



Semnan University of Medical Sciences

# KOOMESH

Journal of Semnan University of Medical Sciences

**Volume 21, Issue 2 (Spring 2019), 205- 393**

**ISSN: 1608-7046**

**Full text of all articles indexed in:**

*Scopus, Index Copernicus, SID, CABI (UK), EMRO, Iranmedex, Magiran, ISC, Embase*

## بررسی نشانگرهای گذر از وضعیت اپیتلیالی به مزانشیمی در سلول‌های سرطانی پستان در پاسخ به فاکتور ۱ مشتق از سلول استرومایی

نغمه احمدیان کیا<sup>۱</sup> (Ph.D)

۱- مرکز تحقیقات پیشگیری از سرطان، دانشگاه علوم پزشکی شاهرود، شاهرود، ایران

۲- دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شاهرود، شاهرود، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۱/۲۶ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۸/۲

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

### چکیده

هدف: متاستاز عامل اصلی مرگ و میر ناشی از سرطان محسوب می‌شود اما مکانسیم‌های آن به میزان زیادی ناشناخته باقی مانده است. کموکاین (stromal cell-derived factor 1) SDF1 و فرایند گذر از حالت اپیتلیالی به مزانشیمی (Epithelial mesenchymal transition, EMT) هر دو به عنوان عوامل مهم در پیشرفت متاستاز معرفی شده‌اند، لیکن ارتباط بین این دو عامل به خوبی شناخته نشده است. به علت اهمیت شناخت عوامل درگیر در متاستاز به منظور ارائه رویکردهای جدید درمانی، در این مطالعه تاثیر SDF1 بر روی بیان فاکتورهای رونویسی درگیر در EMT در سلول‌های سرطانی پستان، مورد بررسی قرار گرفت. مواد و روش‌ها: سلول‌های MDA-MB-361 با SDF1 به غلظت ۱۰۰ ng/ml در بازه‌های زمانی ۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت تیمار شدند. سپس بیان نشانگرهای EMT به روش Real time PCR و وسترن بلات مورد مطالعه قرار گرفتند. یافته‌ها: به دنبال تیمار با SDF1 بیان ژن‌های Snail و Zeb1 افزایش یافتند ( $P < 0.05$ ). همچنین نتایج وسترن بلات افزایش بیان نشانگرهای Zeb1 و Vimentin و کاهش بیان E-cadherin و Claudin1 را در سلول‌های سرطانی پستان نشان دادند ( $P < 0.05$ ).

نتیجه‌گیری: نتایج این مطالعه نشان داد که SDF1 سبب تغییر در بعضی از فاکتورهای کنترل‌کننده EMT در سلول‌های سرطانی پستان می‌شود و این ممکن است یکی از مکانسیم‌های تاثیر SDF1 بر روند متاستاز در سلول‌های سرطانی پستان باشد.

واژه‌های کلیدی: سرطان پستان، گذر از حالت اپیتلیالی به مزانشیمی، کموکاین SDF1، متاستاز سرطان

### مقدمه

سرطان پستان شایع‌ترین نوع سرطان تشخیص داده شده است و علت اصلی مرگ و میر ناشی از سرطان در بین زنان سراسر جهان می‌باشد [۱]. در حدود ۹۵٪ مرگ‌های ناشی از سرطان به واسطه متاستاز تومور اولیه به سایر نواحی بدن اتفاق می‌افتد، لذا شناخت مکانسیم‌های درگیر در روند متاستاز می‌تواند اطلاعات ارزشمندی جهت پایه‌ریزی برنامه‌های درمانی آتی فراهم آورد. متاستاز فرایند پیچیده‌ای است که شامل مراحل جدا شدن سلول‌های سرطانی از تومور اولیه، ورود به جریان خون و گردش در آن، خروج از عروق و در نهایت تکثیر و تشکیل تومور ثانویه در ارگان هدف می‌باشد [۲].

نتایج مطالعات قبلی حاکی از آن است که کموکاین‌ها و به ویژه کموکاین تولید شده از سلول‌های استرومایی (Stromal derived factor 1=SDF1) نقش مهمی در مهاجرت سلول‌های سرطانی و روند متاستاز ایفا می‌کنند [۳]. کموکاین

SDF1 که CXCL12 نیز نامیده می‌شود، توسط سلول‌های استرومایی نظیر فیروبلاست‌ها و سلول‌های اندوتلیالی بیان می‌شود و به ویژه به گیرنده CXCR4 که از نوع گیرنده‌های باندشونده با پروتئین G هستند، اتصال می‌یابد. ثابت شده است که SDF1 و CXCR4 نقش بسیار مهمی در فعالیت‌های بیولوژیک از جمله تکامل جنینی، مهاجرت سلول‌های بنیادی، رگ‌زایی و گسترش تومور دارد [۴]. مطالعات کلینیکی نشان می‌دهد که میزان ترشح SDF1 در بسیاری از تومورها افزایش یافته و با درجه تومور، متاستاز به گره‌های لنفاوی و پیش‌آگهی تومور ارتباط مستقیم دارد [۵، ۶]. افزایش SDF1 سبب افزایش مقاومت در برابر مرگ سلولی، رشد، تهاجم، رگ‌زایی و متاستاز سلول‌های سرطانی می‌گردد [۷]. برخی داروها نظیر Mifepristone از طریق اختلال در مسیر SDF1/CXCR4 سبب مهار متاستاز می‌شوند [۸]. اخیراً تحقیقاتی جهت هدف قرار

MDA-MB-361 در پلیت‌های شش سانتی‌متری کشت شدند. زمانی که تراکم سلول‌ها به ۷۰٪ رسید، محیط کشت سلول‌ها با محیط کشت فاقد سرم و حاوی SDF1 به غلظت صد نانوگرم در میلی‌لیتر تعویض شد. این غلظت بر اساس نتایج مطالعات قبلی انتخاب شد [۱۳]. سلول‌های تیمار شده با SDF1 در بازه‌های زمانی ۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت جمع‌آوری شدند. سلول‌های تیمار نشده به عنوان سلول‌های کنترل در نظر گرفته شدند.

#### بررسی بیان ژن‌های درگیر در EMT

RNA سلول‌ها (۵-۴ میلیون سلول) از رسوب سلولی با استفاده از Qiagen's RNeasy Kit (Cat.No:74104) استخراج شد. برای بررسی کیفیت و کمیت RNA های استخراج شده، به ترتیب از الکتروفورز بر روی ژل آگارز و اسپکتروفوتومتر نانو دراپ مدل NanoDrop 1000 UV Visible Spectrophotometer استفاده شد.

برای بررسی کیفی، نمونه‌های RNA بر روی ژل آگارز بارگذاری شدند و پس از انجام الکتروفورز، از لحاظ باندهای ایجاد شده و وجود یا عدم وجود اسمیر مورد بررسی قرار گرفتند. حضور باندهای rRNA (18S و 28S) سالم و دست‌نخورده بودن نمونه RNA تام را نشان داد. ضمن این‌که شدت باند 28S دو برابر باند 18S بود.

در بررسی کمی نیز، در حدود یک میکرولیتر از RNA تام استخراج شده در چهار میکرولیتر آب مقطر استریل رقیق شده و جذب نوری آن در ۲۶۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. در تمامی نمونه‌ها نسبت طول موج ۲۶۰/۲۸۰ نزدیک به ۲ بود که نشان‌دهنده خلوص نمونه‌های RNA استخراج شده و عدم وجود پروتئین در نمونه بود.

RNA استخراج شده با آنزیم DNaseI تیمار شد. سنتز cDNA با استفاده از RevertAid First (Cat.No:K1622) Strand cDNA Synthesis Kit انجام شد. سپس cDNA سنتز شده به نسبت ۴:۱ رقیق شد و ۲ میکرولیتر نمونه cDNA با مخلوط واکنش Real time PCR شامل ۱۰ میکرولیتر 2X SYBR Green PCR Mastermix متعلق به شرکت پارس توس و ۱ میکرولیتر پرایمرهای اختصاصی (جدول ۱) مخلوط شده و حجم نهایی به ۲۰ میکرولیتر رسانده شد. تنظیم برنامه دمایی و مدت و تعداد سیکل‌ها بر اساس Tm پرایمرهای طراحی شده و منطبق بر ویژگی‌های مراحل مختلف واکنش‌های زنجیره‌ای پلیمرز تعیین گردید [۱۵، ۱۴]. ژن GusB به عنوان ژن خانه‌دار (House keeping gene) برای نرمال کردن ژن‌های هدف مورد استفاده قرار گرفت.

جهت بررسی بیان ژن‌های مورد نظر از دستگاه Roche The LightCycler® 480 Real-Time PCR System استفاده شد. سطح بیان مقایسه‌ای mRNA هر ژن هدف با استفاده از فرمول  $2^{-\Delta\Delta CT}$  تعیین شد. منحنی‌های ذوب به منظور تعیین

دادن محور SDF1/CXCR4 در درمان بدخیمی‌هایی نظیر ملانوما [۸]، تومورهای کبدی [۹] و گلیوبلاستوما [۱۰] انجام گرفته است. علاوه بر آن مطالعات اخیر نشان می‌دهند که متاستاز ارتباط نزدیکی با روند گذر از حالت اپیتلیالی به مزانشیمی (Epithelial to mesenchymal transition=EMT) دارد به گونه‌ای که برخی محققین EMT را لازمه شروع و پیشرفت متاستاز سلول‌های سرطانی می‌دانند [۱۱]. EMT یک روند فیزیولوژیک است که طی آن سلول‌های اپیتلیالی اتصالات چسبنده و قطبیت راسی-قاعده‌ای خود را از دست می‌دهند که این مسئله توانایی مهاجرت سلول‌ها را افزایش می‌دهد. کاهش بیان نشانگرهای اپیتلیالی نظیر E-cadherin و Claudin1 و هم‌چنین افزایش بیان نشانگرهای مزانشیمی نظیر N-cadherin، Slug، Snail، Twist، Vimentin و Zeb1 از جمله حوادث اصلی طی روند EMT می‌باشند [۱۲]. اگر چه روند EMT و هم‌چنین کموکان SDF1 هر دو از عوامل مهم در متاستاز محسوب می‌شوند، لیکن ارتباط بین این دو به خوبی شناخته نشده است. در این مطالعه به منظور شناخت بهتر مکانیسم‌های درگیر در روند متاستاز، تاثیر کموکان SDF1 بر روی بیان ژن‌ها و پروتئین‌های درگیر در EMT در سلول‌های سرطانی پستان بررسی شده است.

#### مواد و روش‌ها

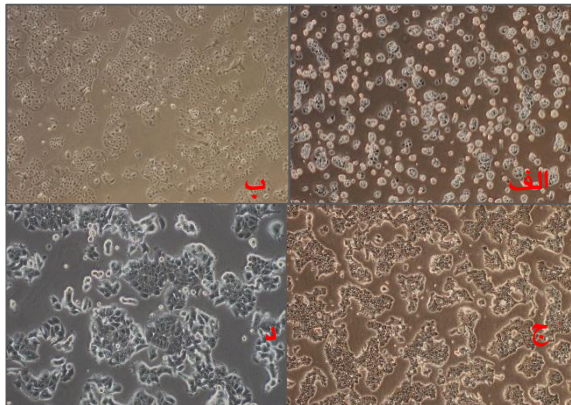
کشت سلولی: در این مطالعه رده‌های سلولی سرطانی نظیر Kuramochi، Ovsaho، MCF7 و MDA-MB-361 با ویژگی‌های اپیتلیالی مورد بررسی قرار گرفتند. این رده‌های سلولی از بانک سلولی ATCC تهیه شده و در محیط کشت Dulbecco modified Eagle's medium (DMEM) ۱۰٪ سرم گاوی (FBS) و آنتی‌بیوتیک (Streptomycin ۱۰۰ µg/ml، Penicillin ۱۰۰ IU/ml) کشت داده شدند. سپس سلول‌ها در محیط مرطوب متشکل از ۹۵٪ هوا و ۵٪ دی‌اکسیدکربن انکوبه شدند. به منظور جدا کردن سلول‌ها از ظرف کشت از تریپسین ۱٪ استفاده شد.

#### تیمار سلول‌ها با SDF1

بر اساس نتایج به دست آمده مبنی بر فسفریله شدن AKT در سلول‌های MDA-MB-361 به دنبال تیمار با SDF1، این سلول‌ها به منظور ادامه مطالعات ژنی و پروتئینی انتخاب شدند. در سایر رده‌های سلولی مورد مطالعه به دنبال تاثیر SDF1 پروتئین AKT فسفریله نشد که این مسئله نشان‌دهنده عدم تاثیر SDF1 بر رده‌های سلولی Kuramochi، Ovsaho و MCF7 بود. لذا این سلول‌ها از مطالعه خارج شدند و تنها رده سلولی MDA-MB-361 برای آزمایشات بعدی مورد استفاده قرار گرفت. جهت تیمار سلول‌ها با SDF1، سلول‌های

## نتایج

تعیین رده سلولی مناسب جهت بررسی تاثیر SDF1 اولین مرحله در این مطالعه، یافتن سلول‌های سرطانی مناسب جهت بررسی تاثیر SDF1 بر روند EMT بود. این سلول‌ها باید از نوع سلول‌های سرطانی اپیتلیالی باشند و به دنبال تیمار با SDF1 مسیر سیگنالینگ داخل سلولی آن‌ها فعال شود. به این منظور رده‌های مختلف سلول‌های سرطانی با ویژگی‌های اپیتلیالی نظیر Kuramochi، Ovsaho، MCF7 و MDA-MB-361 کشت داده شدند (شکل ۱).



شکل ۱. تصویر میکروسکوپ نوری معکوس از رده‌های سلولی مختلف مورد مطالعه. بزرگمایی 4x. (الف) Ovsaho، (ب) Kuramochi، (ج) MDA-MB-361، (د) MCF7.

سپس بیان پروتئین pAKT در آن‌ها بررسی شد. نتایج حاکی از آن بود که از بین رده‌های سلولی مورد مطالعه افزایش pAKT داخل سلولی تنها در رده سلولی MDA-MB-361 بعد از تیمار با SDF1 مشاهده شد (شکل ۲). pAKT یکی از حلقه‌های زنجیره پیام‌رسان داخل سلولی است که به دنبال تیمار با SDF1 و اتصال آن به گیرنده CXCR4 افزایش می‌یابد که این مسئله نشان‌دهنده آن است که سلول‌های MDA-MB-361 به صورت عملکردی به SDF1 در محیط پاسخ می‌دهند و سلول‌های مناسبی برای این مطالعه می‌باشند.

بررسی تاثیر SDF1 بر بیان ژن‌های درگیر در EMT سلول‌های MDA-MB-361 در بازه‌های زمانی ۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت با SDF1 تیمار شدند و سپس Real time PCR به منظور بررسی میزان بیان فاکتورهای رونویسی درگیر در روند EMT انجام شد.

تکنیک غیراختصاصی مورد بررسی قرار گرفتند. نتایج، با استفاده از نرم‌افزار اختصاصی آنالیز شدند.

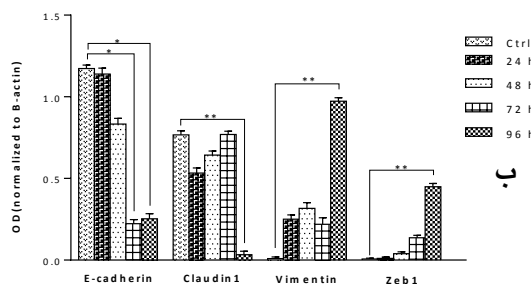
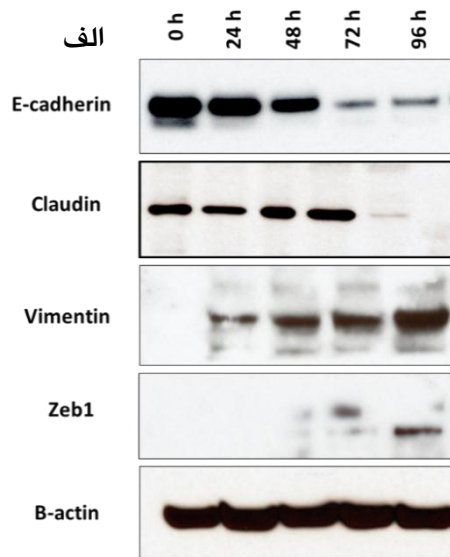
جدول ۱. پرایمرهای طراحی شده برای ژن‌های مورد مطالعه

Primers	Sequence	Product size
Slug	F: TACCGCTGCTCCATTCCACG R: CATGGGGGTCTGAAAGCTTGG	158 bp
Snail	F: CTGGGTGCCCTCAAGATGCA R: CCGGACATGGCCTTGTAGCA	105 bp
Twist	F: TGC GGAAGATCATCCCCACG R: GCTGCAGCTTGCCATCTTGGGA	137 bp
Vimentin	F: ACCCGCACCAACGAGAAGGT R: ATTCTGCTGCTCCAGGAAGCG	90 bp
Zeb1	F: TGC ACTGAGTGTGAAAAGC R: TGGTGATGCTGAAAAGAGACG	237 bp
E-cadherin	F: TTGCACCGGTCGACAAAAGGAC R: TGGATTCCAGAAAACGGAGGCC	231 bp
GusB	F: CTCATTTGGAATTTTGCCGATT R: CCGAGTGAAGATCCCCTTTTTA	81 bp

بررسی میزان بیان pAKT و پروتئین‌های درگیر در EMT میزان بیان پروتئین‌های pAKT، Snail، Twist، N-cadherin، E-cadherin، Claudin1، Vimentin، Zeb1 به روش وسترن بلات در سلول‌ها بررسی شدند [۱۶]. به طور خلاصه سلول‌ها سه بار با PBS شسته شده و سپس با بافر لیزکننده 10% (5M NaCl, 1M Tris-HCl, pH 7.5, 10% sodium dodecyl sulfate) NP-40، 20% sodium dodecyl sulfate) حاوی مهارکننده‌های پروتئاز و فسفاتاز انکوبه شدند. محصول لیز سلولی، سانتریفیوژ شد و مایع رویی به عنوان نمونه پروتئین جمع‌آوری گردید. غلظت پروتئین به روش Lowry تعیین شد حدود ۳۰-۲۰ میکروگرم از نمونه پروتئین روی ژل بیس آکرلامید ۱۲-۴٪ برده شد و سپس به غشا PVDF منتقل گردید. مرحله بلاکینگ به مدت ۶۰ دقیقه با شیر خشک ۵٪ انجام گرفت. پروتئین‌های انتقال داده شده به غشاء با آنتی‌بادی‌های اولیه Anti pAKT، Anti Snail، Anti E-cadherin، Anti N-cadherin، Anti Twist، Anti Vimentin، Anti Claudin1 و Anti Zeb1 با غلظت ۱:۱۰۰۰ در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به صورت شبانه انکوبه شدند. روز بعد غشاهای با آنتی‌بادی ثانویه مورد نظر با غلظت ۱:۵۰۰۰ به مدت ۱ ساعت در دمای اتاق انکوبه شدند و سپس با استفاده از ECL بر روی فیلم ظاهر شدند. تمام آنتی‌بادی‌های مورد استفاده در این مطالعه متعلق به شرکت Cell signaling بودند.

روش آماری:

اطلاعات با استفاده از نرم‌افزار GraphPad Prism نسخه ۶ آنالیز شدند. معنی‌دار بودن تفاوت بین گروه کنترل و سایر گروه‌های مورد آزمایش با روش One-way ANOVA و Dunnett test بررسی شد. اطلاعات به صورت  $\text{mean} \pm \text{SD}$  (standard deviation) نشان داده شده است.

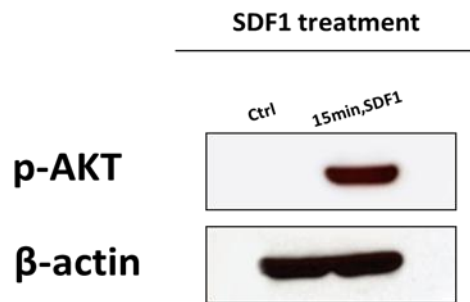


شکل ۴. میزان بیان نشانگرهای EMT بعد از تیمار با SDF1 به روش وسترن بلات. الف) باندهای پروتئینی بر روی غشاء ب) آنالیز آماری تراکم باندها، \* و \*\* به ترتیب نشان‌دهنده  $P < 0.05$  و  $P < 0.01$  می‌باشند. تفاوت با گروه کنترل سنجیده می‌شود.

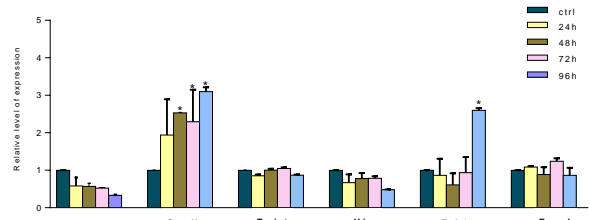
### بحث و نتیجه‌گیری

کموکاین‌ها از طریق تعامل با گیرنده‌های اختصاصی خود، نقش‌های چندگانه‌ای در روندهای فیزیولوژیک و پاتولوژیک دارند. شواهد فراوان حاکی از آن است که گسترش متاستاتیک سلول‌های سرطانی به دنبال مکانیسم‌هایی با واسطه کموکاین‌ها می‌باشد. به ویژه نقش SDF1 در رشد تومور اولیه و روند متاستاز به اثبات رسیده است. مشخص شده است که بیان CXCR4 در سلول‌های توموری نقش مهمی در متاستاز سلولی از طریق شیب غلظت به سمت ارگان‌هایی که لیگاند SDF1 را بیان می‌کنند، دارد [۱۷]. مطالعات متعدد نشان داده است که جمعیت کوچکی از سلول‌های سرطانی، ویژگی‌هایی شبیه سلول‌های بنیادی دارند که سلول‌های بنیادی سرطانی (Cancer stem cells=CSC) نامیده می‌شوند و این سلول‌ها با قدرت تکثیر بالا به عنوان منبع ذخیره و حفظ سلول‌های سرطانی محسوب می‌شوند. اکثر این سلول‌ها گیرنده CXCR4 را بیان می‌کنند و به شیب غلظتی لیگاند اختصاصی SDF1 پاسخ می‌دهند که این مسئله نشان‌دهنده نقش SDF1 و CSC در روند متاستاز است [۱۸].

سلول‌های تیمار نشده به عنوان گروه کنترل در نظر گرفته شدند. بیان ژن Snail در بازه‌های زمانی ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت به میزان معنی‌داری افزایش یافت ( $P < 0.05$ ). افزایش معنی‌دار ژن Zeb1 پس از ۹۶ ساعت مشاهده شد ( $P < 0.05$ ) (شکل ۳). ژن‌های E-cadherin و Vimentin، Twist، Slug سایر نشانگرهای EMT مورد مطالعه در این تحقیق بودند که تغییری در سطح بیان ژن نشان ندادند (شکل ۳).



شکل ۲: بیان p-AKT در سلولهای MDA-MB-231 بعد از ۱۵ دقیقه تیمار با SDF1.  $\beta$ -actin به عنوان کنترل داخلی در نظر گرفته شد.



شکل ۳. میزان بیان نشانگرهای EMT بعد از تیمار با SDF1 به روش Real time PCR. \* بیانگر  $P < 0.05$  می‌باشد. تفاوت با گروه کنترل سنجیده می‌شود.

بررسی تاثیر SDF1 بر بیان پروتئین‌های درگیر در روند EMT میزان بیان نشانگرهای EMT در سطح پروتئین در سلول‌های تیمار شده با SDF1 در ساعت‌های ۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت به روش وسترن‌بلات مورد مطالعه قرار گرفتند. سلول‌های تیمار نشده (ساعت صفر) به عنوان گروه کنترل در نظر گرفته شدند. پروتئین E-cadherin بعد از ۷۲ و ۹۶ ساعت در مقایسه با گروه تیمار نشده به طور معنی‌داری کاهش بیان داشتند ( $P < 0.05$ ) (شکل ۴). بیان Claudin1 نیز بعد از ۹۶ ساعت در مقایسه با گروه تیمار نشده به طور معنی‌داری کاهش یافت ( $P < 0.01$ ) (شکل ۴). E-cadherin و Claudin1 از پروتئین‌های مسئول در ایجاد ویژگی‌های اپی‌تلیالی می‌باشند. علاوه بر آن افزایش بیان نشانگرهای مزانشیمی Zeb1 و Vimentin با افزایش زمان تیمار در مقایسه با گروه تیمار نشده، مشاهده شد که این افزایش بعد از ۹۶ ساعت معنی‌دار بود ( $P < 0.01$ ) (شکل ۴). بیان فاکتورهای رونویسی Snail، Twist، N-cadherin در سطح پروتئین در این سلول‌ها مشاهده نشد.

می‌شوند [۲۷]. نتایج این مطالعه برای اولین بار نشان داد که SDF1 می‌تواند سبب کاهش بیان Claudin1 شود.

Vimentin به عنوان یکی از اجزاء اسکلت سلولی، یکی دیگر از پروتئین‌هایی است که طی روند EMT افزایش بیان پیدا می‌کند. نتایج مطالعه حاضر حاکی از آن بود که به دنبال تیمار با SDF1 بیان Vimentin در سلول‌های سرطانی پستان افزایش می‌یابد. Onoue و همکارانش مطالعه مشابهی را بر روی کارسینومای سلول‌های سنگ‌فرشی دهان انجام داده بودند. نتایج مطالعه آن‌ها نشان داد که تاثیر SDF1 بر بیان Vimentin از طریق مسیر پیام‌رسان PI3K می‌باشد [۲۸]. یکی دیگر از نشانگرهای مهم مورد بررسی در این مطالعه، Zeb1 می‌باشد. Zeb1 یک فاکتور رونویسی می‌باشد که سبب پیشرفت تهاجم و متاستاز از طریق القاء EMT در سلول‌های سرطانی می‌شود. Zeb1 مستقیماً به E-box واقع در پروموتور CDH1 که ژن کدکننده E-cadherin است، متصل می‌شود. این اتصال سبب فراخوانی مهارکننده‌های ژن از جمله SWI/SNF chromatin-remodeling protein BRG1 و بالطبع مهار رونویسی CDH1 و القاء EMT می‌گردد. غیرفعال کردن Zeb1 در سلول‌های MDA-MB-231 سبب افزایش بیان حدود ۲۰۰ ژن و کاهش بیان حدود ۳۰۰ ژن شد که اکثراً در فرایند EMT درگیر بودند [۲۷]. نتایج این مطالعه مبنی بر افزایش بیان Zeb1 بعد از تیمار با SDF1 می‌تواند نقش احتمالی Zeb1 را در میانجی‌گری اثر SDF1 در کاهش متاستاز مطرح کند.

به طور خلاصه در این مطالعه ارتباط بین کموکاین SDF1 و ژن‌ها و پروتئین‌های درگیر در روند EMT مورد بررسی قرار گرفتند. نتایج حاصل از این مطالعه حاکی از آن بود که احتمالاً کموکاین SDF1 از طریق تغییر در بیان نشانگرهای دخیل در روند EMT می‌تواند سبب افزایش متاستاز شود. لذا مهارکننده‌های SDF1 یا آنتاگونیست‌های لیگاند SDF1 می‌توانند به عنوان مهارکننده‌های EMT مطرح شوند.

امید است که نتایج این تحقیق با شناسایی بخشی از ارتباط بین عوامل دخیل در مهاجرت سلول‌های سرطانی، بتواند به ارائه رویکردهایی درمانی مناسب در جهت کنترل و مهار متاستاز در بیماران مبتلا به سرطان کمک کند.

### تشکر و قدردانی

این مطالعه در مرکز تحقیقات Whitehead Institute وابسته به دانشگاه MIT انجام گرفت. بدین وسیله کمال تشکر خود را از پروفسور Robert Weinberg و سایر محققان این مرکز تحقیقاتی به سبب مشاوره علمی و حمایت مالی اعلام می‌دارم.

Yi و همکاران، جمعیتی از CSC پستان که گیرنده CXCR4 را بیان می‌کردند، با کموکاین SDF1 القاء کردند و سپس فسفریلاسیون پروتئینی را در این سلول‌ها بررسی نمودند. نتایج نشان داد که بیش از ۲۰٪ پروتئین‌های فسفریله شده به دنبال القاء با SDF1 مربوط به اسکلت سلولی، چسبندگی و مهاجرت سلول‌ها می‌باشند که این مسئله نقش مهم مسیر پیام‌رسان SDF1/CXCR4 را در روند متاستاز مشخص می‌کند [۱۹]. افزایش بیان SDF1 به عنوان پیش‌آگهی بد در انواعی از سرطان‌ها از جمله سرطان کولورکتال [۷]، سرطان دهانه رحم [۲۰]، سرطان پستان [۲۱] و کارسینومای کلیه [۲۲] گزارش شده است.

هدف قرار دادن SDF1 در تومورهای نظیر ملانوما [۲۳]، تومورهای کبدی [۹] و گلیوبلاستوما [۱۰] مورد مطالعه قرار گرفته است. به امید یافتن تارگت‌هایی در درمان متاستاز، مطالعات روی مسیر پیام‌رسان SDF1/CXCR4 و شناخت ملکول‌ها و پروتئین‌های درگیر در این مسیر مورد توجه بسیاری از محققین قرار گرفته است.

یکی دیگر از پیش‌شرط‌های لازم جهت متاستاز موفق سلول‌های سرطانی روند EMT می‌باشد. از نشانه‌های EMT از بین رفتن عملکردی E-cadherin است. E-cadherin مهارکننده متاستاز در طی روند پیشرفت سرطان می‌باشد [۲۴]. Snail به عنوان یک القاء‌کننده قدرتمند EMT به عنوان مهارکننده اصلی E-cadherin عمل می‌کند [۲۵]. بیان Snail خود توسط ملکول‌های سیگنال‌دهنده مختلفی که در ریز محیط سلول‌های سرطانی یافت می‌شوند، کنترل می‌گردد [۲۶]. تاکنون شواهدی مبنی بر ارتباط بین SDF1 و بیان Snail گزارش نشده است. نتایج این مطالعه مبنی بر افزایش بیان Snail و کاهش بیان E-cadherin به دنبال تیمار با SDF1 می‌تواند شواهدی بر ارتباط بین این سه فاکتور مهم در روند متاستاز باشد.

Claudin ها از خانواده پروتئین‌های داخل غشایی می‌باشند و نقش مهمی در تشکیل اتصالات محکم دارند و برای حفظ قطبیت سلولی حیاتی می‌باشند. مطالعات اخیر شواهدی از افزایش بیان Claudin ها در انواعی از سرطان‌ها در انسان نشان می‌دهند. مطالعه‌ای که توسط Suh و همکارانش انجام گرفت نشان داد که Claudin ها نقش مهمی در روند EMT در سلول‌های سرطانی کبدی ایفا می‌کنند. افزایش بیان Claudin1 سبب القاء بیان فاکتورهای رونویسی کنترل‌کننده EMT از جمله Zeb1 و Slug می‌شود که خود سبب کاهش بیان E-cadherin،  $\beta$ -catenin و افزایش بیان N-cadherin و Vimentin و بالطبع منجر به کاهش چسبندگی سلولی و افزایش تحرک در سلول‌های سرطانی

migration of MCF-7 breast cancer cells through down-regulation of chemokine receptors. *Iran J Basic Med Sci* 2016; 19: 125-131.

[16] Bagheri M, Fazli M, Saeednia S, Kor A, Ahmadiankia N. Pomegranate peel extract inhibits expression of beta-catenin, epithelial mesenchymal transition, and metastasis in triple negative breast cancer cells. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* 2018; 64: 86-91.

[17] Dillenburg-Pilla P, Patel V, Mikelis CM, Zarate-Blades CR, Doci CL, Amornphimoltham P, et al. SDF-1/CXCL12 induces directional cell migration and spontaneous metastasis via a CXCR4/Galphai/mTORC1 axis. *FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol* 2015; 29: 1056-1068.

[18] Faber A, Goessler UR, Hoermann K, Schultz JD, Umbreit C, Stern-Straeter J. SDF-1-CXCR4 axis: cell trafficking in the cancer stem cell niche of head and neck squamous cell carcinoma. *Oncol Rep* 2013; 29: 2325-2331.

[19] Yi T, Zhai B, Yu Y, Kiyotsugu Y, Raschle T, Eitzkorn M, et al. Quantitative phosphoproteomic analysis reveals system-wide signaling pathways downstream of SDF-1/CXCR4 in breast cancer stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2014; 111: E2182-2190.

[20] Song Z, Zhang X, Ye X, Feng C, Yang G, Lu Y, et al. High expression of stromal cell-derived factor 1 (SDF-1) and NF-kappaB predicts poor prognosis in cervical cancer. *Med Sci Monit* 2017; 23: 151-157.

[21] Liu H, Li Z, Deng M, Liu Q, Zhang T, Guo W, et al. Prognostic and clinicopathological value of CXCL12/SDF1 expression in breast cancer: A meta-analysis. *Clin Chim Acta* 2018; 484: 72-80.

[22] Wang L, Chen W, Gao L, Yang Q, Liu B, Wu Z, et al. High expression of CXCR4, CXCR7 and SDF-1 predicts poor survival in renal cell carcinoma. *World J Surg Oncol* 2012; 10: 212.

[23] Bouyssou JMC, Ghobrial IM, Roccaro AM. Targeting SDF-1 in multiple myeloma tumor microenvironment. *Cancer Lett* 2016; 380: 315-318.

[24] Wong SH, Fang CM, Chuah LH, Leong CO, Ngai SC. E-cadherin: Its dysregulation in carcinogenesis and clinical implications. *Crit Rev Oncol Hematol* 2018; 121: 11-22.

[25] Mezencev R, Matyunina L V, Jabbari N, McDonald JF. Snail-induced epithelial-to-mesenchymal transition of MCF-7 breast cancer cells: systems analysis of molecular changes and their effect on radiation and drug sensitivity. *BMC Cancer* 2016; 16: 236.

[26] Wang Y, Shi J, Chai K, Ying X, Zhou BP. The role of snail in EMT and tumorigenesis. *Curr Cancer Drug Targets* 2013; 13: 963-972.

[27] Suh Y, Yoon CH, Kim RK, Lim EJ, Oh YS, Hwang SG, et al. Claudin-1 induces epithelial-mesenchymal transition through activation of the c-Abl-ERK signaling pathway in human liver cells. *Oncogene* 2013; 32: 4873-4882.

[28] Onoue T, Uchida D, Begum NM, Tomizuka Y, Yoshida H, Sato M. Epithelial-mesenchymal transition induced by the stromal cell-derived factor-1/CXCR4 system in oral squamous cell carcinoma cells. *Int J Oncol* 2006; 29: 1133-1138.

[1] Boyle P. Triple-negative breast cancer: epidemiological considerations and recommendations. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol* 2012; 23: vi7-12.

[2] Seyfried TN, Huysentruyt LC. On the origin of cancer metastasis. *Crit Rev Oncol* 2013; 18: 43-73.

[3] Mishan MA, Ahmadiankia N, Bahrami AR. CXCR4 and CCR7: Two eligible targets in targeted cancer therapy. *Cell Biol Int* 2016; 40: 955-967.

[4] Ray P, Lewin SA, Mihalko LA, Leshner-Perez S-C, Takayama S, Luker KE, et al. Secreted CXCL12 (SDF-1) forms dimers under physiological conditions. *Biochem J* 2012; 442: 433-442.

[5] Papatheodorou H, Papanastasiou AD, Sirinian C, Scopu C, Kalofonos HP, Leotsinidis M, et al. Expression patterns of SDF1/CXCR4 in human invasive breast carcinoma and adjacent normal stroma: correlation with tumor clinicopathological parameters and patient survival. *Pathol Res Pract* 2014; 210: 662-667.

[6] Sun Y, Mao X, Fan C, Liu C, Guo A, Guan S, et al. CXCL12-CXCR4 axis promotes the natural selection of breast cancer cell metastasis. *Tumour Biol* 2014; 35: 7765-7773.

[7] Li YP, Pang J, Gao S, Bai P-Y, Wang W, Kong P, et al. Role of CXCR4 and SDF1 as prognostic factors for survival and the association with clinicopathology in colorectal cancer: A systematic meta-analysis. *Tumour Biol* 2017; 39: 1010428317706206.

[8] Zheng N, Chen J, Liu W, Liu J, Li T, Chen H, et al. Mifepristone inhibits ovarian cancer metastasis by intervening in SDF-1/CXCR4 chemokine axis. *Oncotarget* 2017; 8: 59123-59135.

[9] Liepelt A, Tacke F. Stromal cell-derived factor-1 (SDF-1) as a target in liver diseases. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2016; 311: G203-209.

[10] Tseng D, Vasquez-Medrano DA, Brown JM. Targeting SDF-1/CXCR4 to inhibit tumour vasculature for treatment of glioblastomas. *Br J Cancer* 2011; 104: 1805-1809.

[11] Brabletz T, Kalluri R, Nieto MA, Weinberg RA. EMT in cancer. *Nat Rev Cancer* 2018; 18: 128-134.

[12] Heerboth S, Housman G, Leary M, Longacre M, Byler S, Lapinska K, et al. EMT and tumor metastasis. *Clin Transl Med* 2015; 4: 6.

[13] Comito G, Giannoni E, Segura CP, Barcellos-de-Souza P, Raspollini MR, Baroni G, et al. Cancer-associated fibroblasts and M2-polarized macrophages synergize during prostate carcinoma progression. *Oncogene* 2014; 33: 2423-2431.

[14] Mishan MA, Heirani-Tabasi A, Mokhberian N, Hassanzade M, Kalalian Moghaddam H, Bahrami AR, et al. Analysis of chemokine receptor gene expression in esophageal cancer cells compared with breast cancer with insights into metastasis. *Iran J Public Health* 2015; 44: 1353-1358.

[15] Ahmadiankia N, Moghaddam HK, Mishan MA, Bahrami AR, Naderi-Meshkin H, Bidkhori HR, et al. Berberine suppresses

## Analysis of epithelial mesenchymal transition markers in breast cancer cells in response to stromal cell-derived factor 1

Naghmeh Ahmadiankia (Ph.D)\*<sup>1,2</sup>

1 - Cancer Prevention Research Center, Shahroud University of Medical Sciences, Shahroud, Iran.

2 - School of Medicine, Shahroud University of Medical Sciences, Shahroud, Iran.

\* Corresponding author. +98 23-32395054 Ahmadian@shmu.ac.ir

Received: 5 Apr 2018; Accepted: 24 Oct 2018

**Introduction:** Metastasis is the main cause of cancer death; however, the underlying mechanisms of metastasis are largely unknown. The chemokine of stromal cell-derived factor 1 (SDF1) and the process of epithelial mesenchymal transition (EMT), both have been declared as important factors to promote cancer metastasis; however, Conspicuously, the relation between them has not been recognized well yet. Due to the importance of investigating the factors involved in cancer metastasis to develop new therapeutic strategies, in this study the effect of SDF1 on the expression of transcription factors involved in EMT was analyzed in breast cancer cells.

**Materials and Methods:** MDA-MB-361 cells were treated with 100 ng/ml SDF1 in different time points of 24, 48, 72 and 96 hours. Then the expression of EMT markers were analyzed by Real time PCR (Cyber green) and western blot methods.

**Results:** Snail and Zeb1 genes had upregulation in response to SDF1 treatment ( $P < 0.05$ ). Moreover, western blot analysis revealed increased expression of Zeb1 and Vimentin and decreased expression of E-cadherin and Claudin1 in breast cancer cells ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ).

**Conclusion:** The results of this study revealed that SDF1 changes the expression of some factors controlling EMT in breast cancer cells and it might be one of the underlying mechanisms of SDF1 effect on metastasis in breast cancer cells.

**Keywords:** Breast Neoplasms, Epithelial-Mesenchymal Transition, Neoplasm Metastasis, Chemokine SDF1