کومش- جلد ١٤، شماره ٣ (پیاپی ٤٧)، بهار ١٣٩٢

اثر آنتی‌ژن کارسینوامبریونیک محلول بر تمایز سلولی میوژنیک و انتروسیتیک

عباس پاکدل [1*](Ph.D)، فخرالدین نقیب‌الحیسنی [2](Ph.D)

١- *دانشگاه علوم پزشکی سمنان، دانشکده پزشکی، گروه بیوشیمی*

٢- *دانشگاه علوم پزشکی شیراز، دانشکده پزشکی، گروه بیوشیمی*

چکیده

سابقه و هدف: آنتی‌ژن کارسینوامبریونیک (Carcinoembryonic antigen, CFA) یک گلیکوپروتئین با لنگر Glycophosphatidyl inositol است که بیان آن در بسیاری از سرطان‌ها از جمله سرطان کولورکتال افزایش می‌یابد. مهار تمایز سلول می‌تواند باعث ایجاد سرطان شود. مطالعات پیشین نشان می‌دهد که ترانسفکشن و افزایش بیان CEA در کلونوسیت‌ها و میوبلاست‌ها باعث مهار تمایز سلولی می‌شود. در این مطالعه، اثر آنتی‌ژن محلول CEA بر تمایز سلولی بررسی گردید.

مواد و روش‌ها: کشت‌های تک لایه سلول‌های L6، Caco-2، و C2C12 در محیط Dulbecco's Modification of Eagle's Medium (DMEM) حاوی Fetal Bovine Serum (FBS) ١٠٪ رشد داده شدند. به منظور القاء تمایز، محیط رده‌های سلولی C2C12 و L6 به DMEM حاوی ٢٪ سرم اسب تغییر یافت. غلظت CEA در محیط کشت با روش الایزا اندازه‌گیری شد. رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین و ائوزین، اندازه‌گیری فعالیت کراتین کیناز (CK) و RT-PCR ژن میوژنین برای آزمایشات تمایز C2C12 استفاده شد.

یافته‌ها: نتایج نشان داد که CEA خالص تجاری و محیط جمع‌آوری شده از سلول‌های LS-180 (حاوی مقادیر بالای CEA) بر تمایز سلول Caco-2 اثرات مهاری دارند، اما این اثر در گروه‌های کنترل نیز دیده شد. ما مشاهده کردیم که غلظت بالای CEA (٥ µg/ml) و BSA (کنترل) اثرات یک‌سانی بر تمایز سلول‌های L6 دارند. تمایز سلول‌های C2C12 در سطح مورفولوژیکی و بیان ژن میوژنین در پاسخ به اضافه کردن محیط کشت LS-180 مهار شد. فعالیت CK درگروه دریافت‌کننده محیط LS-180 (P=٠/٠٠١٢) و CHO (P=٠/٠٠٠٢) به طور معنی‌داری از گروه کنترل کم‌تر بود.

نتیجه‌گیری: نتایج ما نشان می‌دهد که آنتی‌ژن محلول CEA اثرات قابل توجهی بر روی تمایز سلولی ندارد.

واژه‌های کلیدی: پادگن موجود در بافت سرطانی و بافت رویانی، نورویش‌های کولون و راست روده، میوژنین

مقدمه

سرطان بعد از سوانح و بیماری عروق کرونر قلب سومین عامل مرگ در ایران است. در ایران سرطان روده بزرگ در بین آقایان و خانم‌ها به ترتیب سومین و چهارمین سرطان شایع می‌باشد [٢،١]. آنتی‌ژن کارسینوامبریونیک (Carcinoembryonic antigen, CFA) مارکر توموری است که کاربرد وسیعی در مدیریت بیماران سرطانی، به‌خصوص سرطان کولورکتال دارد [۴،٣]. این پروتئین که به‌وسیله یک لنگر Glycophosphatidyl inositol به سطح سلول متصل می‌گردد [۵] به عنوان یک مولکول چسبندگی بین سلولی عمل

* نویسنده مسئول، تلفن: ٠٢٣١-٣٣٥۴١٧١ نمابر: ٠٢٣١-٣٣٥۴١۶١ Email: ap_biochem@yahoo.com

تاریخ دریافت: ١٣٩١/۴/٢۵ تاریخ پذیرش: ١٣٩١/١١/٢۴

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-08-04]

می‌کند [۶]. مطالعات نشان می‌دهد که CEA خاصیت تهاجمی سلول‌ها و متاستاز به کبد را افزایش می‌دهد [۷]. در یک مدل تجربی سرطان کولورکتال مشخص شد که تزریق سیستمیک آنتی‌ژن محلول CEA همراه با سلول‌های سرطان کولورکتال با قدرت متاستاز پائین به موش‌های nude باعث افزایش متاستاز این سلول‌ها به کبد می‌شود [۸]. مطالعات بر روی مدل‌های سلولی اثبات کرد که احتمالاً اتصال CEA به گیرنده‌اش بر روی ماکروفاژهای کبدی باعث تولید سیتوکاین‌هایی می‌شود که شرایط لازم برای وقوع متاستاز را فراهم می‌آورد [۹]. هاریس پیشنهاد کرده است، تنها فرایندی که در شرایط فیزیولوژیکی می‌تواند از تکثیر سلول‌ها جلوگیری کند تمایز است. و تمام سلول‌ها اگر در شرایط مناسبی باشند می‌توانند تکثیر گردند. بنابراین پیشنهاد شده است که سرطان به عنوان یک بیماری نقص تمایز سلولی در نظر گرفته شود. نتایج برخی از پژوهش‌ها نشان می‌دهد که، در اثر بعضی از سیگنال‌های خارج سلولی، رشد سیتوپلاسمی به صفر کاهش یافته و این امرموجب مهار تمایز سلول می‌شود، از طرفی توانایی‌های دوران جنینی دوباره کسب شده و باعث آغاز سرطان می‌گردد [۱۰].

مطالعات پیشین نشان می‌دهد که افزایش بیان CEA در سلول می‌تواند تمایز انواع مختلف سلول‌ها از جمله تمایز میوژنیک، نوروژنیک و تمایز کولونوسیت‌ها را مهار کند [۱۲،۱۱]. فرض ما این بود که سطوح بالای CEA محلول نیز می‌تواند از تمایز سلولی جلوگیری کند.

مواد و روش‌ها

الف- روش کشت سلول‌ها. رده‌های سلولی C2C12، Caco-2، LS-180 و CHO از انستیتوپاستور ایران تهیه شد و سلول L6 هدیه‌ای از دانشگاه مک‌گیل بود. تمامی سلول‌ها در شرایط استاندارد دمای ۳۷ ºC، CO2 ۵٪ و رطوبت ۹۵٪ در محیط کشت DMEM حاوی ۱۰٪ FBS و پنی‌سیلین (۱۰۰ U/ml) استرپتومایسین (۱۰۰ µg/ml) کشت داده شدند.

ب- روش القاء تمایزسلولی. برای انجام آزمایشات مربوط به تمایز از ۳ نوع مختلف مدل سلولی استفاده شد که در بررسی تمایز کاربرد دارند. رده‌های سلولی C2C12 و L6 که به ترتیب مربوط به میوبلاست‌های موش و موش صحرایی می‌باشند و هم‌چنین رده سلولی Caco-2 که مربوط به کولونوسیت‌های روده انسان است. به‌علاوه، از یک رده سلولی مربوط به کارسینومای کولون انسان به نام LS-180 که تولیدکننده مقدار بالای CEA است، برای تهیه آنتی‌ژن محلول CEAاستفاده گردید. هم‌چنین محیط کشت سلول CHO (Chinese hamster ovary) در برخی آزمایشات به عنوان محیط کنترل فاقد آنتی‌ژن CEA مورد استفاده قرار گرفت. برای القاء تمایز در سلول‌های L6 و C2C12 بعد از کشت ۷۰×۱۰^{۳} سلول در پلیت‌های Cm ۶ و رسیدن سلول‌ها به ۹۰٪ کانفلوئنسی (Confluency) محیط کشت آن‌ها به DMEM حاوی ۲٪ سرم اسب (محیط تمایز، differentiation media، DM) تغییر یافت. کانفلوئنسی اصطلاحی است که معمولاً در کشت سلول برای بیان تعداد سلول‌ها در پلیت و یا فلاسک به‌کار می‌رود. برای کشت و القاء تمایز در سلول‌های Caco-2 از پلیت‌های ۴ خانه‌ای استفاده شد. محیط کشت سلول‌ها هر ۴۸ ساعت تعویض گردید. بعد از رسیدن سلول‌های Caco-2 به مرحله کانفلوئنسی کامل، محیط کشت سلول‌ها هر روز تعویض شد. در مرحله کانفلوئنسی کامل این سلول‌ها به طور خود به خودی شروع به تمایز می‌کنند [۱۷].

ج- روش‌های بررسی اثر آنتی‌ژن CEA بر تمایز. دو منبع از آنتی‌ژن محلول CEA برای آزمایشات درمان رده‌های سلولی Caco-2، L6 و C2C12 استفاده شد که عبارت بودند از: ۱- CEA آزاد شده به داخل محیط کشت به‌وسیله رده سلولی LS-180. به منظور تهیه این نوع از آنتی‌ژن، در مرحله قبل از کانفلوئنسی کامل (Sub-confluency) محیط کشت سلول‌های LS-180 برداشته شد و پس از این‌که سلول‌ها ۳ بار با PBS شستشو شدند، با محیط کشت فاقد سرم برای مدت زمان ۴ ساعت انکوبه شدند. محیط کشت پس از این مدت برداشته شد و مقدار پروتئین تام و CEA در آن به ترتیب با

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-08-04]

روش‌های برادفورد [۱۳] و الایزا (با استفاده از کیت شرکت Canageساخت کشور سوئد) اندازه‌گیری شد. حداکثر غلظت CEAدر محیط کشت جمع‌آوری شده در کشت‌های مختلف ۲۰-۳۵ng/ml بود. در روش برادفورد از پروتئین BSA (Bovine Serum Albumin)به عنوان استاندارد استفاده شد. محیط سلول‌های CHO نیز با همین شرایط جمع‌آوری شد و مقدار پروتئین تام در آن اندازه‌گیری شد و از آن به عنوان کنترل استفاده گردید.

۲- آنتی‌ژن CEA تجاری: از این شکل آنتی‌ژن برای بررسی اثر CEA بر روی سلول‌های L6 (حداکثر غلظت مورد استفاده ۵ µg/ml) و Caco-2 (حداکثر غلظت مورد استفاده ۱/۵ µg/ml) استفاده شد [۹].

روش بررسی اثر CEA بر تمایز سلول‌های C2C12. محیط جمع‌آوری شده از کشت سلول‌های LS-180 به عنوان منبع آنتی‌ژن CEA در آزمایشات این سلول‌ها استفاده شد. پس از انجام کشت سلولی و درمان سلول‌ها، اثر آنتی‌ژن در سطح مورفولوژیکی، فعالیت آنزیم کراتین کیناز و بیان ژن میوژنین بررسی گردید. این سلول‌ها در ۳ گروه کشت داده شدند. گروه اول سلول‌هایی بودند که، به آن‌ها محیط تمایز به‌علاوه مقدار مشخصی از محیط جمع‌آوری شده از کشت سلول‌های LS-180 اضافه شده بود. ۲ گروه دیگر گروه‌های کنترل بودند. گروه کنترل اول (کنترل مثبت ۱) سلول‌هایی بودند که با محیط تمایز به‌علاوه مقدار مشخصی از محیط کشت فاقد سرم جمع‌آوری شده از سلول‌های CHO درمان شده بودند. گروه کنترل دوم (کنترل مثبت۲) سلول‌هایی بودند که محیط کشت آن‌ها فقط محیط تمایز بود. در سطح مورفولوژیک، در اثر تمایز میوبلاست‌ها به میوتیوب‌ها تبدیل می‌گردند که به صورت سلول‌های چند هسته‌ای قابل رویت هستند. برای مشاهده بهتر میوتیوب‌ها در سلول‌های C2C12 در مرحله نهایی از رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین و ائوزین استفاده شد.

در اندازه‌گیری فعالیت آنزیم کراتین کیناز در سلول‌های C2C12، برای تهیه لایزیت سلولی از روشی استفاده گردید که قبلاً به‌کار رفته بود [۱۴]. به طور خلاصه، پس از انجام کشت سلولی و درمان سلول‌ها در ابتدا سلول‌های C2C12 در گروه‌های تست و کنترل با PBS سرد شسته شدند و با استفاده از PBS سرد حاوی ۰/۱٪ تریتون X-100 و ۱٪ کوکتیل مهارکننده پروتئازها به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۴ ºC لیز شده و لایزیت چندین بار از سر سوزن بسیار باریک عبور داده شد. پس از ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ در ۱۴۰۰۰ RPM و دمای ۴ºC مایع رویی جمع‌آوری گردید و فعالیت CK با روش کینتیک و با استفاده از کیت (زیست‌شیمی- ایران) اندازه‌گیری شد.

برای آنالیز مولکولی تمایز در سلول‌های C2C12 از روش RT-PCR استفاده شد. استخراج RNA با استفاده از معرف TriZol® و طبق دستورالعمل کارخانه سازنده (Roche) صورت گرفت. برای آماده‌سازی cDNA طبق دستورالعمل کیت فرمنتاز عمل شد. به طور خلاصه، در ابتدا ۲ µg از RNA الگو با ۱۲/۵ µl آب دی‌یونیزه درمان شده با دی‌اتیل پیروکربنات (DEPC) مخلوط و در ۷۰ ºC به مدت ۵ دقیقه انکوبه شد. پس از سرد شدن مخلوط بر روی یخ، مواد زیر به آن اضافه شد ۴ µl از بافر واکنش (۵ X)، ۲ µl از dNTP4 (از هر کدام ۱۰ mM) و ۰/۷۵ µl مهارکننده ریبونوکلئاز (۴۰ U/µl) در این مرحله مخلوط برای ۵ دقیقه در ۲۵ ºC انکوبه شد و ۱/۲۵ µl آنزیم ترانس کریپتاز معکوس (۲۰۰U/µl) به آن اضافه گردید و ۱۰ دقیقه در ۲۵ ºC و سپس ۶۰ دقیقه در ۴۲ ºC قرار داده شد. برای توقف واکنش مخلوط ۱۰ دقیقه در ۷۰ ºC قرار گرفت و سپس بر روی یخ سرد شد. توالی پرایمرهای مورد استفاده [۱۶،۱۵] در جدول ۱ آورده شده است. برای تهیه واکنش RT-PCR به حجم کلی ۵۰ µl مقدار ۱۰ µl از مخلوط cDNA تهیه شده با ۵ µl بافر PCR (۱۰X)، ۱/۵ µl از MgCl2 (۵۰ mM)، ۱ µl از4 نوع dNTP (از هر کدام ۱۰ mM)، ۱/۵ µl از هرکدام از پرایمرها، ۱/۵ µl آنزیم DNA Taq پلی‌مراز (۱ U/µl) و ۲۸ µl آب مخلوط گردید.

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-08-04]

در مورد ژن میوژنین برنامه واکنش‌های زنجیره‌ای در ترموسیکلر به این صورت بود: دناتوره کردن اولیه در ºC ۹۵ برای زمان ۵ دقیقه انجام گرفت سپس در ۲۵ سیکل برنامه (دناتوراسیون در ºC ۹۵ برای ۴۵ ثانیه –annealing در ºC ۶۵ برای ۴۵ ثانیه– و extension در ºC ۷۲ برای ۴۵ ثانیه) اجرا گردید که با یک مرحله extension در ºC ۷۲ برای ۱۰ دقیقه خاتمه می‌یافت. در مورد کنترل داخلی mGAPDH (mouse Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase) نیز همین برنامه اجرا گردید فقط دمای annealing ۵۷ درجه سانتی‌گراد مورد استفاده قرار گرفت. بعد از انجام PCR، ۱۰ میکرولیتر از محصولات با استفاده از الکتروفورز ژل آگارز ۱/۵٪ در ولتاژ ۱۰۰ ولت جدا گردید. برای رنگ‌آمیزی ژل از Gel-Red استفاده شد.

بررسی اثر آنتی‌ژن CEA بر تمایز در سلول‌های L6 و Caco-2 فقط در سطح مورفولوژیک انجام گرفت و پس از انجام کشت سلولی و درمان سلول‌ها، عکس‌ها به صورت فاز کنتراست تهیه شد. در مرحله قبل از کانفلوئنسی کامل سلول‌های L6 در ۳ گروه قرار گرفتند گروه اول تنها در محیط تمایز، گروه دوم در محیط تمایز حاوی آنتی‌ژن خالص تجاری CEA و گروه سوم در محیط تمایز حاوی پروتئین BSAبه مدت ۶ روز کشت داده شدند. مشاهده میوتیوب‌های چند هسته‌ای به عنوان معیار تمایز بود.

سلول‌های Caco-2 کانفلوئنت شده، در ۵ گروه تا روز ۱۰ پس از کانفلوئنسی کشت داده شدند و سپس از نظر مورفولوژیکی بررسی شدند. در این مدت گروه اول در محیط تمایز و گروه‌های دوم، سوم، چهارم و پنجم به ترتیب در محیط تمایز به علاوه آنتی ژن خالص، محیط تمایز به علاوه BSA، محیط تمایز به علاوه محیط کشت سلول LS-180 ، و محیط تمایز به علاوه محیط کشت سلول CHO نگهداری شدند. مشاهده ساختارهایی گنبدی شکل (Dome) به عنوان شاخص مورفولوژیک تمایز کلونوسیت‌ها به کار رفت. در کشت تک لایه Domeها به صورت حلقه‌های تاریکی به‌وسیله میکروسکوپ فاز کنتراست قابل ملاحظه‌اند [۱۷]. تعداد Domeها حداقل در ۳ زمینه میکروسکوپی با بزرگ‌نمایی ۱۰۰ شمارش گردید.

محاسبه‌های آماری با استفاده از نسخه ۱۵ نرم‌افزار آماری SPSS انجام شد. مقایسه بین گروه‌ها با آزمون Mann–Whitney انجام شد و مقادیر $p<۰/۰۵$ معنی‌دار در نظر گرفته شد.

جدول۱. توالی پرایمرهایRT-PCR

نام ژن	*توالی جفت پرایمرهای مورد استفاده	طول ناحیه تکثیر شده (نوکلئوتید)
میوژنین	CATCCAGTACATTGAGCGCCTA GAGCAAATGATCTCCTGGGTTG	۱۹۰
گلیسر آلدهید۳فسفات دهیدروژناز موشی mGAPDH	TGCACCACCAACTGCTTAG GGATGCAGGGATGATGTTC	۱۷۶

* توالی بالا مربوط به پرایمر Forward می باشد.

نتایج

در این مطالعه ما اثر آنتی‌ژن محلول CEA را بر تمایز ۳ نوع سلول بررسی کردیم.

الف– اثر محیط جمع‌آوری شده از کشت سلول‌های LS-180 حاوی آنتی‌ژن محلول CEA بر روی تمایز سلول‌های C2C12. در گروه کنترل مثبت ۱ (شکل ۱ قسمت E و F) که به طور هم‌زمان با سایر گروه‌ها کشت داده شده بودند، میوتیوب‌ها به خوبی تشکیل شد. هم‌چنین در گروه کنترل مثبت ۲ (شکل ۱ قسمت C و D) همانند گروه کنترل مثبت ۱ میوتیوب‌ها اگر چه با تعداد کم‌تر، مشاهده شد. با

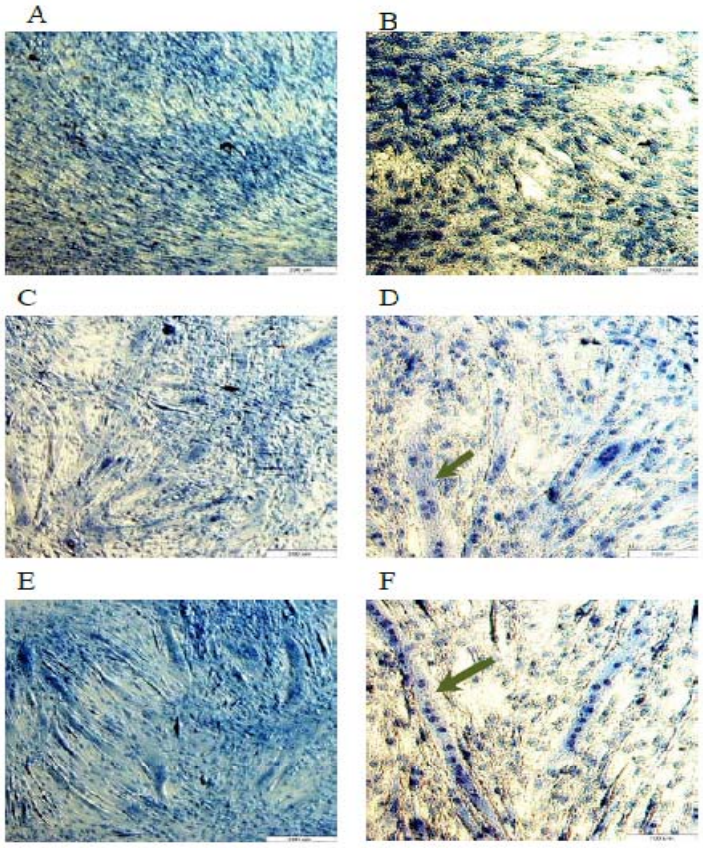
[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-08-04]

افزودن محیط جمع‌آوری شده از کشت سلول‌های LS-180 (حاوی CEA۲ng/ml) به محیط تمایز سلول‌های C2C12 در حال تمایز، تشکیل میوتیوب در آن‌ها مهار گردید (شکل ۱ قسمت A و B).

برای ارزیابی اثر CEA محلول بر روی تمایز سلول‌های C2C12 در سطح بیوشیمیائی ما از اندازه‌گیری فعالیت آنزیم کراتین کیناز (CK) در لایزیت سلول‌های در حال تمایز در شرایط مختلف استفاده کردیم. سلول‌های تمایز یافته دارای فعالیت بالاتری از این آنزیم هستند. در روز ۵ تمایز از سلول‌ها در تمام گروه‌ها لایزیت تهیه شد. همان‌طور که در شکل ۲ نشان داده شده است فعالیت آنزیم کراتین کیناز (CK) در گروه سلول‌هایی که در محیط تمایز به‌علاوه محیط LS-180 (P=۰/۰۰۱۲) و محیط تمایز به‌علاوه محیط CHO قرار داشتند (P=۰/۰۰۰۲) به طور معنی‌داری از گروه سلول‌هایی که فقط در محیط تمایز قرار داشتند کم‌تر بود.

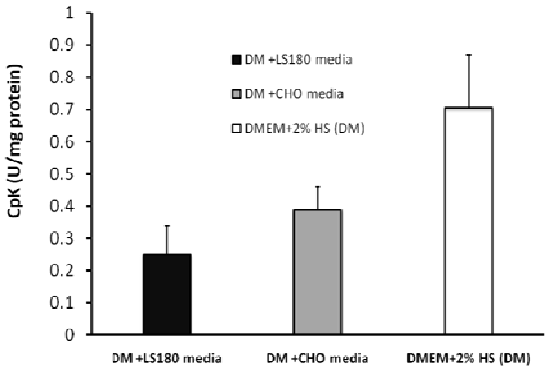
از آن‌جائی که فاکتورهای تنظیمی میوژنیک پیش‌نیازی برای تمایز میوژنیک هستند ما در شرایط آزمایش علاوه بر بررسی مورفولوژی و اندازه‌گیری فعالیت کراتین کیناز بیان میوژنین را نیز در گروه‌های مختلف با استفاده از تکنیک RT-PCR بررسی کردیم. همان‌طور که در شکل ۳ ملاحظه می‌گردد در روز ۵ تمایز سلول‌هایی که در محیط تمایز بودند بیان بالایی از mRNA میوژنین داشتند در حالی که سلول‌هایی که به‌طور هم‌زمان در محیط تمایز به‌علاوه محیط فاقد سرم CHO قرار داشتند بیان کمی از میوژنین نشان دادند اما سلول‌هایی که در محیط تمایز به‌علاوه محیط فاقد سرم LS-180 قرار داشتند بیانی از میوژنین ملاحظه نگردید.

در مجموع می‌توان گفت که اضافه کردن محیط کشت سلول LS-180 به محیط تمایز C2C12 از تمایز آن‌ها در سطح مورفولوژیکی و بیان ژن ممانعت می‌کند.

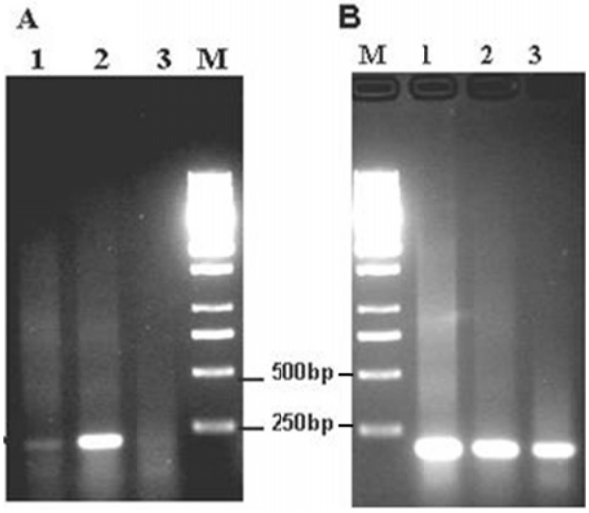


شکل۱- عکس مربوط به سلول های C2C12 درمان شده با محیط تمایز (قسمت E وF)، محیط تمایز + محیط سلول LS-180 که حاوی ng/ml ۲ از CEA (قسمت A وB) و محیط تمایز بعلاوه محیط سلول های CHO (قسمت C وD). فلش ها در قسمت های D و F میوتیوب ها را نشان می دهد. سلول ها با رنگ آمیزی هماتوکسیلین و ائوزین رنگ آمیزی شده اند و بزرگنمائی قسمت های A، C و E به صورت × ۱۰۰ و بزرگنمائی قسمت های B، D و F به صورت ×۲۰۰ است.

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-08-04]



شکل ۲. فعالیت آنزیم کراتین کیناز به ازای میلی گرم پروتئین در لایزیت سلولی در سلول های C2C12 در گروه‌های مختلف.



شکل ۳. الکتروفورز آگارز ژل محصولات RT-PCR مربوط به ژن‌های میوژنین و mGAPDH (یک کنترل داخلی). قسمت A محصول RT-PCR ژن میوژنین (bp 190) است و قسمت B محصول RT-PCR ژن mGAPDH (bp 176) است. ستون ۱ محصول RT-PCR مربوط به RNA تام استخراج شده از سلول‌های C2C12 کشت یافته در محیط تمایز+ محیط فاقد سرم سلول CHO در روز ۵ تمایزاست. ستون ۲ محصول RT-PCR مربوط به RNA تام استخراج شده از سلول‌های C2C12 کشت یافته در محیط تمایز است. ستون ۳ محصول RT-PCR مربوط به RNA تام استخراج شده در روز ۵ تمایز سلول‌های C2C12 کشت یافته در محیط تمایز + محیط فاقد سرم سلول LS-180 است که تنها حاوی 2 ng/ml آنتی ژن CEA است.M مارکر اندازهDNA است. bp (base pair یا جفت باز) است.

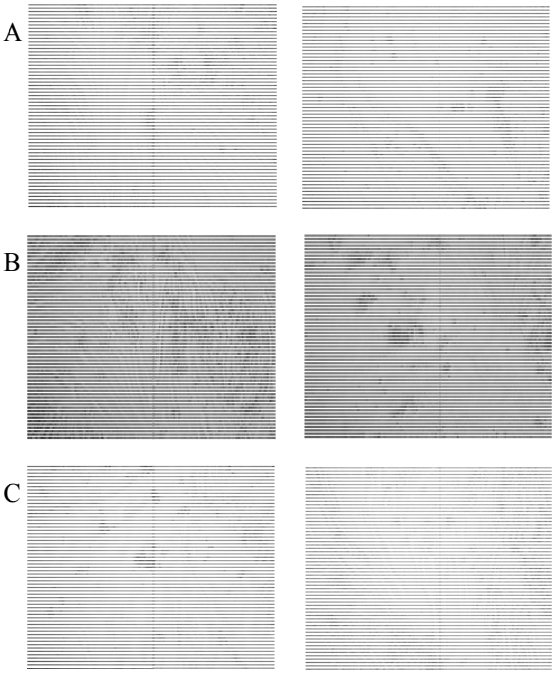
ب- اثرات آنتی‌ژن محلول CEA تجاری بر تمایز سلول‌های L6. ما برای بررسی اثرات احتمالی CEA محلول تجاری بر روی تمایز از سلول‌های L6 استفاده کردیم. همان‌طور که در مورد سلول‌های C2C12 ذکر شد میوبلاست‌ها پس از رسیدن به کانفلوئنسی در محیط حاوی ۲٪ سرم اسب، به هم جوش خورده و به سلول‌های چند هسته‌ای میوتیوب تمایز می‌یابند.

همان‌طور که در شکل ۴ قسمت A ملاحظه می‌کنید سلول‌ها پس از ۶ روز انکوبه شدن در محیط تمایز بهم جوش خوردند و میوتیوب‌ها تشکیل گردید. در سطح مورفولوژیک ما هیچ‌گونه اختلافی بین سلول‌های L6 کنترل (قسمت A) و سلول‌های کشت داده شده در محیط تمایز حاوی CEA محلول (۵µg/ml) (قسمت B) و یا BSA (قسمت C) ملاحظه نکردیم.

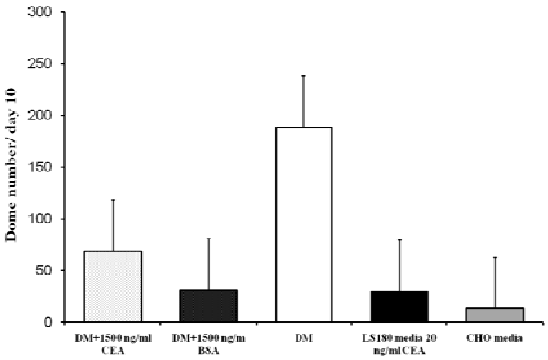
ج- اثرات آنتی‌ژن محلول CEA بر تمایز سلول‌های Caco-2. سلول‌های Caco-2 پس از رسیدن به مرحله کانفلوئنسی شروع به تمایز می‌کنند [۱۲]. یکی از مشخصه‌های مراحل نهایی تمایز آن‌ها تشکیل ساختارهایی به نام Dome است که در اثر حرکت جهت‌دار مایع و الکترولیت‌ها به وجود می‌آید [۱۲] در این ناحیه، سلول از لایه حمایت‌کننده‌اش جدا می‌گردد. ما رده سلولی Caco-2 را با ۱/۵-۰/۵ میکروگرم در میلی‌لیتر CEA خالص تجاری و هم‌چنین محیط‌های مربوط به سلول‌های LS-180 و CHO درمان کردیم. اثر آنتی‌ژن بر تمایز سلولی، در حالتی که ۲۴ ساعت پس از رزمان کشت اضافه شده بود با حالتی که در زمان کانفلوئنسی اضافه شده بود کاملاً یک‌سان بود (نتایج نشان داده نشده). ما تعداد Domeها را در روز ۱۰ پس از کانفلوئنسی در گروه‌های مختلف شمارش کردیم (شکل ۵ و ۶). نتایج ما نشان داد که هر دوی CEA و BSA خالص تعداد Dome را در مقایسه با گروه کنترل (P=۰/۰۰۶) به ترتیب ۶۶ و ۷۱٪ کاهش می‌دهند. اثر BSA بر کاهش تعداد Dome بیش از CEA بود اما این تفاوت معنی‌دار نبود (p=۰/۲). محیط کشت LS-180 (حاوی ۲۰ نانوگرم در میلی‌لیتر CEA) و هم‌چنین محیط کشت CHO (فاقد CEA) نیز به ترتیب ۷۷ و ۹۳/۷ در مقایسه با گروه کنترل در روز ۱۰ تمایز تشکیل Dome را کاهش دادند.

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-08-04]

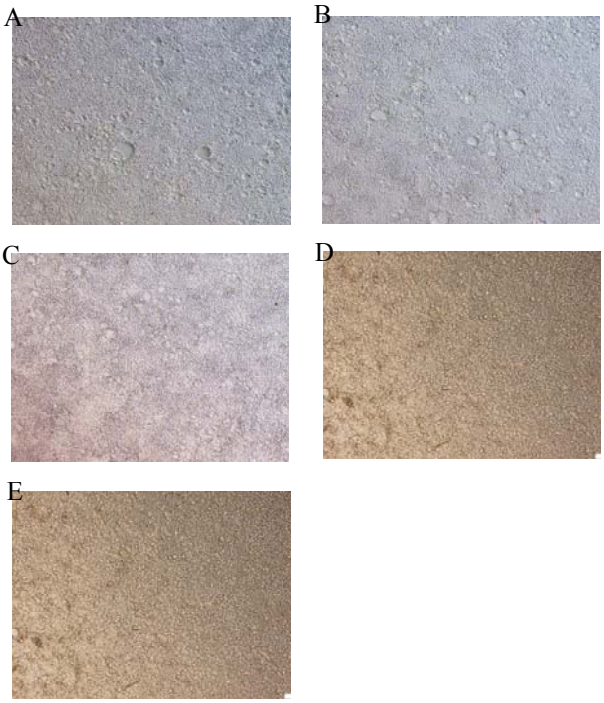
سلول‌های Caco-2 که با محیط سلول‌های LS-180 و CHO درمان شده بودند بعد از روز ۱۰ کانفلوئنسی از سطح پلیت کشت کنده شدند.



شکل ۴. عکس مربوط به سلول‌های L6 درمان شده با محیط تمایز حاوی CEA و یا BSA و سلول‌های کنترل L6 که در محیط تمایز فاقد آنتی ژن‌های CEA و BSA قرار داشتند. قسمت A : عکس مربوط به سلول‌های L6 است که پس از ۶ روز قرار گرفتن در محیط تمایز به خوبی تمایز یافته‌اند. قسمت B مربوط به سلول های L6 است که ۶ روز در محیط تمایز حاوی µg/ml5 آنتی ژن CEA کشت داده شده اند. قسمت C مربوط به سلول های L6 است که ۶ روز در محیط تمایز حاوی µg/ml 5 پروتئین BSA کشت داده شده اند. ردیف‌های اول و دوم، عکس های گرفته شده یک گروه خاص در زمینه‌های میکروسکوپی متفاوت می‌باشد. تصاویر با بزرگ‌نمایی × ۲۰۰ در زیر میکروسکوپ فاز کنتراست گرفته شده است.



شکل ۵. اثر آنتی ژن CEA بر تمایز کلونوسیت‌های Caco-2. تعداد Dome یک میانگین از شمارش در حداقل ۳ زمینه میکروسکوبی با بزرگ‌نمایی ۱۰۰ است. DM محیط تمایز است.



شکل ۶. تصویر فاز کنتراست ازسلول‌های Caco-2 در روز ۱۰ پس از کانفلوئنسی و تشکیل Dome. قسمت A: سلول‌های Caco-2 در محیط DM. قسمت B : سلول‌های Caco-2 در محیط DM بعلاوه ۱/۵ میکروگرم در میلی لیتر CEA تجاری. قسمت C: سلول های Caco-2 در محیط DM بعلاوه ۱/۵ میکروگرم در میلی لیترBSA. قسمت D: سلول‌های Caco-2 در محیط DMEM بعلاوه ۱۰ ٪ FBS و محیط LS-180 حاوی ۲۰ نانوگرم در میلی لیتر CEA. E: سلول‌های Caco-2 در محیط DMEM بعلاوه ۱۰ ٪ FBS و محیط CHO فاقد CEA. بزرگ‌نمایی × ۱۰۰ است.

بحث و نتیجه‌گیری

ارزیابی اثر آنتی‌ژن CEA بر روی تمایز ۳ رده سلولی نشان داد که اگر چه در سلول‌های C2C12 در اثر افزودن مقادیر کمی از محیط کشت سلول‌های LS-180 به محیط تمایز، در سطح مورفولوژی و بیان میوژنین تمایز مهار گردید (شکل ۱ و۳) اما وقتی در سطح بیوشیمیایی و فعالیت CK آزمایش انجام شد هیچ اثر مهاری مشاهده نشد (شکل ۲). هم‌چنین با انتخاب سلول‌های L6 که قادرند تمایز کاملی داشته باشند و بررسی اثرآنتی‌ژن خالص هیچ اثر مهاری ملاحظه نگردید (شکل ۴). ما اثر آنتی‌ژن خالص تجاری و هم‌چنین آنتی‌ژن موجود در محیط کشت سلول LS-180 را بر تمایز سلول‌های Caco-2 در سطح مورفولوژی بررسی کردیم.

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-08-04]

در این سلول هر دو منبع آنتی‌ژن دارای اثر مهاری بر روی تمایز بودند اما این اثر مهاری در گروه‌های کنترل نیز دیده شد (شکل ۵ و ۶).

یکی از محدودیت‌هایی که در انجام آزمایشات با آن مواجه بودیم نوع سلول بود. در مراحل ابتدایی ما فقط سلول‌های C2C12 و Caco-2 را در اختیار داشتیم و به‌دلیل این‌که سلول C2C12 در شرایط تمایز به طور کامل تمایز نمی‌یابد [۱۹] سلول L6 که به طور کامل تمایز می‌یابد از خارج از کشور تهیه شد. Eidelman و همکارانش قبلاً نشان دادند که بیان بالای CEA در سلول‌هایی که به خوبی تمایز می‌یابند مثل میوبلاست‌های موش صحرایی، از تمایز آن‌ها جلوگیری می‌کند [۱۱]. محدودیت دیگر نوع آنتی‌ژن مورد استفاده بود. در نوع تجاری، مشخص نبود که آنتی‌ژن با چه روشی تهیه شده است و از نظر ساختمانی چه مشخصاتی دارد. در حالت عادی آنتی‌ژن CEA از طریق یک لنگر GPI به غشاء سلول متصل می‌گردد. شواهدی در دست است که نشان می‌دهد احتمالاً یک آنزیم به‌نام GPI-PLD باعث آزادسازی آنتی‌ژن از غشاء می‌گردد [۲۰]. به‌دلیل مشکلات مالی و محدودیت زمانی امکان تخلیص آنتی‌ژن از محیط کشت سلول‌ها نیز وجود نداشت. اما با همین آزمایشات ساده و کم‌هزینه توانستیم تا حدود زیادی به فرضیه خود پاسخ دهیم.

مکانیزم دقیق شروع تمایز کلونوسیت‌ها و میوبلاست‌ها هنوز به خوبی روشن نشده است اما برای تمایز، سلول‌ها باید از سیکل سلولی خارج گردند. در تمایز یک سری فاکتورهای محیطی مثل فاکتورهای محلول، تعاملات سلول- سلول و سلول- ماتریکس خارج سلولی دخالت دارند [۲۱]. مطالعات پیشین نشان داده است که بیان بالای CEA با مهار تمایز سلولی و به هم ریختن اسکلت سلولی باعث تومورزایی می‌شود [۲۳،۲۲،۱۱]. Levy و همکارانش اثبات کردند که انتقال پیام از طریق اینتگرین‌ها در روند تمایز سلول‌های Caco-2 نقش دارند [۲۴]. Ordonez و همکارانش نشان دادند که افزایش بیان CEA در سلول‌های L6 و Caco-2 تعاملات بین فیبرونکتین و اینتگرین α5β1 را افزایش می‌دهد [۲۲]. Osses نشان داد که تعاملات اینتگرین- ماتریکس خارج سلولی برای تمایز نهایی ماهیچه اسکلتی فاکتور ضروری می‌باشد [۲۱]. از آن‌جایی که محیط جمع‌آوری شده از سلول LS-180 و CHO علاوه بر CEA حاوی پروتئین‌های دیگری مثل فاکتورهای رشد، فیبرونکتین، پروتئین‌های دارای توالی RGD که به اینتگرین‌ها متصل می‌گردند و.... می‌باشد بنابراین نتایج را نمی‌توان فقط به CEA ربط داد. وقتی ما CEA تجاری را به محیط تمایز سلول‌های L6 و Caco-2 اضافه کردیم علی‌رغم این‌که غلظت CEA به کار رفته در سلول L6 بیش از ۳ برابر مقدار استفاده شده در سلول Caco-2 بود اما بر خلاف آن هیچ اثر مهاری در گروه تست و کنترل L6 مشاهده نشد (شکل ۴). مکانیسم مولکولی دقیق این تفاوت ممکن است مربوط به الگوی بیان متفاوت خانواده اینتگرین در این ۲ لاین سلولی باشد. الگوهای اختصاصی اینتگرین می‌تواند تعیین‌کننده سوبسترای ماتریکس خارج سلولی باشد که به آن متصل می‌گردد [۲۵].

با توجه به نتایج به‌دست آمده می‌توان این‌طور نتیجه‌گیری کرد که آنتی‌ژن CEA محلول اثر قابل ملاحظه‌ای بر تمایز سلولی ندارد. برای نتیجه‌گیری قطعی پیشنهاد می‌گردد از آنتی‌ژن خالص استخراج شده از محیط کشت سلول LS-180 استفاده گردد. هم‌چنین در بررسی اثر CEA بر تمایز بهتر است از سلول‌های L6ای استفاده گردد که قبلاً با ژن CEA جهش یافته‌ای به‌طور پایدار ترانسفکت شده‌اند و پروتئین CEA قادر به اتصال به غشاء سلول نبوده و به‌داخل محیط کشت آزاد می‌گردد.

تشکر و قدردانی

این تحقیق بر گرفته از پایان نامه Ph.D عباس پاکدل در رشته بیوشیمی بالینی است. بدین وسیله از زحمات گروه بیوشیمی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی شیراز تشکر می‌گردد.

منابع

[1] Edwards BK, Brown ML, Wingo PA, Howe HL, Ward E, Ries LA, et al. Annual report to the nation on the status of cancer,

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-08-04]

1975-2002, featuring population-based trends in cancer treatment. J Natl Cancer Inst 2005; 97: 1407-1427.

[2] Mousavi SM, Gouya MM, Ramazani R, Davanlou M, Hajsadeghi N, Seddighi Z. Cancer incidence and mortality in Iran. Ann Oncol 2009; 20: 556-563.

[3] Knychalski B, Lukienczuk T. The evaluation of diagnostic value of the tumor markers: CCSA-2 and CEA in colorectal cancer. Pol Przegl Chir 2012; 84: 86-92.

[4] Su BB, Shi H, Wan J. Role of serum carcinoembryonic antigen in the detection of colorectal cancer before and after surgical resection. World J Gastroenterol 2012; 18: 2121-1226.

[5] Hefta SA, Hefta LJ, Lee TD, Paxton RJ, Shively JE. Carcinoembryonic antigen is anchored to membranes by covalent attachment to a glycosylphosphatidylinositol moiety: identification of the ethanolamine linkage site. Proc Natl Acad Sci U S A 1988; 85: 4648-4652.

[6] Zhou H, Fuks A, Alcaraz G, Bolling TJ, Stanners CP. Homophilic adhesion between Ig superfamily carcinoembryonic antigen molecules involves double reciprocal bonds. J Cell Biol 1993; 122: 951-960.

[7] Thomas P, Forse RA, Bajenova O. Carcinoembryonic antigen (CEA) and its receptor hnRNP M are mediators of metastasis and the inflammatory response in the liver. Clin Exp Metastasis 2011; 28: 923-932.

[8] Hostetter RB, Augustus LB, Mankarious R, Chi KF, Fan D, Toth C, et al. Carcinoembryonic antigen as a selective enhancer of colorectal cancer metastasis. J Natl Cancer Inst 1990; 82: 380-385.

[9] Aarons CB, Bajenova O, Andrews C, Heydrick S, Bushell KN, Reed KL, et al. Carcinoembryonic antigen-stimulated THP-1 macrophages activate endothelial cells and increase cell-cell adhesion of colorectal cancer cells. Clin Exp Metastasis 2007; 24: 201-209.

[10] von Wangenheim KH, Peterson HP. The role of cell differentiation in controlling cell multiplication and cancer. J Cancer Res Clin Oncol 2008; 134: 725-741.

[11] Eidelman FJ, Fuks A, DeMarte L, Taheri M, Stanners CP. Human carcinoembryonic antigen, an intercellular adhesion molecule, blocks fusion and differentiation of rat myoblasts. J Cell Biol 1993; 123: 467-475.

[12] Ilantzis C, DeMarte L, Screaton RA, Stanners CP. Deregulated expression of the human tumor marker CEA and CEA family member CEACAM6 disrupts tissue architecture and blocks colonocyte differentiation. Neoplasia 2002; 4: 151-163.

[13] Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem 1976; 72: 248-254.

[14] Clemente CF, Corat MA, Saad ST, Franchini KG. Differentiation of C2C12 myoblasts is critically regulated by FAK signaling. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol 2005; 289: 862-870.

[15] Wedhas N, Klamut HJ, Dogra C, Srivastava AK, Mohan S, Kumar A. Inhibition of mechanosensitive cation channels inhibits myogenic differentiation by suppressing the expression of myogenic regulatory factors and caspase-3 activity. FASEB J 2005; 19: 1986-1997.

[16] Schmittgen TD, Zakrajsek BA. Effect of experimental treatment on housekeeping gene expression: validation by real-time, quantitative RT-PCR. J Biochem Biophys Methods 2000; 46: 69-81.

[17] Hauck W, Stanners CP. Control of carcinoembryonic antigen gene family expression in a differentiating colon carcinoma cell line, Caco-2. Cancer Res 1991; 51: 3526-3533.

[18] Weintraub H. The MyoD family and myogenesis: redundancy, networks, and thresholds. Cell 1993; 75: 1241-1244.

[19] Yoshida N, Yoshida S, Koishi K, Masuda K, Nabeshima Y. Cell heterogeneity upon myogenic differentiation: down-regulation of MyoD and Myf-5 generates 'reserve cells'. J Cell Sci 1998; 111: 769-779.

[20] Naghibalhossaini F, Ebadi P. Evidence for CEA release from human colon cancer cells by an endogenous GPI-PLD enzyme. Cancer Lett 2006; 234: 158-167.

[21] Osses N, Brandan E. ECM is required for skeletal muscle differentiation independently of muscle regulatory factor expression. Am J Physiol Cell Physiol 2002; 282: C383-394.

[22] Ordonez C, Zhai AB, Camacho-Leal P, Demarte L, Fan MM, Stanners CP. GPI-anchored CEA family glycoproteins CEA and CEACAM6 mediate their biological effects through enhanced integrin alpha5beta1-fibronectin interaction. J Cell Physiol 2007; 210: 757-765.

[23] Hauck W, Stanners CP. Transcriptional regulation of the carcinoembryonic antigen gene. Identification of regulatory elements and multiple nuclear factors. J Biol Chem 1995; 270: 3602-3610.

[24] Lévy P, Robin H, Kornprobst M, Capeau J, Cherqui G. Enterocytic differentiation of the human Caco-2 cell line correlates with alterations in integrin signaling. J Cell Physiol 1998; 177: 618-627.

[25] Hemler ME, Lobb RR. The leukocyte beta 1 integrin. Curr Opin Hematol 1995; 2: 61-67.

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-08-04]

Effect of soluble Carcinoembryonic antigen on myogenic and enterocytic differentiation

Abbas Pakdel (Ph.D)*[1], Fakhraddin Naghibalhossaini (Ph.D)[2]
1 – Dept. of Biochemistry, Semnan University of Medical Sciences, Semnan, Iran
2 – Dept. of Biochemistry, School of Medicine, Shiraz University of Medical Sciences, Zand Street, Shiraz, Fars, Iran

(Received: 15 Jul 2012 Accepted: 12 Feb 2013)

Introduction: Carcinoembryonic antigen (CEA), a glycophosphatidyl inositol (GPI) anchored glycoprotein, is over-expressed in various cancers, including colorectal carcinomas. Inhibition of cell differentiation can cause cancer. Previous studies show transfection and over-expression of CEA gene in myoblasts or colonocytes leads to inhibition of cell differentiation. We investigated whether soluble CEA has a role in inhibition of cell differentiation.

Materials and Methods: Monolayer cultures of L6, C2C12, Caco-2 and CHO cell lines were grown in dulbecco's modification of eagle's medium (DMEM) containing 10% fetal bovine serum (FBS). For differentiation induction C2C12 and L6 cell lines media, was changed to DMEM containing 2% horse serum. CEA concentration was measured in harvested media by ELISA assay. H&E staining, CK assay and RT-PCR for myogenin gene were used for C2C12 differentiation experiments.

Results: The results showed although commercial pure CEA and LS-180 conditioned media (contain high level of CEA) have inhibitory effects on Caco-2 differentiation, but it can also inhibit differentiation of control groups. We observed the effect of high concentration of CEA (5µg/ml) on L6 differentiation is identical with the effect of BSA as control. C2C12 differentiation was inhibited in response to LS-180 conditioned media at morphological level and myogenin expression. CK activity was significantly lower in LS-180 conditioned media (P= 0.0012) and CHO (P= 0.0002) conditioned media groups in comparison to control group.

Conclusion: Our finding shows soluble CEA antigen did not have a significant effect on cell differentiation.

Keywords: Carcinoembryonic antigen, Colorectal neoplasms, Myogenin

* Corresponding author: Fax: +98 231 3354161; Tel: +98 231 3354171
ap_biochem@yahoo.com

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-08-04]