

Research Article

A Comparative Study of Nucleostemin Gene Expression in Two-Dimensional Culture Medium and Multicellular Breast Cancer Spheroids

Naemeh Rezapour¹, Vajiheh Zarrinpour¹, Mohammad Kamalabadi-Farahani^{2*}, Amir Atashi³

1- Department of Biology, Damghan Branch, Islamic Azad University, Damghan, Iran

2- Department of Tissue Engineering, School of Medicine, Shahroud University of Medical Sciences, Shahroud, Iran

3- Department of Medical Laboratory Sciences, School of Paramedical, Shahroud University of Medical Sciences, Shahroud, Iran

*Corresponding author: kamalabadi@shmu.ac.ir

Received: 19 January 2024

Accepted: 4 February 2024

DOI: 10.60833/ascij.2024.1589

Abstract

Breast cancer mortality is mainly due to metastatic disease caused by cancer stem cells. Nucleostemin is a GTP-bound nuclear cofactor that is highly expressed in normal stem cells and tumors and is thought to play an important role in the pathogenesis and metastasis of breast cancer. This study examines the expression level of this gene in a comparison between primary and metastatic tumor cells in two-dimensional and three-dimensional culture conditions. In this study, after creating a mouse model of breast cancer using 4T1 cell line, primary breast cancer cells and brain and lung metastatic tumor cells were isolated and propagated in two-dimensional and three dimensional culture medium. Using real-time PCR reaction, analysis of nucleostemin gene expression was done comparatively between these two culture media. The findings of this experiment showed that the expression of the nucleostemin gene in the metastasis cycle in a two-dimensional culture medium is increased by 6 and 23 times, respectively, in lung and brain metastatic tumor tissue compared to primary tumor cells. In the three-dimensional culture medium, which was done to enrich cancer stem cells, the expression level of nucleostemin gene in primary tumor cells and brain and lung metastatic cells compared to the two-dimensional culture medium in all three cell groups showed a significant decrease in expression. These findings provide information about nucleostemin gene expression in breast cancer metastatic cascade and 3D culture environment, which deserves further discussion. In this regard, analyzing the molecular properties of metastatic tumor cells, can be used to design targeted treatment strategies in the fight against breast cancer metastasis.

Keywords: Breast Cancer, Nucleostemin, Metastasis, Cancer Stem Cells.

مقاله پژوهشی

بررسی مقایسه‌ای میزان بیان ژن نوکلئوستمین در محیط کشت دوبعدی و اسفروئیدهای چند سلولی سرطان پستان

نعیمه رضاپور^۱، وجیهه زرین پور^۱، محمد کمال آبادی فراهانی^{۲*}، امیر آتشی^۳

۱- گروه زیست‌شناسی، واحد دامغان، دانشگاه آزاد اسلامی، دامغان، ایران

۲- گروه مهندسی بافت، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شاهرود، شاهرود، ایران.

۳- گروه هماتولوژی، دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شاهرود، شاهرود، ایران

*مسئول مکاتبات: kamalabadi@shmu.ac.ir

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۱۱/۱۵

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۱۰/۲۹

DOI: 10.60833/ascij.2024.1589

چکیده

مرگ و میر سرطان پستان عمدتاً به دلیل بیماری متاستاتیک است که توسط سلول‌های بنیادی سرطانی ایجاد می‌شود. نوکلئوستمین یک پروتئین هستکی متصل شونده به GTP است که در سلول‌های بنیادی طبیعی و تومورها بیان بالایی دارد و تصور می‌شود نقش مهمی در پاتورنیز و متاستاز سرطان پستان داشته باشد. این مطالعه به بررسی میزان بیان این ژن به صورت مقایسه‌ای بین سلول‌های توموری اولیه و متاستاتیک در شرایط کشت دو بعدی و سه بعدی می‌پردازد. در این مطالعه پس از ایجاد مدل موشی سرطان پستان با استفاده از رده سلولی 4T1، سلول‌های سرطانی اولیه پستان و سلول‌های توموری متاستاتیک مغزی و ریوی، جدا و در محیط کشت دو بعدی و سه بعدی تکثیر شدند. با استفاده از واکنش ریان‌تایم پی‌سی‌آر، تجزیه و تحلیل میزان بیان ژن نوکلئوستمین به صورت مقایسه‌ای بین این دو محیط کشت انجام شد. نتایج حاصل از این آزمایش نشان داد که ژن نوکلئوستمین در چرخه متاستازی در محیط کشت دوبعدی، به ترتیب ۶ و ۲۳ برابر در بافت توموری متاستاتیک ریوی و مغزی نسبت به سلول‌های توموری اولیه، افزایش بیان دارد. در محیط کشت سه بعدی که به منظور غنی سازی سلول‌های بنیادی سرطانی انجام شد، میزان بیان ژن نوکلئوستمین در سلول‌های توموری اولیه و سلول‌های متاستاتیک مغزی و ریوی نسبت به محیط کشت دو بعدی در هر سه گروه سلولی، به طور معنی‌داری کاهش بیان نشان داد. این یافته‌ها اطلاعات جدیدی در مورد بیان ژن نوکلئوستمین در آبشار متاستاتیک سرطان پستان و محیط کشت سه بعدی، ارائه نمود که جای بحث و بررسی بیشتر دارد. در این راستا می‌توان با تجزیه و تحلیل خواص مولکولی سلول‌های تومور متاستاتیک در طراحی استراتژی‌های درمانی هدفمند در مبارزه با متاستاز سرطان پستان بهره برد.

کلمات کلیدی: سرطان پستان، نوکلئوستمین، متاستاز، سلول‌های بنیادی سرطانی.

مقدمه

سرطان پستان به‌عنوان شایع‌ترین نوع سرطان، یکی از علل اصلی مرگ‌ومیر ناشی از سرطان در میان زنان است (۶) که در اثر تکثیر بدخیم سلول‌های اپی‌تلیال پوشاننده مجاری یا لوبول‌های بافت پستان ایجاد می‌شود و مانند تمام بدخیمی‌های اپی‌تلیالی با افزایش سن به تدریج افزایش می‌یابد (۱۳). بیش از ۹۰ درصد

مرگ‌های ناشی از سرطان به دلیل متاستاز به نواحی دوردست است که توسط سلول‌های بنیادی توموری (CSC) ایجاد می‌شوند (۳۱). این سلول‌ها بخش بسیار کوچکی از سلول‌های توموری را تشکیل می‌دهند و با ویژگی بیومارکرهای سطحی، پمپ مقاومت چندگانه دارویی، مسیر خودبازسازی نامنظم و تمایز به انواع سلول‌های متعدد مشخص می‌شوند (۱۶). CSCها نقش تعیین‌کننده‌ای در تحریک سلول‌های سرطانی دارند که منجر به تومورزایی و متاستاز پیشرفته سرطان می‌شود (۲، ۵). اختلال در عملکرد ژن‌هایی که در تنظیم فرایند خودنوزایی سلول‌های بنیادی دخیل می‌باشند، منجر به تکثیر بی‌رویه این سلول‌ها و تشکیل تومور می‌شود (۳۳). نشان داده شده است که CSCها در محیط‌های کشت مخصوص، توانایی تشکیل اسفروئید در شرایط آزمایشگاهی را دارند (۱۹). تصور می‌شود که نوکلئوستمین (Ns) = Nucleostemin) یک مولکول اصلی برای حفظ بنیادی (Stemness) و از جمله ژن‌های خودبازسازی باشد (۱۲، ۲۷) این ژن در بافت‌های تمایز یافته بیانی ندارد و فقط در سلول‌های بنیادی جنینی و بالغ به میزان بالایی بیان می‌شود و به وفور در تومورهای جامد مختلف وجود دارد (۱۵)، و برای پیشرفت تومور پستان ضروری است (۳). پروتئین حاصل از نوکلئوستمین یک پروتئین هستکی ۶۲ کیلو دالتونی متصل به گوانین تری فسفات است که بین هستک و نوکلئوپلاسم در حرکت بوده (۹، ۱۷) و در تعامل با P53 است (۳۰). به نظر می‌رسد این پروتئین می‌تواند یکی از تنظیم‌کننده‌های مربوط به مهار آپوپتوز و افزایش زنده ماندن سلول‌های شروع‌کننده تومور در رده‌های سلولی سرطان پستان و سایر سرطان‌ها باشد (۲۸). نوکلئوستمین در زیرگروه‌های بسیار تهاجمی سرطان پستان از جمله (HER2 Human Epidermal Growth Factor Receptor 2) و (Triple-) TNBC استفاده از

(negative breast cancer) بیشتر بیان می‌شود (۱۲)، (۲۹). مطالعات پیشین نوکلئوستمین را به عنوان پروتئینی مهم برای تومورزایی و متاستاز در سرطان پستان توصیف نموده‌اند (۱۲، ۱۴، ۲۷). با این حال، به نظر می‌رسد بیان و عملکرد این پروتئین به محیط مناسب سلول بستگی زیادی دارد و برای پرداختن به تنظیم و عملکرد این پروتئین در شرایط درون‌تنی، سیستم‌های کشت سلول سه بعدی مناسب‌تر باشد (۷، ۲۳). تا به امروز، آزمایشات مربوط به بررسی بیان ژن نوکلئوستمین یا در کشت سلولی دو بعدی معمولی یا با استفاده از مدل‌های حیوانی و بهره‌گیری از نمونه‌های بالینی انجام شده است (۲۱). اگرچه دستیابی به کشت سلول‌ها در شرایط دوبعدی و استفاده از آنها برای مطالعه اثرات دارو آسان است ولی مدل‌های دوبعدی محدودیت‌های قابل توجهی در ایجاد پیچیدگی و پاتوفیزیولوژی بافت‌های توموری داخل بدن نشان می‌دهند (۱۱). در تحقیقات سرطان، سیستم‌های کشت سلولی سه‌بعدی با توجه به معماری بافتی و ماتریکس خارج سلولی به طور قابل توجهی در نحوه‌ی پاسخ سلول‌های توموری به سیگنال‌های میکرومحیطی تأثیر دارند (۷). سیستم‌های اسفروئیدی تومور چند سلولی یک سیستم مدل کشت سلول آزمایشگاهی را ارائه می‌دهد که بسیاری از پیچیدگی‌های تومور جامد و ریز تومور در شرایط *in vivo* را تقلید می‌کند و اغلب برای مطالعه رشد سلول‌های سرطانی و اثر دارو استفاده می‌شود. سیستم‌های سه‌بعدی چندین ویژگی عملکردی سلول‌های توموری موجود در داخل بدن را که شامل شیب اکسیژن و مواد مغذی است، به خوبی نشان می‌دهند (۷، ۱۸). بررسی‌های مختلفی در مورد ژن نوکلئوستمین در سرطان پستان انجام شده است. ولی تا به امروز بررسی مقایسه‌ای در مورد نحوه بیان این ژن در جمعیت‌های متاستاتیک سرطان پستان با استفاده از

اسفروئیدها صورت نگرفته است. بنابراین در تحقیق حاضر بر آن شدید تا به مقایسه بیان این ژن در شرایط کشت دو بعدی و اسفروئیدهای چند سلولی سرطان پستان پردازیم. با توجه به تحقیقات انجام شده، به نظر می‌رسد ژن نوکلئوستمین این پتانسیل را داشته باشد تا بیش ارزشمندی در مورد پیشرفت بیماری و مناسب‌سازی در سرطان پستان ارائه دهد.

مواد و روش‌ها

رده سلولی سرطان پستان 4T1 از بانک سلولی انستیتو پاستور ایران (C604) تهیه شد. سلول‌ها در محیط Eagle اصلاح شده Dulbecco با گلوکز بالا (DMEM) حاوی FBS (سرم جنین گاوی) ۱۰ درصد و پنی‌سیلین-استرپتومایسین ۲ درصد (همه از Gibco، ایالات متحده آمریکا) در اتمسفر مرطوب CO₂ ۵ درصد در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد کشت داده شدند.

القای مدل حیوانی سینژنیک سرطان پستان: برای ایجاد مدل موشی سرطان پستان از رده سلولی 4T1 جهت القاء تومور در موش‌های ماده BALB/c (تهیه شده از موسسه رویان-ایران) با سن ۶ تا ۸ هفته با وزن ۲۰ تا ۲۵ گرم استفاده شد. حیوانات در دوره نوری ۱۲ ساعت در قفس قرار گرفتند در حالی که دسترسی آزاد به غذا و آب داشتند. کلیه آزمایشات روی حیوانات مطابق با قوانین مربوطه و با تایید کمیته اخلاق دانشگاه آزاد اسلامی واحد دامغان با شناسه اخلاق IR.IAU.DAMGHAN.REC.1400.023 انجام شد. سلول‌های رده سلولی سرطان پستان 4T1 با استفاده از سرنگ انسولین با سوزن G_{۳۲} به صورت زیر جلدی به پهلو موش (۱۰^۵ سلول معلق در ۱۰۰ میکرولیتر PBS) تزریق شد. موش‌ها روزانه از نظر ظاهر و ویژگی‌های رفتاری تحت نظر قرار گرفتند.

تعداد تکرار آزمایشات: بعد از استحصال سلول‌ها از مدل موشی، این مطالعه شامل ۳ گروه سلولی شامل

سلول‌های توموری اولیه (4T1T)، سلول‌های توموری متاستاتیک ریوی (4T1L) و سلول‌های توموری متاستاتیک مغزی (4T1B) بود. هر گروه سلولی هم در شرایط دو بعدی و هم در شرایط سه بعدی کشت شدند. برای هر گروه، سه ظرف محتوی حداقل یک ۱ میلیون سلول در نظر گرفته شد (یعنی تعداد تکرار آزمایشات ۳ بار بود) و میانگین نتایج آن، به‌عنوان عدد مربوط به متغیر مورد نظر تعیین گردید.

استخراج RNA: در این مطالعه به منظور بررسی بیان سطح ژن نوکلئوستمین در گروه کنترل (سلول‌های توموری اولیه) و گروه هدف (سلول‌های متاستاتیک مغزی و ریوی) مطابق دستورالعمل کیت استخراج RNA اختصاصی (یکتا تجهیز، ایران) (FavorPrep™ Cultured Cell Total RNA Mini Kit) صورت پذیرفت. برای بررسی کیفیت و کمیت RNA استخراج شده از دستگاه نانو دراپ و ژل آگارز استفاده شد.

تعیین غلظت RNA: جهت بررسی کیفیت RNA استخراج شده از ژل آگارز ۱/۵ درصد استفاده شد و برای اطمینان از کمیت و غلظت نمونه‌های RNA استخراج شده با دستگاه نانو دراپ (ترموفیشر) با روش اسپکتروفتومتر مورد ارزیابی قرار گرفت و میزان بهینه خلوص OD 260/280 بین ۱/۸ تا ۲ در نظر گرفته شد.

سنتز cDNA: بعد از استخراج RNA تام سلول، سنتز cDNA با استفاده از کیت مخصوص Easy cDNA Synthesis (شرکت پارس توس) و طبق دستورالعمل انجام شد.

طراحی پرایمر: از ژن خانه‌دار *GAPDH* (Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase) به عنوان ژن کنترل داخلی استفاده شد. توالی پرایمر با نسخه ۶ نرم‌افزار Allele ID طراحی و با استفاده از پایگاه داده‌ی NCBI بلاست (Blast) گردید. (جدول

چرخه تکرار شد که هر سیکل شامل ۳ ثانیه دناتوراسیون در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد، دمای اتصال پرایمرها ۶۰ درجه سانتی‌گراد برای ۳۰ ثانیه و دمای طویل‌سازی قطعات ۳۰ ثانیه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد. مرحله ذوب برای محصولات در دمای ۷۲ تا ۹۵ درجه سانتی‌گراد انجام و از روش $2^{-\Delta\Delta Ct}$ به منظور تعیین میزان بیان نسبی ژن‌ها استفاده شد.

تحلیل آماری: داده‌ها با نرم افزار آماری GraphPad Prism 6.0 (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA) با استفاده از آزمون Paired Samples t تجزیه و تحلیل شد. $p < 0/05$ از نظر آماری معنی‌دار در نظر گرفته شد و نتایج به صورت میانگین \pm انحراف استاندارد بیان شدند.

۱). نوکلئوستیمین دارای سه نوع ترانسکریپت واریانت در انسان و دو نوع ترانسکریپت واریانت کدکننده پروتئین و ترانسکریپت واریانت غیرکدکننده پروتئین در موش است که طراحی پرایمر از رونوشت ترانسکریپت واریانت کدکننده پروتئین موش انجام شد.

واکنش Real-Time PCR: ارزیابی بیان ژن بر اساس cDNA 1ng/ μ l در تمام نمونه‌ها اجرا شد. این ارزیابی با روش SYBR Green به وسیله دستگاه ترمال سایکلر (مدل Thermal cycler T 100 BioRad Company) انجام گرفت. برنامه دمایی به شرح ذیل بود: در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد دناتوراسیون اولیه به مدت ۱۵ دقیقه، یک برنامه واکنش تکثیر برای ۴۰

جدول ۱- توالی پرایمرها

Table 1: Sequence of primers

Product size (bp)	Primer	Gene	Gene ID	Accession N:
160	F: TCAAGTTGGAGTGATTGGTTTC R: GCATGGACTGTCTATGATTGTG	<i>Ns</i>	30877	NM_153547.6
179	F: GGTGAAGGTCGGTGTGAACG R: CTCGCTCCTGGAAGATGGTG	<i>GAPDH</i>	24383	NM_080369.3

نتایج

(شکل ۱b) و سلول‌های تومور متاستاتیک ریه یا 4T1L نام‌گذاری کردیم (شکل ۱d)، سلول‌های تومور اولیه هم با 4T1T مشخص شدند (شکل ۱c). برای رسیدن به جمعیت تخلیص شده از سلول‌های بنیادی توموری، از محیط کشت سه‌بعدی و تشکیل اسفروئید استفاده شد. سلول‌های توموری در محیط کشت سه‌بعدی تعامل بیشتری با هم دارند و به محیط واقعی نزدیک‌ترند. در اینجا، یک سیستم کشت سلولی دوبعدی و سه‌بعدی فراهم شد که در آن سلول‌های سرطانی، ساختارهایی را با تک لایه‌های دوبعدی و اسفروئیدهای سه‌بعدی به نمایش گذاشتند. سلول‌های رشدیافته در اسفروئیدهای سه‌بعدی توانایی تکثیر بالاتر و چسبندگی سلولی قوی‌تری نسبت به هم (نه

مدل حیوانی سرطان پستان متاستاتیک ۳۵ روز پس از القای تومور در موش BALB/c ایجاد شد. پس از تزریق رده سلولی سرطان پستان 4T1 به موش‌های BALB/c، به طور خود به خود تومورهای متاستاتیکی تولید می‌شود که به مغز و ریه متاستاز می‌دهد (شکل ۱a) (۲۶). سپس رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین و ائوزین و تایید پاتولوژیک بر روی بافت‌های تومور و ضایعات متاستاتیک انجام شد. سلول‌های تومور اولیه و متاستاتیک به ترتیب از تومور اولیه پستان، مغز و ریه موش‌های سرطانی استخراج شدند. به دلیل سرعت بالای رشد و تکثیر، سلول‌های تومور در این کلنی‌ها پس از ۳ پاساژ خالص‌سازی شدند. این سلول‌ها را به‌عنوان سلول‌های تومور متاستاتیک مغزی یا 4T1B

داده شده منحنی ذوب SYBR Green به صورت تک قله است که نشان دهنده اختصاصی بودن محصول ژن‌ها در PCR و عدم تشکیل پرایمر دایمر است.

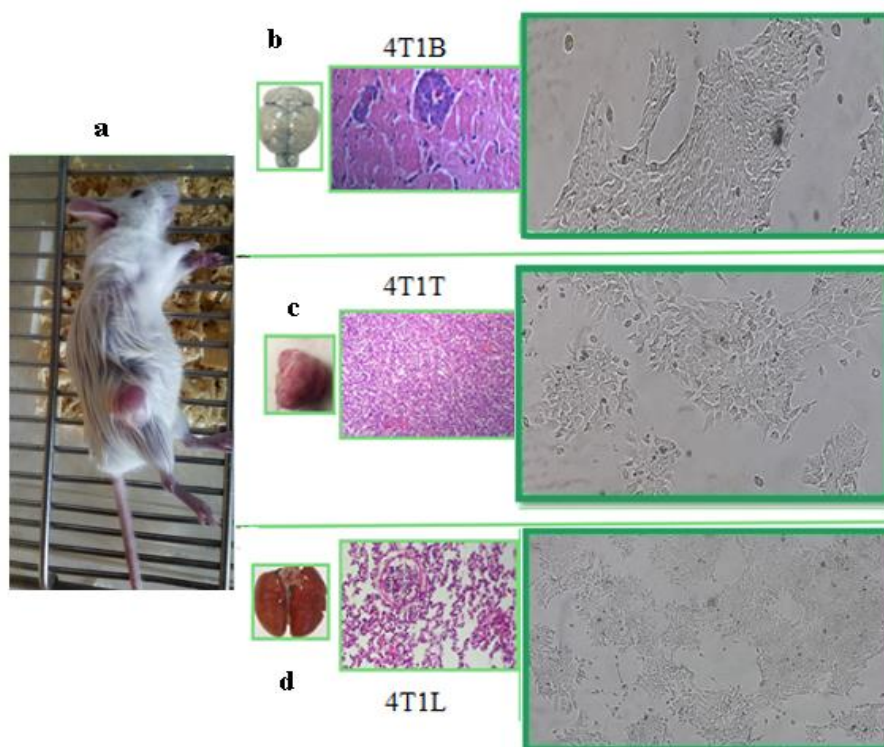
نتایج بیان ژن نوکلئوستمین در شرایط کشت

دوبعدی و سه‌بعدی: بیان نوکلئوستمین در 4T1T، 4T1L و 4T1B مورد بررسی قرار گرفت. کیفیت بازده و اندازه RNA استخراج شده، cDNA سنتز شده و محصولات پی‌سی‌آر با استفاده از نانو دراپ و ژل الکتروفورز تایید شدند. در نمودار ۱ نتایج بیان ژن *Ns* در محیط کشت دوبعدی و در نمودار ۲ بیان این ژن به صورت مقایسه‌ای در محیط کشت دوبعدی و سه‌بعدی نشان داده شده است که نتایج به شرح ذیل می‌باشد: میزان بیان ژن نوکلئوستمین در نمونه توموری متاستاتیک ریه نسبت به نمونه توموری اولیه در شرایط کشت دو بعدی به میزان ۶ برابر افزایش داشت و از نظر آماری این تفاوت بیان کاملاً معنی‌دار است ($p < 0/001$). میزان بیان ژن نوکلئوستمین در نمونه توموری متاستاتیک مغز نسبت به نمونه توموری اولیه در شرایط کشت دو بعدی به میزان ۲۳ برابر افزایش نشان داد که نتایج مربوط به تفاوت بیان در این دو نمونه از نظر آماری کاملاً معنی‌دار است ($p < 0/010$). میزان بیان ژن نوکلئوستمین در نمونه توموری اولیه در محیط کشت اسفروئید سه بعدی (*Tcsc*) نسبت به میزان بیان این ژن در محیط کشت دو بعدی (*T*) برابر کاهش بیان نشان داد (نسبت *Tcsc* با *T*) ($p < 0/01$). میزان بیان ژن نوکلئوستمین در نمونه متاستاتیک مغزی در محیط کشت اسفروئید سه بعدی (*Bcsc*) نسبت به میزان بیان آن در محیط کشت دو بعدی (*B*) ۲۲.۵ برابر کاهش بیان نشان داد. (نسبت *Bcsc* با *B*) ($p < 0/01$). در نمونه متاستاتیک ربوی نیز در محیط کشت اسفروئید سه بعدی (*Lcsc*) نسبت به میزان بیان این ژن در محیط کشت دو بعدی (*L*) ۴۳.۷ برابر کاهش بیان نشان داد.

اتصال به سطح) دارند و از آنجا که سلول‌های توموری در محیط اسفروئیدی از فضای سه‌بعدی برای رشد استفاده می‌کنند، با یکدیگر تعامل بیشتری دارند و در نتیجه، به نظر می‌رسد تغییرات در بیان ژن‌ها در این محیط کشت به واقعیت نزدیک‌تر باشد (۱۰). در اینجا پس از انتقال سلول‌های توموری اولیه و سلول‌های متاستاتیک ریه و مغز به آزمایشگاه، مراحل کشت این سلول‌ها در محیط کشت DMEM انجام شد و پس از سه روز جمعیت سلول‌های توموری با میکروسکوپ نوری معکوس مورد بررسی قرار گرفت و پس از اینکه تعداد سلول‌ها به حجم کافی رسید، پاساژ سلولی در روز سوم انجام شد. در ادامه پاساژ سلول‌ها سه روز بعد، در دو نوبت دیگر تکرار شد. مورفولوژی سلول‌ها کاملاً وابسته به نوع کشت است. برای بررسی کیفیت RNA استخراج شده، آن را بر روی ژل آگارز ۲٪ بارگذاری نمودیم که در ادامه باندهای ۱۸s و ۲۸s به تفکیک و براساس وزن مولکولی قابل رویت گردید. ژل آگارز در اتیدیوم بروماید با غلظت ۰.۵ میکروگرم بر میکرولیتر رنگ-آمیزی شد. نتایج الکتروفورز در شکل ۲ قابل مشاهده است. مشاهده باندها به تفکیک بیانگر عدم تجزیه RNA و اطمینان به کیفیت آن جهت سنتز cDNA می‌باشد. نمودار تکثیر ژن‌های *GAPDH* و *Ns* در شکل ۳ نمایش داده شده است. این نمودار تایید کننده افزایش میزان فلورسانس است که به وسیله دستگاه Real-Time PCR (BIO RAD) صورت گرفت و در آن تکثیر نمونه‌ها نشان داده می‌شود که موید افزایش میزان محصول PCR ژن‌های مذکور است. برای تایید نتایج و بررسی اختصاصیت پرایمرها از منحنی ذوب استفاده می‌شود. منحنی ذوب ژن‌های *GAPDH*، *Ns* در شکل ۴ نمایش داده شده که عبور منحنی‌ها از خط پایه در دماهای مورد نظر نشان‌دهنده تکثیر صحیح ژن‌های مورد مطالعه است. همانطور که در شکل نشان

توموری اولیه افزایش بیان داشته است. مطابق نمودار ۳ به طور کلی داده‌ها نشان داد که میزان بیان ژن Ns در شرایط کشت دوبعدی با سه بعدی تفاوت‌های معناداری دارد که حاکی از تاثیر نوع محیط کشت بر میزان بیان ژن‌ها است. از آنجا که سلول‌های توموری در محیط کشت سه بعدی با یکدیگر تعامل بیشتری داشته و به شرایط درون‌تنی نزدیک‌ترند احتمالاً نتایج بیان ژن‌ها در محیط کشت سه‌بعدی به واقعیت نزدیک‌تر باشد. طبق نتایج این تحقیق در شرایط کشت دوبعدی، میزان بیان ژن Ns در سلول‌های متاستاتیک مغزی و ریوی نسبت به سلول‌های توموری اولیه (به عنوان گروه کنترل) افزایش بیان داشتند و این افزایش بیان در سلول‌های متاستاتیک مغزی بسیار چشمگیر بود. درحالی‌که در محیط کشت سه‌بعدی هر سه گروه سلولی نسبت به محیط کشت دوبعدی کاهش بیان قابل ملاحظه‌ای داشتند.

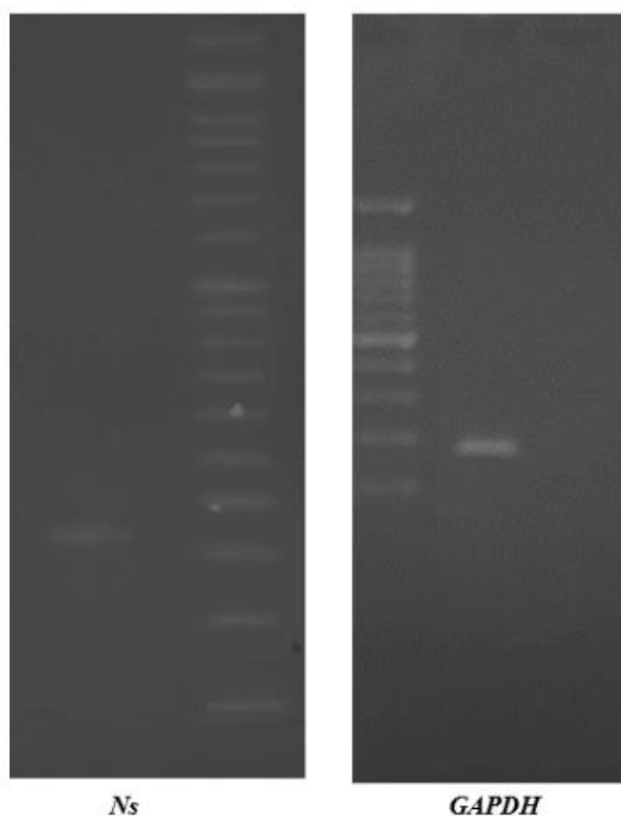
(نسبت Lcsc با L) ($p < 0/05$). تمام نتایج به صورت میانگین \pm انحراف معیار از حداقل سه آزمایش مستقل، بدست آمد و از نظر آماری کاملاً معنی‌دار بودند. این نتایج نشان‌دهنده نقش نوکلئوستمین در تومورهای متاستاتیک در شرایط کشت دو و سه بعدی است. این نتایج می‌تواند به عنوان ابزاری برای شناسایی و انتخاب درمان‌های مناسب در برابر تومورهای متاستاتیک و پیشگیری از گسترش آنها، مورد استفاده قرار گیرد. نتایج حاصل از این آزمایش نشان داد که بیان ژن نوکلئوستمین در محیط کشت سه بعدی در سلول‌های توموری اولیه و سلول‌های متاستاتیک مغز و ریه نسبت به محیط‌کشت دوبعدی به طور معنی‌داری کاهش بیان دارد، در حالی‌که در محیط کشت دو بعدی میزان بیان ژن نوکلئوستمین در بافت توموری متاستاتیک مغزی (به میزان بیشتر) و بافت توموری متاستاتیک ریوی نسبت به بافت



شکل ۱- جداسازی سلول‌های تومور اولیه و متاستاتیک (۲۶). 4T1B: سلول‌های توموری متاستاتیک مغزی / 4T1T: سلول‌های توموری اولیه / 4T1L: سلول‌های توموری متاستاتیک ریوی (a). مدل حیوانی متاستاتیک سرطان پستان پس از ۳۵ روز القای

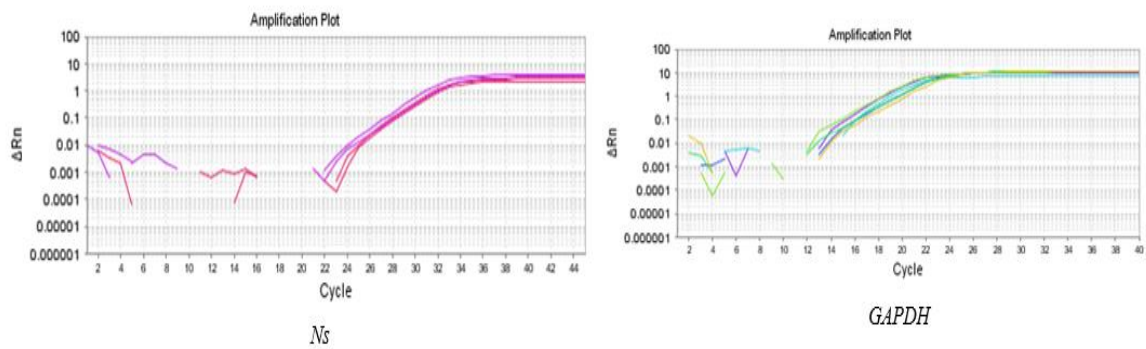
تومور در موش BALB/c. b. جداسازی تومور متاستاتیک مغزی، رنگ‌آمیزی HandE و استخراج سلول‌های تومور متاستاتیک مغزی و کشت دوبعدی سلول‌ها. c. جداسازی تومور اولیه، رنگ‌آمیزی HandE و استخراج سلول‌های تومور اولیه و کشت دوبعدی سلول‌های تومور اولیه. d. جداسازی تومور متاستاتیک ریه، رنگ‌آمیزی HandE و استخراج سلول‌های تومور متاستاتیک ریوی و کشت دوبعدی سلول‌ها.

Figure 1. Separation of primary and metastatic tumor cells (26). 4T1B: brain metastatic tumor cells / 4T1T: primary tumor cells / 4T1L: lung metastatic tumor cells). a. Animal model of metastatic breast cancer after 35 days of tumor induction in BALB/c mice. b. Isolation of metastatic brain tumor, HandE staining and extraction of metastatic brain tumor cells and two-dimensional culture of cells. c. Isolation of primary tumor, HandE staining and extraction of primary tumor cells and two-dimensional culture of primary tumor cells. d. Isolation of metastatic lung tumor, HandE staining and extraction of metastatic lung tumor cells and two-dimensional cell culture.

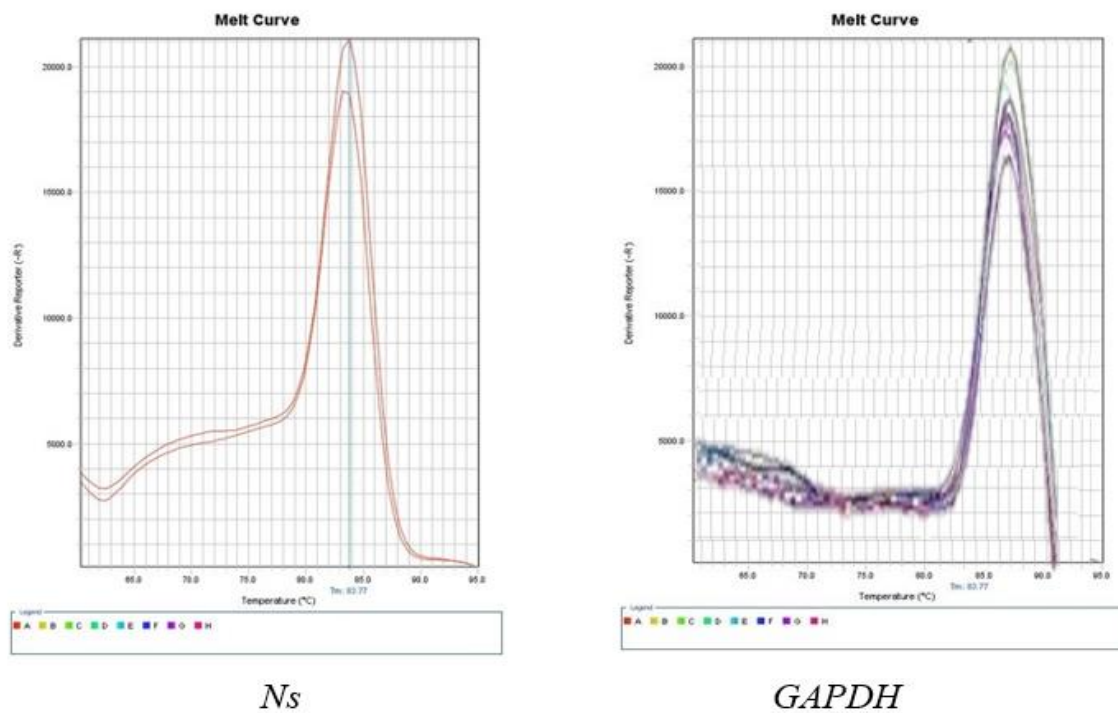


شکل ۲- نتایج حاصل از الکتروفورز RNA استخراج شده بر روی ژل آگارز، مشاهده باندها به تفکیک نشانگر صحت RNA استخراج شده می‌باشد.

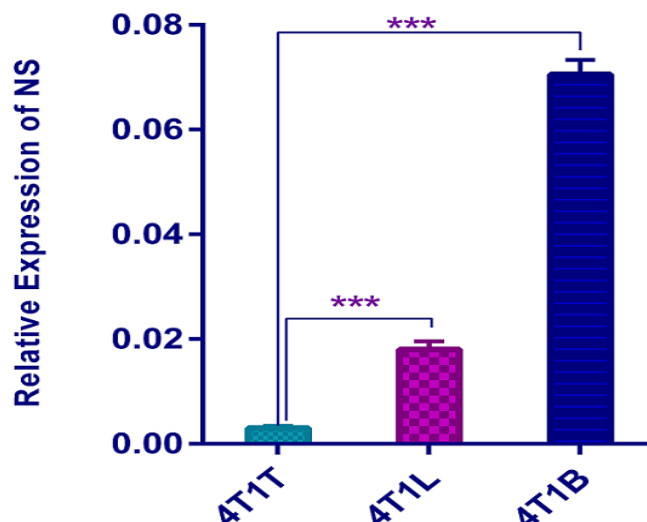
Fig 2. The results of the electrophoresis of the extracted RNA on agarose gel, the observation of the bands separately indicates the correctness of the extracted RNA.



شکل ۳- منحنی تکثیر ژن‌های *Ns* و *GAPDH*
 Fig 3. The amplification curve of *Ns* and *GAPDH* genes

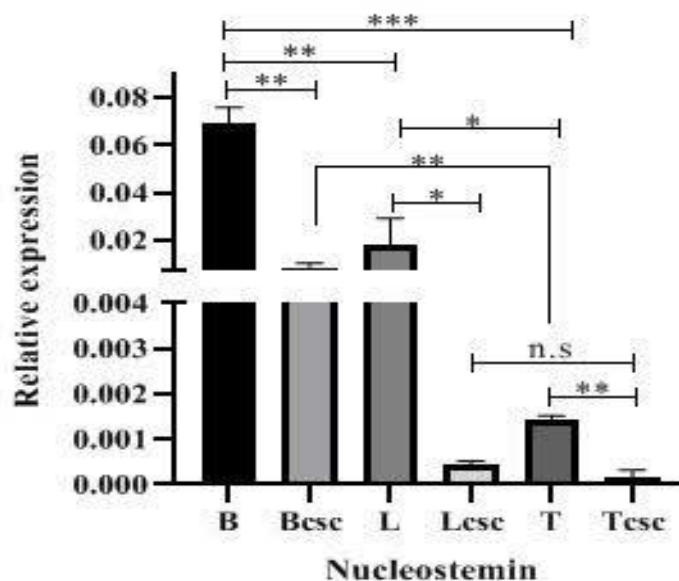


شکل ۴- منحنی ذوب ژن‌های *Ns* و *GAPDH*
 Fig 4. Melting curve of *Ns* and *GAPDH* genes



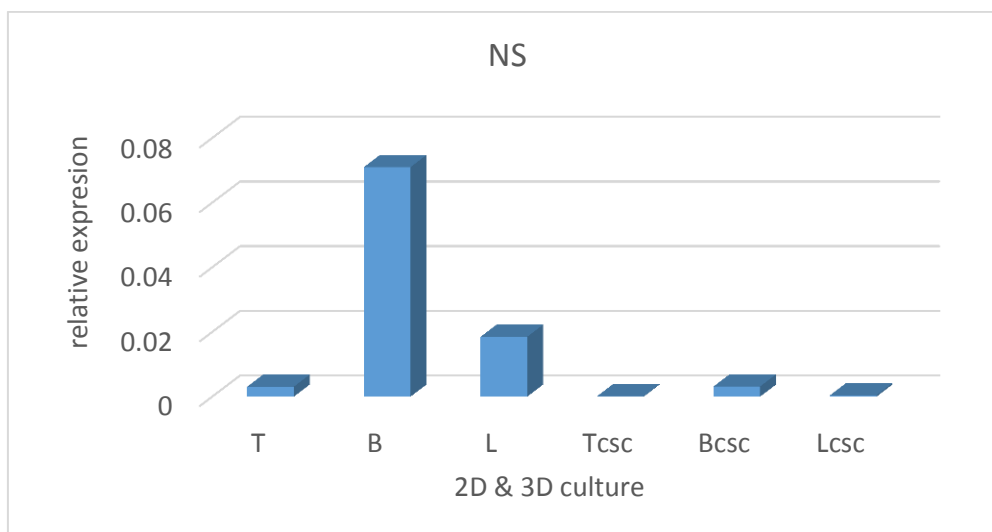
نمودار ۱ - بررسی بیان نوکلئوستمین در سلول‌های توموری متاستاتیک در شرایط کشت دو بعدی. (4T1B: سلول‌های توموری متاستاتیک مغزی / 4T1T: سلول‌های توموری اولیه / 4T1L: سلول‌های توموری متاستاتیک ریوی)

Fig 5. Examining the expression of *Ns* nucleostemin in metastatic tumor cells in 2-D culture conditions. (4T1B: 4T1 Brain metastatic tumor cells / 4T1T: 4T1 Primary metastatic tumor cells / 4T1L: 4T1 Liver metastatic tumor cells).



نمودار ۲- مقایسه بیان ژن نوکلئوستمین در محیط کشت دو بعدی و اسفروئیدهای چندسلولی. (T: نمونه توموری اولیه در کشت دو بعدی، Tsc: نمونه توموری اولیه در کشت اسفروئید سه بعدی، B: نمونه متاستاتیک مغزی در کشت دو بعدی، Bsc: نمونه متاستاتیک مغزی در کشت اسفروئید سه بعدی، L: نمونه متاستاتیک ریوی در کشت دو بعدی، Lsc: نمونه متاستاتیک ریوی در کشت اسفروئید سه بعدی، 4T1B: سلول‌های توموری متاستاتیک مغزی، 4T1T: سلول‌های توموری اولیه، 4T1L: سلول‌های توموری متاستاتیک ریوی، *: معنی‌داری در سطح $p < 0.05$ ، **: معنی‌داری در سطح $p < 0.01$ ، ***: معنی‌داری در سطح $p < 0.001$ ، n.s.: no significant)

Fig 6.. Comparison of nucleostemin gene expression in two-dimensional culture medium and multicellular spheroids (T: 2D culture of primary tumor sample, Tsc: 3D spheroid culture of primary tumor sample, B: 2D culture of Brain metastatic sample, Bsc: 3D spheroid culture of brain metastatic sample, L: 2D culture of Lung metastatic sample, Lsc: 3D spheroid culture of lung metastatic specimen, *: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$, ***: $p < 0.001$, n.s.: no significant)



نمودار ۳- نمودار ستونی میزان بیان ژن نوکلئوستمین در محیط کشت دو بعدی و سه بعدی (T: نمونه توموری اولیه در کشت دو بعدی، Tcsc: نمونه توموری اولیه در کشت اسفروئید سه بعدی، B: نمونه متاستاتیک مغزی در کشت دو بعدی، Bcsc: نمونه متاستاتیک مغزی در کشت اسفروئید سه بعدی، L: نمونه متاستاتیک ریوی در کشت دو بعدی، Lcsc: نمونه متاستاتیک ریوی در کشت اسفروئید سه بعدی، 4T1B: سلول‌های توموری متاستاتیک مغزی، 4T1T: سلول‌های توموری اولیه، 4T1L: سلول‌های توموری متاستاتیک ریوی)

Fig 7. Column chart of Nucleostemin gene expression in two-dimensional and three-dimensional culture medium (T: 2D culture of primary tumor sample, Tcsc: 3D spheroid culture of primary tumor sample, B: 2D culture of Brain metastatic sample, Bcsc: 3D spheroid culture of brain metastatic sample, L: 2D culture of Lung metastatic sample, Lcsc: 3D spheroid culture of Lung metastatic specimen)

بحث

اتفاق داروهای پیش بالینی امیدوارکننده در بیماران مبتلا به تومور، یا فاقد اثربخشی است و یا ضعیف عمل می‌کنند و در نتیجه کشف درمان‌های موفق را به تأخیر می‌اندازند. این به دلیل فقدان تماس سلولی و ریزمحیط طبیعی تومور در محیط کشت دو بعدی است که در سیگنال‌دهی تومور و پاسخ دارویی نقش مهمی دارد و در نتیجه منجر به کاهش فنوتیپ بدخیم در مقایسه با تومور واقعی می‌شود. از این نظر، کشت‌های سه بعدی سلول‌های سرطانی که محیط‌های سلولی داخل بدن را بهتر بیان می‌کنند، به عنوان مدل‌های سرطانی دقیق و کم‌هزینه برای غربالگری بالینی و آزمایش داروهای نامزد جدید قبل از حرکت به سمت مدل‌های حیوانی گران‌قیمت و زمان‌بر هستند (۲۳). از طرفی بررسی میزان بیان ژن‌های مختلف در سلول‌های توموری اولیه و متاستاتیک به ما کمک می-

در حالی‌که پیشرفت‌های چشمگیری در مدیریت سرطان پستان در مراحل اولیه صورت گرفته، اما در مورد سرطان پستان متاستاتیک خیلی صدق نمی‌کند و میزان مرگ و میر ناشی از سرطان پستان متاستاتیک طی دهه‌ها تغییر چشمگیری نکرده است و متاستاز همچنان از بزرگترین مشکلات درمان سرطان پستان است (۲۲، ۲۵). بیماران مبتلا به سرطان متاستاتیک پستان معمولاً به دلیل تشخیص دیر هنگام و میزان بالای عود، پیش‌آگهی بدی دارند. بنابراین، شناسایی نشانگرهای مفید بالینی برای پیش‌آگهی سرطان متاستاتیک پستان از اهمیت بالایی برخوردار است (۳۲). اکثر محققین سرطان هنوز به روش‌های متداول کشت تک لایه دو بعدی برای آزمایش داروهای ضد تومور در شرایط آزمایشگاهی قبل از آزمایشات درون‌تنی تکیه می‌کنند. با این حال، اکثریت قریب به

بیماران با ریسک بالاتر و رفتارهای تهاجمی‌تر بیماری فراهم کند. تصور می‌شود که نوکلئوستمین از جمله ژن‌های خودبازسازی است که به میزان بالایی در سلول‌های بنیادین جنینی و بالغ بیان می‌شود، اما در بافت‌های تمایز یافته بیان نمی‌گردد. همچنین در انواعی از بافت‌ها و رده‌های سلولی سرطانی نیز بیان می‌شود و به فرآیندهای بیولوژیکی مانند جنین‌زایی، بازسازی بافت و توسعه سرطان کمک می‌کند (۲۴). بر اساس نتایج بررسی‌های حسین‌پور و همکاران در ۲۰۱۲ نوکلئوستمین یک مارکر تکثیری است و سطح بیان آن افزایش معنی‌داری را بین تومورهای بدخیم و خوش‌خیم نشان می‌دهد و به طور معنی‌داری در ارتباط با افزایش درجه‌ی تومورهای بدخیم پستان است ولی استفاده از نوکلئوستمین را به عنوان مارکر تشخیصی در تفکیک و شناسایی بافت‌های توموری از غیرتوموری موثر نمی‌داند و فقط از آن در تخمین اندازه‌ی تومور استفاده می‌کند. همچنین نوکلئوستمین را به عنوان یک فاکتور بالقوه پیش‌آگهی برای تعیین شدت‌های مختلف توموری در تومورهای پستان بدخیم می‌داند و بیان می‌کند که مهار نوکلئوستمین ممکن است بتواند راهکار موثری در کاهش نرخ تکثیر سلول‌های سرطانی پستان باشد (۸). در سال ۲۰۱۳، مودی و همکاران نشان دادند که کاهش نوکلئوستمین منجر به فعالیت تشکیل اسفروئید در رده‌های سلولی MCF-7 و MDA-MB-231 می‌گردد. مطالعات بعدی بیان کردند که پیری و آپوپتوز، توقف چرخه سلولی و در نهایت مرگ جنینی در مرحله بلاستوسیست تحت تأثیر حذف نوکلئوستمین در سلول‌های بنیادی جنینی موش ایجاد می‌شود. طبق داده‌های ایشان نوکلئوستمین در سرطان پستان، باعث تشکیل اسفروئیدهای توموری مستقل از تکیه‌گاه شده و در طول پیشرفت تومور پستان موش افزایش می‌یابد (۲۰). لین و همکاران در ۲۰۱۹ اذعان داشتند که

کند تا بهتر درک کنیم چگونه سلول‌های توموری متاستاتیک ممکن است با سلول‌های توموری اولیه متفاوت باشد که می‌تواند منجر به شناسایی مواردی برای درمان سرطان شود (۴). مدل‌سازی مرحله متاستاتیک سرطان پستان در حیوان آزمایشگاهی، امکان بررسی مسیرهای سلولی درگیر و همچنین سنجش اثربخشی داروهای جدید را امکان‌پذیر می‌نماید. مدل موشی سرطان پستان که در این پروژه با موفقیت ساخته و به کار برده شد، امکان شبیه‌سازی مرحله IV سرطان پستان در موش مشابه سرطان پستان انسانی را فراهم نمود و دستیابی ما به جمعیت خالصی از سلول‌های توموری اولیه و متاستاتیک مغزی و ریوی را به دنبال داشت. در این تحقیق برای پی بردن به میزان تأثیر ژن‌های انتخابی در متاستاز سرطان پستان، به بررسی میزان بیان آن‌ها در سلول‌های توموری اولیه و سلول‌های متاستاتیک مغز و ریه آن‌هم به صورت مقایسه‌ای در شرایط کشت دوبعدی و سه‌بعدی پرداختیم. نوکلئوستمین نقش اساسی در تکثیر برخی از سلول‌های بنیادی و سلول‌های سرطانی دارد، اما هیچ تحقیقی برای ارزیابی ارتباط بین نوکلئوستمین و متاستاز در سرطان پستان در محیط کشت سه بعدی انجام نشده است. متاستاز و عود سرطان از علل اصلی مرگ ناشی از سرطان هستند. شواهد قابل‌توجهی وجود دارد که نشان می‌دهد بسیاری از سرطان‌ها توسط سلول‌های بنیادی سرطانی در مکان‌های متاستاتیک ایجاد می‌شوند. با وجود این- که سلول‌های بنیادی سرطانی بخش کوچکی از سلول‌های تومور را تشکیل می‌دهند، نقش عمده‌ای در عود تومور، متاستاز و مقاومت دارویی دارند، این ممکن است به دلیل ویژگی‌های منحصر به فرد آنها مانند خودنوسازی و پرتوانی باشد (۱, ۴). بنابراین، بررسی نشانگرهای مرتبط با سلول‌های بنیادی سرطانی پستان ممکن است ابزار مهمی برای شناسایی

سلول‌های سرطان پستان می‌شود و بیان کرد که نوکلئوستمین نقش تنظیمی حیاتی در زنده ماندن سلول‌های سرطانی، به ویژه در رده‌های سلولی-MCF-7 و MDA-MB-468 دارد (۲۰). با توجه به مطالب ذکر شده به این نتیجه رسیدیم که نوکلئوستمین از جمله مهم‌ترین تعدیل‌کننده دخیل در کنترل خودنوسازی سلول‌های بنیادی و از تنظیم‌کننده‌های مهار آپوپتوز و افزایش بقا در سلول‌های شروع‌کننده تومور در رده‌های سلولی سرطان پستان و سایر سرطان‌هاست. به طور کلی می‌توان گفت که نوکلئوستمین نوعی فعالیت بالادستی در کنترل مکانیسم‌های تکثیر سلولی در سلول‌های بنیادی داشته و خاموش شدن بیان آن می‌تواند به عنوان عاملی برای خروج سلول‌ها از چرخه سلولی و ورود به فاز خفتگی باشد. بنابراین با مهار بیان نوکلئوستمین از طریق روش‌های مولکولی می‌توان به درمان‌های موفقیت‌آمیزی برای سرطان دست یافت. با توجه به-این‌که اسفروئیدهای تومور بسیاری از ویژگی‌های سلول‌های بنیادی سرطانی را به اشتراک می‌گذارند و تعداد سلول‌های بنیادی توموری بسیار کم می‌باشد برای تشخیص دقیق‌تر میزان بیان نوکلئوستمین توسط این سلول‌ها در این تحقیق از محیط کشت سه‌بعدی استفاده شد. در مطالعه حاضر، نشان داده شد که ژن نوکلئوستمین به میزان بالایی در محیط کشت دو-بعدی در سلول‌های متاستاتیک مغزی بیان می‌شود درحالی‌که در محیط کشت سه‌بعدی در سلول‌های متاستاتیک کاهش بیان و در سلول‌های توموری اولیه افزایش بیان دارد.

نتیجه‌گیری

تحقیق حاضر نشان داد که نه‌تنها میزان بیان ژن نوکلئوستمین بین سلول‌های توموری متاستاتیک و سلول‌های توموری اولیه متفاوت است بلکه میزان بیان

فرآیند حفظ ژنوم ممکن است توسط پروتئین خود تجدید شونده نوکلئوستمین همراه باشد و نشان دادند که سلول‌های تومور پستانی به دنبال تخلیه نوکلئوستمین بسیار مستعد آسیب به DNA در همانندسازی می‌شوند و سلول‌های دارای کمبود نوکلئوستمین کاهش قابل‌توجهی در فعالیت تعمیر DNA را نشان می‌دهند. تجزیه و تحلیل TCGA (The Cancer Genome Atlas Program) از سرطان پستان انسان نشان داد که نوکلئوستمین به طور مثبت با پروتئین‌های ترمیم‌کننده DNA همراه است و بیان نوکلئوستمین بالا با نقص‌های تعمیر DNA ارتباط دارد و بقای بدون پیشرفت ضعیف در سرطان پستان را پیش‌بینی می‌کند. این کار نشان داد که نوکلئوستمین از عوامل حفظ ژنوم و ارتقا دهنده تومور است و برای پیشرفت تومور پستانی لازم است (۱۴). در ادامه، تجزیه و تحلیل نمونه‌های سرطان پستان انسان توسط لین و همکاران در ۲۰۱۹ نشان داد که نوکلئوستمین در سطح بالاتری در سرطان متاستاتیک پستان در مقایسه با لومینال یا HER2 بیان می‌شود و در تومورهای پیشرفته، بیان بالای نوکلئوستمین یک ارتباط قوی با بقای کم بدون پیشرفت در سرطان متاستاتیک پستان دارد. لین بیان نمود که نوکلئوستمین در پیشرفت تومور پستانی نقش دارد و ممکن است از نظر بالینی یک نشانگر پیش‌آگهی جدید برای سرطان متاستاتیک پستان باشد (۱۴). در سال ۲۰۱۹ سامی و همکاران نشان دادند که بیان نوکلئوستمین با پیشرفت سرطان پستان و بیماری پیشرفته همراه است و با زیرگروه‌های تهاجمی‌تر سرطان پستان در رابطه است. بیان نوکلئوستمین در سرطان متاستاتیک پستان شایع است و با بیان عوامل ضد‌رگ‌زایی و ژن‌های پیشرفت تومور همبستگی مثبت دارد (۲۷). در سال ۲۰۲۰ مودی نشان داد که خاموش کردن نوکلئوستمین باعث آپوپتوز سلولی در

5. Fillmore C.M., Kuperwasser C. 2008. Human breast cancer cell lines contain stem-like cells that self-renew, give rise to phenotypically diverse progeny and survive chemotherapy. *Breast Cancer Research*, 10:1-13.

6. Firatligil-Yildirim B., Yalcin-Ozuyal O. 2023. Recent advances in lab-on-a-chip systems for breast cancer metastasis research. *Nanoscale Advances*, 5(9):2375-2393.

7. Habanjar O., Diab-Assaf M., Caldefie-Chezet F., Delort L. 2021. 3D cell culture systems: tumor application, advantages, and disadvantages. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(22):12200-12235.

8. Hosseinpour Feizi M.A., Saed S., Babaei E., Montazeri V., Halimi M. 2012. Evaluation of nucleostemin gene expression as a new molecular marker in breast tumors. *Journal of Kerman University of Medical Sciences*, 19(2):113-125.

9. Huang M., Itahana K., Zhang Y., Mitchell B.S. 2009. Depletion of guanine nucleotides leads to the Mdm2-dependent proteasomal degradation of nucleostemin. *Cancer Research*, 69(7):3004-3012.

10. Jubelin C., Muñoz-Garcia J., Griscom L., Cochonneau D., Ollivier E., Heymann M.F., Vallette F.M., Oliver L., Heymann D. 2022. Three-dimensional in vitro culture models in oncology research. *Cell and Bioscience*, 12(1):155-183.

11. Kapalczyńska M., Kolenda T., Przybyła W., Zajączkowska M., Teresiak A., Filas V., Ibbs M., Bliźniak R., Łuczewski Ł., Lamperska, K., 2018. 2D and 3D cell cultures—a comparison of different types of cancer cell cultures. *Archives of Medical Science*, 14(4):910-919.

12. Kobayashi T., Masutomi K., Tamura K., Moriya T., Yamasaki T., Fujiwara Y., Takahashi S., Yamamoto J., Tsuda H. 2014. Nucleostemin expression in invasive breast cancer. *BMC Cancer*, 14:1-9.

آن در سلول‌های توموری اولیه و متاستاتیک در شرایط سه بعدی با شرایط دو بعدی کاملاً تفاوت دارد. سلول‌های بیان‌کننده نوکلئوستمین در سلول‌های بنیادی سرطانی با کشت اسفروئید تومور غنی می‌شوند و از آنجا که نوکلئوستمین برای فعالیت اسفروئید سازی سلول‌های سرطان پستان انسان مورد نیاز است، بنابراین، نوکلئوستمین می‌تواند یک هدف بالقوه برای درمان سرطان پستان مبتنی بر سلول‌های بنیادی سرطانی باشد.

تشکر و قدردانی

بدینوسیله از گروه مهندسی بافت دانشگاه علوم پزشکی شاهرود و گروه مهندسی ژنتیک دانشگاه آزاد دامغان که ما را در این طرح یاری کردند کمال تشکر را داریم. مولف اعلام می‌کند که هیچ تضاد منافی ندارد.

منابع

1. Andisheh-Tadbir A., Ranjbar M.A., Shiri, A.A., Mardani M. 2020. Expression of nucleostemin in odontogenic cysts and tumors. *Experimental and Molecular Pathology*, 113:104376.

2. Borah A., Raveendran S., Rochani A., Maekawa T., Kumar D.S. 2015. Targeting self-renewal pathways in cancer stem cells: clinical implications for cancer therapy. *Oncogenesis*, 4(11):e177-e177.

3. Cela I., Cufaro M.C., Fucito M., Pieragostino D., Lanuti P., Salles M., Del Boccio, P., Di Matteo A., Allocati N., De Laurenzi V., Federici L. 2022. Proteomic Investigation of the Role of Nucleostemin in Nucleophosmin-Mutated OCI-AML 3 Cell Line. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(14):7655-7673.

4. Fares J., Fares M.Y., Khachfe H.H., Salhab H.A., Fares Y., 2020. Molecular principles of metastasis: a hallmark of cancer revisited. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 5(1):28-40.

21. Pack C.G., Jung K., Paulson B., Kim J.K. 2021. Mobility of Nucleostemin in Live Cells Is Specifically Related to Transcription Inhibition by Actinomycin D and GTP-Binding Motif. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(15):8293-8308.
22. Park M., Kim D., Ko, S., Kim, A., Mo, K., Yoon, H., 2022. Breast cancer metastasis: mechanisms and therapeutic implications. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(12):6806-6824.
23. Pinto B., Henriques A.C., Silva P.M., Bousbaa H. 2020. Three-dimensional spheroids as in vitro preclinical models for cancer research. *Pharmaceutics*, 12(12):1186-1224.
24. Quiroga-Artigas G., de Jong D., Schnitzler C.E. 2022. GNL3 is an evolutionarily conserved stem cell gene influencing cell proliferation, animal growth and regeneration in the hydrozoan *Hydractinia*. *Open Biology*, 12(9):220120.
25. Redig A.J., McAllister S.S. 2013. Breast cancer as a systemic disease: a view of metastasis. *Journal of Internal Medicine*, 274(2):113-126.
26. Rezapour N., Kamalabadi-Farahani M., Atashi A., Zarrinpour V., 2023. Paclitaxel resistance and nucleostemin upregulation in metastatic mouse breast cancer cells. *Minerva Biotechnology and Biomolecular*, 35(1):16-21.
27. Sami M.M., Hachim, M.Y., Hachim, I.Y., Elbarkouky, A.H., López-Ozuna, V.M. 2019. Nucleostemin expression in breast cancer is a marker of more aggressive phenotype and unfavorable patients' outcome: A STROBE-compliant article. *Medicine*, 98(9):e14744.
28. Moudi M., Saravani R., Sargazi S. 2020. Silencing of nucleostemin by siRNA induces apoptosis in MCF-7 and MDA-MB-468 cell lines. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research: IJPR*, 19(1):37.
13. Lin J., Ye S., Ke H., Lin L., Wu X., Guo M., Jiao B., Chen C., Zhao L. 2023. Changes in the mammary gland during aging and its links with breast diseases: Aged mammary gland and breast diseases. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, 55(6):1001-1020.
14. Lin T., Lin T.C., McGrail D.J., Bhupal P.K., Ku Y.H., Zhang W., Meng L., Lin S.Y., Peng G., Tsai R.Y. 2019. Nucleostemin reveals a dichotomous nature of genome maintenance in mammary tumor progression. *Oncogene*, 38(20):3919-3931.
15. Lin T., Meng L., Lin T.C., Wu L.J., Pederson T., Tsai R.Y., 2014. Nucleostemin and GNL3L exercise distinct functions in genome protection and ribosome synthesis, respectively. *Journal of Cell Science*, 127(10):2302-2312.
16. Lin Y., Zhong Y., Guan H., Zhang X., Sun Q. 2012. CD44+/CD24-phenotype contributes to malignant relapse following surgical resection and chemotherapy in patients with invasive ductal carcinoma. *Journal of Experimental and Clinical Cancer Research*, 31:1-9.
17. Lo D., Dai M.S., Sun X.X., Zeng S.X., Lu H. 2012. Ubiquitin-and MDM2 E3 ligase-independent proteasomal turnover of nucleostemin in response to GTP depletion. *Journal of Biological Chemistry*, 287(13):10013-10020.
18. Lv D., Hu Z., Lu L., Lu H., Xu X. 2017. Three-dimensional cell culture: A powerful tool in tumor research and drug discovery. *Oncology Letters*, 14(6):6999-7010.
19. Morrison B.J., Steel J.C., Morris J.C. 2012. Sphere culture of murine lung cancer cell lines are enriched with cancer initiating cells. *PloS One*, 7(11):e49752.
20. Moudi M., Saravani R., Sargazi S. 2020. Silencing of nucleostemin by siRNA induces apoptosis in MCF-7 and MDA-MB-468 cell lines. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*, 19(1):37-45.

32. Zduniak K., Agrawal A., Agrawal S., Hossain M.M., Ziolkowski P., Weber G.F. 2016. Osteopontin splice variants are differential predictors of breast cancer treatment responses. *BMC Cancer*, 16:1-12.
33. Zeng X., Liu C., Yao J., Wan H., Wan G., Li Y., Chen N. 2021. Breast cancer stem cells, heterogeneity, targeting therapies and therapeutic implications. *Pharmacological Research*, 163:105320.
29. Tsai R.Y., McKay R.D. 2002. A nucleolar mechanism controlling cell proliferation in stem cells and cancer cells. *Genes and Development*, 16(23):2991-3003.
30. Tsai R.Y., McKay R.D. 2005. A multistep, GTP-driven mechanism controlling the dynamic cycling of nucleostemin. *The Journal of cell biology*, 168(2):179-184.
31. Wilkinson L., Gathani T. 2022. Understanding breast cancer as a global health concern. *The British Journal of Radiology*, 95(1130):20211033.