

القای آپوپتوز در سلول‌های سرطانی HepG2 توسط آگروزوم‌های مشتق شده از سلول‌های بنیادی مزانشیمی از طریق تولید گونه‌های فعال اکسیژن

سحر ساکی^۱، مهدی حاتمی^۲، فاطمه غفاری^۱، اعظم خدری^۱، سمانه صالحی پور باورصاد^۱

مقاله پژوهشی

چکیده

مقدمه: سرطان سلول‌های کبدی (Hepatocellular carcinoma) HCC شایع‌ترین نوع سرطان کبد در جهان است. روش‌های درمانی فعلی مانند شیمی‌درمانی و پرتودرمانی، می‌توانند به اندام‌های بیمار آسیب برسانند و گاهی منجر به مرگ شوند. اتوپوزاید (ETO) نیز به عنوان یک داروی شیمی‌درمانی پرکاربرد، همین مشکلات را دارد. آگروزوم‌های مشتق شده از سلول‌های بنیادی مزانشیمی به عنوان یک رویکرد نوین، می‌توانند با تحویل هدفمند مولکول‌های زیستی به سلول‌های سرطانی، عوارض جانبی را کاهش دهند.

روش‌ها: ابتدا سلول‌های سرطانی HepG2 تا رسیدن به تراکم مناسب در محیط کشت DMEM حاوی ۱۰ درصد سرم جنینی گاوی (Fetal bovine serum) FBS کشت داده شدند. سپس سلول‌های HepG2 با غلظت‌های ۲۵ و ۵۰ میکرومولار از آگروزوم به مدت ۲۴ ساعت تیمار شدند. در ادامه، میزان بیان ژن‌های BAX و BCL-2، سطح ROS و میزان آپوپتوز اندازه‌گیری شد.

یافته‌ها: نتایج نشان داد که تیمار سلول‌های HepG2 با آگروزوم‌های مشتق شده از سلول‌های بنیادی مزانشیمی به افزایش بیان ژن BAX و کاهش بیان ژن BCL-2 منجر شد. همچنین، سطح تولید گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) و میزان آپوپتوز در مقایسه با گروه شاهد به‌طور معنی‌داری افزایش یافت، که نشان‌دهنده تأثیر مثبت آگروزوم‌ها در القای مرگ سلولی برنامه‌ریزی‌شده است.

نتیجه‌گیری: آگروزوم‌های مشتق شده از MSC توانستند از طریق تولید ROS باعث القای آپوپتوز در سلول‌های سرطانی HepG2 شوند. این یافته‌ها نشان می‌دهد که آگروزوم‌ها می‌توانند به‌عنوان یک روش درمانی نوین با پتانسیل بالا در درمان سرطان مورد استفاده قرار گیرند و راهکارهایی برای توسعه استراتژی‌های کم‌خطرتر و مؤثرتر در درمان سرطان پیشنهاد می‌دهد.

واژگان کلیدی: آگروزوم؛ گونه‌های فعال اکسیژن؛ سرطان کبدی (HCC)؛ آپوپتوز

ارجاع: ساکی سحر، حاتمی مهدی، غفاری فاطمه، خدری اعظم، صالحی پور باورصاد سمانه. القای آپوپتوز در سلول‌های سرطانی HepG2 توسط آگروزوم‌های مشتق شده از سلول‌های بنیادی مزانشیمی از طریق تولید گونه‌های فعال اکسیژن. مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۴۰۳؛ ۴۲: (۷۹۹): ۱۲۰۶-۱۲۱۴.

شیمی‌درمانی و پرتودرمانی است (۲، ۳). اگرچه این روش‌ها می‌توانند در کنترل و کاهش تومور مؤثر واقع شوند، اما غالباً با عوارض جانبی قابل توجهی همراه هستند که شامل آسیب به بافت‌ها و اندام‌های سالم می‌شود (۴). این عوارض می‌توانند به‌طور چشمگیری کیفیت زندگی بیماران را تحت تأثیر قرار دهند و نیاز به جستجوی راهکارهای درمانی جدید و کم‌خطرتر را اجتناب‌ناپذیر کرده‌اند. در میان داروهای شیمی‌درمانی، اتوپوزاید (ETO) به عنوان یکی از

مقدمه

سرطان سلول‌های کبدی (Hepatocellular carcinoma) HCC به عنوان شایع‌ترین نوع سرطان کبد در سطح جهانی، به یکی از دغدغه‌های عمده‌ی بهداشت عمومی تبدیل شده است (۱). با توجه به میزان بالای مرگ‌ومیر و گزینه‌های درمانی محدود برای این بیماری، چالش‌های بزرگی در مدیریت و درمان آن وجود دارد. درمان‌های موجود برای HCC شامل جراحی، پیوند کبد، و روش‌های مختلف

۱- کارشناسی ارشد، مرکز تحقیقات سلولی مولکولی، گروه بیوشیمی بالینی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز، اهواز، ایران

۲- استادیار، مرکز تحقیقات سلولی مولکولی، گروه بیوشیمی بالینی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز، اهواز، ایران

نویسنده‌ی مسؤول: سمانه صالحی پور باورصاد: استادیار، مرکز تحقیقات سلولی مولکولی، گروه بیوشیمی بالینی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز، اهواز، ایران
Email: s.salehipour@yahoo.com

بنیادی مزانشیمی بر القای آپوپتوز در سلول‌های سرطانی HepG2 می‌پردازد. به طور خاص، تمرکز این تحقیق بر تولید گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) و تأثیر آن‌ها در فرایند مرگ سلولی برنامه‌ریزی شده است. نتایج این مطالعه می‌تواند راهکارهای جدیدی برای بهبود درمان سرطان ارائه دهند و به کاهش عوارض جانبی ناشی از درمان‌های کنونی کمک کنند. همچنین، با بررسی دقیق مکانیزم‌های زیربنایی تأثیرات آگزوزوم‌ها، امکان توسعه استراتژی‌های درمانی مؤثرتر و کم‌خطرتر فراهم خواهد شد. این تحقیق همچنین می‌تواند به درک بهتر از نحوه تأثیرگذاری ROS بر روی مسیرهای سیگنالینگ و آپوپتوز کمک کند و به پیشرفت‌های علمی در زمینه درمان‌های سرطان منجر شود.

روش‌ها

کشت و تیمار سلول‌های HepG2

در این مطالعه، اتوپوزاید از شرکت Sigma (Fetal bovine serum)، FBS از شرکت Gibco، آنتی بیوتیک‌های پنی‌سیلین و استرپتومایسین و محیط کشت DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) از شرکت Bio-Idea خریداری شدند. در این مطالعه، از رده‌ی سلولی HepG2 استفاده شد. این رده‌ی سلولی نوعی از سلول‌های سرطانی کبدی است که به طور گسترده‌ای در مطالعات سرطان کبد به کار می‌رود و ویژگی‌های خاص خود را در پاسخ به درمان‌های مختلف حفظ می‌کند. سلول‌ها به مدت ۲۴ ساعت در شرایط Starvation قرار داده شدند، سپس تیمار سلول‌ها با غلظت‌های ۲۵ و ۵۰ میکرومولار آگزوزوم (۱۳) به مدت ۲۴ ساعت انجام شد. برای انجام آزمایش سه گروه در نظر گرفته شد ۱- گروه شاهد، ۲- گروه تیمار با اتوپوزاید، ۳- گروه تیمار با آگزوزوم.

جداسازی و تمایز سلول‌های بنیادی مشتق از ژله و ارتون (WJ-MSCs)

نمونه‌های بند ناف از مادرانی که زایمان سزارین کامل داشتند، پس از اخذ رضایت کتبی، جمع‌آوری شدند. این نمونه‌ها بلافاصله با محلول PBS شستشو داده شده و ژله و ارتون به قطعات کوچک (حدود ۱-۲ میلی‌متر) تقسیم گردید. این قطعات سپس در محیط کشت DMEM با مکمل ۱۰ درصد سرم جنینی گاوی (FBS) و ۱ درصد پنی‌سیلین/استرپتومایسین کشت داده شدند و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و ۵٪ CO₂ درصد انکوبه گردیدند. برای تمایز استخوانی، سلول‌ها در محیط تمایزی استخوانی شامل DMEM حاوی ۱۰ درصد FBS، ۵۰ میلی‌گرم بر لیتر اسید آسکوربیک، ۱۰ میلی‌مولار β-گلیسرول فسفات و ۱۰۰ نانومولار دکزامتازون به مدت ۲۱ روز کشت داده شدند. محیط تمایزی دو بار در هفته تعویض شد. پس از دوره‌ی

داروهای پرکاربرد شناخته می‌شود. با وجود کارایی آن در درمان سرطان، مشکلاتی نظیر سمیت بالا و آسیب به بافت‌های سالم همچنان وجود دارد. این چالش‌ها به تحقیقات گسترده‌ای برای یافتن روش‌های درمانی جدید با خطرات کمتر و اثربخشی بیشتر منجر شده است (۵، ۶).

در سال‌های اخیر، توجه به آگزوزوم‌ها به عنوان یک رویکرد نوین درمانی در حال افزایش است. آگزوزوم‌ها، که نانوذراتی هستند که از سلول‌ها ترشح می‌شوند، نقش کلیدی در انتقال مولکول‌های زیستی و اطلاعات سلولی دارند. آگزوزوم‌های مشتق شده از سلول‌های بنیادی مزانشیمی (MSCs) به دلیل ویژگی‌های منحصر به فرد خود در تحویل هدفمند مولکول‌ها و کاهش عوارض جانبی، به عنوان یک روش درمانی نوین در درمان سرطان‌ها مطرح شده‌اند (۷، ۸).

این ذرات می‌توانند به طور خاص مولکول‌های زیستی را به سلول‌های هدف انتقال دهند و به کاهش اثرات جانبی درمان‌های سنتی کمک کنند. برای استفاده از آگزوزوم‌ها محدودیت‌هایی نیز وجود دارد. از جمله این محدودیت‌ها می‌توان به پایداری و کیفیت آگزوزوم‌ها در فرایند جداسازی، احتمال پاسخ‌های ایمنی و نیاز به تحقیقات بیشتر برای درک دقیق عملکرد آن‌ها اشاره کرد. یکی از مکانیسم‌های کلیدی که آگزوزوم‌ها می‌توانند از طریق آن اثرات درمانی خود را اعمال کنند، تولید گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) است. ROSها به عنوان مولکول‌های با قابلیت اکسیدکنندگی بالا، قادرند به اجزای مختلف سلول‌ها از جمله DNA، پروتئین‌ها و لیپیدها آسیب برسانند. این آسیب‌ها می‌توانند به فعال‌سازی مسیرهای سیگنالینگ منجر شوند که در نهایت به آپوپتوز یا مرگ سلولی برنامه‌ریزی شده ختم می‌شود (۹، ۱۰).

مسیرهای آپوپتوز شامل مسیر داخلی و خارجی هستند. در مسیر داخلی، تولید ROS منجر به آسیب به میتوکندری‌ها و آزادسازی سیتوکروم c به سیتوپلاسم می‌شود، که این امر به فعال‌سازی کاسپازها و در نتیجه آغاز فرایند آپوپتوز منجر می‌شود. در مسیر خارجی، ROS می‌توانند به فعال‌سازی مسیرهای سیگنالینگ که منجر به فعال شدن گیرنده‌های مرگ و در پی آن آپوپتوز شوند، کمک کنند (۱۱، ۱۲).

افزایش توجه به نقش آگزوزوم‌ها در پزشکی و بیولوژی سلولی، به ویژه در زمینه‌ی درمان سرطان، به دلیل توانایی این ذرات در انتقال مواد زیستی و اطلاعات به طور مستقیم به سلول‌های هدف، چشم‌اندازهای جدیدی را برای درمان‌های هدفمند ارائه می‌دهد. با توجه به پیچیدگی‌های مسیرهای سیگنالینگ و فرایندهای سلولی مربوط به آپوپتوز، بررسی دقیق نقش آگزوزوم‌ها در این فرایندها می‌تواند منجر به توسعه راهکارهای درمانی مؤثرتر و با حداقل عوارض جانبی شود.

این مطالعه به بررسی اثرات آگزوزوم‌های مشتق شده از سلول‌های

تاکارا (ژاپن) از روی RNA انجام شد.

واکنش Real-Time PCR برای سنجش میزان بیان ژن‌های BAX، BCL-2 و GAPDH با استفاده از کیت "RealQ Plus 2x" (Ampliqon, Denmark) Master Mix Green low Rox و با استفاده از دستگاه Applied Biosystems QuantStudio3 انجام شد. پروتکل دستگاه با حرارت دادن محلول RT-PCR تا دمای ۹۵ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۱۵ دقیقه آغاز شد، سپس ۴۰ سیکل فناتوراسیون در دمای ۹۵ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۱۵ ثانیه و اتصال پرایمرها در دمای ۶۰ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه انجام شد. کل زمان اجرای این پروتکل در سیستم ما ۱۱۰ دقیقه به طول انجامید. پرایمرهای مورد استفاده به شرح زیر می‌باشند که از مقالات معتبر توالی گرفته شدند (۱۴) و پس از طی مراحل بلست، از شرکت سیناکلون (ایران) خریداری شدند. از GAPDH به عنوان کنترل داخلی جهت نرمالیزه کردن بیان ژن استفاده شد.

توالی رفت ژن BAX : 5'-
CGCCCTTTTCTACTTTGACA- 3'
توالی برگشت ژن BAX : 5'-
GTGACGAGGCTTGAGGAG- 3'
توالی رفت ژن BCL-2 : 5'-
TGGTCTTCTTTGAGTTCGG- 3'
توالی برگشت ژن BCL-2 : 5'-
GGCTGTACAGTTCACAA- 3'
توالی رفت ژن GAPDH : 5'-
CTTTGGTATCGTGGAAGGAC- 3'
توالی برگشت ژن GAPDH : 5'-
GCAGGGATGATGTTCTGG- 3'

اندازه‌گیری میزان تولید رادیکال‌های آزاد (ROS) در سلول

در این روش، از ماده DCHF (دی‌کلرودی‌هیدروفلورسنتین) برای شناسایی گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) استفاده می‌شود. DCHF توانایی نفوذ به سلول‌های زنده و استری‌زدایی را دارد که توسط آنزیم‌های استراز داخل سلولی کاتالیز می‌شود و منجر به گیر افتادن آن در داخل سلول می‌شود. پس از بازسازی توسط گونه‌های اکسیژن آزاد، DCHF خواص فلورسانس را نشان می‌دهد. فلورسانس ساطع شده توسط این فلوروفور را می‌توان در طول موج تحریک/انتشار ۴۸۵/۵۲۵ نانومتر با استفاده از فلورومتری با صفحه اندازه‌گیری کرد. برای این منظور، سلول‌های HepG2 به تعداد 5×10^4 سلول در هر چاهک قرار داده شدند. پس از ۲۴ ساعت، سلول‌های HepG2 با غلظت‌های ۲۵ و ۵۰ میکرومولار اگزوزوم به مدت ۲۴ ساعت انکوبه شدند. در پایان زمان انکوباسیون، سلول‌ها با PBS شستشو داده شدند و ۲۵ μM از محلول DCHF به هر چاهک اضافه شد و به مدت ۳۰

انکوباسیون، سلول‌ها با ۱۰ درصد فرمالین به مدت ۱۰ دقیقه ثابت و سپس با آلیزارین قرمز (Sigma-Aldrich) به مدت ۴۵ دقیقه در دمای اتاق رنگ‌آمیزی شدند. برای تمایز چربی‌ساز، سلول‌ها در محیط تمایزی چربی‌ساز (DMEM) حاوی ۱۰ درصد FBS، ۱ میکرومولار دکزامتازون، ۱۰ میکرومولار انسولین و ۰/۵ میلی‌مولار ایزوبوتیل متیل زانتین، به مدت ۲۱ روز کشت داده شده و محیط کشت نیز هر ۳ روز تعویض گردید. پس از دوره‌ی انکوباسیون، سلول‌ها با ۰/۵ درصد محلول Oil Red O به مدت ۴۵ دقیقه در دمای اتاق رنگ‌آمیزی شدند. همچنین شناسایی نشانگرهای سطحی سلول‌های بنیادی مزانشیمی با استفاده از آنتی‌بادی‌های FITC-conjugated برای CD44 و CD105 و PE-conjugated برای CD34 و CD45 انجام شد. در نهایت سلول‌ها پس از رنگ‌آمیزی با دستگاه فلوسایتومتری (BD FACSLyric) آنالیز شدند و نتایج توسط نرم‌افزار FlowJo تحلیل گردید.

جداسازی و مشخصه‌یابی اگزوزوم‌ها

برای جداسازی اگزوزوم‌ها، سلول‌ها ابتدا در محیط کشت DMEM حاوی ۱۵ درصد سرم جنینی گاوی (FBS) کشت داده شدند. قبل از استخراج اگزوزوم‌ها، غلظت FBS به ۰ درصد کاهش یافت تا از وجود اگزوزوم‌های خارجی جلوگیری شود. محیط کشت جمع‌آوری شده و سپس به مدت ۱۰ دقیقه در $300 \times g$ سانتریفیوژ شد تا سلول‌ها و دیگر ذرات بزرگ حذف شوند. اگزوزوم‌ها با استفاده از کیت EXOCIB ساخت IB Biotech Co., ایران طبق دستورالعمل سازنده جدا شدند. اگزوزوم‌های جدا شده در ۵۰ تا ۲۰۰ میکرولیتر PBS معلق و در دمای ۸۰- درجه‌ی سانتی‌گراد نگهداری شدند. مقدار پروتئین‌های موجود در اگزوزوم‌ها با استفاده از کیت BCA، ساخت IB Biotech Co., ایران تعیین شد. برای مشخصه‌یابی، اندازه‌ی ذرات اگزوزوم با استفاده از تکنیک پخش نور دینامیکی (DLS) و دستگاه Zetasizer Nano (Malvern Corp., UK) در دمای ۲۳ درجه‌ی سانتی‌گراد اندازه‌گیری شد. همچنین، برای مشاهده ساختار و شکل ظاهری اگزوزوم‌ها از میکروسکوپ الکترونی عبوری (TEM) استفاده شد.

تکنیک Real-Time PCR

به منظور انجام Real-Time PCR، سلول‌های HepG2 تیمار شده پس از اتمام زمان انکوباسیون با استفاده از تریپسین از کف پلیت جمع‌آوری شدند. سپس، محتویات پلیت به مدت ۵ دقیقه با دور RPM ۱۲۰۰۰ در دمای ۴ درجه‌ی سانتی‌گراد سانتریفیوژ گردید. پس از آن، رسوب سلولی برای استخراج کامل RNA با استفاده از کیت شرکت کیاژن (آلمان) طبق دستورالعمل سازنده استخراج شد. میزان OD طول موج ۲۶۰ به ۲۸۰ با استفاده از دستگاه نانودراپ اندازه‌گیری شد و عدد ۲.۱ به دست آمد. سپس سنتز cDNA با استفاده از کیت

لیالات متحده تحلیل شدند. داده‌ها با نرم‌افزار FlowJo™ (Tree Star, Ashland, OR) تحلیل شده و درصد سلول‌های آپوتوتیک و نکروتیک در هر گروه مشخص شد. آزمایشات سه بار تکرار شدند. داده‌های حاصل به صورت (میانگین \pm انحراف معیار) و با استفاده از آزمون ANOVA و تفکیکی Tukey به کمک نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۴ (version 24, IBM Corporation, Armonk, NY) مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. سطح معنی‌داری p value $< 0/05$ در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

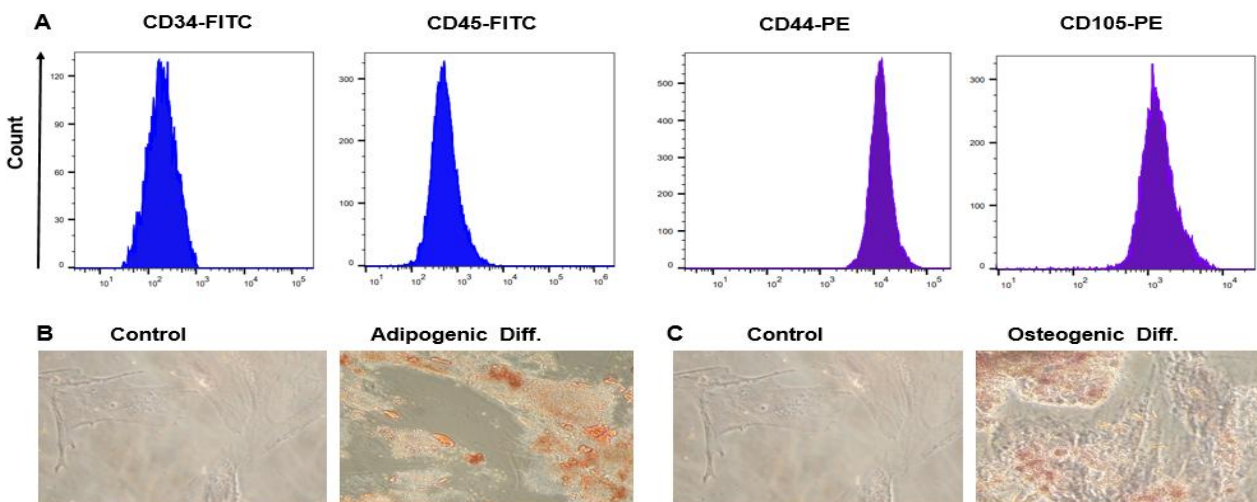
مشخصه‌یابی سلول‌های بنیادی مزانشیمی

برای مشخصه‌یابی سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق شده از ژله وارنون (WJ-MSCs)، بر اساس توصیه‌های انجمن بین‌المللی سلول‌های بنیادی، بیان مارکرهای سطحی و توانایی تمایز آزمایشگاهی آن‌ها ارزیابی شد. WJ-MSCs در پاساژ سوم به صورت لایه‌های تک‌سلولی دوکی شکل و شبیه به فیروبیلاست‌ها در کف فلاسک‌های کشت ظاهر شدند. با استفاده از فلوسایتومتری، نشان داده شد که WJ-MSCs مارکرهای CD44 و CD105 را بیان می‌کنند و فاقد مارکرهای سلول‌های بنیادی خونساز (CD34) و مونوسیت-ماکروفاژ (CD45) هستند، که تأیید می‌کند تنها MSCs جدا شده و سلول‌های اندوتلیالی یا خونساز وجود ندارند (شکل ۱، A). همچنین، پس از ۲۱ روز کشت در محیط تمایز چربی، رنگ‌آمیزی با Oil Red O نشان‌دهنده تشکیل مقادیر بالای قطرات چربی بود که نشان‌دهنده

درجه‌ی سانتی‌گراد قرار داده شد. پس از پایان زمان فوق، فلورسانس در طول موج تحریک/انتشار ۴۸۵/۵۲۵ نانومتر با استفاده از دستگاه فلوریمتر مدل ۶۲۷۰ ساخت کمپانی Jenway انگلیس اندازه‌گیری شد.

بررسی میزان آپوتوز با فلوسایتومتری

برای بررسی میزان آپوتوز، از روش فلوسایتومتری با استفاده از کیت‌های تعیین شده برای شناسایی سلول‌های آپوتوتیک بهره گرفته شد. در این روش، سلول‌های HepG2 به تعداد 5×10^4 سلول در هر چاهک کشت داده شدند و پس از ۲۴ ساعت، سلول‌ها با غلظت‌های ۲۵ و ۵۰ میکرومولار اگزوزوم به مدت ۲۴ ساعت تیمار شدند. برای ارزیابی آپوتوز، از کیت Annexin V-FITC/PI (Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit، ساخت شرکت BioLegend، کالیفرنیا، ایالات متحده استفاده شد. این کیت شامل Annexin V کونژوگه با FITC (فلورسانس سبز) و پروپیدیوم آیویداید (PI) برای تمایز بین سلول‌های زنده، آپوتوتیک اولیه و نکروتیک می‌باشد. Annexin V-FITC به فسفاتیدیل سرین که در مراحل اولیه آپوتوز به سطح خارجی غشاء سلولی منتقل می‌شود، متصل می‌شود. پروپیدیوم آیویداید نیز به DNA سلول‌های نکروتیک یا سلول‌هایی که غشای آنها آسیب دیده باشد، نفوذ کرده و آنها را رنگ‌آمیزی می‌کند. به منظور انجام آزمایش، سلول‌های تیمار شده با اگزوزوم‌ها، پس از شستشو با PBS، به مدت ۱۵ دقیقه در محلول Annexin V-FITC و PI طبق دستورالعمل سازنده انکوبه شدند. سپس سلول‌ها با استفاده از فلوسایتومتری BD FACSLyric، Becton Dickinson، کالیفرنیا،



شکل ۱. ایمونوفلوئورسینس و قابلیت‌های تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی ژله وارنون (WJ-MSC) ارزیابی شدند (A). تحلیل فلوسایتومتری نشان‌دهنده‌ی بیان CD44 و CD105 بود، در حالی که CD34 و CD45 در سطح WJ-MSC کاهش یافته بودند (B). رنگ‌آمیزی Oil Red O تجمع لیپیدهای درون سلولی قرمز رنگ را در آدیپوسیت‌های WJ-MSC در روز ۲۱ نشان داد (C). رنگ‌آمیزی Alizarin Red S رسوب کلسیم را به شکل رنگ قرمز نارنجی شدید در استئوسیت‌های WJ-MSC در روز ۲۱ نشان داد.

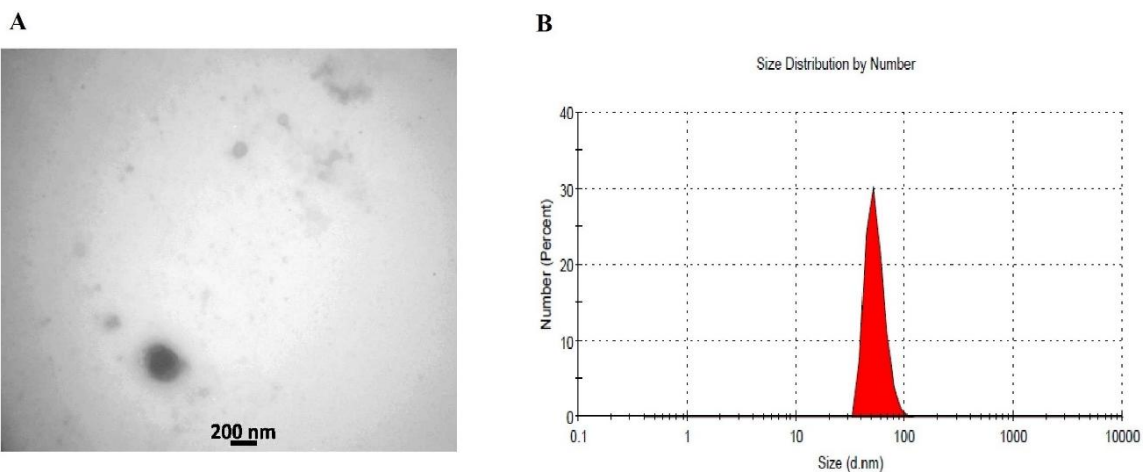
بیان mRNA ژن‌های BAX, BCL-2 در حضور آگزوزوم

به منظور بررسی اثر آگزوزوم‌های مشتق‌شده از سلول‌های بنیادی مزانشیمی بر میزان بیان ژن‌های BAX و BCL-2، سلول‌های HepG2 با غلظت‌های مختلف آگزوزوم (۲۵ و ۵۰ میکرومولار) به مدت ۲۴ ساعت تیمار شدند. سپس میزان بیان mRNA ژن‌های BAX و BCL-2 با استفاده از تکنیک Real-Time PCR اندازه‌گیری شد. نتایج نشان داد که تیمار با آگزوزوم‌ها منجر به افزایش قابل توجه در بیان ژن BAX و کاهش معنی‌دار در بیان ژن BCL-2 نسبت به گروه شاهد شد ($P > 0.05$). (شکل ۳، A, B).

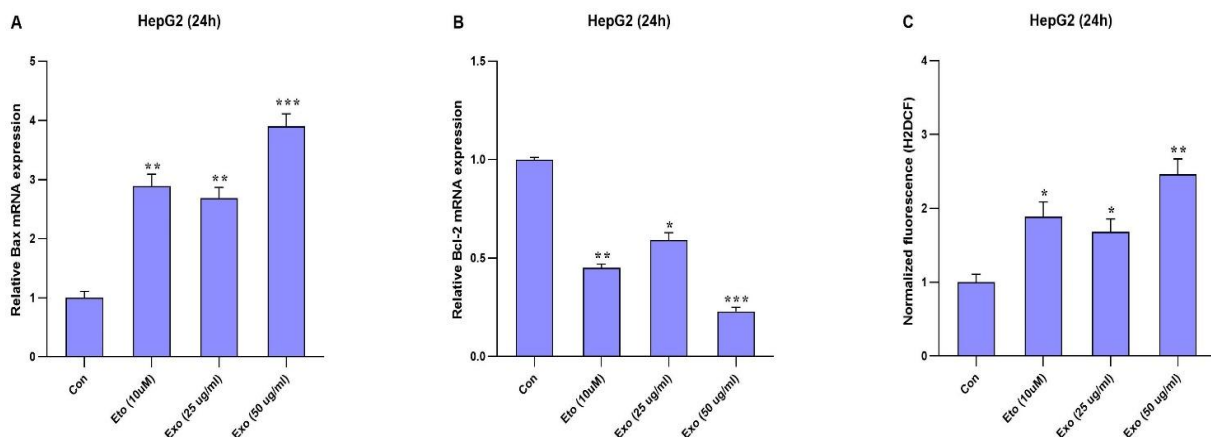
توانایی تمایز WJ-MSCs است. علاوه بر این، تمایز سلولی به استئوبلاست و سپس رنگ‌آمیزی با Alizarin Red به رسوب کلسیم شدید منجر شد که نشان‌دهنده تمایز استئوژنیک بود (شکل ۱، B).

مشخصه‌یابی آگزوزوم‌ها

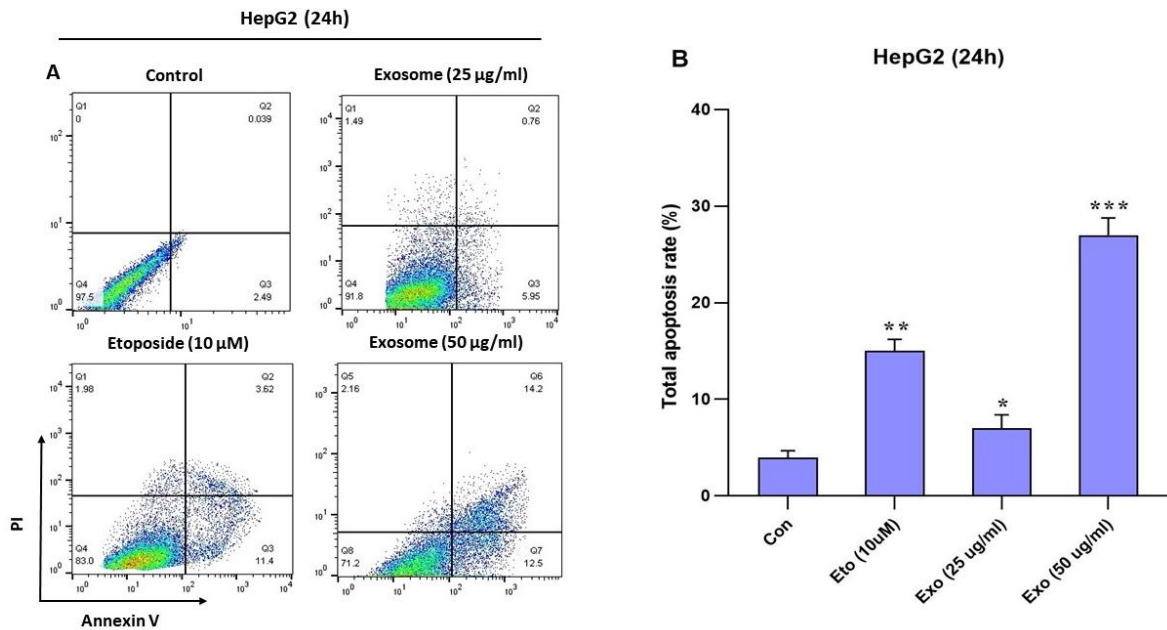
با استفاده از میکروسکوپ الکترونی عبوری (TEM)، شکل کروی آگزوزوم‌های ما با قطر ۵۰ تا ۲۰۰ نانومتر مشخص شد. همچنین توزیع اندازه آگزوزوم‌های جداشده با دستگاه زتا سایزر اندازه‌گیری شد. حدود ۸۰ درصد از آگزوزوم‌ها دارای قطری در حدود ۷۳ نانومتر بودند (شکل ۲، A, B).



شکل ۲. شناسایی آگزوزوم‌ها انجام شد (A). از میکروسکوپ الکترونی عبوری (TEM) برای مشاهده شکل و اندازه‌ی این وزیکول‌ها استفاده شد (B). اندازه‌گیری سایز آگزوزوم‌ها با استفاده از دستگاه Malvern Zeta Sizer نشان داد که تا ۸۵ درصد از کل آگزوزوم‌ها دارای قطر ۷۳ نانومتر بودند.



شکل ۳. بیان mRNA ژن‌های Bax و Bcl2 در حضور آگزوزوم در رده سلولی HepG2: نتایج حاصل از سه بار تکرار بصورت میانگین \pm انحراف معیار) و تغییرات بیان ژن‌ها در زمان ۲۴ ساعت نسبت به گروه شاهد گزارش شده است. مطابق شکل بیان ژن Bax در غلظت ۲۵ ug/ml، ۵۰ آگزوزوم نسب به گروه شاهد بصورت معنی‌داری افزایش پیدا کرد (گروه شاهد $P < 0.01$ ، $P < 0.001$). بیان ژن Bcl2 در غلظت ۲۵ ug/ml و ۵۰ آگزوزوم نسبت به گروه شاهد، کاهش بیان معنی‌داری پیدا کرده است ($P < 0.05$ ، $P < 0.01$ ، $P < 0.001$). شکل (C): میزان تولید ROS در غلظت ۲۵ ug/ml، ۵۰ آگزوزوم نسب به گروه شاهد بصورت معنی‌داری افزایش پیدا کرد (گروه شاهد $P < 0.05$ ، $P < 0.01$). سطح معنی‌داری $P < 0.05$ در نظر گرفته شد. از ژن GAPDH به عنوان ژن مرجع استفاده شده است.



شکل ۴. اثرات آگروزوم‌های مشتق شده از سلول‌های بنیادی مزانشیمی (MSC) بر آپوپتوز سلول‌های سرطانی Hep-G2 با استفاده از فلوسایتومتری (A). نمودار فلوسایتومتری نشان‌دهنده درصد سلول‌های آپوپتوتیک پس از تیمار با آگروزوم‌ها در مقایسه با گروه شاهد است. تیمار با آگروزوم‌ها در دو غلظت ۲۵ و ۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر انجام شد (B). نمودار ستونی مقایسه درصد آپوپتوز در گروه‌های مختلف. تیمار با آگروزوم‌ها به‌طور معنی‌داری باعث افزایش آپوپتوز سلول‌های Hep-G2 شد (گروه شاهد: $P < 0/05$; $P < 0/01$; $P < 0/001$).

بحث

سرطان کبدی (HCC) به عنوان یکی از شایع‌ترین و کشنده‌ترین انواع سرطان‌های کبد در سطح جهانی شناخته می‌شود و درمان آن همچنان یکی از چالش‌های بزرگ در پزشکی است (۱۵، ۱۶). روش‌های درمانی متداول نظیر شیمی‌درمانی و پرتودرمانی، هرچند که ممکن است در کاهش تومورها مؤثر باشند، اما با عوارض جانبی قابل توجهی همراه هستند که می‌تواند به آسیب بافت‌های سالم و افزایش خطرات جدی منجر شود (۱۷، ۱۸). به همین دلیل، جستجو برای رویکردهای درمانی جدید و کم‌خطرتر اهمیت زیادی پیدا کرده است. یکی از این رویکردها، استفاده از آگروزوم‌ها به عنوان نانوذرات زیستی است که به تازگی توجه زیادی را به خود جلب کرده‌اند.

در مطالعه‌ی حاضر، تأثیر آگروزوم‌های مشتق شده از سلول‌های بنیادی مزانشیمی بر بیان ژن‌های BAX و BCL-2 و همچنین تولید رادیکال‌های آزاد (ROS) در سلول‌های HepG2 بررسی شد. نتایج نشان داد که تیمار سلول‌های HepG2 با آگروزوم‌ها منجر به افزایش معنی‌دار بیان ژن BAX و کاهش معنی‌دار بیان ژن BCL-2 شد. این تغییرات نشان‌دهنده‌ی تأثیر مثبت آگروزوم‌ها در تحریک آپوپتوز است، به ویژه با توجه به نقش مهم این ژن‌ها در تنظیم مرگ سلولی برنامه‌ریزی شده. ژن BAX به عنوان یک عامل پیش‌برنده‌ی آپوپتوز و ژن BCL-2 به عنوان یک عامل ضدآپوپتوز عمل می‌کند (۱۹). افزایش

میزان تولید رادیکال‌های آزاد (ROS)

به منظور بررسی اثر آگروزوم‌های مشتق شده از سلول‌های بنیادی مزانشیمی بر میزان تولید رادیکال‌های آزاد (ROS) در سلول‌های HepG2، سلول‌ها با دوزهای مختلف آگروزوم (۲۵ و ۵۰ میکرومولار) به مدت ۲۴ ساعت تیمار شدند. سپس میزان تولید ROS درون سلولی اندازه‌گیری شد. نتایج نشان داد که تیمار با آگروزوم‌ها منجر به افزایش معنی‌دار در تولید ROS درون سلولی نسبت به گروه کنترل شد ($P < 0/05$). این افزایش در تولید ROS که به عنوان یک مکانیزم القای آپوپتوز برای نابودی سلول‌های سرطانی عمل می‌کند ($P < 0/05$) (شکل ۳، C).

میزان آپوپتوز سلول‌های HepG2

میزان آپوپتوز در سلول‌های HepG2 پس از تیمار با آگروزوم‌ها با استفاده از روش فلوسایتومتری اندازه‌گیری شد. سلول‌ها با استفاده از رنگ‌آمیزی با Annexin V و Propidium Iodide (PI) جهت شناسایی سلول‌های آپوپتوتیک و نکروتیک، و سپس با استفاده از دستگاه فلوسایتومتر مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. نتایج نشان داد که تیمار با دوزهای مختلف آگروزوم‌ها باعث افزایش معنی‌دار درصد سلول‌های آپوپتوتیک نسبت به گروه کنترل شد ($P < 0/05$). این یافته‌ها به وضوح نشان‌دهنده‌ی تأثیر مثبت آگروزوم‌ها در القای مرگ سلولی برنامه‌ریزی شده در سلول‌های سرطانی است. شد ($P < 0/05$) (شکل ۴، A، B).

استرس‌های اکسیداتیو و تحریک مرگ سلولی نقش دارند. افزایش تولید ROS توسط آگزوزوم‌ها می‌تواند باعث فعال‌سازی این مسیرها و در نتیجه افزایش آپوپتوز در سلول‌های سرطانی شود (۲۳، ۲۴).

در مقایسه با سایر روش‌های درمانی، استفاده از آگزوزوم‌ها به عنوان حامل‌های هدفمند مولکول‌های زیستی، مزایای زیادی دارد. به عنوان مثال، آگزوزوم‌ها قادر به انتقال مولکول‌های زیستی به طور دقیق به سلول‌های هدف هستند و می‌توانند به طور خاص در مناطق آسیب‌دیده تجمع یابند. این ویژگی‌ها می‌توانند به کاهش عوارض جانبی درمان‌های سستی و افزایش کارایی درمان‌های ضدسرطان کمک کنند (۲۵).

نتیجه‌گیری

در مجموع، نتایج این مطالعه بر پتانسیل بالای آگزوزوم‌ها به عنوان یک روش درمانی نوین برای سرطان کبدی تأکید می‌کند. با این حال، برای تأیید این نتایج و بررسی مکانیسم‌های دقیق‌تر، مطالعات بیشتری در مقیاس‌های بزرگتر و بر روی مدل‌های حیوانی لازم است. این تحقیقات می‌توانند به توسعه‌ی استراتژی‌های درمانی کم‌خطرتر و مؤثرتر کمک کنند و به پیشرفت‌های جدیدی در درمان سرطان کبدی منجر شوند.

تشکر و قدردانی

نتایج گزارش شده در این مطالعه، حاصل طرح تحقیقاتی ثبت شده در دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز با شماره طرح -CMRC 0225 می‌باشند. تمامی امور مربوط به اجرای این مطالعه، در گروه بیوشیمی و مرکز تحقیقات سلولی ملکولی دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز انجام شده است. از اساتید محترم و کارشناسان دلسوزی که در انجام این طرح همکاری نمودند کمال تشکر را داریم.

نسبی BAX و کاهش BCL-2 به وضوح به تعادل به نفع مرگ سلولی برنامه‌ریزی‌شده اشاره دارد که می‌تواند به نابودی سلول‌های سرطانی کمک کند (۲۰).

نتایج این مطالعه همچنین نشان داد که آگزوزوم‌ها به طور معنی‌داری تولید ROS درون سلولی را افزایش می‌دهند. تولید ROS به عنوان یک مکانیزم کلیدی در القای آپوپتوز و آسیب به سلول‌های سرطانی شناخته می‌شود. افزایش سطح ROS می‌تواند به آسیب DNA، اختلال در عملکرد میتوکندری و در نهایت مرگ سلولی منجر شود. این یافته‌ها به وضوح نشان می‌دهند که آگزوزوم‌ها از طریق افزایش تولید ROS می‌توانند به عنوان یک استراتژی مؤثر در درمان سرطان عمل کنند.

مطالعات مشابه در این زمینه، نظیر تحقیقاتی که به بررسی اثرات آگزوزوم‌های مشتق شده از سلول‌های بنیادی بر روی انواع دیگر سلول‌های سرطانی پرداخته‌اند، نتایج مشابهی را گزارش کرده‌اند. برای مثال، پژوهش‌های اخیر نشان داده‌اند که آگزوزوم‌ها می‌توانند با انتقال miRNAهای خاص به سلول‌های هدف، مسیرهای سیگنالینگ مرتبط با آپوپتوز را تحت تأثیر قرار دهند و منجر به تحریک مرگ سلولی در سرطان‌های مختلف شوند (۲۱). همچنین، سایر مطالعات نشان داده‌اند که آگزوزوم‌ها می‌توانند به طور مستقیم تولید ROS را افزایش دهند و به عنوان یک روش غیرمستقیم برای القای مرگ سلولی عمل کنند (۹، ۲۲).

در این مطالعه، بررسی مسیرهای سیگنالینگ مرتبط با اثرات آگزوزوم‌ها می‌تواند به درک بهتر مکانیسم‌های زیربنایی این تأثیرات کمک کند. به طور خاص، مسیرهای سیگنالینگ مرتبط با تولید ROS و آپوپتوز شامل مسیرهای میتوکندریایی، مسیرهای سیگنالینگ JNK و p38 MAPK هستند. این مسیرها در تنظیم پاسخ‌های سلولی به

References

- Arzumanian VA, Kiseleva OI, Poverennaya EV. The curious case of the HepG2 cell line: 40 years of expertise. *Int J Mol Sci* 2021; 22(23): 13135.
- Liang W-F, Gong Y-X, Li H-F, Sun F-L, Li W-L, Chen D-q, et al. Curcumin activates ROS signaling to promote pyroptosis in hepatocellular carcinoma HepG2 cells. *In Vivo* 2021; 35(1): 249-57.
- Kim SM, Ha SE, Lee HJ, Rampogu S, Vetrivel P, Kim HH, et al. Sinensetin induces autophagic cell death through p53-related AMPK/mTOR signaling in hepatocellular carcinoma HepG2 cells. *Nutrients* 2020; 12(8): 2462.
- Badroon NA, Abdul Majid N, Alshawsh MA. Antiproliferative and apoptotic effects of cardamonin against hepatocellular carcinoma HepG2 cells. *Nutrients* 2020; 12(6): 1757.
- Aslani F, Afarin R, Madiseh ND, Nasab HB, Monjezi S, Igder S, et al. Potentiation of apoptotic effect of combination of etoposide and quercetin on HepG2 liver cancer cells. *Hepatitis Monthly* 2023; 23(1): 2.
- Gholami A, Emadi F, Nazem M, Aghayi R, Khalvati B, Amini A, et al. Expression of key apoptotic genes in hepatocellular carcinoma cell line treated with etoposide-loaded graphene oxide. *Journal of Drug Delivery Science and Technology* 2020; 57: 101725.
- Afarin R, Aslani F, Asadizade S, Asl BJ, Gahrooie MM, Shakerian E, et al. The effect of lipopolysaccharide-stimulated adipose-derived mesenchymal stem cells on NAFLD treatment in high-fat diet-fed rats. *Iran J Pharm Res* 2023; 22(1): e134807.
- Tang Z, He J, Zou J, Yu S, Sun X, Qin L. Cisplatin-resistant HepG2 cell-derived exosomes transfer cisplatin resistance to cisplatin-sensitive cells in HCC. *PeerJ* 2021; 9: e11200.
- Li X, Wang Y, Cai Z, Zhou Q, Li L, Fu P. Exosomes from human umbilical cord mesenchymal stem cells

- inhibit ROS production and cell apoptosis in human articular chondrocytes via the miR-100-5p/NOX4 axis. *Cell Biol Int* 2021; 45(10): 2096-106.
10. Liu B, Hu D, Zhou Y, Yu Y, Shen L, Long C, et al. Exosomes released by human umbilical cord mesenchymal stem cells protect against renal interstitial fibrosis through ROS-mediated P38MAPK/ERK signaling pathway. *Am J Transl Res* 2020; 12(9): 4998- 5014.
 11. Wang T, Ma M, Chen C, Yang X, Qian Y. Three widely used pesticides and their mixtures induced cytotoxicity and apoptosis through the ROS-related caspase pathway in HepG2 cells. *Food Chem Toxicol* 2021; 152: 112162.
 12. Wang J-R, Li T-Z, Wang C, Li S-M, Luo Y-H, Piao X-J, et al. Liquiritin inhibits proliferation and induces apoptosis in HepG2 hepatocellular carcinoma cells via the ROS-mediated MAPK/AKT/NF- κ B signaling pathway. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 2020; 393(10): 1987-99.
 13. Rashidi M, Matour E, Monjezi S, Zadeh SA, Shakerian E, Sabahy S, et al. Effects of exosomes of mesenchymal stem cells on cholesterol-induced hepatic fibrogenesis. *Iran J Basic Med Sci* 2023; 26(6): 695-700.
 14. Masoudi E, Soleimani M, Zarinfard G, Homayoun M, Bakhtiari M. The effects of chitosan-loaded JQ1 nanoparticles on OVCAR-3 cell cycle and apoptosis-related gene expression. *Res Pharm Sci* 2024; 19(1): 53-63.
 15. Yang Y, Yu S, Lv C, Tian Y. NETosis in tumour microenvironment of liver: from primary to metastatic hepatic carcinoma. *Ageing Res Rev* 2024; 97: 102297.
 16. Shi X, Xing H, Yang X, Li F, Yao S, Zhang H, et al. Fibroblast imaging of hepatic carcinoma with 68 Ga-FAPI-04 PET/CT: a pilot study in patients with suspected hepatic nodules. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2021; 48(1): 196-203.
 17. Chen Z, Xie H, Hu M, Huang T, Hu Y, Sang N, et al. Recent progress in treatment of hepatocellular carcinoma. *Am J Cancer Res* 2020; 10(9): 2993-3036.
 18. Brown ZJ, Tsilimigras DI, Ruff SM, Mohseni A, Kamel IR, Cloyd JM, et al. Management of hepatocellular carcinoma: a review. *JAMA Surg* 2023; 158(4): 410-20.
 19. Diepstraten ST, Young S, La Marca JE, Wang Z, Kluck RM, Strasser A, et al. Lymphoma cells lacking pro-apoptotic BAX are highly resistant to BH3-mimetics targeting pro-survival MCL-1 but retain sensitivity to conventional DNA-damaging drugs. *Cell Death Differ* 2023; 30(4): 1005-17.
 20. Robert A, Pujals A, Favre L, Debernardi J, Wiels J. The BCL-2 family protein inhibitor ABT-737 as an additional tool for the treatment of EBV-associated post-transplant lymphoproliferative disorders. *Mol Oncol* 2020; 14(10): 2520-32.
 21. Zhang W, Wang T, Xue Y, Zhan B, Lai Z, Huang W, et al. Research progress of extracellular vesicles and exosomes derived from mesenchymal stem cells in the treatment of oxidative stress-related diseases. *Front Immunol* 2023; 14: 1238789.
 22. He R, Jiang Y, Shi Y, Liang J, Zhao L. Curcumin-laden exosomes target ischemic brain tissue and alleviate cerebral ischemia-reperfusion injury by inhibiting ROS-mediated mitochondrial apoptosis. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl* 2020; 117: 111314.
 23. Yue J, López JM. Understanding MAPK signaling pathways in apoptosis. *Int J Mol Sci* 2020; 21(7): 2346.
 24. Dhanasekaran DN, Reddy EP. JNK signaling in apoptosis. *Oncogene* 2008; 27(48): 6245-51.
 25. Gong Y, Kong T, Ren X, Chen J, Lin S, Zhang Y, et al. Exosome-mediated apoptosis pathway during WSSV infection in crustacean mud crab. *PLoS Pathog* 2020; 16(5): e1008366.

Induction of Apoptosis in HepG2 Cancer Cells by Mesenchymal Stem Cell-Derived Exosomes via Reactive Oxygen Species Production

Sahar Saki¹, Mahdi Hatami², Fatemeh Ghaffari¹, Azam Khedri²,
Samaneh Salehipour bavarsad²

Original Article

Abstract

Background: Hepatocellular carcinoma (HCC) is the most common type of liver cancer worldwide. Current treatment methods, such as chemotherapy and radiation therapy, can cause damage to patients' organs and occasionally lead to death. Etoposide (ETO), a widely used chemotherapeutic agent, has similar issues. Exosomes derived from mesenchymal stem cells represent a novel approach that may reduce side effects by targeted delivery of bioactive molecules to cancer cells.

Methods: HepG2 cancer cells were first cultured in a DMEM medium containing 10% fetal bovine serum (FBS) until reaching appropriate confluence. Then, the HepG2 cells were treated with 25 and 50 μ M concentrations of exosomes for 24 hours. Subsequently, the expression levels of BAX and BCL-2 genes, ROS levels, and the apoptosis rate were measured.

Findings: Treatment of HepG2 cells with exosomes derived from mesenchymal stem cells led to an increase in BAX gene expression and a decrease in BCL-2 gene expression. Additionally, the levels of reactive oxygen species (ROS) and apoptosis rates were significantly higher compared to the control group, indicating a positive effect of exosomes in inducing programmed cell death.

Conclusion: Exosomes derived from MSCs were able to induce apoptosis in HepG2 cancer cells through the production of ROS. These findings suggest that exosomes can be utilized as a promising novel therapeutic approach in cancer treatment and offer strategies for developing safer and more effective cancer therapies.

Keywords: Exosomes; Reactive oxygen species; Hepatocellular carcinoma (HCC); Apoptosis

Citation: Saki S, Hatami M, Ghaffari F, Khedri A, Salehipour bavarsad S. **Induction of Apoptosis in HepG2 Cancer Cells by Mesenchymal Stem Cell-Derived Exosomes via Reactive Oxygen Species Production.** J Isfahan Med Sch 2025; 42(799): 1206-14.

1- MSc, Cellular and Molecular Research Center, Department of Clinical Biochemistry, School of Medicine, Ahvaz Jundishapur University of Medical Sciences, Ahvaz, Iran

2- Assistant Professor, Cellular and Molecular Research Center, Department of Clinical Biochemistry, School of Medicine, Ahvaz Jundishapur University of Medical Sciences, Ahvaz, Iran

Corresponding Author: Samaneh Salehipour bavarsad, Assistant Professor, Cellular and Molecular Research Center, Department of Clinical Biochemistry, School of Medicine, Ahvaz Jundishapur University of Medical Sciences, Ahvaz, Iran;
Email: s.salehipour@yahoo.com