

## جداسازی و بررسی ویژگی‌های بنیادین سلول‌های سرطانی با نشانگر سطحی CD44<sup>+</sup> از رده‌ی سلولی سرطانی A2780

وحیده کیوانی<sup>۱</sup>، سید رضا کاظمی‌نژاد<sup>۲</sup>، محمدرضا عباس‌زادگان<sup>۳</sup>

### مقاله پژوهشی

### چکیده

**مقدمه:** سرطان تخمدان، پنجمین علت مرگ ناشی از سرطان در بین زنان جهان می‌باشد. سرطان تخمدان یک بیماری هتروژن است که از لحاظ ژنومیک و هیستوپاتولوژیک، بسیار متنوع می‌باشد. علاوه بر درمان‌های معمول که برای سرطان تخمدان انجام می‌شود، عود مجدد این بیماری مشاهده می‌شود که به علت عدم ریشه‌کنی کامل نوع خاصی از سلول‌های سرطانی می‌باشد. این سلول‌ها که به نام سلول‌های بنیادی سرطانی شناخته می‌شوند، دارای خواص بنیادین متفاوتی می‌باشند.

**روش‌ها:** در مطالعه‌ی حاضر، سلول‌های بنیادی سرطانی با نشانگر سطحی CD44 از رده‌ی سلولی سرطانی A2780 تخمدان جداسازی شد و خواص مهاجرت، رشد، تمایز و بیان نشانگر بنیادی Aldehyde dehydrogenase 1 (ALDH1) در سلول‌های CD44<sup>+</sup> جدا شده در مقایسه با سلول‌های CD44<sup>-</sup> مورد بررسی قرار گرفت. میزان بیان نشانگر سطحی CD44 در این رده‌ی سلولی، با تکنیک فلوسایتومتری مورد ارزیابی قرار گرفت. سپس، جداسازی این سلول‌ها با استفاده از تکنیک Magnetic-activated cell sorting (MACS) و میکروبیدهای اختصاصی انجام شد و برای تأیید صحت جداسازی، از تکنیک فلوسایتومتری استفاده گردید. میزان مهاجرت، رشد، درصد تمایز و میزان بیان نشانگر ALDH1 در سلول‌های CD44<sup>+</sup> با سلول‌های CD44<sup>-</sup> مورد مقایسه قرار گرفت.

**یافته‌ها:** سلول‌های بنیادی سرطان CD44<sup>+</sup> در مقایسه با سلول‌های CD44<sup>-</sup>، دارای توانایی مهاجرت، تمایز به سلول‌های اپی‌تلیال در محیط کشت حاوی سرم، میزان رشد سریع‌تر و بیان بالاتر نشانگر ALDH1 بودند.

**نتیجه‌گیری:** جداسازی سلول‌های بنیادی سرطانی برای درمان هدفمند سرطان تخمدان بسیار حایز اهمیت است و می‌تواند از عود مجدد و تکثیر مجدد تومور جلوگیری کند.

**واژگان کلیدی:** نئوپلاسم تخمدان؛ سلول بنیادی نئوپلاستیک؛ عود مجدد؛ نشانگر CD44

**ارجاع:** کیوانی وحیده، کاظمی‌نژاد سید رضا، عباس‌زادگان محمدرضا. جداسازی و بررسی ویژگی‌های بنیادین سلول‌های بنیادی سرطانی با نشانگر سطحی CD44<sup>+</sup> از رده‌ی سلولی سرطانی A2780. مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۴۰۰؛ ۳۹ (۶۲۹): ۴۴۲-۴۳۴.

### مقدمه

سرطان تخمدان، یکی از رایج‌ترین سرطان‌های هتروژن با خواص ژنومیک و هیستوپاتولوژیک بسیار متنوع می‌باشد (۱). یکی از رایج‌ترین انواع سرطان تخمدان، سرطان تخمدان اپی‌تلیال می‌باشد که حدود ۹۰ درصد موارد سرطان تخمدان را در بر می‌گیرد و شامل زیرگروه‌های متفاوتی نظیر سروس، اندومترئید و موسینوس می‌باشد (۲). سرطان تخمدان در حدود ۲۳۹۰۰۰ مورد جدید ابتلا و ۱۵۲۰۰۰ مرگ سالیانه در جهان را به خود اختصاص داده است. بالاترین میزان

مشاهده‌ی این بیماری در اروپای مرکزی و شرقی گزارش شده است (۳). این بیماری به طور معمول در مراحل نهایی تشخیص داده می‌شود و در این زمان، نرخ بقای ۵ ساله‌ی بیماران تنها ۲۹ درصد می‌باشد، اما در بیمارانی که در مراحل ابتدایی تشخیص داده می‌شوند، نرخ بقای ۵ ساله در حدود ۹۲ درصد است (۴). در کنار شیمی‌درمانی‌های معمول بر پایه‌ی داروی پلاتین برای درمان سرطان تخمدان، یک سری درمان‌های جدید نیز به کار گرفته می‌شوند (۵-۸).

- ۱- دانشجوی دکتری زیست‌شناسی سلولی مولکولی - ژنتیک، گروه بیولوژی، دانشکده‌ی علوم، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران
  - ۲- دانشیار، گروه زیست‌شناسی، دانشکده‌ی علوم، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران
  - ۳- استاد، گروه ژنتیک پزشکی، دانشکده‌ی علوم و مرکز تحقیقات ژنتیک پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران
- نویسنده‌ی مسؤو: سید رضا کاظمی‌نژاد؛ دانشیار، گروه زیست‌شناسی، دانشکده‌ی علوم، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران

Email: kazemi\_reza@scu.ac.ir

را ایفا کند. به همین دلیل، به منظور هدف قرار دادن اختصاصی سلول‌های پیش‌گفته به طور مستقیم در مطالعات آینده، این سلول‌ها با استفاده از نشانگر سطح CD44 از رده‌ی سلولی A2780 تخمدان جداسازی و خواص بیان ژن 1 Aldehyde dehydrogenase (ALDH1)، رشد، تمایز و مهاجرت سلولی در سلول‌های جدا شده مورد بررسی قرار گرفت.

### روش‌ها

**کشت سلولی:** رده‌ی سلولی A2780 تخمدان، از مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی پژوهشکده‌ی بوعلی مشهد (مشهد، ایران) خریداری شد. برای تأیید صحت این رده‌ی سلولی، Short tandem repeat analysis (STR profiling) انجام گردید. رده‌ی سلولی A2780 در محیط کشت Roswell Park Memorial Institute-1640 (RPMI-1640) حاوی سرم ۱۰ درصد (Gibco, UK)، ۱۰۰ واحد/میلی لیتر پنی سیلین-استرپتومایسین (Gibco, UK) در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد، رطوبت ۹۵ درصد و CO<sub>2</sub> ۵ درصد در فلاسک کشت داده شد. پاساژ سلولی بعد از رسیدن سلول‌ها به پوشش سلولی ۸۰-۷۰ درصد با استفاده از محلول تریپسین ۰/۲۵ درصد (Gibco, UK) با Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) ۱ میلی‌مولار انجام گردید.

### واکوی بیان نشانگر CD44 با استفاده از Flow cytometry

**(FCM):** جهت بررسی میزان بیان نشانگر سطحی CD44 در رده‌ی سلولی A2780، روش فلوسایتومتری انجام گردید. بدین منظور، بعد از رسیدن سلول‌ها به پوشش سلولی ۸۰ درصد، سلول‌ها با Phosphate buffered saline (PBS) ساخته شده شستشو داده شد و به جهت تک سلولی شدن تریپسینه شدند. تک سلول‌ها به تعداد حداقل ۱۰<sup>۵</sup>/۱۰<sup>۰</sup> میکرولیتر در بافر PBS حاوی سرم ۵ درصد حل شد و با ۱۰ میکرولیتر آنتی‌بادی CD44 کونژوگه شده با رنگ Fluorescein isothiocyanate (FITC) (MiltenyiBiotech, Germany) طبق دستورالعمل مخلوط گردید و به مدت ۱۵-۱۰ دقیقه در تاریکی و دمای ۴ درجه‌ی سانتی‌گراد انکوبه شد. سلول‌های نشان‌دار شده توسط دستگاه FACS Calibur flow cytometer (BD Biosciences, USA) واکوی و نتایج با نرم‌افزار CXP مورد بررسی قرار گرفت.

### جداسازی سلول‌های بنیادی سرطانی با تکنیک MACS و تأیید

**صحت جداسازی:** بعد از محاسبه‌ی دقیق میزان بیان نشانگر CD44 در این رده‌ی سلولی، کشت سلولی در حجم بالا انجام شد و جداسازی سلول‌ها با تکنیک MACS با استفاده از میکروبیدهای اختصاصی کونژوگه شده با آنتی‌بادی CD44 انجام شد. برای این

درمان‌های معمول و سستی سرطان تخمدان همواره با عود مجدد تومور در بیماران همراه است که این عود، به دلیل عدم توانایی ریشه‌کنی کامل نوع خاصی از سلول‌های سرطانی می‌باشد. این سلول‌ها که به نام سلول‌های بنیادی سرطانی (Cancer stem cells یا CSC) شناخته می‌شوند، دارای ویژگی‌های بنیادی می‌باشند و قادرند توده‌ی سرطانی را بار دیگر ایجاد کنند. همچنین، این سلول‌ها دارای توانایی خودنوزایی، تومورزایی و مقاومت به شیمی درمانی هستند (۹).

عمده‌ی این ویژگی‌ها، به دلیل جهش‌هایی است که به سلول‌ها اجازه داده است تا ویژگی‌های شبه بنیادی سرطانی پیدا کنند. CSCs و سلول‌های بنیادی طبیعی یا (Non-stem cells یا NSCs) دارای شماری ویژگی‌های مشترک نظیر افزایش توانایی سم‌زدایی (۱۰) توسط تغییر در ترانسپورترهای دارویی (۱۱) و توانایی ترمیم DNA هستند (۱۲). از طرفی، هر دوی این سلول‌ها، دارای مسیرهای پیام‌رسانی مشترکی مانند Wnt, Notch و Hedgehog می‌باشند. علاوه بر این، برخی ویژگی‌های متفاوت نیز بین این سلول‌ها وجود دارد. برای مثال، NSCها دارای تعادل هموستاتیک، توانایی تمایز و خودنوزایی بسیار تنظیم شده و دارای کاربوتایپ طبیعی هستند. در حالی که CSCها این ویژگی‌ها را از دست داده‌اند (۱۳).

نشانگرهای سطح سلولی خاصی نظیر CD133, CD44 و CD54 برای شناسایی و جداسازی CSCها مورد استفاده قرار می‌گیرند (۱۴). CD44، یک گلیکوپروتئین متصل به هیالورونیک اسید (HA) در سطح سلول است که به طور تقریبی در تمام تومورهای با منشأ اپی‌تلیال تا حد زیادی بیان می‌شود و نقش مهمی در شروع و متاستاز تومور دارد. CD44 یک نشانگر مهم برای سلول‌های بنیادی سرطانی بسیاری از بدخیمی‌های جامد است. علاوه بر این، تعامل هیالورونیک اسید و CD44، باعث پیشرفت مسیرهای Epidermal growth factor receptor (EGFR) می‌شود. در نتیجه، منجر به رشد سلول‌های توموری، مهاجرت سلول‌های توموری و مقاومت به شیمی‌درمانی در سرطان‌های جامد می‌شود. شواهد جمع‌آوری شده، نشان می‌دهد که مسیرهای اصلی سیگنالینگ HA-CD44 شامل یک نوع خاصی از ایزوفرم‌های CD44 است (۱۵).

جداسازی CSCها با استفاده از تکنیک‌های Magnetic-activated cell sorting (MACS) یا Fluorescence-activated cell sorting (FACS) انجام می‌شود. فرض بر این است که CSC، می‌تواند یکی از دلایل عمده‌ی بدخیمی، رشد و تومورزایی در سرطان تخمدان باشد. به همین دلیل، جداسازی دقیق این سلول‌ها با روش‌های اختصاصی و بدون عوارض جانبی، می‌تواند در جهت درمان هدفمند این سلول‌ها و جلوگیری از عود مجدد سرطان تخمدان نقش به‌سزایی

ستونی آن ترسیم شد.

**سنجش تکثیر سلولی:** سلول‌های CD44<sup>+</sup> و CD44<sup>-</sup> تازه جدا شده به تعداد ۱۰۰۰ سلول در هر چاهک پلیت ۹۶ خانه در محیط کشت RPMI-1640 برای مشاهده و بررسی میزان رشد و تکثیر سلولی در انکوباتور قرار گرفتند. به مدت ۵ روز، هر روز از سلول‌ها عکس گرفته شد و میزان جذب نوری سلول‌ها با استفاده از روش ۳-(۴،۵)-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-2H--۳ (MTT) tetrazolium bromide (Sigma, Germany) دستگاه Enzyme-linked immunosorbent assay reader (ELISA reader) مدل Biotech LX800 اندازه‌گیری شد و منحنی رشد سلولی بر طبق داده‌های به دست آمده ترسیم گردید.

**سنجش تمایز سلولی:** سنجش تمایز سلولی ۵ روز بعد از جداسازی سلول‌های CD44<sup>+</sup> و CD44<sup>-</sup> انجام شد. سلول‌ها در محیط کشت RPMI-1640 کشت داده شدند و میزان تمایز آن‌ها به سلول‌های با ظاهر اپی‌تلیال بعد از ۵ روز با مشاهده‌ی میکروسکوپی مورد بررسی قرار گرفت. با این روش، میزان توانایی تمایز دو نوع جمعیت سلولی مورد مقایسه قرار گرفت.

**استخراج RNA و سنجش بیان ژن ALDH** استخراج RNA از تعداد  $10^5 \times 8$  سلول CD44<sup>+</sup> و CD44<sup>-</sup> با کیت استخراج RNA (پارس توس، ایران) طبق دستورالعمل شرکت انجام شد. میزان جذب نوری در طول موج‌های ۲۶۰، ۲۳۰، ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر و نسبت  $A_{260}/A_{280}$ ،  $A_{260}/A_{230}$ ،  $A_{260}/A_{280}$  با دستگاه نانودراپ (Biowave, USA) اندازه‌گیری شد. نمونه‌های RNA با آنزیم DNaseI (Thermo Fisher Scientific, US) تیمار گردید و سنتز complementary DNA (cDNA) با کیت پارس توس انجام شد. واکنش Real-Time polymerase chain reaction (Real-Time PCR) مقایسه‌ای به صورت دوگانه با استفاده از مستر میکس سایبرگرین (AMPLIQON, Denmark) و دستگاه ترموسایکلر (Light Cycler 96, Roche, Germany) انجام گردید. ژن Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) به عنوان شاهد داخلی استفاده شد. Fold change بیشتر از ۱/۵ به عنوان افزایش بیان در نظر گرفته شد. پرایمر نوکلئوتیدی جهت انجام واکنش Real-time PCR برای ژن شاهد داخلی و ژن ALDH1 با استفاده از نرم‌افزار Oligo v7.60 طراحی و در نرم‌افزار Primer Blast NCBI، از اختصاصی بودن پرایمر اطمینان حاصل شد (جدول ۱). Real-time PCR با استفاده از ۵ میکرولیتر مستر میکس سایبرگرین، ۱۰ پیکومول از پرایمرهای Forward و Reverse هر کدام از ژن‌ها و ۱۰۰ نانوگرم/میکرولیتر از cDNA سنتز شده در مرحله‌ی پیشین برای هر واکنش در حجم نهایی ۱۰ میکرولیتر در شرایط ارایه شده توسط شرکت سازنده انجام شد.

منظور، تعداد  $10^4$  سلول A2780 در چند فلاسک (SPL, Korea) T75 در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد کشت داده شد و بعد از رسیدن به پوشش سلولی مناسب، تریپسین و تک سلولی گردید. تک سلول‌ها از فیلتر ۳۰ میکرومتر (MiltenyiBiotech, Germany) جهت حذف کلامپ‌ها و توده‌های چند سلولی عبور داده شدند. سپس، سلول‌ها به طور دقیق با رنگ‌آمیزی تریپان بلو شمارش شدند. رسوب در ۶۰۰ میکرولیتر بافر ترکیبی کیت MACS BSA stock solution 1:20 (MiltenyiBiotech, Germany) autoMACS rinsing solution حل شد. ۲۰۰ میکرولیتر از FCR blocking reagent به مخلوط اضافه گردید و در نهایت، ۲۰۰ میکرولیتر میکروبیید CD44 اضافه شد و به خوبی مخلوط گردید. مخلوط حاصل به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۴ درجه‌ی سانتی‌گراد قرار گرفت و هر ۲ دقیقه، برای اتصال بهتر میکروبیدها به آرامی تکان داده شد. سلول‌ها بعد از این زمان با مقدار ۲۰-۱۰ میلی‌لیتر بافر ترکیبی (MiltenyiBiotech, Germany) شستشو داده شد و بعد از سانتریفیوژ در دور  $300 \times g$  به مدت ۱۰ دقیقه، در ۵ میلی‌لیتر بافر ترکیبی حل شد و سپس، فرایند جداسازی به وسیله‌ی مگنت و ستون طبق دستورالعمل کیت انجام گردید. سپس، به منظور تأیید صحت جداسازی سلول‌های CD44<sup>+</sup>، تعداد  $10^5$  از این سلول‌ها شمارش شد و در ۱۰۰ میکرولیتر بافر ترکیبی حل گردید. مقدار ۱۰ میکرولیتر آنتی‌بادی CD44 به بافر ترکیبی اضافه شد و به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۴ درجه‌ی سانتی‌گراد قرار داده شد. سپس، سلول‌ها با ۲-۱ میلی‌لیتر بافر ترکیبی شسته شده، در دور  $300 \times g$  به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ گردید و رسوب در ۴۰۰ میکرولیتر بافر ترکیبی برای آنالیز فلوسایتومتری حل گردید.

**سنجش مهاجرت سلولی:** با توجه به این که CD44 یک گیرنده‌ی غشایی برای Hyaluronan (HA) خارج سلولی است که نقش مهمی در پیشرفت تومور و مهاجرت سلول‌های سرطانی بازی می‌کند (۱۶). به همین دلیل، در این مطالعه برای ارزیابی میزان مهاجرت سلولی در سلول‌های CD44<sup>+</sup> و CD44<sup>-</sup> مقایسه‌ی آن‌ها، از روش Scratch استفاده شد. برای این منظور، سلول‌های CD44<sup>+</sup> و CD44<sup>-</sup> در محیط کشت تازه حاوی سرم ۲ درصد کشت داده شدند و بعد از رسیدن به پوشش سلولی مناسب، با استفاده از نوک پیپت p200 خراش در پلیت ایجاد گردید. سلول‌ها توسط میکروسکوپ نوری معکوس (OPTICA, Italy) مورد ارزیابی قرار گرفتند و در بازه‌ی زمانی ۱۲، ۲۴ و ۳۶ ساعت از آن‌ها عکس برداری شد. پردازش تصویر در بخش Image processing نرم‌افزار MATLAB (R2021a V9) انجام شد و سطح خراش و فاصله‌ی بین سلول‌ها در ۴ زمان مختلف اندازه‌گیری شد. سپس، با وارد کردن اعداد به دست آمده در Excel، واکاوی داده‌ها و مقایسه‌ی میزان مهاجرت سلولی در این سه زمان بین دو نوع سلول CD44<sup>+</sup> و CD44<sup>-</sup> انجام و نمودار

جدول ۱. مشخصات پرایمر به کار رفته در واکاوی Real-time polymerase chain reaction (Real-time PCR)

پرایمر	طول محصول (جفت باز)	GC%	دمای ذوب (درجه‌ی سانتی‌گراد)	طول (جفت باز)	توالی
GAPDH	۱۰۱	۵۷/۱۴	۶۰	۲۱	F:GGAAGGTGAAGGTCGGAGTCA R:GTCATTGATGGCAACAATATCCACT
		۴۰	۶۰	۲۵	
ALDH1	۲۰۲	۶۰	۶۲	۲۰	F: GATCCCCGTGGCGTACTATG R: TGGATCTTGTCCAGCCCAACC
		۵۵	۶۲	۲۰	

GAPDH: Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase; ALDH1: Aldehyde dehydrogenase 1

**سنجش مهاجرت سلولی:** یکی از ویژگی‌های مهم CSCها، توانایی آن‌ها در مهاجرت و ایجاد متاستاز توموری می‌باشد. برای ارزیابی این ویژگی، آزمایش مهاجرت سلولی برای سنجش و مقایسه‌ی مهاجرت سلولی بین سلول‌های CD44<sup>+</sup> و CD44<sup>-</sup> انجام شد. مهاجرت در سلول‌های CD44<sup>+</sup> در مقایسه با سلول‌های CD44<sup>-</sup> افزایش نشان داد (شکل ۲).

**سنجش تکثیر سلولی:** برای تعیین میزان رشد و تکثیر سلول بعد از جداسازی سلول‌های CD44<sup>+</sup> و CD44<sup>-</sup> از روش MTT استفاده شد. نتایج نشان داد که بعد از ۲ روز سلول‌های CD44<sup>+</sup> به مرحله‌ی لگاریتمی رشد سلولی در محیط کشت فاقد سرم رسیدند؛ در حالی که سلول‌های CD44<sup>-</sup> به رشد آهسته‌ی خود در محیط کشت تا ۵ روز قبل رسیدن به مرحله‌ی لگاریتمی ادامه دادند (شکل ۳).

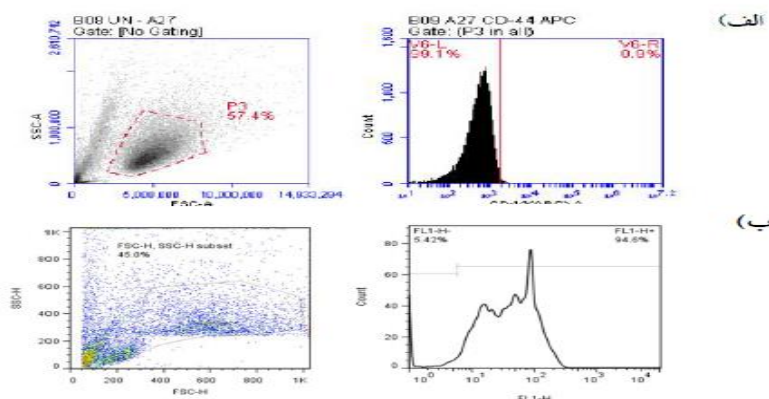
**سنجش تمایز سلولی:** بعد از جداسازی سلول‌های CD44<sup>+</sup> و CD44<sup>-</sup> و گذشت ۵ روز از کشت این سلول‌ها، تفاوت در میزان تمایز دو نوع سلول به سلول‌های با ظاهر اپی‌تلیال با میکروسکوپ مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که سلول‌های CD44<sup>+</sup> در مقایسه با سلول‌های CD44<sup>-</sup> دارای توانایی تمایز بیشتری بودند (شکل ۴).

**واکاوی آماری:** واکاوی داده‌های Real-time PCR به روش  $\Delta\Delta CT$  (Comparative CT method) انجام شد. واکاوی آماری سایر داده‌ها نیز در نرم‌افزار Excel با روش One-way ANOVA انجام شد و سطح معنی‌داری آن‌ها مشخص گردید.

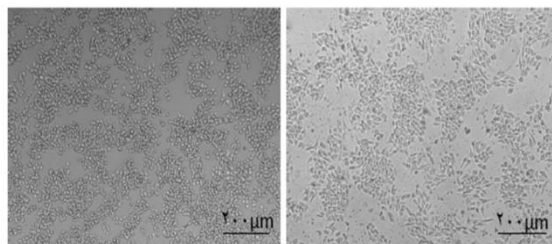
### یافته‌ها

**بیان نشانگر سطحی CD44 در رده‌ی سلولی A2780:** برای ارزیابی میزان بیان نشانگر سطحی CD44 در رده‌ی سلولی A2780 تخمدان، از تکنیک فلوسایتومتری استفاده شد. میزان بیان سلول‌های CD44<sup>+</sup> در این رده‌ی سلولی، ۰/۹ درصد بود (شکل ۱-الف). با توجه به این میزان بیان، از این رده‌ی سلولی برای جداسازی CSCها به کمک نشانگر سطحی CD44 و تکنیک MACS استفاده شد.

**جداسازی سلول‌های CD44<sup>+</sup> از رده‌ی سلولی A2780:** برای جداسازی سلول‌های CD44<sup>+</sup> از رده‌ی سلولی A2780 تخمدان، از تکنیک MACS استفاده شد و برای تأیید صحت جداسازی، از تکنیک فلوسایتومتری استفاده شد. درصد سلول‌های CD44<sup>+</sup> در سلول‌های جدا شده با تکنیک MACS، ۹۴/۳ درصد بود (شکل ۱-ب).



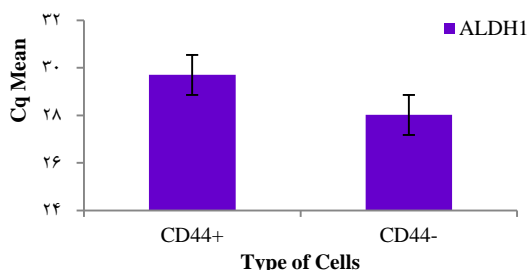
شکل ۱. الف) واکاوی فلوسایتومتری بیان نشانگر سطحی CD44 در رده‌ی سلولی A2780. سلول‌ها با Fluorescein isothiocyanate (FITC) کانژوگ شده به آنتی‌بادی منوکلونال آنتی-CD44 رنگ‌آمیزی شدند. فرکانس سلول‌های CD44<sup>+</sup> در رده‌ی سلولی A2780، ۰/۹ درصد بود. ب) واکاوی بیان نشانگر سطحی CD44 در سلول‌های جدا شده با تکنیک (MACS) Magnetic-activated cell sorting با تکنیک فلوسایتومتری



شکل ۴. سلول‌های CD44<sup>+</sup> (سمت راست تصویر) نسبت به سلول‌های CD44<sup>-</sup> (سمت چپ تصویر) توانایی بیشتر و سریع‌تری در چسبیدن به پلیت چسبنده و تمایز به سلول‌های اپی‌تلیال دارند. تصاویر با بزرگ‌نمایی ۱۰× گرفته شده است.

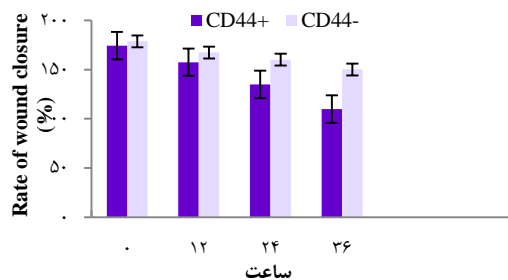
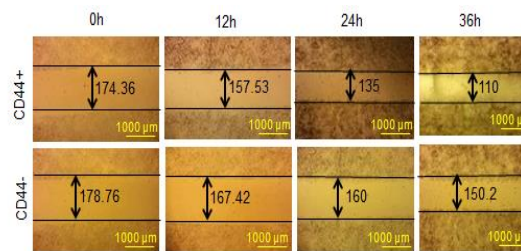
### بحث

سرطان تخمدان، یک بدخیمی هتروژن و هفتمین سرطان رایج در جهان است (۱۷). اگر چه رویکردهای درمانی بسیاری برای درمان این سرطان اتخاذ شده است که امید به زندگی را در این بیماران در طی دهه‌های گذشته افزایش داده است، اما باز هم نرخ بقای ۵ ساله‌ی بیماران مبتلا به این سرطان بعد از درمان‌های اولیه، بسیار کم بوده و عود مجدد بیماری بعد از شیمی‌درمانی‌های استاندارد مشاهده شده است. این موضوع، لزوم وجود راهبردهای درمانی جدید برای درمان این سرطان برای غلبه بر مقاومت به شیمی‌درمانی را نشان می‌دهد (۱۹-۱۸). یکی از عوامل اصلی مقاومت به شیمی‌درمانی در سرطان‌ها به ویژه سرطان تخمدان، وجود CSCها می‌باشد که دارای توانایی خودنوزایی، تمایز، تومورزایی و مقاومت به شیمی‌درمانی می‌باشند (۲۰). با توجه به اهمیت CSCهای تخمدان در مقاومت به دارو و عود تومور، از بین بردن آن‌ها می‌تواند به عنوان یک روش درمانی کارآمد جهت کاهش مقاومت دارویی و عود سرطان تخمدان در نظر گرفته شود (۲۱).



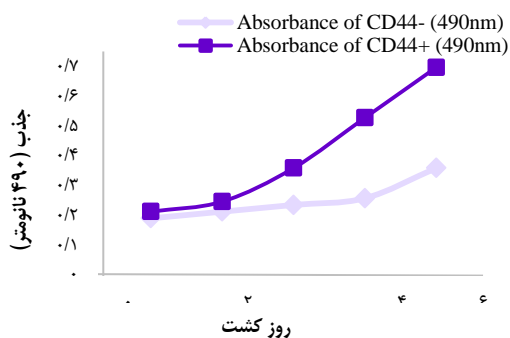
شکل ۵. سنجنش بیان نشانگر ۱ Aldehyde dehydrogenase 1 (ALDH1) در سلول‌های CD44<sup>+</sup> در مقایسه با سلول‌های CD44<sup>-</sup>

بنابراین، راهبردهای مختلفی نظیر مسیرهای سیگنالینگ می‌توانند انتخاب مناسبی باشند که با هدف قرار دادن آن‌ها، می‌توان از بقا و



شکل ۲. سنجنش مهاجرت سلولی در سلول‌های CD44<sup>+</sup> و CD44<sup>-</sup> انجام شد. الف) سلول‌ها در فواصل زمانی ۱۲ ساعت مورد بررسی و عکس برداری با میکروسکوپ (بزرگ‌نمایی ۴×) قرار گرفتند و سطح خراش توسط نرم‌افزار MATLAB اندازه‌گیری شد. ب) با استفاده از نرم‌افزار Excel واکاوی آن انجام و نمودارها رسم گردید. میزان مهاجرت سلولی در سلول‌های CD44<sup>+</sup> نسبت به سلول‌های CD44<sup>-</sup> افزایش معنی‌داری نشان داد.

سنجنش بیان ژن ALDH1 از آن جایی که نشانگر ALDH1 به عنوان یک نشانگر CSC در بیشتر تومورهای جامد مطرح است، بیان این نشانگر در سلول‌های CD44<sup>+</sup> جدا شده با تکنیک Real-time PCR مورد بررسی قرار گرفت و میزان بیان آن با سلول‌های CD44<sup>-</sup> مقایسه گردید. در این سنجنش، افزایش بیان این نشانگر در سلول‌های CD44<sup>+</sup> (Fold change ۱/۵) در مقایسه با سلول‌های CD44<sup>-</sup> مشاهده شد (شکل ۵).



شکل ۳. منحنی تکثیر سلول‌های CD44<sup>+</sup> و CD44<sup>-</sup> کشت داده شده در محیط کشت RPMI-1640 فاقد سرم به مدت ۵ روز

این سلول‌ها، خواص CSCها نظیر تهاجم، تکثیر، تمایز و بیان نشانگر ALDH1 را نشان دادند. در مطالعه‌ی دیگری، ارتباط معنی‌داری بین بیان CD44<sup>+</sup> و درجه‌ی تومور و میزان تهاجم مشاهده شده است (۴۲). در مطالعه‌ی دیگری نشان داده شد که CD44<sup>+</sup> CSCSها قادر به تشکیل تومور در موش Nude و مقاومت به شیمی‌درمانی در مقایسه با سلول‌های CD44<sup>-</sup> هستند و نتایج، گویای خواص CSC در سلول‌های CD44<sup>+</sup> بود (۴۳). روش دیگر جداسازی CSC بر اساس ALDH با استفاده از روش Aldefluor است. این روش در مقایسه با روش‌های جداسازی با نشانگر سطح سلولی، از ویژگی (Specificity) کمتری برخوردار است (۴۴). روش دیگر برای جداسازی CSC بر اساس جمعیت سلول جانبی (SP) با بیان انتقال دهنده‌های ABC با استفاده از رنگ‌آمیزی Hoechst است. در این روش، سلول‌های SP رنگ Hoechst را از طریق یک انتقال دهنده خارج می‌کنند. این مکانیسم برای خارج کردن داروهای شیمی‌درمانی و ایجاد مقاومت در برابر شیمی‌درمانی است (۴۵). این روش، همچنین برای جداسازی CSCها بدون نشانگر سطح سلول مورد استفاده قرار می‌گیرد، اما در مقایسه با سایر روش‌ها، از خصوصیات و خلوص کمتری برخوردار است و اثرات سمی بر روی سلول‌های جدا شده دارد (۴۶).

### نتیجه‌گیری

با توجه به اهمیت هدف قرار دادن CSCها در درمان قطعی سرطان تخمدان، جداسازی دقیق این سلول‌ها بسیار حایز اهمیت می‌باشد. بنابراین، جداسازی CSCها از طریق نشانگرهای سطحی رایج و بررسی خواص این سلول‌ها برای تحقیقات آینده، می‌تواند بسیار مفید و راه‌گشا باشد.

### تشکر و قدردانی

بدین وسیله از بخش ژنتیک انسانی پژوهشکده‌ی بوعلی مشهد و گروه زیست‌شناسی دانشگاه شهید چمران اهواز تشکر می‌شود. مقاله‌ی حاضر برگرفته از پایان‌نامه‌ی مقطع دکتری تخصصی رشته‌ی زیست‌شناسی سلولی ملکولی - ژنتیک مصوب دانشگاه شهید چمران اهواز با شماره‌ی SCU.SB 99.78 و طرح مصوب دانشگاه علوم پزشکی مشهد با شماره‌ی ۹۵۱۵۶۵ می‌باشد.

رشد CSCها جلوگیری کرد (۲۲). همچنین، می‌توان از نشانگرهای سطح به عنوان هدف اختصاصی برای سرکوب و ریشه‌کنی CSCها بهره برد. نشانگرهای سطح CSC، مانند CD24، CD44، CD117 و CD133، می‌توانند توسط چندین راهبرد مورد هدف قرار گیرند (۲۳). طی یک مطالعه، سلول‌های CD44 جدا شده از رده‌ی سلولی SKOV3 توسط هیالورونیک اسید- پاکلیتاکسل (HA-TXL) هدف قرار گرفتند که منجر به کاهش وزن تومور شد (۲۴). در گزارش دیگری، سلول‌های CD133 جدا شده از سلول‌های OVCAR5-luc مورد هدف قرار گرفتند که منجر به کاهش قابل توجه پیشرفت تومور گردید (۲۵). مهار سلول‌های CD24 از طریق القای آپوپتوز در رده‌ی سلولی SKOV3 باعث کاهش زنده ماندن سلول‌های سرطانی و کاهش رشد تومور در موش‌های Nude گردید (۲۶). رشد سلول‌های CD44<sup>+</sup> و CD117<sup>+</sup> (CSC تخمدان) مقاوم به شیمی‌درمانی نیز توسط درمان‌های پاکلیتاکسل و سالینومایسین مهار شد (۲۷).

متفورمین، یکی دیگر از داروهای مرتبط با افزایش ۵ سال بقا در بیماران مبتلا به سرطان تخمدان است. مشاهده شده است که متفورمین، CSCهای CD44<sup>+</sup> و CD117<sup>+</sup> و فرایند Epithelial to mesenchymal transition (EMT) را در رده‌های سلولی SKOV3 و A2780 مهار می‌کند (۲۸). بنابراین، جداسازی این سلول‌ها و انجام تحقیقات گسترده روی این سلول‌ها، بسیار اهمیت دارد. CSCها با روش‌های مختلف قابل شناسایی و جداسازی هستند. روش‌های MACS و FACS روش‌های کارآمدی برای جداسازی CSCها از تومورهای جامد و یا رده‌های سلولی بر اساس نشانگرهای سطح یا داخل سلول هستند. MACS یک روش جداسازی سلولی مغناطیسی سریع و آسان است که برای جداسازی تعداد زیادی سلول با توجه به نشانگرهای خاص سطح سلول ایجاد و به کار گرفته می‌شود (۲۹).

نشانگر CD44 یک پروتئین چسبنده است که به عنوان یک نشانگر CSC به طور خیلی وسیعی در سرطان‌های معده، روده، مری و پستان بیان می‌گردد (۳۳-۳۰). تا کنون از چندین نشانگر مانند CD133<sup>+</sup>، ALDH1/2، EpCAM، LGR5، CD44، CD34، CD24، CD117، MyD88 و CDH1 برای جداسازی CSC از رده‌های سلولی تخمدان استفاده شده است (۴۱-۳۴). در این مطالعه، جداسازی سلول‌های CD44<sup>+</sup> از رده‌ی سلولی A2780 انجام شد و

### References

1. The Cancer Genome Atlas Research Network. Integrated genomic analyses of ovarian carcinoma. *Nature* 2011; 474(7353): 609-15.
2. Torre LA, Trabert B, DeSantis CE, Miller KD, Samimi G, Runowicz CD, et al. Ovarian cancer statistics, 2018. *CA Cancer J Clin* 2018; 68(4): 284-96.
3. Ferlay J, Shin HR, Bray F, Forman D, Mathers C, Parkin DM. Cancer incidence and mortality worldwide: IARC Cancer Base No. 10. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer; 2010.
4. Howlader N, Noone AM, Krapcho M, Neyman N, Aminou R, Waldron W, et al. SEER Cancer Statistics

- Review, 1975-2008. Bethesda, MD: National Cancer Institute; 2011.
5. Ozols RF, Bundy BN, Greer BE, Fowler JM, Clarke-Pearson D, Burger RA, et al. Phase III trial of carboplatin and paclitaxel compared with cisplatin and paclitaxel in patients with optimally resected stage III ovarian cancer: A Gynecologic Oncology Group study. *J Clin Oncol* 2003; 21(17): 3194-200.
  6. Armstrong DK, Bundy B, Wenzel L, Huang HQ, Baergen R, Lele S, et al. Intraperitoneal cisplatin and paclitaxel in ovarian cancer. *N Engl J Med* 2006; 354(1): 34-43.
  7. Kehoe S, Hook J, Nankivell M, Jayson GC, Kitchener H, Lopes T, et al. Primary chemotherapy versus primary surgery for newly diagnosed advanced ovarian cancer (CHORUS): an open-label, randomised, controlled, non-inferiority trial. *Lancet* 2015; 386(9990): 249-57.
  8. Wright AA, Bohlke K, Armstrong DK, Bookman MA, Cliby WA, Coleman RL, et al. Neoadjuvant chemotherapy for newly diagnosed, advanced ovarian cancer: Society of Gynecologic Oncology and American Society of Clinical Oncology Clinical Practice Guideline. *Gynecol Oncol* 2016; 143(1): 3-15.
  9. Moghbeli M, Moghbeli F, Forghanifard MM, Abbaszadegan MR. Cancer stem cell detection and isolation. *Med Oncol* 2014; 31(9): 69.
  10. Moitra K. overcoming multidrug resistance in cancer stem cells. *Biomed Res Int* 2015; 2015: 635745.
  11. Hedditch EL, Gao B, Russell AJ, Lu Y, Emmanuel C, Beesley J, et al. ABCA transporter gene expression and poor outcome in epithelial ovarian cancer. *J Natl Cancer Inst* 2014; 106(7): dju149.
  12. Wang QE. DNA damage responses in cancer stem cells: Implications for cancer therapeutic strategies. *World J Biol Chem* 2015; 6(3): 57-64.
  13. Shackleton M. Normal stem cells and cancer stem cells: similar and different. *Semin Cancer Biol* 2010; 20(2): 85-92.
  14. Rahman M, Jamil H, Akhtar N, Rahman K, Islam R, Asaduzzaman S. Stem cell and cancer stem cell: A tale of two cells. *Progress in Stem Cell* 2016; 3(2): 97-108.
  15. Thapa R, Wilson GD. The importance of CD44 as a stem cell biomarker and therapeutic target in cancer. *Stem Cells Int* 2016; 2016: 2087204.
  16. Toole BP. Hyaluronan-CD44 interactions in cancer: paradoxes and possibilities. *Clin Cancer Res* 2009; 15(24): 7462-8.
  17. Ottevanger PB. Ovarian cancer stem cells more questions than answers. *Semin Cancer Biol* 2017; 44: 67-71.
  18. Hassan S, Muere A, Einstein G. Ovarian hormones and chronic pain: A comprehensive review. *Pain* 2014; 155(12): 2448-60.
  19. Naora H, Montell DJ. Ovarian cancer metastasis: Integrating insights from disparate model organisms. *Nat Rev Cancer* 2005; 5(5): 355-66.
  20. Frank NY, Schatton T, Frank MH. The therapeutic promise of the cancer stem cell concept. *J Clin Invest* 2010; 120(1): 41-50.
  21. Walters Haygood CL, Arend RC, Straughn JM, Buchsbaum DJ. Ovarian cancer stem cells: Can targeted therapy lead to improved progression-free survival? *World J Stem Cells* 2014; 6(4): 441-7.
  22. Keyvani V, Farshchian M, Esmaeili SA, Yari H, Moghbeli M, Nezhad SRK, et al. Ovarian cancer stem cells and targeted therapy. *J Ovarian Res* 2019; 12(1): 120.
  23. Li SD, Howell SB. CD44-targeted microparticles for delivery of cisplatin to peritoneal metastases. *Mol Pharm* 2010; 7(1): 280-90.
  24. Lee SJ, Ghosh SC, Han HD, Stone RL, Bottsford-Miller J, Shen DY, et al. Metronomic activity of CD44-targeted hyaluronic acid-paclitaxel in ovarian carcinoma. *Clin Cancer Res* 2012; 18(15): 4114-21.
  25. Skubitz AP, Taras EP, Boylan KL, Waldron NN, Oh S, Panoskaltzis-Mortari A, et al. Targeting CD133 in an in vivo ovarian cancer model reduces ovarian cancer progression. *Gynecol Oncol* 2013; 130(3): 579-87.
  26. Su D, Deng H, Zhao X, Zhang X, Chen L, Chen X, et al. Targeting CD24 for treatment of ovarian cancer by short hairpin RNA. *Cytotherapy* 2009; 11(5): 642-52.
  27. Chung H, Kim YH, Kwon M, Shin SJ, Kwon SH, Cha SD, et al. The effect of salinomycin on ovarian cancer stem-like cells. *Obstet Gynecol Sci* 2016; 59(4): 261-8.
  28. Zhang R, Zhang P, Wang H, Hou D, Li W, Xiao G, et al. Inhibitory effects of metformin at low concentration on epithelial-mesenchymal transition of CD44(+)CD117(+) ovarian cancer stem cells. *Stem Cell Res Ther* 2015; 6: 262.
  29. Miltenyi S, Muller W, Weichel W, Radbruch A. High gradient magnetic cell separation with MACS. *Cytometry* 1990; 11(2): 231-8.
  30. Mani SA, Guo W, Liao MJ, Eaton EN, Ayyanan A, Zhou AY, et al. The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells. *Cell* 2008; 133(4): 704-15.
  31. Prince ME, Sivanandan R, Kaczorowski A, Wolf GT, Kaplan MJ, Dalerba P, et al. Identification of a subpopulation of cells with cancer stem cell properties in head and neck squamous cell carcinoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007; 104(3): 973-8.
  32. Dalerba P, Dylla SJ, Park IK, Liu R, Wang X, Cho RW, et al. Phenotypic characterization of human colorectal cancer stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007; 104(24): 10158-63.
  33. Reim F, Dombrowski Y, Ritter C, Buttman M, Hausler S, Ossadnik M, et al. Immunoselection of breast and ovarian cancer cells with trastuzumab and natural killer cells: selective escape of CD44high/CD24low/HER2low breast cancer stem cells. *Cancer Res* 2009; 69(20): 8058-66.
  34. Foster R, Buckanovich RJ, Rueda BR. Ovarian cancer stem cells: working towards the root of stemness. *Cancer Lett* 2013; 338(1): 147-57.
  35. Garson K, Vanderhyden BC. Epithelial ovarian cancer stem cells: Underlying complexity of a simple paradigm. *Reproduction* 2015; 149(2): R59-R70.
  36. Shah V, Taratula O, Garbuzenko OB, Taratula OR, Rodriguez-Rodriguez L, Minko T. Targeted nanomedicine for suppression of CD44 and simultaneous cell death induction in ovarian cancer: an optimal delivery of siRNA and anticancer drug.

- Clin Cancer Res 2013; 19(22): 6193-204.
37. Cao L, Shao M, Schilder J, Guise T, Mohammad KS, Matei D. Tissue transglutaminase links TGF-beta, epithelial to mesenchymal transition and a stem cell phenotype in ovarian cancer. *Oncogene* 2012; 31(20): 2521-34.
  38. Alvero AB, Chen R, Fu HH, Montagna M, Schwartz PE, Rutherford T, et al. Molecular phenotyping of human ovarian cancer stem cells unravels the mechanisms for repair and chemoresistance. *Cell Cycle* 2009; 8(1): 158-66.
  39. Alvero AB, Fu HH, Holmberg J, Visintin I, Mor L, Marquina CC, et al. Stem-like ovarian cancer cells can serve as tumor vascular progenitors. *Stem Cells* 2009; 27(10): 2405-13.
  40. Wei X, Dombkowski D, Meirelles K, Pieretti-Vanmarcke R, Szotek PP, Chang HL, et al. Mullerian inhibiting substance preferentially inhibits stem/progenitors in human ovarian cancer cell lines compared with chemotherapeutics. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010; 107(44): 18874-9.
  41. Meng E, Long B, Sullivan P, McClellan S, Finan MA, Reed E, et al. CD44<sup>+</sup>. *Clin Exp Metastasis* 2012; 29(8): 939-48.
  42. Mansouri A, Foroughmand AM, Abbaszadegan MR, Memar B, Mahmoudian RA, Gholamin M. Expression analysis of CD44 isoforms S and V3, in patients with esophageal squamous cell carcinoma. *Iran J Basic Med Sci* 2015; 18(4): 380-4.
  43. Moghbeli M, Mosannen MH, Memar B, Forghanifard MM, Gholamin M, Abbaszadegan MR. Role of MAML1 in targeted therapy against the esophageal cancer stem cells. *J Transl Med* 2019; 17(1): 126.
  44. Almanaa TN, Geusz ME, Jamasbi RJ. A new method for identifying stem-like cells in esophageal cancer cell lines. *J Cancer* 2013; 4(7): 536-48.
  45. Song J, Chang I, Chen Z, Kang M, Wang CY. Characterization of side populations in HNSCC: highly invasive, chemoresistant and abnormal Wnt signaling. *PLoS One* 2010; 5(7): e11456.
  46. Ruan Z, Liu J, Kuang Y. Isolation and characterization of side population cells from the human ovarian cancer cell line SK-OV-3. *Exp Ther Med* 2015; 10(6): 2071-8.



## Isolation and Characterization of Stemness Properties of Cancer Stem Cells with CD44<sup>+</sup> Surface Marker from A2780 Cancer Cell Line

Vahideh Keyvani<sup>1</sup>, Seyed Reza Kazeminezhad<sup>2</sup>, Mohammad Reza Abbaszadegan<sup>3</sup>

### Original Article

#### Abstract

**Background:** Ovarian cancer is the fifth leading cause of cancer death among women worldwide. Ovarian cancer is a heterogeneous disease that is genomically and histopathologically very diverse. In spite of usual treatments, recurrence of this cancer is very common due to the lack of complete eradication of certain types of cancer cells. These cells, known as cancer stem cells, have different stemness properties.

**Methods:** In the present study, we isolated cancer stem cells (CSCs) with CD44 surface marker from ovarian A2780 cell line, and examined the invasion, growth, and differentiation properties and ALDH1 expression of isolated CD44<sup>+</sup> cells compared to CD44<sup>-</sup> cells. The expression level of CD44 in this cell line was evaluated by flow cytometry (FCM) technique. Then, the isolation of these cells was performed by magnetic-activated cell sorting (MACS) technique using specific microbeads, and FCM was used to confirm the isolation efficacy. Invasion, growth rate, differentiation percentage, and expression rate of ALDH1 in CD44<sup>+</sup> cells were evaluated and compared with CD44<sup>-</sup> cells.

**Findings:** CD44<sup>+</sup> CSCs, compared to CD44<sup>-</sup> cells, not only had the ability to invade other tissues, and differentiate to epithelial cells in culture medium containing serum, but also had faster growth rate and higher ALDH1 expression in comparison with the control.

**Conclusion:** Isolation of cancer stem cells has great importance in the targeted treatment of ovarian cancer and inhibition of tumor recurrence.

**Keywords:** Ovarian neoplasm; Neoplastic stem cell; Recurrence; CD44 antigen

**Citation:** Keyvani V, Kazeminezhad SR, Abbaszadegan MR. Isolation and Characterization of Stemness Properties of Cancer Stem Cells with CD44<sup>+</sup> Surface Marker from A2780 Cancer Cell Line. J Isfahan Med Sch 2021; 39(629): 434-442.

1- PhD Candidate of Molecular Genetics, Department of Biology, School of Science, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran

2- Associate Professor, Department of Biology, School of Science, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran

3- Professor, Department of Medical Genetics, School of Science AND Medical Genetics Research Center, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran

**Corresponding Author:** Seyed Reza Kazeminezhad, Associate Professor, Department of Biology, School of Science, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran; Email: kazemi\_reza@scu.ac.ir