضیه ابراهیمی[2]، جمشید حاجتی[3]، سید محمد مؤذنی[4*]

۱- دانشجوی دکتری تخصصی، گروه ایمنی‌شناسی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
۲- استادیار، گروه سلول‌های بنیادین و بیولوژی تکوینی، مرکز تحقیقات سلولی، انستیتو رویان، تهران، ایران
۳- استاد، گروه ایمنی‌شناسی پزشکی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تهران، تهران، ایران
۴- استاد، گروه ایمنی‌شناسی پزشکی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

*آدرس نویسنده مسئول: ایران، تهران، کدپستی: ۱۴۱۱۷۱۳۱۱۶، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم پزشکی، گروه ایمنی‌شناسی
Email: moazzeni@modares.ac.ir

دریافت مقاله: ۹۳/۰۲/۰۶ پذیرش مقاله: ۹۳/۰۳/۲۰

چکیده

هدف: یافته‌های جدید علمی در رابطه با چگونگی تشکیل سرطان پیشنهاد می‌کند که سرطان‌ها از زیر جمعیت کوچکی از سلول‌ها، تحت عنوان سلول‌های بنیادین سرطانی یا سلول‌های آغاز کنندهٔ تومور حاصل می‌شود. سلول‌های بنیادین سرطانی به دلیل حضور پمپ‌های انتقالی ABC در سطحشان نسبت به روش‌های درمانی معمول سرطان مقاوم هستند؛ بنابراین باقی ماندن آن‌ها پس از درمان منجر به بازگشت سرطان و بروز متاستاز می‌شود. لذا شناسایی و تعیین هویت صحیح این سلول‌ها در انواع سرطان‌ها به‌منظور هدف‌گیری آن‌ها در روش‌های درمانی جدید، بسیار مهم و دارای اهمیت است. در این مطالعه با هدف طراحی روش ایمنی درمانی جدید برای هدف‌گیری سلول‌های بنیادین سرطانی ملانومای موشی در مرحله اول شناسایی و تعیین خصوصیات این سلول‌ها انجام شد.

مواد و روش‌ها: ابتدا تومور ملانوما توسط رده سلولی ملانومایی B16F10 در موش C57BL/6 القا شد، سپس از توده توموری با استفاده از روش هضم آنزیمی سلول‌های هوموژن تهیه و توسط آنتی‌بادی‌های CD24 و CD44 رنگ‌آمیزی و جداسازی شدند. زیرجمعیت‌های سلولی به‌دست آمده از نظر توان تولید اسفیر در محیط فاقد سرم بررسی شدند. علاوه بر این؛ توانایی القای تومور زیر جمعیت‌های سلولی جدا شده با تزریق سریال رقت‌های متفاوت از سلول‌های مذکور به موش C57/BL6 مطالعه شد.

نتایج: سلول‌های $CD24^+$ به‌صورت معنی‌دار توان تولید اسفرویید بیشتری داشتند. در ارتباط با قدرت ایجاد تومور سلول‌های $CD24^+CD44^-$، سلول‌های دوگانه منفی $CD24^-CD44^-$ و سلول‌های ملانوما ردهٔ B16F10 واجد قدرت تقریباً برابر (یک سلول از هر ۲۱۷۳۰ سلول) بودند. این توان در مورد سلول‌های $CD24^+CD44^-$ یک سلول از هر ۱۷٤۲٦ سلول و در مورد سلول‌های دوگانه مثبت $CD24^+CD44^+$ یک سلول از هر ۱۱۲۹۵ سلول بود.

نتیجه‌گیری: در مجموع سلول‌های دوگانه مثبت ($CD24^+CD44^+$) از نظر هر دو خصوصیت تولید اسفیر و القای تومور توانمندتر بودند که می‌تواند نشانه خصوصیت بنیادین این سلول‌ها باشد. بنابراین به‌عنوان سلول‌های بنیادین ملانومای موشی شناسایی و معرفی شدند.

کلیدواژگان: سلول‌های بنیادین سرطانی، تومور، رده سلولی ملانومایی B16F10، شناسایی

مجله علوم پزشکی مدرس: آسیب شناسی زیستی، دوره ۱۷، شماره ۲، تابستان ۱۳۹۳، صفحات: ۲۷-۳۷

مقدمه

فرضیه معمول و شناخته شده در مورد چگونگی به‌وجود آمدن سرطان‌ها، مطرح می‌کند که سرطان حاصل تکثیر کلونال سلول‌های تمایز یافته یا سلول‌های پیش‌سازی که جهش سرطان‌زا را کسب کرده‌اند، است. از زمانی که وجود سلول‌های بنیادین در بافت‌های مختلف بدن شناسایی شدند، این ایده مطرح شد که سلول‌های ریشه‌ای بافتی نیز می‌توانند جهش‌های سرطان‌زا را به مانند سایر سلول‌ها کسب کنند و به‌صورت بدخیم درآیند. از آن‌جایی که در بسیاری از سرطان‌ها سلول‌هایی با شاخص‌های مشابه سلول‌های بنیادین قابل شناسایی هستند و به دلیل این‌که سلول‌های بنیادین بافتی دارای عمر طولانی بوده و در طول حیات به تکثیر خود ادامه می‌دهند، در حالی‌که سلول‌های تمایز یافته معمولاً عمری کوتاه داشته و به‌وسیله سلول‌های جدید جایگزین می‌شوند؛ بنابراین به‌نظر می‌رسد که سلول‌های بنیادین هدف مناسب‌تری برای تجمع جهش‌ها و در نهایت تبدیل شدن به سلول‌های بدخیم باشند به هر جهت سلول‌های بنیادینی که جهش بدخیم را کسب کرده‌اند به‌عنوان سلول‌های شروع کننده سرطان یا سلول‌های بنیادین سرطانی شناخته می‌شوند [۱]. این سلول‌ها دارای خصوصیت منحصر به‌فرد مقاومت به شیمی‌درمانی و مقاومت به اشعه هستند؛ بنابراین اعتقاد بر این است که در بسیاری از موارد پس از درمان سرطان‌ها، سلول‌های بنیادین سرطانی از بین نرفته و منجر به بازگشت سرطان می‌شوند. به همین دلیل به‌نظر می‌رسد مطالعاتی که در زمینهٔ شناسایی و تعیین هویت سلول‌های بنیادین سرطانی انجام می‌گیرد نه تنها باعث شناخت بهتر محققین از این سلول‌ها می‌شود بلکه با شناسایی دقیق این سلول‌ها می‌توان به طراحی روش‌های درمانی به‌منظور هدف‌گیری آن‌ها اقدام نمود و بدین‌ترتیب از عود مجدد و بازگشت سرطان‌ها جلوگیری کرد [۲]. در یک بافت سرطانی انواع سلول‌ها نظیر سلول‌های بنیادی، سلول‌های تکثیر شوندهٔ موقتی، سلول‌های بالغ یا کاملاً تمایز یافته و سلول‌های مرده حضور دارند. برای اولین بار سلول‌های بنیادین سرطانی در لوکمی میلوییدی حاد (Acute Myeloid Leukemia: AML) شناسایی شد [۳] و نشان داده شد که این سلول‌ها توسط شاخص CD38 و CD34 قابل جداسازی هستند. در سال‌های اخیر این سلول‌ها در بسیاری از تومورهای جامد نیز شناسایی شده‌اند [٤-۱۰]. سلول‌های بنیادین سرطانی با ویژگی‌های خود همانندسازی (Self Renewal) و توانایی القای تومور و تبدیل شدن به جمعیت هتروژن سلول‌های توموری به‌صورت اولیه شناسایی می‌شوند و تاکنون یک روش شناسایی مشخص برای تشخیص سلول‌های بنیادین سرطانی معرفی نشده است [۱۱]. برای شناسایی یک سلول به‌عنوان سلول بنیادین سرطانی، این سلول باید حاوی شاخص‌های سطحی سلول‌های بنیادین طبیعی بوده، بتواند خود همانندسازی کند و توانایی القای تومور در موش‌های دارای نقص ایمنی یا همسان را دارا باشد. در حال حاضر مطالعات چندی در زمینهٔ تعیین خصوصیات سلول‌های بنیادین ملانومای موشی (Mouse Melanoma Stem Cell) صورت گرفته است؛ اما نتایج به‌دست آمده گیج کننده بوده است [٤-٦] و در مواردی متناقض یکدیگر هستند. در این مطالعه با هدف طراحی روش ایمنی درمانی جدید برای هدف‌گیری سلول‌های بنیادین سرطانی ملانومای موشی، در مرحله اول نسبت به شناسایی و تعیین خصوصیات دقیق سلول‌های بنیادین ملانوما اقدام شد و زیر جمعیت سلولی حاوی ویژگی‌های سلول‌های بنیادین (Stem Like) از بین زیر جمعیت‌های مختلف سلولی این تومور بدخیم گزارش شد.

مواد و روش‌ها

ردهٔ سلولی ملانومایی و نژاد موشی مورد استفاده

رده سلولی ملانومایی B16F10 از انستیتو پاستور ایران خریداری شد. سلول‌های فوق در محیط کشت RPMI (Roswell Park Memorial Institute Medium) حاوی ۱۰ درصد سرم جنین گاوی، ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر استرپتومایسین، ۱۰۰ واحد در میلی‌لیتر پنی‌سیلین، در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و ۵ درصد CO_2 کشت داده شدند.

موش‌های نژاد C57BL/6 ٦ تا ٨ هفته‌ای از انستیتو پاستور ایران خریداری شدند. موش‌ها در شرایط مناسب دمایی و ١٢ ساعت روشنایی ١٢ ساعت تاریکی و براساس دستورالعمل دانشگاه تربیت مدرس نگهداری شدند.

القای تومور و جداسازی زیر جمعیت‌های سلولی تشکیل دهنده تومور ملانوما

سلول‌های ملانومای کشت داده شده در فلاسک کشت سلولی با استفاده از محلول EDTA (Ethylen Diamine Tetra Acetic Acide) ٥ میلی‌مولار از کف فلاسک کشت جدا و ٢ بار با بافر PBS (بافر فسفات سالین: Phosphate Buffered Saline) شستشو شدند. پس از بررسی حیات، سلول‌ها به تعداد 1×10^{5} در ١٠٠ میکرولیتر بافر فسفات حل گشته و در ناحیهٔ پهلوی راست موش‌ها به‌صورت زیر جلدی تزریق شدند. موش‌ها به‌مدت ٨ هفته تحت نظر بودند. پس از ظهور تومور و رشد آن به اندازه کافی، برای تهیهٔ سوسپانسیون سلولی از تومور القا شده، ابتدا موش نخاعی شده و تومور با جراحی از موضع خارج شد و با استفاده از آنزیم کلاژناز (١ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) (Roche، آلمان) و DNase (Roche، آلمان) (١٥٠ میکروگرم در میلی‌لیتر) سلول‌های توموری به‌صورت سوسپانسیون درآمدند. سلول‌های مرده و زنده با استفاده از شیب غلظت فایکول از یکدگر جدا شدند و سلول‌های زنده به تعداد 1×10^{10} سلول در ١٠ میلی‌لیتر بافر فسفات به‌صورت سوسپانسیون درآمدند. تمامی آنتی‌بادی‌های استفاده شده در این تحقیق از شرکت BD biosciences (آمریکا) خریداری شد. آنتی‌بادی CD24 (PE- conjugated, clone M1/69) و CD44 (FITC- conjugated, clone IM7) به غلظت ١ میکروگرم در میلی‌لیتر به‌طور همزمان به سوسپانسیون سلول‌های توموری اضافه شد و به‌مدت ٢٠ دقیقه روی یخ انکوبه شد. سپس سلول‌ها ٢ بار شستشو شدند و بیان شاخص‌های فوق توسط فلوسیتومتری بررسی شد. به‌عنوان کنترل منفی از آنتی‌بادی‌های کنترل ایزوتایپ FITC Rat IgG2b, κ Isotype و PE Rat IgG2b, κ Isotype Control clone A95-1 استفاده شد. برای جداسازی زیر جمعیت‌های سلولی تومور ملانوما، سوسپانسیون سلولی در ١٠ میلی‌لیتر بافر فسفات به تعداد 10×10^{10} سلول در میلی‌لیترآماده شد و پس از رنگ‌آمیزی با آنتی‌بادی‌های CD24 و CD44 با استفاده از دستگاه جدا کنندهٔ فلوسیتومتری FACS, Aria II (BD Biosciences، آمریکا) بر اساس حضور یا عدم حضور شاخص‌های سطحی (CD24 و CD44) زیر جمعیت‌های مختلف سلولی جداسازی شد.

ارزیابی تولید اسفیر در زیر جمعیت‌های تومور ملانومای موشی

زیر جمعیت‌های سلولی جداسازی شدهٔ از تومور ملانوما به‌همراه ردهٔ سلولی ملانوما B16F10 به تعداد 1×10^{3} سلول در میلی‌لیتر، در محیط کشت DMEM-F12 (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) فاقد سرم تهیه شد. این سلول‌ها در مجاورت EGF (عامل رشد اپیدرمی: Epidermal Growth Factor) (PeproTech، آلمان) به غلظت ٢٠ نانوگرم در میلی‌لیتر، bFGF (عامل رشد فیبروبلاستی بازی: basic Fibroblast Growth Factor) (PeproTech، آلمان) با غلظت ٢٠ نانوگرم در میلی‌لیتر، به تنهایی یا هر دو عامل به‌صورت همزمان، همچنین در مجاورت B27 (1X) (عامل رشد سلول‌های بنیادین) (Invitrogen، آمریکا) در ٣٧ درجه سانتی‌گراد و ٥ درصد CO_2 به‌مدت ١٢ روز کشت داده شدند و روزانه بررسی شدند. سلول‌هایی که توانایی تولید اسفیر داشتند به‌صورت تجمعات سلولی کروی شکل با اندازهٔ بزرگ‌تر از ١٥٠ میکرومتر که در محیط به‌صورت شناور بودند، مشخص شدند.

بررسی توان القای تومور توسط زیر جمعیت‌های سلولی تومور ملانومای موشی [٦]

از زیر جمعیت‌های مختلف سلولی تومور ملانوما رقت‌های

متفاوت سلولی بـه تعـداد ۱×۱۰^{۵}، ۵×۱۰^{۴}، ۲۵×۱۰^{۳}، ۱۰×۱۰^{۳} و ۵×۱۰^{۳} تهیـه شـد و در حجـم ۱۰۰ میکرولیتـر بـه گـروه‌هـای مختلـف مـوش C57BL/6 (n=٦) در ناحیـهٔ پهلـوی سـمت راست آن‌ها تزریق شد. موش‌ها بـه‌مـدت ٦ مـاه از نظـر بـروز تومـور بررسـی شـدند و تـوان القـای تومـور در هـر یـک از رقت‌های فوق و هرکدام از زیر جمعیت‌ها بررسـی شـد. تـوان القای تومور در ابتدا با حضور یک برجستگی رنـگ پریـده در محل تزریق سلول‌ها و سپس رشد تودهٔ توموری مشخص شد.

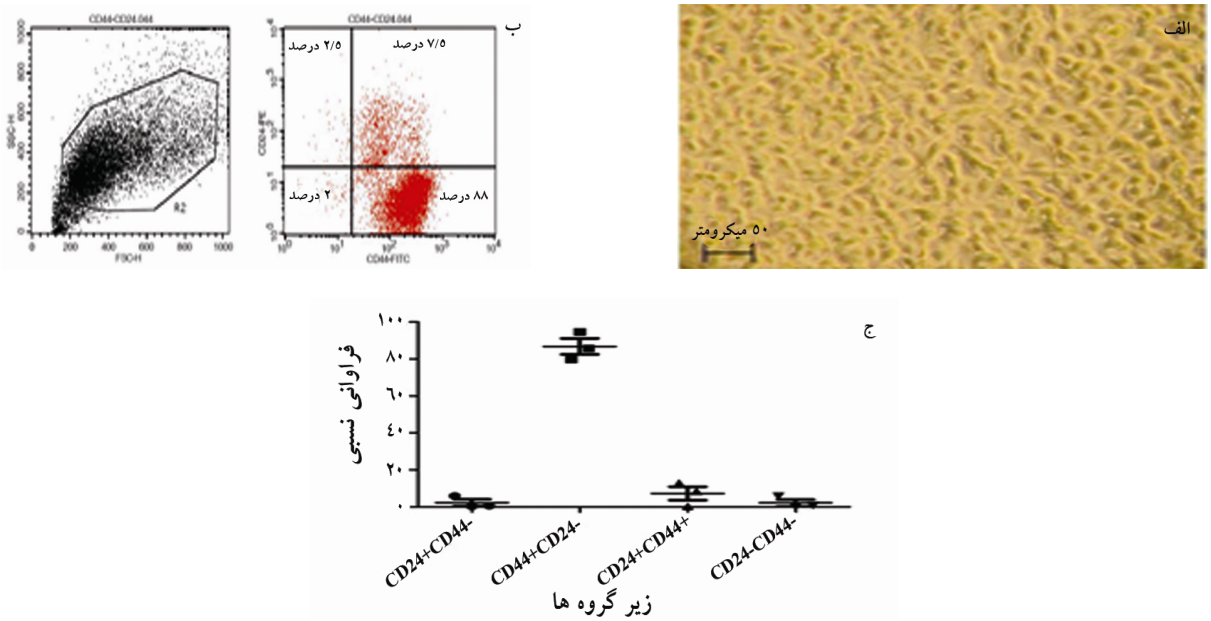
بررسی‌های آماری

همه داده‌های تحقیق به‌صورت میـانگین ± انحـراف معیـار ارایه شده است. اخـتلاف بـین گـروه‌هـا بـا اسـتفاده از آزمـون T-Student تجزیه و تحلیل شد. سطح معنـی‌داری ۹۵ درصـد در نظر گرفته شده و مقدار P (P value) کمتر از ۰/۰۵ از نظـر آماری معنی‌دار تلقی شد. بـرای بررسـی آمـاری آزمـون القـای تومور از نرم‌افزار L-Cal C استفاده شد.

نتایج

نتایج حاصل از کشت و بررسی شاخص‌های سطحی در تومور ملانومای موشی

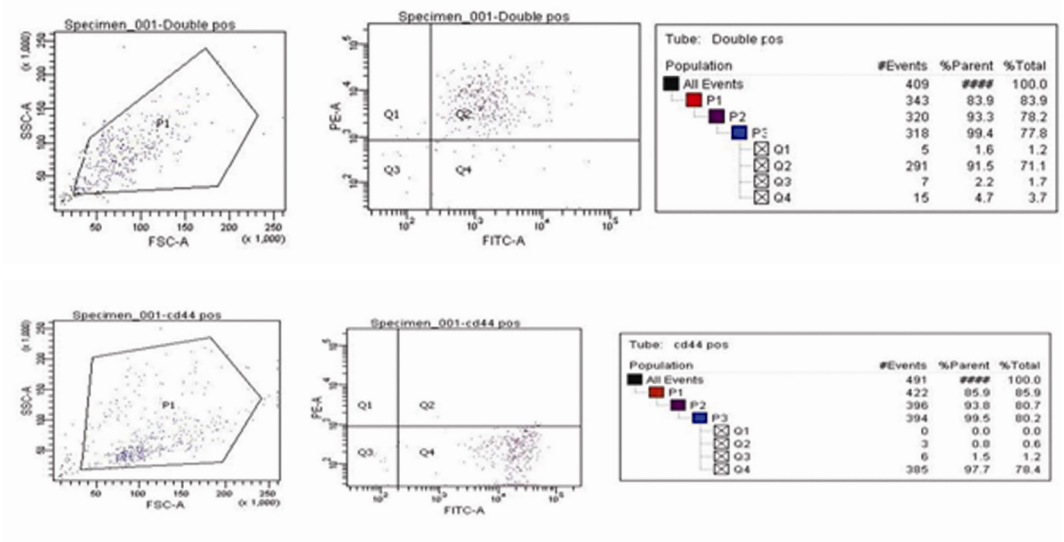
تومور ملانوما با استفاده از دودمان سلولی B16F10 (شکل ۱ الف) به‌صورت زیر جلدی در موش‌های C57BL/6 القا شد. پـس از رشـد تومـور و برداشـتن آن، از سـلول‌هـا تومـوری سوسپانسیون تک سلولی تهیه شد. سلول‌های تومـور ملانومـای موشی با دو آنتـی‌بـادی علیـه CD24 و CD44 کـه بـه‌عنـوان شاخص‌های سلول‌هـای بنیـادین سـرطانی گـزارش شـده بـود [۵، ۷، ۸]، رنـگ‌آمیـزی و توسـط فلوسـایتومتر بررسـی شـدند (شکل ۱ ب). بیان شاخص‌های سطی بر اسـاس دو آنتـی‌بـادی CD24 و CD44 مشخص شد (شکل ۱ ج).



شکل ۱ بررسی خصوصیات فنوتایپی سلول‌های ملانومای موشی؛ (الف) سلول‌های ملانومایی ردهٔ B16F10 در کشت سلولی، (ب) نمودار فلوسیتومتری از میـزان بیان شاخص‌های سطحی بر اساس دو آنتی‌بادی CD24 و CD44 روی سلول‌های جدا شده از تومور موش: نمودار مذکور نمونه‌ای از ۳ آزمایش مستقل است. (ج) زیر جمعیت‌ها متفاوت سلولی و فراوانی نسبی آن‌ها در تومور ملانومای موشی: اغلب سلول‌های تومور ملانومای بدخیم موشی شاخص CD44 را در سطح خـود بیان می‌کردند (۸٦/۷۹±۷/٤۷ درصد). سلول‌هایی که فقط شاخص CD24 را بیان می‌کردند حدود ۲/۳۱±۳/۱۵ درصد، سلول‌هایی که هر دو شاخص فوق را بیـان می‌کردند ۷/۲۵±٦/۳۳ درصد و سلول‌هایی که هیچ‌کدام از شاخص‌های فوق را بیان نمی‌کردند ۲/۱٤±۳/۱٤ درصد از کل سلول‌های تومور ملانومای موشی را شامل می‌شدند.

نتایج حاصل از جداسازی زیر گروه‌های متفاوت سلول‌های ملانوما بر اساس بروز شاخص‌های CD24 و CD44

سلول‌های تومور ملانومای القا شده در موش C57BL/6 پس از جداسازی و رنگ‌آمیزی با آنتی‌بادی علیه CD24 و CD44 توسط دستگاه فلوسیتومتری دارای جدا کنندهٔ سلول بررسی شدند و پس از بهینه‌سازی شرایط جداسازی، زیر جمعیت‌های مختلف سلولی تشکیل دهنده تومور، جداسازی شدند. خلوص سلول‌های جدا شده بیش از ۸۰ درصد بود (شکل ۲).

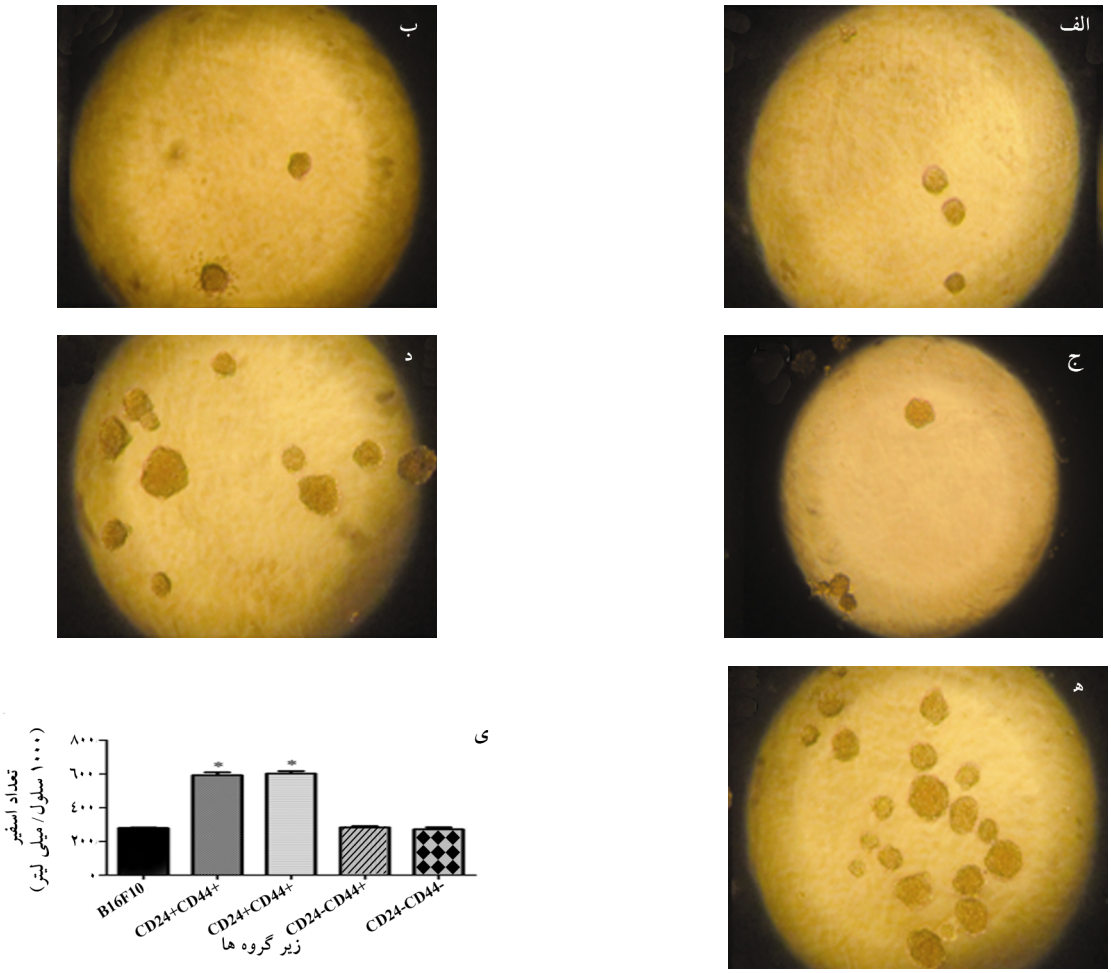


شکل ۲ نمودار فلوسیتومتری نشان دهنده خلوص زیر جمعیت‌های سلولی جداسازی شده پس از فرآیند جداسازی، در این شکل دو نمونه از زیر جمعیت‌های جداسازی شده به‌عنوان نمونه آورده شده است.

توان تولید اسفیر سلولی توسط زیر جمعیت‌های سلولی توموری

به‌منظور تعیین ظرفیت تولید اسفیر (Sphere Formation) سلولی توسط زیر جمعیت‌های مختلف سلولی جدا شده از تومور ملانوما، این زیر جمعیت‌های سلولی در محیط کشت فاقد سرم و حاوی ترکیب‌های متفاوتی از عوامل رشد سلولی کشت داده شدند. پس از گذشت ۱۲ روز، میزان تولید اسفیر سلولی توسط هر کدام از زیر جمعیت‌ها در شرایط مختلف کشت بررسی شد. تجمع‌های سلولی شناور و غیر چسبان که بیش از ۱۰ سلول در آن حضور داشتند یا تجمع‌های بزرگ‌تر از ۱۰۰ میکرومتر به‌عنوان اسفیر در نظر گرفته شدند (شکل ۳). سلول‌های جداسازی شدهٔ توموری و سلول‌های ملانوما ردهٔ B16F10 در مجاورت EGF و bFGF توانایی تولید اسفیر نداشتند؛ اما این سلول‌ها در مجاورت B27 اسفیر تولید کردند. سلول‌های بیان کنندهٔ CD24 به‌طور معنی‌داری نسبت به سایر سلول‌ها تعداد بیشتری اسفیر تولید کردند. تفاوت تعداد اسفیرها در هر زیر جمعیت‌ها و سلول‌های ملانوما تفکیک نشده ردهٔ B16F10 به‌صورت مجزا در شکل ٤ نشان داده شده است. تعداد کل سلول‌های کشت داده شده از هر زیر جمعیت و سلول‌های ملانوما ردهٔ B16F10 ۱۰۰۰ سلول بود. از این تعداد سلول کشت داده شده، سلول‌های ملانوما ردهٔ B16F10، ۵/۵۰±۲۸۰/۳ اسفیر (تقریباً ۲۸ درصد)، سلول‌های دوگانه مثبت $CD24^{+}CD44^{+}$ ۳۰/۲±۵۹۳ اسفیر (تقریباً ۵۹ درصد)، سلول‌های $CD24^{+}CD44^{-}$ ۲۵/۳٦±٦۰۳ اسفیر (تقریباً ٦۰ درصد)، سلول‌های $CD24^{-}CD44^{+}$ ۱٤/۵۷±۲۸۳/۳ اسفیر

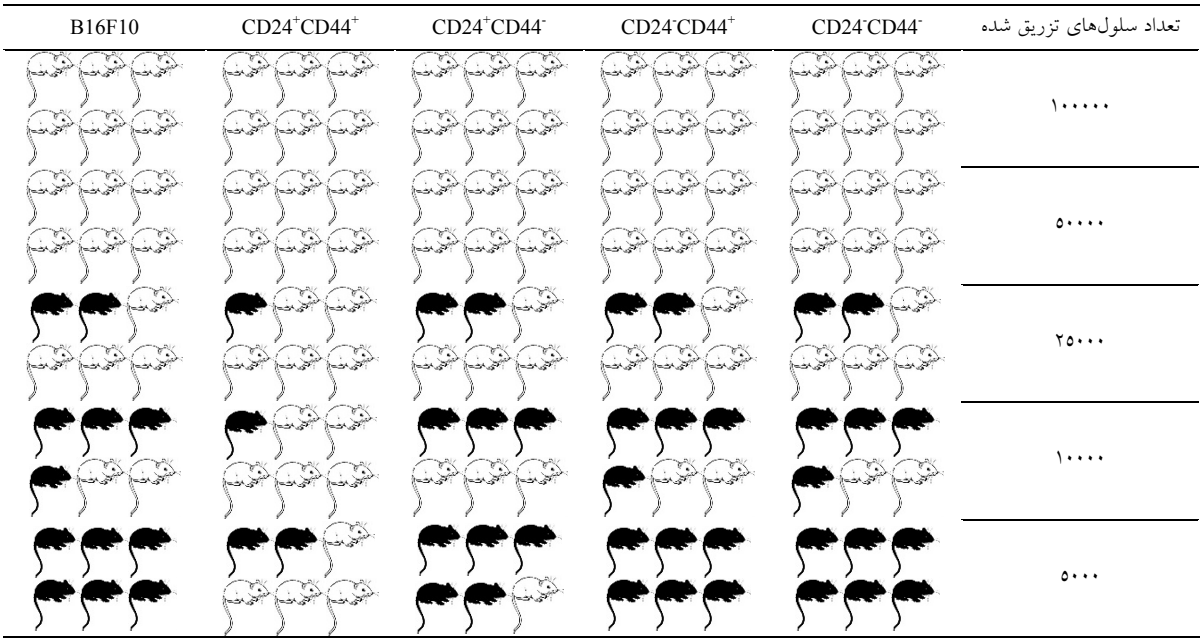
(تقریباً ۲۸ درصد) و سلول‌های دوگانه منفی $CD24^{-}CD44^{-}$ ۲۷۲/۳±۲۱/۱۳ (تقریباً ۲۷ درصد) اسفیر تولید کردند. تمام زیر رده‌هایی که روی سطح خود شاخص CD24 را بیان می‌کردند به‌طور معنی‌داری اسفیرهای بیشتری نسبت به سایر زیر جمعیت‌ها و سلول‌های ملانومای تفکیک نشده ردهٔ B16F10 تولید کردند. (*: P<۰/۰۵)



شکل ۳ اسفیرهای تولید شده در مجاورت عامل B27 توسط سلول‌های دسته‌بندی شدهٔ توموری و سلول‌های ملانوما B16F10 (بزرگنمایی: ×۶/۷ + ×۴۰). در روز نهم کشت؛ (الف) سلول‌های ملانوما B16F10، (ب) سلول‌های دوگانهٔ منفی $CD24^{-}CD44^{-}$، (ج) سلول‌های $CD24^{+}CD44^{-}$، (د) سلول‌های $CD24^{-}CD44^{+}$ و (ه) سلول‌های دوگانه مثبت $CD24^{+}CD44^{+}$، (ی) تعداد اسفیرهای تولید شده توسط ۱۰۰۰ سلول از زیر جمعیت‌های مختلف سلولی تومور ملانوما. زیر جمعیت‌های سلولی حاوی شاخص CD24 به‌طور معنی‌دار تعداد اسفیر سلولی بیشتری تولید نمودند.

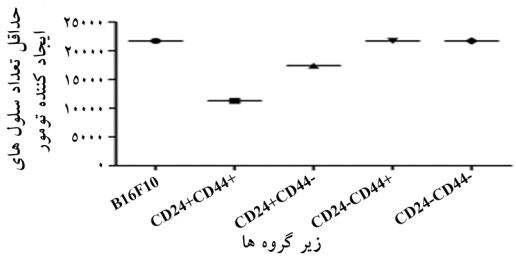
نتایج به‌دست آمده از سنجش قدرت ایجاد تومور توسط زیر جمعیت‌های سلولی جداسازی شدهٔ از تومور ملانومای بدخیم موشی

تعداد متفاوتی از سلول‌های دسته‌بندی شدهٔ تومور ملانومای بدخیم موشی و سلول‌های اولیه ملانوما ردهٔ B16F10 برای بررسی قدرت تومورزایی آن‌ها به گروه‌های مختلف موشی C57BL/6 تزریق شدند. شکل ٤ نتایج حاصل از این بررسی را نشان می‌دهد.



شکل ٤ نتیجه القای تومور در گروه‌های مختلف موشی؛ تعداد مختلف سلول‌هایی که هر گروه دریافت کردند و نتایج حاصل از آن. موش‌هایی که به رنگ مشکی نشان داده شده‌اند به تومور مبتلا نشدند و موش‌هایی که به رنگ سفید نشان داده شدند به تومور مبتلا شدند.

حداقل میزان سلول‌های جداسازی شده که توان تومورزایی داشتند در هر گروه بر اساس تعداد سلول‌های تزریق شده، تعداد کل موش‌های هر گروه و تعداد موش‌های مبتلا شده به تومور بررسی شد. نتایج حاصل از این بررسی در شکل ۵ نشان داده شده است.



شکل ۵ حداقل میزان سلول‌های مورد نیاز برای القای تومور در زیر جمعیت‌های مختلف ملانومای بدخیم موشی و سلول‌های ملانوما ردهٔ B16F10. پس از بررسی قدرت تومورزایی توسط نرم‌افزار L-Cal مشاهده شد که سلول‌های ملانوما ردهٔ B16F10 از هر ۲۱۷۳۰ سلول ۱ سلول قدرت ایجاد تومور، سلول‌های دوگانه مثبت $CD24^{+}CD44^{+}$ از هر ۱۱۲۹۵ سلول، سلول‌های $CD24^{+}CD44^{-}$ از هر ۱۷٤۲٦ سلول، سلول‌های $CD24^{-}CD44^{+}$ از هر ۲۱۷۳۰ سلول و همچنین سلول‌های $CD24^{-}CD44^{-}$ نیز از هر ۲۱۷۳۰ سلول یکی از آن‌ها قدرت ایجاد تومور دارد.

بحث

امروزه برای درمان انواع سرطان‌ها از روش‌های ترکیبی شامل جراحی، شیمی‌درمانی و اشعه‌درمانی استفاده می‌کنند. ولی با این‌که ممکن است تودهٔ توموری ظاهراً حذف شود، در عموم سرطان‌ها، یا بازگشت مجدد تودهٔ سرطانی مشاهده می‌شود یا متاستاز پیشرونده رخ می‌دهد که سلول‌های بنیادین سرطانی را عامل این مقاومت به درمان می‌دانند [۹-۱۱]. بنابراین پیشرفت سریع علم سلول‌های بنیادین سرطانی برای شناسایی این سلول‌ها بسیار اهمیت دارد. برای شناسایی و تعیین هویت سلول‌های بنیادین سرطانی در انواع تومورها می‌بایستی مجموعه‌ای از آزمایش‌ها را در کنار هم انجام داد تا این سلول‌ها به‌عنوان سلول‌های بنیادین سرطانی شناسایی شوند. استفاده از شاخص‌های موجود برای شناسایی سلول‌های بنیادین طبیعی به شناسایی سلول‌های بنیادین سرطانی در مطالعات بسیاری کمک نموده است [۱۲]. برای اولین بار بونت (Bonnet) و همکارانش نشان دادند که در لوسمی میلوییدی حاد حتی یک سلول از سلول‌های $CD34^{+}CD38^{-}$ قادر بود در

موش‌های دارای نقص ایمنی ایجاد لوسمی نماید [۳]. این دانشمندان سلول‌های فوق را به‌عنوان سلول‌های بنیادین سرطانی معرفی کردند. در تومورهای جامد الحاج (All-Hajj) و همکارانش از دو شاخص CD24 و CD44 برای شناسایی سلول‌های بنیادین سرطانی در سرطان پستان استفاده کردند [۷] در مورد ملانومای موشی نیز از این دو شاخص سطحی به همین منظور استفاده شده است [۵]. در مطالعهٔ حاضر نیز از این دو شاخص برای شناسایی سلول‌های فوق استفاده شد. بدین‌منظور سلول‌های تومور ملانومای موشی با آنتی‌بادی‌های ضد CD24 و CD44 رنگ‌آمیزی شدند و بر این اساس به ٤ دستهٔ $CD24^{+}CD44^{+}$، $CD24^{+}CD44^{-}$، $CD24^{-}CD44^{+}$ و $CD24^{-}CD44^{-}$ تقسیم شدند. از آزمایش‌های بسیار مهم در زمینهٔ تعیین هویت سلول‌های بنیادین سرطانی ارزیابی توانایی ایجاد اسفیر در محیط کشت فاقد سرم است [۱۳] در مطالعهٔ حاضر سلول‌هایی که دارای شاخص CD24 بودند توانایی بیشتری در تولید اسفیر داشتند. در مورد توانایی تولید اسفیر دوو (Duo) و همکاران نشان دادند که سلول‌های جداسازی شده از تومور ملانوما توانایی تولید اسفیر در حضور EGF، bFGF یا هر دو را دارند [۵] در صورتی که ژونگ (Zhong) و همکارانش نه تنها نتوانستند در حضور این دو ماده اسفیر تولید کنند، بلکه در بررسی آن‌ها در مجاورت با B27 نیز هیچ‌گونه اسفیری تولید نشده بود [٦]. در مطالعهٔ حاضر در حضور EGF و bFGF اسفیری تولید نشد اما در مجاورت B27 اسفیر به‌وجود آمد. برای اولین بار رینولدز (Reynolds) و ویس (Weiss) نشان دادند سلول‌های عصبی که در محیط فاقد سرم حاوی EGF و bFGF و شرایط غیر چسبان به‌صورت اسفیرهای شناور در می‌آیند دارای خصوصیات سلول‌های بنیادین هستند [١٤] که نوروسفر (Neurosphere) نامیده شدند. اکثر سلول‌های این اسفیرها نستین (Nestin) که از شاخص‌های سلول‌های بنیادین نورواپیتلیال (Neuroepithelial Stem Cell) هستند را بیان کردند. نشان داده شده است که ٤ تا ۲۰ درصد سلول‌های نوروسفر سلول‌های بنیادین و مابقی آن سلول‌های پیش‌ساز هستند که در مراحل مختلف تمایز قرار دارند. در شرایط چسبان این سلول‌ها به نورون یا سلول‌های گلیال تمایز پیدا کردند. امروزه از این روش به‌طور وسیعی در شناسایی سلول‌های بنیادین و سلول‌های بنیادین سرطانی استفاده می‌شود [۱۵، ١٦]. عواملی نظیر EGF باعث بیان گیرندهٔ EGF روی سلول‌های بنیادین شده و سبب تقسیم و تکثیر آن‌ها می‌شود. مطالعات بسیاری نشان داده‌اند که در شرایط کشت بدون سرم و شرایط غیر چسبان و در حضور عوامل رشدی نظیر EGF و bFGF فقط سلول‌های بنیادین و برخی از سلول‌های پیش‌ساز تکثیر می‌یابند و مابقی سلول‌ها می‌میرند [۱۷]. از دیگر عواملی که برای تولید اسفیر استفاده می‌شود عامل رشد B27 است که بسیاری از محققین برای افزایش قدرت پاساژ اسفیرها و افزایش میزان تولید اسفیر از این عامل استفاده می‌نمایند [۱۸]. در تحقیق حاضر سلول‌های بنیادین ملانوما نتوانستند در حضور EGF یا bFGF اسفیر تولید کنند و تمامی سلول‌ها در کشت از بین رفتند. با این حال در حضور B27 اسفیر تولید شد. از لحاظ تئوری استفاده از ترکیبات دارای مواد مشخص و تعیین شده این مزیت را دارد که شرایط یکسان آزمایشی برای محققین مختلف به‌وجود آورد؛ با این حال بسیاری از محققین نتایج مختلفی در استفاده از B27 برای رشد نورون ها داشته‌اند. از دلایل این اختلاف می‌توان به وجود ترکیباتی نظیر آلبومین سرم گاوی یا ترانسفرین به‌صورت ناخالصی همراه با منابع زیستی اشاره کرد. این مواد طی مراحل تولید به عامل رشد اضافه می‌شود و به دلیل متفاوت بودن منابع و روش‌های به‌دست آوردن عوامل رشد، میزان ناخالصی‌ها نیز متفاوت است و در نتیجه روی نتایج حاصل تأثیرات متفاوتی می‌گذارد [۱۹]. یکی از علل تفاوت در مطالعه حاضر با نتایجی که ژونگ در استفاده از عامل B27 به‌دست آورد [٦] می‌تواند به دلیل همین اختلاف در منبع تهیهٔ عامل B27 باشد. در نهایت مهم‌ترین آزمایش برای اثبات بنیادین بودن یک سلول سرطانی ارزیابی قدرت ایجاد تومور در موش‌های دارای نقص ایمنی یا همسان است

[٦] با توجه به نتایج به‌دست آمده از این تحقیق سلول‌های دوگانه مثبت $CD24^{+}CD44^{+}$ دارای بیشترین قدرت ایجاد تومور در موش‌های همسان بودند، نتایج به‌دست آمده با نتایج حاصل از تحقیق دوو کاملاً همخوانی دارد [٥]. سئوال دیگری که مطرح است توانایی سلول‌های جداسازی شده دیگر به غیر از سلول‌های $CD24^{+}CD44^{+}$ در تولید اسفیر یا قدرت ایجاد تومور است. مطالعات بسیاری نشان داده است که سلول‌های بنیادین سرطانی به مانند سلول‌های بنیادین طبیعی، مخلوط با سلول‌هایی هستند که در مراحل مختلف تمایز قرار دارند که به آن‌ها سلول‌های تکثیر شوندهٔ موقتی گفته می‌شود [١]، بخشی از این سلول‌ها از لحاظ بنیادینگی نیز اگرچه متمایزتر هستند، اما هنوز خاصیت بنیادین را کاملاً از دست نداده‌اند، بنابراین می‌توانند رفتارهایی شبیه به سلول‌های بنیادین بروز دهند. در کل سلول‌های $CD24^{+}CD44^{+}$ در بین سلول‌های جداسازی شده از تومور ملانومای موشی دارای خصوصیات بنیادین بیشتری هستند و در تحقیق حاضر به‌عنوان سلول‌های بنیادین ملانومای موشی در نظر گرفته شدند. برای مطالعات بیشتر پیشنهاد می‌شود از شاخص‌های سطحی دیگری مانند CD133 نیز برای شناسایی و جداسازی دقیق‌تر سلول‌های بنیادین توموری استفاده شود.

تشکر و قدردانی

این مقاله بخشی از پایان‌نامه مصوب دانشگاه تربیت مدرس بوده و بدین‌وسیله از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه تربیت مدرس و دانشکده علوم پزشکی کمال تشکر و قدردانی را داریم. همچنین از جناب آقای جانزمین کارشناس محترم بخش فلوسایتومتری انستیتو رویان قدردانی می‌نماییم.

منابع

[1] Sell S. Stem cell origin of cancer and differentiation therapy. Crit Rev Oncol Hematol 2004; 51(1): 1-28.

[2] Ning N, Pan Q, Zheng F, Teitz-Tennenbaum S, Egenti M, Yet J, Li M, Ginestier C, Wicha MS, Moyer JS, Prince ME, Xu Y, Zhang XL, Huang S, Chang AE, Li Q. Cancer stem cell vaccination confers significant antitumor immunity. Cancer Res 2012; 72(7): 1853-64.

[3] Bonnet D, Dick JE. Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. Nat Med 1997; 3(7): 730-7.

[4] Dou J, Wen P, Hu W, Li Y, Wu Y, Liu C, Zhao F, Hu K, Wang J, Jiang C, He X, Gu N. Identifying tumor stem-like cells in mouse melanoma cell lines by analyzing the characteristics of side population cells. Cell Biol Int 2009; 33(8): 807-15.

[5] Dou J, Pan M, Wen P, Li Y, Tang Q, Chu L, Zhao F, Jiang C, Hu W, Hu K, Gu N. Isolation and identification of cancer stem-like cells from murine melanoma cell lines. Cell Mol Immunol 2007; 4(6): 467-72.

[6] Zhong Y, Guan K, Zhou C, Ma W, Wang D, Zhang Y, Zhang S. Cancer stem cells sustaining the growth of mouse melanoma are not rare. Cancer Lett 2010; 292(1): 17-23.

[7] 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(7): 3983-8.

[8] Fillmore C, Kuperwasser C. Human breast cancer stem cell markers CD44 and CD24:

enriching for cells with functional properties in mice or in man? Breast Cancer Res 2007; 9(3): 303.

[9] Zitvogel L, Apetoh L, Ghiringhelli F, Kroemer G. Immunological aspects of cancer chemotherapy. Nat Rev Immunol 2008; 8(1): 59-73.

[10] Koch U, Krause M, Baumann M. cer stem cells at the crossroads of current cancer therapy failures--radiation oncology perspective. Semin Cancer Biol 2010; 20(2): 116-24.

[11] Moserle L, Ghisi M, Amadori A, Indraccolo S. Side population and cancer stem cells: therapeutic implications. Cancer Lett 2010; 288(1): 1-9.

[12] Kitamura H, Okudela K, Yazawa T, Sato H, Shimoyamada H. Cancer stem cell: implications in cancer biology and therapy with special reference to lung cancer. Lung Cancer 2009; 66(3): 275-81.

[13] Pastrana E, Silva-Vargas V, Doetsch F. Eyes wide open: a critical review of sphere-formation as an assay for stem cells. Cell Stem Cell 2011; 8(5): 486-98.

[14] Reynolds BA, Weiss S. Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system. Science 1992; 255(5052): 1707-10.

[15] Clevers H. The cancer stem cell: premises, promises and challenges. Nat Med 2011; 17(3): 313-9.

[16] Hirschhaeuser F, Menne H, Dittfeld C, West J, Mueller-Klieser W, Kunz-Schughart LA. Multicellular tumor spheroids: an underestimated tool is catching up again. J Biotechnol 2010; 148(1): 3-15.

[17] Ponti D, Costa A, Zaffaroni N, Pratesi G, Petrangolini G, Coradini D, Pilotti S, Pierotti MA, Daidone MG. Isolation and in vitro propagation of tumorigenic breast cancer cells with stem/progenitor cell properties. Cancer Res 2005; 65(13): 5506-11.

[18] Gritti A, Galli R, Vescovi AL. Cultures of Stem Cells of the Central Nervous System. In: Richardson A, (Editors). Protocols for Neural Cell Culture. 3rd edition, Saskatchewan, Canada: Humana Press, Inc., 2001; p: 173-9.

[19] Chen Y, Stevens B, Chang J, Milbrandt J, Barres BA, Hell JW. NS21: re-defined and modified supplement B27 for neuronal cultures. J Neurosci Methods 2008; 171(2): 239-47.