

Paracrine effect of normal fibroblasts on phenotypic and molecular characteristics of cancer stem cells in luminal and basal subtypes of breast cancer

Fakhrosadat Sajjadian¹, Melika Izadpanah¹, Kobra Velaei^{1,2*}

¹Department of Anatomical Sciences, Faculty of Medicine, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran

²Immunology Research Center, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran

ARTICLE INFO

Article History:

Received: 14 Oct 2025

Revised: 16 May 2026

Accepted: 19 May 2026

ePublished: 11 Jul 2026

Keywords:

- Cancer-associated fibroblasts
- Cancer stem cells
- Luminal breast cancer
- Normal fibroblasts
- Basal breast cancer

Abstract

Background. Breast cancer progression is influenced not only by malignant cells but also by the tumor microenvironment. Fibroblasts, as important stromal components, regulate cancer cell behavior through paracrine signaling. Although cancer-associated fibroblasts are generally linked to tumor progression, the role of normal fibroblasts remains unclear. This study investigated the effects of conditioned medium derived from human normal fibroblasts on stemness characteristics in luminal and basal breast cancer cell lines.

Methods. MCF-7 (luminal) and MDA-MB-231 (basal) breast cancer cells were cultured for 7 days in conditioned medium obtained from human foreskin fibroblasts (HFF2). Stemness-related markers, including OCT4, SOX2, NANOG, ALDH1, and CD44+/CD24-, were evaluated using real-time PCR, Western blotting, and flow cytometry. Additionally, mammosphere formation, morphological analysis, and scratch wound-healing assays were performed to assess self-renewal ability and invasive potential.

Results. Treatment with fibroblast-conditioned medium significantly reduced the expression of OCT4, SOX2, NANOG, and ALDH1 in both cell lines, especially in the basal subtype. The size and number of mammospheres decreased in MCF-7 cells, while MDA-MB-231 cells formed smaller but more numerous mammospheres. Morphological analysis showed a shift toward a more epithelial phenotype, and scratch assays demonstrated reduced migration and invasion. The CD44+/CD24- population increased, which is likely related to selective survival under stress conditions.

Conclusion. The findings suggest that normal fibroblasts can suppress stemness and invasive properties of breast cancer cells through paracrine mechanisms. These results highlight the potential therapeutic importance of targeting stromal interactions and fibroblast-mediated pathways in the treatment of breast cancer.

Practical Implications. These findings highlight the potential of targeting the tumor microenvironment, particularly fibroblasts, as a novel therapeutic strategy in breast cancer.

How to cite this article: Sajjadian F, Izadpanah M, Velaei K. Paracrine effect of normal fibroblasts on phenotypic and molecular characteristics of cancer stem cells in luminal and basal subtypes of breast cancer. *Med J Tabriz Uni Med Sciences*. 2026;48(3):203-216. doi: 10.34172/mj.026.35146. Persian.

*Corresponding author; Email: kobraelaei@gmail.com

© 2026 The Authors. This is an Open Access article published by Tabriz University of Medical Sciences under the terms of the Creative Commons Attribution CC BY 4.0 License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited

Extended Abstract

Background

Breast cancer is one of the most common malignancies worldwide and remains a major cause of cancer-related mortality among women. In recent years, increasing evidence has shown that tumor progression is not only dependent on malignant cells themselves but is also strongly influenced by the tumor microenvironment. Among the various stromal components, fibroblasts play an important role in regulating cancer behavior through direct interactions and paracrine signaling. While cancer-associated fibroblasts are generally linked to tumor progression and stemness, the role of normal fibroblasts remains controversial. Cancer stem cells are particularly important because they contribute to tumor initiation, metastasis, recurrence, and treatment resistance. Therefore, investigating the effects of normal fibroblasts on stemness-related properties in breast cancer cells may provide valuable insight into potential therapeutic strategies. This study aimed to evaluate the effect of conditioned medium derived from human normal fibroblasts on stemness characteristics of luminal and basal breast cancer cell lines.

Methods

In this in vitro experimental study, the effects of conditioned medium from human normal fibroblasts were investigated on stemness and invasiveness of breast cancer. Two breast cancer cell lines representing different molecular subtypes were selected: MCF-7 as a luminal subtype and MDA-MB-231 as a basal subtype. Human foreskin fibroblast cells (HFF2) were used to prepare fibroblast-conditioned medium. Breast cancer cells were cultured in this conditioned medium for 7 days to evaluate the paracrine effects of fibroblast-secreted factors. Several molecular and functional assays were conducted to assess stemness-related characteristics. The percentage of CD44⁺/CD24⁻ cells, which are recognized as cancer stem cell markers in breast cancer, was measured using flow cytometry. In addition, the expression of ALDH1, another important stemness marker, was analyzed

by Western blotting. Quantitative real-time PCR was also used to determine the expression levels of stemness-associated genes, including OCT4, SOX2, and NANOG. To evaluate self-renewal ability, mammosphere formation assays were conducted in both cell lines after treatment with fibroblast-conditioned medium. Both the number and size of mammospheres were assessed and compared with untreated control groups. Morphological changes were examined microscopically to identify shifts toward epithelial or mesenchymal phenotypes. Cell migration and invasion were evaluated using scratch wound-healing assays. The extent of scratch closure in treated cells was compared with control cells to determine changes in invasiveness. Through these combined analyses, the study aimed to comprehensively investigate whether secretory factors released by normal fibroblasts could alter stemness and aggressiveness of breast cancer cells.

Results

Treatment with conditioned medium derived from human normal fibroblasts produced significant biological changes in both luminal and basal breast cancer cell lines. One of the most important findings was the reduction in the expression of stemness-related genes, including OCT4, SOX2, and NANOG, in both MCF-7 and MDA-MB-231 cells. The decrease was more evident in the basal MDA-MB-231 cells, suggesting that basal breast cancer cells may respond more strongly to inhibitory factors secreted by normal fibroblasts. Similarly, ALDH1 expression was reduced in both cell lines following treatment, indicating suppression of stem cell-like properties. However, flow cytometry analysis demonstrated an increase in the proportion of CD44⁺/CD24⁻ cells after treatment in both cell lines. This result appeared inconsistent with the reduction observed in other stemness markers. The authors suggested that prolonged culture in conditioned medium may have caused nutrient stress and selective survival of resistant CD44⁺/CD24⁻ cells, resulting in their relative enrichment. Mammosphere formation

assays demonstrated subtype-specific effects. In MCF-7 luminal cells, both the number and size of mammospheres decreased, indicating reduced self-renewal capacity. In contrast, MDA-MB-231 basal cells showed an increase in the number of mammospheres, although sphere size decreased. This finding may be related to the intrinsically higher proliferative capacity of basal cells despite suppression of stemness pathways. Morphological evaluation indicated that treated cells acquired a more epithelial and flattened appearance in both cell lines. Importantly, no evidence of transition toward a mesenchymal phenotype was observed. These findings suggested inhibition of epithelial-to-mesenchymal transition, a process associated with cancer invasion and metastasis. Consistent with these observations, scratch wound-healing assays revealed significantly reduced scratch closure in treated cells compared with controls, indicating decreased migration and invasive potential. The inhibitory effects observed in this study may result from suppression of signaling pathways involved in stem cell maintenance and tumor progression, including IL6/STAT3, TGF- β /SDF-1/PI3K, WNT/ β -catenin, HGF/c-MET, and SHH pathways.

Overall, the findings suggested that normal fibroblast-conditioned medium can suppress the expression of several stemness-associated genes and invasive properties of breast cancer cells.

Conclusion

This study demonstrated that conditioned medium derived from human normal fibroblasts can reduce important stemness and invasive characteristics in both luminal and basal breast cancer cell lines. Treatment suppressed the expression of key stemness-related genes and reduced migratory potential while promoting a more epithelial cellular phenotype. The proportion of CD44⁺/CD24⁻ cells increased, which is likely associated with selective survival under stress conditions rather than enhanced stemness. Overall, the results suggest that normal fibroblasts may exert anti-tumorigenic effects through paracrine interactions within the tumor microenvironment. These findings highlight the therapeutic potential of targeting stromal interactions and fibroblast-mediated signaling pathways in breast cancer treatment.

اثر پاراکرینی فیروبلست نرمال بر ویژگی‌های فنوتیپی و مولکولی سلول‌های بنیادی سرطان در زیر گروه‌های لومینال و بازال سرطان پستان

فخرالسادات سجادیان^۱، ملیکا ایزدپناه^۱، کبری ولانی^{۲*}

^۱گروه علوم تشریحی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران
^۲مرکز تحقیقات ایمونولوژی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران

چکیده

زمینه. پیشرفت سرطان پستان تنها به سلول‌های بدخیم وابسته نیست، بلکه ریزمحیط تومور نیز نقش مهمی در تنظیم رفتار سلول‌های سرطانی دارد. فیروبلست‌ها به عنوان یکی از اجزای اصلی استرومای تومور، از طریق پیام‌رسانی پاراکرین می‌توانند بر ویژگی‌های سلول‌های سرطانی تأثیر گذارند. اگرچه فیروبلست‌های وابسته به سرطان معمولاً با پیشرفت تومور مرتبط هستند، با این حال، نقش فیروبلست‌های طبیعی هنوز به طور کامل مشخص نشده است. این مطالعه به بررسی تأثیر ترشحات پاراکرینی فیروبلست‌های نرمال انسانی بر ویژگی‌های بنیادی در دو رده سلولی نوع بازال و لومینال می‌پردازد.

روش کار. در این مطالعه، دو زیر گروه لومینال (MCF-7) و بازال (MDA-MB-231) سرطان پستان با محیط کشت فیروبلست نرمال انسانی که از رده سلولی HFF2 حاصل شده بود، به مدت ۷ روز کشت داده شدند. سپس درصد جمعیت سلولی CD44+/CD24- و آنزیم ALDH1 به ترتیب با روش‌های فلوسیتومتری و وسترن بلات مورد بررسی قرار گرفتند. همچنین، میزان توانایی تشکیل ماموسفر در زیر گروه‌ها با استفاده از میکروسکوپ اینورت مورد ارزیابی قرار گرفت. میزان تهاجم سلولی از طریق Scratch assay، میزان تغییرات مورفولوژیکی-سلولی با روش factor shape و میزان بیان ژن‌های سلول‌های بنیادی سرطان به روش Real time-PCR مورد مطالعه قرار گرفت.

یافته‌ها. تیمار با محیط کشت حاصل از فیروبلست نرمال انسانی موجب کاهش معنی‌دار بیان SOX2، OCT4، NANOG و ALDH1 در هر دو رده سلولی شد که این کاهش در سلول‌های بازال بارزتر بود. در سلول‌های MCF-7 تعداد و اندازه ماموسفرها کاهش یافت؛ در حالی که در سلول‌های MDA-MB-231 علی‌رغم کاهش اندازه ماموسفرها، تعدادشان افزایش پیدا کرد. بررسی مورفولوژی سلولی نشان‌دهنده تغییر به سمت فنوتیپ اپی‌تلیالی بود. همچنین، درصد بسته شدن خراش برای ارزیابی میزان تهاجم، در هر دو رده سلولی در مقایسه با گروه کنترل کاهش معناداری داشت. در بررسی درصد جمعیت سلولی CD44+/CD24- نیز در هر دو رده سلولی MCF-7 و MDA-MB-231 پس از هم‌کشتی افزایش این جمعیت نادر سلولی گزارش شد.

نتیجه‌گیری. نتایج این مطالعه نشان داد که فیروبلست‌های طبیعی می‌توانند از طریق مکانیسم‌های پاراکرین، ویژگی‌های stemness و تهاجمی سلول‌های سرطان پستان را مهار کنند. این یافته‌ها اهمیت بالقوه هدف‌گیری برهم‌کنش‌های استرومایی و مسیرهای وابسته به فیروبلست را در درمان سرطان پستان برجسته می‌کند.

پیامدهای عملی. یافته‌های این پژوهش می‌تواند چشم‌اندازی نوین برای هدف‌گیری ریزمحیط تومور، به ویژه فیروبلست‌ها، در درمان انواع سرطان پستان ترسیم کند.

اطلاعات مقاله

سابقه مقاله:

دریافت: ۱۴۰۴/۷/۲۲
اصلاح نهایی: ۱۴۰۵/۲/۲۶
پذیرش: ۱۴۰۵/۲/۲۹
انتشار برخط: ۱۴۰۵/۳/۲۰

کلید واژه‌ها:

- فیروبلست‌های همراه سرطان
- سلول‌های بنیادی سرطان
- سرطان پستان لومینال
- فیروبلست نرمال
- سرطان پستان بازال

مقدمه

طبق آخرین آمار سازمان بهداشت جهانی در سال ۲۰۱۸، در حدود ۱۱۸ میلیون مورد جدید سرطان و ۶/۹ میلیون مرگ ناشی از سرطان اتفاق افتاده است. شایع‌ترین سرطان در هر دو جنس، سرطان ریه تشخیص داده شده است که ۱۱/۶ درصد از کل موارد را

*نویسنده مسؤول: ایمیل: kobravelaei@gmail.com

حق تألیف برای مؤلفان محفوظ است. این مقاله با دسترسی آزاد توسط دانشگاه علوم پزشکی تبریز تحت مجوز کپی‌رایت کامنز ۴.۰ (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0) منتشر شده که طبق مفاد آن هرگونه استفاده تنها در صورتی مجاز است که به اثر اصلی به نحو مقتضی استناد و ارجاع داده شده باشد.

سرطان (CSCs-Cancer StemLike Cells)، سلول‌های توموری هستند که توانایی خودنوسازی و تولید دودمان‌های ناهمگونی از سلول‌های سرطانی مولد تومور را دارند.^{۱۰} این جمعیت سلولی در انواع مختلف سرطان با ویژگی‌های متفاوتی از سایر سلول‌های سرطانی تمایز داده می‌شوند. سلول‌های بنیادی سرطان پستان (Breast Cancer Stem Cells or BCSCs) با بیان مارکرهای سطحی $ESA+ALDH+/CD44+/CD24-$ و فقدان بیان مارکرهای $CD31$ ، $CD18$ ، $CD16$ ، $CD10$ ، $CD3$ ، $CD2$ ، $CD140b$ ، $CD64$ توصیف می‌شوند. در بررسی زونگرافت سلول‌هایی با ویژگی $ESA+/CD44+/CD24-$ شناسایی شدند که منجر به افزایش تشکیل تومور و ناهمگونی فنوتیپی می‌شوند.^{۱۱} همچنین، بیان آلدئید دهیدروژناز برای تمایز سلول‌های بنیادی سرطانی پستان مورد توجه است. در واقع سلول‌های $ALDH^+$ در مقایسه با $ALDH^-$ توانایی تشکیل تومورهایی را دارند که از نظر ویژگی‌های فنوتیپی و ساختاری مشابه تومور اولیه (والد/ منشأ) است.^{۱۲} این مارکرها سبب بیان بیش از حد مسیر سیگنالینگ Hedgehog در فرایند خود تجدیدپذیری نیز می‌شود.^{۱۳} $NANOG$ ، $OCT4$ ، $C-Myc$ ، $SOX2$ و $KLF4$ ژن‌های تنظیمی سلول‌های بنیادی هستند که نقش مهمی در حفظ قابلیت تجدید سلول، تکثیر و تمایز سلول دارند. در مطالعه ونجلی، از وسترن بلات برای تشخیص بیان $C-Myc$ ، $OCT4$ ، $NANOG$ ، $SOX2$ استفاده شد.^{۱۴} نتایج مطالعه نشان داد که میزان بیان این ژن‌ها در CSC-MCF-7 به‌طور قابل توجهی بالاتر از MCF-7 بود. بنابراین سلول‌های سرطانی با بیان ژن‌های مذکور ویژگی‌های سلول بنیادی را خواهند داشت. ریز محیط غنی از فیبروبلاست‌های همراه سرطان با داشتن HGF (ligand for c-Met receptor)، CXCL12 (ligand for chemokine receptor CXCR4) سلول‌های سرطانی را به سمت مقاومت به درمان سوق می‌دهند.^{۱۵} یکی از ویژگی‌های اصلی سلول‌های بنیادی سرطان ایجاد مقاومت به درمان می‌باشد. کزت و همکاران نشان دادند که CAFها با بیان FGF5 و ترشح فیبریل‌های کلاژن، می‌توانند به عنوان بستر حمایتی برای ایجاد سلول‌های مقاوم به درمان با ویژگی‌های بنیادی عمل کنند.^{۱۶} مهارگیرنده Hedgehog در سلول‌های فیبروبلاست باعث افزایش حساسیت سلول‌های سرطانی پستان به داروی شیمی‌درمانی docetaxel شد. همچنین، ارتباط دو طرفه بین سلول‌های سرطانی و فیبروبلاست‌ها (ارتباط پاراکرینی و تماس سلول با سلول) از طریق مهار مسیرهای سیگنالینگ $TGF-\beta/SDF-IL6/STAT3$ ، WNT/β -catenin، $HGF/cMET$ ، SHH/Hh ، $1/PI3K$ توانسته است مانع ایجاد فنوتیپ بنیادی در سلول‌های سرطانی شود.^{۱۷} تقسیم‌بندی سلول‌های سرطان پستان بر اساس ویژگی‌های مولکولی، روشی کلیدی برای تمایز و شناسایی زیر گروه‌های

تشکیل می‌دهد؛ به دنبال آن سرطان پستان در زنان در رتبه دوم قرار دارد.^۱ سرطان پستان از نظر ژنتیکی و بالینی ناهمگن است. برای سازماندهی این ناهمگنی، سیستم‌های طبقه‌بندی سرطان پستان توسعه یافته است. زیر گروه‌های سرطان پستان بر اساس طبقه‌بندی مولکولی و بیان گیرنده‌های هورمونی، $ErbB2(HER2/neu)$ ، ER، PR به انواع زیر تقسیم می‌شود:^{۲،۳}

Luminal subtype A (ER^+ , $PR \geq 20\%$, $HER2^-$, $Ki67 < 20\%$)
Luminal subtype B (ER^+ , $PR < 20\%$ and/or $HER2^+$ and/or $Ki67 \geq 20\%$ Basal like ((triple negative: ER^- , PR^- , $HER2^-$)
 $ErbB2^+(ER^+, PR^-, HER2^+)$ or $HER2$ -overexpression
توده توموری صرفاً مجموعه‌ای از سلول‌های منفرد نیست، بلکه با محیط پیرامون خود که دربرگیرنده ریز محیط تومور می‌باشد دارای تعاملات دوطرفه است. تعاملات دوطرفه سلول‌های توموری با ماتریکس خارج سلولی (ECM)، ماکروفاژهای مرتبط با تومور (TAM)، فیبروبلاست‌های همراه سرطان (CAF)، سلول‌های بنیادی مزانشیمی (MSC) و سلول‌های اندوتلیال (EC) به اثبات رسیده است. این ارتباطات با کمک کموکاین‌ها، فاکتورهای رشد، ماتریکس متالوپروتئازها (MMP) و پروتئین‌های ECM برقرار شده و در نهایت منجر به تغییر رفتار و عملکرد سلول‌های توموری می‌گردد. از این رو، ریز محیط اعم از داخل توموری یا داخل پستانی از لحاظ پروفایل سلولی و مولکولی می‌تواند باعث شروع تغییرات نئوپلاستیک، متاستاز، همچنین محافظت سلول‌های توموری در مقابل سیستم ایمنی میزبان و یا حتی مقاومت به درمان شود.^۴ از میان انواع متفاوت سلول‌های حاضر در TME، فیبروبلاست‌ها هم در داخل تومور و نیز در داخل پستان بیشترین تعداد سلول را به خود اختصاص می‌دهند.^۵ منشأ فیبروبلاست‌های مرتبط با تومور (CAFs) می‌تواند بسته به نوع سرطان متفاوت باشد و در نتیجه منجر به ظهور انواع مختلفی از فیبروبلاست‌ها با ویژگی‌های مولکولی متفاوت شود. در برخی موارد، این سلول‌ها از سلول‌های پیش‌ساز مغز استخوان مشتق می‌شوند که به سمت ناحیه توموری در حال رشد جذب می‌گردند. با این حال، شواهدی وجود دارد که نشان می‌دهد CAFها ممکن است از سلول‌های اپیتلیالی یا فیبروبلاست‌های ساکن در بافت منشأ گرفته باشند که طی فرایند تمایز، به میوفیبروبلاست‌ها تبدیل شده‌اند. در تومورهای اپیتلیالی، فیبروبلاست‌ها عمدتاً از طریق ترشح فاکتورهای رشد و کموکاین‌ها منجر به ایجاد یک ماتریکس خارج سلولی تغییر یافته شده، سیگنال‌های تکثیر و متاستاز را افزایش داده و نهایتاً منجر به تحریک پیشرفت تومور شوند.^۶ بنابراین، امروزه در درمان سرطان نگاه خاص و ویژه‌ای به نقش و ویژگی‌های ریز محیط تومور می‌شود که یکی از اجزا شاخص ریز محیط توموری و داخل پستانی فیبروبلاست‌های نرمال هستند.^{۸،۹} سلول‌های بنیادی

شده و در تمام آزمایش‌ها در فاز لگاریتمی رشد هر دو رده سلولی به‌صورت جداگانه، مورد استفاده قرار گرفتند. به دلیل اینکه سلول‌ها به‌صورت چسبنده رشد کرده بودند، جهت جداسازی آن‌ها از ظروف کشت، از محلول ۲۵ درصد Trypsin/EDTA استفاده شد.

تهیه کاندیشن مدیوم

جهت تهیه کاندیشن مدیوم برای تیمار، از سلول‌های HFF-2 رده فیروبلست انسانی استفاده شد. به این منظور، ابتدا سلول‌های فیروبلست دفریز و سپس به داخل فلاسک ۷۵T منتقل گردید. پس از رسیدن به کانفلوئسی ۷۰ درصد، سلول‌ها با محیط کشت بدون FBS به مدت ۴۸ ساعت کشت داده شدند. پس از ۴۸ ساعت کشت با محیط کشت بدون سرم، محیط رویی بدون سلول و به‌صورت استریل جمع‌آوری شد. در نهایت، با دور ۱۳۰۰rpm به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ گردید. پس از فیلترکردن با فیلتر ۰/۲ میکرومتر، مدیوم حاصل داخل فالكون استریل منتقل و در صورت لزوم فریز گردید.

فلوسایتومتري

میزان بیان و عدم بیان هم‌زمان مارکرهای CD44+/CD24-، پس از هم‌کشتی سلول‌های سرطانی با محیط کشت فیروبلست نرمال با استفاده از روش فلوسایتومتري مورد مطالعه قرار گرفت. به منظور رنگ‌آمیزی با آنتی‌بادی CD44 و CD24 متصل به ماده فلورسنت، ابتدا سلول‌ها با Triton X نفوذپذیر و سپس با الکل ۷۰ درصد فیکس شدند و پس از انکوباسیون با آنتی‌بادی، میزان بیان هم‌زمان پروتئین‌های CD44+ و CD24- در سلول‌های سرطان پستان با دستگاه فلوسیتومتري بررسی شد. در نهایت، داده‌های به دست آمده با نرم‌افزار FLOWJO آنالیز شد.

وسترن بلات (Western blotting)

پس از تیمار ابتدا پروتئین‌های مورد نظر از نمونه‌ها استخراج گردید. پس از جداسازی پروتئین‌ها روی ژل با کمک الکتروفورز، انتقال پروتئین‌های جدا شده بر روی غشای نیتروسولوزی انجام گرفت. همچنین، پروتئین‌های غیراختصاصی برای جلوگیری از اتصالات غیراختصاصی آنتی‌بادی‌ها بلاک گردید. در مرحله بعد، انکوباسیون با آنتی‌بادی اولیه و سپس با آنتی‌بادی ثانویه انجام گرفت. در نهایت، پروتئین‌ها با کیت ECL advanced reagents آشکار شدند. ریل تایم پی‌سی‌آر (PCR): میزان کاهش یا افزایش بیان ژن‌های OCT4, SOX2, Nanog در رده‌های مختلف سرطان پستان پس از تیمار با مدیوم حاصل از سلول‌های فیروبلست با کمک Real time RTqPCR مورد بررسی قرار گرفت. میزان تغییر در

مختلف این بیماری است که با بیان ژن‌ها و بروز فنوتیپ‌های ویژه از هم تشخیص داده می‌شوند.^{۱۶} بر اساس نظریه سلول‌های بنیادی، سلول‌های سرطانی کمتر تمایز یافته مانند نوع بازال سرطان پستان در مقایسه با نوع لومینال، از سلول‌های بنیادی با درجه تمایز پایین‌تر منشأ می‌گیرند.^{۱۷} در این میان، ریز محیط تومور نقش اساسی در فرایند تکامل سلول‌های سرطانی پستان ایفا می‌کند. ارتباط پاراکرینی سلول‌های سرطانی دارای بیان platelet-derived growth factor (PDGF) با های دارای گیرنده آن، موجب بروز ویژگی‌های نوع بازال در سلول‌های سرطانی می‌گردد. از طرفی، مهار فعالیت PDGF باعث بیان گیرنده‌های هورمونی در نوع بازال (فاقد گیرنده) شده است.^{۱۸} همچنین، میزان بیان مارکرهای CD44+ و CD24- در نوع بازال نسبت به نوع لومینال به صورت قابل توجهی بیشتر است. از طرفی، بیان ALDH1 در این زیر گروه نیز در مقایسه با نوع لومینال و $HER2^{+}$ بالاتر است.^{۱۹} دو زیر گروه لومینال و بازال سرطان پستان به دلیل تفاوت‌های مولکولی و تمایزی، احتمالاً در پاسخ به تعامل با ریز محیط، رفتار متفاوتی از نظر بروز بیان ویژگی‌های بنیادی نشان می‌دهند. بسیاری از مطالعات نقش فیروبلست‌های همراه سرطان (فیروبلست سازش یافته با شرایط ریز محیط تومور) در القای ویژگی‌های بنیادی و ایجاد مقاومت به درمان را به اثبات رسانده است. تا به امروز تأثیر فیروبلست‌های نرمال بر ویژگی‌های بنیادی سلول‌های سرطانی پستان کمتر مورد مطالعه و بحث قرار گرفته است. بنابراین، برای روشن‌تر شدن نقش فیروبلست‌های نرمال به عنوان سلول‌های حاضر در ریز محیط تومور یا در بافت اطراف آن، مطالعه حاضر به بررسی اثر پاراکرینی این نوع فیروبلست‌ها بر ویژگی‌های سلول‌های بنیادی سرطان پستان پرداخته است. در این تحقیق، میزان بروز ویژگی‌های بنیادی از جمله درصد سلول‌های بنیادی، بیان ژن‌ها و پروتئین‌های بنیادی به همراه قدرت تهاجمی و تومورزایی سلول‌های سرطانی پس از هم‌کشتی با کاندیشن مدیوم فیروبلست‌های نرمال انسانی در زیر گروه‌های لومینال و بازال سرطان پستان مورد ارزیابی قرار گرفته است.

روش کار

کشت سلولی

سلول‌های MCF-7 و MDA-MB-231 در محیط کشت کامل حاوی ۱۰ درصد سرم جنین گاوی، ۱ درصد آنتی‌بیوتیک، ۱۰ درصد سدیم پیروات، ۲ گرم L-گلوتامین در یک انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، ۵ درصد دی‌اکسیدکربن و ۹۵ درصد رطوبت کشت داده شدند. سلول‌ها با غلظت اولیه 1×10^4 در میلی‌لیتر، پاساژ داده

۱۰X و ۴۰X مورد بررسی قرار گرفت. سپس میزان تغییرات مورفولوژیک سلول‌ها با اندازه‌گیری مساحت و محیط هر سلول در نرم‌افزار Image J با کمک فرمول زیر محاسبه گردید. قابل ذکر است که عدد حاصل (S= Shape factor) از این فرمول در دامنه ۰ تا ۱ قرار خواهد داشت. عدد ۱ بیانگر گرد بودن سلول‌ها (اپی تلیالی) و عدد زیر ۱ بیانگر دراز و کشیده شدن (مزانشیمی) سلول‌ها می‌باشد.

$$S = \frac{4\pi A}{P^2}$$

P = the cell perimeter
A = the area of the cell
[]=3.14

روش انجام Scratch Assay جهت بررسی میزان تهاجم سلول‌ها

ابتدا سلول‌های رده MCF-7 و MDA-MB231 (تعداد ۱۰^۵) پس از هفت روز تیمار با کاندیشن مدیوم حاصل از فیبروبلاست با حضور داروی دوکسوروبیسین در داخل پلیت‌های ۶ خانه برای انجام scratch assay آماده شدند. برای ایجاد scratch از سر سمپلر آبی استفاده شد. بلافاصله پس از ایجاد خراش مدیوم سلول‌ها تعویض و برای برداشتن دبری‌های سلولی با محلول PBS به تعداد سه بار هر پلیت به دقت شستشو داده شد. ارزیابی میزان تهاجم سلول‌ها در روز صفر و ۲۴ از پلیت‌ها در محل خراش تصویربرداری شد و سپس میزان تغییرات با کمک نرم‌افزار imageJ اندازه‌گیری گردید. برای محاسبه درصد wound closure از فرمول زیر استفاده شد:

$$\text{Rate of wound closure} = \frac{A_0 - A_t}{A_0} \times 100$$

تحلیل آماری

پس از تعیین نرمال بودن داده‌ها با کمک آزمون کولموگروف-اسمیرنوف (K-S)، از آزمون پارامتریک t-test در نرم‌افزار prism graph pad برای تعیین معنادار بودن تفاوت‌ها در گروه‌های مختلف استفاده شد. سطح معنی‌داری کمتر از ۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

میزان بیان آنزیم ALDH1 در سلول‌های MCF-7 و MDA-MB-231 پس از ۷ روز هم‌کشتی با محیط کشت حاصل از فیبروبلاست‌های نرمال انسانی مطابق شکل ۱-A اندازه‌گیری شد و ژن B-actine نیز به عنوان ژن کنترل داخلی مورد استفاده قرار گرفت. نتایج با گروه کنترل مقایسه شد که در هر دو رده MCF-7 و MDA-MB-231 کاهش را در بیان آنزیم ALDH1 نشان داد. با کاهش بیان آنزیم ALDH1 به عنوان مارکر سلول‌های بنیادی سرطان پستان در گروه‌های تیمار هر دو رده لومینال و بازال،

بیان ژن‌ها در رده‌های مختلف با گروه کنترل مقایسه شد. جهت استخراج RNA از ستون‌های سیلیکونی شرکت یکتا تجهیز آزما استفاده شد. پس از استخراج integrity با روش ران روی ژل و غلظت RNA با روش اسپکتروفتومتری بررسی شد. به دنبال آن از روی RNA، cDNA ساخته شد. در این مرحله از میکروتیوب‌های Lyophilize شده استفاده گردید که پس از اضافه شدن RNA و پرایمرهای الیگو dt و رندم هگزامر میکروتیوب‌ها جهت سنتز cDNA در سیکل‌های دمایی طبق پروتکل شرکت سازنده قرار گرفت. در نهایت، با کمک SYBER green master mix واکنش PCR در سه دمایی مختلف denaturation، annealing و extension در چهل سیکل متناوب در دستگاه Corbett انجام گرفت. بر اساس Ct‌های حاصل از مرحله PCR با کمک فرمول فافل، میزان افزایش یا بیان هر ژن نسبت به گروه کنترل مشخص شد.

ماموسفر فرمیشن یا تست کلونی‌زایی

برای این منظور در داخل هر ول از دو لایه ژل استفاده شد. لایه زیری فاقد سلول با نیم درصد ژل و لایه رویی با ۰/۰۴ درصد ژل آگاروز به همراه سلول بود. ابتدا آگاروز ۱ درصد با مدیوم فاقد سرم تهیه شد. پس از اتو کلاو آگاروز با مقدار هم حجم مدیوم حاوی سرم ۲۰ درصد مخلوط شد. در نهایت، به اندازه ۱/۵ میلی‌لیتر از محلول حاصل (آگاروز ۰/۵ درصد) کف هر خانه از پلیت ۶ خانه ریخته شد. سپس اجازه داده شد تا در زیر هود به مدت ۳۰ دقیقه، ژل کامل سفت شود. جهت آماده‌سازی لایه ژل رویی به همراه سلول به ترتیب بالا ابتدا آگاروز ۰/۸ درصد با مدیوم فاقد سرم تهیه شد. پس از اتو کلاو، آگاروز با مقدار هم حجم مدیوم (۱/۵) حاوی سرم ۲۰ درصد حاوی سلول مخلوط شد. در نهایت، برای هر ول با حدود ۱/۵ میلی‌لیتر از ژل آگاروز ۰/۴ مخلوط کرده حاوی ۵۰۰۰ سلول روی ژل ۰/۵ داخل ول ریخته شد. پس از سفت شدن ژل سطح آن با محیط کامل پوشانده شد. پس از گذشت مدت زمان ۱۴ روز، با رنگ‌آمیزی کریستال ویوله میزان کلونی‌های تشکیل شده در زیر میکروسکوپ شمارش شد. قابل ذکر است که مدیوم مورد استفاده در گروه‌های آزمایش حاوی ۳۰ درصد محیط کشت حاصل از فیبروبلاست بود و برای گروه کنترل از مدیوم استفاده شد.

روش محاسبه Shape Factor

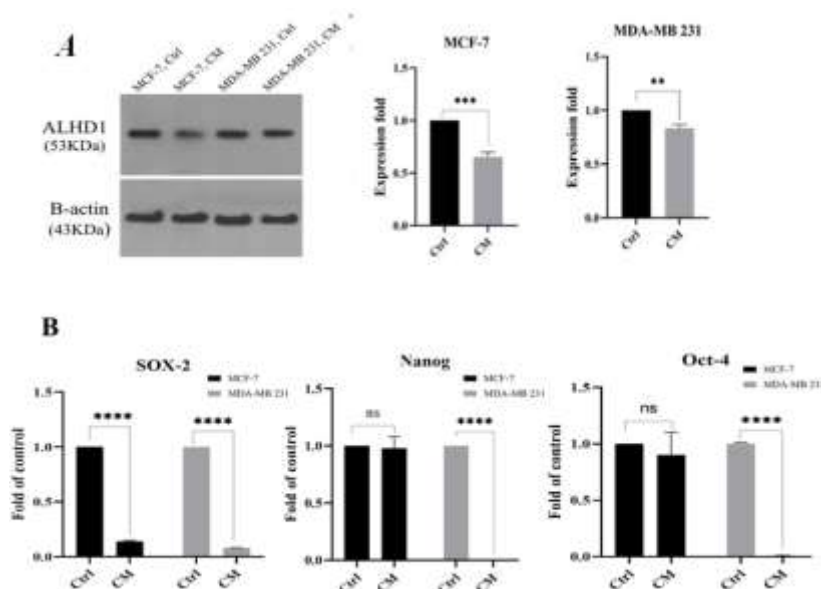
برای مقایسه تغییرات مورفولوژی حاصل از هم‌کشتی، دو رده سلولی سرطان پستان MCF-7 و MDA-MB-231 در پلیت ۶ خانه با کاندیشن مدیوم حاصل از فیبروبلاست‌ها تیمار گردید و پس از هم‌کشتی به مدت ۷ روز توسط میکروسکوپ نوری با بزرگنمایی

سلول‌های بنیادی CD44+/CD24- در نوع بازال (MDA-MB-231) در مقایسه با نوع لومینال (MCF-7) در هر دو گروه کنترل و کاندیشن مدیوم مقدار بالایی را نشان می‌دهد. این امر می‌تواند دلیل بر قدرت بالای نوع بازال (MDA-MB-231) در توانایی خودتجدیدی و تومورزایی باشد که به احتمال زیاد به علت تمایز کمتر رده بازال در مقایسه با رده لومینال است. به نظر می‌رسد تناقض این یافته با سایر یافته‌ها به دلیل مقاومت بالای این جمعیت در مقابل مرگ سلولی بوده است. این جمعیت نادر ۷ روز قدرت تاب‌آوری در محیط فاقد سرم را داشته‌اند و در نتیجه بعد از ۷ روز تیمار فقط با کاندیشن مدیوم و مرگ سلول‌های حساس سرطانی به کمبود مواد غذایی درصد این جمعیت را در گروه تیمار در هر دو رده بالا برده است. جهت بررسی میزان تشکیل ماموسفر به عنوان یکی از ویژگی‌های سلول‌های بنیادی، سلول‌های MCF-7 (رده لومینال) و MDA-MB-231 (رده بازال) به مدت ۷ روز با کاندیشن مدیوم هم‌کشتی داده شدند. سپس سلول‌های هر دو رده با مدیوم ماموسفر (مدیوم DMEM/F12 حاوی B27 2% و EGF 20ng/ml, FGF 10ng/ml) به مدت ۵ روز تیمار شدند. پس از شمارش ماموسفرها، اندازه ماموسفرها (ماموسفرهای بزرگتر از ۶۰ میکرومتر) نیز مورد مطالعه قرار گرفت. دو متغیر اندازه و تعداد بین دو گروه کاندیشن مدیوم و کنترل مورد مقایسه قرار گرفتند. رده سلولی MCF-7 (رده لومینال) در اندازه و تعداد ماموسفرها بین دو گروه کنترل و تیمار شده با کاندیشن مدیوم تفاوت معناداری نشان نداد (شکل B-2). همچنین، در رده MDA-MB-231 (بازال) از لحاظ آماری افزایش اندازه ماموسفرها بین گروه‌های کنترل و کاندیشن مدیوم تفاوت معناداری نشان نداد، با این حال، از نظر تعداد این افزایش به‌طور معناداری قابل توجه بود (شکل B-2). با توجه به قدرت تکثیر بالای سلول‌های رده بازال نسبت به رده لومینال می‌توان نتیجه گرفت که افزایش معنی‌دار تعداد ماموسفرها در رده بازال می‌تواند به دلیل قدرت بالای تکثیر این رده سلولی باشد که در پی تمایز کمتر این رده در مقایسه با رده لومینال است. در نهایت، می‌توان چنین استنباط کرد که تیمار با کاندیشن مدیوم حاصل از فیروبلاست‌های نرمال انسانی توان تشکیل ماموسفر یا تومورزایی را در هر دو رده لومینال و بازال به‌طور معناداری کاهش داده است. کاهش توان تومورزایی می‌تواند در نتیجه مهار کاهش بیان آنزیم ALDH1 که خود تحریک کننده مسیر سیگنالینگ Hedgehog است، باشد.^{۱۳} برای محاسبه تغییرات مورفولوژیکی سلول‌ها پس از تیمار با محیط کشت فیروبلاست نرمال از فرمول shape factor استفاده گردید. این فرمول میزان گرد یا کشیده بودن مورفولوژی سلول‌ها را مشخص می‌نماید. تصاویر میکروسکوپی به دست

می‌توان چنین استنباط کرد که تیمار با محیط کشت فیروبلاست نرمال با کاهش بیان این آنزیم، ویژگی‌های بنیادی را در این رده‌ها کاهش داده است. از میان ژن‌های مرتبط با ویژگی‌های سلول‌های بنیادی سه ژن Oct4، Sox2، Nanog که در مطالعات گسترده‌ای به عنوان ژن‌های بنیادی معرفی شده بودند، انتخاب گردیدند. میزان بیان سه ژن Oct4، Sox2، Nanog در سلول‌های MCF-7 و MDA-MB-231 تیمار شده با محیط کشت حاصل از فیروبلاست اندازه‌گیری و سپس با گروه کنترل مقایسه شد. میزان بیان Sox-۲ در رده سلول‌های MCF-7 در مقایسه با گروه تیمار شده با محیط کشت فیروبلاستی، کاهش بیان از ۱ به ۰/۲ و نیز در رده MDA-MB-231 کاهش بیان قابل توجهی را از ۱ به ۰/۱ نشان داد (شکل B-۱). همچنین، میزان بیان ژن Nanog در سلول‌های MCF-7 و MDA-MB-231 تیمار شده با کاندیشن مدیوم حاصل از فیروبلاست نرمال انسانی اندازه‌گیری شد و با گروه کنترل مقایسه گردید. این میزان بیان Nanog در رده سلولی MCF-7 کاهش مختصری را پس از هم‌کشتی نشان می‌دهد، در حالی که در رده سلول‌های MDA-MB-231 کاهش بسیار زیادی از بیان ژن را نسبت به گروه کنترل خود نشان داد (شکل B-۱). میزان بیان ژن Oct4 در رده سلولی MCF-7 یک کاهش بیان از ۱ به ۰/۸ را پس از هم‌کشتی نشان داد. همچنین، رده سلول‌های MDA-MB-231 کاهش در بیان ژن Oct4 را نشان داد. به طور کلی یافته‌های حاصل از بررسی بیان ژن‌های بنیادی در هر دو رده سلولی لومینال و بازال پس از تیمار با محیط کشت حاصل از فیروبلاست نرمال انسانی، کاهش در میزان بیان هر سه ژن Oct4، Sox2، Nanog را نشان می‌دهد (شکل B-۱). بنابراین، می‌توان نتیجه‌گیری کرد که تیمار با کاندیشن مدیوم منجر به کاهش ویژگی‌های بنیادی سرطان در سطح بیان ژن در هر دو رده سلولی شده است. کاهش ویژگی‌های بنیادی به دنبال تأثیر سکروتوم فیروبلاست نرمال انسانی می‌تواند از طریق مهار مسیرهای سیگنالینگ رشد و تشکیل سلول‌های بنیادی باشد. درصد سلول‌های بنیادی سرطان پستان (CD44+/CD24-) در رده MCF-7 و MDA-MB-231 پس از ۷ روز هم‌کشتی با کاندیشن مدیوم حاصل از فیروبلاست نرمال انسانی تیمار شده با کمک روش فلوسیتومتری اندازه‌گیری شد. مطابق با نتایج به دست آمده (شکل A-۲)، جمعیت سلول‌های بنیادی CD44+/CD24- در رده لومینال (MCF-7) سرطان پستان از ۰/۲ درصد به حدود ۰/۷۵ درصد افزایش یافت که از لحاظ آماری معنادار بود. مطابق با نمودار (شکل A-2) درصد جمعیت سلولی CD44+/CD24- در گروه کاندیشن مدیوم در مقایسه با گروه کنترل در سلول‌های بازال (MDA-MB-231) نیز افزایش قابل توجهی داشت که این جمعیت سلولی پس از تیمار از ۱۹ درصد به ۵۰ درصد رسید. جمعیت

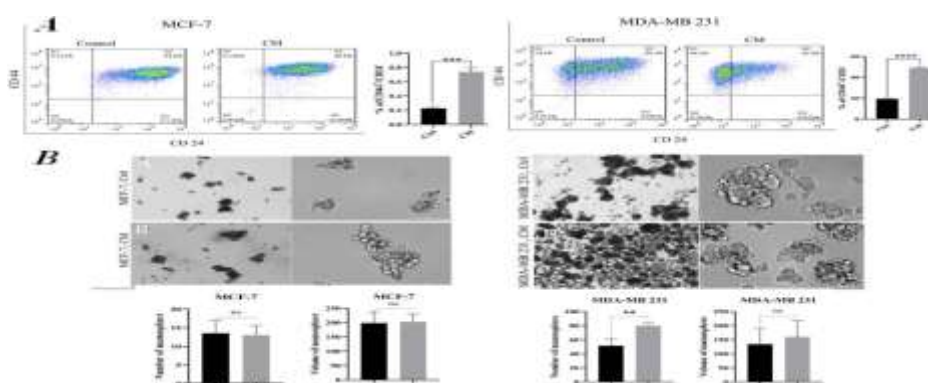
تمایل به دوکی شکل شدن یا تغییرات اپی‌تلیالی به مزانشیمی که شروعی بر تهاجم است را نشان نمی‌دهد. به‌طور کلی، سلول‌ها تمایل به پهن شدن و حالت کمتر تهاجمی را دارند. جهت بررسی میزان تهاجم، پس از ۷ روز تیمار با نوک سمپلر آبی کف پلیت خراش عمودی ایجاد شد. سپس از هر دو رده تصاویر میکروسکوپی در زمان ایجاد و ۲۴ ساعت بعد از ایجاد گرفته شد. در نهایت، درصد بسته شدن خراش ایجاد شده محاسبه و بین گروه‌های کنترل و کاندیشن مدیوم در هر دو رده MCF-7 (لومینال) و MDA-MB-231 (بازال) مقایسه گردید. در رده MCF-7 (لومینال) میزان بسته‌شدن خراش (wound clousre) در مدت ۲۴ ساعت در گروه کنترل به طور میانگین ۵۰ درصد و در گروه تیمار با کاندیشن مدیوم ۳۲ درصد بود (شکل ۶-B و A). همچنین، در رده MDA-MB-231 (بازال) میزان بسته شدن خراش (wound clousre) در مدت ۲۴ ساعت در گروه کنترل به طور میانگین ۸۲ درصد و در گروه تیمار با کاندیشن مدیوم ۳۹ درصد بود (شکل ۶-C و D). مقایسه بین گروه‌ها در دو رده نشان دهنده آن است که پس از ۷ روز تیمار با فیروبلاست نرمال انسانی درصد یا میزان بسته‌شدن خراش در ۲۴ ساعت در گروه تیمار شده با کاندیشن مدیوم کمتر بوده است. این امر نشان دهنده مهار قدرت تهاجم با اثر کاندیشن مدیوم است.

آمده از میکروسکوپ نوری اینورت با کمک نرم‌افزار image آنالیز گردید. Shape factor به‌صورت میانگین برای سلول‌های MCF-7 و MDA-MB-231 در دو مرحله زمانی روز صفر و روز هفتم تیمار محاسبه گردید. میزان Shape factor بالاتر از ۱ نشان دهنده سلول‌های گرد اپی‌تلیالی و میزان کمتر از ۱ و نزدیکتر به صفر نشان‌دهنده سلول‌هایی با مورفولوژی مزانشیمی کشیده و دوکی شکل است. نتایج به دست آمده نشان داد با افزایش زمان تیمار سلول‌ها در هر دو رده تبدیل به سلول‌های اپی‌تلیالی با ظاهر پهن شدند. در گروه کنترل رده سلولی MCF-7 مقدار Shape factor روز صفر از ۰/۳ به ۰/۴۷ در روز هفتم افزایش داشت. همچنین، برای سلول‌های MCF-7 تیمار شده با کاندیشن مدیوم فیروبلاست نرمال افزایش Shape factor از ۰/۳۸ تا حدود ۰/۵ به ترتیب برای روز صفر و هفت را نشان داد (شکل ۳-ستون A). در گروه کنترل رده سلولی MDA-MB-231، هم در روز صفر و هم روز هفت، عدد Shape factor نزدیک به ۶ بود. برای سلول‌های MDA-MB-231 تیمار شده با کاندیشن فیروبلاست نرمال این عدد از ۰/۵۷ در روز صفر به ۰/۷۵ در روز هفت افزایش داشت (شکل ۳-ستون B). بدین ترتیب می‌توان نتیجه گرفت که هر دو رده سلول سرطانی پستان در مواجه ۷ روزه با کاندیشن مدیوم حاصل از فیروبلاست نرمال انسانی تغییرات مورفولوژیکی به سمت گرد شدن و اپی‌تلیالی (نزدیک شدن به عدد ۱) را نشان دادند. بنابراین، یافته‌ها

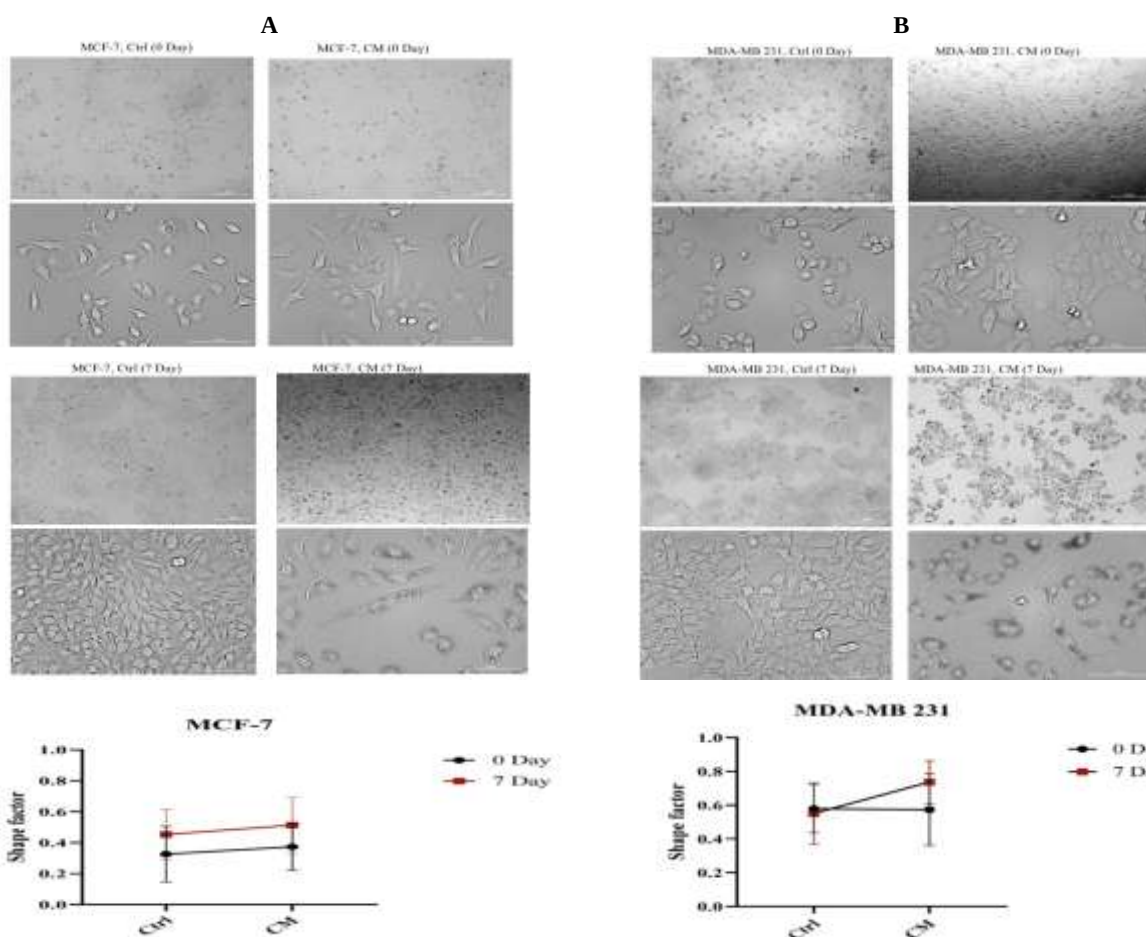


شکل ۱. A) مقایسه میزان بیان آنزیم ALDH1 در رده‌های سلولی MCF-7 و MDA-MB-231 پس از ۷ روز هم‌کشتی با محیط کشت حاصل از فیروبلاست‌های نرمال انسانی در سمت چپ. نمودار ستونی پس از کمی و نرمالیزه شدن پلات‌ها در دو رده سلولی MCF-7 و MDA-MB-231 بین گروه‌های تیمار و کنترل به صورت سه بار تکرار در سمت راست. **B)** نمودار ستونی مقایسه میزان بیان ژن‌های Oct4، Sox2، Nanog در رده سلول‌های MCF-7 و MDA-MB-231 بین گروه‌های کنترل و تیمار با کاندیشن مدیوم حاصل از فیروبلاست‌های نرمال انسانی به صورت سه بار تکرار.

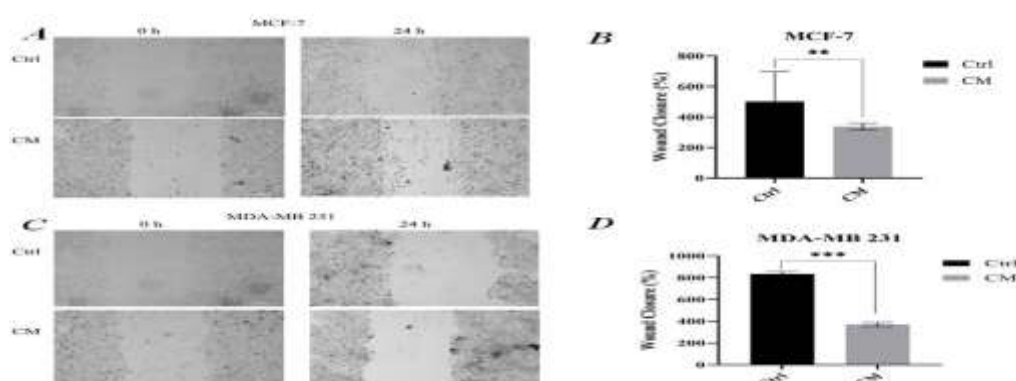
(ns) nonsignificant ** $P < .01$ *** $P < .001$ **** $P < .0001$



شکل ۲. A) نمودار فلوسیتومتری و ستونی نشان دهنده درصد جمعیت سلول‌های CD44⁺/CD24⁻ در رده‌های سلولی MCF-7 و MDA-MB-231 در گروه‌های کنترل و تیمار با کاندیشن مدیوم حاصل از فیبروبلاست نرمال انسانی پس از ۷ روز هم‌کشتی به صورت سه بار تکرار. **B)** تصاویر میکروسکوپی از ماموسفرها در رده‌های سلولی MCF-7 و MDA-MB-231 با بزرگ‌نمایی ۴۰X در سمت راست و بزرگ‌نمایی ۱۰۰X در سمت چپ. ۵ روز تیمار با مدیوم ماموسفر (مدیوم DMEM-F12 حاوی ۲ درصد EGF (20 ng/ml), FGF (۱۰ ng/ml) به دنبال ۷ روز تیمار در گروه‌های کنترل و کاندیشن مدیوم. زیر تصاویر میکروسکوپی نمودار ستونی مقایسه تعداد و اندازه ماموسفرها (بزرگتر از ۶۰ میکرومتر) بین گروه‌های کنترل و تیمار شده با کاندیشن مدیوم در رده‌های سلولی MCF-7 و MDA-MB-231. $P < 0.0001$ **** $P < 0.001$ *** $P < 0.01$ ** (ns) nonsignificant



شکل ۳. A) مقایسه Shape factor (Circularity) سلول‌های MCF-7 در روز صفر و هفتم در گروه‌های کنترل و تیمار شده با کاندیشن مدیوم حاصل از فیبروبلاست نرمال انسانی و نمودار خطی مقایسه بین روزها در هر گروه کنترل و تیمار با کاندیشن مدیوم به صورت سه بار تکرار. **B)** مقایسه shape factor (Circularity) سلول‌های MDA-MB-231 در روز صفر و هفتم در گروه‌های کنترل و تیمار شده با کاندیشن مدیوم حاصل از فیبروبلاست نرمال انسانی و نمودار خطی مقایسه بین روزها در هر گروه کنترل و تیمار با کاندیشن مدیوم به صورت سه بار تکرار. Scale bar: ۲۰۰ μm



شکل ۴. A و B) تصاویر میکروسکوپی در زمان ایجاد و ۲۴ ساعت بعد از ایجاد در سلول‌های MCF-7 گروه‌های کنترل و تیمار شده با کاندیشن مدیوم حاصل از سلول‌های فیبروبلاست نزال انسانی به صورت سه بار تکرار. نمودار هیستوگرام نمایش‌دهنده درصد wound closure در گروه‌های مورد مطالعه و مقایسه آماری آن‌ها. تفاوت معنی‌دار بین گروه‌ها به صورت $P < 0.01$ می‌باشد. C و D) تصاویر میکروسکوپی در زمان ایجاد و ۲۴ ساعت بعد از ایجاد در سلول‌های MDA-MB-231 گروه‌های کنترل و تیمار شده با کاندیشن مدیوم حاصل از سلول‌های فیبروبلاست نزال انسانی به صورت سه بار تکرار. نمودار هیستوگرام نمایش‌دهنده درصد wound closure در گروه‌های مورد مطالعه و مقایسه آماری آن‌ها. تفاوت معنی‌دار بین گروه‌ها به صورت $P < 0.001$ می‌باشد.

بحث

یافته‌تر لومینال^{۱۹}، همچنین، توانایی تشکیل کلونی نیز در سلول‌های لومینال به‌طور قابل توجهی کمتر از سلول‌های بازال گزارش شده است.^{۲۰} در بررسی کلونی‌زایی، تعداد ماموسفرهای سلول‌های بازال بیشتر از سلول‌های رده لومینال بوده است. ژن‌های Oct4 و Nanog می‌توانند خواصی مانند قابلیت خود نوسازی، تغییرات اپی‌تلیالی-مزانسیمی و مقاومت دارویی را به سلول‌های بنیادی سرطان اختصاص دهند.^{۲۱} Sox2 نیز ژن اساسی است که علاوه بر دو ژن مذکور در انواع سلول‌های بنیادی بیشترین بیان را دارد.^{۲۳} در مطالعه حاضر، کاهش چشمگیری در بیان ژن Sox-2 در هر دو رده لومینال و بازال رویت شد. از طرفی، میزان بیان ژن‌های Oct4 و Nanog در هر دو رده سلولی MDA-MB-231 و MCF-7 کاهش داشته است. البته در رده سلولی MDA-MB-231 این کاهش بیان، بسیار قابل ملاحظه بوده است. هم‌کشتی فیبروبلاست‌ها با سلول‌های سرطانی ریه باعث مهار بیان ژن Sox2 شده است.^{۲۳} که این نتیجه با نتایج ما کاملاً همسو می‌باشد. در مطالعه‌ای دیگر با مهار مسیر سیگنالینگ Wnt در فیبروبلاست‌های همراه سرطان تخمدان توانستند ویژگی‌های بنیادی از جمله بیان ژن‌های Oct4، Sox-2 و Nanog را کاهش دهند.^{۲۴} به نظر می‌رسد که ترشحات پاراکرینی فیبروبلاست‌های نزال از طریق مهار مسیرهای رشد و خودتجدیدی مانند Wnt مهار بیان ژن‌های بنیادی مورد مطالعه را در پی داشته است. همچنین، در این مطالعه کاهش قابل توجهی در بیان آنزیم ALDH1 در دو رده سلولی مشاهده شد. این کاهش بیان در رده سلولی MDA-MB-231 کمتر بود که با نتایج تحقیقات قبلی هم‌راستا است. به‌طوری که بیان ALDH1 در نوع بازال می‌تواند به عنوان فاکتور در پیش‌آگهی نوع بازال باشد.^{۲۵}

مطالعه روی کنش‌های سلولی در انواع مختلف سلول‌های سرطان با ریز محیط داخل توموری و پستانی یا حتی فراتر از جهت انتخاب نوع درمان اهمیت بسیار بالایی دارد. بررسی دقیق این تعاملات درون توموری و تعیین استراتژی‌های درمانی مبتنی بر این شناخت، نوید بخش آینده‌ای امیدوار کننده در جهت مهار پیشرفت بیماری و جلوگیری از متاستاز خواهد بود. بر اساس یافته‌های حاصل از این مطالعه در رده‌های سلولی لومینال و بازال تیمار با کاندیشن فیبروبلاست‌های نزال انسانی باعث افزایش درصد جمعیت سلولی CD44+/CD24- شد. با توجه به سایر یافته‌های مطالعه مبنی بر مهار تشکیل سلول‌های بنیادی این یافته به تنهایی نتوانست مدرک کافی بر سوق سلول‌های سرطانی به سمت حالت بنیادی در نتیجه مداخله ما باشد. افزایش این جمعیت سلولی می‌تواند به دلیل مقاومت این بخش نادر جمعیت سلول‌های سرطانی به مرگ باشد. ۷ روز تیمار فقط با کاندیشن مدیوم و نبود مواد غذایی کافی در محیط، مرگ سلول‌های سرطانی حساس به کمبود را در پی داشته و به دنبال آن درصد سلول‌های مقاوم به مرگ CD44+/CD24- افزایش یافته است. در مطالعه‌ای دیگر که بر روی زیر گروه‌های مختلف سلول‌های سرطانی پستان انجام شد، مشخص گردید که سلول‌های لومینال MCF-7 نسبت به سلول‌های بازال MDA-MB-231، بیان بالاتر E-cadherin، بیان پایین CD44+ و عدم بیان CD24- را دارند. نتایج حاصل از مطالعه ما نیز تأییدکننده این یافته‌ها بود و نشان داد که درصد جمعیت سلولی CD44+/CD24- در سلول‌های رده بازال نسبت به لومینال بیشتر بوده است. این یافته نشان می‌دهد که سلول‌های بازال بیشتر ویژگی‌های بنیادی دارند تا سلول‌های تمایز

بنیادی سرطان در سطح بیان ژن‌های SOX2/ NANOG/ OCT4 نگردیده است، بلکه منجر به کاهش بیان ژن‌های مورد نظر در هر دو رده شده است. تیمار هر دو رده لومینال و بازال با کاندیشن مدیوم حاصل از فیروبلاست نرمال انسانی، منجر به افزایش جمعیت سلولی CD44+/CD24- شد که این یافته مثبت را به تنهایی نمی‌توان دال بر حصول ویژگی بنیادی به دنبال اثر پاراکرینی فیروبلاست‌های نرمال دانست. به نظر می‌رسد افزایش این جمعیت نادر سلولی بعد از 7 روز تیمار با کاندیشن مدیوم به دلیل تاب‌آوری این جمعیت مقاوم به کمبود مواد غذایی در محیط بوده است. از طرفی تیمار دو رده سلولی لومینال و بازال با کاندیشن مدیوم حاصل از فیروبلاست نرمال انسانی، قدرت تشکیل ماموسفر یا قابلیت تومورزایی را در هر دو رده افزایش نداده است. همچنین، تغییر اپیتلیال به مزانشیمی نیز در دو رده لومینال و بازال با بررسی تغییرات مورفولوژیکی مشاهده نگردید. یافته‌های درصد بسته شدن خراش نیز به نفع افزایش تهاجم نبوده است. در نهایت، می‌توان نتیجه گرفت که فیروبلاست‌های نرمال از طریق ترشحات پاراکرینی پتانسیل لازم برای مهار تشکیل سلول‌های بنیادی سرطان در شرایط آزمایشگاهی (*in vitro*) را دارند. مهار تشکیل سلول‌های بنیادی می‌تواند ناشی از مهار مسیره‌های سیگنالینگ مانند IL6/STAT3, TGF- β /SDF-1/ PI3K, WNT/ β -catenin, HGF/cMET SHH/Hh باشد. مسیره‌های مذکور با توجه به مطالعات قبلی در رشد و تمایز سلول‌های بنیادی نقش بنیادین دارند. محدودیت اصلی طرح عدم دسترسی به سلول‌های فیروبلاست جدا شده از بافت یا همان فیروبلاست‌های همراه سرطان به دلیل محدودیت‌های تکنیکی موجود و مقایسه اثر این نوع فیروبلاست با فیروبلاست نرمال بوده است.

قدردانی

نویسندگان بر خود لازم می‌دانند از مرکز تحقیقات ایمونولوژی دانشگاه علوم پزشکی تبریز به خاطر خدماتشان تشکر و قدردانی کنند.

مشارکت پدیدآوران

کبری ولایی: طراحی و ایده‌پردازی، نظارت و بررسی بر تمام اقدامات اجرایی و داده‌ها، تهیه نمودارها و تصاویر، تأمین بودجه پروژه؛ فخرالسادات سجادیان: تهیه نسخه خطی و ملیکا ایزدپناه: طراحی نسخه خطی و ویرایش کامل و نهایی آن را بر عهده داشتند.

منابع مالی

طرح حاضر با حمایت مالی و تکنیکی مرکز تحقیقات ایمونولوژی انجام گرفته است.

دلیل تفاوت بیان در دو رده به علت ویژگی بنیادی بالای رده بازال در مقایسه با رده لومینال است. در مورد میزان و قدرت تشکیل ماموسفر در رده MDA-MB-231 تعداد ماموسفرها در گروه تیمار بیشتر از گروه کنترل بود و اندازه آنها تفاوت نداشت. در حالی که در رده MCF-7 در تعداد و اندازه ماموسفرها تفاوت معناداری بین گروه کنترل و تیمار مشاهده نشد. در مجموع، قدرت کلونی‌زایی در دو رده با کاندیشن مدیوم افزایش نیافت هر چند که سلول‌های بازال به دلیل کمتر تمایز یافتگی توانایی تشکیل ماموسفرهای بالایی دارند. نتایج این بخش با نتایج تحقیقات وانگ و همکاران در یک راستا بود.^{۲۶} کاهش توان تومورزایی می‌تواند در نتیجه مهار کاهش بیان آنزیم ALDH1 که خود تحریک‌کننده مسیر سیگنالینگ Hedgehog دخیل در فرایند تومورزایی باشد.^{۲۳} فعال شدن مسیر سیگنالینگ Hedgehog در فیروبلاست‌ها که توسط سلول‌های بنیادی تحریک می‌شود، می‌تواند منجر به افزایش ویژگی‌های بنیادی در سلول‌های سرطانی فیروبلاست‌های فعال شده شود.^{۲۴} بنابراین، ایجاد حالت بنیادی در سلول‌های سرطانی بیشتر نیازمند تماس بین سلولی است تا اثر پاراکرینی. کاندیشن مدیوم حاصل از فیروبلاست نرمال انسانی بازدارندگی برای بیان مارکرهای ژنی و پروتئینی و به دنبال آن مهار رفتارهای تهاجمی سلول‌های بنیادی را نیز دارد. مطالعات قبلی حاکی از افزایش رفتار تهاجمی سلول‌های سرطانی در مواجهه با فیروبلاست‌های همراه سرطان می‌باشد. ولی یافته‌های حاضر نشان داد که قدرت تهاجم و حرکت سلول‌های سرطانی هر دو رده لومینال و بازال بعد از تیمار با کاندیشن مدیوم کاهش معنی‌داری را دارد. از اختصاصات ریز محیط شرایط هایپوکسیک می‌باشد که با فعال سازی مسیر سیگنالینگ IL1 β -IL1R باعث ایجاد ویژگی‌های تهاجمی در سلول‌ها می‌شود.^{۲۵} همچنین، نقش اجزای التهابی مانند سیتوکین‌های التهابی (IL-6, IL-17, TNF, IFNs) و سلول‌های التهابی به عنوان ویژگی مهم ریز محیط تومور در القا و افزایش سلول‌های سرطانی بنیادی به اثبات رسیده است.^{۲۹} به نظر می‌رسد عدم توانایی در تقلید دقیق شرایط ریز محیط در آزمایشگاه یکی از دلایل تفاوت یافته‌های مطالعه حاضر در کاهش ویژگی‌های بنیادی مانند تهاجم و غیره بوده است.

نتیجه‌گیری

در مطالعه حاضر، تیمار دو رده لومینال و بازال با کاندیشن مدیوم حاصل از فیروبلاست نرمال انسانی با کاهش بیان آنزیم ALDH1، ویژگی‌های بنیادی را در این رده‌ها کاهش داده است. همچنین، تیمار دو رده لومینال و بازال با کاندیشن مدیوم حاصل از فیروبلاست نرمال انسانی نه تنها باعث افزایش ویژگی‌های

دسترس پذیری داده‌ها

داده‌های ایجاد شده در مطالعه فعلی در صورت درخواست معقول از پدیدآور رابط ارایه می‌گردد.

تعارض منافع

نویسندگان اظهار می‌دارند که هیچ‌گونه تضاد منافی در مورد مطالعه مذکور ندارند.

ملاحظات اخلاقی

طرح تحقیقاتی حاضر با کد اخلاقی IR.TBZMED.VCR.REC.1401.026 در مرکز تحقیقات ایمونولوژی تبریز به تصویب رسیده است.

References

1. Wang S, Zheng R, Li J, Zeng H, Li L, Chen R, et al. Global, regional, and national lifetime risks of developing and dying from gastrointestinal cancers in 185 countries: a population-based systematic analysis of GLOBOCAN. *Lancet Gastroenterol Hepatol*. 2024;9(3):229-37. doi: 10.1016/S2468-1253(23)00366-7.
2. Malhotra GK, Zhao X, Band H, Band V. Histological, molecular and functional subtypes of breast cancers. *Cancer Biol Ther*. 2010;10(10):955-60. doi: 10.4161/cbt.10.10.13879
3. Tahmasebi-Birgani M, Javidi MA, Ghiasvand S, Zaferani Arani H, Sadeghizadeh M, Mowla SJ, et al. OCT4B1 Dysregulation Is a Key Factor in Different Sensitivity of Normal Cells and Breast Cancer Cells to the Curcumin. *Iranian Journal of Breast Diseases*. 2023;16(1):97-110. doi: 10.30699/ijbd.16.1.97
4. Januškevičienė I, Petrikaitė V. Heterogeneity of breast cancer: The importance of interaction between different tumor cell populations. *Life Sci*. 2019;239:117009. doi: 10.1016/j.lfs.2019.117009.
5. Quail DF, Taylor MJ, Postovit LM. Microenvironmental regulation of cancer stem cell phenotypes. *Curr Stem Cell Res Ther*. 2012;7(3):197-216. doi: 10.2174/157488812799859838
6. Moccia C, Haase K. Engineering Breast Cancer On-chip-Moving Toward Subtype Specific Models. *Front Bioeng Biotechnol*. 2021;9:694218. doi: 10.3389/fbioe.2021.694218
7. Dixelius J, Jakobsson L, Genersch E, Bohman S, Ekblom P. Laminin-1 promotes angiogenesis in synergy with fibroblast growth factor by distinct regulation of the gene and protein expression profile in endothelial cells. *J Biol Chem*. 2004;279(22):23766-72. doi: 10.1074/jbc.M311675200
8. Cross MJ, Claesson-Welsh L. FGF and VEGF function in angiogenesis: signalling pathways, biological responses and therapeutic inhibition. *Trends Pharmacol Sci*. 2001;22(4):201-7. doi: 10.1016/S0165-6147(00)01676-X
9. Zhou J, Chen Q, Zou Y, Chen H, Qi L, Chen Y. Stem Cells and Cellular Origins of Breast Cancer: Updates in the Rationale, Controversies, and Therapeutic Implications. *Front Oncol*. 2019;9:820. doi: 10.3389/fonc.2019.00820
10. Al-Hajj M, Wicha MS, Benito-Hernandez A, Morrison SJ. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100(7):3983-8. doi: 10.1073/pnas.0530291100.
11. Ginestier C, Hur MH, Charafe-Jauffret E, Monville F, Dutcher J, Brown M. ALDH1 is a marker of normal and malignant human mammary stem cells and a predictor of poor clinical outcome. *Cell Stem Cell*. 2007;1(5):555-67. doi: 10.1016/j.stem.2007.08.014
12. Merchant AA, Matsui W. Targeting Hedgehog--a cancer stem cell pathway. *Clin Cancer Res*. 2010;16(12):3130-40. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-09-2846.
13. Cazet AS, Hui MN, Elsworth BL, Wu SZ, Roden D, Chan CL, et al. Targeting stromal remodeling and cancer stem cell plasticity overcomes chemoresistance in triple negative breast cancer. *Nat Commun*. 2018;9(1):2897. doi: 10.1038/s41467-018-05220-6.
14. Li W, Li Y, Cui Y, Li S, Zhu Y, Shang C, et al. Anti-tumour effects of a dual cancer-specific oncolytic adenovirus on Breast Cancer Stem cells. *J Cell Mol Med*. 2021;25(2):666-76. doi: 10.1111/jcmm.16113.
15. Zhang J, Yuan B, Zhang H, Li H. Human epithelial ovarian cancer cells expressing CD105, CD44 and CD106 surface markers exhibit increased invasive capacity and drug resistance. *Oncol Lett*. 2019;17(6):5351-60. doi: 10.3892/ol.2019.10221.
16. Csermely P, Hódsági J, Korcsmáros T, Módos D, Perez-Lopez ÁR, Szalay K, et al. Cancer stem cells display extremely large evolvability: alternating plastic and rigid networks as a potential Mechanism: network models, novel therapeutic target strategies, and the contributions of hypoxia, inflammation and cellular senescence. *Semin Cancer Biol*. 2015;30:42-51. doi: 10.1016/j.semcancer.2013.12.004.
17. Steinbichler TB, Savic D, Dudás J, Kvitsaridze I, Skvortsov S, Riechelmann H, et al. Cancer stem cells and their unique role in metastatic spread. *Semin Cancer Biol*. 2020;60:148-56. doi: 10.1016/j.semcancer.2019.09.007.

18. Roswall P, Bocci M, Bartoschek M, Li H, Kristiansen G, Jansson S, et al. Microenvironmental control of breast cancer subtype elicited through paracrine platelet-derived growth factor-CC signaling. *Nat Med.* 2018;24(4):463-73. doi: 10.1038/nm.4494.
19. Chekhun SV, Zadvorny TV, Tymovska YO, Anikusko MF, Novak OE, Polishchuk LZ. CD44+/CD24- markers of cancer stem cells in patients with breast cancer of different molecular subtypes. *Exp Oncol.* 2015;37(1):58-63.
20. Chekhun S, Bezdenezhnykh N, Shvets J, Lukianova N. Expression of biomarkers related to cell adhesion, metastasis and invasion of breast cancer cell lines of different molecular subtype. *Exp Oncol.* 2013;35(3):174-9.
21. Wang D, Lu P, Zhang H, Luo M, Zhang X, Wei X, et al. Oct-4 and Nanog promote the epithelial-mesenchymal transition of breast cancer stem cells and are associated with poor prognosis in breast cancer patients. *Oncotarget.* 2014;5(21):10803-15. doi: 10.18632/oncotarget.2506.
22. Leis O, Eguiara A, Lopez-Arribillaga E, Alberdi M, Hernandez-Garcia S, Elorriaga K, et al. Sox2 expression in breast tumours and activation in breast cancer stem cells. *Oncogene.* 2012;31(11):1354-65. doi: 10.1038/onc.2011.338
23. Chen S, Giannakou A, Wyman S, Gruzas J, Golas J, Zhong W, et al. Cancer-associated fibroblasts suppress SOX2-induced dysplasia in a lung squamous cancer coculture. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 2018;115(50):E11671-E80. doi: 10.1073/pnas.1803718115
24. Fang Y, Xiao X, Wang J, Dasari S, Pepin D, Nephew KP, et al. Cancer associated fibroblasts serve as an ovarian cancer stem cell niche through noncanonical Wnt5a signaling. *NPJ Precis Oncol.* 2024;8(1):7. doi: 10.1038/s41698-023-00495-5.
25. Panigoro SS, Kurnia D, Kurnia A, Haryono SJ, Albar ZA. ALDH1 Cancer Stem Cell Marker as a Prognostic Factor in Triple-Negative Breast Cancer. *Int J Surg Oncol.* 2020;2020:7863243. doi: 10.1155/2020/7863243
26. Wang R, Lv Q, Meng W, Tan Q, Zhang S, Mo X, et al. Comparison of mammosphere formation from breast cancer cell lines and primary breast tumors. *J Thorac Dis.* 2014;6(6):829-37. doi: 10.3978/j.issn.2072-1439.2014.03.38.
27. Valenti G, Quinn HM, Heynen GJJE, Lan L, Holland JD, Vogel R, et al. Cancer Stem Cells Regulate Cancer-Associated Fibroblasts via Activation of Hedgehog Signaling in Mammary Gland Tumors. *Cancer Res.* 2017;77(8):2134-47. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-15-3490.
28. Lappano R, Talia M, Cirillo F, Rigracciolo DC, Scordamaglia D, Guzzi R, et al. The IL1 β -IL1R signaling is involved in the stimulatory effects triggered by hypoxia in breast cancer cells and cancer-associated fibroblasts (CAFs). *J Exp Clin Cancer Res.* 2020;39(1):153. doi: 10.1186/s13046-020-01667-y.
29. Zhang S, Yang X, Wang L, Zhang C. Interplay between inflammatory tumor microenvironment and cancer stem cells. *Oncol Lett.* 2018;16(1):679-86. doi: 10.3892/ol.2018.8716.