

Structure of Tumor and Localization of Na⁺/K⁺-ATPase in Mouse (Balb/c nu), 4T1 Breast Tumor Model

Ameneh Ahrani¹,
Saber Khodabandeh²,
Haleh Akhavan Niaki³,
Mohsen Asouri⁴,
Aliasghar Ahmadi⁵

¹ MSc Student in Marine Biology, Faculty of Marine Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

² Associate Professor, Department of Marine Biology, Faculty of Marine Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

³ Associate Professor, Department of Cell and Molecular, Cellular and Molecular Biology Research Center, Faculty of Medicine, Babol University of Medical Sciences, Babol, Iran

⁴ PhD Candidate in Biotechnology, North Research Center, Pasteur Institute of Iran, Amol, Iran

⁵ PhD Candidate in Developmental and Stem Cell Biology, Cellular and Molecular Biology Research Center, Faculty of Medicine, Babol University of Medical Sciences, Babol, Iran

(Received December 9, 2015 ; Accepted March 7, 2016)

Abstract

Background and purpose: The 4T1 cell line is a laboratory model used in the study of tumors biology. This cell line is very tumorigenic with high metastatic capacity in different organs. In this study, histology and immunohistochemistry methods were used to investigate the structure and localization of Na⁺/K⁺-ATPase enzyme in 4T1 cells induced breast cancer tumor in *Balb/c nu* mice.

Materials and methods: The histological sections (4 μm) were stained using Hematoxylin-Eosin and IgGα₅ special antibody was used for immunohistochemistry study.

Results: Study of tumor structure showed abnormal proliferation and high mitogenicity in epithelial cells with high proliferation rate. Immunohistochemistry analysis revealed significant immunofluorescence, indicating abundant presence of Na⁺/K⁺-ATPase enzymes (sodium potassium pump) in tumor cells.

Conclusion: Current results showed high rate of sodium potassium pump in plasma membrane of tumor cells. Immunofluorescence characteristic of 4T1 tumor cell lines make them appropriate candidate for antitumor studies.

Keywords: Breast tumor, Na⁺/K⁺-ATPas, 4T1, immunohistochemistry, *Balb/c nu*

J Mazandaran Univ Med Sci 2016; 26(137): 1-11 (Persian).

بررسی سلولی تومور و مکان‌یابی آنزیم $\text{Na}^+, \text{K}^+ \text{-ATPase}$ در موش توموری شده $[\text{Balb}/c \text{ nu}]$ با استفاده از رده سلولی 4T1

آمنه احراری^۱
صابر خداپنده^۲
هاله اخوان نیکی^۳
محسن آسوری^۴
علی اصغر احمدی^۵

چکیده

سابقه و هدف: رده سلولی 4T1 کارسینومای پستان موش، یک مدل آزمایشگاهی است که به صورت گسترده در مطالعه بیولوژی تومورها کاربرد دارد. این سلول‌ها به شدت تومورزا و مهاجم بوده و دارای قابلیت بالای متاستاز در اندام‌های دیگر هستند. این مطالعه به منظور بررسی ساختار و مکان‌یابی آنزیم $\text{Na}^+, \text{K}^+ \text{-ATPase}$ ، تومورهای ایجاد شده توسط رده سلولی 4T1 در موش $\text{Balb}/c \text{ nu}$ به روش بافت‌شناسی و ایمونوهیستوشیمی انجام شد.

مواد و روش‌ها: برش‌های هیستولوژیک (به ضخامت $4 \mu\text{m}$) با هماتوکسیلین-ئوزین رنگ آمیزی شد و برای مطالعه ایمونوهیستوشیمی از آنتی‌بادی اختصاصی IgG₅ استفاده گردید.

یافته‌ها: بررسی ساختار تومور نشان داد که تکثیر غیر عادی در سلول‌های اپیتلیال و هم‌چنین پلئومورفیسم بالایی از میتوزنیستی سلول‌ها قابل مشاهده است. در آنالیز تصاویر ایمونوهیستوشیمی، ایمونوفلوئورسانس قابل توجهی که شاخص حضور فراوان آنزیم $\text{Na}^+, \text{K}^+ \text{-ATPase}$ و به عبارتی پمپ سدیم-پتاسیم می‌باشد، در سلول‌های توموری دیده شد.

استنتاج: نتایج نشان داد که سلول‌های تومور غنی از پمپ سدیم-پتاسیم در غشا پلاسمایی خود بوده است. نتایج تحقیق حاضر نشان داد که ویژگی ایمونوفلوئورسانس تومور رده سلولی 4T1 این امکان را می‌دهد که به عنوان یک شاخص در مطالعات درمانی ضد توموری استفاده گردد.

واژه‌های کلیدی: تومور پستان، $\text{Na}^+, \text{K}^+ \text{-ATPase}$ ، 4T1، ایمونوهیستوشیمی، $\text{Balb}/c \text{ nu}$

مقدمه

در مناطق مختلفی چون گره‌های لنفاوی و اندام‌های دورتری چون استخوان، ریه، کبد و مغز است (۳-۷، ۵). مطالعات بسیاری در زمینه مارکرهای وابسته به تومور و پیش‌آگهی مربوط به آن صورت گرفته است (۸).

سرطان، مجموعه‌ای از بیماری‌هاست که در آن سلول‌ها به صورت غیرطبیعی و کنترل نشده گسترش یافته و سبب ایجاد توده‌ای گوشتی به نام تومور می‌شوند (۱). دلیل عمده مرگ و میرهای ناشی از سرطان، توسعه و متاستاز

E-mail: surp78@gmail.com

مؤلف مسئول: صابر خداپنده - نور: خیابان امام، دانشگاه تربیت مدرس

۱. دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه زیست‌شناسی دریا، دانشکده علوم دریایی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

۲. دانشیار، گروه زیست‌شناسی دریا، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

۳. دانشیار، مرکز تحقیقات بیولوژی سلولی مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی، بابل، ایران

۴. دانشجوی دکتری بیوتکنولوژی، انستیتو پاستور ایران، آمل، ایران

۵. دانشجوی دکتری سلول‌های بنیادی، مرکز تحقیقات بیولوژی سلولی مولکولی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی بابل، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۹/۱۸ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات: ۱۳۹۴/۹/۲۴ تاریخ تصویب: ۱۳۹۴/۱۲/۱۷

دارد (۱۹). این آنزیم از دو زیر واحد مجزای گلوبولی α و β تشکیل شده است. پروتئین α گیرنده‌های سدیم و پتاسیم داشته و قسمتی از درون آن فعالیت ATPase دارد. آنتی‌بادی مورد استفاده در بخش ایمنو هیستوشیمی منوکلونال α_5 است که قادر به شناسایی زیر واحدهای $\text{Na}^+, \text{K}^+ \text{-ATPase}$ می‌باشد و گزارشات نشان داده که وجود این آنزیم در واکنش با $\text{IgG}\alpha_5$ واکنش ایمنیایی (Immunoreactivity) ایجاد می‌کند (۲۰، ۲۲، ۲۱) و (FITC) Fluorescein isothiocyanate که برای مشخص نمودن آنتی‌بادی‌ها و یا سایر پروتئین‌ها استفاده می‌شود، به آنتی‌بادی $\text{IgG}\alpha_5$ متصل و سبب ایجاد رنگ فلوئورسنت سبز زرد در محل حضور آنتی‌بادی و در این جا در محل حضور آنزیم $\text{Na}^+, \text{K}^+ \text{-ATPase}$ می‌گردد.

محققان استدلال متقاعد کننده‌ای دارند که بیان می‌کند این پمپ با داشتن زیر واحدهای اختصاصی، توانایی هماهنگی با نیازهای فیزیولوژیک سلول را دارد (۲۳) و در نتیجه با تغییر در بیان و سوء عمل، منجر به اختلال در ساختمان اتصالات سلولی و سرانجام پیشرفت سرطان پستان می‌شود (۲). اگرچه فعالیت و بیان ژن این پمپ بررسی شده است، اما ایمنو فلوئورسانس آن در تومور پستان مطالعه نشده است. به منظور مطالعه پمپ سدیم-پتاسیم در ساختار تومور از رده سلولی 4T1 استفاده گردید (۲۴). همان طوری که اشاره شد، اگرچه به نقش پمپ سدیم-پتاسیم در تومورهای پستان در مطالعات پرداخته شده، ولی مکان‌یابی آنزیم این پمپ به روش ایمنو هیستوشیمی بررسی نشده است. لذا تحقیق حاضر به دنبال بررسی ساختار تومور و مکان‌یابی این آنزیم در قسمت‌های مختلف تومور بوده است.

مواد و روش‌ها

۱- کشت سلول و آماده سازی رده سلولی 4T1

رده سلولی 4T1 برای القا تومور زیر جلدی در ناحیه FAT PAD از انستیتو پاستور ایران تهیه گردید. سلول‌ها با رعایت شرایط استاندارد کشت داده شده و

مطالعات حاصل از داروهای ضد استروژنی چون تاموکسیفن و مهارکننده‌های آروماتاز نشان داده این ترکیبات ابتدا در درمان تومور موفق عمل کردند. اما بعدها تحقیقات نشان داد که اکثر تومورهای ایجاد شده مقاوم به درمان هستند. لذا هدف‌های دیگری برای درمان تومور در نظر گرفته شده که بیان می‌کند انتقال دهنده‌های یونی دارای خواص منحصر به فردی هستند و دارای قابلیت درمانی هستند (۲).

در تحقیقات جدید مشخص شده است که انتقال دهنده‌های یونی در عملکردهایی چون تکثیر سلولی نقش داشته و نقش آن‌ها در سرطان به خوبی مطالعه شده است (۹). از جمله این انتقال دهنده‌ها پمپ سدیم-پتاسیم بوده که دارای نقشی اساسی در سلول‌های سرطان پستان می‌باشد به این دلیل که در پیشرفت و چسبندگی سلول‌های توموری نقش کلیدی ایفا کرده، هم چنین به عنوان یک مبدل سیگنالی همکاره در تنظیم هورمون‌هایی چون استروژن دخالت دارد و بیان نابجا و فعالیت بالای آن در توسعه و پیشرفت تومور پستان قابل توجه است (۲). حضور این پمپ هم چنین برای فعالیت حیاتی تمامی سلول‌های بدن الزامی است، اما در سلول‌هایی که نقش تنظیم یونی دارند و هم چنین در سلول‌های جذبی روده، حضور این پمپ بیش تر است (۱۱). هم چنین گزارش شده که حضور نا برابر این پمپ در سلول‌های اپیتلیالی سبب تغییر و از دست دادن قطیت در آن‌ها می‌گردد (۱۲). به علاوه، فعالیت این پمپ در ماه‌های قبل از رشد تومور در مخاط پیش سرطانی، تغییر پیدا می‌کند (۱۳). این پمپ فعالیتش را مدیون حضور آنزیمی به نام $\text{Na}^+, \text{K}^+ \text{-ATPase}$ می‌باشد که بیان بیش تر زیر واحد α این پمپ در سرطان کلیه (۱۴)، مثانه (۱۵) و در شکل بسیار تهاجمی در سرطان ریه (۱۶) و بافت‌های دیگر (۱۷) مشخص شده است. در مطالعات اخیر اشاره شده که آنزیم $\text{Na}^+, \text{K}^+ \text{-ATPase}$ در تنظیم فنوتیپ قطبی سلول‌های اپیتلیالی تومور (۱۲) و تحرک سلول‌های سرطانی جهت فعالیت تهاجمی و متاستازی نقشی کلیدی بر عهده

به منظور تشخیص مهاجم بودن سلول‌ها، تست تشکیل کلونی در آگار صورت گرفت و پس از یک شبانه روز در محیط RPMI حاوی ۱۰ درصد سرم جنین گاو (BSA) و آنتی‌بیوتیک Pen/Strep تریپسینه و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و شرایط CO₂ ۵ درصد کشت داده شد. در فاز لگاریتمی رشد سلول‌ها با تریپسین از فلاسک جدا و بعد از شمارش و تعیین قابلیت زیستی (بالای ۹۰ درصد) به شکل سوسپانسیون در محیط بافر فسفات استریل (PBS) و آماده تزریق شدند (۲۶،۲۵).

۲- انتخاب مدل حیوانی و تزریق سلول

در این مطالعه ۱۰ سر موش نود ماده گونه Balb/c nu (۴ تا ۵ هفته) از انستیتو پاستور تهیه گردید که در حیوان‌خانه این انستیتو طبق شرایط خاص و رعایت نکات ایمنی جهت القای رده سلولی آماده شدند. القای تومور در ناحیه FAT PAD با این کلونی سلولی برای ۱۰ نمونه موش در نزدیک پستان انجام شد. پس از تزریق رده سلولی، تومورها به روش میکروسکوپی و ماکروسکوپی بررسی شدند. در نهایت همه ۱۰ سر موش تزریقی دچار تومور شدند. از زمان قابل مشاهده بودن تومور، بیومتری آن‌ها با کولیس ورنیه انجام و روزانه موش‌ها از نظر سلامت جسمی مورد بررسی قرار گرفتند (در تمام مراحل تحقیق، اصول اخلاقی کار با این حیوانات رعایت شده است). بعد از طی یک دوره یک ماهه، موش‌های سرطانی بیهوش و طی عمل جراحی، تومور از بدن خارج و به منظور مطالعات بعدی، در بوئن به مدت ۲۴ ساعت تثبیت شدند (۲۸،۲۷).

۳- بافت شناسی کلاسیک

بررسی‌های بافت شناسی نمونه‌های تثبیت شده با استفاده از روش معمول در آزمایشگاه بافت‌شناسی و مطالعات میکروسکوپی انجام شد (۳۰، ۲۹). به طور خلاصه، نمونه‌ها بعد از تثبیت، جهت آنگیری در اتانول ۷۰ درصد قرار داده شدند. مراحل آنگیری با استفاده از الکل‌های ۹۰ درصد (دو بار چهار ساعته) و ۱۰۰ درصد (دو بار یک

ساعته) و در نهایت با الکل بوتیلیک (دو بار ۱۲ ساعته) انجام شد. نمونه‌ها بعد از ۱۲ ساعت نگهداری در پارافین مایع (داخل آون با دمای ۶۰°C)، در داخل پارافین قالب‌گیری شده و با استفاده از میکروتوم، برش‌های عرضی و طولی ۴ میکرومتری تهیه گردید. برش‌های مطالعات بافت‌شناسی بر روی لام‌های شسته شده در الکل ۷۰ درصد قرار داده شده و لام‌ها ۲۴ ساعت در آون در دمای ۳۷°C نگهداری شدند. نمونه‌ها بعد از پارافین زدائی (به کمک تولوئن و زایلن) و آبدهی با استفاده از هماتوکسلین-ائوزین رنگ شده و با میکروسکوپ نوری معمولی (Nikone DS-Fil) مطالعه و عکس برداری شدند (۳۱).

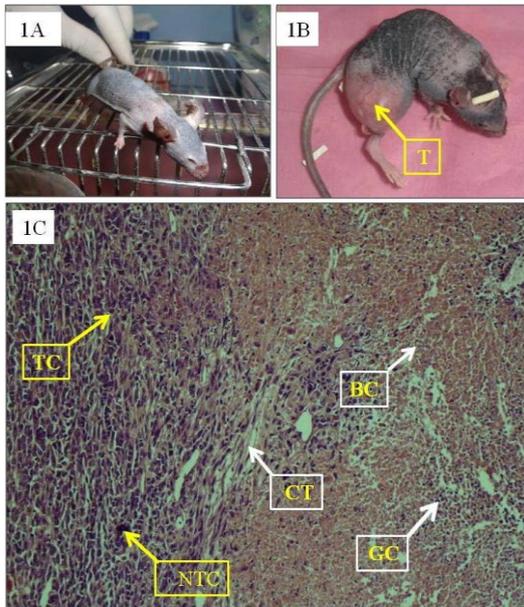
۴- ایمونوهیستوشیمی

تعیین مکان و حضور پمپ سدیم-پتاسیم با استفاده از مکان‌یابی دانسیته فلوروسانس آنزیم - K⁺ , Na⁺ ATPase با استفاده از آنتی‌بادی IgG_{α5} (۳۲) Monoclonal Antibody Raised Against the a-subunit of the Chicken NKA; Developmental (Studies و (Hybridoma Bank, the university of Iowa, USA آنتی‌بادی FITC (Mouse Anti-fluorescein Antibody) (Jackson Immuno Research, USA) و میکروسکوپ فلوروسانس انجام گرفت. برای مطالعه ایمونوهیستوشیمی، لام‌ها بعد از پارافین زدایی در HCl و آبدهی در اتانول، در محلول PBS، قرار داده شد. سپس لام‌ها در PBS شستشو داده شده و روی هر لام ۲ تا ۳ قطره از آنتی‌بادی IgG_{α5} رقیق شده به میزان ۲۰ μg/ml برای ۱۰ لام در PBS اضافه و به مدت ۵ ساعت در دمای اتاق نگهداری شد. بعد از شستشوی آنتی‌بادی اضافی با PBS، ۲-۳ قطره از آنتی‌بادی FITC روی هر لام اضافه و به مدت ۳ ساعت در محیط تاریک نگهداری شد، سپس لام‌ها با PBS شستشو و با استفاده از مایع مونتاژ، مونتاژ شدند (۳۳، ۳۴).

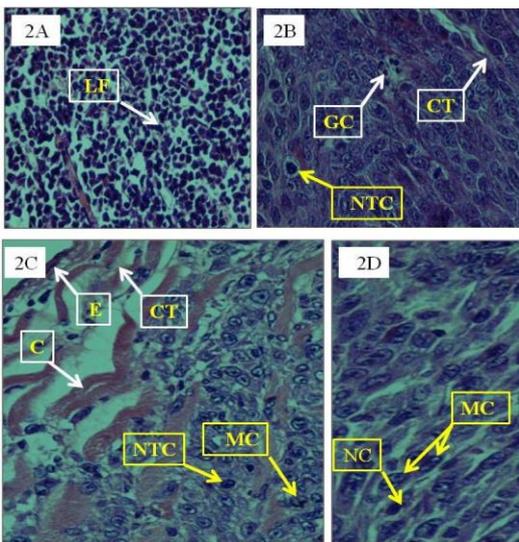
یافته‌ها

در این مطالعه، تزریق سلول‌های رده 4T1 در

نشان داد که نشان از حضور فراوان آنزیم $\text{Na}^+, \text{K}^+ \text{-ATPase}$ و به عبارتی تعداد زیاد پمپ سدیم-پتاسیم می باشد. فلئورسانس در تمام بخش های سلول غیر از هسته انتشار داشت و بیش تر در ناحیه غشا پلاسمایی قابل رویت بود (تصویر شماره 3D).



تصویر 1A: فرقیب موش ماده *Balb/c nu* سبب ایجاد آدنوکارسینوما پستان در موش شد. تصویر 1B: مدل سازی رده 4T1 در موش *Balb/c nu* سبب ایجاد آدنوکارسینوما پستان در موش شد. تصویر 1C: نمای میکروسکوپی از آدنوکارسینوما پستان موش که با هماتو-کسین-انوزین رنگ آمیزی شده، سلول های توموری با هسته های بزرگ و سیتوپلاسم کم در کنار تجمعی از سلول های خونی و گرتولوسیتها که در استرومای تومور نفوذ کرده اند (×۱۰۰).
T: Tumor, TC: Tumor Cell, SC: Stromal Cell, CT: Connective Tissue, NTC: Necrosis Tumor Cell, GC: Granulosa Cells, BC: Blood Cell



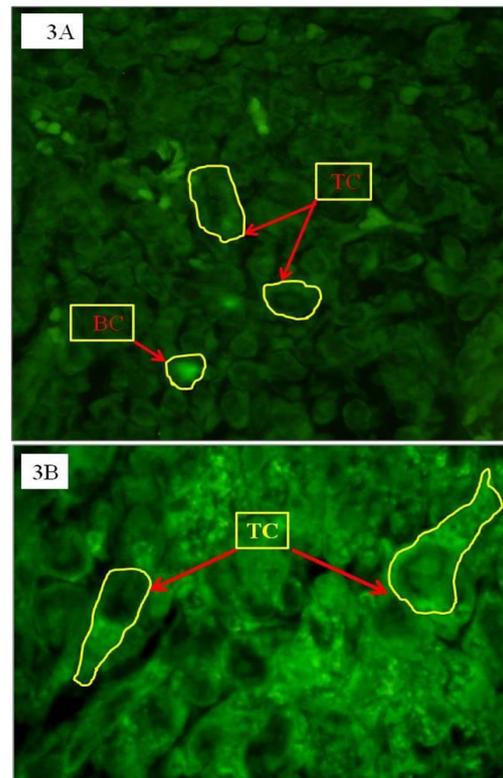
تصویر 2A: تجمع سلول های لنفوسیتی (ماکرופاژها، لنفوسیتها و پلازموگلوبولینها در بافت پیوندی تومور به وسیله قابل مشاهده است. ×۴۰.
تصویر 2B: سلول های توموری دارای شکل های مختلفی از هسته هستند. نسبت بالای هسته به سیتوپلاسم، هسته های هایپر کروماتیک در این سلولها به خوبی مشخص است. ×۴۰.
تصویر 2C: شناسایی از سلول های مزوپیتلیال و سلول های بومی که در حال جایگزینی با سلول های توموری هستند. در این بخش انبوهی از رده های کلاژن استروما قابل مشاهده است که در این بخش از ریز محیط تومور جمع پیدا کردند. همچنین تعدادی از این سلولها دچار نکروز و برخی دچار میتوز شده اند. ×۴۰.
تصویر 2D: سلول های توموری که در سیتوپلاسم آنزولین به همراه هسته گرد و هسته های غالب دیده می شوند این سلولها غالباً مزوپیتلیال و برآمدگی بزرگ اپیکال را نمایش می دهند.
LF: Lymphoid Follicles, GC: Granulosa Cell, CT: Connective Tissue, NTC: Necrosis Tumor Cell, E: Epithelial, C: Collagen, MC: Mitotic Cells

ناحیه FAT PAD موش های ترانسژنیک ماده (۴-۵ هفته) گونه *Balb/c nu* انجام شد (تصویر شماره 1A). پس از گذشت ۸ روز، موش ها دارای تومورهای پستان با قوام و پر رنگ شدند (تصویر شماره 1B). تظاهر توده توموری نشان دهنده مهاجم بودن این رده سلولی و موفقیت پیوند بود. پس از گذشت ۳-۴ هفته، تومورها دارای قوام کاملاً جامد، جراحت و التهاب و موش ها دارای افت وزن، تغییر رنگ پوست، انحراف در ستون فقرات و متاستاز قابل رویت شدند (تصویر شماره 1B). در پایان این دوره، موش ها دچار کاهش وزن مفرط و افت ضربان قلب، بی حالی مفرط، عدم حرکت و تغذیه به مدت ۵ تا ۶ ساعت قبل از مرگ شدند. پس از بیهوشی و جراحی تومور، در نواحی شکمی، کبدی و زیر جلدی تومورهای متاستازی دیده شدند. در برش عرضی بافت تومور، تجمعی از سلول های اپیتلیالی در استروما به همراه تجمع شامل سلول های ایمنی به ویژه لنفوسیتها و ماکروفاژها هستند (تصویر شماره 2A). سلول های اپیتلیالی دارای پلئومورفیسم (دوکی، گرد، تخم مرغی) با هسته های آبی هایپرکروماتین، اندکس میتوتیک بالا و نسبت بالای هسته به سیتوپلاسم (محتوای DNA متفاوت) و نکروزیس در برخی موارد (تصاویر شماره 2B, 2C, 2D) بودند. هم چنین سلول های اپیتلیال در بخش هایی از تومور دارای میزان بالایی هسته هایپرکروماتینی و سلول های نکروزه فراوان بودند (تصاویر شماره 2B, 2D). سلول های اپیتلیال در استرومای توموری با فاصله زیادی در کنار یکدیگر قرار گرفته و در حال جدا شدن از غشای پایه بودند. این سلول های همگن، در بین بافت پیوندی و کلاژن به خوبی قابل مشاهده بودند (تصویر شماره 2C). بررسی لام های ایمونوهیستوشیمی نشان داد که فلئورسانس ضعیفی در غشاء تمامی سلول ها قابل رویت می باشد و حتی سلول های خونی اتوفلئورسانس زرد رنگی از خود نشان دادند (تصویر شماره 3A). در سلول های توموری، غشاء پلاسمایی فلئورسانس بالایی را

کاهش وزن) را بهتر نشان می‌دهد(۴۱). لذا در این مطالعه از موش *Balb/c nu* استفاده شد.

مطالعات بسیار زیادی در ارتباط با عوامل کنترل و مهار متاستاز این رده سلولی در غالب مطالعات هیستولوژی(۳۲،۳۷،۳۹،۴۲-۴۷) صورت گرفته است. نتایج مطالعه حاضر در بخش بافت شناسی پستان نشان داد که ریز محیط تومور متشکل از میزان بالایی استروما، به همراه تجمعی از سلول‌های ناهمگن میلوئیدی، سلول‌های خونی، گرانولوسیت‌ها و سلول‌های اپیتلیالی سرطانی با شاخص بالای میتوتیکی است که ظاهر آپیکال گرد و دوکی با هسته‌های هایپر کروماتیک داشته و برخی دارای نسبت بالای هسته به سیتوپلاسم بودند. هم‌چنین سلول‌های توموری نکروزه که در بخش‌هایی از تومور از غشای پایه جدا شده بودند، مشاهده شد. سایر مطالعات در بخش بافت‌شناسی سرطان پستان نیز برخی از عارضه‌های عنوان شده را در مطالعات خود نشان دادند. مطالعه Li و Lu (۲۰۱۱)، نشان داد که فیروبلاست استروما می‌تواند در پیشرفت تومور نقش غالبی ایفا کند(۴۰). فیروبلاست مسئول تولید فاکتورهای رشد، ماتریکس خارج سلولی، کموکینازهای رگزایی و ایمونولوژیک است که سبب رشد تومور(۳۸،۴۸)، سازگاری، تکامل و توسعه سلول‌های اپیتلیالی تومور می‌شود(۴۷). مطالعات نشان داده که مکانیزم‌های تنظیم کننده پروتئین‌های کیناز که سبب افزایش تکثیر، تهاجم سلول‌های تومور می‌شوند(۱۰)، با مهار پمپ سدیم-پتاسیم فعال می‌شوند(۳۸). Hunter(۲۰۰۷) نیز نشان داد که تجمع سلول‌های میلوئید به همراه گرانولوسیت‌ها در بافت اولیه تومور 4T1 سبب پیشرفت و افزایش پتانسیل متاستازی در موش ماده *Balb/c* شده است(۴۹).

مکان‌یابی پمپ سدیم-پتاسیم در بافت توموری پستان موش *Balb/c nu* با روش ایمونوهیستوشیمی با آنتی‌بادی $IgG\alpha_5$ در هیچ یک از مطالعات صورت نگرفته است. استفاده از روش ایمونوهیستوشیمی به عنوان یکی از مطمئن‌ترین روش‌های آزمایشگاهی،



تصویر 3A: سلول‌های توموری در کنار برخی از سلول‌های خونی که خاصیت اتوفلورسنت دارند، دیده می‌شود.
تصویر 3B: غشای سلول‌های تومور پستان دارای خاصیت فلورسنت است که این مرید وجود آنزیم Na^+ K^+ -ATPase در غشای این سلول‌هاست. *۴۰
TC: Tumor Cell, BC: Blood Cell

بحث

در مطالعه حاضر، از رده سلولی بسیار تهاجمی 4T1 جهت توموری کردن مدل‌های حیوانی ترانسژنیک (*Balb/c nu*) استفاده شد. گرچه انواعی از رده‌های سلولی برای مطالعه سرطان پستان وجود دارد(۳۵)، اما رده سلولی اپیتلیالی کارسینوم پستان 4T1، یک مدل موشی است که همانند مرحله چهارم سرطان پستان انسان، از طریق گردش خون سبب شروع متاستاز و نوپلازی در اندام‌های مختلف می‌شود(۳۶،۳۷). مطالعات نشان داده که استفاده از مدل‌های حیوانی این امکان را فراهم می‌کند که سلول‌ها بتوانند در یک ریز محیط توموری پیچیده متشکل از سلول‌های توموری، استروما، غشای پایه، رگ‌های خونی و سلول‌های التهابی و ... زندگی کنند(۴۰). هم‌چنین استفاده از موش‌های ترانسژنیک به دلیل نداشتن تیموس، تغییرات فیزیکی ایجاد شده (التهاب، نکروز، انحنا در سطح ستون فقرات،

همکاران (۲۰۰۶)، استدلال متقاعد کننده‌ای دارند که بیان می‌کند که تغییر در بیان و سوء عمل پمپ سدیم-پتاسیم منجر به اختلال در ساختمان اتصالات محکم و نهایتاً تغییر در اتصال و چسبندگی سلول‌ها و سرانجام پیشرفت تومور پستان می‌شود (۲). از طرفی تحقیقات نشان داده‌اند که رابطه مستقیمی بین بلوکه کننده‌های پمپ سدیم-پتاسیم و سرطان وجود دارد، از جمله: دیگوکسین و اوباین که گلیکوزیدهای طبیعی هستند و مطالعات حاکی از آن است که این ترکیبات به دلیل خواص چندگانه خود در غلظت‌های غیر سمی سبب مهار و القای خود کشی برنامه‌ریزی شده سلول (آپوپتوزیس) در رده‌های مختلف سلول‌های سرطانی می‌گردند (۵۴-۵۲). با بررسی نتایج این تحقیقات مشخص شده که زنان مبتلا به سرطان پستان طی دوره درمان با دیگوکسین، بافت شناسی خوش خیم و میزان پایینی از تکثیر و عود تومور را در مقایسه با افراد شاهد داشتند (۵۵). این نرخ رشد طی ۲۰ سال مطالعه و پیگیری، به طور قابل توجهی کاهش پیدا کرد (۵۶). با توجه به نتایج آورده شده در پژوهش‌های پیشین و مکان‌یابی پمپ سدیم-پتاسیم در تحقیق حاضر می‌توان گفت که این آنزیم در بخش‌های بازولترال سلول‌های اپیتلیال دارای فلوتورسانس مشخصی است که می‌تواند به دلیل چین خوردگی‌های فراوان غشا سلول باشد (۳۲). ضمن این که مطالعات نشان داده که فعالیت این پمپ در غشا بازولترال سلول‌های اپیتلیال پستان می‌تواند به دلیل نیاز مبرم سلول‌های توموری در جهت تبادلات یونی و مواد غذایی و دفعی باشد (۵۷). مطالعات صورت گرفته بر پمپ سدیم-پتاسیم موید این است که بیان زیر واحدهای این پمپ دارای خواص منحصر به فردی هستند و با توجه به این تفاوت‌ها در بافت‌های مختلف توزیع و بیان می‌شوند (۵۸). به طور کلی، نتایج این تحقیق نشان داد استفاده از روش فلوتورسانت α_5 تایید کننده نتایج تحقیقات پیشین مبنی بر فعالیت زیاد و بیان بالای ژن α این پمپ در سلول‌های توموری است و هم چنین انتشار غیر قطبی این پمپ در سلول‌ها، نشانگر

جهت شناسایی و تشخیص پمپ سدیم-پتاسیم برای نخستین بار در تومور پستان در مطالعه حاضر مورد بررسی قرار گرفت. در بخش ایمونوهیستوشیمی سلول‌های توموری، میزان بالایی از حضور پمپ سدیم-پتاسیم را از خود نشان دادند و از طرفی قطبیت حضور این پمپ، که معمولاً در ناحیه بازولترال سلول اپیتلیال قرار دارد، در این سلول‌ها از بین رفته و تمامی غشاء پلاسمایی فلوتورسانت بود.

Mani و همکاران (۲۰۰۷) بیان کرده‌اند که انتقال سلول‌های اپیتلیال-مزانسیمال سلول‌های کارسینوما به معنی شروع حمله متاستازی بوده، در طی این فرایند سلول‌های اپیتلیال اتصالات و قطبیت سلولی خود را از دست می‌دهند و از دست دادن فنوتیپ قطبی سلول‌های اپیتلیال ویژگی مشخص سلول‌های توموری و پتانسیل مهاجمی آن‌ها جهت افزایش متاستاز است (۳۸). مطالعات حاکی از آن است که پمپ سدیم-پتاسیم در تنظیم فنوتیپ قطبی سلول‌های اپیتلیال نقش مهمی بر عهده دارد (۵۰).

تحقیقات صورت گرفته نشان داده که پمپ سدیم-پتاسیم دارای نقشی اساسی در سلول‌های توموری و در تکثیرهای وخیم سلولی است (۵۱). هم‌چنین در مطالعاتی که طی ده سال گذشته صورت گرفته، پیشنهاد شده که پمپ سدیم-پتاسیم در رشد سلول و بیان ژن‌های مختلف دخالت داشته و می‌تواند هدف ضد توموری باشد. هم‌چنین طی تحقیق Davies و همکاران (۱۹۹۱)، مشخص شده که فعالیت پمپ سدیم-پتاسیم در ماه‌های قبل از رشد تومور در مخاط پیش سرطانی، تغییر پیدا می‌کند (۱۳). گزارش‌هایی از افزایش بیان زیر واحد α این پمپ در سرطان کلیه (۱۴) و مثانه (۱۵) داده شده است. گزارشات نشان داده که بیان نابجا و فعالیت بیش از حد این آنزیم در تومور پستان می‌تواند نقش اصلی را در توسعه و پیشرفت این بیماری بدخیم ایفا کند. هم‌چنین شواهد قوی نشان داده‌اند که پمپ سدیم-پتاسیم نقش مهمی را در اتصالات محکم (tight-junctions) و چسبندگی سلول‌ها (cell adhesion) ایفا می‌کند (۱۸). در تحقیقی، Chen و

سپاسگزاری

از آقایان مهندس کاوسیان، مهندس سید مصطفی حسینی و خانم حیاتی و خانم بی بی ساره نبوی و نیز کلیه پرسنل زحمت کش انستیتو پاستور شمال کشور که ما را در انجام این پروژه یاری کردند، کمال تشکر را داریم.

تمایل به متاستازی شدن آن هاست. نهایتاً این که مکان یابی و میزان حضور آنزیم و در واقع پمپ سدیم-پتاسیم به روش فلئوئورسنت به عنوان یک بیومارکر می تواند در مطالعات بالینی و تحقیقاتی مورد استفاده قرار گیرد.

References

1. Maxmen A. The hard facts. *Nature* 2012; 485(7400): S50-S51.
2. Chen JQ, Contreras RG, Wang R, Fernandez SV, Shoshani L, Russo IH, et al. Sodium/potassium ATPase (Na⁺, K⁺-ATPase) and ouabain/related cardiac glycosides: a new paradigm for development of anti-breast cancer drugs? *Breast cancer Res Treat* 2006; 96(1): 1-15.
3. Idriss ME, Modawe GA, Shrif NE. M. Assessment of Serum Zinc and Iron among Sudanese Women with Breast Cancer in Khartoum State. *International Annals of Advanced Scientific Research* 2015; 2(2): 41-45.
4. American Cancer Society. *Cancer Facts & Figures*. Atlanta: American Cancer Society; 2015.
5. Sakamoto K, Schmidt JW, Wagner KU. Mouse Models of Breast Cancer. *Methods Mol Biol* 2015; 1267: 47-71.
6. Fantozzi A, Christofori G. Mouse models of breast cancer metastasis. *Breast Cancer Res* 2006; 8(4): 212.
7. Hennighausen L. Mouse models for breast cancer. *Breast Cancer Res* 2000; 2(1): 2-7.
8. De Souza Garcia CM, de Araújo MR, Lopes MTP, Ferreira MAND, Cassali GD. Morphological and Immunophenotypical Characterization of Murine Mammary Carcinoma 4t1. *Brazilian Journal of Veterinary Pathology* 2014; 7(3): 158-165.
9. Fraser SP, Diss JK, Chioni AM, Mycielska ME, Pan H, Yamaci RF, et al. Voltage-gated sodium channel expression and potentiation of human breast cancer metastasis. *Clin Cancer Res* 2005; 11(15): 5381-5389.
10. Winnicka K, Bielawski K, Bielawska A, Milytk W. Dual effects of ouabain, digoxin and proscillaridin A on the regulation of apoptosis in human fibroblasts. *Nat Prod Res* 2010; 24(3): 274-285.
11. Epstein FH, Cynamon M, McKay W. Endocrine control of Na-K-ATPase and seawater adaptation in *Anguilla rostrata*. *Gen Comp Endocr* 1971; 16(2): 232-238.
12. Rajasekaran SA, Hu J, Gopal J, Gallemore R, Ryazantsev S, Bok D, et al. Na⁺, K⁺-ATPase inhibition alters tight junction structure and permeability in human retinal pigment epithelial cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 2003; 284(6): C1497-C1507.
13. Davies R, Sandle G, Thompson SM. Inhibition of the Na⁺, K⁺-ATPase pump during induction of experimental colon cancer. *Cancer Biochem Biophys* 1991; 12(2): 81-94.
14. Rajasekaran SA, Ball WJ, Bander NH, Liu H, Pardee JD, Rajasekaran AK. Reduced expression of beta-subunit of Na, K-ATPase in human clear-cell renal cell carcinoma. *J Urol*. 1999; 162(2): 574-580.

15. Espineda C, Seligson DB, James Ball W, Rao J, Palotie A, Horvath S, et al. Analysis of the Na⁺, K⁺ ATPase α and β bunit expression profiles of bladder cancer using tissue microarrays. *Cancer* 2003; 97(8): 1859-1868.
16. Factor P, Senne C, Dumasius V, Ridge K, Ari Jaffe H, Uhal B, et al. Overexpression of the Na⁺, K⁺-ATPase α 1 subunit increases Na⁺, K⁺-ATPase function in A549 cells. *Am J Resp Cell Mol* 1998; 18(6): 741-749.
17. Winnicka K, Bielawski K, Bielawska A. Cardiac glycosides in cancer research and cancer therapy. *Acta Pol Pharm* 2006; 63(2): 109-115.
18. Rajasekaran SA, Palmer LG, Moon SY, Soler AP, Apodaca GL, Harper JF, et al. Na⁺, K⁺-ATPase activity is required for formation of tight junctions, desmosomes, and induction of polarity in epithelial cells. *Mol Biol Cell* 2001; 12(12): 3717-3732.
19. Suhail M. Na⁺, K⁺-ATPase: ubiquitous multifunctional transmembrane protein and its relevance to various pathophysiological conditions. *J Clin Med Res* 2010; 2(1): 1-17.
20. Hirose S, Kaneko T, Naito N, Takei Y. Molecular biology of major components of chloride cells. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 2003; 136(4): 593-620.
21. Pelis RM, McCormick SD. Effects of growth hormone and cortisol on Na⁺-K⁺-2Cl⁻ cotransporter localization and abundance in the gills of Atlantic salmon. *General and Comparative Endocrinology* 2001; 124(2): 134-143.
22. Seidelin M, Madsen SS, Byrialsen A, Kristiansen K. Effects of insulin-like growth factor-I and cortisol on Na⁺, K⁺-ATPase expression in osmoregulatory tissues of brown trout (*Salmo trutta*). *Gen Comp Endocrinol* 1999; 113(3): 331-342.
23. Blanco G, Mercer RW. Isozymes of the Na-K-ATPase: heterogeneity in structure, diversity in function. *Am J Physiol* 1998; 275(5): F633-F650.
24. Pulaski BA, Ostrand Rosenberg S. Mouse 4T1 breast tumor model. *Curr Protoc Immunol* 2001; 20-22.
25. Kim LS, Price JE. Clinically relevant metastatic breast cancer models to study chemosensitivity. *Methods Mol Med* 2005; 111: 285-295
26. Aslakson CJ, Miller FR. Selective events in the metastatic process defined by analysis of the sequential dissemination of subpopulations of a mouse mammary tumor. *Cancer Res* 1992; 52(6): 1399-1405.
27. Gao ZG, Tian L, Hu J, Park IS, Bae YH. Prevention of metastasis in a 4T1 murine breast cancer model by doxorubicin carried by folate conjugated pH sensitive polymeric micelles. *J Control Release* 2011; 152(1): 84-89.
28. Wu NZ, Klitzman B, Rosner G, Needham D, Dewhirst MW. Measurement of material extravasation in microvascular networks using fluorescence video-microscopy. *Microvasc Res* 1993; 46(2): 231-253.
29. Khodabandeh S, Golzari A. Immunolocalization of Na⁺,K⁺-ATPase in the branchial cavity of *Palaemon elegans* (Decapoda: Crustacea) and effects of mercury on Na⁺,K⁺-ATPase Immunoreactivity. *Integrative and Comparative Biology* 2006; 45B: 1153-1161.
30. Ghanizadeh Kazerouni E, Khodabandeh S. Effects of ultraviolet radiation on skin structure and ultrastructure in Caspian Sea Salmon, *Salmo trutta caspius*, during alevin stage, *Toxicological & Environmental Chemistry*.2010; 92(5): 903-914.

31. Khodabandeh S, Charmantier G, Charmantier-Daures M. Ultrastructural studies and Na⁺, K⁺-ATPase immunolocalization in the antennal urinary glands of the lobster *Homarus gammarus* (Crustacea, Decapoda). *J Histochem Cytochem* 2005; 53(10): 1203-1214.
32. Taghizadeh Rahmat Abadi Z, Khodabandeh S, Abtahi B, Charmantier G, Charmantier-Daures M. Ultrastructure and osmoregulatory function of the kidney in larvae of the Persian sturgeon *Acipenser persicus*. *J Fish Biol* 2011; 78 (5): 1359-1374.
33. Cieluch U, Anger K, Aujoulat F, Buchholz F, Gharmanier-Daures M, Gharmanier G. Ontogeny of osmoregulatory structures and functions in the green crab *Carcinus maenas* (Crustacea: Decapoda). *J Exp Biol* 2004; 207(2): 325-336.
34. Rajabi H, Khodabandeh S. Osmoregulation ability in different sizes of Caspian trout (*Salmo trutta caspius*) parrs, with the same age, following direct transfer from fresh water to the Caspian sea water. *Journal of Agricultural Science and Technology* 2013; 15(2): 279-292.
35. Kometiani P, Liu L, Askari A. Digitalis-induced signaling by Na⁺, K⁺-ATPase in human breast cancer cells. *Mol Pharmacol* 2005; 67(3): 929-936.
36. Chen L, Huang TG, Meseck M, Mandeli J, Fallon J, Woo SL. Rejection of metastatic 4T1 breast cancer by attenuation of Treg cells in combination with immune stimulation. *Molecular Therapy* 2007; 15(12): 2194-2202.
37. Shahbazfar AA, Zare P, Ranjbaran M, Tayefi-Nasrabadi H, Fakhri O, Farshi Y, et al. A survey on anticancer effects of artemisinin, iron, miconazole, and butyric acid on 5637 (bladder cancer) and 4T1 (Breast cancer) cell lines. *J Cancer Res Ther* 2014; 10(4): 1057-1062
38. Haas M, Wang H, Tian J, Xie Z. Src-mediated inter-receptor cross-talk between the Na⁺/K⁺-ATPase and the epidermal growth factor receptor relays the signal from ouabain to mitogen-activated protein kinases. *J Biol Chem* 2002; 277(21): 18694-18702.
39. Redelman D, Hunter KW. The mouse mammary carcinoma 4T1: characterization of the cellular landscape of primary tumours and metastatic tumour foci. *Int J Exp Pathol* 2007; 88(5): 351-360.
40. Li L, Lu Y. Optimizing a 3D culture system to study the interaction between epithelial breast cancer and its surrounding fibroblasts. *J Cancer* 2011; 2: 458-466.
41. Zhang Z, Burnley P, Coder B, Su DM. Insights on FoxN1 biological significance and usages of the “nude” mouse in studies of T-lymphopoiesis. *Int J Biol Sci* 2012; 8(8): 1156-1167.
42. Gravekamp C, Leal B, Denny A, Bahar R, Lampkin S, Castro F, et al. In vivo responses to vaccination with Mage-b, GM-CSF and thioglycollate in a highly metastatic mouse breast tumor model, 4T1. *Cancer Immunol Immunother* 2008; 57(7): 1067-1077.
43. Lelekakis M, Moseley JM, Martin TJ, Hards D, Williams E, Ho P, et al. A novel orthotopic model of breast cancer metastasis to bone. *Clin Exp Metastasis* 1999; 17(2): 163-170.
44. Tao K, Fang M, Alroy J, Sahagian GG. Imagable 4T1 model for the study of late stage breast cancer. *BMC Cancer* 2008; 8(1): 228.
45. Smith MC, Luker KE, Garbow JR, Prior JL, Jackson E, Piwnica-Worms D, et al. CXCR4 regulates growth of both primary and

- metastatic breast cancer. *Cancer Res* 2004; 64(23): 8604-8612.
46. Adisheshaiah PP, Patel NL, Ileva LV, Kalen JD, Haines DC, McNeil SE. Longitudinal Imaging of Cancer Cell Metastases in Two Preclinical Models: A Correlation of Noninvasive Imaging to Histopathology. *International Journal of Molecular Imaging* 2014; 2014: 1-14.
47. Ottewell PD, Mönkkönen H, Jones M, Lefley DV, Coleman RE, Holen I. Antitumor effects of doxorubicin followed by zoledronic acid in a mouse model of breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 2008; 100(16): 1167-1178.
48. Hiraga T, Myoui A, Choi ME, Yoshikawa H, Yoneda T. Stimulation of cyclooxygenase-2 expression by bone-derived transforming growth factor- β enhances bone metastases in breast cancer. *Cancer Res* 2006; 66(4): 2067-2073.
49. DuPre' SA, Hunter KW. Murine mammary carcinoma 4T1 induces a leukemoid reaction with splenomegaly: association with tumor-derived growth factors. *Exp Mol Pathol* 2007; 82(1): 12-24.
50. Rajasekaran SA, Rajasekaran AK. Na^+ , K^+ -ATPase and epithelial tight junctions. *Front Biosci* 2009; 14: 2130-2148.
51. Xie Z, Cai T. Na^+ - K^+ -ATPase-mediated signal transduction: from protein interaction to cellular function. *Mol Interv* 2003; 3(3): 157-168.
52. Magpusao AN, Omolloh G, Johnson J, Gascón J, Peczuh MW, Fenteany G. Cardiac Glycoside Activities Link Na^+/K^+ ATPase Ion-Transport to Breast Cancer Cell Migration via Correlative SAR. *ACS Chem Biol* 2014; 10(2): 561-569.
53. Kawazoe N, Watabe M, Masuda Y, Nakajo S, Nakaya K. Tiam1 is involved in the regulation of bufalin-induced apoptosis in human leukemia cells. *Oncogene* 1999; 18(15): 2413-2421.
54. McConkey DJ, Lin Y, Nutt LK, Ozel HZ, Newman RA. Cardiac glycosides stimulate Ca^{2+} increases and apoptosis in androgen-independent, metastatic human prostate adenocarcinoma cells. *Cancer Res* 2000; 60(14): 3807-3812.
55. Stenkvist B, Bengtsson E, Dahlqvist B, Eriksson O, Jarkrans T, Nordin B. Cardiac glycosides and breast cancer, revisited. *N Engl J Med* 1982; 306(8): 484.
56. Stenkvist B. Is digitalis a therapy for breast carcinoma? *Oncol Rep* 1999; 6(3): 493-499.
57. MacPhee DJ, Jones DH, Barr KJ, Betts DH, Watson AJ, Kidder GM. Differential involvement of Na^+ , K^+ -ATPase isozymes in preimplantation development of the mouse. *Dev Biol* 2000; 222(2): 486-498.
58. Blanco G, Mercer RW. Isozymes of the Na^+ - K^+ -ATPase: heterogeneity in structure, diversity in function. *Am J Physiol* 1998; 275(5): F633-F650.