

بررسی بیان شاخص‌های سطحی CD44، CD133 و ABCG2 در رده‌های سلولی ملانوما و ارتباط آنها با سلول‌های بنیادی سرطان

نویسندگان: مطهره رجبی فومشی^۱، مرضیه ابراهیمی^{۳*}، سید جواد مولی^۴،
فاضل صحرائین سامانی^۱

- ۱- دانشجوی کارشناسی ارشد زیست‌شناسی علوم جانوری، گرایش سلولی و تکوینی، گروه زیست‌شناسی تکوینی، دانشگاه علم و فرهنگ، تهران، ایران
- ۲- کارشناسی ارشد زیست‌شناسی علوم جانوری، گرایش سلولی و تکوینی، گروه سلول‌های بنیادی و زیست‌شناسی تکوینی، پژوهشگاه رویان، پژوهشکده زیست‌شناسی و فناوری سلول‌های بنیادی جهاد دانشگاهی مرکز تحقیقات علوم سلولی، تهران، ایران
- ۳- استادیار گروه سلول‌های بنیادی و زیست‌شناسی تکوینی، پژوهشگاه رویان، پژوهشکده زیست‌شناسی و فناوری سلول‌های بنیادی جهاد دانشگاهی، مرکز تحقیقات علوم سلولی، تهران، ایران
- ۴- دانشیار گروه ژنتیک مولکولی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

* نویسنده مسئول: مرضیه ابراهیمی
E-mail: mebrahimi@royaninstitute.org

چکیده

مقدمه و هدف: سلول‌های بنیادی ملانوما، مسئول تهاجم و متاستاز آن است. در این پژوهش، بیان شاخص‌های کاندید سلول‌های بنیادی سرطان در رده‌های سلولی ملانوما و ارتباط بیان این شاخص‌ها با ویژگی‌های بنیادینگی سلول بررسی شد.

مواد و روش‌ها: میزان بیان شاخص‌های CD44، CD133 و ABCG2 در رده‌های سلولی ملانوما (D10، A375، Me67، SK-MEL، NA8، WM115) توسط فلوسایتومتری سنجیده شد. پس از انتخاب شاخص و رده سلولی مناسب، سلول‌ها براساس بیان و عدم بیان شاخص منتخب به جمعیت مثبت و منفی جداسازی شدند؛ سپس عملکرد کلنی‌زایی، تشکیل اسفروئید و همچنین بیان ژن‌های بنیادی *NANOG*، *SOX2*، *OCT4* و *KLF4* در سه جمعیت مثبت، منفی و رده سلولی جداسازی نشده ارزیابی شدند.

نتایج: نتایج ما نشان داد که در $1/85 \pm 28/65$ درصد از رده سلولی D10 شاخص CD133 بیان شد. در حالی که در همه رده‌های سلولی تست شده، شاخص CD44 و ABCG2 فاقد بیان بودند یا بیانی ضعیف داشتند. جمعیت CD133+ افزایش حدود $1/64$ برابر در قدرت کلنی‌زایی ($P < 0.05$) و $2/2$ برابر در تعداد ملانوسفیر ($P = 0.00$) در مقایسه با جمعیت CD133- نشان داد. بررسی بیان ژن‌های بنیادینگی نشان داد که ژن *NANOG* و *OCT4* در گروه CD133+ و ژن *SOX2* در گروه CD133- دارای افزایش بیان بودند و هیچ تفاوتی در بیان ژن *KLF4* در میان گروه‌ها وجود نداشت.

نتیجه‌گیری: یافته‌های این پژوهش نشان دادند که شاخص CD133 می‌تواند به‌عنوان شاخص سلول‌های شبه‌بنیادی در رده‌ی سلولی D10 و دیگر سلول‌های ملانوما که شاخص CD133 را بیان می‌کنند، در نظر گرفته شود.

واژگان کلیدی: ملانوما، سلول‌های بنیادی سرطان، CD133

دوماهنامه علمی-پژوهشی
دانشگاه شاهد
سال بیستم - شماره ۱۰۶
شهریور ۱۳۹۲

دریافت: ۱۳۹۲/۵/۶
آخرین اصلاح‌ها: ۱۳۹۲/۶/۳۱
پذیرش: ۱۳۹۲/۷/۹

مقدمه

ملانوما ناشی از دگرگونی ملانوسیت‌های تولیدکننده رنگدانه است؛ این بیماری دارای قدرت تهاجم بالا و متاستاز سریع به سایر اندام‌ها بوده (۱) و در شمار کشنده‌ترین سرطان‌ها محسوب می‌شود. براساس گزارش‌های WHO تعداد موارد ملانوما در سراسر جهان با سرعتی بیشتر نسبت به انواع دیگر سرطان‌ها در حال افزایش است و سالانه موجب مرگ ۴۸ هزار نفر می‌شود؛ این سرطان اگرچه حدود ۴ تا ۵ درصد از سرطان‌های پوست را شامل می‌شود، علت ۷۴ درصد از مرگ‌ومیرهای ناشی از سرطان پوست است (۲). زمانی که ملانوما شروع می‌کند به متاستاز، مقاومت زیادی نسبت به درمان و آپوپتوز نشان می‌دهد و قادر است به نواحی مختلف بدن از جمله قسمت‌های عمیق‌تر پوست، طحال، کبد، گره‌های لنفی و مغز استخوان مهاجرت کند (۳) تا (۵). مدت بقای افراد مبتلا پس از متاستاز به‌طور متوسط شش تا نه ماه است و فقط ۱۰ درصد از بیماران می‌توانند تا پنج سال زندگی کنند؛ به‌رغم این اهمیت بالینی، ساختارهای اساسی مولکولی و سلولی پیشرفت ملانوما هنوز به اندازه کافی شناخته‌نشده است و هیچ بهبود معناداری در بقای این بیماران صورت نگرفته است (۶) و (۷)؛ این بیماری پیش‌آگهی کمی دارد و لذا درمان سریع را با مشکل مواجه می‌سازد که در بسیاری از موارد نیز شفابخش نیست؛ بنابراین رویکردهایی جدید برای درمان این بیماری لازم است (۸).

به‌نظر می‌رسد که سلول‌های بنیادی سرطان در ایجاد و پیشروی سرطان‌ها از جمله ملانوما نقش دارند (۹). سلول‌های بنیادی سرطان، قدرت خودنوزایی و تمایز داشته، ویژگی‌هایی مانند قدرت تحرک و تهاجم دارند (۱۰ و ۱۱). درخصوص حضور سلول‌های بنیادی در ملانوما گزارش‌هایی متفاوت وجود دارند؛ تعدادی از مطالعات از حضور سلول‌های بنیادی سرطان و شاخص‌های ویژه آن در ملانوما حمایت می‌کنند. CD133 که [این مورد] به‌عنوان مهم‌ترین شاخص سلول‌های بنیادی سرطان در نظر گرفته می‌شود، در زیرمجموعه‌ای از سلول-

های بنیادی سرطان مغز، روده، شش، ملانوما و دیگر تومورهای جامد بیان می‌شود (۱۲ و ۱۳). در سال ۲۰۰۷، مونزانی^۱ و همکارانش نشان داده‌اند که سلول‌های ملانومای بیان‌کننده شاخص‌های CD133 و ABCG2 پتانسیل تومورزایی بیشتری در موش NOD-SCID دارند؛ همچنین سلول‌های CD133+ حاصل از نمونه بیمار پس از چهل تا پنجاه روز تزریق به موش NOD-SCID، تومورهای قابل شناسایی را ایجاد می‌کردند در صورتی که سلول‌های CD133- حتی پس از چهار ماه تومور تشکیل ندادند (۱۴ و ۱۵)؛ علاوه بر این، شاخص CD133، افزایش معنادار را در نمونه‌های بیماران دارای ملانومای عودکننده نسبت به نمونه‌های ملانومای غیرعودکننده نشان می‌دهد (۱۶). CD44 با چندین مولکول شامل کلاژن، فیبرونکتین، لامینین و اکنش می‌دهد و این ارتباط متقابل، نقشی مهم در پیشرفت سرطان توسط افزایش تکثیر سلول، مهاجرت و متاستاز دارد؛ همچنین خاموش کردن این ژن در ملانوما موجب تخریب تکثیر سلول و مهاجرت می‌شود (۱۷) و در بسیاری از سرطان‌ها از جمله سرطان پستان به‌عنوان شاخص برای سلول‌های بنیادی سرطان شناخته شده است (۱۸).

از طرفی مطالعاتی وجود دارند که به‌طور تقریبی، حضور سلول‌های بنیادی سرطان را در ملانوما نفی می‌کنند، کوایتانا^۲ و همکارانش در سال ۲۰۰۸ برای ارزیابی اینکه چگونه سلول‌های تومورزای ملانوما از سلول‌های غیرتومورزا از نظر فنوتیپی قابل تشخیص هستند، شاخص‌هایی شامل «A2B5، c-kit، CD44، CD49B، CD49D، CD49f، CD54، CD133، ABCB5، CD271، CD29، CD9، CD151، CD10، L6، CD49e، CD166، HNK-1، L1CAM، MCAM، p75^{E-cadherin} و N-cadherin» را که در سلول‌های ملانومای حاصل از چندین بیمار به‌صورت هتروژنوس بیان می‌شوند، بررسی کرده‌اند و مشخص شد که هر دو جمعیت مثبت و منفی از نظر بیان این شاخص‌ها، وقتی به‌طور جداگانه خالص‌سازی و به موش NOD/SCID IL2R γ null تزریق-

1 - Monzani
2-Quintana

کشت سلول‌ها به صورت تک‌لایه

به منظور کشت سلول‌ها به صورت تک‌لایه، تمام رده‌های سلولی ملانوما در محیط RPMI حاوی ۱۰ درصد سرم (FBS)، 2 mM گلوتامین، ۱ درصد پنی‌سیلین/استرپتومایسین و ۱ درصد اسیدآمینوهای غیرضروری (NEAA) کشت شدند (همگی از شرکت GIBCO خریداری شدند). حدود ۱۵۰ هزار سلول به فلاسک T-25 حاوی ۵ میلی‌لیتر محیط کشت منتقل شدند؛ محیط کشت سلول هر دو روز یک‌بار به‌طور کامل، تعویض و سلول‌ها پس از انباشتگی مناسب، توسط تریپسین ۰/۰۵ درصد از کف فلاسک جدا و پاساژ داده شدند.

ایمونوفلوروسانس

برای بررسی بیان شاخص‌های CD133، CD44 و ABCG2 در رده‌های سلولی ملانوما از روش ایمنوفلوروسانس با استفاده از آنتی‌بادی‌های اختصاصی (جدول ۱) استفاده شد. ابتدا سلول‌ها توسط تریپسین ۰/۰۵ درصد از کف ظرف جدا شدند، پس از شستشو با بافر فسفات نمکی فاقد یون کلسیم و منیریم (PBS-) (سانتریفیوژ در سرعت ۴۰۰ g، ۵ دقیقه، دمای ۴ درجه سانتی‌گراد) و شمارش سلول‌ها، حدود ۱۵۰ هزار سلول به لوله‌های مخصوص فلوسایتومتری منتقل و حجم نهایی توسط PBS- به ۱۰۰ میکرولیتر رسانده شد؛ سپس مقدار ۳ میکرولیتر از آنتی‌بادی‌های مورد نظر و ایزوتیپ کنترل آنتی‌بادی‌های مورد نظر به‌طور جداگانه به لوله‌های مرتبط اضافه و نمونه‌ها به مدت ۴۵ دقیقه در شرایط تاریکی و روی یخ انکوبه شدند؛ نمونه‌ها پس از شستشو، توسط دستگاه فلوسایتومتری BD FACS Calibur مورد بررسی قرار گرفتند. به منظور بررسی بیان شاخص‌ها بر جمعیت سلول‌های زنده در هنگام انجام فلوسیتومتری به لوله‌ها رنگ پرومیدیم یداید (PI) اضافه و بیان شاخص‌ها بر جمعیت PI- (سلول‌های زنده) آنالیز شدند؛ درانتها اطلاعات حاصل با نرم‌افزار flowing software تجزیه و تحلیل شدند (جدول ۱).

می‌شوند، دارای فراوانی بسیار بالایی از سلول‌های تومورزا هستند و در همه موارد تومور ایجاد می‌کنند (۱۹ تا ۲۱). با مطالعه‌ای که در سال ۲۰۰۹، شکلتون^۱ و همکارانش، روی سلول‌های ملانوما حاصل از نمونه بیمار و با استفاده از شاخص CD133 انجام دادند، نیز نتایج مشابه به دست آمده است (۲۲).

ناهنجاری و ناهماهنگی موجود در خصوص حضور سلول‌های بنیادی سرطان در ملانوما می‌تواند به مقدار زیادی ناشی از تفسیرهای مختلف خود مدل و همچنین پراکندگی در روش‌های مطالعه سلول بنیادی ملانوما باشد (۲۳). با توجه به اهمیت شناسایی سلول‌های بنیادی سرطان به منظور توسعه روش‌های درمانی، در این پژوهش به مطالعه‌ای منسجم در خصوص بررسی بیان شاخص‌های کاندید سلول‌های بنیادی سرطان و سپس جداسازی سلول‌ها بر اساس شاخص مورد نظر و بررسی ویژگی‌های بنیادی مانند قابلیت کلنی‌زایی و تشکیل تشکیل اسفروئید و همچنین بیان ژن‌های مؤثر در حفظ حالت بنیادی، پرداخته شده است.

مواد و روش‌ها

رده‌های سلولی مورد مطالعه

در این مطالعه از رده‌های سلولی ملانوما متاستازی شامل WM115، NA8، SK-MEL، Me67، A375 و D10 استفاده شد که اسپاگنولی^۲ از مرکز آنکولوژی بیمارستان دانشگاه بازل سوئیس، آن را به آزمایشگاه سلول‌های بنیادی سرطان پژوهشگاه رویان اهدا کرده بود؛ تمامی این رده‌های سلولی در محیط کشت (GIBCO) RPMI کشت شدند و با توجه به نوع کشت، مواد مکمل به محیط پایه آنها اضافه شدند.

1-Shackleton

2 - Spagnoli

جدول ۱. آنتی‌بادی‌های مورد استفاده در این پژوهش

کد ماده	شرکت سازنده	میزبان تولید-کننده	نوع ایزوتایپ	رنگ کونژوگه	نام آنتی‌بادی
130-090-853	Miltenyi Biotec	موش	IgG2b	PE	Anti-human CD133/2 (293C3)
130-092-215	Miltenyi Biotec	موش	IgG2b	PE	Mouse IgG2b (کنترل ایزوتایپ)
555478	BD	موش	IgG2b	FITC	Anti-human CD44
X0941	DAKO	موش	IgG2b	FITC	Mouse IgG2b (کنترل ایزوتایپ)
12-8888	eBioscience	موش	IgG2b	PE	Anti-Human CD338 (ABCG2)

تجمع‌های سلولی، مخلوط سلول از فیلتر مش عبور داده- شد؛ سرانجام جمعیت‌های سلولی زنده مورد نظر با دستگاه BD FACSAria II جداسازی شدند.

بررسی قابلیت کلنی‌زایی

از ویژگی‌های سلول‌های بنیادی سرطان، توانایی تشکیل کلنی است؛ لذا توانایی سلول‌ها در گروه‌های خالص‌شده با استفاده از این روش بررسی شد؛ به‌طور خلاصه ۲۰۰ عدد سلول در ظروف کشت شش‌خانه‌ای (سطح ۱/۶ سانتیمتر مربع) حاوی ۲/۵ میلی‌لیتر محیط کامل اضافه شد و پس از ده روز، تعداد کلنی‌های تشکیل‌شده در گروه‌ها به‌طور جداگانه شمارش و بررسی شدند؛ این تست در سه تکرار و به‌صورت سه-تایی انجام شد و اعداد به‌دست‌آمده با برنامه Stata نسخه ۱۲ آنالیز شدند.

بررسی قابلیت تشکیل اجسام کروی شکل (اسفروئید: spheroid)

یکی دیگر از عملکردهای سلول‌های بنیادی سرطان، توانایی تشکیل اسفیر در محیط کشت عاری از سرم است. به‌منظور بررسی توانایی جمعیت‌های سلولی خالص‌شده، ۵ هزار عدد از هر گروه سلولی در ۲ میلی-لیتر محیط کشت فاقد سرم به ظروف کشت شش‌خانه‌ای دارای قدرت اتصال پایین (سطح ۱/۶ سانتی‌متر مربع) اضافه شد؛ از روز اول و هر دو روز یک‌بار ۲۰ نانوگرم فاکتور رشد EGF و bFGF (پژوهشگاه رویان) به‌ازای هر

جداسازی سلول‌ها با استفاده از دستگاه فلوسیتومتری پس از اینکه نتایج حاصل از آنالیزهای فلوسیتومتری، بررسی و شاخص و رده سلولی مناسب انتخاب شد، از روش FACS (Fluorescence-Activated Cell Sorting) برای جداسازی و خالص‌سازی سلول‌ها براساس شاخص مورد نظر استفاده شد؛ به این ترتیب که ابتدا سلول‌ها توسط تریپسین ۰/۰۵ درصد از کف ظرف جدا شدند و پس از شستشو توسط بافر فسفات نمکی (سانتریفیوژ در سرعت ۴۰۰ g، ۵ دقیقه، دمای ۴ درجه سانتی‌گراد) حجم مخلوط سلولی توسط محلول مخصوص رنگ‌آمیزی (PBS- + 2% FBS) به ۵۰۰ میکرولیتر رسانیده و سلول‌ها شمارش شدند؛ پس از شمارش، سلول‌ها به سه گروه تقسیم شدند: ۱- گروه کنترل منفی، سلول‌های بدون رنگ-آمیزی (حدود ۱۰۳ × ۱۵۰)؛ ۲- گروه کنترل ایزوتایپ که به آن ۳ میکرولیتر ایزوتایپ آنتی‌بادی اضافه شد (حدود ۱۰۳ × ۱۵۰) و ۳- گروه تست که به آن ۳ میکرولیتر آنتی‌بادی CD133 به‌ازای هر ۱۰۶ عدد سلول اضافه شد (بقیه سلول‌ها). نمونه‌ها به‌مدت ۴۵ دقیقه در شرایط تاریکی و روی یخ انکوبه شدند؛ پس از اتمام انکوباسیون، نمونه‌ها توسط PBS- شستشو و رسوب سلولی نمونه تست در محلول مخصوص جداسازی سلول (این محلول شامل PBS- به همراه ۱ میلی‌مولار EDTA، ۲۵ میلی‌مولار HEPES و ۱ درصد FBS است) معلق شد (۱ میلی‌لیتر به‌ازای هر ۱۰۶ × ۲). برای حذف

توسط کیت (TaKaRa) و با استفاده از پرایمر هگزامر تصادفی (Random Hexamer) به cDNA تبدیل شد؛ سرانجام Real-Time PCR برای cDNA تولید شده انجام شد؛ برای این منظور ۱ میکرولیتر از هر پرایمر مرتبط (جدول ۲)، ۶ میکرولیتر از SYBRGreenMasterMix (TaKaRa)، ۱۰ میکرولیتر آب و ۲ میکرولیتر از cDNA با هم ترکیب شدند؛ از ژن GAPDH نیز به عنوان کنترل داخلی استفاده شد؛ این روند با سه تکرار بیولوژیک و هر تکرار به صورت دوتایی صورت گرفت. واکنش Real-Time PCR توسط دستگاه Corbet Life Science انجام شد و داده‌ها با روش $-\Delta\Delta Ct$ ۲ آنالیز شدند. به منظور بررسی معناداری تفاوت بیان ژن در میان گروه‌ها از ANOVA و Post Hoc Tests استفاده شد.

میلی‌لیتر محیط کشت اضافه شد؛ پس از ده روز که اسفروئیدها به رشد نهایی خود رسیدند (یعنی زمانی که مرگ سلولی در آنها آغاز می‌شود و مرکز اسفیر به رنگ قهوه‌ای درمی‌آید)، تمام اسفروئیدهای تشکیل شده در هر خانه توسط میکروسکوپ نوری معکوس شمارش شدند؛ این تست در سه تکرار بیولوژیک و به صورت سه‌تایی انجام شد. برای بررسی معناداری تفاوت در میان گروه‌ها از ONEWAY ANOVA و Post Hoc Tests استفاده شده است.

بررسی بیان ژن‌های بنیادینگی

به منظور بررسی و مقایسه بیان ژن‌های بنیادینگی در گروه‌های سلولی خالص شده از روش Real-Time PCR استفاده شد؛ برای این منظور ابتدا RNA توسط تریزول (SIGMA) استخراج شد و سپس RNA استخراج شده

جدول ۲. فهرست پرایمرهای مورد استفاده در این پژوهش

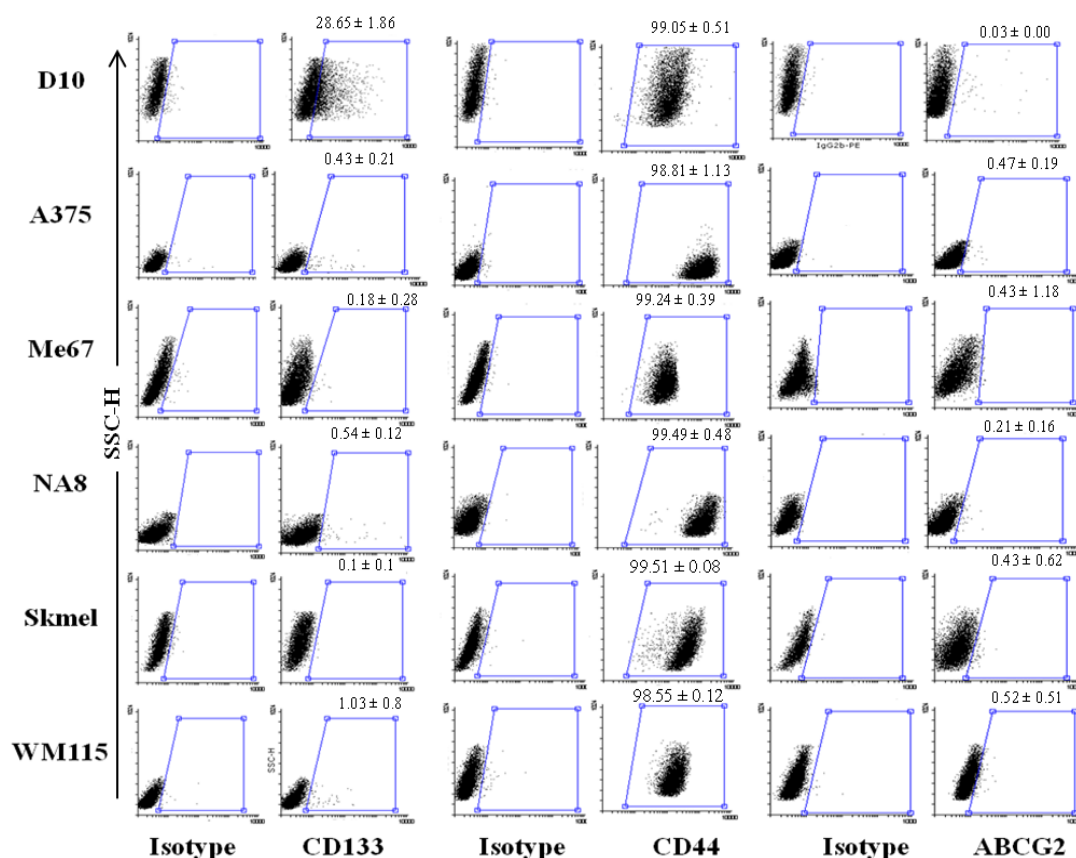
ژن	توالی پرایمر	طول محصول (جفت باز)
GAPDH	F: CTCATTTTCCTGGTATGACAAC R: CTTCTCTTGTGCTCTTGCT	122
NANOG	F: AAAGAATCTTCACCTATGCC R: GAAGGAAGAGGAGAGACAGT	110
SOX2	F: GGGAAATGGAAGGGGTGCAAAAGAGG R: TTGCGTGAGTGTGGATGGGATTGGTG	151
OCT4	F: GTTCTTCATTCACTAAGGAAGG R: CAAGAGCATCATTGAACTTCAC	101
KLF4	F: ATTACCAAGAGCTCATGCCA R: CCTTGAGATGGGAACTCTTTG	150
CD133/ PROM1	F: GCATCCATCAAGTGAAACGT R: GGTTTGGCGTTGACTCTGT	199

ABCG2 را یا بیان نمی‌کردند یا بیان آن را در حدی بسیار پایین نشان می‌دادند. شاخص CD133 در رده سلولی D10 به طور نسبی و به میزان $1/85 \pm 28/65$ درصد بیان شد و دیگر رده‌های سلولی، بیانی بسیار پایین یا عدم بیان داشتند. براساس این نتایج، رده سلولی D10 و شاخص سطحی CD133 برای جداسازی انتخاب شدند (شکل ۱).

نتایج

بررسی ایمونوفنوتایپ رده‌های سلولی ملانوما

در این مطالعه، میزان بیان شاخص‌های سطحی مرتبط با سلول‌های بنیادی سرطان (CD133، CD44 و ABCG2) به صورت تکرنگ مورد بررسی قرار گرفت. نتایج حاصل از آنالیزهای فلوسایتومتری نشان داد که شاخص CD44 در همه رده‌های سلولی، بیان بالایی (به‌طور تقریبی ۱۰۰ درصد) داشته است. تمام رده‌ها شاخص

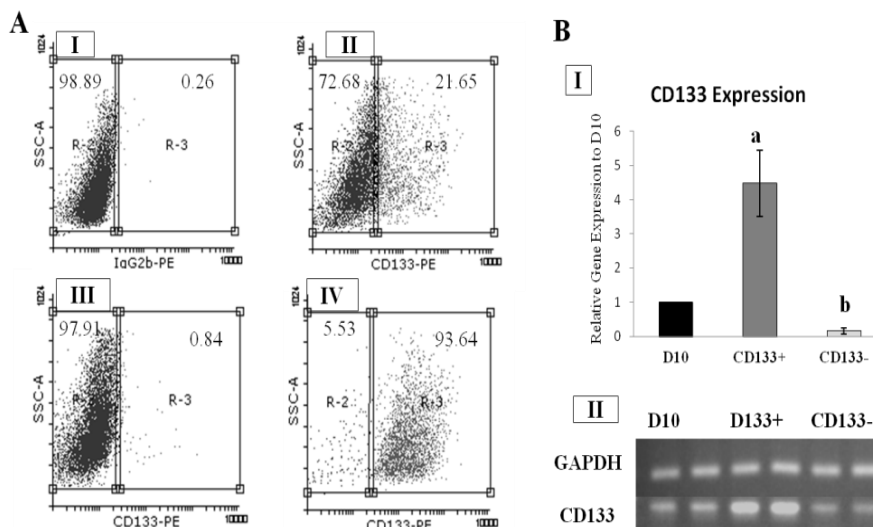


شکل ۱. نمودارهای مربوط به بیان شاخص‌های CD133، CD44 و ABCG2 در رده‌های سلولی D10، A375، Me67، Wm115 و Skmel، NA8

جداسازی سلول‌ها:

بر اساس داده‌های فلوسایتومتری رده سلولی D10 و شاخص CD133 برای جداسازی سلول‌ها انتخاب شدند؛ این رده سلولی بر اساس بیان و عدم بیان شاخص CD133 در قالب دو جمعیت CD133+ و CD133- جداسازی شد؛ ناحیه R-3 به عنوان جمعیت CD133+ و ناحیه R-2 به عنوان CD133- انتخاب شدند (شکل ۲A)؛ پس از جداسازی سلول‌ها، برای بررسی درصد خلوص سلول‌های جداسازی شده، حدود ۵ هزار سلول از هر

گروه دوباره توسط دستگاه بررسی شدند. جمعیت‌هایی که خلوص بیش از ۹۰ درصد داشتند، برای آنالیزهای بعدی انتخاب شدند. آنالیزهای مولکولی انجام شده توسط روش Real-Time PCR نشان داد که تفاوتی معنادار در سطح mRNA ژن CD133 میان سه جمعیت سلولی وجود داشت؛ همچنین بیان ژن CD133 در گروه CD133+ نسبت به گروه D10 افزایشی معنادار داشت (p=0.005)؛ بیان این ژن در گروه D10 نیز بیشتر از CD133- بود (p=0.008) (شکل ۲B).

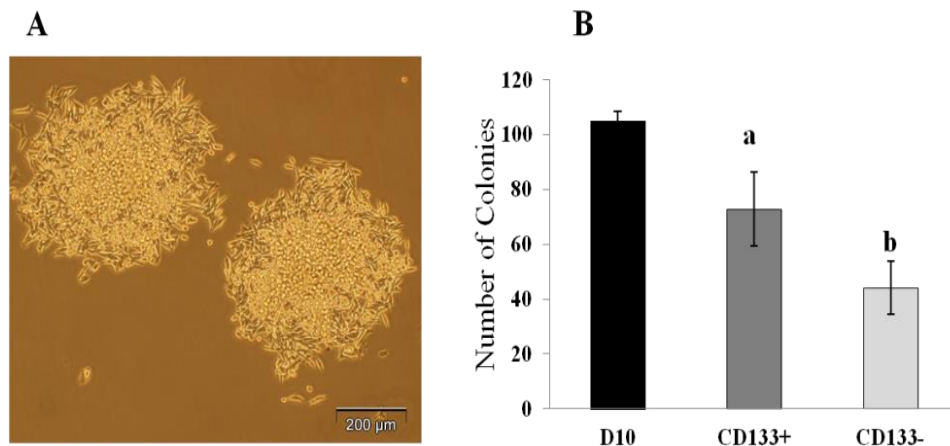


شکل ۲. A. نمودارهای مربوط به روند جداسازی سلول‌ها در D10: I. ایزوتیپ کنترل پیش از جداسازی سلول‌ها؛ II. بررسی بیان CD133+ در رده سلولی D10 پیش از جداسازی سلول‌ها نشان داد که ۲۱/۶۵ درصد بیان‌کننده این شاخص هستند؛ III. تعیین خلوص جمعیت CD133- پس از جداسازی (۹۷.۹۱٪) و IV. تعیین درصد خلوص جمعیت CD133+ (۹۳.۶۴٪) پس از انجام جداسازی توسط دستگاه FACS؛ B. تأیید صحت انجام جداسازی سلول‌ها توسط بررسی‌های مولکولی؛ I. میزان بیان ژن CD133 در سه گروه سلولی D10، CD133+ و CD133- (Mean±SD)؛ a. معناداری جمعیت CD133+ نسبت به D10 ($p=0.005$)؛ b. معناداری جمعیت CD133- نسبت به CD133+ و D10 ($p\leq 0.008$)؛ II. باندهای محصول‌های Real-Time PCR پس از انجام الکتروفورز روی ژل آگارز

در گروه‌های مختلف تفاوتی با یکدیگر نداشت (شکل ۳A). نتایج حاصل از شمارش کلنی‌ها در شکل ۳B نشان‌دهنده شده‌است. همان‌طورکه در نمودار نشان‌دهنده شده‌است، از میان گروه‌های مورد آزمایش، قدرت کلنی-زایی در گروه CD133+ نسبت به گروه CD133-، ۱/۶۴ برابر بود؛ همچنین قدرت کلنی‌زایی در گروه D10 نسبت به CD133- ۱/۹۴ برابر بود و تفاوتی معنادار در میان گروه‌ها وجود داشت ($P<0/05$).

بررسی قابلیت کلنی‌زایی

به‌منظور بررسی توان کلنی‌زایی در گروه‌های مورد مطالعه، تعداد ۲۰۰ سلول در سطح ۱/۶ سانتی‌متر مربع به مدت ده روز بدون تغییر محیط کشت شدند. کلنی‌های تشکیل‌شده دارای شکل گرد و با قطر بیش از ۴۰۰ میکرومتر بودند. سلول‌های تشکیل‌دهنده کلنی‌ها در مرکز کلنی به‌صورت مدور و چندلایه‌ای و در حاشیه آن به‌صورت دوکی و تک‌لایه‌ای بودند؛ شکل و وسعت کلنی و همچنین تراکم سلول‌های تشکیل‌دهنده کلنی‌ها

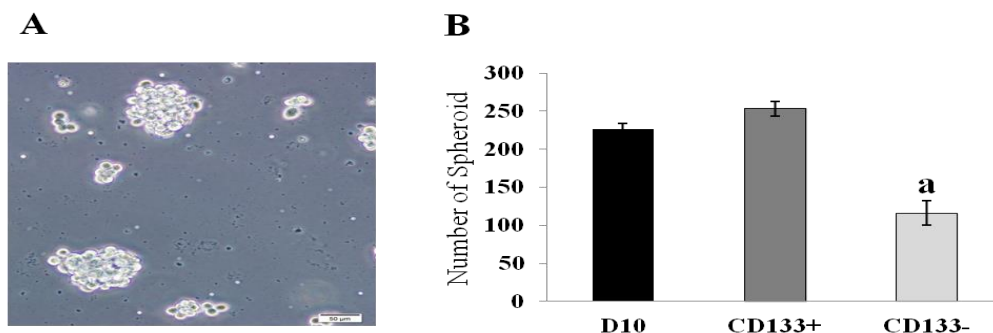


شکل ۳. A. نمای میکروسکوپ نوری معکوس از تک کلنی حاصل از کشت ۲۰۰ عدد سلول اولیه در سطح ۱/۶ سانتی‌متر مربع سطح ظرف کشت به مدت ده روز؛ B. تعداد کلونی‌های تشکیل شده در گروه‌های مختلف. نتایج حاصل سه تکرار مستقل که هر یک نیز به طور دوتایی انجام شده و به صورت Mean±SD در نمودار به نمایش درآمده‌اند؛ a. معناداری تفاوت در گروه CD133+ نسبت به گروه‌های D10 و CD133- و b. معناداری تفاوت در گروه CD133- نسبت به گروه D10، (p<0.05).

مورفولوژی، اندازه اسفروئیدها و همچنین تراکم سلول-های تشکیل دهنده آن مشاهده نشد. قدرت تشکیل اسفروئید در گروه CD133+ به طور تقریبی ۲/۲ برابر بیشتر از گروه CD133- بود (p=000) و در گروه CD133- به طور معناداری، کمتر از گروه D10 بود (p=000). تفاوتی معنادار میان گروه D10 و CD133+ مشاهده نشد (p=0.063) (شکل ۴B).

بررسی قابلیت تشکیل اجسام کروی (اسفروئید):

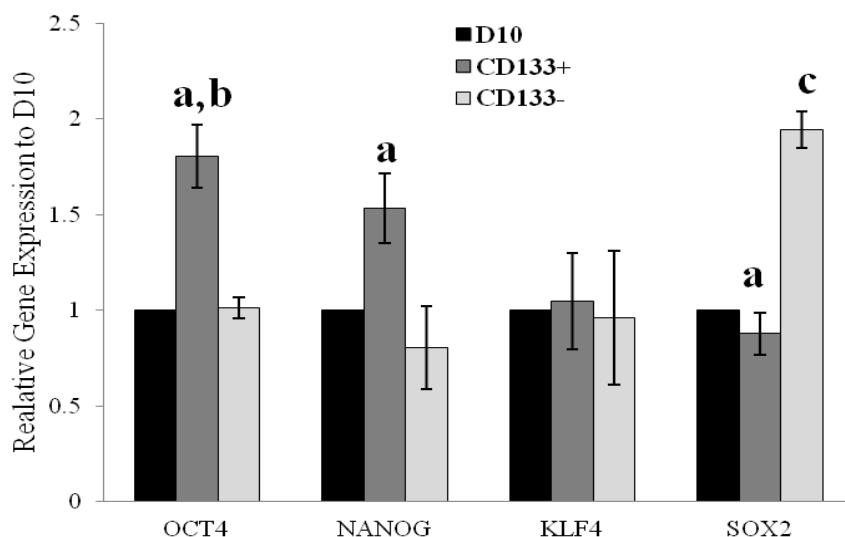
یکی دیگر از ویژگی‌های سلول‌های بنیادی سرطان، تشکیل اسفیر در محیط آزمایشگاه است که می‌تواند شاهدی بر تشکیل تومور در موجود زنده باشد؛ به این منظور، تعداد ۵ هزار سلول در سطح ۱/۶ سانتی‌متر مربع و در ۲/۵ میلی‌لیتر محیط فاقد سرم به مدت ده روز کشت شدند (شکل ۴A). در گروه‌های مختلف از نظر



شکل ۴. A. نمای میکروسکوپ نوری معکوس از اسفروئیدهای حاصل از کشت ۵ هزار سلول اولیه در سطح ۱/۶ سانتی‌متر مربع سطح ظرف کشت به مدت ده روز (بزرگنمایی ×۲۰)؛ B. تعداد اسفروئیدهای تشکیل شده در گروه‌های مختلف مشتق از رده سلولی ۱۰؛ D. نتایج حاصل سه تکرار مستقل که هر یک نیز به طور دوتایی انجام شده‌اند و به صورت Mean±SD در نمودار به نمایش درآمده‌اند؛ a. معناداری تفاوت در گروه CD133- نسبت به گروه CD133+ و D10، (P≤0.0001).

معنادر داشتند ($p < 0.05$)؛ همچنین بیان OCT4 در KLF4 نسبت به D10 افزایش داشت. از نظر بیان KLF4 تفاوتی معنادر میان گروه‌ها وجود نداشت، در حالی که ژن SOX2 در گروه CD133- نسبت به D10 و CD133+ به‌طور معناداری افزایش یافته بود ($p < 0.05$) (شکل ۵).

بررسی بیان ژن‌های بنیادی در سلول‌های جداسازی شده
بررسی بیان ژن‌های دخیل در حفظ حالت بنیادینگی از جمله OCT4، NANOG، KLF4 و SOX2 در سه گروه D10، CD133+ و CD133- نشان داد که در گروه CD133+، ژن NANOG و OCT4 نسبت به گروه CD133- افزایشی



شکل ۵. بررسی بیان ژن‌های OCT4، SOX-2، NANOG و KLF4 در سه گروه CD133+، CD133- و D10 به روش Real-Time PCR. نتایج به صورت $Mean \pm SD$ سه تکرار مجزا نشان داده شده‌اند؛ a. $P < 0.03$ در گروه CD133+ نسبت به CD133-؛ b. $P = 0.003$ در گروه CD133+ نسبت به D10 و c. $P \leq 0.02$ در گروه CD133- نسبت به D10.

جداسازی CD133- شد.

استفاده از دو تست کلنی زایی و تشکیل اسفروئید که عملکرد سلول‌های بنیادی سرطان را مشخص می‌کنند، نشان داد که جمعیت CD133+ توان تشکیل کلنی و اسفروئید بالاتری نسبت به جمعیت CD133- دارند؛ لذا جمعیت CD133+ از نظر ویژگی‌های عملکردی به سلول‌های بنیادی سرطان شبیه است. در مطالعه‌ای که شارما^۱ و همکارانش در سال ۲۰۱۲ انجام دادند، مشخص شد، وقتی سلول‌های CD133+ ملانومایی از پاساژهای اولیه ملانومای متاستازی جداسازی و به موش NCr-nu/nu تزریق می‌شوند در تعداد کم سلول (۱۰۰۰ عدد) نیز پس

بحث

در این مطالعه به بررسی بیان شاخص‌های سلول‌های بنیادی سرطان و ارتباط آن با ویژگی بنیادی در سطح عملکردی و بیان ژن، در چند رده سلولی ملانوما (D10، A375، Me67، SK-MEL، NA8، WM115) پرداخته شد؛ برای این منظور، ابتدا بیان شاخص‌های CD133، CD44 و ABCG2 در رده‌های بالا به روش فلوسایتومتری بررسی شدند و سپس براساس نتایج حاصل، رده سلولی D10 (مشتق از بیوپسی یک بیمار با ملانومای متاستاتیک به غدد لنفاوی) و شاخص CD133 برای جداسازی سلول‌ها در این مطالعه انتخاب شد و این رده سلولی به روش FACS در قالب دو گروه CD133+

¹ - SHARMA

داشته‌است و بیان Klf4 تفاوتی معنادار را نشان نداده. در مطالعه جتر^۱ و همکارانش در سال ۲۰۱۱ مشخص شد که خاموش کردن NANOG، موجب کاهش رشد کلنی و تومورزایی در چند رده سلولی سرطان سینه، کولن، پروستات و همچنین مدل‌های زئوگرفت می‌شود؛ علاوه-براین افزایش بیان NANOG در سلول‌های بنیادی سرطان با افزایش بیان مولکول‌های وابسته به سلول‌های بنیادی سرطان مانند CD133، ABCG2، ALDH1A1 و CD44 مرتبط است (۲۵). Oct4 مهم‌ترین معیار رونویسی القاکننده پرتوانی^۲ است که در بسیاری از سرطان‌ها توسط سلول‌های شبه‌بنیادی سرطان^۳ بیان می‌شود؛ بیان این ژن در ملانوما موجب تمایززدایی سلول‌های ملانوما و تبدیل آن به سلول‌های شبه‌بنیادی سرطان می‌شود. بیان Oct4 در ملانوما توسط کمبود اکسیژن القامی‌شود و بیان آن در زیرمجموعه‌ای از سلول‌های ملانوما در نمونه‌های بیماران قابل مشاهده است (۲۶)؛ SOX2 نیز یک معیار رونویسی است که از طریق تسهیل گذر از مرحله G1 به S موجب القای تکثیر و تومورزایی می‌شود. میزان SOX2، موجب تنظیم ژن‌های هدف SOX2 و Oct4 و همچنین ایجاد CSC می‌شود به طوری که خاموش کردن SOX2 در سلول‌های بنیادی سرطان ریه، مهار رشد و متاستاز را در پی دارد (۲۷)؛ در مطالعه‌ای دیگر نشان داده-شد که تشکیل ماموسفریوید در شرایط آزمایشگاهی، رابطه‌ای مستقیم با بیان Sox2 دارد. به طوری که افزایش بیان آن، موجب افزایش تشکیل اسفریوید و مهار آن، مانع تشکیل اسفریوید و تأخیر در تشکیل تومور در مدل‌های حیوانی می‌شود (۲۸). براساس مطالعات گذشته تمایززدایی کارآمد سلول‌های ملانومایی در نتیجه بیان درون‌زاد^۴ Sox2 و Klf4 است (۲۶)؛ اما در مطالعه ما، بیان Sox2 در جمعیت CD133- بیشتر بوده‌است و تفاوتی معنادار در بیان Klf4 مشاهده نشد؛ البته باید توجه داشت که معیارهای رونویسی در قالب پروتئین دارای عملکرد

از هشت هفته قادر به ایجاد تومور هستند ولی در جمعیت CD133- حتی در تعداد زیاد سلول، تومور ایجاد نمی‌شود (۱۶). ولی مطالعه کوانیتانا و همکارانش نشان می‌دهد که هر دو گروه CD133+ و CD133- توانایی زیادی به ایجاد تومور دارند و تومورهای ایجاد شده از هر دو گروه سلولی، شامل جمعیت‌های CD133+ و CD133- هستند (۱۹)؛ این تفاوت نتایج در بررسی سلول‌های بنیادی سرطان ملانوما می‌تواند به مقدار زیادی، ناشی از تفسیرهای مختلف خود مدل و همچنین پراکنندگی در روش‌های مطالعه باشد؛ برای نمونه در ملانوما مشاهده شده‌است که تغییرهای ویژه در پروتوکل پیوند زدن سلول موجب می‌شود که میزان سلول‌های شروع‌کننده تومور از ۰/۰۰۰۱ درصد به ۲۵ درصد افزایش یابند؛ این تغییرها شامل افزایش ناکارآمدی سیستم ایمنی موش نژاد NSG، تزریق سلول‌ها در ماتریژل و سپس پیوند آن به مدل حیوانی و افزایش زمان برای مشاهده تشکیل تومور است (۲۴). در مطالعه حاضر به دلیل عدم دسترسی به مدل حیوانی نمی‌توان با قطعیت، شاخص CD133 را به شاخص سلول‌های بنیادی سرطان در این رده سلولی رد کرد یا پذیرفت ولی براساس تست عملکردی در شرایط آزمایشگاهی، مانند قدرت کلنی‌زایی و تشکیل اسفریوید می‌توان جمعیت CD133+ را سلول‌های شبه‌بنیادی سرطان دانست؛ از سوی دیگر، مطالعات ما نشان داده‌اند که رده سلولی D10 نسبت به سلول‌های CD133+ کلنی‌زایی بیشتری دارند که می‌تواند به دلیل استرس ناشی از جداسازی سلول‌ها در دستگاه فلوسیتومتری باشد به این معنی که سلول‌های CD133+ به مدتی طولانی تحت فشار جداساز قرار گرفته‌اند که می‌تواند بر توان عملکردی آنها اثر بگذارد. با وجود این، هدف این مطالعه، بررسی میان جمعیت‌های CD133+ و CD133- بود که هر دو گروه، شرایطی یکسان را متحمل شده‌اند؛ همچنین از میان ژن‌های بنیادینگی مورد بررسی، ژن‌های NANOG و OCT4 در جمعیت CD133+ بیان بیشتری داشته‌اند و ژن SOX2 در این گروه نسبت به جمعیت CD133-، کاهش بیان

¹ - Jeter

² - Pluripotency

³ - CSC-like cells

⁴ - Endogenous

اسفروید و همچنین بیان ژنهای OCT4 و NANOG ثابت می‌کند که شاخص CD133 می‌تواند برای جداسازی سلول‌های شبه‌بنیادی رده D10 و دیگر سلول‌های ملانوما که شاخص CD133 را بیان می‌کنند، در نظر گرفته شود.

هستند و بهتر است که بیان آنها علاوه بر آنکه در سطح ژن ارزیابی می‌شود، در سطح پروتئین نیز بررسی شود زیرا بیان ژن به تنهایی، معرف عملکرد نیست؛ با این حال، نتایج آنالیزهای عملکردی قدرت کلنی‌زایی و تشکیل

منابع

1. Tomic T, Botton T, Cerezo M, Robert G, Luciano F, Puissant A, et al. Metformin inhibits melanoma development through autophagy and apoptosis mechanisms. *Cell Death Dis* 2011;2:e199.
2. Mueller DW, Bosserhoff AK. Role of miRNAs in the progression of malignant melanoma. *Br J Cancer* 2009;101(4):551-6.
3. Payne AS, Cornelius LA. The role of chemokines in melanoma tumor growth and metastasis. *J Invest Dermatol* 2002;118(6):915-22.
4. Su DM, Zhang Q, Wang X, He P, Zhu YJ, Zhao J, et al. Two types of human malignant melanoma cell lines revealed by expression patterns of mitochondrial and survival-apoptosis genes: implications for malignant melanoma therapy. *Mol Cancer Ther* 2009;8(5):1292-304.
5. Keshet GI, Goldstein I, Itzhaki O, Cesarkas K, Shenhav L, Yakirevitch A, et al. MDR1 expression identifies human melanoma stem cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2008;368(4):930-6.
6. Shapiro DG, Samlowski WE. Management of melanoma brain metastases in the era of targeted therapy. *J Skin Cancer* 2011;2011:845863.
7. Schatton T, Frank MH. Cancer stem cells and human malignant melanoma. *Pigment Cell Melanoma Res* 2008;21(1):39-55.
8. Bill MA, Fuchs JR, Li C, Yui J, Bakan C, Benson DM, Jr., et al. The small molecule curcumin analog FLLL32 induces apoptosis in melanoma cells via STAT3 inhibition and retains the cellular response to cytokines with anti-tumor activity. *Mol Cancer* 2010;9:165.
9. Morrison R, Schleicher SM, Sun Y, Niermann KJ, Kim S, Spratt DE, et al. Targeting the mechanisms of resistance to chemotherapy and radiotherapy with the cancer stem cell hypothesis. *J Oncol* 2011;2011:941876.
10. Spillane JB, Henderson MA. Cancer stem cells: a review. *ANZ J Surg* 2007;77(6):464-8.
11. Ratajczak MZ. Cancer stem cells--normal stem cells "Jedi" that went over to the "dark side." *Folia Histochem Cytobiol* 2005;43(4):175-81.
12. Welte Y, Adjaye J, Lehrach HR, Regenbrecht CR. Cancer stem cells in solid tumors: elusive or illusive? *Cell Commun Signal* 2010;8(1):6.
13. Al Dhaybi R, Sartelet H, Powell J, Kokta V. Expression of CD133+ cancer stem cells in childhood malignant melanoma and its correlation with metastasis. *Mod Pathol* 2010;23(3):376-80.
14. Monzani E, Facchetti F, Galmozzi E, Corsini E, Benetti A, Cavazzin C, et al. Melanoma contains CD133 and ABCG2 positive cells with enhanced tumorigenic potential. *Eur J Cancer* 2007;43(5):935-46.
15. Vescovi AL, Galli R, Reynolds BA. Brain tumour stem cells. *Nat Rev Cancer* 2006;6(6):425-36.
16. 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. *Int J Oncol* 2012.
17. Hernandez D, Miquel-Serra L, Docampo MJ, Marco-Ramell A, Bassols A. Role of versican V0/V1 and CD44 in the regulation of human melanoma cell behavior. *Int J Mol Med* 2011;27(2):269-75.
18. Prud'homme GJ, Glinka Y, Toulina A, Ace O, Subramaniam V, Jothy S. Breast cancer stem-like cells are inhibited by a non-toxic aryl hydrocarbon receptor agonist. *PLoS One* 2010;5(11):e13831.
19. Quintana E, Shackleton M, Sabel MS, Fullen DR, Johnson TM, Morrison SJ. Efficient tumour formation by single human melanoma cells. *Nature* 2008;456(7222):593-8.
20. Quintana E, Shackleton M, Foster HR, Fullen DR, Sabel MS, Johnson TM, et al. Phenotypic heterogeneity among tumorigenic melanoma cells from patients that is reversible and not hierarchically organized. *Cancer Cell* 2010;18(5):510-23.
21. Ma J, Frank MH. Tumor initiation in human malignant melanoma and potential cancer therapies. *Anticancer Agents Med Chem* 2010;10(2):131-6.
22. Shackleton M, Quintana E, Fearon ER, Morrison SJ. Heterogeneity in cancer: cancer stem cells versus clonal evolution. *Cell* 2009;138(5):822-9.
23. Girouard SD, Murphy GF. Melanoma stem cells: not rare, but well done. *Lab Invest* 2011;91(5):647-64.
24. Ishizawa K, Rasheed ZA, Karisch R, Wang Q, Kowalski J, Susky E, et al. Tumor-initiating cells

- are rare in many human tumors. *Cell Stem Cell* 2010;7(3):279-82.
25. Jeter CR, Liu B, Liu X, Chen X, Liu C, Calhoun-Davis T, et al. NANOG promotes cancer stem cell characteristics and prostate cancer resistance to androgen deprivation. *Oncogene* 2011;30(36):3833-45.
 26. Kumar SM, Liu S, Lu H, Zhang H, Zhang PJ, Gimotty PA, et al. Acquired cancer stem cell phenotypes through Oct4-mediated dedifferentiation. *Oncogene* 2012, (In Press).
 27. Xiang R, Liao D, Cheng T, Zhou H, Shi Q, Chuang TS, et al. Downregulation of transcription factor SOX2 in cancer stem cells suppresses growth and metastasis of lung cancer. *Br J Cancer* 2011;104(9):141.
 28. Leis O, Eguiara A, Lopez-Arribillaga E, Alberdi MJ, Hernandez-Garcia S, Elorriaga K, et al. Sox2 expression in breast tumours and activation in breast cancer stem cells. *Oncogene* 2012;31(11):1354-65.

Daneshvar

Medicine

*Scientific-Research
Journal of Shahed
University
Twentieth Year,
No.106
August, September
2013*

Received: 2013/5/24

Last revised: 2013/9/22

Accepted: 2013/10/1

Evaluating the expression of cell surface markers CD133, CD44 and ABCG2 in melanoma cell lines and its relationship with cancer stem cells

Motahareh Rajabi Fomeshi^{1,2}, Marzieh Ebrahimi^{3*}, Seyed Javad Mowla⁴, Fazel Sahraneshin Samani¹

1. M. Sc. - Department of Stem Cells and Developmental Biology, Cell Science Research Center, Royan Institute for Stem Cell Biology and Technology, ACECR, Tehran, Iran.
2. M. Sc. - Department of Developmental Biology, University of Science and Culture, ACECR, Tehran, Iran.
3. Assistant Professor - Department of Stem Cells and Developmental Biology, Cell Science Research Center, Royan Institute for Stem Cell Biology and Technology, ACECR, Tehran, Iran.
4. Associate Professor - Molecular Genetic Department, Faculty of Biological Science, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran.

E-mail: mebrahimi@royaninstitute.org

Abstract

Background and Objective: Melanoma is the most deadly type of skin cancer that has a high potency and rapid metastasis to other organs. It appears that cancer stem cells (CSCs) are responsible for invasion and metastasis. The aim of this study was to investigate the expression of cancer stem cells candidate markers and their association with stemness features in melanoma cell lines.

Materials and Methods: The expression levels of CD133, CD44 and ABCG2 were measured in melanoma cell lines (WM115, NA8, SK-MEL, Me67, A375 and D10) by flow cytometry. Then, selected cell line was sorted up on the expression of selected stem cell marker into positive and negative populations. Afterward, The potential of cologenic, spheroid formation and expression of stem genes including NANOG, SOX2, OCT4 and KLF4 was estimated in positive, negative and unsorted cells.

Results: Our results demonstrated that $28.65 \pm 1.85\%$ of D10 cell line expressed CD133. However, CD44 and ABCG2 were or (not) expressed in all cell lines. The CD133⁺ sorted cells showed an increase in colony formation about 1.64 fold ($p < 0.05$) and melanospheres about 2.2 fold ($p = 0.00$) as compared to CD133⁻. The evaluation of stemness genes expression determined the significance of up-regulation of NANOG and OCT4 in CD133⁺ and SOX2 in CD133⁻ respectively. There was no difference in KLF4 expression between the two groups.

Conclusion: Findings of this research showed that CD133 can be considered as stem-like cells marker in D10 cell line and other melanoma cells which expressed CD133.

Key words: Melanoma, Cancer stem cells, CD133.