زیست‌شناسی جانوری، سال پانزدهم، شماره دوم، زمستان ۱۴۰۱، صفحات ۲۴۵- ۲۳۳

مقاله پژوهشی

# بررسی تاثیر محیط شرطی سلول‌های بنیادی مزانشیمیِ تیمار شده با آسکوربیک اسید بر رفتار تکثیری سلول‌های سرطان پستان

فتانه سام دلیری[۱]، محمود تلخابی[۱*]، نرگس طولابی[۱]، فرنوش عطاری[۲]، موسی کهتری[۲]

۱- گروه زیست‌شناسی دریا، دانشکده علوم و فناوری زیستی، دانشگاه شهید بهشتی، تهران ایران

۲- گروه علوم جانوری، دانشکده زیست‌شناسی، دانشگاه تهران، تهران، ایران

*مسئول مکاتبات: m_talkhabi@sbu.ac.ir

DOI: 10.22034/ascij.2022.1957184.1382

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۰۲/۰۲ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۳/۲۴

## چکیده

سرطان پستان از شایع‌ترین انواع سرطان در زنان است. امروزه پژوهشگران به‌دنبال شیوه‌های نوین درمان سرطان هستند. یکی از رویکردهای مورد بررسی در حوزه سرطان، استفاده از سلول‌های بنیادی می‌باشد. این مطالعه با هدف ارزیابی تکثیر و زنده‌مانی سلول‌های سرطان پستان رده 4T1 در حضور محیط شرطی (CM) سلول‌های بنیادی مزانشیمی تیمار شده با آسکوربیک‌اسید (AA) صورت گرفت. در این مطالعه از سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از چربی انسانی (h-ADMSCs) و سلول‌های سرطان پستان رده 4T1 استفاده شد. سلول‌های 4T1 با غلظت‌های مختلف AA تیمار شدند و میزان زنده‌مانی آن‌ها بوسیله تست MTT بررسی شد. طبق نتایج مطالعات پیشین و تست MTT، غلظت ۱ میلی‌مولار جهت جمع‌آوری CM از h-ADMSCs انتخاب شد. h-ADMSCs به چهار گروه تقسیم شدند: گروه‌های فاقد FBS با و بدون AA (-FBS/± 1 mM AA) و گروه‌های حاوی ۵ درصد FBS با و بدون AA (5% FBS/± 1 mM AA). سپس میزان زنده‌مانی، پتانسیل کلونی‌زایی، پروفایل چرخه سلولی و میزان آپوپتوز سلول‌های 4T1 تیمار شده با CMهای مختلف، بررسی شد. نتایج نشان داد CM در گروه FBS/+AA– نسبت به گروه FBS/-AA– سبب کاهش زنده‌مانی و تکثیر سلول‌های 4T1 می‌شود. همچنین CM در گروه‌های دارای FBS نیز نتایج مشابهی را نشان داد و گروه FBS/+AA ۵ درصد + نسبت به گروه FBS/-AA + ۵ درصد زنده‌مانی و تکثیر سلولی سلول‌های 4T1 را کاهش دادند. همچنین CM در گروه‌های مورد مطالعه، باعث تغییراتی در پروفایل چرخه سلولی سلول‌های 4T1 و میزان آپوپتوز آن‌ها شد. طبق نتایج حاصل به نظر می‌رسد که اسکوربیک اسید احتمالاً با تاثیر بر ترکیبات CM بدست آمده از h-ADMSCs، می‌تواند باعث کاهش زنده‌مانی و تکثیر سلول‌های سرطان پستان رده 4T1 شود.

**کلمات کلیدی:** سرطان پستان، سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از چربی، آسکوربیک‌اسید، محیط شرطی، تکثیر سلولی.

## مقدمه

سرطان پستان یکی از جدی‌ترین بیماری‌های زنان در سراسر جهان محسوب می‌شود (۷). این سرطان، همانند سایر سرطان‌ها تحت تاثیر عوامل مختلف ژنتیکی و محیطی می‌باشد. مجموعه این عوامل سبب بروز این بیماری خواهند شد (۱۵). افزایش سن و پیری یکی از مهمترین عوامل موثر در بروز سرطان پستان است (۲۶). پس از تشخیص اولیه

سرطان، انتخاب شیوه مناسب درمان به عوامل گوناگونی همچون میزان پیشرفت سرطان، اندازه تومور، مکان قرارگیری آن و وضعیت جسمی بیمار بستگی دارد. روش-های درمانی مانند عمل جراحی، شیمی‌درمانی و پرتودرمانی از رایج‌ترین انواع درمان محسوب می‌شوند (۱، ۹). امروزه، شیوه‌های نوین درمان سرطان مانند استفاده از سلول‌های بنیادی، گزینه امیدوارکننده‌ای در مسیر درمان سرطان فراهم کرده است (٤). در بین انواع سلول‌های بنیادی، سلول‌های بنیادی مزانشیمی (MSCs) به جهت دارا بودن ویژگی‌هایی از قبیل وجود منابع فراوان جهت استخراج، امکان کشت در مقیاس وسیع، قابلیت تمایز به انواع سلول‌ها و ترشح فاکتورهای مختلف، مورد توجه پژوهشگران قرار دارند (۲، ۲۳).

یکی از روش‌های کاربرد MSCs، استفاده از محیط شرطی (Conditioned media or CM) این سلول‌ها می‌باشد که به علت دارا بودن مواد ترشحی این سلول‌ها، پیشنهاد می‌شود (۱۱).

MSCs دارای قابلیت تعدیل‌کننده سیستم ایمنی می‌باشند. MSCs رشد یافته در شرایط آزمایشگاهی، توانایی تعامل و تنظیم عملکرد اکثر سلول‌های موثر در فرآیندهای پاسخ ایمنی اولیه و اکتسابی را دارند (۲).

از کاربردهای دیگر MSCs، استفاده از این سلول‌ها در ترمیم بافت‌های آسیب‌دیده می‌باشد. MSCs به دلیل توانایی مهاجرت، این امکان را دارند که به مناطق آسیب دیده، مهاجرت کنند و با توجه به امکان تمایز به برخی از سلول‌های محل آسیب‌دیده و توانایی ترشح کموکاین‌ها، سایتوکاین‌ها و فاکتورهای رشد که به بازسازی بافت کمک می‌کنند، سبب ترمیم و بهبود بافت شوند. MSCs، در پاسخ به سیگنال‌های آسیب، می‌توانند از کنام خود به داخل گردش خون محیطی حرکت کرده، از دیواره عروق عبور کنند و به بافت‌های مورد نظر برسند (۱۱، ۱٦).

امروزه تعداد زیادی از مطالعات صورت گرفته، اثرات مفید درمان‌های مبتنی بر MSCs برای بهبود آسیب‌های مختلف، از جمله اختلال‌های عصبی، ایسکمی قلبی، دیابت و بیماری‌های استخوان و غضروف نشان می‌دهد. با این حال، پتانسیل درمانی MSCs در سرطان هنوز مورد بحث است (۱۳).

توانایی MSCs در جهت تعامل با ریز محیط سلول‌های سرطانی، سبب استفاده از این سلول‌ها در مطالعات حوزه سرطان شده‌است. برخی از آزمایش‌های انجام شده، نشان‌دهنده اثر MSCs در جلوگیری از شروع و پیشرفت تومورها و مهار تکثیر سلول‌های سرطانی می‌باشد. همچنین MSCs ممکن است در تمام مراحل سرطان‌زایی مانند ایجاد سلول‌های بنیادی سرطانی (CSCs)، رشد تومور، تبدیل اپیتلیال به مزانشیم (EMT)، و رگ‌زایی موثر باشند و منجر به پیشرفت و متاستاز تومورها شوند (۳، ۱۹، ۲٤).

علاوه بر چالش‌های پیش‌روی اجرای ایمن و و موثر درمان-های سلول‌های بنیادی، محدودیت‌هایی در ظرفیت تمایز این سلول‌ها، برای کاربردهای بالینی وجود دارد. یکی از مواد موثر بر سلول‌های بنیادی، آسکوربیک اسید (AA) می-باشد. مطالعات متعدد، نشان‌دهنده‌ی نقش AA، بر تکثیر و پتانسیل تمایزی سلول‌های بنیادی مزانشیمی می‌باشد (۱۸).

AA، یک کربوهیدرات کوچک طبیعی و محلول در آب است که به عنوان آنتی‌اکسیدان عمل می‌کند (۸).

نتایج مطالعات نشان می‌دهد که AA می‌تواند بر بسیاری از رفتارهای سلول‌های بنیادی و سلول‌های تمایزیافته، تاثیر بگذارد و به عنوان تنظیم کننده اصلی پرتوانی، خودنوزایی و تمایز سلول‌های بنیادی مطرح است (۵).

AA در غلظت‌های کم با تاثیر بر متابولیسم سلولی، سبب افزایش تکثیر سلول‌های بنیادی مزانشیمی می‌شود. افزودن AA به محیط کشت MSCs، منجر به آماده سازی کارآمدتر این سلول‌ها می‌شود (۱۲).

AA به طور گسترده در درمان و پیشگیری سرطان استفاده می‌شود. با این وجود، نتایج بالینی، هنوز قطعی نیستند. این ماده می‌تواند به صورت آنتی‌اکسیدان و یا ضد تومور به کار برود. اثر AA به عنوان یک عامل درمانی، به نحوه تجویز آن، غلظت پلاسما و ظرفیت جذب سلول‌های تومور بستگی دارد (۲۰، ۲۱).

آسکوربیک‌اسید در غلظت‌های مختلف به عنوان آنتی‌اکسیدان، با چندین مکانیسم از جمله، کاهش سمیت سلولی، کاهش آپوپتوز، کاهش رشد تومور و ترشح سایتوکاین‌های التهابی عمل می‌کند و زمانی که به عنوان یک عامل ضد تومور در نظر گرفته شود، سبب مهار پیشرفت سلول، افزایش سطح H2O2، اثر ضد تکثیر سلول‌های توموری، سمیت سلولی و القا آپوپتوز می‌شود و همچنین در درمان با غلظت‌های بالا، ممکن است به عنوان درمان جدید اپی‌ژنتیکی عمل کند (۱۸، ۲۱).

در مطالعه حاضر، اثرات CM مشتق شده از سلول‌های بنیادی مزانشیمی چربی انسانی (h-ADMSCs) تیمار شده با آسکوربیک‌اسید، بر رفتار تکثیری سلول‌های سرطان پستان رده 4T1 در محیط برون تنی، مورد بررسی قرار گرفته است.

## مواد و روش‌ها

**کشت h-ADMSCs و 4T1 و انتخاب غلظت AA**: h-ADMSCs در پاساژ یک از پژوهشکده بن یاخته (ایران- تهران) تهیه شده و با محیط کشت DMEM (شرکت Gibco) حاوی ۱۰ درصد سرم جنین گاو (FBS) (شرکت DNA biotech) و ۱ درصد پنی‌سیلین/استرپتومایسن (شرکت Gibco) کشت، تکثیر و نگهداری شدند (دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، $CO_2$ ۵ درصد). پس از آن‌که سلول‌ها حدود ۸۰ درصد کف فلاسک کشت را پر کردند، پاساژ سلولی بوسیله آنزیم تریپسین (شرکت Gibco) انجام گرفت. سلول‌های سرطان پستان رده 4T1 در پاساژ پنجم، از دانشگاه تهران تهیه شده و در محیط کشت DMEM حاوی ۱۰ درصد FBS کشت، تکثیر و نگهداری شدند (دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، $CO_2$ ۵ درصد).

برای دستیابی به غلظت مناسب AA، از تستMTT (شرکت Sigma-Aldrich) و از سلول 4T1 در پاساژ ۱۰ استفاده شد. ابتدا ۳۰۰۰ سلول 4T1 در هر چاهک پلیت ۹۶ خانه کشت داده شدند. بعد از ۴۸ ساعت، محیط روی سلول‌ها جمع‌آوری و محیط کشت تازه حاوی غلظت‌های مختلف AA (۰/۱، ۰/۲، ۰/۵، ۱، ۱/۵، ۲، ۲/۵، ۳، ۳/۵، ٤ و ۵ میلی‌مولار) و گروه کنترل (فاقد AA) تعویض شد. هر گروه با چهار تکرار در نظر گرفته شد. ۲٤ ساعت پس از تیمار با غلظت‌های مختلف AA، سلول‌ها بوسیله PBS شستشو داده شده و به سلول‌ها، محیط کشت حاوی محلول MTT (شرکت Sigma-Aldrich) با غلظت نهایی نیم میلی‌گرم در هر میلی‌لیتر در تاریکی اضافه گردید. سپس سلول‌ها به مدت ۳ ساعت درانکوباتور نگهداری شدند. پس ازآن محیط رویی به آرامی حذف گردید و به هر چاهک ۱۰۰ میکرولیتر DMSO اضافه شد. میزان جذب نوری با دستگاه اسپکتروفتومتری (BioTek® 800™ TS) در طول موج ۵۷۰ نانومتر خوانش شد.

**تهیه و جمع‌آوری CM مشتق شده از h-ADMSCs**: برای تهیه CM، سلول‌های h-ADMSCs در پاساژ ۲ در پلیت‌های ٦ خانه کشت داده شدند و زمانی که ۷۰ درصد کف چاهک‌ها توسط سلول‌ها پوشیده شد، محیط رویی سلول‌ها خارج شده و یکبار بوسیله PBS شستشو داده شدند. سپس محیط کشت جدید فاقد FBS و فاقد AA (-FBS/-AA)، فاقدFBS و حاوی یک میلی‌مولار AA ( 1 mM +/FBS-AA)، حاوی ۵ درصد FBS و فاقد AA (+5% FBS/-AA) و حاوی ۵ درصد FBS و حاوی یک میلی‌مولار AA (+5% FBS/+1 mM AA) به چاهک‌ها اضافه شد. پس از ۲٤ ساعت CM مربوط به هر گروه جمع‌آوری و به فریزر ۲۰- درجه سانتی‌گراد جهت نگهداری منتقل شد.

**ارزیابی زنده‌مانی سلول‌های 4T1:** جهت انجام تست MTT، ابتدا تعداد ٤٠٠٠ سلول 4T1 در پاساژ ۱۰ در هر چاهک پلیت ۹٦ خانه کشت شدند. بعد از ٤٨ ساعت، محیط روی سلول‌ها خارج شده و یک‌بار بوسیله PBS شستشو داده شدند. سپس به هر چاهک ۱۰۰ میکرولیتر از CM های گروه‌های مختلف (-FBS/-AA، -FBS/+ 1mM AA، +5% FBS/-AA و +5% FBS/+1mM AA) اضافه شد. برای هر یک از گروه‌های چهارگانه مطالعه، پنج تکرار زیستی انجام شد. بعد از ٢٤ ساعت، محیط روی سلول‌ها خارج شده و سلول‌ها یک‌بار بوسیله PBS شستشو داده شدند. سپس، میزان زیستایی سلول‌ها بوسیله تست MTT ارزیابی شد.

**ارزیابی تشکیل کلونی سلول‌های 4T1:** برای ارزیابی کلونی‌های حاصل از سلول‌های 4T1 ، ابتدا این سلول‌ها در پاساژ ۱۰ مورد شمارش قرار گرفته و به تعداد ۷۵ سلول در هر چاهک پلیت ۱۲ چاهکی کشت شدند. بعد از اتصال سلول‌ها به کف چاهک و شروع شکل گیری کلونی، سلول ها با CMهای گروه‌های مختلف (-FBS/-AA، -FBS/+ 1mM AA، +5% FBS/-AA و +5% FBS/ + 1mM AA) تیمار شدند. در هرگروه، ۳ تکرار درنظرگرفته شد. بعد از یک هفته، محیط رویی سلول‌ها خارج شده و یک بار شستشو توسط PBS انجام شد. سپس کلونی‌ها با فرمالدهید ٤ درصد (دکتر مجللی) به مدت ۱۵ دقیقه در دمای اتاق فیکس شده و با کریستال ویوله رنگ آمیزی شدند. کلونی های سلولی با استفاده از استریومیکروسکوپ شمارش شده و تصاویر آن‌ها بوسیله میکروسکوب اینورت ( ZEISS Primovert) گرفته شد.

**بررسی آپوپتوز و چرخه سلولی سلول‌های 4T1:** به منظور بررسی آپوپتوز و چرخه سلولی سلول‌های رده 4T1 تیمار شده با ٤ گروه مورد بررسی، ابتدا این سلول‌ها در پاساژ ۱۰ در چاهک‌های پلیت ٦ خانه کشت داده شدند. زمانی که ۷۰ درصد هر چاهک توسط سلول‌ها پوشیده شد، محیط رویی سلول‌ها خارج شده و یک بار شستشو توسط PBS انجام شد. سپس، سلول‌ها با CMهای گروه‌های مختلف (-FBS/-AA، -FBS/+ 1mM AA، +5% FBS/-AA و +5% FBS/+ 1mM AA) تیمار شدند. پس از ٢٤ ساعت، سلول‌ها جهت ارزیابی آپوپتوز و نیز چرخه سلولی به آزمایشگاه بافت آزما (ایران–تهران) منتقل شدند. این ارزیابی‌ها با یک بار تکرار زیستی انجام شدند.

**آنالیز آماری:** در این مطالعه از شاخص‌های میانگین و انحراف معیار برای نشان دادن توزیع داده‌ها و همچنین جمع‌بندی آن‌ها استفاده شد. نتایج حاصل با استفاده از تست های آماری T-test و one way ANOVA و در سطوح معنا داری P-value < ۰/۰۵ مورد بررسی قرار گرفت. برای محاسبات در هر یک از روش‌های فوق از نرم‌افزار Graphpad prism 9 استفاده شد. تعداد تکرار زیستی هر آزمایش در بخش مربوطه، مشخص شده است.

## نتایج

**بررسی مورفولوژی سلول‌های h-ADMSCs و 4T1:** سلول‌های h-ADMSCs درمحیط کشت DMEM دارای ۱۰ درصد FBS، کشت شدند و در پاساژ دوم، جهت تهیه محیط شرطی، مورد استفاده قرار گرفتند. این سلول‌ها در تمام مدت کشت، مورفولوژی کشیده و دوکی شکل خود را حفظ کرده و به صورت چسبنده، رشد و تکثیر پیدا کردند (شکل ۱–A، بالا). سلول‌های رده سلولی 4T1 نیز در محیط کشت DMEM دارای ۱۰ درصد FBS، کشت داده شدند. با بررسی سلول‌ها در مراحل مختلف کشت و پاساژهای مختلف، مشاهده شد این سلول‌ها مورفولوژی طبیعی و اپیتلیالی خود را حفظ کردند (شکل ۱. A، پایین).

**ارزیابی زنده‌مانی سلول‌های 4T1 در غلظت‌های مختلف AA:** نتایج حاصل از تست MTT سلول‌های 4T1 نشان داد که میزان زنده‌مانی سلول‌های 4T1 در گروه کنترل و غلظت‌های ۰/۱، ۰/۲، ۰/۵ و ۱ میلی‌مولار بیش از ۷۰ درصد

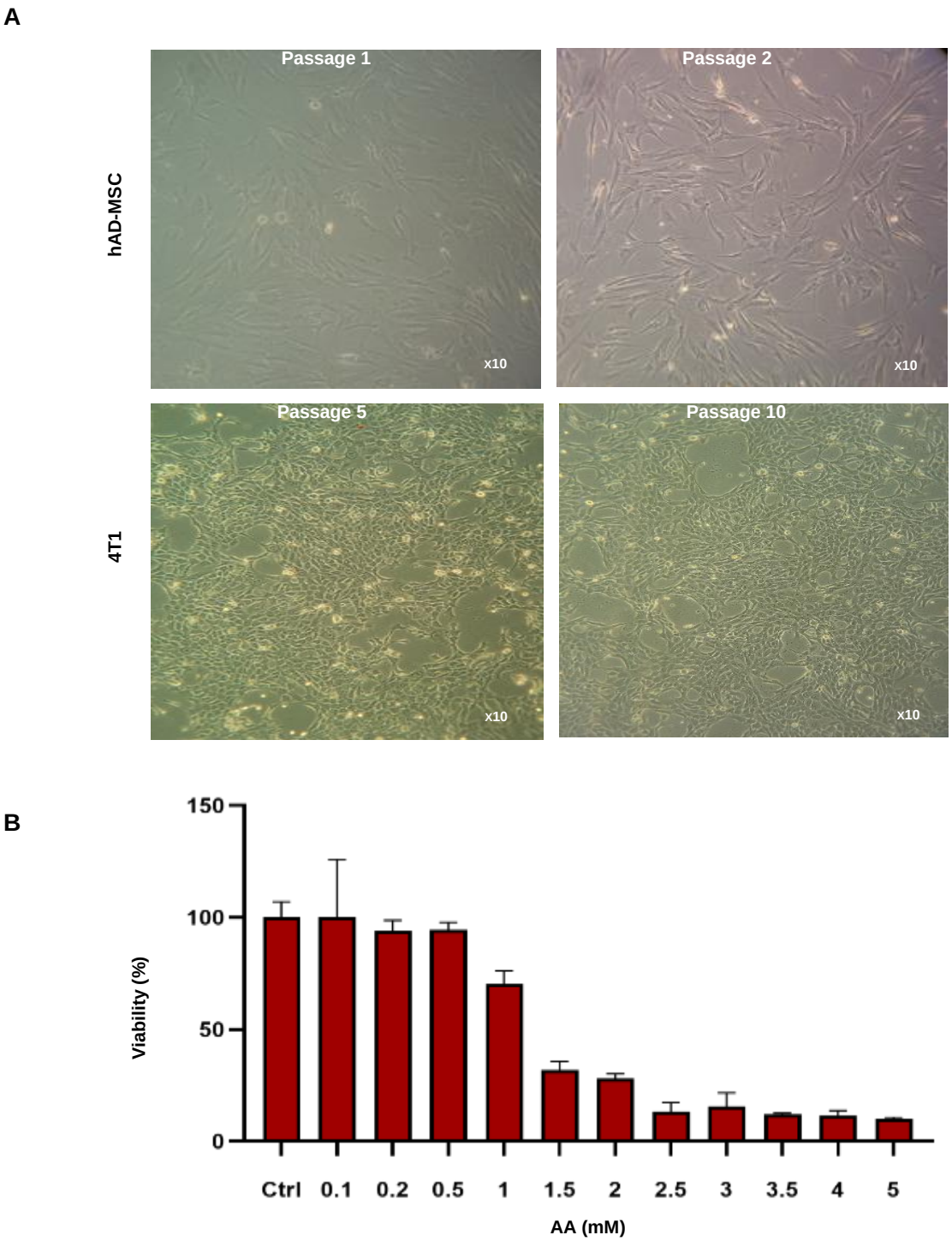
است درحالی که در غلظت‌های ۱/۵، ۲، ۲/۵، ۳، ۳/۵، ٤ و ٥ میلی‌مولار، زنده‌مانی کمتر از ۵۰ درصد است (شکل ۱-B). طبق نتایج به دست آمده، غلظت ۱ میلی‌مولار AA به‌عنوان غلظتی که با وجود تاثیر بر سلول‌ها، زنده‌مانی سلول‌ها نیز در این غلظت، بیش از ۷۰ درصد مشاهده شد به عنوان غلظت نهایی برای انجام مراحل بعدی آزمایش انتخاب شد.

**بررسی تغییرات موفولوژیکی و زنده‌مانی سلول‌های 4T1 تیمار شده با CM:** بررسی سلول‌های 4T1 پس از ٢٤ ساعت تیمار با گروه‌های مختلف CM، نشان داد که سلول-های 4T1 در گروه FBS/-AA– تغییرات مورفولوژی کمتری نسبت به سایر گروه‌ها داشتند و به مورفولوژی اولیه و طبیعی خود شباهت بیشتری دارند در حالی که در گروه – FBS/+1mM AA مشاهده شد که سلول‌ها در بعضی قسمت‌ها از ظرف کشت جدا شده‌اند و تراکم سلولی کم می‌باشد (شکل ۲-A). تغییر مورفولوژی و کاهش تراکم سلولی در گروه‌های دارای FBS نیز مشاهده شد که در گروه FBS/+1mM AA 5%+ جدا شدن سلول‌ها از ظرف کشت بیشتر مشاهده شده است (شکل ۲-A). نتایج حاصل از تست MTT بر روی سلول‌های4T1 نشان داد که در گروه FBS/-AA– درصد زنده‌مانی سلول‌ها بیشتر از گروه – FBS/+1mM AA است (شکل ۲-B، بالا). همچنین در گروه FBS/-AA 5%+ نیز درصد زنده‌مانی بیشتر از گروه FBS/+1mM AA 5%+ بود (شکل ۲-B، پایین)، البته افزایش در میزان زنده‌مانی سلول‌ها از نظر آماری معنادار نبود (شکل ۲).

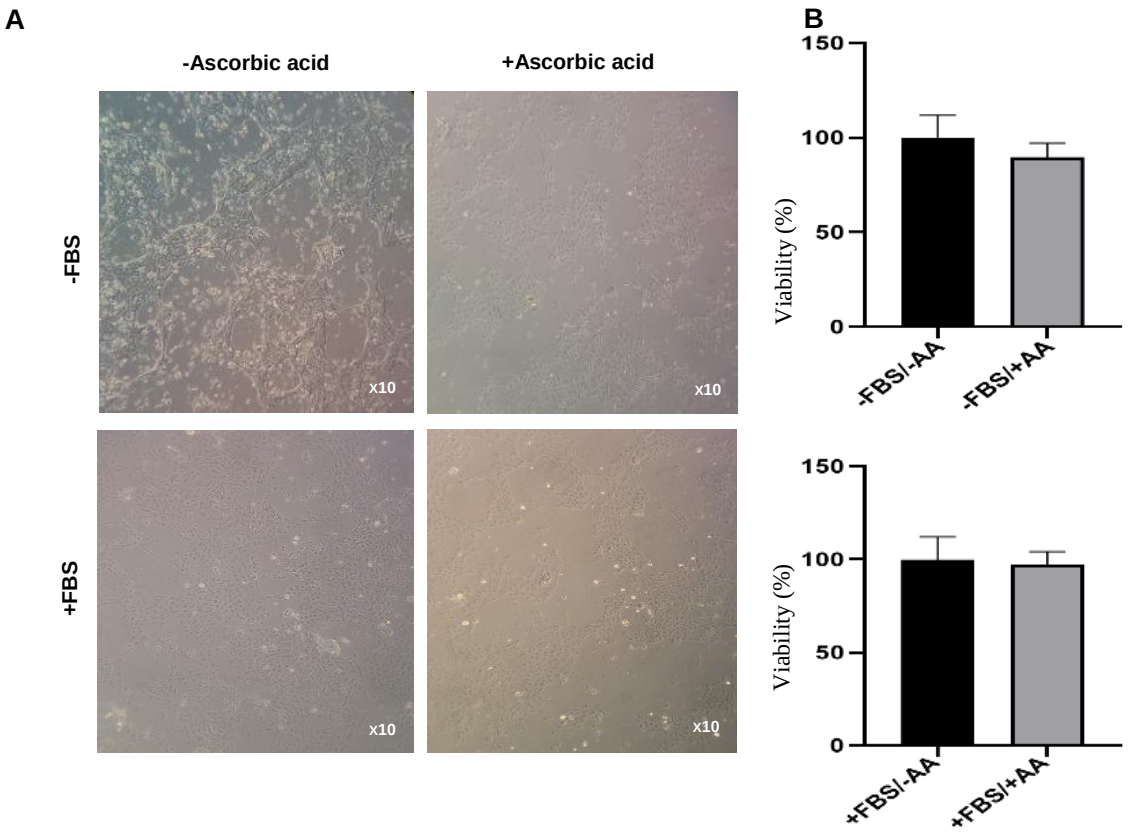
**ارزیابی پتانسیل کلونی‌زایی سلول‌های 4T1 تیمار شده با CM:** مشاهده و بررسی مورفولوژی کلونی‌های تشکیل شدهٔ سلول‌های 4T1 تیمار شده با CM، نشان داد که در گروه-های حاوی AA اندازه کلونی‌ها نسبت به گروه‌های فاقد AA کوچکتر می‌باشد (شکل ۳-A). همچنین بررسی تعداد کلونی های سلول‌های 4T1 نشان داد که درگروه -FBS/– AA تعداد کلونی‌ها برابر با گروه FBS/+1mM AA– است. همچنین مشخص شد که تعداد کلونی های سلول‌های 4T1 در گروه FBS/-AA 5%+ بیشتر از گروه FBS/+1mM 5%+ AA است، هرچند این اختلاف معنادار نبود (شکل ۳-B).

**ارزیابی آپوپتوز و چرخه سلولی سلول‌های 4T1 تیمار شده با CM:** بررسی میزان آپوپتوز سلول‌های 4T1 تیمار شده با CMهای مختلف، نشان داد که درصد سلول‌های زنده در گروه FBS/+1mM AA– کمتر از گروه -FBS/– AA می‌باشد، همچنین در گروه‌های دارای FBS نیز، مشاهدات نشان‌دهنده بیشتر بودن درصد سلول‌های زنده در گروه FBS/-AA 5%+ نسبت به گروه FBS/+1mM 5%+ AA می‌باشد (شکل ٤-A، B). همچنین، درصد سلول‌ها در فاز تاخیری آپوپتوز در گروه FBS/+1mM AA– بیشتر از بقیه گروه‌ها بود (شکل ٤-A، B).

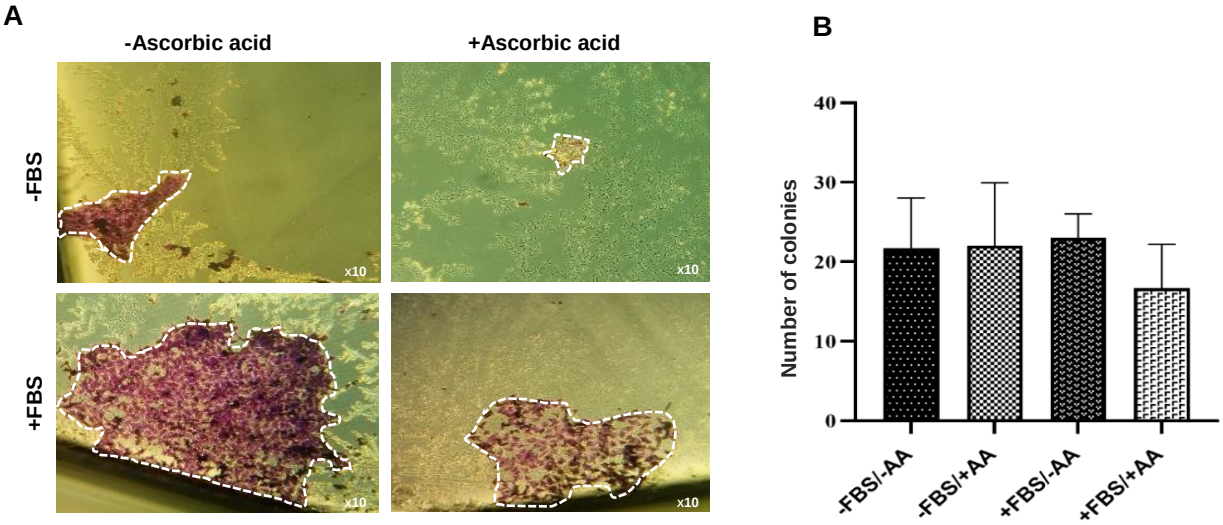
بررسی پروفایل چرخه سلولی سلول‌های 4T1 تیمار شده با CMهای مختلف نشان داد که درصد سلول‌ها در مرحله G1 در گروه FBS/-AA– از گروهFBS/+1mM AA– بیشتر است (شکل ٤-C، D). درصد سلول‌ها در مرحله G1 در گروه FBS/-AA 5%+ از گروه FBS/+1mM AA 5%+ کمتر می‌باشد. بررسی پروفایل چرخه سلولی نشان داد که بیشترین درصد سلول‌ها در مرحله S و G2/M مختص به گروه FBS/-AA 5%+ می‌باشد (شکل ٤-C، D).



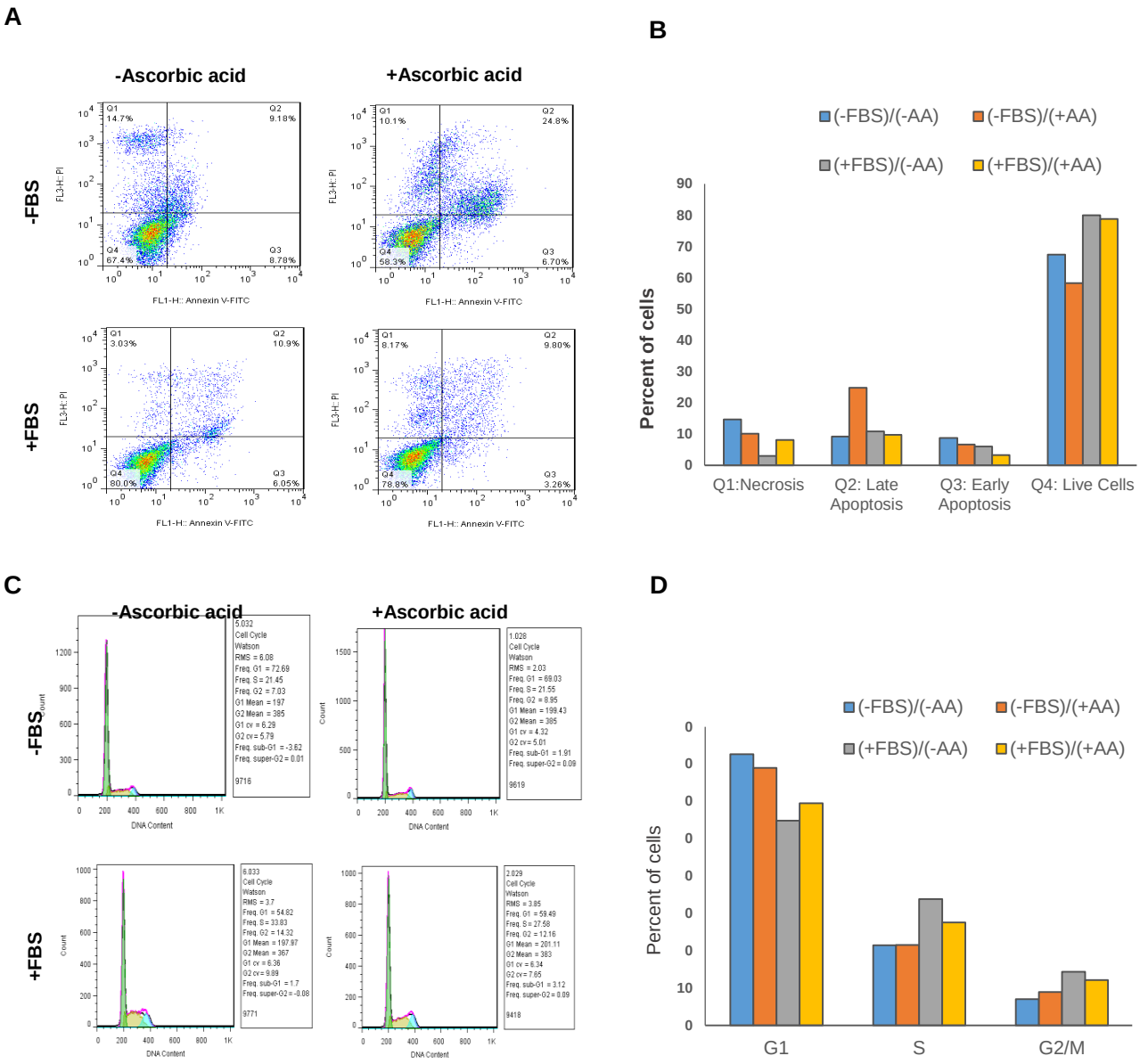

شکل ۱- A) تصویر میکروسکوپ اینورت با بزرگنمایی ۱۰، hAD-MSCs (بالا) و سلول‌های 4T1 (پایین)، B) نتایج تست MTT بر روی سلول‌های4T1.




شکل۲- A) تغییرات مورفولوژی سلول‌های 4T1 تیمار شده با گروه‌های مختلف CM، B) نتایج حاصل از تست MTT بر روی سلول‌های4T1 تیمار شده با گروه‌های مختلف CM، میزان زنده‌مانی گروه FBS/-AA– بیشتر از گروه FBS/+1mM AA– (بالا) و میزان زنده‌مانی گروه FBS/-AA +5% بیشتر از گروه FBS/+1mM AA +5% (پایین).




شکل ۳- A) موفولوژی کلونی‌های تشکیل شده سلول‌های 4T1 تیمار شده با گروه‌های مختلف CM، B) نمودار تعداد کلونی سلول‌های 4T1 تیمار شده با گروه‌های مختلف CM.




شکل٤- A و B) نتایج بررسی میزان آپوپتوز سلول‌های 4T1 تیمار شده با گروه‌های مختلف CM به مدت ٢٤ ساعت. C و D) نتایج بررسی پروفایل چرخه سلولی سلول‌های 4T1 تیمار شده با گروه‌های مختلف CM به مدت ٢٤ ساعت.

## بحث

سرطان پستان با ایجاد بدخیمی‌های مشخص در غدد پستانی، در صورت متاستاز، اندام‌هایی مانند غدد لنفاوی، مغز، ریه‌ها، استخوان و کبد را درگیر می‌کند. انتخاب شیوه مناسب درمان، جهت بهبود سرطان، موضوع بسیار مهمی است. رایج‌ترین روش‌های درمان سرطان پستان، جراحی، شیمی‌درمانی و پرتودرمانی می‌باشد (۱، ۹).

امروزه پژوهشگران به دنبال شیوه‌های نوین در درمان سرطان هستند و استفاده از سلول‌های بنیادی، گزینه

امیدوارکننده‌ای در مسیر درمان سرطان فراهم کرده است (٤).

سلول‌های بنیادی مزانشیمی با داشتن ویژگی‌هایی مثل خودنوزایی، دارا بودن توان تمایزی و همچنین در دسترس بودن منابع استخراج، نسبت به سایر سلول‌های بنیادی، گزینه مناسبی در پژوهش‌های سرطان محسوب می‌شوند (٦، ١٧).

همچنین ارتباط نزدیک MSCs با سلول‌های سرطانی و اثری که فاکتورهای ترشحی این سلول‌ها بر سلول‌های سرطانی دارند، بسیار با اهمیت است. با این حال، پتانسیل درمانی MSCs در سرطان، هنوز مورد بحث است. MSCs با ترشح عواملی همچون کموکاین CCL5، VEGF، TGFβ و bFGF، سبب پیشرفت سرطان می‌شوند. همچنین این سلول‌ها با ترشح عوامل موثر بر سمیت سلولی مانند لیگاند القاکننده آپوپتوز مرتبط با فاکتور نکروز تومور (TRAIL) که به طور انتخابی سبب ایجاد آپوپتوز در انواع سلول‌های سرطانی می‌شود و همچنین ترشح واسطه‌های التهابی، سبب ایمنی ضد توموری می‌شوند و از این طریق در از بین بردن سلول‌های سرطانی نقش دارند (١٣، ٢٤).

در مطالعه انجام شده، از CM بدست آمده از h-ADMSCs که با AA تیمار شده بودند، جهت بررسی رفتار تکثیری سلول‌های سرطان پستان (رده سلولی 4T1) استفاده شد. AA یک ماده آنتی‌اکسیدان موثر بر تکثیر سلولی MSCs می‌باشد. بر اساس نتایج حاصل از پژوهش‌های صورت گرفته، اثر AA بر سلول‌های سرطانی متفاوت گزارش شده است (١٢، ٢١).

مطالعات متعددی جهت دست‌یابی به غلظت مناسب AA، مورد بررسی قرار گرفت و با توجه به نتایج گزارش شده توسط Fujisawa و همکاران (١٢)، Frömberg و همکاران (١٠)، Pathi و همکاران (٢٥)، همچنین نتایج حاصل از تست MTT سلول‌های 4T1، غلظت ١ میلی‌مولار به‌عنوان غلظت مناسب AA انتخاب شد.

مطابق نتایج به دست آمده در این پژوهش، در گروه‌های تیمار شده با CM دارای AA، تغییرات مورفولوژی سلول‌ها بیشتر بوده و تکثیر سلولی کاهش پیدا کرده است. مطالعات متعددی در همین راستا گزارش شده است، به طور مثال در سال ٢٠١٦، Ji و همکاران اثر CM به دست آمده از MSCs لثه را بر سلول‌های سرطان دهان مورد بررسی قرار دادند. نتایج بررسی‌های آن‌ها نشان داد عوامل محلول در CM، نقش مهمی در مهار رشد سلول‌های سرطانی ایفا می‌کند (١٤).

همچنین در سال ٢٠١٥، Meleshina و همکاران اثرات CM به دست آمده از MSCs مشتق از مغز استخوان انسانی (hBM-MSCs) را بر تکثیر سلول‌های سرطان پستان (رده سلولی MDA-MB-231) مورد ارزیابی قرار دادند. نتایج حاصل از این پژوهش نشان داد که تکثیر سلول‌های سرطانی در حضور CM، کمتر از سلول‌های رشد یافته در محیط کشت معمول می‌باشد (٢٢).

تست MTT سلول‌های 4T1، نشان دهنده کاهش زنده‌مانی سلول‌ها بعد از تیمار با CM بدست آمده از h-ADMSCs تیمار شده با AA بود. تغییرات در گروه‌های دارای FBS، کمتر مشاهده شده است. با توجه به این نکته که FBS دارای مواد ضروری مانند هورمون‌ها، ویتامین‌ها، پروتئین‌ها و فاکتورهای رشد موثر بر تکثیر سلولی می‌باشد احتمال اثرگذاری بر ترکیبات CM وجود داشته که بررسی این موضوع نیازمند تحقیقات بیشتر و شناسایی فاکتورهای ترشحی می‌باشد (٢٧).

در مطالعات مربوط به بررسی نقش AA بر سلول‌های سرطانی، در سال ٢٠١٧، Fernandes و همکاران، اثر غلظت‌های مختلف AA بر رده سلولی G292 که یک نوع سلول‌های سرطانی بدخیم استخوان انسان است، مورد بررسی قرار دادند. آن‌ها گزارش کردند که فعالیت متابولیکی و زنده ماندن سلول‌های سرطانی در غلظت ١ میلی‌مولار آسکوربیک اسید به صورت قابل‌توجهی کاهش می‌یابد و

منجر به کاهش زنده‌مانی و القا آپوپتوز در سلول‌های سرطانی می‌شود (۸).

نتایج حاصل از بررسی مورفولوژی کلونی‌های سلول‌های 4T1 تیمار شده با CMهای مختلف نیز نشان داد که همواره گروه‌های دارای AA، کلونی‌های کوچکتر، با تعداد سلول کمتری تشکیل دادند. شمارش کلونی‌های سلول‌های 4T1، بیانگر وجود اختلاف در گروه‌های دارای AA و گروه‌های فاقد AA بود. تعداد کلونی‌های تشکیل شده در گروه‌های دارای AA کاهش پیدا کرده بود که البته اختلاف بین گروه‌ها به صورت معنادار نبوده است. از نکاتی که می‌توان در این خصوص به آن اشاره کرد ذکر این مورد است که در مطالعه صورت گرفته فقط یک غلظت AA مورد بررسی قرار گرفته است، احتمالا در صورت بررسی سایر غلظت‌های AA نتایج تکمیل کننده‌ای کسب خواهد شد.

طبق مطالعه‌ای که در سال ۲۰۱۸ توسط Fujisawa و همکاران در خصوص نقش AA بر متابولیسم hBM-MScs صورت گرفته است، آن‌ها بیان کردند که افزودن AA به محیط کشت MSCs، در میزان تکثیر MSCs تاثیر مثبت داشته و سبب بهبود متابولیسم این سلول‌ها می‌شود (۱۲). در مطالعه ذکر شده، نقش AA در فعالیت آنزیم‌های درون سلول بررسی شده است. نتایج این بررسی نشان داد AA به عنوان کوفاکتور در ساختار آنزیم‌هایی که سبب کنترل فاکتور ۱-آلفا القاشونده توسط هیپوکسی (HIF1α) می‌شوند، وجود دارد. AA با کاهش میزان HIF1α، بر تکثیر و متابولیسم سلول‌های مزانشیمی موثر است، همچنین HIF1α، در جنبه های مهمی از پیشرفت و متاستاز سلول‌های سرطانی نقش دارد. این فاکتور سبب القای بیان ژن VEGF شده، در نتیجه AA با کاهش میزان HIF1α، می‌تواند در کنترل سرطان موثر واقع شود. از سایر مکانیسم‌های پیشنهادی در خصوص نقش AA بر MSCs، به اثر AA درکاهش متیلاسیون DNA اشاره شد که سبب تغییرات اپی‌ژنتیکی در MSCs می‌شود (۱۲).

در بررسی‌های صورت گرفته توسط تکنیک فلوسایتومتری، آپوپتوز و چرخه سلولی، مورد ارزیابی قرار گرفت. طبق نتایج به‌دست آمده از بررسی آپوپتوز سلول‌های 4T1، بیشترین درصد سلول‌های قرار گرفته در مرحله آپوپتوز، مربوط به گروه بدون FBS و دارای AA بود. در خصوص نقش AA بر آپوپتوز سلول‌های سرطانی، Mata و همکاران در سال ۲۰۱۶، گزارشی از اثر AA بر آپوپتوز سلول‌های سرطانی ارائه دادند. آن‌ها بیان داشتند، استفاده از غلظت‌های ۱۰ نانومولار تا ۱ میلی‌مولار AA بر سلول‌های سرطان ملانوما و نوروبلاستوما، سبب القا آپوپتوز در این سلول‌ها می‌شود (۲۱).

نتایج بررسی چرخه سلولی، نیز نشان داد گروهی که در آن، سلول‌های 4T1 با CM دارای FBS و فاقد AA، تیمار شدند، بیشترین درصد سلول‌های مرحله S چرخه سلولی را تشکیل می‌دهند که بیانگر افزایش تقسیم سلولی در این گروه نسبت به سایر گروه‌ها می‌باشد.

با وجود استفاده از MSCs، بسیاری از مطالعات، نشان داده-اند که پیری MSCs بر اثرگذاری این سلول‌ها در کاربردهای بالینی موثر است. اگرچه مکانیسم‌های دقیق پیری سلول، هنوز نامشخص است، اما نظریه نقش رادیکال‌های آزاد در پیری، به طور گسترده پذیرفته است. در MSCs، ROS اضافی می‌تواند خودنوزایی، ظرفیت تمایز و تکثیر را مختل کند. تجمع فزاینده رادیکال‌های آزاد می‌تواند به اکثر مولکول‌های زیستی از جمله DNA، پروتئین و لیپیدها آسیب برساند. سطح بالای ROS، ممکن است باعث آسیب و اختلال عملکرد سلولی شود و منجر به پیری سلول شود (۲۸).

AA به عنوان مهمترین ماده کاهش‌دهنده طبیعی محسوب می‌شود. این ماده در داخل سلول‌ها، برای حفظ تعادل ردوکس درون سلولی، همکاری می‌کند و با انتقال الکترون، گونه‌های فعال اکسیژن را کاهش می‌دهد (۵).

اگرچه اثرات مثبت AA بر رشد MSCs مشخص است، اما مکانیسم‌های مولکولی اصلی مبنی بر تاثیر AA بر عملکرد MSCs، هنوز ناشناخته است (۲۸).

## نتیجه‌گیری

در مطالعه انجام شده، به تاثیر CM بدست آمده از h-ADMSCs تیمارشده با AA، بر رفتار تکثیری و زیستایی سلول‌های سرطان پستان پرداخته شده است.بطور کلی، نتایج به دست آمده در اکثر ارزیابی‌های صورت گرفته، نشان دهنده‌ی کاهش زنده‌مانی و تکثیر سلول‌های سرطان پستان می‌باشد. این مطالعه نشان داد که CM سلول‌های بنیادی مزانشیمی تیمار شده با آسکوربیک‌اسید، می‌تواند سبب کنترل سرطان پستان شود و از این جهت می‌توانند به عنوان یک رویکرد در درمان سرطان مطرح شوند. هرچند برای نتیجه‌گیری دقیق‌تر، نیاز به بررسی غلظت‌های دیگر و نیز انجام تست‌ها و تکرارهای بیشتر می‌باشد.

## منابع


1. Akram M., Iqbal M., Daniyal M., Khan A.U. 2017. Awareness and current knowledge of breast cancer. *Biological Research*, 50(1):1-23.

2. Andrzejewska A., Lukomska B., Janowski M. 2019. Concise review: mesenchymal stem cells: from roots to boost. *Stem Cells*, 37(7):855-864.

3. Christodoulou I., Goulielmaki M., Devetzi M., Panagiotidis M, Koliakos G, Zoumpourlis V. 2018. Mesenchymal stem cells in preclinical cancer cytotherapy: a systematic review. *Stem Cell Research and Therapy*, 9(1):1-38.

4. Chu D.T., Nguyen T.T., Tien N.L., Tran D.K., Jeong J.H., Anh P.G., Dinh T.C. 2020. Recent progress of stem cell therapy in cancer treatment: molecular mechanisms and potential applications. *Cells*, 9(3):563.

5. D'Aniello C., Cermola F., Patriarca E.J., Minchiotti G. 2017. Vitamin C in stem cell biology: impact on extracellular matrix homeostasis and epigenetics. *Stem Cells International*, 2017:8936156.

6. Ding D.C., Shyu W.C., Lin S.Z. 2011. Mesenchymal stem cells. *Cell Transplantation*, 20(1):5-14.

7. Feng Y., Spezia M., Huang S., Yuan C., Zeng Z., Zhang L., Ren G. 2018. Breast cancer development and progression: Risk factors, cancer stem cells, signaling pathways, genomics, and molecular pathogenesis. *Genes and Diseases*, 5(2):77-106.

8. Fernandes G., Barone A.W., Dziak R. 2017. The effect of ascorbic acid on bone cancer cells in vitro. *Cogent Biology*, 3(1):1288335.

9. Fernández-Lao C., Cantarero-Villanueva I., Fernández-de-las-Peñas C., Del-Moral-Ávila R., Menjón-Beltrán S., Arroyo-Morales M. 2011. Widespread mechanical pain hypersensitivity as a sign of central sensitization after breast cancer surgery: comparison between mastectomy and lumpectomy. *Pain Medicine*, 12(1):72-78.

10. Frömberg A., Gutsch D., Schulze D., Vollbracht C., Weiss G., Czubayko F., Aigner A. 2011. Ascorbate exerts anti-proliferative effects through cell cycle inhibition and sensitizes tumor cells towards cytostatic drugs. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 67(5):1157-1166.

11. Fu X., Liu G., Halim A., Ju Y., Luo Q., Song G. 2019. Mesenchymal stem cell migration and tissue repair. *Cells*, 8(8):784.

12. Fujisawa K., Hara K., Takami T., Okada S., Matsumoto T., Yamamoto N., Sakaida I. 2018. Evaluation of the effects of ascorbic acid on metabolism of human mesenchymal stem cells. *Stem Cell Research and Therapy*, 9(1):1-12.

13. Hmadcha A., Martin-Montalvo A., Gauthier B.R., Soria B., Capilla-Gonzalez V. 2020. Therapeutic potential of mesenchymal stem cells for cancer therapy. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 8:43.

14. Ji X., Zhang Z., Han Y., Song J., Xu X., Jin J., Su S., Mu D., Liu X., Xu S., Cui H. 2016.

Mesenchymal stem cells derived from normal gingival tissue inhibit the proliferation of oral cancer cells in vitro and in vivo. *International Journal of Oncology*, 49(5):2011-2022.

15. Kolak A., Kamińska M., Sygit K., Budny A., Surdyka D., Kukiełka-Budny B., Burdan F. 2017. Primary and secondary prevention of breast cancer. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*, 24(4): 549-553

16. Kolios G., Moodley Y. 2013. Introduction to stem cells and regenerative medicine. *Respiration*, 85(1):3-10.

17. Langroudi L., Hassan Z.M., Soleimani M., Hashemi S.M. 2015. Tumor associated mesenchymal stromal cells show higher immunosuppressive and angiogenic properties compared to adipose derived MSCs. *Iranian Journal of Immunology*, 12(4):226-239.

18. Lee Chong T., Ahearn E.L., Cimmino L. 2019. Reprogramming the epigenome with vitamin C. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 7:128.

19. Lin W., Huang L., Li Y., Fang B., Li G., Chen L., Xu L. 2019. Mesenchymal stem cells and cancer: clinical challenges and opportunities. *BioMed Research International*, 2019: 2820853.

20. Ma Y., Chapman J., Levine M., Polireddy K.., Drisko J., Chen Q. 2014. High-dose parenteral ascorbate enhanced chemosensitivity of ovarian cancer and reduced toxicity of chemotherapy. *Science Translational Medicine*, 6(222):222ra18.

21. Mata A.M., Carvalho R.M., Alencar M.V., Cavalcante A.A., Silva B.B. 2016. Ascorbic acid in the prevention and treatment of cancer. *Revista da Associação Médica Brasileira*, 62:680-686.

22. Meleshina A.V., Cherkasova E.I., Shirmanova M.V., Klementieva N.V., Kiseleva E.V., Snopova L.B., Prodanets N.N., Zagaynova E.V. 2015. Influence of mesenchymal stem cells on metastasis development in mice in vivo. *Stem Cell Research and Therapy*, 6(1):1-10.

23. Naji A., Eitoku M., Favier B., Deschaseaux F., Rouas-Freiss N., Suganuma N. 2019. Biological functions of mesenchymal stem cells and clinical implications. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 76(17):3323-3348.

24. Papaccio F., Paino F., Regad T., Papaccio G., Desiderio V., Tirino V. 2017. Concise review: cancer cells, cancer stem cells, and mesenchymal stem cells: influence in cancer development. *Stem Cells Translational Medicine*, 6(12):2115-2125

25. Pathi S.S., Lei P., Sreevalsan S., Chadalapaka G., Jutooru I., Safe S. 2011. Pharmacologic doses of ascorbic acid repress specificity protein (Sp) transcription factors and Sp-regulated genes in colon cancer cells. *Nutrition and Cancer*, 63(7):1133-1142.

26. Sun Y.S., Zhao Z., Yang Z.N., Xu F., Lu H.J., Zhu Z.Y., Shi W., Jiang J., Yao P.P., Zhu H.P. 2017. Risk factors and preventions of breast cancer. *International Journal of Biological Sciences*, 13(11):1387.

27. van der Valk J., Bieback K., Buta C., Cochrane B., Dirks W., Fu J., Hickman J., Hohensee C., Kolar R., Liebsch M., Pistollato F. 2018. Fetal bovine serum (FBS): past–present–future. *Altex*, 35(1):1-20.

28. Yang M., Teng S., Ma C., Yu Y., Wang P., Yi C. 2018. Ascorbic acid inhibits senescence in mesenchymal stem cells through ROS and AKT/mTOR signaling. *Cytotechnology*, 70(5): 1301-1313.

# Investigation of the Effect of Conditioned Media of Mesenchymal Stem Cells Treated with Ascorbic Acid on Proliferative Behavior of Breast Cancer Cells

**Fattane Sam Daliri[1], Mahmood Talkhabi[1*], Narges Toolabi[1], Farnoosh Attari[2], Mousa Kehtari[2]**

1- Department of Animal Sciences and Marine Biology, Faculty of Life Sciences and Biotechnology, Shahid Beheshti University, Tehran, Iran
2- Department of Animal Biology, School of Biology, College of Science, University of Tehran, Tehran, Iran

## Abstract

Breast cancer is one of the most common types of cancer in women. Today, researchers are looking for new ways to treat cancer. One of the investigated approaches in the field of cancer is the use of stem cells. This study aimed to evaluate the proliferation and survival of 4T1 breast cancer cells in the presence of conditioned medium (CM) of mesenchymal stem cells treated with ascorbic acid (AA). Human adipose-derived mesenchymal stem cells (h-ADMSCs) and 4T1 breast cancer cells were used in this study. 4T1 cells were treated with different concentrations of AA and their viability was checked by MTT test. According to the results of previous studies and MTT test, 1 mM concentration was chosen to collect CM from h-ADMSCs. h-ADMSCs were divided into four groups: groups without FBS with and without AA (-FBS/± 1 mM AA) and groups containing 5% FBS with and without AA (5% FBS/± 1 mM AA). Then, the survival rate, colonization potential, cell cycle profile and apoptosis rate of 4T1 cells treated with different CMs were investigated. The results showed that CM in the -FBS/+AA group causes a decrease in the viability and proliferation of 4T1 cells compared to the -FBS/-AA group. Also, CM in the groups with FBS also showed similar results and the FBS/+AA group +5% decreased the survival and cell proliferation of 4T1 cells compared to the FBS/-AA+5% group. Also, CM caused changes in the cell cycle profile of 4T1 cells and their apoptosis rate in the studied groups. According to the results, it seems that ascorbic acid can decrease the survival and proliferation of 4T1 breast cancer cells by affecting the CM compounds obtained from h-ADMSCs.

**Keywords:** Breast cancer, Adipose-derived Mesenchymal Stem Cell, Ascorbic Acid, Conditioned Media, Cell Proliferation.