افزایش بیان استئوپونتین در سلول‌های متاستاتیک سرطان پستان موشی

نعیمه رضاپور [۱](Ph.D Student)، محمد کمال‌آبادی فراهانی [۲*](Ph.D)، وجیهه زرین‌پور [۳](Ph.D)، امیر آتشی [۴](Ph.D)

۱- گروه مهندسی ژنتیک، دانشگاه آزاد اسلامی واحد دامغان، دامغان، ایران

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

۳- گروه مهندسی ژنتیک، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد دامغان، دامغان، ایران

۴- گروه هماتولوژی، دانشگاه علوم پزشکی شاهرود، شاهرود، ایران

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۲۳-۳۲۳۹۵۰۵۴ kamalabadi@shmu.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۱۱/۲۱ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۶/۲۲

چکیده

هدف: استئوپونتین یک فسفوپروتئین گلیکوزیله در ماتریکس خارج سلولی است که در بافت‌های مختلف بیان می‌شود و در بسیاری از فرآیندهای پاتوبیولوژیکی از جمله سرطان و متاستاز نقش دارد. افزایش بیان OPN، در مراحل پیشرفته سرطان پستان در مطالعات متعددی مورد تایید واقع شده است، ولی تا به امروز هیچ مطالعه‌ای ارتباط بین استئوپونتین و متاستاز در سرطان پستان را مورد بررسی قرار نداده است.

مواد و روش‌ها: پس از ایجاد مدل موشی سرطان سینه با استفاده از رده سلولی 4T1، سلول‌های توموری اولیه و متاستاتیک به ترتیب از توده توموری، ریه و مغز موش‌های سرطانی جدا، تکثیر و به ترتیب 4T1T، 4T1L و 4T1B نامیده شدند. بیان استئوپونتین در این سلول‌ها با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلیمراز در زمان واقعی مورد بررسی قرار گرفت.

یافته‌ها: یافته‌های ما نشان داد که در سلول‌های توموری متاستاتیک بیان استئوپونتین به طور قابل توجهی افزایش می‌یابد. بیان استئوپونتین در 4T1L و 4T1B به ترتیب ۲/۳ برابر و ۳/۲۵ برابر در مقایسه با سلول‌های توموری اولیه، افزایش داشت.

نتیجه‌گیری: برای اولین بار، این یافته‌ها اطلاعات جدیدی در مورد بیان استئوپونتین در آبشار متاستاتیک سرطان پستان ارائه کرد. تجزیه و تحلیل خواص مولکولی سلول‌های توموری متاستاتیک می‌تواند در درک بیش‌تر از جنبه‌های مولکولی و ژنتیکی مقاومت دارویی و هم‌چنین طراحی استراتژی‌های درمانی هدفمند برای مبارزه با متاستاز سرطان پستان استفاده شود.

واژه‌های کلیدی: استئوپونتین، سرطان پستان، متاستاز، موش

مقدمه

سرطان پستان شایع‌ترین بدخیمی و اصلی‌ترین عامل مرگ و میر ناشی از سرطان در زنان در سراسر جهان است. اکثریت قریب به اتفاق عوارض و مرگ و میر مرتبط با سرطان پستان را می‌توان به متاستاز نسبت داد که در ۳۰ درصد موارد رخ می‌دهد و زمینه‌ساز ۹۰ درصد از مرگ و میرهای ناشی از سرطان پستان است [۲،۱].

متاستاز فرآیند چندگانه‌ای است که در آن سلول‌های سرطانی در بدن گسترش می‌یابند و طی آن یک تومور اولیه به یک تومور ثانویه تبدیل می‌شود. عموماً به دلیل تشخیص در مراحل نهایی، سرطان‌های متاستاتیک با شکست در درمان، منجر به مرگ بسیاری از بیماران می‌شود [۳]. مراحل چندگانه متاستاز عبارت است از تهاجم سلول‌های توموری اولیه و عبور از ماتریکس خارج سلولی، ورود به رگ‌های خونی، بقا در جریان خون، توقف در محل اندام ثانویه، خروج از خون به سمت بافت پارانشیمی اندام هدف و بقا در ریز محیط بافت هدف و در نهایت تشکیل تومور متاستازی است. این رفتار تهاجمی سلول‌های سرطانی مستلزم فرآیند گذار اپیتلیال-مزانشیمی است که برای متاستاز در اکثر سرطان‌ها مورد نیاز است [۵،۴]. ریز محیط تومور نیز تأثیر زیادی در ایجاد و پیشرفت متاستاز دارد و عوامل محلول در آن مانند سایتوکاین‌ها، کموکاین‌ها، عوامل رشد، هورمون‌ها، متابولیت‌ها و اجزای ماتریکس خارج سلولی به رشد و تکثیر تومور کمک می‌کند [۷،۶]. یکی از این سایتوکین‌ها استئوپونتین است [۸].

استئوپونتین (OPN یا Osteopontin) یک فسفوپروتئین گلیکوزیله ماتریکس خارج سلولی مرتبط با استخوان است که توسط انواع مختلفی از سلول‌ها از جمله استئوبلاست‌ها، استئوکلاست‌ها، سلول‌های ایمنی، سلول‌های اندوتلیال و

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-08-05]

سلول‌های اپیتلیال تولید می‌شود [۱۰،۹]. استئوپونتین، با نام‌های سیالوپروتئین ۱ استخوانی [۱۱] و فسفوپروتئین مترشحه ۱ [۱۲]، در انسان توسط ژن «*SPP1*» کدگذاری می‌شود و با ۷ اگزون بر روی بازوی بلند کروموزوم ۴ واقع شده است [۱۴،۱۳]. این پروتئین واجد ۲۹۷ اسیدآمینه بوده و وزن مولکولی حدود ۳۴ کیلو دالتون دارد [۱۲]. در سرطان‌ها، استئوپونتین یک پروتئین محوری است که میانجی فرآیندهای مهمی برای پیشرفت سرطان مانند پاسخ ایمنی، چسبندگی و مهاجرت سلولی، و تومورزایی است. روی هم رفته، مطالعات تجربی نشان داده که استئوپونتین ممکن است در پیشرفت و متاستاز تومور نقش داشته باشد [۸]. استئوپونتین در تعامل با گیرنده‌های سطحی سلول، تداخل در مسیرهای پیام‌رسانی مرتبط با رشد و تاثیر بر عملکرد پروتئازها در فرآیند سرطان‌زایی نقش دارد. فعل و انفعالات استئوپونتین با گیرنده‌های مختلف سطح سلول می‌تواند باعث فعال شدن مسیرهای مختلف انتقال سیگنال شود. که در نتیجه این تعاملات تغییراتی در بیان یک سری از ژن‌ها ایجاد و در نهایت باعث تغییر در رفتارهای مهم سلولی از جمله مهاجرت و متاستاز می‌شود [۱۶،۱۵].

افزایش بیان ژن استئوپونتین، در مراحل پیشرفته سرطان پستان در بسیاری از مقالات معتبر گزارش شده است، ولی تا به امروز هیچ مطالعه‌ای میزان بیان استئوپونتین در چرخه متاستازی سرطان پستان را به صورت دقیق مورد ارزیابی قرار نداده است. بنابراین در مطالعه حاضر با بهره‌گیری از مدل متاستازی سرطان پستان موشی این تغییرات مورد بررسی قرار می‌گیرد.

مواد و روش‌ها

رده سلولی. رده سلولی 4T1 از بانک سلولی انستیتوپاستور ایران(C604) تهیه شد. سلول‌ها در محیط Dulbecco's Modified Eagle (DMEM) با گلوکز بالا، حاوی FBS ۱۰درصد (سرم جنین گاوی) و پنی‌سیلین-استرپتومایسین ۲درصد (Gibco) در محیط با CO2 ۵درصد در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد کشت داده شدند.

القای مدل حیوانی سینژنیک سرطان پستان. موش‌های ماده BALB/c با وزن ۲۰ تا ۲۵ گرم از موسسه رویان (ایران) تهیه شد. حیوانات در قفس‌هایی با دوره نوری ۱۲ ساعته و دسترسی آزاد به غذا و آب قرار گرفتند. کلیه آزمایشات حیوانی مطابق با قوانین مربوطه انجام شد و این مطالعه توسط کمیته اخلاق دانشگاه آزاد اسلامی واحد دامغان برای اخلاق در تحقیقات حیوانی (شماره ثبت: IR.IAU.DAMGHAN.REC.1400.023) پذیرفته شد. سلول‌های 4T1 (10^5 سلول معلق در ۱۰۰ میکرولیتر PBS) با استفاده از سرنگ انسولین با سوزن G ۳۲ به صورت زیر جلدی به موش‌ها تزریق شد. رفتار موش‌ها به صورت روزانه بررسی می‌شد.

جداسازی سلول‌های توموری اولیه و متاستاتیک. استخراج و جداسازی سلول‌های توموری اولیه و متاستاتیک بر اساس پروتوکل‌های قبلی گروه ما انجام شد [۱۷]. اختصاراً این‌که، پس از ۳۵ روز از تزریق سلول‌های توموری به موش‌ها، حیوانات با رعایت پروتوکل‌های اخلاقی قربانی شدند. در مرحله بعد توده‌های توموری اولیه و هم‌چنین مغز و ریه موش‌ها جداسازی و خون سطحی بافت‌ها با استفاده از PBSشسته شد. نمونه در شرایط استریل به اتاق کشت منتقل و پس از برش قطعات با استفاده از قیچی، تکه‌های خرد شده در یک لوله فالکون ۵۰ میلی‌لیتری قرار داده شدند. هضم آنزیمی با استفاده از کلاژناز نوع IV (۱۰میلی‌گرم / میلی‌لیتر) به مدت ۷۵ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انجام پذیرفت. تمام آنزیم‌ها از سیگما (سنت لوئیس، MO، ایالات متحده آمریکا) خریداری شدند. قطعات هضم شده بافتی با PBSشسته و از فیلترهای سلولی ۷۰ میکرونی عبور داده شد. در مرحله بعد، سلول‌های عبور یافته از فیلتر در محیطی حاوی FBS ۱۰ درصد، ۱۰۰ واحد در میلی‌لیتر پنی‌سیلین و ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر استرپتومایسین (همه از Gibco، ایالات متحده) غوطه‌ور شدند. در نهایت سلول‌ها در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در CO2 ۵ درصد کشت شدند.

تعیین کمیت OPN توسط RT-qPCR . در هر چاهک پلیت ۲۴ خانه، ۱×۱۰^۴ سلول (سلول‌های توموری اولیه و متاستاتیک استخراج شده در مرحله قبل) کشت داده شدند. ۴۸ ساعت بعد RNA کل با استفاده از QIAzol Lysis Reagent-QIAGEN از این سلول‌ها استخراج شد. اسپکتروفتومتری (NanoDrop-ThermoFisher) و الکتروفورز برای ارزیابی کیفیت، بازده و اندازه RNA استخراج شده استفاده شد. رشته cDNA با بهره‌گیری از کیت رونویسی معکوس (Perfect Real Time -Takara) سنتز شد. Real-time PCRبا استفاده از ۱ نانوگرم در میکرولیتر از cDNAانجام پذیرفت. بیان OPN با استفاده از SYBR Green Real Time PCR Master Mix(Amplicon A/S، دانمارک) مطابق دستورالعمل کیت آنالیز شد. روش تکثیر به شرح زیر بود:

۱ سیکل در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ دقیقه، به دنبال آن ۴۰ سیکل شامل (دمای ۹۵ درجه

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-08-05]

سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، ۶۰ درجه سانتی‌گراد برای ۳۰ ثانیه و ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه). سطح بیان mRNA با سطح بیان GAPDH نرمال شد. از فرمول زیر برای محاسبه تغییرات نسبی در بیان ژن استفاده شد.

Fold change = $2^{-\Delta\Delta Ct}$, where ΔΔCt = [Ct of OPN (in 4T1L or 4T1B) - Ct of GAPDH (in 4T1L or 4T1B)] - [Ct of OPN (in 4T1T) - Ct of GAPDH (in 4T1T)].

پرایمرها با استفاده از نسخه ۶ نرم‌افزار AlleleID طراحی شدند. پرایمرهای مورد استفاده به شرح زیر است:

For OPN:
Forward 5′-GGATGAATCTGACGAATCTCAC-3′,
Reverse 5′-CTTAGACTCACCGCTCTTC -3′;
For GADPH:
Forward 5′-GGTGAAGGTCG GTGTGAACG-3′,
Reverse 5′-CTCGCTCCTGGAAGATGGTG -3′.

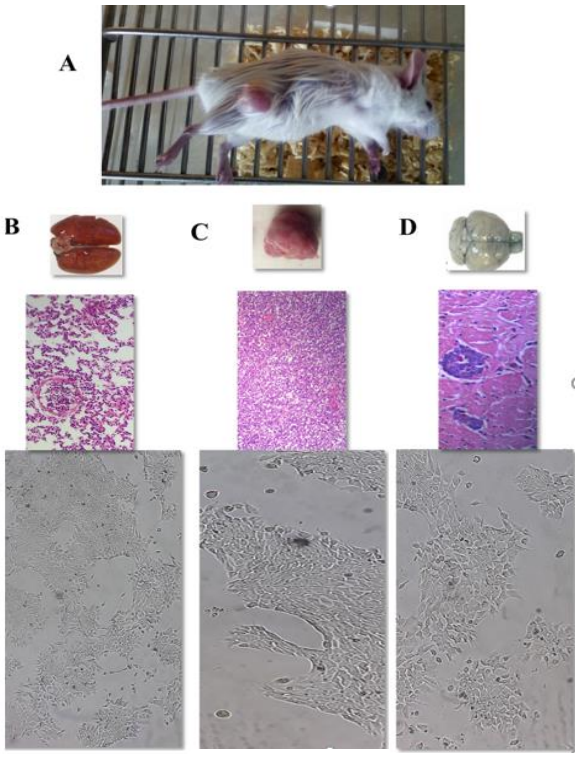
تحلیل آماری. نتایج به صورت میانگین ± انحراف معیار بیان می‌شوند. داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار آماری GraphPad Prism 6.0 (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA) با استفاده از آزمون Paired Samples t test مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. از نظر آماری $P<0/05$ معنی‌دار در نظر گرفته شد.

نتایج

استخراج سلول‌های توموری اولیه و متاستاتیک

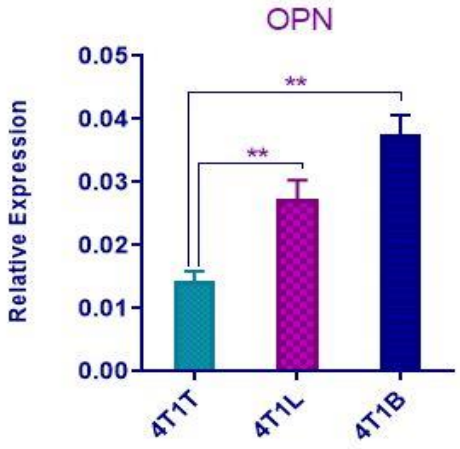
پس از ۳۵ روز از القای تومور، یک مدل حیوانی متاستاتیک سرطان سینه در موش‌های BALB/c ایجاد شد (شکل ۱ A). هنگامی که T14 به موش‌های BALB/c تزریق می‌شود، تومورهای متاستاتیکی ایجاد می‌کند که می‌توانند به ارگان‌های مختلف از جمله مغز و ریه متاستاز کنند، در حالی‌که تومور اصلی در محل تزریق رشد می‌کند. بر روی نمونه‌های توموری و ضایعات متاستاتیک، رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین–ادوزین و تایید پاتولوژیک انجام شد. در ادامه سلول‌های توموری اولیه و متاستاتیک را از توده توموری زیر جلدی، مغز و ریه موش‌ها جدا گردید (شکل ۱ B, C, D). پس از جداسازی اولیه، سلول‌های توموری متاستاتیک، کلنی‌هایی را در محیط کشت تشکیل می‌دهند. سلول‌های توموری متاستاتیک جداسازی شده از مغز با عنوان 4T1B و سلول‌های توموری متاستاتیک جداسازی شده از ریه با عنوان 4T1L شناخته می‌شوند. در حالی‌که سلول‌هایی که به همین روش، از بافت اولیه تومور به‌دست می‌آیند، به عنوان سلول‌های تومور اولیه یا 4T1T شناخته می‌شوند.

افزایش معنادار OPN در سطح mRNA . بیان OPN در سلول‌های 4T1T، 4T1L و 4T1B مورد مطالعه قرار گرفت. از اسپکتروفتومتر و ژل الکتروفورز برای تایید کیفیت و اندازه RNA استخراج‌شده، cDNA تولید شده و محصولات PCR استفاده شد. همان‌طور که در شکل ۲ نشان داده شده است، OPN در سلول‌های 4T1L ۲/۳ برابر و در 4T1B، ۳/۲ برابر



در مقایسه با سلول‌های تومور اولیه دچار افزایش بیان شده است.

شکل ۱. جداسازی سلول های توموری اولیه و متاستاتیک A. مدل حیوانی سرطان پستان متاستاتیک در موش های BALB/c پس از ۳۵ روز از تزریق اولیه سلولهای توموری ایجاد شد. B. روی ریه موش‌های سرطانی،رنگ‌آمیزی H&E بافت و استخراج سلول‌های توموری متاستاتیک انجام شد. C. روی بافت‌های توموری اولیه، رنگ‌آمیزی H&E و استخراج سلول‌های توموری اولیه انجام شد. D. روی مغز موش‌های سرطانی، جداسازی تومورهای متاستاتیک، رنگ‌آمیزی H&E بافت و استخراج سلول‌های توموری متاستاتیک انجام شد.



شکل ۲. Real-Time PCR بیانگر بیان افزایش یافته OPN در سلول های توموری متاستاتیک است. در سلول های توموری متاستاتیک، OPN به طور قابل توجهی افزایش بیان را نشان داد. همه نتایج به

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-08-05]

صورت میانگین انحراف استاندارد از حداقل سه آزمایش مستقل با استفاده از ANOVA یک طرفه بیان می‌شوند. ** $P < 0.001$.

بحث و نتیجه‌گیری

در حالی‌که پیشرفت‌های چشمگیری در روش‌های درمانی سرطان پستان صورت گرفته است، اما این دستاوردها در مورد انواع متاستاتیک سرطان پستان خیلی کارایی ندارند و میزان مرگ و میر ناشی از سرطان پستان متاستاتیک طی دهه‌های اخیر تغییر محسوسی نکرده است. متاستاز یکی از بزرگ‌ترین مشکلات درمان سرطان پستان است. مطالعات متعددی به بررسی‌های ملکولی فرآیند متاستاز در سرطان پستان می‌پردازند [۱۸-۲۰]. مدل‌سازی این مرحله از سرطان در حیوان آزمایشگاهی، امکان بررسی مسیرهای سلولی درگیر و همچنین سنجش اثربخشی داروهای جدید را امکان‌پذیر می‌نماید. بر این اساس مدل موشی متاستاتیک سرطان پستان در این پروژه ایجاد و بررسی‌های ملکولی نشان داد که در سلول‌های توموری متاستاتیک بیان استئوپونتین به طور قابل توجهی افزایش می‌یابد.

چندین مطالعه ارتباط بین استئوپونتین و سرطان را در سال‌های گذشته بررسی کرده‌اند [۱۵،۸]. بیماران مبتلا به سرطان متاستاتیک پستان معمولاً به دلیل تشخیص دیرهنگام و عود بیماری، پیش‌آگهی بدی دارند [۲۱]. بنابراین، شناسایی نشانگرهای مفید بالینی برای پیش‌آگهی سرطان متاستاتیک پستان از اهمیت بالایی برخوردار است. در سال‌های اخیر، برخی از مطالعات ارزش بالقوه بالینی OPN را به عنوان یک نشانگر زیستی برای پیش‌آگهی و یک هدف درمانی بالقوه در بیماران مبتلا به سرطان متاستاتیک پستان نشان داده‌اند [۲۳،۲۲]. در مطالعه ما نیز بیان بیش از حد OPN در سلول‌های متاستاتیک پستان مشاهده گردید که بیانگر ارتباط بین افزایش بیان OPN و متاستاز در سرطان پستان می‌باشد.

رابطه بین OPN و پیشرفت سرطان پستان اولین بار توسط Tuck و همکاران در سال ۱۹۹۷ مورد مطالعه قرار گرفت [۲۴]. در ادامه نشان داده شد که تهاجم تومور و پیش‌آگهی ضعیف، با توانایی سلول‌های سرطانی پستان در سنتز OPN ارتباط دارد [۲۵]. مطالعات بعدی نشان داد که سطح سرمی OPN در بیماران مبتلا به سرطان پستان تا ۱۰ برابر افزایش می‌یابد و غلظت‌های بالاتر آن با انواع پیشرفته‌تر تومور همراه است [۲۶-۲۸]. در سال ۲۰۱۷ Chengcheng Hao و همکارانش نشان دادند که OPN ممکن است یک نشانگر زیستی مفید برای پیگیری پیشرفت سرطان و یکی از پیش‌بینی‌کننده‌های مهم در پیش‌آگهی و میزان بقا بیماران مبتلا سرطان پستان باشد [۲۱]. در سال ۲۰۱۸ گروه Hailin Zhao بر نقش مهم OPN در فرآیندهای اصلی دخیل در پیشرفت سرطان مانند مهاجرت سلولی و تومورزایی تاکید کردند. آن‌ها مشخص کردند که بیان بیش از حد OPN از طریق فعال‌سازی واسطه‌های مختلف پروتئینی، باعث ایجاد متاستاز سلول‌های سرطانی می‌شود [۸] بعلاوه، OPN می‌تواند با تعامل با اینتگرین‌ها و CD44، مهاجرت سلول‌های توموری را القا کند [۲۹].

در سال ۲۰۱۹ Kovacheva و همکارانش به بررسی نقش OPN در متاستاز اسکلتی سرطان پستان پرداختند و نشان دادند که بیان زیاد استئوپونتین با متاستاز استخوان در سرطان پستان مرتبط است [۳۰] و با حذف ژن OPN تشکیل کلنی و توانایی مهاجرت سلول سرطانی مهار شد که با بهبودی نسبی و کاهش ضایعات استئولیتیک همراه بود [۳۱]. علاوه بر این، مطالعات بعدی نشان داد که بیان ژن استئوپونتین در سلول‌های توموری القا می‌شود و رابطه مستقیمی بین بیان استئوپونتین و کسب فنوتیپ متاستاتیک توسط این سلول‌ها وجود دارد [۳۲،۹]. مطابق با این داده‌ها، نتایج ما نیز بیانگر بیان افزایش‌یافته OPN در سلول‌های توموری متاستاتیک است. نتایجی که نشان می‌دهد OPN در پیشرفت تومور و کسب ویژگی متاستاتیک سلول‌های توموری نقش دارد.

مطالعات جدید نیز موید نقش OPN در پیشرفت و متاستاز سرطان است. Yoshinobu Kariya در سال ۲۰۲۲ بیان می‌کند که استئوپونتین از روش‌های مختلف از جمله تاثیر بر رشد و تهاجم تومور و رگ‌زایی می‌تواند در متاستاز و مقاومت دارویی دخیل باشد و با توجه به کاربردهای بالقوه استئوپونتین، از آن به عنوان یک نشانگر زیستی و یک هدف درمانی یاد می‌کند [۳۳]. تحقیق Yuying Tan در سال ۲۰۲۲ نیز نشان می‌دهد که استئوپونتین به عنوان یک پروتئین ترشحی، عملکردهای بیولوژیکی پیچیده‌ای دارد و نقش مهمی در پیشرفت تومورهای جامد، تنظیم تومورزایی، ایمنی ضد تومور و تعدیل ریزمحیط تومور ایفا می‌کند [۳۴]. واضح است که چشم‌اندازهای بالینی برای هدف‌گیری درمانی بر علیه OPN وجود دارد ولی تحقیقات بیش‌تری برای روشن کردن نقش دقیق این پروتئین در مسیرهای مختلف مولکولی که منتهی به پیشرفت سرطان و متاستاز می‌شوند لازم است. طبق نتایج ما، OPN در سلول‌های متاستاتیک و سلول‌هایی که عملکرد تهاجمی بالاتری دارند، دچار افزایش بیان می‌شود. با توجه به محدودیت‌های این مطالعه، مطالعات کامل‌تری مورد نیاز است تا ارزیابی‌های دقیق‌تری در مورد نقش OPN در متاستاز سرطان پستان روشن شود.

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-08-05]

تشکر و قدردانی

مقاله حاضر برگرفته از پایان‌نامه مقطع دکتری با کد اخلاق IR.IAU.DAMGHAN.REC.1400.023 می‌باشد. لازم می‌دانیم از معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی شاهرود تشکر و قدردانی نمائیم.

مشارکت و نقش نویسندگان

نعیمه رضاپور: طراحی مطالعه، نگارش نسخه اولیه مقاله. محمد کمال‌آبادی فراهانی: ایده و طراحی مطالعه، انجام آزمایشات کشت سلولی و مطالعه حیوانی، آنالیز و تفسیر نتایج. وجیهه زرین‌پور: نگارش نسخه اول مقاله. امیر آتشی: انجام آزمایشات ملکولی. همه نویسندگان نتایج را بررسی نموده و نسخه نهایی مقاله را تایید نمودند.

منابع

[1] Robinson NJ, Taylor DJ, Schiemann WP. Stem cells, immortality, and the evolution of metastatic properties in breast cancer: Telomere maintenance mechanisms and metastatic evolution. J Cancer Metastasis Treat 2019; 39: 5. https://doi.org/10.20517/2394-4722.2019.15

[2] Chaffer CL, Weinberg RA. A perspective on cancer cell metastasis. Science 2011; 331: 1559-1564. https://doi.org/10.1126/science.1203543

[3] Van Denderen BJ, Thompson EW. The to and fro of tumour spread. Nature 2013; 493: 487-488. https://doi.org/10.1038/493487a

[4] Williams ED, Gao D, Redfern A, Thompson EW. Controversies around epithelial-mesenchymal plasticity in cancer metastasis. Nat Rev Cancer 2019; 19: 716-732. https://doi.org/10.1038/s41568-019-0213-x

[5] Ayoub NM, Jaradat SK, Al-Shami KM, Alkhalifa AE. Targeting angiogenesis in breast cancer: current evidence and future perspectives of novel anti-angiogenic approaches. Front Pharmacol 2022; 13: 838133. https://doi.org/10.3389/fphar.2022.838133

[6] Melzer C, von der Ohe J, Hass R. Breast carcinoma: from initial tumor cell detachment to settlement at secondary sites. BioMed Res Int 2017; 2017. https://doi.org/10.1155/2017/8534371

[7] Melzer C, Yang Y, Hass R. Interaction of MSC with tumor cells. Cell Commun Signal 2016; 14: 1-12. https://doi.org/10.1186/s12964-016-0143-0

[8] Zhao H, Chen Q, Alam A, Cui J, Suen KC, Soo AP, et al. The role of osteopontin in the progression of solid organ tumour. Cell Death Diseas 2018; 9: 1-15. https://doi.org/10.1038/s41419-018-0391-6

[9] Hao C, Cui Y, Owen S, Li W, Cheng S, Jiang WG. Human osteopontin: Potential clinical applications in cancer. Int J Mol Med 2017; 39: 1327-1337. https://doi.org/10.3892/ijmm.2017.2964

[10] Denhardt DT, Noda M. Osteopontin expression and function: role in bone remodeling. J Cell Biochem 1998; 72: 92-102. https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-4644(1998)72:30/31+<92::AID-JCB13>3.0.CO;2-A

[11] Pagel CN, Wasgewatte Wijesinghe DK, Taghavi Esfandouni N, Mackie EJ. Osteopontin, inflammation and myogenesis: influencing regeneration, fibrosis and size of skeletal muscle. J Cell Commun Signal 2014; 8: 95-103. https://doi.org/10.1007/s12079-013-0217-3

[12] Senger DR, Wirth DF, Hynes RO. Transformed mammalian cells secrete specific proteins and phosphoproteins. Cell 1979; 16: 885-893. https://doi.org/10.1016/0092-8674(79)90103-X

[13] Wei R, Wong JPC, Kwok HF. Osteopontin--a promising biomarker for cancer therapy. J Cancer 2017; 8: 2173. https://doi.org/10.7150/jca.20480

[14] Fisher L, Torchia D, Fohr B, Young M, Fedarko N. Flexible structures of SIBLING proteins, bone sialoprotein, and osteopontin. Biochem Biophys Res Commun 2001; 280: 460-465. https://doi.org/10.1006/bbrc.2000.4146

[15] Rodrigues LR, Teixeira JA, Schmitt FL, Paulsson M, Lindmark-Mansson H. The role of osteopontin in tumor progression and metastasis in breast cancer. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 2007; 16: 1087-1097. https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-06-1008

[16] Denhardt DT, Noda M, O'Regan AW, Pavlin D, Berman JS. Osteopontin as a means to cope with environmental insults: regulation of inflammation, tissue remodeling, and cell survival. J Clin Invest 2001; 107: 1055-1061. https://doi.org/10.1172/JCI12980

[17] Kamalabadi-Farahani M. Down-regulation of death receptor-5 in metastatic cascade of triple-negative breast cancer. Turk J Oncol 2020; 1. https://doi.org/10.5505/tjo.2019.2179

[18] Amirsaadat S, Jafari-Gharabaghlou D, Alijani S, Mousazadeh H, Dadashpour M, Zarghami N. Metformin and Silibinin co-loaded PLGA-PEG nanoparticles for effective combination therapy against human breast cancer cells. J Drug Delivery Sci Technol 2021; 61: 102107. https://doi.org/10.1016/j.jddst.2020.102107

[19] Raeisizadeh M, Saki Malehi A, Maraghi E, Bahmanziari M, Seghatoleslami M, Hoseinzadeh M. Effect of hormone receptors and Her-2 status on metastasis status in patients with breast cancer using logistic regression model. Koomesh 2021; 23: 748-755. (Persian).

[20] Johari B, Ghorbani R, Heidari S, Rashidi S, Madanchi H. Anti-cancer effects of the combined treatment of trastuzumab and decoy oligodeoxynucleotides to target STAT3 transcription factor on SK-BR-3 breast cancer cell line. Koomesh 2023; 25: 71-82. (Persian).

[21] Zduniak K, Agrawal A, Agrawal S, Hossain MM, Ziolkowski P, Weber GF. Osteopontin splice variants are differential predictors of breast cancer treatment responses. BMC Cancer 2016; 16: 1-12. https://doi.org/10.1186/s12885-016-2484-x

[22] Shevde LA, Samant RS. Role of osteopontin in the pathophysiology of cancer. Matrix Biol 2014; 37: 131-141. https://doi.org/10.1016/j.matbio.2014.03.001

[23] Likui W, Hong W, Shuwen Z, Yuangang Y, Yan W. The potential of osteopontin as a therapeutic target for human colorectal cancer. J Gastrointest Surg 2011; 15: 652-659. https://doi.org/10.1007/s11605-011-1445-6

[24] Tuck AB, O'Malley FP, Singhal H, Tonkin KS. Osteopontin and p53 expression are associated with tumor progression in a case of synchronous, bilateral, invasive mammary carcinomas. Arch Pathol Lab Med 1997; 121: 578.

[25] Mitas M, Mikhitarian K, Walters C, Baron PL, Elliott BM, Brothers TE, et al. Quantitative real-time RT-PCR detection of breast cancer micrometastasis using a multigene marker panel. Int J Cancer 2001; 93: 162-171. https://doi.org/10.1002/ijc.1312

[26] Rudland PS, Platt-Higgins A, El-Tanani M, de Silva Rudland S, Barraclough R, Winstanley JH, et al. Prognostic significance of the metastasis-associated protein osteopontin in human breast cancer. Cancer Res 2002; 62: 3417-3427.

[27] Brown LF, Papadopoulos-Sergiou A, Berse B, Manseau EJ, Tognazzi K, Perruzzi CA, et al. Osteopontin expression and distribution in human carcinomas. Am J Pathol 1994; 145: 610.

[28] Tuck AB, Chambers AF. The role of osteopontin in breast cancer: clinical and experimental studies. J Mammary Gland Biol Neoplasia 2001; 6: 419-429. https://doi.org/10.1023/A:1014734930781

[29] Tuck AB, Elliott BE, Hota C, Tremblay E, Chambers AF. Osteopontin-induced, integrin-dependent migration of human mammary epithelial cells involves activation of the hepatocyte growth factor receptor (Met). J Cell Biochem 2000; 78: 465-475.

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-08-05]

https://doi.org/10.1002/1097-4644(20000901)78:3<465::AID-JCB11>3.0.CO;2-C
[30] Kovacheva M, Zepp M, Schraad M, Berger S, Berger MR. Conditional knockdown of osteopontin inhibits breast cancer skeletal metastasis. Int J Mol Sci 2019; 20: 4918.
https://doi.org/10.3390/ijms20194918
[31] Reufsteck C, Lifshitz-Shovali R, Zepp M, Bäuerle T, Kübler D, Golomb G, et al. Silencing of skeletal metastasis-associated genes impairs migration of breast cancer cells and reduces osteolytic bone lesions. Clin Exp Metastasis 2012; 29: 441-456.
https://doi.org/10.1007/s10585-012-9462-8
[32] Cui R, Takahashi F, Ohashi R, Gu T, Yoshioka M, Nishio K, et al. Abrogation of the interaction between osteopontin and αvβ3 integrin reduces tumor growth of human lung cancer cells in mice. Lung Cancer 2007; 57: 302-310.
https://doi.org/10.1016/j.lungcan.2007.03.019
[33] Kariya Y, Kariya Y. Osteopontin in Cancer: mechanisms and therapeutic targets. Int J Translat Med 2022; 2: 419-447.
https://doi.org/10.3390/ijtm2030033
[34] Tan Y, Zhao L, Yang YG, Liu W. The role of osteopontin in tumor progression through tumor-associated macrophages. Front Oncol 2022; 12.
https://doi.org/10.3389/fonc.2022.953283

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-08-05]

Koomesh -Volume 25, Issue 4 July and August 2023, 460- 465

Upregulation of Osteopontin in Metastatic Mouse Breast Cancer Cells

Naeemeh Rezapour (Ph.D Student)[1], Mohammad Kamalabadi-Farahani (Ph.D)[*2], Vajiheh zarrinpour (Ph.D)[3], Amir Atashi (Ph.D)[4]

1- Damghan Branch, Islamic Azad University, Damghan, Iran
2 – Dept. of Tissue Engineering, School of Medicine, Shahroud University of Medical Sciences, Shahroud, Iran
3- Dept. of Genetic Engineering, Damghan Branch, Islamic Azad University, Damghan, Iran
4- Dept. of Medical Laboratory Sciences, School of Allied Medical Sciences, Shahroud University of Medical Sciences, Shahroud, Iran

* Corresponding author. +98 23-32395054 kamalabadi@shmu.ac.ir Received: 10 Feb 2023; Accepted: 13 Sep 2023

Introduction: Osteopontin (OPN) is a glycosylated phosphoprotein found in the extracellular matrix that is expressed in a variety of body tissues and is involved in a variety of pathobiological processes such as cancer and metastasis. Several studies have reported increased OPN gene expression in advanced stages of breast cancer, but no studies have been conducted to investigate the relationship between OPN and metastasis in breast cancer.

Materials and Methods: After the development of an animal model of breast cancer using the 4T1 cell line, primary and metastatic tumor cells were isolated from the tumor mass, lung, and brain of cancerous mice, multiplied, and named 4T1T, 4T1L, and 4T1B, respectively. The expression of OPN in these cells has been analyzed using real-time polymerase chain reaction.

Results: According to our findings, metastatic tumor cells significantly increase their OPN expression. OPN expression was increased 2.3-fold and 3.25-fold in 4T1L and 4T1B cells, respectively, when compared to primary tumor cells.

Conclusion: These findings provided important insights into OPN expression in the metastatic cascade of breast cancer for the first time. In this account, the analysis of the molecular properties of metastatic tumor cells can help researchers better understand the molecular and genetic aspects of chemoresistance, as well as design targeted therapeutic strategies to combat breast cancer metastasis.

Keywords: Osteopontin, Breast Cancer, Metastasis, Mouse

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-08-05]