

## Identification and characterization of colon cancer stem cells in HT-29 adenocarcinoma cell line

Khorrani S<sup>1</sup>, Zavarani Hosseini A<sup>2\*</sup>, Mowla J<sup>3</sup>, Malekzadeh R<sup>4</sup>

1- Department of Immunology, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

2- Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

3- Department of Molecular Genetics, Faculty of Biological Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

4- Digestive Oncology Research Center, Digestive Diseases Research Institute, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

Received: 20 Apr 2014, Accepted: 11 Jun 2014

---

### Abstract

**Background:** Cancer stem cells are subpopulation of cancer cells that show self-renewal potential and the capacity to differentiate into diverse populations comprising a tumor. One of the characteristics of CSCs is their ability to form floating spheroids under anchorage-independent conditions in a serum-free media. The aim of this study was isolation of colon cancer stem cells by sphere formation assay and characterization of them in human colonic adenocarcinoma HT-29.

**Materials and Methods:** In this experimental study, colon CSCs markers including CD44 and EPCAM in spheroid and HT-29 cells were analyzed by flow cytometry. The expression levels of stemness genes in both spheroid and HT-29 cells were investigated using real-time PCR. Tumorigenic potential of spheroid cells was evaluated using *in vivo* xenografts assay.

**Results:** Our data showed over 92% of spheroids were CD44<sup>+</sup>/EpCAM<sup>+</sup>, while HT-29 cells only have expressed 37% of CD44/EpCAM markers. In compared with the HT-29 cells, expression levels of “stemness” genes, like Sox2, Oct4, Nanog, C-myc, and Klf4 were significantly increased in spheroid cells ( $p < 0.05$ ). Further, As little as 2500 spheroid cells were sufficient to obtain tumor growth in nude mice, while  $1 \times 10^6$  of HT-29 cells was needed to form tumor.

**Conclusion:** Our data suggest that spheroid formed by colon cancer cell lines highly enriched in CSCs and showed increasing expression of stemness genes and tumorigenic in nude mice.

**Keywords:** Cancer stem cells, CD44, EPCAM, HT-29, Spheroid.

\*Corresponding Author:

Address: Department of Immunology, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran.

Email: Zavarana@modares.ac.ir

## شناسایی و تعیین خصوصیات سلول‌های بنیادی سرطانی کولون در رده سلولی آدنوکارسینوم کولونی HT-29

سمانه خرمی<sup>1</sup>، احمد زواران حسینی<sup>2\*</sup>، سید جواد مولی<sup>3</sup>، رضا ملک زاده<sup>4</sup>

- 1- دانشجوی دکتری ایمنی شناسی پزشکی، گروه ایمنی شناسی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
- 2- استاد، گروه ایمنی شناسی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
- 3- دانشیار، گروه ژنتیک مولکولی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
- 4- استاد، گروه تحقیقات سرطان، پژوهشکده بیماری‌های گوارشی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران

تاریخ دریافت: 93/1/31 تاریخ پذیرش: 93/3/21

### چکیده

**زمینه و هدف:** یکی از ویژگی‌های سلول‌های بنیادی سرطانی توانایی آنها در تشکیل کلنی‌های اسفروبییدی تحت شرایط غیر چسبان و در محیط فاقد سرم می‌باشد. هدف از این مطالعه جداسازی سلول‌های بنیادی سرطانی با استفاده از روش تشکیل اسفروبیید و بررسی خصوصیات عملکردی آنها در رده سلولی سرطانی آدنوکارسینوم کولونی HT-29 می‌باشد. **مواد و روش‌ها:** در این مطالعه تجربی، شاخص‌های سلول‌های بنیادی سرطانی کولون شامل CD 44 و EPCAM و میزان بیان ژن‌های مرتبط با مسیرهای اختصاصی سلول‌های بنیادی سرطانی در اسفروبیدها و سلول‌های HT-29 مورد بررسی قرار گرفت. جهت تعیین توانایی تومورزایی اسفروبیدها نیز، پیوند زونگرافت در موش‌های nude انجام گردید. **یافته‌ها:** بر اساس اطلاعات به دست آمده بیش از 92 درصد از اسفروبیدها EPCAM<sup>+</sup>/CD 44<sup>+</sup> بودند در حالی که فقط 37 درصد از سلول‌های HT-29 شاخص‌های EPCAM/CD 44 را بیان می‌کردند. در مقایسه با سلول‌های HT-29 میزان بیان ژن‌های Oct4, Sox2, Nanog, Klf4 و C-myc به طور قابل ملاحظه‌ای در سلول‌های اسفروبییدی افزایش نشان داد (p<0/05). همچنین تزریق 2500 سلول اسفروبییدی برای شروع و رشد تومور در موش‌های nude کافی بود در حالی که  $1 \times 10^6$  سلول HT-29 توانایی القاء تومور را داشتند. **نتیجه‌گیری:** یافته‌ها نشان می‌دهد اسفروبیدهای تشکیل شده از رده سلولی سرطانی کولون HT-29 غنی از سلول‌های بنیادی سرطانی می‌باشند که بیان افزایش یافته‌ای از ژن‌های درگیر در ویژگی‌های چند قوه‌زایی و همچنین توانایی تومورزایی در موش‌های nude را نشان می‌دهند. **واژگان کلیدی:** اسفروبیید، سلول‌های بنیادی سرطانی، CD44، EPCAM، HT-29.

\*نویسنده مسئول: تهران، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم پزشکی، گروه ایمنی شناسی پزشکی

Email: Zavarana@modares.ac.ir

## مقدمه

در حال حاضر شواهد فراوانی نشان می دهند که سرطان های با منشا سلول های اپی تلیالی شامل سرطان کولورکتال از یک مجموعه کوچکی از سلول های دارای قدرت خود تجدید شوندگی تحت عنوان سلول های بنیادی سرطانی ایجاد می شوند. بر اساس مدل " سلول های بنیادی سرطانی (Cancer stem cells)"، زیر جمعیت کوچکی از سلول های سرطانی که ویژگی هایی مشابه سلول های بنیادی سالم را نشان می دهند، توانایی شروع و حفظ رشد تومور، متاستاز و مقاومت به درمان را دارا می باشند (1). از این رو تحقیقاتی که در جهت شناسایی و تعیین ویژگی های سلول های بنیادی سرطانی انجام می شود نه تنها موجب بهبود شناخت محققین از این سلول ها می گردد بلکه با شناسایی دقیق این سلول ها می توان به طراحی روش های درمانی در راستای هدف گیری این سلول ها اقدام نمود و بدین ترتیب از عود مجدد و متاستاز سرطان ها جلوگیری نمود. سلول های بنیادی سرطانی یا سلول های شروع کننده تومور اولین بار در لوسمی حاد میلویدی و در سال های اخیر در بسیاری از تومورها از جمله سرطان کولون شناسایی شدند (2، 3).

اکثر روش های جداسازی سلول های بنیادی سرطانی بر اساس استفاده از شاخص های سطح سلولی مختلف شامل CD 24, CD 44, CD 133 و ALDH می باشند که برای جدا سازی و غنی کردن سلول های بنیادی سرطانی از بافت های توموری اولیه با استفاده از تکنولوژی جداسازی سلولی فعال با فلوسیتومتری (FACS) و سپس آزمودن توانایی ایجاد تومور در موش های دارای نقص ایمنی به کار برده می شوند (4، 5). این روش ها بسیار هزینه بر بوده و به سهولت قادر به شناسایی سلول های بنیادی سرطانی یا ویژگی های عملکردی آنها نیستند. از این رو استفاده از روش های جایگزین قابل اطمینان در شرایط آزمایشگاهی برای شناسایی سلول های بنیادی سرطانی مشتق از رده های سلولی مزایای بسیاری خواهد داشت. برای مثال، مطالعات اثرات آنتی بادی ها، داروها، افزایش بیان و یا حذف ژن های خاص بر عملکردهای اختصاصی سلول های بنیادی سرطانی

مشتق از رده های سلولی را فراهم می سازد. روش های آزمایشگاهی هم چنین شناسایی ژن های اختصاصی که وضعیت سلول های بنیادی را کنترل می کنند و هنوز مشخص نشده اند را فراهم می کنند.

در مطالعات فراوانی نشان داده شده است که برخلاف بافت توموری انسانی، رده های سلولی سرطانی به عنوان منابع با ارزشی محسوب می شوند که می توانند به طور نامحدود و قابل تکرار استفاده شوند (6). رده های سلولی با توجه به محتوی ژنتیکی به سهولت قابل شناسایی هستند و با بافت های استرومایی که می توانند بر تفسیر نتایج به دست آمده از بافت های انسانی اثر بگذارند آلودگی ندارند (7). شواهد مستدلی وجود دارد که رده های سلولی نمایان گر تومورهایی هستند که در ابتدا از آنها جدا شده اند و می توانند ساختارهایی مشابه آنچه که در بافت های اصلی یافت می شوند تشکیل دهند. هم چنین از نظر موتاسیون در ژن ها با سرطان های اولیه مشابهت دارند (8).

هدف ما در این مطالعه نشان دادن چگونگی جداسازی سلول های بنیادی سرطانی کولون با استفاده از روش تشکیل اسفریوید (sphere formation assay) در شرایط آزمایشگاهی و سپس بررسی شاخص های سطح سلولی و خصوصیات عملکردی مربوط به سلول های بنیادی سرطانی می باشد. در این مطالعه از رده سلولی HT-29 که رده سلولی آدنوکارسینوم کولون است به عنوان مدل استفاده شده است.

## مواد و روش ها

در این مطالعه تجربی رده سلولی آدنوکارسینوم کولون انسانی HT-29 از مرکز ملی ذخایر ژنتیکی خریداری شد. سلول ها در محیط کشت DMEM/F 12 (گیکو - آمریکا) همراه با 10 درصد سرم جنین گاوی (Fetal Bovine Serum-FBS) (گیکو - آمریکا) و 1 درصد پنی سیلین / استرپتومایسین (آنتی بیوتیک - آمریکا) در انکوباتور در شرایط دمای 37 درجه سانتی گراد و دی اکسید کربن 5 درصد کشت داده شد. سلول ها با استفاده از تریپسین

تریپسینه شده و در بافر PBS حاوی 1 درصد آلبومین سرم گاوی (Bovine Serum Albumin-BSA)، به صورت سوسپانسیون سلولی در آورده شدند. بعد از 10 دقیقه، سلولها با استفاده از آنتی بادی های انسانی شامل anti APC-44 و anti CD 44 (نیوساینس - آمریکا) EPCAM-PE رنگ آمیزی شدند. سلولهای رنگ آمیزی شده با کنترل های ایزوتایپی IgG2-APC و IgG1-PE به عنوان کنترل استفاده شدند. آنالیز فلوسیتومتری با استفاده از دستگاه FACS CantoII (BD, USA) انجام شد.

### Real-Time PCR

ابتدا RNA از سلول های اسفرویدی و سلول های HT-29 با استفاده از کیت جداسازی RNA (رش - آمریکا) بر اساس دستورالعمل استخراج شد. واکنش PCR با استفاده از کیت light cycler RNA Master SYBR Green I (کیژن - آمریکا) و دستگاه light cycler Roche مدل 3/5 انجام شد. توالی پرایمرها و شرایط PCR در جدول 1 به طور خلاصه آورده شده است. از HGPRT به عنوان کنترل داخلی استفاده شد. تغییرات بیان ژن ها با استفاده از روش  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  محاسبه شد.

0/25 درصد (اینوتروژن - آمریکا) به صورت سوسپانسیون سلولی در آورده شدند.

برای تشکیل کلنی های اسفرویدی، سوسپانسیون سلولی به تعداد 15000-20000 سلول در هر میلی لیتر در پلیت های 6 خانه ای در محیط فاقد سرم شامل DMEM/F12 همراه با فاکتورهای رشد شامل 20 نانوگرم در میلی لیتر فاکتور رشد اپیدرمی (Epidermal growth factor-EGF (سیگما - آمریکا) و 10 نانوگرم در میلی لیتر فاکتور رشد فیبروبلاستی (Fibroblast growth factor-FGF2) (میلیور - آمریکا) 27 درصد ویتامین B1 کشت داده شد. برای تعیین توانایی تمایز سلول های اسفرویدی، اسفرویدها در محیط کشت DMEM/F12 فاقد فاکتورهای رشد و در حضور 10 درصد سرم جنین گاوی کشت داده شد.

### ارزیابی شاخص های سطح سلولی با استفاده از فلوسیتومتری

برای این منظور، سوسپانسیون سلولی حاصل از اسفرویدها و سلول های HT-29 بر اساس پروتکل استاندارد رنگ آمیزی شدند. به طور خلاصه سلول های دو گروه

جدول 1. توالی پرایمرها و شرایط PCR

نام ژن	توالی پرایمرها	دمای Tm	دمای اتصال	طول سنتز شده	قطعه
C-myc	F: 5'-AGCGACTCTGAGGAGGAAC-3' R: 5'-CTGCGTAGTTGTGCTGATG-3'	58/4 57/7	59	184	جفت باز
Sox-2	F: 5'-GACTGAGAGAAAGAAGAGGAG-3' R: 5'-GAAAATCAGGCGAAGAATAAT-3'	59/2 58/2	60	197	جفت باز
Oct-4	F: 5'-CGCCGTATGAGTTCTGTG-3' R: 5'-GGTGATCCTCTTCTGCTTC-3'	59/6 59/9	60	284	جفت باز
Nanog	F: 5'-GCTAAGGACAACATTATAGAAG-3' R: 5'-CTTCATCACCAATTCGTAATTG-3'	58/3 57/6	59	127	جفت باز
Klf-4	F: 5'-CCCAATTACCCATCCTTCC-3' R: 5'-GTGCCTGGTCAGTTCATC-3'	58/8 59/3	59	303	جفت باز
HPRT	F: 5'-CCTGGCGTCGTGATTAGTG-3' R: 5'-TCAGTCCTGTCCATAATTAGTCC-3'	58/3 59/1	60	125	جفت باز

شرایط سیکل های PCR بدین ترتیب بود: 1 سیکل در دمای 50 درجه سانتیگراد برای مدت زمان 10 دقیقه، 1 سیکل در دمای 95 درجه سانتیگراد برای مدت زمان 10 دقیقه بدنبال 40 سیکل در دمای 95 درجه برای 10 ثانیه و دمای 60 یا 59 درجه برای 1 دقیقه

### توانایی تومورزایی در شرایط درون تنی

در این مطالعه نتایج نشان داد سلول های آدنوکارسینوم کولونی HT-29 در محیط فاقد سرم و در حضور فاکتورهای رشد می توانند کلنی های اسفرویدی غیر چسبان تشکیل دهند (شکل 1 الف). جهت بررسی توانایی تمایز کلنی های اسفرویدی این سلول ها در محیط کشت حاوی 10 درصد FBS کشت داده شد. بعد از یک روز سلول های تمایز نیافته به تدریج از حالت اسفرویدی به سلول های چسبنده و تمایز یافته تبدیل شدند (شکل 1 ب). یافته ها نشان می دهند سلول های اسفرویدی ویژگی هایی مشابه سلول های بنیادی شامل خود تجدید شونده گی و توانایی تمایز را نشان می دهند. تحت شرایط فاقد سرم کلنی های اسفرویدی شاخص های سطح سلولی CD44 و EPCAM را در مقایسه با سلول های HT-29 به طور معنی داری بیان می کنند ( $p < 0/05$ ). نتایج نشان می دهد که 92/3(4/2) درصد اسفرویدها از نظر شاخص های سطح سلولی  $CD44^+ / EPCAM^+$  می باشند در حالی که 37/4(3/9) درصد سلول های HT-29 شاخص های EPCAM/CD44 را بیان می کنند (شکل 2). یافته ها نشان می دهند که اسفرویدهای تشکیل شده از سلول های HT-29 دارای جمعیت غنی شده از سلول های بنیادی سرطانی می باشند.

توانایی تومورزایی از طریق تزریق زیرجلدی سوسپانسیون سلولی اسفرویدها و سلول های HT-29 به موش های nude (6-8 هفته) ارزیابی شد. قبل از تزریق سلول ها به صورت هم حجم در بافر فسفات نمکی و کلاژن آماده سازی شدند. موش ها از آزمایشگاه حیوانات بیمارستان امام خمینی خریداری شده و تحت شرایط استاندارد نگهداری شد. مطالعه روی حیوانات توسط کمیته اخلاق پزشکی دانشگاه تربیت مدرس تصویب شد. زمانی که تومورها به حجم آسانتی متر مکعب رسیدند موش ها کشته و نمونه های توموری جهت بررسی های پاتولوژیکی و کشت در شرایط آزمایشگاهی به دست آمد. حجم تومور با استفاده از فرمول زیر محاسبه شد.

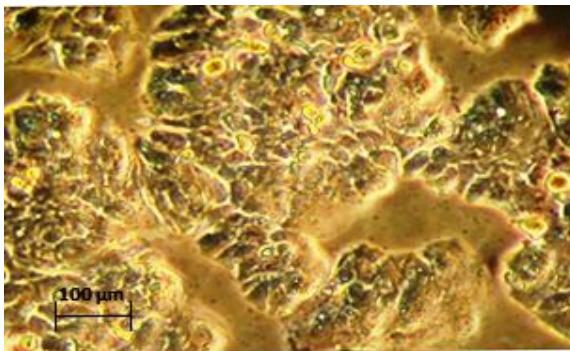
$$2 / (\text{قطر بزرگ}) \times (\text{قطر کوچک})^2 = \text{حجم تومور}$$

### آنالیز آماری

اطلاعات به صورت میانگین  $\pm$  انحراف معیار ارائه گردید. از تست paired t-test برای محاسبه تغییرات میزان بیان ژن ها و شاخص ها بین گروه ها استفاده شد. تجزیه و تحلیل آماری با استفاده از GraphPad Prism نسخه 3 انجام شد. همه تست ها به صورت تکرار سه تایی و سطح معنی داری نیز کمتر از 0/05 در نظر گرفته شد.

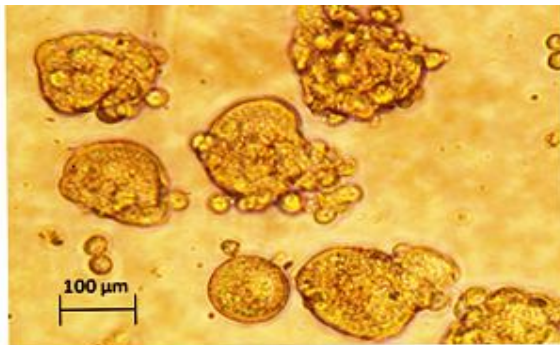
### یافته ها

#### تشکیل و شناسایی کلنی های اسفرویدی

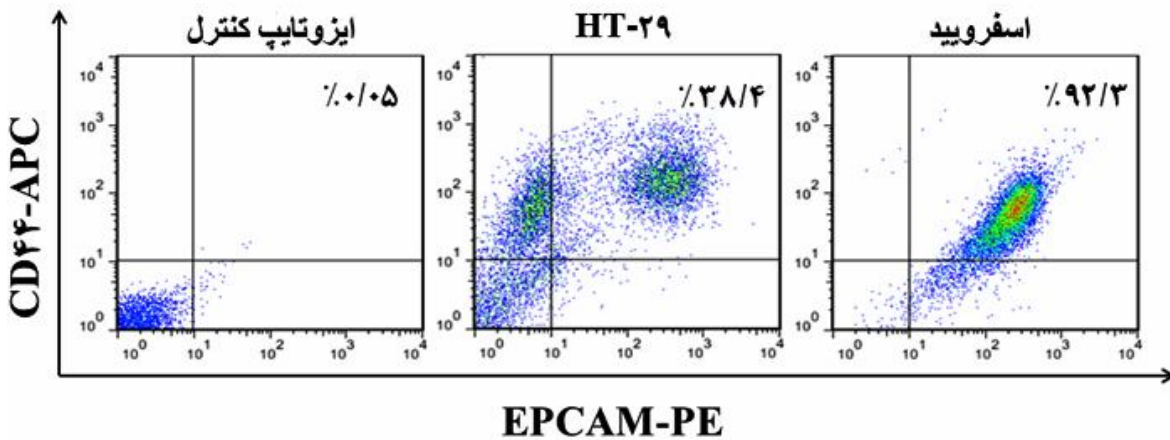


ب

شکل 1. تشکیل سلول های اسفرویدی از رده سلولی HT-29. الف) سلول های سرطانی کولون در شرایط آزمایشگاهی به صورت اسفروید های غیر متمایز در محیط فاقد سرم و حاوی فاکتورهای رشد فیبروبلاستی و اپیدرمی رشد می کنند. ب) سلول های اسفرویدی در حضور سرم جنین گاوی 10 درصد و فقدان فاکتورهای رشد به سلول های چسبنده و متمایز تبدیل می شوند. (میکروسکوپ معکوس، بزرگنمایی 200X)



الف

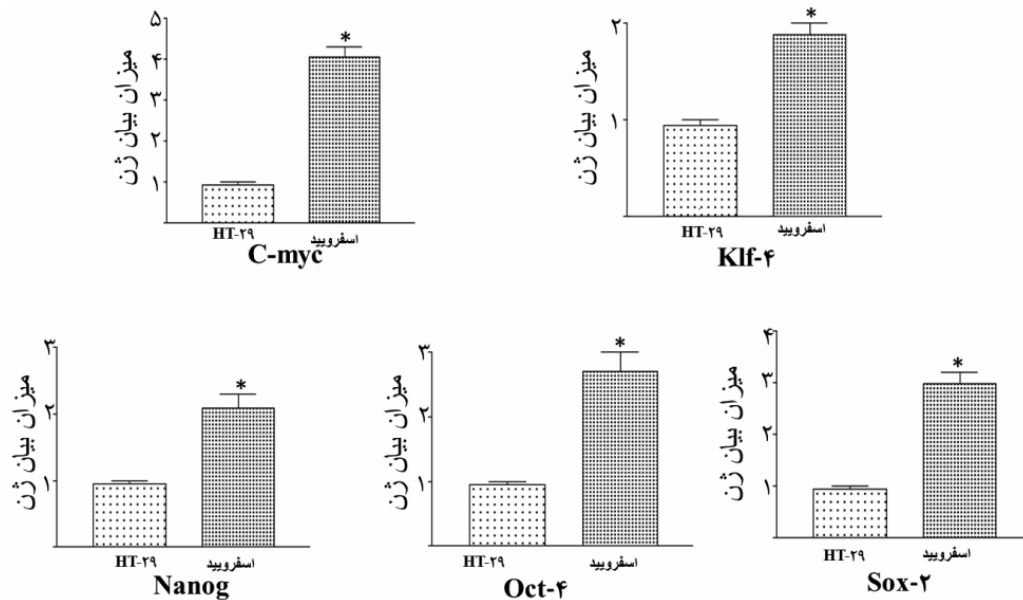


شکل 2. تصاویر آنالیزهای فلوسیتومتری نشان دهنده سلول های  $EPCAM^+ / CD44^+$  در سلول های اسفرویدی و HT-29 می باشد که نشان می دهد اسفرویدها به صورت معنی داری شاخص های  $EPCAM / CD44$  را نسبت به HT-29 بیشتر بیان می کنند.

### اسفرویدها ویژگی های سلول های بنیادی سرطانی را نشان می دهند

جهت مطالعه ویژگی های مولکولی سلول های بنیادی سرطانی کولون بیان ژن هایی که مرتبط با مسیرهای سلول های بنیادی هستند، در سلول های اسفرویدی و سلول های HT-29 به وسیله RT-PCR بررسی شدند. همان طور که در نمودار 1 نشان داده شده است در مقایسه با سلول های HT-29 میزان بیان ژن های Sox2، Oct4، Nanog، Klf4 و C-myc به طور معنی داری ( $p < 0/05$ ) در سلول های اسفرویدی افزایش می یابند (نمودار 1).

اسفرویدها توانایی ایجاد تومور را نشان می دهند برای تعیین توانایی تومورزایی اسفرویدها در مقایسه با سلول های HT-29، موش های nude به صورت زیرجلدی تحت تزریق قرار گرفتند. نتایج نشان داد اسفرویدها در مقایسه با سلول های HT-29 خاصیت تومورزایی بیشتری را نشان می دهند به طوری که فقط 2500 سلول اسفرویدی برای ایجاد و رشد تومور کافی می باشد، در حالی که  $1 \times 10^6$  سلول HT-29 قادر به تشکیل تومور در موش های nude می باشند (جدول 2).



نمودار 1. بیان ژن‌های مرتبط با چند قوه زایی سلول‌های بنیادی در سلول‌های اسفرویدی و HT-29. میزان بیان ژن‌های Sox 2, 4, Nanog, Oct, Klf4 و C-myc به صورت معنی‌داری در سلول‌های اسفرویدی افزایش نشان می‌دهد ( $p < 0/05$ ).

سلول‌های اسفرویدی غنی از سلول‌های بنیادی سرطانی در تعداد بسیار کم قادر به القاء تومور در موش‌های nude می‌باشند در حالی که  $1 \times 10^6$  سلول HT-29 توانایی القاء تومور را داشتند.

شواهد فراوانی این واقعیت را که سلول‌های بنیادی سرطانی ممکن است مشتقا سرطان‌های انسانی از جمله سرطان کولون باشد را تایید می‌کنند. جداسازی سلول‌های سرطانی از بیماران مبتلا به سرطان با محدودیت‌هایی از قبیل ناهمگن بودن و تغییر پذیری بالا همراه می‌باشد. از این رو رده‌های سلولی سرطانی انسانی می‌توانند به عنوان منابع سلولی با ارزشی با ثبات ژنتیکی و قابلیت تجدید شوندگی برای مطالعه خصوصیات اساسی سلول‌های بنیادی سرطانی در نظر گرفته شوند (9, 10). علاوه بر این از آنجایی که سرطان کولون در 95 درصد موارد از نوع آدنوکارسینوم می‌باشد رده سلولی آدنوکارسینوم کولون انسانی HT-29 به عنوان مدل در این مطالعه انتخاب گردید.

در این مطالعه با استفاده از ترکیبی از روش‌های کشت سلولی و بررسی شاخص‌های سطح سلولی، سلول‌های بنیادی سرطانی در رده سلولی مشتق از سرطان کولون شناسایی و خصوصیات آنها مورد بررسی قرار داده شد. یکی

جدول 2. توانایی تومورزایی سلول‌های اسفرویدی و سلول‌های HT-29 در موش‌های nude

نوع سلول	تعداد سلول‌های تزریق شده	تشکیل تومور از پیوند های زونگرافت	تشکیل سلول‌های اسفرویدی
سلول‌های اسفرویدی	$2/5 \times 10^3$	2/2	بله
سلول‌های HT-29	$5 \times 10^5$	2/2	بله
	$5 \times 10^5$	0/2	-
	$1 \times 10^6$	2/2	بله

## بحث

در مطالعه حاضر با استفاده از روش‌های برون تنی و درون تنی سلول‌های بنیادی سرطانی کولون در رده سلولی HT-29 شناسایی شد. کلنی‌های اسفرویدی مشتق از سلول‌های HT-29 که در شرایط فاقد سرم و در حضور فاکتورهای رشد تشکیل شدند افزایش بیان شاخص‌های سلول‌های بنیادی CD 44 و EPCAM را به طور معنی‌داری نسبت به سلول‌های HT-29 نشان دادند. هم‌چنین بیان ژن‌های اختصاصی سلول‌های بنیادی شامل Sox2, Oct4, Nanog, Klf4 و C-myc در اسفرویدها در مقایسه با سلول‌های HT-29 به طور قابل ملاحظه‌ای افزایش نشان داد. علاوه بر این در شرایط درون تنی یافته‌ها نشان داد

از ویژگی های سلول های بنیادی سرطانی مشتق از تومور که اخیرا گزارش شده است توانایی رشد آنها به صورت کلنی های اسفرویدی تحت شرایط غیرچسبان در محیط کشت فاقد سرم همراه با فاکتورهای رشد در شرایط آزمایشگاهی می باشد (11). روش تشکیل کلنی های اسفرویدی با هدف رشد و مطالعه سلول های بنیادی سرطانی برای نوروسفرها (neurospheres)، ماموسفرها (mammospheres) و کولونوسفرها (colonospheres) گزارش شده است (4، 12، 13). در این تحقیق در راستای مطالعات گذشته، با استفاده از روش تشکیل اسفروید، نشان داده شد سلول های سرطانی HT-29 تحت شرایط فاقد سرم توانایی رشد به صورت کلنی های اسفرویدی را دارند و در حضور 10 درصد سرم جنین گاوی متمایز می شوند که نشان دهنده قابلیت خود تجدید شونگی و توانایی تمایز این سلول ها می باشد.

طبق یافته های به دست آمده، کلنی های اسفرویدی مشتق از رده سلولی HT-29 برای سلول هایی که شاخص های سطحی سلول های بنیادی سرطانی را بیان می کنند غنی بودند. یکی از ویژگی های سلول های بنیادی که به طور گسترده پذیرفته شده است شامل بیان آنتی ژن های سلول های بنیادی، سیکل سلولی کند و تمایز محدود یا تمایز زدایی تحت اثر ریز محیط می باشد (14). اخیرا سلول های بنیادی سرطانی کولون به وسیله بیان شاخص های سطح سلولی از جمله CD44، CD166، CDLGR، EPCAM، ALDH 1 و CD133 مشخص شده اند (15-17). کلنی های اسفرویدی تشکیل شده از سلول های HT-29 بیان افزایش یافته ای از شاخص سلول های بنیادی سرطانی کولون، CD44، همراه با شاخص اپی تلایالی EPCAM را در مقایسه با سلول های HT-29 نشان می دهند. این مشاهدات که بیش از 92 درصد اسفرویدهای مشتق از سلول های HT-29 شاخص های CD 44 و EPCAM را بیان می کنند که به عنوان شاخص هایی برای سلول های بنیادی سرطانی کولون پذیرفته شده است به طور مستدلی نشان می دهند که اسفرویدهای تشکیل شده تحت شرایط فاقد سرم عمدتا از

سلول های بنیادی سرطانی تشکیل شده اند. در همین راستا، یانگ و همکاران نشان دادند که جداسازی سلول های  $CD44^+/CD24^-$  از رده های سلولی HT-29 و SW1222 غنی از سلول های بنیادی سرطانی کولون می باشند که توانایی خود تجدید شونگی در شرایط آزمایشگاهی را نشان می دهند و فقط 200 سلول با این ویژگی ها توانایی تومورزایی در موش های NOD/SCID را دارا می باشند. اگرچه جمعیت سلولی  $CD44^+/CD24^-$  به میزان جزئی توانایی کلونوژنیک کمتری نسبت به جمعیت سلولی  $CD44^+/CD24^+$  نشان می داد اما بر این عقیده هستند که سلول های CD 44 اهمیت تعیین کننده ای برای غنی کردن سلول های بنیادی سرطانی دارد، به طوری که حذف CD44 از طریق siRNA در سلول های سرطانی کولون با سرکوب رشد تومور در زئوگرافت در موش های nude همراه می باشد (14). هم چنین در مطالعه دیگری، کانوار و همکاران نشان دادند که کلنی های اسفرویدی حاصل از رده های سلولی کولونی HT-29 و HCT-116 افزایش معنی داری در بیان شاخص های سلول های بنیادی سرطانی کولون شامل CD44، EPCAM، Musashi-1، و LGR-5 در مقایسه با جمعیت سلول های غیر اسفرویدی نشان می دهند (18).

مطالعات انجام شده روی سلول های بنیادی مطرح می کنند که بیان ژن هایی از قبیل Sox2، Wnt 2، Oct4، ABCGNanog2، Klf4، CXCR4، و C-myc برای حفظ ویژگی های اختصاصی سلول های بنیادی ضروری می باشد. هم چنین دخالت بسیاری از این شاخص های مولکولی در تعیین خصوصیات اساسی سلول های بنیادی سرطانی انسانی مورد مطالعه قرار گرفته است. نتایج حاصل از این تحقیق نیز نشان داد کلنی های اسفرویدی مشتق از سلول های HT-29 به طور قابل ملاحظه ای بیان افزایش یافته ای از ژن های دخیل در چند قوه زایی (pluripotency) شامل Sox2، OctNanog4، Klf4، و C-myc را در مقایسه با سلول های HT-29 دارا می باشند.

اسفرویدهای مشتق از سلول های HT-29 علاوه بر این که در شرایط درون آزمایشگاهی ویژگی های



- originates from a primitive hematopoietic cell. *Nature medicine*. 1997;3(7):730-7.
3. Vermeulen L, Felipe De Sousa EM, van der Heijden M, Cameron K, de Jong JH, Borovski T, et al. Wnt activity defines colon cancer stem cells and is regulated by the microenvironment. *Nature cell biology*. 2010;12(5):468-76.
  4. Ricci-Vitiani L, Lombardi DG, Pilozzi E, Biffoni M, Todaro M, Peschle C, et al. Identification and expansion of human colon-cancer-initiating cells. *Nature*. 2006; 445(7123): 111-5.
  5. O'Brien CA, Pollett A, Gallinger S, Dick JE. A human colon cancer cell capable of initiating tumour growth in immunodeficient mice. *Nature*. 2006;445(7123):106-10.
  6. Liu Y, Bodmer WF. Analysis of P53 mutations and their expression in 56 colorectal cancer cell lines. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2006;103(4):976-81.
  7. Volchenbom SL, Li C, Li S, Attiyeh EF, Reynolds CP, Maris JM, et al. Comparison of primary neuroblastoma tumors and derivative early-passage cell lines using genome-wide single nucleotide polymorphism array analysis. *Cancer research*. 2009;69(10):4143-9.
  8. Douglas EJ, Fiegler H, Rowan A, Halford S, Bicknell DC, Bodmer W, et al. Array comparative genomic hybridization analysis of colorectal cancer cell lines and primary carcinomas. *Cancer research*. 2004; 64(14): 4817-25.
  9. Siegel R, Naishadham D, Jemal A. *Cancer statistics, 2012*. CA: a cancer journal for clinicians. 2012;62(1):10-29.
  10. Khalek FJA, Gallicano GI, Mishra L. Colon cancer stem cells. *Gastrointestinal cancer research: GCR*. 2010(Suppl 1):S16-23.
  11. Sukach A, Ivanov E. Formation of spherical colonies as a property of stem cells. *Cell and Tissue Biology*. 2007;1(6):476-81.
  12. Singh SK, Clarke ID, Terasaki M, Bonn VE, Hawkins C, Squire J, et al. Identification of a cancer stem cell in human brain tumors. *Cancer research*. 2003;63(18):5821-8.
  13. Kakarala M, Brenner DE, Korkaya H, Cheng C, Tazi K, Ginestier C, et al. Targeting breast stem cells with the cancer preventive compounds curcumin and piperine. *Breast*

سلول های بنیادی را نشان می دادند در مطالعه ای که روی موش های nude جهت ارزیابی توانایی تومورزایی صورت گرفت نتایج مشابهی را نشان دادند، به طوری که تعداد محدودی از کلنی های اسفرویدی (2500 سلول) قادر به تشکیل تومور در موش های nude بودند در حالی که سلول های HT-29 در تعداد  $1 \times 10^6$  توانایی القاء تومور را نشان می دادند. تومورهای القاء شده ویژگی های مورفولوژیکی آدنوکارسینوم را در دو گروه نشان می دادند. مشابه نتایج این مطالعه، تودارو و همکاران نشان دادند که تعداد 500 سلول اسفرویدی تشکیل شده از بافت توموری انسانی برای رشد تومور کافی است در حالی که تعداد  $10^6 \times 2$  سلول غیر اسفرویدی توانایی القاء تومور را ندارند (19).

### نتیجه گیری

به طور کلی یافته ها نشان می دهند که نه تنها سلول های بنیادی سرطانی در رده سلولی سرطانی کولونی HT-29 وجود دارد بلکه کلنی های اسفرویدی غنی از سلول هایی هستند که خصوصیات سلول های بنیادی سرطانی کولون را نشان می دهند. از این رو به نظر می رسد تکنیک تشکیل کلنی های اسفرویدی در شرایط آزمایشگاهی جهت غنی کردن سلول های بنیادی سرطانی یا به عنوان جایگزینی برای تشکیل تومور می تواند روش مفیدی باشد.

### تشکر و قدردانی

از آزمایشگاه حیوانات بیمارستان امام خمینی تهران جهت فراهم کردن موش های Nude تشکر و قدردانی می نمایم. این مطالعه با حمایت مالی دانشگاه تربیت مدرس و پژوهشکده بیماری های گوارشی دانشگاه علوم پزشکی تهران انجام گردید.

### منابع

1. Jordan CT, Guzman ML, Noble M. Cancer stem cells. *New England Journal of Medicine*. 2006; 355(12):1253-61.
2. Bonnet D, Dick JE. Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that

- cancer research and treatment. 2010; 122(3): 777-85.
14. Yeung TM, Gandhi SC, Wilding JL, Muschel R, Bodmer WF. Cancer stem cells from colorectal cancer-derived cell lines. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2010;107(8):3722-7.
15. Dalerba P, Dylla SJ, Park I-K, Liu R, Wang X, Cho RW, et al. Phenotypic characterization of human colorectal cancer stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2007; 104(24):10158-63.
16. Klonisch T, Wiehac E, Hombach-Klonisch S, Ande SR, Wesselborg S, Schulze-Osthoff K, et al. Cancer stem cell markers in common cancers—therapeutic implications. *Trends in molecular medicine*. 2008;14(10):450-60.
17. Huang EH, Hynes MJ, Zhang T, Ginestier C, Dontu G, Appelman H, et al. Aldehyde dehydrogenase 1 is a marker for normal and malignant human colonic stem cells (SC) and tracks SC overpopulation during colon tumorigenesis. *Cancer research*. 2009; 69(8): 3382-9.
18. Kanwar SS, Yu Y, Nautiyal J, Patel BB, Majumdar AP. The Wnt/ $\beta$ -catenin pathway regulates growth and maintenance of colonospheres. *Molecular cancer*. 2010; 9(1): 212-3.
19. Todaro M, Alea MP, Di Stefano AB, Cammareri P, Vermeulen L, Iovino F, et al. Colon cancer stem cells dictate tumor growth and resist cell death by production of interleukin-4. *Cell stem cell*. 2007;1(4):389-402.