

بررسی تأثیر سلول‌های بنیادی پالپ دندان شیری انسانی بر سلول‌های توموری K۵۶۲ در شرایط هم‌کشتی

منا گرجی^۱، دکتر بتول هاشمی بنی^۲، دکتر حمید بهرامیان^۳، دکتر حسین صالحی^۴، راضیه علی‌پور^۴،
مریم علی اکبری^۵

مقاله پژوهشی

چکیده

مقدمه: به دلیل افزایش میزان سرطان در جوامع انسانی، دانشمندان روش‌های گوناگونی از قبیل شیمی درمانی و دارو درمانی را جهت مبارزه با سرطان به کار گرفته‌اند، اما این روش‌ها به دلیل عود مکرر و مقاومت دارویی به صورت کامل جوابگو نیست. به همین دلیل، در سال‌های اخیر علاوه بر روش‌های دیگر، سلول درمانی نیز در درمان سرطان مورد توجه قرار گرفته است. از آن جا که در بررسی تأثیر سلول‌های بنیادی بر سلول‌های توموری نتایج متناقضی به دست آمده است، این مطالعه با هدف بررسی میزان تکثیر و بقای رده‌ی سلولی سرطانی K۵۶۲ در شرایط هم‌کشتی با سلول‌های بنیادی پالپ دندان شیری انجام شد.

روش‌ها: سلول‌های بنیادی حاصل از پالپ دندان‌های شیری افتاده، از دانشکده‌ی دندانپزشکی دانشگاه علوم پزشکی اصفهان و سلول‌های K۵۶۲ از انستیتو پاستور تهیه و کشت داده شد. هم‌کشتی مستقیم سلول‌های بنیادی با K۵۶۲ در زمان‌های ۴۸ و ۹۶ ساعت با نسبت سلولی ۱ به ۱۰، ۱ به ۱ و ۱ به ۱ صورت پذیرفت. لازم به ذکر است تعداد سلول‌های توموری در تمام گروه‌های آزمایشی یکسان انتخاب گردید. بررسی میزان تکثیر و بقای سلول‌های توموری، با روش‌های رنگ آمیزی تریپان بلو و [MTT] 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide انجام گرفت.

یافته‌ها: مقایسه‌ی نتایج MTT در گروه‌های مختلف پس از ۴۸ و ۹۶ ساعت هم‌کشتی، نشان داد که با افزایش دانسیته‌ی سلول‌های بنیادی نسبت به توموری، میانگین تکثیر سلول‌های توموری کاهش یافت. در گروه اول که نسبت سلول‌های بنیادی مشتق از پالپ دندان ۱۰ برابر سلول‌های K۵۶۲ بود، میزان تکثیر سلول‌های سرطانی حداقل (Optical density = ۰/۶) و در گروه سوم که سلول‌های بنیادی مشتق از پالپ دندان با دانسیته‌ی ۰/۱ سلول‌های K۵۶۲ کشت داده شد، حداکثر (Optical density = ۱/۶) تکثیر سلول‌های توموری به دست آمد (P < ۰/۰۵۰). نتایج شمارش سلولی با رنگ‌آمیزی تریپان بلو، مطابق نتایج پیش‌گفته بود.

نتیجه‌گیری: در شرایط هم‌کشتی، افزایش نسبت سلول‌های بنیادی به سلول‌های سرطانی K۵۶۲ بر روند تکثیر سلول‌های K۵۶۲ تأثیر بازدارندگی دارد.

واژگان کلیدی: سلول بنیادی پالپ دندان، سلول‌های توموری K۵۶۲، هم‌کشتی

ارجاع: گرجی منا، هاشمی بنی بتول، بهرامیان حمید، صالحی حسین، علی‌پور راضیه، علی اکبری مریم. بررسی بقا و تکثیر سلول‌های K۵۶۲

تحت تأثیر هم‌کشتی با سلول‌های بنیادی مشتق از پالپ دندان. مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۳۹۳؛ ۳۲ (۳۰۴): ۱۶۴۵-۱۶۳۳

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه علوم تشریحی، دانشکده‌ی پزشکی و کمیته‌ی تحقیقات دانشجویی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران.

۲- دانشیار، گروه علوم تشریحی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران.

۳- استادیار، گروه علوم تشریحی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران.

۴- دانشجوی دکتری، گروه ایمنی‌شناسی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران.

۵- گروه علوم تشریحی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران.

مقدمه

سلول‌های بنیادی به عنوان سلول‌هایی تعریف شده‌اند که توانایی خودنوزایی (Self-renewal) و پتانسیل تمایز (Multi potent) را دارند و می‌توانند به سلول‌های دختری و به انواع سلول‌های بالغ تبدیل شوند (۱-۲). به طور کلی، خصوصیات سلول‌های بنیادی عبارت از توانایی چسبیدن به ظرف و داشتن شکل شبه فیبروبلاستی در محیط کشت، داشتن قابلیت خودنوزایی و توانایی تمایز به سلول‌های بافت‌های مزانشیمی (استخوان، غضروف و بافت چربی)، عدم بیان نشانگرهای مربوط به رده‌ی هم‌پویتی‌ک (CD۱۹، CD۴۵، CD۳۴، CD۱۴) و CD۱۱b) و بیان بعضی از نشانگرها مانند CD۴۴، CD۷۳، (Thy-۱) CD۹۰ و CD۱۰۵ است (۳-۵).

در سال‌های اخیر نیز وجود نشانگرهای سلول‌های بنیادی بر روی SHED مورد بررسی قرار گرفته و مشخص شده است که SHEDها خواص سلول‌های بنیادی را دارند.

دندان و سلول‌های اطراف ریشه، دارای انواع سلول‌های بنیادی هستند که تا کنون چند نوع آن شناسایی شده‌اند که عبارت از DPSC (Dental pulp stem cells)، SHED (Stem cells from exfoliated deciduous teeth)، PDLSC (Stem cells from apical papilla) SCAP (Periodontal ligament stem cells) و DFPC (Dental follicle progenitor cells) می‌باشند.

سلول‌های بنیادی دندان شیری (SHED) یا (Stem cell from human exfoliated deciduous teeth) در انسان توسط Huang و همکاران معرفی گردید. این سلول‌های اکتومزانشیمی هتروژنوس با خاصیت

خودنوزایی و تمایز Multi-linage هستند (۶). Petrovic و Stefanovic بیان کردند که سلول‌های SHED در حین تکثیر به صورت سلول‌های کروی و خوشه‌ای در می‌آیند. این سلول‌ها نسبت به سلول‌های بنیادی مزانشیمی جدا شده از مغز استخوان و بافت چربی، کمتر مورد توجه قرار گرفته‌اند و اکثر مطالعات بر روی آن‌ها نیز در زمینه‌ی طب ترمیمی و مهندسی بافت به ویژه بافت‌های دندانی بوده است (۷).

از آن جا که ابتلا به انواع سرطان‌ها و تومورها یکی از مهم‌ترین مشکلات بهداشتی بشر امروز و عامل ۱۳ درصد مرگ‌ها است، تصور استفاده از سلول‌های بنیادی شگفت‌انگیز در درمان انواع سرطان‌ها، از همان اوایل شناخت سلول‌های بنیادی، مورد توجه بوده است (۸).

خصوصیت لانه‌گزینی و تجمع سلول‌های بنیادی مزانشیمی در اطراف بافت توموری موجب شده است که این سلول‌ها را ابزارهای مناسبی، جهت هدف قرار دادن بافت توموری و فرستادن مولکول‌های ضد توموری مانند پیش داروها (Prodrugs)، سایتوکاین‌های تحریک کننده‌ی ایمنی و ... به محل تومور بدانند. به همین دلیل، در سال‌های اخیر، آزمایش‌های متعددی در این باره طراحی و انجام شده‌اند (۹-۱۲).

Valtieri و Sorrentino بیان می‌کنند که سلول‌های بنیادی موجب مرگ سلول‌های توموری نشده و حتی باعث تبدیل سلول‌های بنیادی به سلول‌های سرطانی می‌شود و اگر تعداد سلول‌های بنیادی کم باشد، این سلول‌ها باعث ایجاد حالت متاستاتیک در تومور می‌شود (۱۱). همچنین در تحقیق دیگری، DelaRosa و Lombardo گزارش

کرده‌اند که سلول‌های بنیادی دارای خاصیت ضد ایمنی هستند و قادرند با ترشح عواملی از تکثیر و عملکرد لنفوسیت‌ها جلوگیری کنند (۱۲).

Shi و همکاران بیان کرده‌اند که سلول‌های بنیادی می‌توانند به محل تومور مهاجرت کنند و سلول‌های بنیادی به همراه IFN- γ (Interferon gamma), IL- α , (Interleukin alpha) و IL- β (Interleukin beta) باعث القای خاصیت ضد ایمنی می‌شوند (۱۳).

به تازگی در انسان و بایون دیده شده است که هم‌کشتی سلول‌های بنیادی و لنفوسیت‌ها باعث بروز خاصیت سرکوب ایمنی شده و تولید سایتوکاین‌ها نیز تعدیل گردیده است (۱۶-۱۴).

Frank و همکاران در تحقیق نشان دادند که قادرند به محل تومور مهاجرت کنند و باعث ایجاد خاصیت ایمنونوزسنسی (تحریک سیستم ایمنی) شوند. در واقع، با تغییراتی در سلول‌های بنیادی، آن‌ها مولکول‌های شبه آنتی‌بادی را تولید می‌کنند که باعث ایجاد منافذ در دیواره‌ی سلول توموری می‌شوند. وقتی سلول‌های بنیادی در مجاورت سلول‌های توموری قرار می‌گیرند، می‌توانند انواع مختلفی از عوامل ضد سرطانی مثل اینترلوکین‌ها و اینترفرون‌ها را تولید کنند و حتی با تولید سایتوکاین‌ها و عوامل رشد و ماتریکس خارج سلولی، باعث پسرقت تومور و آپوپتوز سلول‌های توموری می‌شوند (۱۷). همچنین سلول‌های بنیادی تکثیر سلول‌های توموری را کاهش می‌دهند و چرخه‌ی سلولی را در سلول‌های توموری در مراحل G $_0$ -G $_1$ نگه می‌دارند و مانع پیشرفت آن می‌شوند (۶).

از طرف دیگر، به نظر می‌رسد که اثرات سلول‌های بنیادی بر سلول‌های توموری به منشأ سلول‌های بنیادی نیز بستگی دارد؛ برای مثال، در

حالی که سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از مغز استخوان روی متاستاز به ریه در موش‌های مبتلا به کارسینومای متاستاتیک پستان تأثیری ندارند، سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از خون بند ناف و همین‌طور بافت چربی، متاستازهای ریوی را در این موش‌ها کاهش می‌دهند (۱۸) و یا در مطالعه‌ی دیگری مشاهده شده است که تزریق زیر جلدی سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از خون بند ناف و یا بافت چربی همراه با سلول‌های سرطانی، موجب کاهش و تزریق زیر جلدی سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از مغز استخوان همراه با سلول‌های سرطانی، موجب افزایش توانایی متاستاتیک سلول‌های توموری شده است (۱۹).

به طور اختصاصی‌تر، در مورد سلول‌های بنیادی مشتق از بافت چربی (ADSC) یا Adipose-derived stem cells) که با تزریق زیر جلدی این سلول‌ها به منطقه‌ی تومور سرعت رشد تومور و میزان متاستاز افزایش می‌یابد (۲۰).

در مطالعه‌ی Galie و همکاران مشاهده شد که وقتی سلول ADSC در مجاورت سلول سرطانی (PC3) قرار می‌گیرد، در محدوده‌ی تومور، رگ‌زایی اتفاق می‌افتد (۲۱). در تحقیقات دیگر نشان داده شده است که هم‌کشتی سلول‌های ADSC با سلول‌های پانکراس سرطانی، باعث توقف سلول توموری در مرحله‌ی G $_1$ می‌شود و هم‌کشتی سلول‌های ADSC با سلول‌های سرطانی K562 باعث کاهش تکثیر در سلول‌های توموری می‌شود. در واقع، یک رده‌ی اریتروبلاست لکومی انسانی، غیر چسبنده، معلق و با شکل گرد است. این رده‌ی سلولی از بیماران مبتلا به CML (Chronic myeloid leukemia) به دست

می‌آید (۲۳-۲۲، ۸).

در هم‌کشتی سلول‌های بنیادی مشتق از بند ناف با سلول‌های K562 نیز کاهش تکثیر سلول‌های توموری و توقف تقسیم سلولی در مرحله‌ی G₀/G₁ مشاهده شد (۲۴). زمانی که سلول‌های K562 با روش هم‌کشتی مستقیم و هم‌کشتی غیر مستقیم در مجاورت سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان قرار می‌گیرند، باعث کاهش تکثیر سلول‌های تومور می‌شود (۲۵).

از آن جایی‌که دندان‌های شیری، بعد از افتادن استفاده‌ی کلینیکی خاصی ندارند و سلول‌های بنیادی موجود در آن (SHED) نسبت به سایر منابع سلول‌های بنیادی، هم با روشی بدون آسیب و درد قابل دسترسی هستند و هم از حیث هزینه، مقرون به صرفه‌تر می‌باشند؛ سلول‌های SHED را می‌توان به عنوان یک منبع مناسب در تحقیقات مختلف استفاده نمود (۶-۷).

این سلول‌ها به تازگی شناخته شده‌اند و اطلاعات به دست آمده در مورد آن‌ها، نسبت به سلول‌های بنیادی مشتق از مغز استخوان و چربی کمتر است. با توجه به نتایج متناقض به دست آمده از تحقیقات مختلف در زمینه‌ی هم‌کشتی سلول‌های توموری و بنیادی و عدم وجود مطالعه مبنی بر هم‌کشتی سلول‌های بنیادی دندان شیری و رده‌ی سلولی K562، در این تحقیق تأثیر هم‌کشتی سلول‌های SHED و سلول‌های توموری K562 مورد بررسی قرار گرفت.

روش‌ها

سلول‌های K562 از انستیتو پاستور ایران تهیه شد؛ همچنین، محیط کشت RPMI1640

(Roswell Park Memorial Institute 1640) (Abcame) حاوی (Fetal bovine serum) FBS (Sigma) 10 درصد و Penicillin/Streptomycin (Gibco) 1 درصد فراهم گردید. به دلیل این که این سلول‌ها فاقد توانایی چسبندگی به کف فلاسک هستند، کشت به صورت سوسپانسیون انجام شد.

جهت به دست آوردن سلول‌های بنیادی از دندان شیری، پالپ دندان‌ها جدا شد و تحت شرایط استریل از دانشکده‌ی دندانپزشکی دانشگاه علوم پزشکی اصفهان به آزمایشگاه کشت سلول گروه علوم تشریحی منتقل گردید. تحت شرایط استریل در زیر هود لامینار کلاس II، پالپ دندان‌ها جدا شد و با اسکالپل به قطعات چند میلی‌متری بریده شد و جهت تجزیه‌ی بافت، آنزیم کلاژناز نوع I A (Sigma) به میزان 1 mg/g بافت پالپ‌دندانی به کار گرفته شد. نمونه‌ها در دمای 37°C به مدت 30 دقیقه انکوبه گردید. پس از اطمینان از تجزیه شدن کامل بافت، برابر حجم محلول آنزیم به کار رفته، محیط کشت RPMI1640 تهیه شده، جهت خنثی کردن فعالیت آنزیم به سوسپانسیون سلولی اضافه گردید.

در ادامه‌ی کار، سوسپانسیون در لوله‌های فالكون 15 ml به مدت 10 دقیقه با دور 1400 rpm سانتریفوژ شد و مایع رویی تخلیه گردید. به رسوب سلولی به دست آمده، محیط کشت FBS 10 درصد و RPMI افزوده شد و در مرحله‌ی پایانی، سلول‌ها در فلاسک 25 cm² در محیط کشت FBS 10 درصد، RPMI، Penicillin/Streptomycin 1 درصد در انکوباتور 37°C، CO₂ 5 درصد و رطوبت نسبی 90 درصد کشت داده شدند.

هم‌کشتی سلول‌های بنیادی و توموری

بعد از به دست آوردن تعداد کافی SHED از طریق پاساژهای متوالی، دو پلیت ۱۲ خانه انتخاب و ۴ خانه‌ی اول هر پلیت یک میلیون سلول SHED در ۴ خانه‌ی بعدی ۱۰۰۰۰۰ سلول و در ۴ خانه‌ی آخر، ۱۰۰۰۰ سلول ریخته شد. بعد از گذشت ۲۴ ساعت و چسبیدن سلول‌های SHED به کف چاهک‌های هر پلیت، به هر کدام از ۱۲ خانه‌ی هر پلیت، ۱۰۰۰۰۰ سلول K562 اضافه شد و این گونه نسبت‌های ۱/۱۰، ۱/۱ و ۱۰/۱ با ۴ تکرار برقرار شد. پس از ۴۸ و ۹۶ ساعت هم‌کشتی، میزان تکثیر و زنده بودن سلول‌ها با استفاده از روش MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] و تریپان بلو بررسی شد. این مراحل، ۳ مرتبه تکرار گردید.

روش MTT

جهت بررسی میزان تکثیر و بقای سلول‌ها از روش رنگ‌آمیزی MTT استفاده شد. مدیوم رویی تخلیه شد و چاهک با ۱/۵ cc PBS (Phosphate buffered saline) (Sigma) شستشو داده شد و ۴۰۰ μ l مدیوم خالص و سپس ۴۰ μ l محلول MTT (Merck) با غلظت ۵ mg/ml اضافه شد و پس از ۴ ساعت انکوبه و تخلیه‌ی مدیوم ۴۰۰ μ l دی‌متیل سولفوکساید اضافه شد، ۲ ساعت در تاریکی ماند و سپس از هر چاهک، ۱۰۰ μ l محلول به پلیت ۹۶ خانه منتقل شد و توسط دستگاه الیزا (Microplate Reader) جذب نوری (OD یا Optical density) آن در موج ۵۷۰ nm خوانده شد.

روش رنگ‌آمیزی تریپان بلو

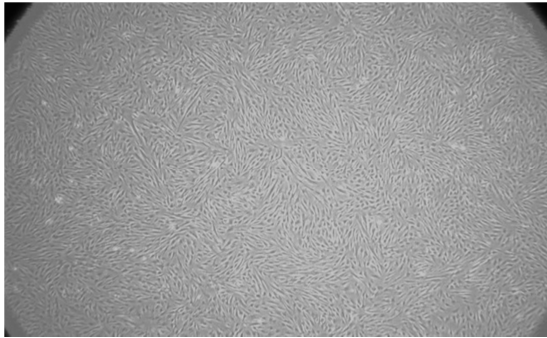
در روش تریپان بلو سوسپانسیون سلول‌های K562 به لوله‌ی فالكون منتقل گردید. پس از سانتریفوژ کردن محلول رویی خارج گردید، ۱ ml مدیوم اضافه شد و

سلول‌ها پیست گردید و به طور یکنواخت شناور شد. سپس ۱۰ μ l محلول تریپان بلو (Merck) ۰/۴ درصد با ۱۰ μ l سوسپانسیون سلولی مخلوط گردید و ۱۰ μ l از این مخلوط، به لام نئوبار منتقل شد و شمارش سلولی انجام گرفت.

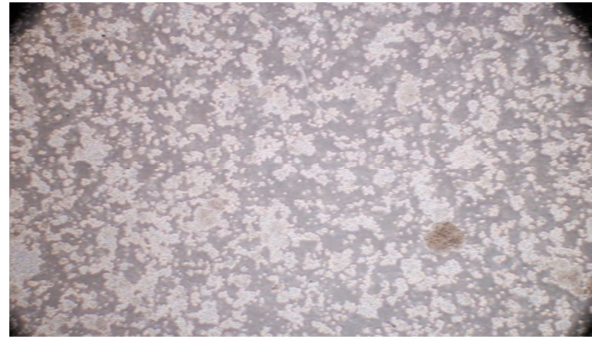
یافته‌ها

کشت سلولی: در کشت سوسپانسیون سلول‌های K562، این سلول‌ها با مورفولوژی کروی بدون ایجاد زواید سلولی به حالت شناور و بدون چسبندگی به کف فلاسک مشخص بودند. در این شرایط، برخی سلول‌ها به یکدیگر چسبیده و به صورت توده‌های مجتمع دیده شدند که با پیپتینگ از هم جدا گردیدند (شکل ۱).

پس از تجزیه‌ی بافت پالپ دندان شیری انسانی تحت تأثیر آنزیم کلاژناز، سلول‌های تک هسته‌ای حاصل در فلاسک‌های ۲۵ cm کشت داده شدند. در ابتدا با مشاهده‌ی فلاسک‌ها در زیر میکروسکوپ، سلول‌ها به حالت کروی و شناور بودند، اما با گذشت چند ساعت، به تدریج مرحله‌ی چسبندگی خود را به کف فلاسک آغاز کردند و در این زمان از حالت کروی خارج و به اشکال چند وجهی، ستاره‌ای و دوکی با زواید سیتوپلاسمی کوتاه و اندک مشخص شدند. به تدریج تحت شرایط مناسب دما (37°C) و CO_2 ۵ درصد در انکوباتور، سلول‌ها با انجام تقسیمات میتوزی متوالی، رشد و تکثیر یافتند و پس از ۱۰-۱۲ روز، کف فلاسک را اشغال نمودند. با تکثیر و افزایش تعداد سلول‌ها، اشکال ستاره‌ای و چند وجهی کمتر شد و اکثر سلول‌ها دوکی شکل بودند (شکل ۲).



شکل ۲. سلول‌های بنیادی مشتق از پالپ دندان (SHED) یا (Stem cell from human exfoliated deciduous teeth) به صورت شبه فیبروبلاستی و دوکی هستند و قسمت اعظم فلاسک را اشغال کرده‌اند (× ۴۰).



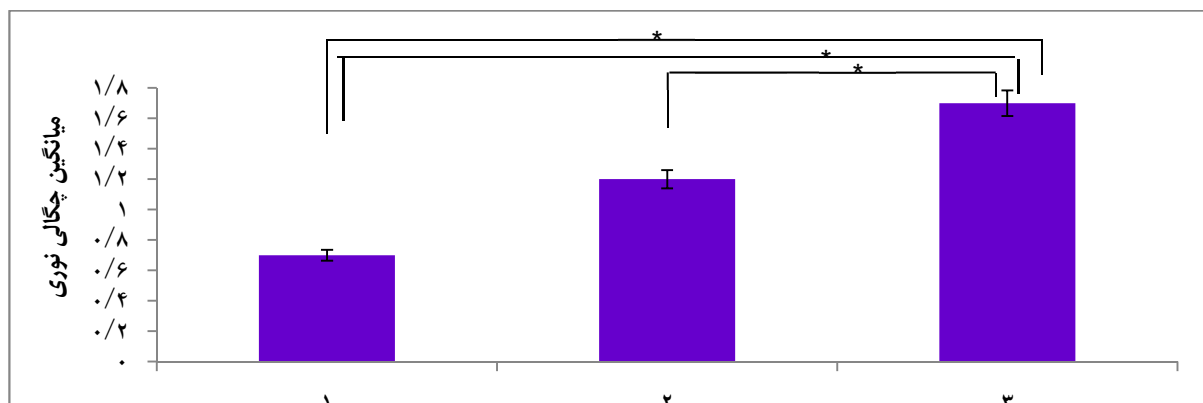
شکل ۱. در تصویر میکروسکوپ اینورت سلول‌های K562 در کشت سوسپانسیونی به صورت معلق، کروی و شبه‌کلونی مشخص می‌باشند (× ۴۰).

تکثیر سلول‌های توموری کاهش یافت. در گروه اول که سلول‌های بنیادی مشتق از پالپ دندان ۱۰ برابر سلول‌های K562 بود، میزان تکثیر سلول‌های سرطانی حداقل و در گروه سوم که سلول‌های بنیادی مشتق از پالپ دندان ۰/۱ سلول‌های K562 بود، حداکثر تکثیر سلول‌های توموری مشاهده گردید. پس از مقایسه‌ی این دو گروه با یکدیگر، اختلاف معنی‌داری به دست آمد ($P \leq 0/050$) (اشکال ۳ و ۴).

نتایج رنگ‌آمیزی MTT و تریپان بلو: پس از

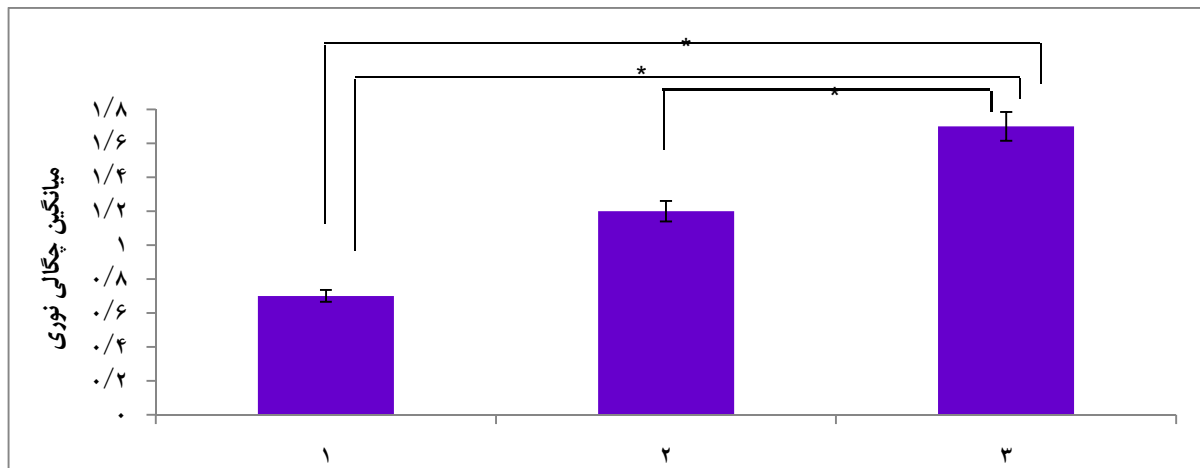
هم‌کشتی سلول‌های بنیادی پالپ دندان و توموری K562 با نسبت‌های سلولی مختلف در دو زمان، میزان تکثیر و بقای نمونه‌های مورد آزمایش از طریق روش‌های MTT مقایسه گردید.

مقایسه‌ی نتایج MTT در گروه‌های مختلف پس از ۴۸ و ۹۶ ساعت هم‌کشتی نشان داد که با افزایش دانسیته‌ی سلول‌های بنیادی نسبت به توموری میانگین



شکل ۳. میزان تکثیر سلول‌های توموری رده‌ی K562 در شرایط هم‌کشتی با سلول‌های بنیادی مشتق از پالپ دندان به مدت ۴۸ ساعت که با روش MTT assay [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] بررسی گردید. نتایج نشان داد که با افزایش دانسیته‌ی سلول‌های بنیادی نسبت به توموری، میانگین تکثیر سلول‌های توموری کاهش یافت ($P \leq 0/050$).

در گروه ۱ تعداد سلول‌های بنیادی ۱۰ برابر سلول‌های توموری، در گروه ۲ تعداد سلول‌های بنیادی برابر با سلول‌های توموری و در گروه ۳ تعداد سلول‌های بنیادی ۰/۱ سلول‌های توموری بود.



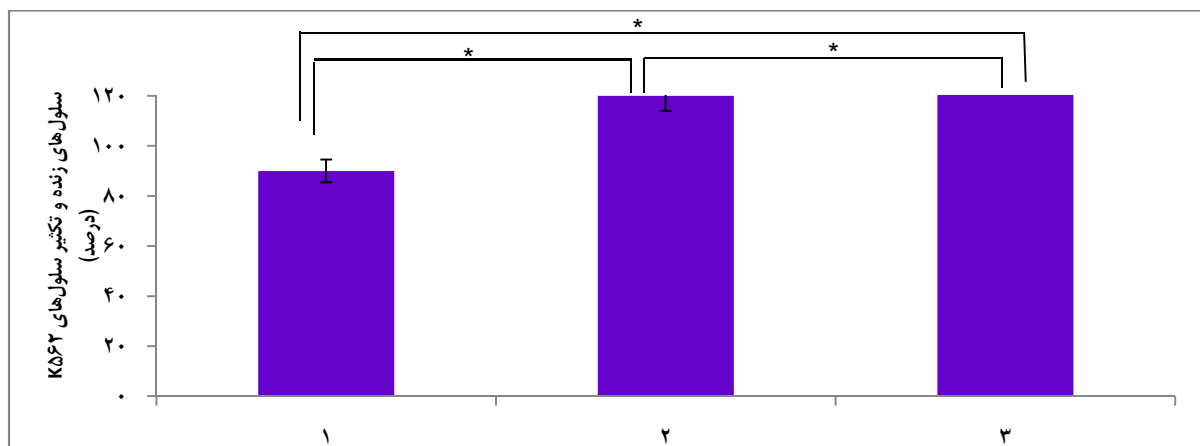
شکل ۴. میزان تکثیر سلول‌های توموری رده‌ی K562 در شرایط هم‌کشتی با سلول‌های بنیادی مشتق از پالپ دندان به مدت ۹۶ ساعت که با روش MTT assay [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] بررسی گردید. نتایج نشان داد که با افزایش دانسیته‌ی سلول‌های بنیادی نسبت به توموری، میانگین تکثیر سلول‌های توموری کاهش یافت ($P \leq 0/050$).

در گروه ۱ تعداد سلول‌های بنیادی ۱۰ برابر سلول‌های توموری، در گروه ۲ تعداد سلول‌های بنیادی برابر با سلول‌های توموری و در گروه ۳ تعداد سلول‌های بنیادی ۱/۱ سلول‌های توموری بود.

بود و در نسبت سلولی ۱۰ برابر سلول‌های بنیادی مشتق از پالپ دندان در مقایسه با سلول‌های K562، میزان تکثیر سلول‌های سرطانی در مقایسه با گروه‌های دیگر کاهش معنی‌داری را نشان داد ($P \leq 0/050$) (اشکال ۵ و ۶).

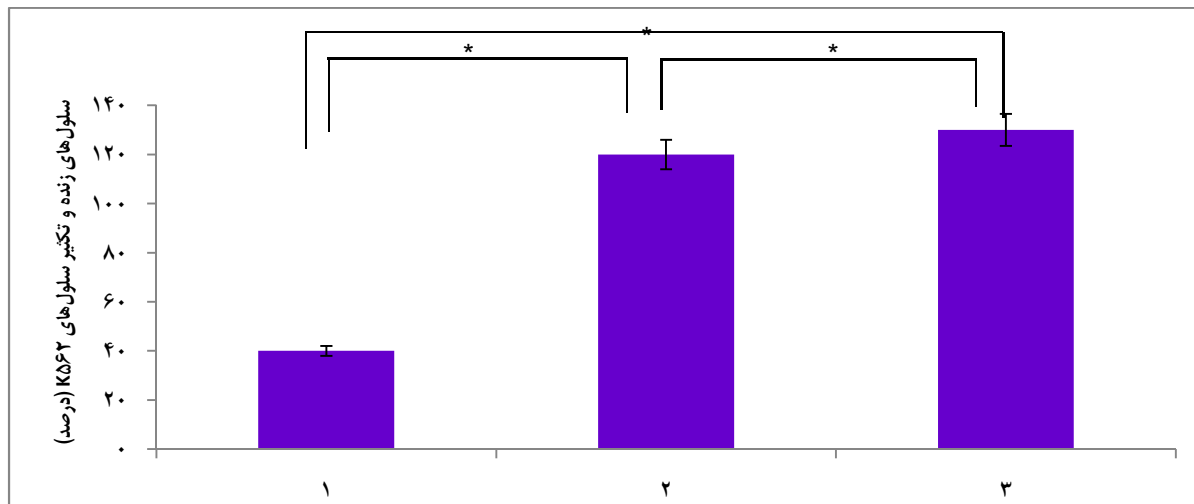
نتایج رنگ‌آمیزی تریپان بلو: نتایج شمارش

سلول‌های زنده پس از هم‌کشتی سلول‌های بنیادی پالپ دندان و توموری K562 با نسبت‌های سلولی مختلف در دو زمان ۴۸ و ۹۶ ساعت مطابق با نتایج روش MTT



شکل ۵. درصد سلول‌های زنده و تکثیر سلول‌های K562 در شرایط هم‌کشتی با سلول‌های بنیادی مشتق از پالپ دندان به مدت ۴۸ ساعت که از طریق روش رنگ‌آمیزی با تریپان بلو بررسی گردید. با افزایش سلول‌های بنیادی نسبت به توموری، درصد سلول‌های زنده‌ی توموری کاهش نشان داد و میزان تکثیر در تمام گروه‌ها در مقایسه با یکدیگر اختلاف معنی‌دار داشته است ($P \leq 0/050$). گروه اول با نسبت ۱ به ۱۰ (سلول‌های K562 به سلول‌های بنیادی)؛ گروه دوم با نسبت ۱ به ۱ (سلول‌های K562 به سلول‌های بنیادی)؛

گروه سوم با نسبت ۱۰ به ۱ (سلول‌های K562 به سلول‌های بنیادی)



شکل ۶. درصد سلول‌های زنده و تکثیر سلول‌های K562 در شرایط هم‌کشتی با سلول‌های بنیادی مشتق از پالپ دندان به مدت ۹۶ ساعت که از طریق روش رنگ‌آمیزی با تریپان بلو بررسی گردید. با افزایش سلول‌های بنیادی نسبت به توموری، درصد سلول‌های زنده‌ی توموری کاهش نشان داد و میزان تکثیر در تمام گروه‌ها در مقایسه با یکدیگر اختلاف معنی‌دار داشت ($P \leq 0.05$). گروه اول با نسبت ۱ به ۱۰ (سلول‌های

K562 به سلول‌های بنیادی): گروه دوم با نسبت ۱ به ۱ (سلول‌های K562 به سلول‌های بنیادی)

گروه سوم با نسبت ۱۰ به ۱ (سلول‌های K562 به سلول‌های بنیادی)

بار از مغز استخوان جداسازی شدند، اما تحقیقات بعدی، وجود آن‌ها را در بسیاری از بافت‌های بالغین شامل بافت چربی، خون محیطی، بافت پیوندی ماهیچه‌ها، پالپ دندان و همچنین در بافت‌های جنینی مانند ریه و طحال جنینی، خون بند ناف، مایع آمنیوتیک و جفت به خوبی نشان داد. این سلول‌ها دارای پتانسیل‌های تمایز یافتگی و ویژگی‌های ایمونولوژیک و ترمیم هستند (۳۰-۲۹، ۱۹، ۳). نکته‌ی مهمی که در مورد سلول‌های بنیادی مزانشیمی به دست آمده از بافت‌های مختلف باید مد نظر باشد، این است که اگر چه سلول‌های بنیادی مزانشیمی از نظر ویژگی‌های کلی شبیه هم هستند، اما به طور دقیق مانند یکدیگر رفتار نمی‌کنند و تفاوت‌هایی نیز در قدرت تکثیر، توانایی سرکوب ایمنی و توانایی تمایز به بافت‌های مختلف با هم را دارند (۱۹). از مهم‌ترین ویژگی سلول‌های بنیادی، توانایی آن‌ها در

بحث

سلول‌های بنیادی به عنوان سلول‌هایی تعریف شده‌اند که توانایی خودنوزایی (Self-renewal) و پتانسیل تمایز (Multi potent) را دارند که می‌توانند به سلول‌های دختری و به انواع سلول‌های بالغ تبدیل شوند (۱-۲) و به طور کامل بقای خود را حفظ کنند و حتی دچار آتروفی و هاپیر پلازی زودرس نیز نمی‌شوند (۲۶). این سلول‌ها به عنوان منبع سلولی احتمالی برای تمام بافت‌ها، به علت توانایی در تمایز به هر نوع سلولی، پتانسیل درمانی زیادی دارند (۲۷). به طور کلی، سلول‌های بنیادی بر اساس قدرت تمایز و درجه ی خودنوزایی تقسیم‌بندی می‌شوند. بر اساس منشأ، حداقل دو دسته سلول‌های بنیادی رویانی (Embryonic stem cell) و بالغ (Adult) وجود دارند (۲۸-۲۹). هر چند که سلول‌های بنیادی مزانشیمی برای اولین

را ترشح و خاصیت پیش بقا (Pro-survival) را از خود نشان دادند، اما سلول‌های MSC (Mesenchymal stem cells) بر روی گلیوبلاستوما اثر بازدارنده داشتند. آن‌ها پیشنهاد کردند که تمام نتایج بستگی به پاسخ سلول توموری به عوامل ترشح شده‌ی پاراکرینی از MSC دارد که منجر به فعالیت‌های دینامیک و واکنش‌های معکوس بین سلول‌های توموری بدخیم و استروما می‌شود (۳۴).

Suchanek و همکاران بیان کردند که در زمان طولانی مدت کشت، سلول‌های SHED علایمی از دژنره شدن و تخریب و تمایز خود به خودی از خود نشان نمی‌دهند و این ویژگی، استفاده‌ی SHED را برای زمان‌های ۴۸ و ۹۶ ساعت مناسب‌تر کرده است (۳۵). Nakamura و همکاران در محیط کشت از SHED و سلول‌های بنیادی مشتق از مغز استخوان استفاده و مشاهده نمودند که سرعت تکثیر SHED در مقایسه با سلول‌های مغز استخوان به میزان ۵۰ درصد بیشتر است. علاوه بر آن در SHED، ژن‌هایی وجود دارند که بیان بسیار بالایی دارند و در ارتباط با افزایش تکثیر سلولی و ماتریکس خارج سلولی عمل می‌نمایند (۳۶). در تحقیقی دیگر که توسط Kerkis و همکاران صورت گرفت، بیان گردید که سلول‌های بنیادی مشتق از مغز استخوان می‌توانند به سمت سرطانی شدن پیشرفت نمایند که این حالت در رابطه با سلول‌های SHED دیده نشده است (۳۷). در چند تحقیق دیگر گزارش شده است که هم‌کشتی سلول‌های ADSC (Adipose derive stem cell) با سلول‌های سرطانی K562 باعث کاهش تکثیر در سلول‌های توموری می‌شود (۲۳-۲۴، ۸). Fonseka و همکاران نمونه‌ای از هم‌کشتی سلول‌های K562 با

سرکوب سیستم ایمنی است. سلول‌های بنیادی دارای پتانسیل درمانی هستند؛ بدین صورت که می‌توانند از پس زدن بافتی جلوگیری کنند و در ترمیم نقایص جنینی و درمان بیماری‌های خود ایمنی نیز کارا باشند (۱۳). دیده شده است که سلول‌های بنیادی می‌توانند تکثیر لئوسیت‌ها را مهار کنند و هر چه میزان دانسیته‌ی سلول‌های بنیادی بیشتر باشد، این سرکوب نیز بیشتر است (۳۱-۳۲). در تحقیق حاضر نیز با افزایش سلول‌های بنیادی نسبت به توموری، درصد سلول‌های زنده‌ی توموری کاهش یافت.

Keramidas و همکاران اعلام کردند که خاصیت ضد ایمنی سلول‌های بنیادی به خاطر این است که این سلول‌ها، عوامل محلول را ترشح می‌کنند که این عوامل، پتانسیل تکثیری سلول‌های توموری را کاهش می‌دهند (۳۳). در مطالعه‌ی دیگر که توسط Zhu و همکاران صورت گرفت، گزارش شد که سلول‌های بنیادی با ترشح موادی از قبیل IL8, IFN β (Interferon β)، TNF α (Tumor necrosis factor) و IFN γ ، IL6 و IFN γ مانع تکثیر سلول‌های توموری و همچنین با ترشح عواملی از قبیل Dikfopt باعث القای آپوپتوز در سلول‌های توموری می‌شوند (۸).

Kucerova و همکاران، اثر سلول‌های بنیادی مشتق از چربی را بر روی دو رده‌ی سلول توموری مختلف از نوع ملانوما (Melanoma) و گلیوبلاستوما (Glioblastoma) بررسی کردند. اگر چه سلول‌های مزانشیمی به طور کامل مشابه و از یک منشأ بودند، اما وقتی هر دو رده‌ی سلول توموری با سلول‌های بنیادی مزانشیمی مجاور شدند، نتایج مختلفی به دست آمد. سلول‌های ملانوما عوامل پیش رگ‌زایی و پیش التهابی (Pro-inflammatory/pro-angiogenic)

سلول‌های توموری این گروه نسبت به گروه شاهد افزایش بسیار زیادی پیدا کرده است. شاید بتوان از این یافته به این نتیجه رسید که در هم‌کشتی سلول‌های بنیادی و توموری، نسبت سلولی نیز علاوه بر زمان از اهمیت برخوردار است.

نتیجه‌ی تحقیق حاضر با آن چه که Fonseka و همکاران گزارش نمودند، متفاوت است؛ شاید دلیل این تفاوت، استفاده از سلول‌های بنیادی متفاوت باشد، اما نتایج تحقیق حاضر مؤید تحقیق Crop و همکاران مبنی بر آن است که عملکرد سلول‌های بنیادی حتی اگر همگی منشأ مزانشیمی یکسانی داشته باشند، در شرایط متفاوت می‌تواند متفاوت باشد (۳۲).

نتیجه‌گیری

درمان سرطان (که یکی از معضلات پزشکی جوامع امروز است) توجه بسیاری از دانشمندان و پژوهشگران را به خود جلب کرده است. در تحقیق حاضر اگر چه در نسبت بالای سلول‌های بنیادی به توموری و در مدت ۹۶ ساعت هم‌کشتی، توانست تکثیر سلول‌های توموری را کنترل نماید؛ اما توجه به این نکته مهم است که این نتیجه در محیط آزمایشگاهی (In vitro) و بر روی یک رده‌ی سلولی حاصل شده است و با محیط داخل بدن (In vivo) بسیار متفاوت است. از این رو تحقیقات بسیار زیاد دیگری لازم است تا شاید بتواند در درمان سرطان مؤثر باشد.

تشریح و قدردانی

این مقاله حاصل پایان‌نامه‌ی دوره‌ی کارشناسی ارشد مناگرگی به شماره‌ی طرح پژوهشی ۳۹۲۴۴۵ در دانشگاه علوم پزشکی اصفهان است.

سلول‌های مزانشیمی مشتق از بند ناف را از طریق هم‌کشتی مستقیم و ترنس ول با نسبت‌های مختلفی از قبیل ۱/۱۰، ۱/۵، ۱/۱ و ۱/۱۰ (سلول بنیادی به توموری) مورد آزمایش قرار دادند. آن‌ها تعداد سلول‌های توموری K562 را در تمام نسبت‌ها ثابت و زمان را ۴۸ ساعت در نظر گرفتند. نتیجه‌ی گزارش این بود که در تمام نمونه‌ها، سلول‌های بنیادی مانع از تکثیر سلول‌های توموری و توقف تقسیم سلولی در مرحله‌ی G0/G1 شده بود و همچنین کاهش رشد سلول‌های توموری در هم‌کشتی مستقیم بیشتر از هم‌کشتی غیر مستقیم بود (۲۴). در تحقیق حاضر، با همین بازه‌ی زمانی (۴۸ ساعت) و با استفاده از هم‌کشتی مستقیم مشاهده شد که سلول‌های بنیادی با این که از لحاظ نسبت، ۱۰ برابر سلول‌های توموری بودند، اما تأثیری بر کاهش رشد تومور نداشتند. در سایر نمونه‌ها، زمانی که سلول‌های توموری از نظر تعداد نسبت به سلول‌های بنیادی بیشتر یا برابر بودند، سلول‌های بنیادی علاوه بر این که تکثیر سلول‌های توموری را مهار نکردند، باعث افزایش رشد سلول‌های توموری نیز شدند. در زمان ۹۶ ساعت در گروهی که هم‌کشتی سلول‌های SHED و K562 به نسبت ۱۰ به ۱ انجام گرفت، یعنی تعداد سلول‌های بنیادی ۱۰ برابر سلول‌های سرطانی بود، میزان تکثیر سلول‌های سرطانی کاهش معنی‌داری داشت؛ در حالی که در زمان ۴۸ ساعت این هم‌کشتی و این نسبت تأثیری بر روند تکثیر و بقای سلولی نداشت که بیانگر آن است که زمان هم‌کشتی در تکثیر و یا آپوپتوز سلول‌های توموری اهمیت دارد. در هر دو زمان، در گروه دوم و سوم که نسبت سلول‌های K562 به SHED به ترتیب ۱۰ به ۱ و ۱ به ۱ بوده است،

References

- Cai J, Rao MS. Stem cell and precursor cell therapy. *Neuromolecular Med* 2002; 2(3): 233-49.
- Payne N, Siatskas C, Bernard CC. The promise of stem cell and regenerative therapies for multiple sclerosis. *J Autoimmun* 2008; 31(3): 288-94.
- Alipour R, Sadeghi F, Hashemi-Beni B, Zarkesh-Esfahani SH, Heydari F, Mousavi SB, et al. Phenotypic characterizations and comparison of adult dental stem cells with adipose-derived stem cells. *Int J Prev Med* 2010; 1(3): 164-71.
- Muller I, Lymperi S, Dazzi F. Mesenchymal stem cell therapy for degenerative inflammatory disorders. *Curr Opin Organ Transplant* 2008; 13(6): 639-44.
- Bochev I, Elmadjian G, Kyurkchiev D, Tzvetanov L, Altankova I, Tivchev P, et al. Mesenchymal stem cells from human bone marrow or adipose tissue differently modulate mitogen-stimulated B-cell immunoglobulin production in vitro. *Cell Biol Int* 2008; 32(4): 384-93.
- Huang GT, Gronthos S, Shi S. Mesenchymal stem cells derived from dental tissues vs. those from other sources: their biology and role in regenerative medicine. *J Dent Res* 2009; 88(9): 792-806.
- Petrovic V, Stefanovic V. Dental tissue--new source for stem cells. *Scientific World Journal* 2009; 9: 1167-77.
- Zhu Y, Sun Z, Han Q, Liao L, Wang J, Bian C, et al. Human mesenchymal stem cells inhibit cancer cell proliferation by secreting DKK-1. *Leukemia* 2009; 23(5): 925-33.
- Bergfeld SA, DeClerck YA. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells and the tumor microenvironment. *Cancer Metastasis Rev* 2010; 29(2): 249-61.
- Djouad F, Plerce P, Bony C, Tropel P, Apparailly F, Sany J, et al. Immunosuppressive effect of mesenchymal stem cells favors tumor growth in allogeneic animals. *Blood* 2003; 102(10): 3837-44.
- Valtieri M, Sorrentino A. The mesenchymal stromal cell contribution to homeostasis. *J Cell Physiol* 2008; 217(2): 296-300.
- DelaRosa O, Lombardo E. Modulation of adult mesenchymal stem cells activity by toll-like receptors: implications on therapeutic potential. *Mediators Inflamm* 2010; 2010: 865601.
- Shi Y, Hu G, Su J, Li W, Chen Q, Shou P, et al. Mesenchymal stem cells: a new strategy for immunosuppression and tissue repair. *Cell Res* 2010; 20(5): 510-8.
- Sonoyama W, Liu Y, Fang D, Yamaza T, Seo BM, Zhang C, et al. Mesenchymal stem cell-mediated functional tooth regeneration in swine. *PLoS One* 2006; 1: e79.
- Rhodes LV, Muir SE, Elliott S, Guillot LM, Antoon JW, Penfornis P, et al. Adult human mesenchymal stem cells enhance breast tumorigenesis and promote hormone independence. *Breast Cancer Res Treat* 2010; 121(2): 293-300.
- Han Z, Jing Y, Zhang S, Liu Y, Shi Y, Wei L. The role of immunosuppression of mesenchymal stem cells in tissue repair and tumor growth. *Cell Biosci* 2012; 2(1): 8.
- Frank RT, Najbauer J, Aboody KS. Concise review: stem cells as an emerging platform for antibody therapy of cancer. *Stem Cells* 2010; 28(11): 2084-7.
- Uccelli A, Pistoia V, Moretta L. Mesenchymal stem cells: a new strategy for immunosuppression? *Trends Immunol* 2007; 28(5): 219-26.
- Lu YR, Yuan Y, Wang XJ, Wei LL, Chen YN, Cong C, et al. The growth inhibitory effect of mesenchymal stem cells on tumor cells in vitro and in vivo. *Cancer Biol Ther* 2008; 7(2): 245-51.
- Siddiqi A, Long LM, Li L, Marciniak RA, Kazhdan I. Expression of HER-2 in MCF-7 breast cancer cells modulates anti-apoptotic proteins Survivin and Bcl-2 via the extracellular signal-related kinase (ERK) and phosphoinositide-3 kinase (PI3K) signalling pathways. *BMC Cancer* 2008; 8: 129.
- Galie M, Konstantinidou G, Peroni D, Scambi I, Marchini C, Lisi V, et al. Mesenchymal stem cells share molecular signature with mesenchymal tumor cells and favor early tumor growth in syngeneic mice. *Oncogene* 2008; 27(18): 2542-51.
- Cousin B, Ravet E, Poglio S, De TF, Bertuzzi M, Lulka H, et al. Adult stromal cells derived from human adipose tissue provoke pancreatic cancer cell death both in vitro and in vivo. *PLoS One* 2009; 4(7): e6278.
- Klopp AH, Gupta A, Spaeth E, Andreeff M, Marini F, III. Concise review: Dissecting a discrepancy in the literature: do mesenchymal stem cells support or suppress tumor growth? *Stem Cells* 2011; 29(1): 11-9.
- Fonseka M, Ramasamy R, Tan BC, Seow HF. Human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells (hUCB-MSC) inhibit the proliferation of K562 (human erythromyeloblastoid leukaemic cell line). *Cell Biol Int* 2012; 36(9): 793-801.
- Wei Z, Chen N, Guo H, Wang X, Xu F, Ren Q, et al. Bone marrow mesenchymal stem cells from leukemia patients inhibit growth and apoptosis in serum-deprived K562 cells. *J Exp Clin Cancer Res* 2009; 28: 141.

26. Rossi DJ, Jamieson CH, Weissman IL. Stems cells and the pathways to aging and cancer. *Cell* 2008; 132(4): 681-96.
27. Yang J, Rostami A, Zhang GX. Cellular remyelinating therapy in multiple sclerosis. *J Neurol Sci* 2009; 276(1-2): 1-5
28. Togel F, Westenfelder C. Adult bone marrow-derived stem cells for organ regeneration and repair. *Dev Dyn* 2007; 236(12): 3321-31.
29. Hashemibeni B, Razavi S, Esfandiary E, Karbasi S, Mardani M, Nasresfahani M. Induction of chondrogenic differentiation of human adipose-derived stem cells with TGF- β 3 in pellet culture system. *Iran J Basic Med Sci* 2008, 11(1): 10-7.
30. Hashemibeni B, Razavi S, Esfandiary E, Karbasi S, Mardani M, Sadeghi F, et al. The effect of BMP-6 growth factor on differentiation of adipose-derived stem cells into chondrocyte in pellet culture. *JIMS* 2009, 27(100): 613-44. [In Persian].
31. Zhang X, Jiao C, Zhao S. Role of mesenchymal stem cells in immunological rejection of organ transplantation. *Stem Cell Rev* 2009; 5(4): 402-9.
32. Crop M, Baan C, Weimar W, Hoogduijn M. Potential of mesenchymal stem cells as immune therapy in solid-organ transplantation. *Transpl Int* 2009; 22(4): 365-76.
33. Keramidas M, de Fraipont F, Karageorgis A, Moisan A, Persoons V, Richard MJ, et al. The dual effect of mesenchymal stem cells on tumour growth and tumour angiogenesis. *Stem Cell Res Ther* 2013 29; 4(2): 41.
34. Kucerova L, Matuskova M, Hlubinova K, Altanerova V, Altaner A: Tumor cellsbehaviour modulation by mesenchymal stromal cells. *Mol Cancer* 2010; 9: 129-34.
35. Suchanek J, Visek B, Soukup T, El-Din Mohamed SK, Ivancakova R, Mokry J, et al. Stem cells from human exfoliated deciduous teeth--isolation, long term cultivation and phenotypical analysis. *Acta Medica (Hradec Kralove)* 2010; 53(2): 93-9.
36. Nakamura S, Yamada Y, Katagiri W, Sugito T, Ito K, Ueda M. Stem cell proliferation pathways comparison between human exfoliated deciduous teeth and dental pulp stem cells by gene expression profile from promising dental pulp. *J Endod* 2009; 35(11): 1536-42.
37. Kerkis I, Kerkis A, Dozortsev D, Stukart-Parsons GC, Gomes Massironi SM, Pereira LV, et al. Isolation and characterization of a population of immature dental pulp stem cells expressing OCT-4 and other embryonic stem cell markers. *Cells Tissues Organs* 2006; 184(3-4): 105-16.

The Effects of Coculture of Stem Cells from Human Exfoliated Deciduous Teeth (SHED) on K562 Tumor Cells

Mona Gorji¹, Batoul Hashemibeni PhD², Hamid Bahramian PhD², Hosein Salehi PhD³,
Razieh Alipour MSc⁴, Maryam Aliakbari⁵

Original Article

Abstract

Background: Due to increased prevalence of cancer in human population, the effectiveness of chemotherapy and drug (therapy) is reducing because of recurrence and drug-resistance. Therefore, scientists are trying other options such as cell-therapy. Among the cells, scientists have more focused on evaluating effect of stem cells on tumor cells. Since there were controversial reports on this effect in literature, the aim of this study was to assess the proliferation and survival of K562 tumor cells cocultured with stem cells from human exfoliated deciduous teeth (SHED).

Methods: Stem cells were isolated from human exfoliated deciduous teeth and cultured K562 cells were obtained from the Pasteur institute of Iran. Stem cells and K562 were directly cocultured with each other and the ratios of K562 to stem cells were 1/10, 10/1, and 1/1. In this study, the viability and proliferation of the cells via MTT assay [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] and trypan blue staining.

Findings: The trypan blue and MTT assay results of 48 hours coculture with ratio of 1/10 in comparison with control group did not show any significance difference. But with this ratio, at 96 hour, proliferation of K562 compared to control had reduced significantly; and in other ratios (1/1 and 1/10) at 48 and 96 hours, proliferation of K562 increased significantly ($P < 0.05$).

Conclusion: Results of our study revealed that in this coculture, increased number of stem cells had an inhibitory effect on proliferation of K562 cells. Moreover, low numbers of stem cells not only were not able to inhibit tumor cells, but also contributed to improve their proliferation.

Keywords: Human exfoliated deciduous teeth (SHED), Stem cell, K562 tumor cell, Coculture

Citation: Gorji M, Hashemibeni B, Bahramian H, Salehi H, Alipour R, Aliakbari M. **The Effects of Coculture of Stem Cells from Human Exfoliated Deciduous Teeth (SHED) on K562 Tumor Cells.** J Isfahan Med Sch 2014; 32(304): 1633-45

1- MSc Student, Department of Anatomical Sciences, School of Medicine AND Student Research Committee, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan. Iran

2- Associate Professor, Department of Anatomical Sciences, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan. Iran

3- Assistant Professor, Department of Anatomical Sciences, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan. Iran

4- PhD student, Department of Immunology, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan. Iran

5- Department of Anatomical Sciences, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan. Iran

Corresponding Author: Batoul Hashemibeni PhD, Email: hashemibeni@med.mui.ac.ir