

Effect of Mesenchymal Stem Cell Conditioned Medium on Proliferation of A549 and JEG3 Cancer Cell Lines

Shahnaz Hosseinzadeh¹,
Hossein Ranjbaran²,
Saeid Abediankenari³

¹ PhD Student in Immunology, Mazandaran University of Medical Sciences, Immunogenetics Research Center, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

² Assistant Professor, Immunogenetics Research Center, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

³ Professor, Immunogenetics Research Center, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

(Received April 14, 2020 ; Accepted July 5, 2020)

Abstract

Background and purpose: Cancer is a serious public health problem. Some studies indicated the anti-cancer effects of mesenchymal stem cells (MSCs) associated with stem cells or their secretory mediators. The aim of this study was to evaluate the impact of conditioned medium derived from MSCs on A549 and JEG3 cancer cell lines.

Materials and methods: In an experimental study, A549 and JEG3 cell lines were provided and grown in the culture media of DMEM F12 containing 10% fetal bovine serum. They were then treated with different percentages of conditioned medium from mesenchymal stem cells (5, 10, 20, 40, 50, and 100) for 48 hours. Metabolic activity was evaluated by MTT assay.

Results: MTT assay showed that various percentages of condition medium from mesenchymal stem cells had inhibitory effects on A549 cell line and significant differences were observed between treated cells and control cells ($P < 0.05$).

Conclusion: Current study showed different effects of conditioned medium from mesenchymal stem cells, including suppressive effect on A549 cell line. Therefore, MSCs and their secretory paracrine factors could be considered as one of the treatment purposes in this cancer.

Keywords: conditioned medium, msenchymal stem cell, A549 cell line, JEG3 cell line, MTT assay

J Mazandaran Univ Med Sci 2020; 30 (187): 49-57 (Persian).

* **Corresponding Author: Saeid Abediankenari**- Immunogenetics Research Center, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran (E-mail: abedianlab@yahoo.co.uk)

بررسی اثر سوپر ناتانت سلول های بنیادی مزانشیمال بر روی رده های سرطانی A549 و JEG3

شهناز حسین زاده¹

حسین رنجبران²

سعید عابدیان کناری³

چکیده

سابقه و هدف: سرطان یکی از بیماری های مهم تهدیدکننده سلامت جهانی است. برخی از مطالعات، اثرات ضد سرطانی سلول های بنیادی مزانشیمال را نشان داده اند که این اثرات مربوط به سلول های بنیادی یا واسطه های مترشحه از آن ها می باشد. لذا هدف از این مطالعه، ارزیابی اثر سوپر ناتانت سلول های بنیادی مزانشیمال بر روی رده های سرطانی A549 و JEG3 بوده است.

مواد و روش ها: در یک مطالعه تجربی، سلول های A549 و JEG3 در محیط کشت DMEMF12 حاوی 10 درصد FBS کشت داده شدند. سپس با درصدهای مختلف سوپر ناتانت سلول های بنیادی مزانشیمال (100، 50، 40، 20، 10، 2) به مدت 48 ساعت تیمار شدند. در نهایت با استفاده از تست MTT فعالیت متابولیک سلولی در مقایسه با کنترل مورد سنجش قرار گرفت.

یافته ها: نتایج حاصل از MTT، اثر مهارتی درصدهای مختلف سوپر ناتانت سلولی بر روی سلول های A549 را نشان داد. تفاوت معناداری بین سلول های تیمار شده با کنترل مشاهده شد ($P < 0/05$).

استنتاج: نتایج حاصل از این مطالعه نشان داده است که سوپر ناتانت سلول های بنیادی مزانشیمال اثرات متفاوتی بر روی رده های مختلف سلول های سرطانی دارد. با توجه به اثر مهارتی مشاهده شده در این تحقیق بر روی رده سلولی A549، پیشنهاد می شود که سلول های بنیادی مزانشیمال و فاکتورهای پاراکرین مترشحه از آن ها به عنوان یکی از اهداف درمانی در این نوع سرطان ها مد نظر قرار گیرند.

واژه های کلیدی: سوپر ناتانت، سلول های بنیادی مزانشیمال، رده سلولی A549، رده سلولی JEG3، MTT

مقدمه

درمانی و جراحی از درمان های متداول سرطان ها هستند. با این حال، اثرات درمانی به خاطر عوارض جانبی جدی، عدم توانایی در تشخیص دقیق بین سلول های طبیعی و توموری و مقاومت در برابر شیمی درمانی رضایت بخش نیستند (2).

سرطان یکی از عوامل تهدیدکننده سلامت و از علل اصلی مرگ و میر انسان در سراسر جهان محسوب می شود. میزان ابتلا به سرطان در سال 2018 حدود 18/1 میلیون نفر مورد جدید و 9/6 میلیون نفر مرگ تخمین زده شده است (1). در حال حاضر رادیو تراپی، شیمی

E-mail: abedianlab@yahoo.co.uk

مؤلف مسئول: سعید عابدیان کناری - ساری: کیلومتر 18 جاده خزرآباد، مجتمع پیامر اعظم (ص)، دانشکده پزشکی

1. دانشجوی دکترای تخصصی ایمونولوژی، مرکز تحقیقات ایمونونوتیک، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران

2. استادیار، مرکز تحقیقات ایمونونوتیک، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران

3. استاد، مرکز تحقیقات ایمونونوتیک، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران

تاریخ دریافت: 1399/1/26 تاریخ ارجاع جهت اصلاحات: 1399/1/27 تاریخ تصویب: 1399/4/15

از سرطان معده، تکثیر و مهاجرت سلول های سرطانی را افزایش می دهند (9). در حالی که مطالعات دیگر پیشنهاد کرده اند که سلول های بنیادی مزانشیمال فعالیت های ضد سرطانی دارند (10، 11). بررسی ها نشان داده که سوپر ناتانت سلول های بنیادی مزانشیمال بند ناف، رشد سلول های سرطانی سینه، ریه و پانکراس را مهار می کند (12). در پژوهشی اثر سلول های بنیادی مزانشیمال مشتق از منابع مختلف روی رده های سلولی سرطان تخمدان مورد بررسی قرار گرفت. نتایج این مطالعه نشان داد که سلول های بنیادی مزانشیمال و سوپر ناتانت حاصل از آن ها اثر مهاری روی قدرت مهاجمی سلول های توموری دارد (13). در مطالعه ای روی سلول های سرطان کبد نشان دادند سوپر ناتانت سلول های بنیادی مزانشیمال به صورت سینرژیسیم با داروی Sorafenib عمل کرده و باعث مهار رشد سلول های سرطانی می شود (14). به دلیل تناقضات و تفاوت هایی که در مطالعات متعدد در رابطه با اثرات سلول های بنیادی مزانشیمال بر روی رده های سلولی مختلف وجود دارد، این مطالعه با هدف ارزیابی اثر سوپر ناتانت سلول های بنیادی مزانشیمال بر روی سلول های سرطانی کوریو کارسینوما (JEG3) و ریه (A549) پایریزی گردید تا بتواند افق درمانی جدیدی در این بدخیمی ها ترسیم نماید.

مواد و روش ها

در یک مطالعه تجربی اثر سوپر ناتانت سلول های بنیادی مزانشیمال بر روی دو رده سرطانی به صورت سه تایی مورد بررسی قرار گرفت که مراحل انجام آزمایشات به صورت زیر بوده است.

جداسازی سلول های بنیادی مزانشیمال و تعیین فنوتایپ به روش فلوسایتومتری

نمونه های بند ناف از مرکز آموزشی درمانی امام خمینی (ره) شهرستان ساری جمع آوری گردید. سپس به روش مکانیکی به قطعات کوچکتری تقسیم شدند. به

بنابراین توسعه روش های درمانی اختصاصی و کارآمد، حائز اهمیت است. سلول های بنیادی مزانشیمال، سلول هایی چند ظرفیتی با توانایی تکثیر زیاد هستند که توانایی تمایز به رده های مختلف سلولی مانند آدیپوسیت ها، کندروسیت ها، میوسیت ها و استئوبلاست ها را دارند. مشخص شده که سلول های بنیادی مزانشیمال اثرات ایمنومودولاتوری دارند که این ویژگی آن ها را در درمان بیماری های مرتبط با ایمنی مانند بیماری پیوند علیه میزبان، لوپوس اریتماتوز سیستمیک و مولتیپل اسکلروزیس حائز اهمیت کرده است (3). سلول های بنیادی مزانشیمال می توانند از انواع بافت ها مانند کبد، مغز استخوان، پالپ دندان، بافت چربی، مایع آمنیوتیک، جفت و خون بند ناف جدا شوند (4). مکانیسم عملکردی سلول های بنیادی مزانشیمال هم از طریق تماس مستقیم با سلول ها و هم از طریق فاکتورهای محلول ترشحی می باشد (3). سلول های بنیادی مزانشیمال محدوده وسیعی از مولکول های بیولوژیک مانند فاکتورهای رشد، سایتوکاین ها و کموکاین ها را تولید می کنند (5). همان طور که ذکر شد، بخشی از فعالیت های سلول های بنیادی مزانشیمال با واسطه بیومولکول های ترشح شده می باشد که این مهم استفاده از سوپر ناتانت سلولی (condition medium) مشتق از سلول بنیادی مزانشیمال (MSC-CM) را در پزشکی و درمان سرطان حائز اهمیت کرده است. از نظر بالینی استفاده از ترشحات سلولی ممکن است ابزار درمانی بهتری در مقایسه با درمان مبتنی بر سلول باشد (6). در مورد اثرات سلول های بنیادی مزانشیمال بر سرطان نظرات مختلفی وجود دارد. تعدادی مطالعات نشان داده اند که سلول های بنیادی مزانشیمال باعث پیشبرد تکثیر تومور و متاستاز می شوند. در مطالعه ای که روی تومورهای سینه و پروستات انجام شد نشان دادند که سلول های بنیادی مزانشیمال مشتق از مغز استخوان رشد و رگ زایی در این تومورها را افزایش می دهند (7، 8). علاوه بر این، در یک مطالعه روی سلول های سرطان معده نشان دادند که سلول های بنیادی مزانشیمال مشتق

(Fetal Bovine Serum) به همراه آنتی بیوتیک های پنی سیلین (100 IU/ml) و استرپتوما یسین (100µg/ml) برای کشت سلول ها استفاده شد. فلاسک های کشت در انکوباتور 37 درجه سانتی گراد با 90 درصد رطوبت و 5 درصد CO2 قرار داده شدند.

تهیه سوپر ناتانت سلولی از سلول های بنیادی مزانشیمال سلول های بنیادی مزانشیمال در فلاسک های مخصوص کشت T75 با محیط کشت DMEM F12 حاوی 10 درصد FBS کشت داده شدند و این فلاسک های حاوی سلول ها تا زمانی که تعداد سلول ها افزایش پیدا کرده و 80 درصد فلاسک را پر کنند، نگهداری شدند. سپس سلول ها با بافر فسفات نمکی (Phosphate Buffer Saline) استریل شستشو داده شدند. بعد محیط کشت DMEM F12 فاقد سرم به میزان 12 میلی لیتر به فلاسک سلولی اضافه شد. سپس فلاسک ها در انکوباتور 37 درجه سانتی گراد با رطوبت 90 درصد و 5 درصد CO2 به مدت 48 ساعت انکوبه شدند. بعد از مدت زمان مذکور، سوپر ناتانت سلولی جمع آوری شده و در 400 g به مدت 8 دقیقه سانتریفوژ شدند تا سلول های مرده جدا شوند. سپس سوپر ناتانت های جمع آوری شده در لوله های فالدون استریل با حجم 15 میلی لیتر ریخته شده و در فریزر منهای 80 درجه سانتی گراد تا زمان استفاده نگهداری شدند.

اندازه گیری پروتئین سوپر ناتانت سلولی به روش برادفورد سنجش پروتئین به روش برادفورد یک روش رنگ سنجی سریع، دقیق و حساس می باشد. اساس روش برادفورد، تشکیل کمپلکس بین رنگ کوماسی بلو G-250 و پروتئین های موجود در محلول می باشد. میزان پروتئین در سوپر ناتانت سلولی با استفاده از روش برادفورد اندازه گیری شد. محلول برادفورد استفاده شده در این آزمایش از شرکت Bio Basic (cat.no: SK3041) خریداری گردید. تست در پلیت 96 خانه انجام و OD

این قطعات کوچک بند ناف که حاوی لایه ی ژلاتینی هستند، ژله وار تون گفته می شود. ژله وار تون به محیط کشت High Glucose DMEM (Biowest-USA) حاوی 15 درصد سرم جنین گاوی (Biochrom-) (FBS) و آنتی بیوتیک های پنی سیلین (100IU/ml) و استرپتوما یسین (100µg/ml) انتقال داده شد. سپس به مدت 5 دقیقه در دور 1250 rpm سانتریفوژ گردید. به رسوب سلولی محلول تریپسین-EDTA اضافه شد و به مدت نیم ساعت در انکوباتور کشت سلولی انکوبه گردید. سپس رسوب سلولی دو بار شستشو شده و از فیلتر 70 میکرون عبور داده شد. برای لیز گلبول های قرمز باقی مانده در نمونه، از محلول هیپوتونیک کلرید آمونیوم استفاده شد. رسوب سلولی به فلاسک کشت سلولی T75 (SPL) منتقل و با محیط کشت High Glucose DMEM حاوی 15 درصد FBS کشت داده شد. سلول های مزانشیمال با اتصال به کف فلاسک، پس از چند روز تشکیل کلنی داده و تکثیر شدند. بعد از این که سلول ها 80 تا 90 درصد فلاسک را پر کردند، با استفاده از تریپسین - EDTA 0/25 درصد، سلول ها از کف فلاسک کنده شده برای پاساژ های بعدی و همچنین تعیین هویت مورد استفاده قرار گرفتند. برای تعیین فنوتایپ از آنتی بادی های مونو کلونال اختصاصی برای شاخص های CD44, CD90, CD105, CD34 و HLA-DR استفاده شد و با استفاده از دستگاه فلوسایتومتری، فنوتیپ سلول ها تعیین گردید.

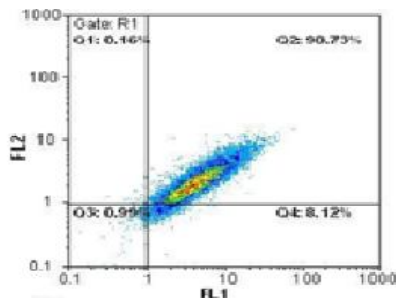
کشت سلول های بنیادی مزانشیمال

سلول های بنیادی مزانشیمال حاصل از ژله وار تون پس از تعیین هویت به روش فلوسیتومتری تا زمان انجام آزمایش در تانک نیتروژن ذخیره شد سپس سلول ها در زمان استفاده ذوب شده و با محیط کشت DMEM F12 حاوی سرم شستشو داده شدند. سپس در فلاسک های مخصوص کشت T25 (SPL) کشت داده شدند. محیط کشت DMEM F12 حاوی 10 درصد FBS

یک شب انکوباسیون در انکوباتور 37 درجه سانتی گراد، سلول‌های سرطانی با درصدهای مختلف سوپر ناتانت سلولی سلول‌های بنیادی مزانشیما (5، 10، 20، 40، 50، 100) به مدت 48 ساعت تیمار شدند. سپس 20 میکرولیتر از محیط کشت برداشته شده و 20 میکرولیتر رنگ MTT (Gibco) (غلظت 5 میلی گرم در هر میلی لیتر) به چاهک‌ها اضافه شد و در انکوباتور 37 درجه سانتی گراد به مدت 4 ساعت انکوبه شد. بعد از زمان مورد نظر، محیط کشت سلولی خارج و 200 میکرولیتر محلول DMSO (Merk) به چاهک‌ها اضافه شد و پلیت داخل فویل پیچیده شده و به مدت 20 دقیقه روی روتاتور قرار داده شد. سپس برای خواندن شدت رنگ از دستگاه الیزا ریدر H1 Synergy در طول موج 570 نانومتر استفاده شد. طول موج 630 به عنوان طول موج رفرانس استفاده شد.

یافته ها

بیان مارکرهای سطحی سلول‌های بنیادی مزانشیما با استفاده از فلوسایتومتری آنالیز شدند. نتایج بررسی نشان داد که این سلول‌ها، مارکرهای CD105، CD90 و CD44 را به میزان بالایی بیان می کنند. در حالی که برای مارکرهای CD34 و HLA-DR منفی هستند. نتیجه فلوسایتومتری سلول‌های بنیادی مزانشیما مشتق از ژله وارتون در تصویر شماره 1 نشان داده شده است. مطابق با شکل شماره 1، بیش از 90 درصد سلول‌ها مارکرهای CD90 و CD105 را بیان می کنند. همچنین بالای 80 درصد مارکر CD44 را بیان می کنند، در حالی که درصد ناچیزی از سلول‌ها CD34 و HLA-DR را بیان می کنند.



در طول موج 595 nm با دستگاه Synergy H1 Hybrid Reader خوانده شد.

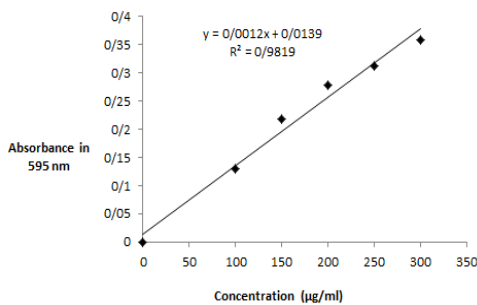
کشت سلول های سرطانی

سلول‌های سرطانی شامل رده سلولی A549 (سرطان ریه) و رده سلولی JEG3 (کوریو کارسینوما) که قبلاً از انستیتو پاستور تهیه شده و در کرایوتوب‌ها به صورت فریز شده در داخل تانک نیتروژن قرار داشتند، مورد استفاده قرار گرفتند. ابتدا سلول‌ها دفریز شده و با محیط کشت DMEM F12 حاوی سرم شستشو شدند. سپس در فلاسک‌های کشت T25 کشت داده شدند. شرایط کشت این سلول‌ها مشابه با سلول‌های بنیادی مزانشیما بود. فلاسک‌ها در انکوباتور 37 درجه سانتی گراد قرار گرفتند تا سلول‌ها رشد کرده و حدود 80 درصد فلاسک پر شود. این سلول‌ها برای آزمایش‌های بعدی مورد استفاده قرار گرفتند.

بررسی بقا و فعالیت متابولیک سلولی با روش MTT

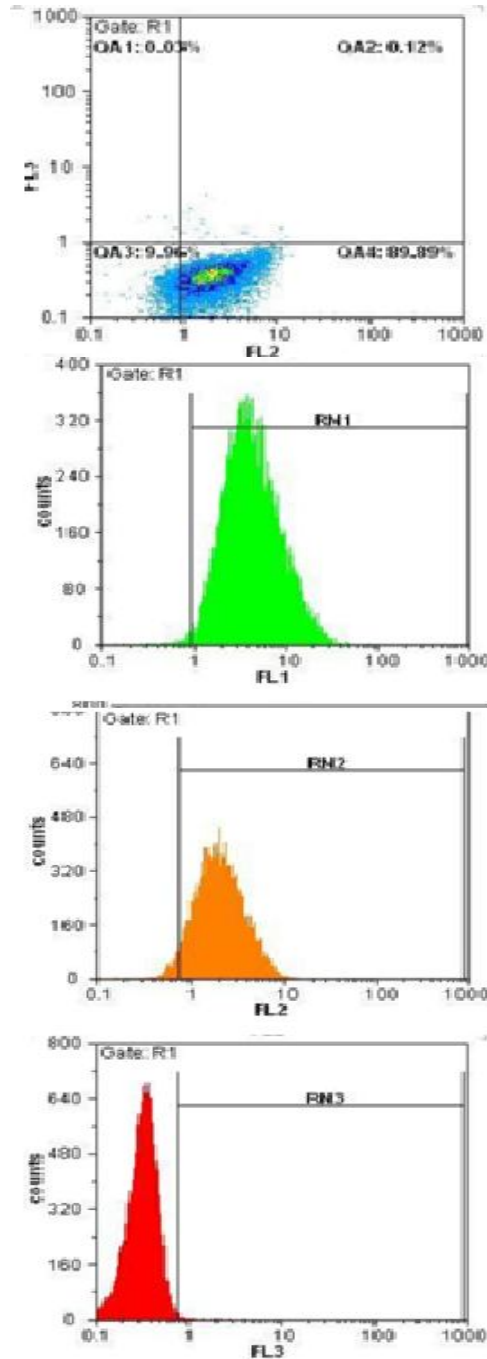
سلول‌های A549 و JEG3 در فلاسک‌های T25 در شرایطی که قبلاً ذکر شد، کشت داده شدند. بعد از این که سلول‌ها 80 درصد فلاسک را پر کردند، برای تست MTT مورد استفاده قرار گرفتند. به این ترتیب که ابتدا محیط کشت سلولی جمع‌آوری و دور ریخته شد. سپس سلول‌ها با PBS استریل سه بار شستشو شدند. سپس با تریپسین-EDTA 0/25 درصد به حجم 1 تا 2 میلی لیتر به مدت 5 دقیقه در انکوباتور 37 درجه سانتی گراد انکوبه شدند. سلول‌ها در زیر میکروسکوپ از نظر کنده شدن از کف فلاسک بررسی شده و بعد از کنده شدن به فالكون 15 میلی لیتر حاوی 2 میلی لیتر محیط کشت سرم‌دار اضافه شد. بعد از سانتریفیوژ در 400 g به مدت 6 دقیقه محیط کشت رویی برداشته شده و به رسوب سلولی 2 میلی لیتر محیط کشت حاوی سرم اضافه گردید و سوسپانسیون سلولی یکنواختی تهیه شد. سپس سلول‌ها با استفاده از رنگ تریپان بلو و لام نوبار شمارش شد. تعداد 5000 سلول به هر چاهک در پلیت 96 تایی اضافه شد. بعد از

که بیش از 95 درصد سلول‌ها برای مارکر CD90 مثبت هستند. نمودار CD105 نشان می‌دهد که بیش از 90 درصد سلول‌ها برای مارکر CD105 مثبت هستند نمودار CD34 نشان می‌دهد که تقریباً تمام سلول‌ها برای این مارکر منفی هستند در اندازه‌گیری پروتئین به روش براد فورد، منحنی استاندارد با رقت‌های مختلف از BSA (Bovine Serum Albumin) ترسیم شد و غلظت پروتئین در سوپر ناتانت سلول‌های بنیادی مزانشیمال براساس منحنی استاندارد، 56/75 میکروگرم در میلی‌لیتر به دست آمد. نمودار استاندارد برای غلظت‌های 100-300 میکروگرم در هر میلی‌لیتر پروتئین، در تصویر شماره 2 نشان داده شده است.



تصویر شماره 2: نمودار استاندارد برای غلظت های 100-300 µg/ml (دستگاه Synergy HI Hybrid Reader)

نتایج بررسی فعالیت متابولیک سلولی با روش MTT، به دنبال تیمار سلول‌های سرطانی رده A549 و JEG3 با درصدهای مختلف سوپرناتانت سلول‌های بنیادی مزانشیمال نشان داد که سوپر ناتانت حاصل از این سلول‌ها اثر منفی بر فعالیت متابولیک سلول‌های سرطانی ریه (A549) دارد (تصویر شماره 3) و از نظر آماری تفاوت معنی‌داری بین گروه تیمار شده با کنترل وجود دارد ($P < 0/05$). همان‌طور که در تصویر مشاهده می‌شود، درصد حیات سلولی بین گروه‌های تیمار شده با گروه تیمار نشده متفاوت است و سوپر ناتانت سلول‌های بنیادی مزانشیمال باعث کاهش بقا سلولی در سلول‌های سرطان ریه شده است؛ در حالی که تاثیر کمی بر فعالیت متابولیکی و حیات سلول



تصویر شماره 1: آنالیز فلوسایتمتری سلول های بنیادی مزانشیمال حاصل از ژله وار تون

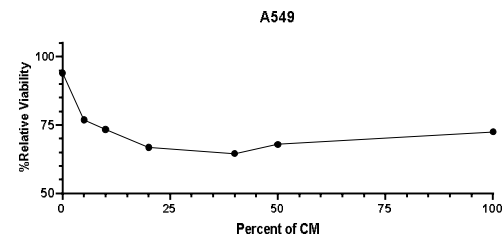
همان‌طور که در تصویر مشاهده می‌شود بیش از 90 درصد سلول‌ها برای مارکر CD90 و CD105 مثبت هستند. در صورتی که درصد بسیار کمی از سلول‌ها (0/15 درصد) مارکر CD34 را بیان می‌کنند نمودار CD90 نشان می‌دهد

بنیادی مزانشیمال بر روی رده سرطانی A549 اثر مهارتی دارد و از نظر آماری تفاوت معناداری بین سلول‌های تیمار شده با سلول‌های کنترل، از نظر بقا و فعالیت متابولیکی وجود دارد ($P < 0/05$)، در حالی که در رده سلولی JEG3، تأثیری روی بقا سلولی نداشت ($P > 0/05$).

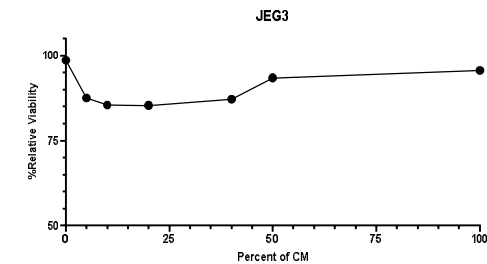
در مطالعه‌ای که توسط LI و همکاران در سال 2017 انجام شد، اثر سوپر ناتانت سلول‌های بنیادی مزانشیمال روی رده سلولی A549 و MDA-MB-231 مورد بررسی قرار گرفت. نتایج این مطالعه نشان داد که سوپر ناتانت سلولی، اثر مهارتی روی مهاجرت سلول‌های سرطانی A549 دارد اما هیچ تأثیری روی تکثیر رده‌های سلولی مورد مطالعه نداشته است (2). نتایج این مطالعه با یافته‌های ما تناقض دارد.

Iman Seyhoun و همکاران (2019) در مطالعه‌ای تأثیر سوپر ناتانت سلول‌های بنیادی مزانشیمال را بر روی رده سلولی کارسینوما هیپاتو سلولار HepG2 مورد بررسی قرار دادند. میزان تکثیر سلولی در گروه‌های تیمار شده نسبت به گروه کنترل کاهش شدیدی را نشان داد. این مطالعه اثر مهارتی سوپر ناتانت سلول‌های بنیادی مزانشیمال را بر روی رده سلولی سرطانی نشان داد (14). Li و همکاران در سال 2011 اثر سلول‌های بنیادی مزانشیمال و سوپر ناتانت آن‌ها را روی سلول‌های سرطان ریه (SK-MES-1, A549) بررسی کردند. نتایج این پژوهش نشان داد که سوپر ناتانت سلول‌های بنیادی مزانشیمال باعث القاء آپوپتوز در سلول‌های سرطان ریه می‌شود و تکثیر و رشد آن‌ها را مهار می‌کند. نتایج این مطالعه با نتایج مطالعه ما همخوانی دارد و اثر مهارتی سوپر ناتانت را بر روی سلول‌های سرطانی نشان می‌دهد (15). با توجه به نتایج این مطالعات، سلول‌های بنیادی مزانشیمال و سوپر ناتانت حاصل از آن‌ها به عنوان افق درمانی مناسبی در این نوع سرطان‌ها می‌تواند مورد توجه قرار گیرد. در مطالعه‌ای توسط فرهمند و همکاران در سال 2018، اثر سوپر ناتانت سلول‌های بنیادی مزانشیمال مشتق از مغز استخوان روی سلول‌های سرطان سینه (MCF7)

در سلول‌های سرطانی کوریوکارسینوما (JEG3) داشته است (تصویر شماره 4) و تفاوت بین گروه تیمار شده و کنترل از نظر آماری معنی‌دار نمی‌باشد ($P > 0/05$). همچنین بین گروه‌های مختلف تیماری هم از نظر بقا سلولی تفاوت معناداری وجود ندارد.



تصویر شماره 3: نتایج MTT گروه‌های مختلف تیمار شده با سوپر ناتانت سلول‌های بنیادی مزانشیمال در مقایسه با کنترل در رده سلولی A549. همان‌طور که در شکل مشخص است، سوپر ناتانت باعث کاهش بقا سلول‌های سرطانی شده است و تفاوت معناداری بین گروه‌های مختلف تیماری با گروه تیمار نشده (کنترل) وجود دارد ($P < 0/05$).



تصویر شماره 4: نتایج MTT گروه‌های مختلف تیمار شده با سوپر ناتانت سلول‌های بنیادی مزانشیمال در مقایسه با کنترل در رده سلولی JEG3. همان‌طور که در شکل مشاهده می‌شود، درصد‌های مختلف سوپر ناتانت سلول‌های بنیادی مزانشیمال تأثیر کمی روی بقا سلول‌های سرطانی و فعالیت متابولیک سلول داشته است که این تأثیر از نظر آماری معنادار نمی‌باشد ($P < 0/05$).

بحث

با توجه به نقش امیدبخش سلول‌های بنیادی مزانشیمال و سوپر ناتانت آن‌ها در درمان سرطان‌ها، در این مطالعه اثر سوپر ناتانت سلول‌های بنیادی مزانشیمال بر روی رده‌های سرطانی JEG3 و A549 مورد بررسی قرار گرفت. نتایج این تحقیق نشان داد که سوپر ناتانت سلول‌های

ناتانت سلول های بنیادی مزانشیمال، ممکن است منشاء متفاوت سلول بنیادی باشد. به این ترتیب تناقضاتی که در اثرات آن ها مشاهده شده، می تواند تا حدی قابل توجه باشد. از موارد قابل توجه دیگر در سوپر ناتانت های سلولی نحوه تهیه آن ها می باشد. در برخی پژوهش ها، سوپر ناتانت های تهیه شده، تغلیظ شده و ذخیره می شوند که این مورد می تواند در عملکرد آن ها تاثیر گذار باشد. لذا پیشنهاد می شود برای استفاده از سلول های بنیادی مزانشیمال و سوپر ناتانت این سلول ها به عنوان اهداف درمانی، علاوه بر انجام مطالعات پایه جهت پی بردن به مکانیسم های مولکولی مرتبط با این سلول ها، نقش آن ها بر روی سلول های مختلف سرطانی هم انجام گیرد تا این سلول ها بتوانند به عنوان یک رویکرد درمانی، مورد استفاده قرار گیرند.

سپاسگزاری

مطالعه حاضر با حمایت معاونت محترم تحقیقات و فن آوری دانشگاه علوم پزشکی مازندران به شماره 2807 انجام شده است که نویسندگان مراتب تشکر و قدردانی خود را اعلام می دارند.

مورد بررسی قرار گرفت و بیان ژن های مربوط به تکثیر سلولی و آپوپتوز ارزیابی شد. نتایج این مطالعه نشان داد که سوپر ناتانت سلولی باعث افزایش بیان ژن های ضد آپوپتوز و ژن های مرتبط با تکثیر سلولی می شود. افزایش بیان این ژن ها با پیش آگهی بد بیماری ارتباط دارد (16).
Chen و همکاران اثر سوپر ناتانت سلول های بنیادی مزانشیمال را بر تکثیر و مهاجرت سلول های A549 مورد بررسی قرار دادند. نتایج مطالعه نشان داد که سوپر ناتانت سلولی باعث افزایش تکثیر و مهاجرت سلول های A549 می شود (17). با توجه به مطالعات مختلف مشاهده می شود که رفتار سلول های سرطانی مختلف در مقابل سوپر ناتانت سلولی متفاوت می باشد. بنابراین باید مطالعات پیش تری در مورد سرطان های مختلف انجام گیرد تا اطلاعات حاصل از این مطالعات در استفاده از این رویکرد درمانی مورد توجه قرار گیرند. یک مورد حائز اهمیت در این مطالعات، تفاوت در منشاء سلول های بنیادی مزانشیمال می باشد. بررسی ها نشان داده اند که سوپر ناتانت های حاصل از سلول های بنیادی مزانشیمال از منابع مختلف، از نظر مواد و ترکیبات مترشحه متفاوت می باشند که این مورد می تواند در انتخاب آن ها به عنوان راهکار درمانی، مد نظر قرار گیرد (18). یکی از دلایل تاثیر متفاوت سوپر

References

1. IARC Global Cancer Observatory. Latest global cancer data: Cancer burden rises to 18.1 million new cases and 9.6 million cancer deaths in 2018. International Agency for Research on Cancer: Lyon, France. 2018.
2. Li P, Zhou H, Di G, Liu J, Liu Y, Wang Z, et al. Mesenchymal stem cell-conditioned medium promotes MDA-MB-231 cell migration and inhibits A549 cell migration by regulating insulin receptor and human epidermal growth factor receptor 3 phosphorylation. *Oncol Lett* 2017; 13(3): 1581-1586.
3. Bertolo A, Pavlicek D, Gemperli A, Baur M, Pötzel T, Stoyanov J. Increased motility of mesenchymal stem cells is correlated with inhibition of stimulated peripheral blood mononuclear cells in vitro. *Journal of Stem Cells and Regenerative Medicine* 2017; 13(2): 62-74.
4. Abediankenari S, Yousefzadeh Y, Azadeh H, Vahedi, M. Comparison of several maturation inducing factors in dendritic cell differentiation. *Iranian Journal of Immunology* 2010; 7(2): 83-87.
5. Abediankenari S, Eslami MB, Sarrafnejad A, Mohseni M, Larjani B. Dendritic cells bearing

- HLA-G inhibit T-cell activation in type 1 diabetes. *Iran J Allergy Asthma and Immunol* 2007; 6(1): 1-7 (Persian).
6. Linero I, Chaparro O. Paracrine effect of mesenchymal stem cells derived from human adipose tissue in bone regeneration. *PloS one* 2014; 9(9): e107001.
 7. Shinagawa K, Kitadai Y, Tanaka M, Sumida T, Kodama M, Higashi Y, et al. Mesenchymal stem cells enhance growth and metastasis of colon cancer. *Int J Cancer* 2010; 127(10): 2323-2333.
 8. Zhang T, Lee YW, Rui YF, Cheng TY, Jiang XH, Li G. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells promote growth and angiogenesis of breast and prostate tumors. *Stem Cell Research & Therapy* 2013; 4(3): 70.
 9. Li W, Zhou Y, Yang J, Zhang X, Zhang H, Zhang T, et al. Gastric cancer-derived mesenchymal stem cells prompt gastric cancer progression through secretion of interleukin-8. *J Exp Clin Cancer Res* 2015; 34(1): 52.
 10. Khakoo AY, Pati S, Anderson SA, Reid W, Elshal MF, Rovira II, et al. Human mesenchymal stem cells exert potent antitumorigenic effects in a model of Kaposi's sarcoma. *J Exp Med* 2006; 203(5): 1235-1247.
 11. Gauthaman K, Yee FC, Cheyyatraivendran S, Biswas A, Choolani M, Bongso A. Human umbilical cord Wharton's jelly stem cell (hWJSC) extracts inhibit cancer cell growth in vitro. *J Cell Biochem* 2012; 113(6): 2027-2039.
 12. Ayuzawa R, Doi C, Rachakatla RS, Pyle MM, Maurya DK, Troyer D, et al. Naive human umbilical cord matrix derived stem cells significantly attenuate growth of human breast cancer cells in vitro and in vivo. *Cancer Letters* 2009; 280(1): 31-37.
 13. Khalil C, Moussa M, Azar A, Tawk J, Habbouche J, Salameh R, et al. Anti-proliferative effects of mesenchymal stem cells (MSCs) derived from multiple sources on ovarian cancer cell lines: an in-vitro experimental study. *J Ovarian Res* 2019; 12(1): 70.
 14. Seyhoun I, Hajighasemlou S, Jafari A, Hosseinzadeh F, Mirmoghtadaei M, Seyhoun SM, et al. Novel Combination of Mesenchymal Stem Cell-Conditioned Medium with Sorafenib Have Synergistic Antitumor Effect of Hepatocellular Carcinoma Cells. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention* 2019; 20(1): 263-267 (Persian).
 15. Li L, Tian H, Chen Z, Yue W, Li S, Li W. Inhibition of lung cancer cell proliferation mediated by human mesenchymal stem cells. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)* 2011; 43(2): 143-148.
 16. Farahmand L, Esmaili R, Eini L, Majidzadeh AK. The effect of mesenchymal stem cell-conditioned medium on proliferation and apoptosis of breast cancer cell line. *Journal of Cancer Research and Therapeutics* 2018; 14(2): 341-344 (Persian).
 17. Chen J, Li Y, Hao H, Li C, Du Y, Hu Y, et al. Mesenchymal stem cell conditioned medium promotes proliferation and migration of alveolar epithelial cells under septic conditions in vitro via the JNK-P38 signaling pathway. *Cell Physiol Biochem* 2015; 37(5): 1830-1846.
 18. Li X, Bai J, Ji X, Li R, Xuan Y, Wang Y. Comprehensive characterization of four different populations of human mesenchymal stem cells as regards their immune properties, proliferation and differentiation. *International Journal of Molecular Medicine* 2014; 34(3): 695-704.