

## بررسی اثر آگروزوم‌های مشتق از سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان بر بیان ژن CDK4 و توانایی تکثیر و مهاجرت سلول‌های سرطان پستان

منصور الموح<sup>۱</sup>، محبوبه شیخ بهائی<sup>۱</sup>، زهیر محمد حسن<sup>۲</sup> و صادق باباشاه<sup>۱\*</sup>

۱. گروه ژنتیک، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

۲. گروه ایمونولوژی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۰۵/۰۹ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۰۸/۰۷

### چکیده

سرطان پستان از شایعترین سرطان‌ها در بین زنان بوده و اولین علت مرگ و میر ناشی از سرطان در زنان به شمار می‌رود. ژن کیناز وابسته به سایکلین ۴ (CDK4) یکی از مهمترین ژن‌های تنظیم‌کننده ی چرخه‌ی سلولی است و به عنوان انکوژن عمل می‌کند به طوری که میزان بیان آن در انواع مختلف سرطان‌ها از جمله سرطان پستان افزایش می‌یابد. شواهد نشان می‌دهد که آگروزوم‌های ترشح شده توسط سلول‌های بنیادی مزانشیمی (MSCs) باعث مهار گسترش تومور از طریق انتقال مولکول‌های زیستی می‌شوند. هدف از انجام مطالعه حاضر، تعیین بیان ژن CDK4 و میزان تکثیر و مهاجرت سلولی در رده‌ی سلولی سرطان پستان 4T1 تحت تأثیر تیمار با آگروزوم های ترشح شده توسط سلول‌های بنیادی مزانشیمی می باشد. رده‌ی سلولی 4T1 سرطان پستان کشت داده شد و با ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر آگروزوم‌های MSCs تیمار شد. تغییر بیان ژن CDK4 در سلول‌های تیمار شده توسط Real-time PCR ارزیابی شد. همچنین، میزان تکثیر، بقا و مهاجرت سلول‌های سرطانی در پی تیمار آگروزومی سنجیده شد. نتایج نشان داد که تیمار سلول‌های سرطان پستان 4T1 با آگروزوم‌های مشتق شده از سلول‌های بنیادی مزانشیمی باعث کاهش میزان تکثیر و مهاجرت سلولی در مقایسه با گروه کنترل شد. همچنین، کاهش معنی‌داری در میزان بیان ژن CDK4 به عنوان تنظیم‌کننده کلیدی چرخه سلولی مشاهده شد. در مجموع این مطالعه پیشنهاد می‌کند آگروزوم‌های مشتق از سلول‌های بنیادی مزانشیمی اثرات مهارتی بر بیان ژن CDK4 در سلول‌های سرطانی پستان داشته و می‌تواند سبب کاهش نرخ تکثیر و مهاجرت این سلول‌ها شوند.

**واژه‌های کلیدی:** سلول‌های بنیادی مزانشیمی؛ آگروزوم‌ها؛ سرطان پستان؛ CDK4

\* نویسنده مسئول، پست الکترونیکی: babashah@modares.ac.ir

### مقدمه

سرطان پستان از شایعترین سرطان‌ها در بین زنان بوده و بیشترین علت مرگ ناشی از سرطان در زنان می‌باشد. سرطان پستان نوعی تومور بدخیم است که از سلول‌های پستان به وجود می‌آید (۷). تعداد مبتلایان به سرطان پستان در جهان در حال افزایش است. امروزه از هر هشت زن یک نفر مبتلا می‌شود و از هر ۳۰ زن مبتلا به سرطان پستان یک نفر فوت می‌کند (۲۴). سلول‌های بنیادی مزانشیمی (MSCs)، سلول‌های پرتوانی هستند که قابلیت خودنوزایی و تمایز به انواع سلول‌های استرومایی را دارند، و این کاملاً به شرایط و عوامل موجود در ریزمحیط آن‌ها بستگی دارد. (۶، ۱۶، ۲۷). سلول‌های بنیادی مزانشیمی

<sup>1</sup>Mesenchymal stem cells

می‌توانند به سمت تومورهای اولیه مهاجرت کنند که این ویژگی بر اهمیت تعامل این سلول‌ها با سلول‌های توموری اشاره دارد (۳۲).

در سال‌های اخیر، گزارش‌هایی مبنی بر مهاجرت سلول‌های بنیادی مزانشیمی به میکرومحیط توموری و ارتباطات این سلول‌ها با سلول‌های اطراف به واسطه‌ی وزیکول‌های خارج سلولی بنام آگزوزوم‌ها منتشر شده است (۸). آگزوزوم‌ها وزیکول‌هایی کوچک و با اندازه ۳۰-۱۰۰ نانومتر هستند که از انواع سلول ترشح می‌شوند. آگزوزوم‌ها دارای نشانگرهای سطحی با نام تتراسپانین‌ها بوده و همچنین غنی از آنکسین و پروتئین‌های شوک حرارتی (Hsp90, Hsp70, Hsp60) می‌باشند. آگزوزوم‌ها حامل‌ها مولکول‌های زیستی مختلفی مانند DNA و انواع RNA های کد کننده و غیر کد کننده هستند (۱۴).

به طور کلی یکی از ویژگی‌های سرطان، رشد و تکثیر بی‌رویه سلول‌های توموری می‌باشد. پیشرفت چرخه سلولی یک فرآیند کاملاً تنظیم شده است که شامل چندین نقطه بازرسی است که سیگنال‌های رشد خارج سلولی، یکپارچگی DNA و تکثیر سلولی را ارزیابی می‌کند. از این رو اختلال در چرخه سلولی یکی از مهم‌ترین تغییرات در طول رشد تومور است (۲۸). در واقع، پیشرفت چرخه سلولی توسط کینازهای وابسته به سیکلین (CDKs<sup>۲</sup>) کنترل و انتقال سلول از فاز G1 به فاز S توسط سیکلین‌های نوع D شامل سیکلین D1, D2 و D3 با تشکیل کمپلکس با CDKs تنظیم می‌شود (۱۵). CDK4 یکی از مهمترین ژن‌های تنظیم کننده‌ی چرخه‌ی سلولی است که به عنوان انکوژن عمل می‌کند به طوری که میزان بیان آن در انواع مختلف سرطان از جمله سرطان پستان افزایش می‌یابد و باعث افزایش تکثیر و مهاجرت سلولی می‌شود (۱۸، ۳۰، ۹، ۲۱).

هدف از مطالعه‌ی حاضر، بررسی اثرات آگزوزوم‌های مشتق شده از سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان موشی بر تکثیر و مهاجرت سلول‌های سرطانی پستان می‌باشد. همچنین تغییرات بیانی ژن CDK4 بعنوان یکی از ژن‌های مهم در پیشرفت چرخه سلولی در سلول‌های سرطانی پستان در پی تیمار آگزوزومی سنجیده خواهد شد.

## مواد و روش‌ها

### تهیه، جداسازی و کشت سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان:

جهت انجام این پژوهش تجربی-آزمایشگاهی ابتدا سلول‌های بنیادی مزانشیمی از مغز استخوان موش جداسازی و کشت داده شدند. در کلیه مراحل انجام تحقیق، موارد اخلاقی کار با حیوان مطابق مقررات کمیته اخلاق دانشگاه تربیت مدرس (کد مصوب اخلاق به شماره IR.MODARES.REC.1400.164) رعایت گردید. موش‌های نژاد BALB/ C با سن تقریبی چهار هفته از پژوهشگاه رویان ایران خریداری شدند. برای جداسازی سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از مغز استخوان، موش‌ها با استفاده از کلروفورم بیهوش شدند، استخوان‌های ران و درشت نی آنها جدا گردید و داخل تیوپ حاوی بافر فسفات سالین (PBS) استریل سرد قرار داده شدند. بعد از پاکسازی بافت‌های اطراف و قطع دو سر استخوان، مغز استخوان با روش فشار دادن توسط سرنگ از درون استخوان‌های ران تخلیه شد. محتویات خارج شده از درون استخوان بعد از سانتریفیوژ، به

<sup>۱</sup>checkpoints

<sup>۲</sup>Cyclin Dependent Kinases

<sup>۳</sup>phosphate-buffered saline

فلاسک دارای محیط کشت DMEM<sup>۱</sup> (Sigma-Aldrich, USA) حاوی ۱۵ درصد سرم جنین گاوی (FBS) ( Gibco, Life Technologies, USA) (و یک درصد پنسیلین-استرپتومایسین Germany) اضافه شده و درون انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتیگراد و CO<sub>2</sub> پنج درصد نگهداری شدند. بعد از ۲۴ ساعت محیط رویی تخلیه و هر سه روز یکبار محیط کشت تعویض شد. زمانیکه تراکم سلول‌های بنیادی مزانشیمی به ۸۰ درصد رسید، پاساژ سلولی انجام شد و سلول‌ها پس از پاساژ سوم جهت تأیید هویت سلول‌های بنیادی مزانشیمی با روش فلوسایتومتری ارزیابی شدند (۳).

#### بررسی نشانگرهای سطحی سلول‌های بنیادی مزانشیمی با روش فلوسایتومتری

سلول‌های بنیادی مزانشیمی موشی دارای بیان مثبت نشانگرهای سطحی CD90 و CD73، CD105، CD44 و عدم بیان نشانگرهای سلول‌های خونساز مانند CD34 و CD45 بر سطح خود می‌باشند (۱۳). به منظور بررسی فلوسایتومتری نشانگرهای سطحی سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از مغز استخوان، از سلول‌های پاساژ سوم استفاده شد. این سلول‌ها تریپسینه و بعد از شمارش سلولی برای هر نشانگر تعداد یکصد هزار سلول استفاده شد. مقدار مشخص از هر آنتی بادی و یا ایزوتایپ کنترل مناسب آنها طبق پروتکل شرکت سازنده (Pharmigen, USA) به میکروتیوپ سلولی اضافه و سپس در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد و به مدت ۴۵ دقیقه در تاریکی انکوبه گردید. در مرحله بعد، با دور ۴۰۰ g به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ شد. محلول رویی برداشته و رسوب سلولی حاصل با بافر PBS سرد حاوی دو درصد سرم جنین گاوی FBS با دور ۴۰۰ g به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ و شسته شد تا آنتی بادی‌های اضافه از محیط حذف شود. سپس سلول‌ها با استفاده از دستگاه فلوسایتومتری FACS Canto II (Bioscience, CA) خوانش و با نرم افزار Flowjo V10.8.1 آنالیز شدند. آنتی بادی‌های CD44 و CD73، CD45 در این پژوهش بررسی شدند.

#### کشت رده سلولی سرطان پستان موشی 4T1

رده سلولی 4T1 از گروه ایمونولوژی دانشگاه تربیت مدرس برای این پژوهش فراهم شد. سلول‌ها به فلاسک T25 منتقل و در محیط RPMI (Roswell Park Memorial Institute 1640) حاوی ۱۰ درصد سرم جنین گاوی FBS و ۱ درصد پنسیلین/استرپتومایسین کشت و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و ۵ درصد CO<sub>2</sub> نگهداری شدند. سلول‌های 4T1 به منظور آماده‌سازی جهت تیمار با نمونه آگزوزومی، در پلیت‌های ۱۲ خانه کشت داده شد. بعد از رسیدن تراکم سلولی به میزان مناسب، میزان ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر آگزوزوم به هر خانه افزوده شد (۱۱).

#### جداسازی آگزوزوم‌های سلول‌های بنیادی مزانشیمی با استفاده از پلی اتیلن گلیکول (PEG)

برای جداسازی آگزوزوم‌ها از روش PEG استفاده شد (۲۹)، ابتدا محیط کشت سلولی جمع‌آوری و سپس به مدت ۱۵ دقیقه در دور ۳۰۰ xg سانتریفیوژ شد. سپس، به محیط کشت سلولی جمع‌آوری شده محلول PEG به نسبت ۱ محلول PEG و ۵ سوپ سلولی اضافه گردید. انکوباسیون در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۴ ساعت همراه با تکان دادن انجام شد.

<sup>۱</sup>Dulbecco's Modified Eagle's Medium

<sup>۲</sup>Fetal Bovine Serum

<sup>۳</sup>Polyethylene glycol

<sup>۴</sup>Shaking

سپس، به مدت ۳۰ دقیقه با دور ۱۵۰۰۰ xg در دمای ۴ درجه ی سانتی گراد سانتریفیوژ شد. در این مرحله، مایع رویی به آرامی خارج و رسوب حاوی آگروزوم‌ها در ۲۰۰ میکرولیتر PBS حل گردید.

### تعیین اندازه آگروزوم‌ها با استفاده از پراکندگی نور دینامیکی (DLS)

پراکندگی نور دینامیکی DLS روشی فیزیکی است که برای تعیین توزیع ذرات موجود در محلول‌ها و سوسپانسیون استفاده می‌شود. این روش غیرمخرب و سریع برای تعیین اندازه ذرات در محدوده چند نانومتر تا میکرون به کار می‌رود (۲۰). جهت تعیین سایز آگروزوم‌ها به روش DLS، میزان ۱۰۰ میکرو لیتر آگروزوم با غلظت ۱۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر توسط PBS به حجم ۶۰۰-۷۰۰ میکرو لیتر رسانیده شد. سنجش سایز آگروزوم‌ها به وسیله‌ی دستگاه (Malvern Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, UK) انجام شد.

### تعیین غلظت آگروزوم‌ها با استفاده از روش برادفورد

به منظور تعیین غلظت آگروزوم‌های خالص سازی شده از روش برادفورد استفاده شد (۲۶). برای هر نمونه ۲۵ میکرولیتر از نمونه‌ی آگروزومی با ۴۷۵ میکرولیتر از محلول برادفورد مخلوط و برای ۲۰ دقیقه در تاریکی در دمای اتاق انکوبه شد. جذب نوری در طول موج ۵۹۵ نانومتر در رقت‌های سریالی پروتئین استاندارد آلبومین BSA خوانده شد. سپس غلظت نمونه‌های آگروزوم خوانش شد. به منظور تعیین غلظت پروتئین نمونه‌ی ناشناخته، منحنی استاندارد ترسیم شد؛ به این ترتیب که میزان جذب نوری روی محور عمودی و میزان غلظت پروتئین استاندارد (BSA) روی محور افقی قرار گرفت. پس از ترسیم نمودار استاندارد، با قرار دادن جذب نوری OD<sup>۲</sup> نمونه در معادله خطی، میزان غلظت آگروزوم‌ها به دست آمد.

### ارزیابی بقاء و تکثیر سلولی

تعیین درصد زنده بودن سلول‌ها و میزان تکثیر سلولی توسط رنگ آمیزی سلولی با تریپان بلو و با کمک لام نئوبار انجام شد. به منظور شمارش سلولی، پس از تریپسینه کردن و جدا کردن گروه‌های سلولی از کف پلیت، سوسپانسیون سلولی به لوله فالکون استریل منتقل شد. سپس سلول‌ها به مدت ۶ دقیقه در دمای اتاق با دور ۱۲۰۰ rpm سانتریفیوژ شدند. محیط رویی خالی شد و رسوب سلولی، در یک میلی لیتر محیط کشت سوسپانسیون گردید. جهت شمارش سلول‌های زنده توسط رنگ تریپان بلو مقدار ۵۰ میکرولیتر از سوسپانسیون سلولی با ۵۰ میکرولیتر رنگ تریپان بلو ۰/۴٪ مخلوط شد. مقدار ۲۰ میکرولیتر از این مخلوط بر روی لام نئوبار ریخته، شمارش و میانگین گرفته شد. رنگ تریپان بلو در سلول‌های مرده نفوذ و آنها را آبی رنگ می‌نماید در حالی که سلول‌های زنده رنگ آمیزی نمی‌شوند.

### بررسی مهاجرت سلولی توسط آزمون خراش (Scratch wound assay)

مهاجرت سلول‌ها با استفاده از ایجاد خراش در پلیت‌های ۱۲ خانه انجام شد. میزان یکصد هزار سلول 4T1 به همراه محیط RPMI حاوی ۱۰ درصد سرم جنین گاوی FBS و ۱ درصد پنیسیلین/سترپتومایسین کشت و در دمای ۳۷ درجه‌ی سانت‌گراد و ۵ درصد CO<sub>2</sub> پلیت‌های ۱۲ خانه نگهداری شدند کشت، پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون و پرشدن کف پلیت‌ها، سلول‌ها به مدت ۸ ساعت، بدون سرم جنین گاوی FBS جهت توقف تکثیر سلولی، نگهداری شدند. پس از ایجاد

<sup>۱</sup>Dynamic light scattering

<sup>۲</sup>Optical density

خرایش، بمنظور حذف سلول‌های مرده، چاهک با PBS شستشو شد. سپس محیط کشت غنی شده با 10% FBS به پلیت‌ها افزوده شد. گروه کنترل با PBS و گروه تیماری با محلول آگزوزومی دارای غلظت ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر مورد تیمار قرار گرفتند. عکس برداری از سلول‌ها در ساعت‌های صفر، ۱۲ و ۲۴ صورت گرفت و سپس میزان بسته شدن خراش با نرم افزار ImageJ آنالیز شد. بسته شدن نسبی خراش، توانایی مهاجرت سلول‌های 4T1 را نشان داد.

#### ارزیابی مهاجرت سلولی توسط ازومون ترانسول Transwell Chamber

سنجش مهاجرت در شرایط آزمایشگاهی به وسیله چاهک کشت ترانسول با قطر منافذ ۸ میلی‌متر میلی‌متر اندازه‌گیری شد. تعداد یکصد هزار سلول 4T1 در محیط کشت RPMI بدون سرم در قسمت بالایی فیلتر دولایه پلیت Chamber Transwell (BD Biosciences, NSW, Australia) کشت داده شد. سپس سلول‌های گروه کنترل با PBS و گروه تیماری با آگزوزوم‌های دارای غلظت ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر تحت تیمار قرار گرفتند. سپس محیط کشت با FBS 10% را به قسمت پایین پلیت اضافه شد و به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد و غلظت گاز Co2 ۵ درصد نگهداری شد تا سلول‌ها به طبقه پایین مهاجرت کنند. سپس سلول‌های مهاجرت کرده با رنگ کریستال ویوله رنگ آمیزی شدند. تصاویر از طریق میکروسکوپ معکوس به دست آمد و تعداد سلول‌های مهاجرت کرده با استفاده از نرم افزار Image J شمارش شد.

#### ارزیابی بیان ژن کینازی وابسته به سایکلین ۴ (CDK4) با استفاده از Real-time PCR

جهت بررسی بیان ژن CDK4، سلول‌های 4T1 گروه کنترل با PBS و گروه تیماری با آگزوزوم‌های دارای غلظت ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر تحت تیمار قرار گرفته و سپس به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور نگهداری شدند. استخراج RNA در این مطالعه با استفاده از واکنش‌گر ترایزول (Invitrogen, USA) و مطابق با دستورالعمل شرکت سازنده انجام گرفت. بررسی کیفیت RNA استخراج شده با تکنیک الکتروفورز روی ژل آگارز ۱ درصد انجام شد. کمیت RNA از طریق تعیین میزان غلظت با استفاده از دستگاه نودراپ مورد مطالعه قرار گرفت. به منظور سنتز cDNA از واکنش رونویسی معکوس مطابق با دستورالعمل کیت شرکت Takara ژاپن استفاده شد. طراحی آغازگرها برای تکثیر ژن‌های CDK4 و  $\beta 2M$  با استفاده از نرم افزار الیگو ۷ (oligo 7.56) انجام شد. اختصاصی بودن پرایمرها در سایت NCBI/BLAST بررسی شد. جدول ۱ خصوصیات پرایمرهای مورد استفاده برای PCR کمی در زمان واقعی را نشان می‌دهد.

سنجش کمی رونوشت ژن با کمک دستگاه Real-time PCR مدل Applied Biosystems StepOne انجام گرفت. مخلوط واکنش PCR در حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر شامل ۱۰ میکرولیتر مسترمیکس سایبرگرین ریل‌تایم Ampliqon PCR SYBR green master mix 2X، ۰/۵ میکرولیتر (معادل ۵ پیکومول) از هر آغازگر، ۱ میکرولیتر (معادل ۵ نانوگرم) cDNA سنتز شده و ۸ میکرولیتر آب مقطر تهیه شد. واکنش Real-time PCR برای هر ژن، سه سری و به صورت هم‌زمان انجام شد و میانگین چرخه آستانه Ct به دست آمده برای هر ژن محاسبه شد. واکنش در دستگاه Real-time PCR تحت شرایط حرارتی و زمانی زیر انجام شد: در ابتدا ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه به عنوان مرحله واسرشته‌سازی ابتدایی در نظر گرفته شد. سپس برنامه حرارتی زیر در ۴۰ چرخه تکرار شد: مرحله واسرشته‌سازی ثانویه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، مرحله اتصال آغازگر در ۵۸ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه و مرحله بسط در ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه. در انتها ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه به عنوان مرحله بسط نهایی در نظر گرفته شد. پس از

انجام واکنش Real-time PCR ، اختلاف چرخه آستانه (Ct) سلول‌های تیمار شده با آگروزوم‌ها و تیمار شده با PBS به عنوان کنترل به دست آمد. همچنین با استفاده از فرمول  $\Delta\Delta Ct$ ، نسبت ژن هدف به ژن کنترل داخلی از طریق فرمول (نسبت بیانی)  $Ratio=2^{-\Delta\Delta Ct}$  محاسبه شد. مقادیر رونوشت‌های ژن هدف در مقایسه با بیان ژن  $\beta 2M$  (بیان ژن  $\beta 2M$  به عنوان ژن کنترل داخلی تعیین شد. شایان ذکر است ژن  $\beta 2M$  از ژن‌هایی است که بیان بسیار پایداری در شرایط مختلف دارد. این ویژگی این ژن را حائز شرایطی می‌دارد که می‌توان از آن بعنوان ژن خانه دار در مطالعات بیان ژن استفاده نمود.

### آنالیزهای آماری داده‌ها

آنالیزهای آماری این پروژه با استفاده از نرم‌افزار GraphPad Prism version 9.00 انجام گرفت. داده‌ها به صورت میانگین  $\pm$  انحراف استاندارد (SD) از دو یا سه آزمایش مستقل ارائه شدند و از آزمون t-test جهت آنالیز آماری تغییرات داده‌ها استفاده گردید. مقادیر P-value کمتر از ۰/۰۵ از منظر آماری با معنی در نظر گرفته شدند.

### یافته‌ها

#### بررسی مورفولوژی سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از مغز استخوان موشی

نتایج مربوط به کشت اولیه سلول‌های مزانشیمی مغز استخوان نشان می‌دهد که سلول‌ها مورفولوژی مشابه سلول‌های فیروبلاست و به شکل دوکی و کشیده دارند. سلول‌ها سالم و به کف فلاسک چسبیده بودند (شکل ۱).

#### نتایج مربوط به فلوسایتومتری نشانگرهای سطحی سلول‌های بنیادی مزانشیمی

با توجه به اینکه سلول‌های بنیادی مزانشیمی دارای نشانگرهای ویژه هستند، وجود برخی از این نشانگرها با روش فلوسایتومتری آنالیز شد. در این مطالعه بیان نشانگرهای سطحی CD44 و CD73 به عنوان نشانگرهای ویژه سلول‌های بنیادی مزانشیمی و نشانگر سلول‌های خونساز CD45 مورد بررسی قرار گرفت. نتایج مربوط به آنالیز فلوسایتومتری میزان بالای نشانگر سطحی CD44 (۹۸/۷ درصد) و CD73 (۹۹/۴ درصد) را برای سلول‌های مزانشیمی نشان داد، و بیان اندک نشانگر CD45 (۲/۵ درصد) نشان‌دهنده عدم آلودگی با سلول‌های خونی است. این نتایج اثبات‌کننده ماهیت صحیح سلول‌های بنیادی مزانشیمی جداسازی شده است (شکل ۲).

#### بررسی آگروزوم‌های سلول‌های بنیادی مزانشیمی جداسازی شده توسط آنالیز DLS

پراکندگی نور دینامیکی (DLS) روشی فیزیکی است که برای تعیین توزیع ذرات موجود در محلول‌ها و سوسپانسیون‌ها استفاده می‌شود (۲۰). این روش غیرمخرب و سریع برای تعیین اندازه ذرات در محدوده چند نانومتر تا میکرون به کار می‌رود. سایز آگروزوم‌ها توسط بررسی DLS ارزیابی شد. سنجش توزیع تعداد توسط DLS پیک حدوداً ۴۰ نانومتر را برای جمعیت آگروزوم‌های جداسازی شده نشان داد (شکل ۳).

### تعیین غلظت آگروزوم‌ها

اندازه‌گیری غلظت آگروزوم‌های استخراج شده با روش برادفورد انجام گرفت. بدین منظور ابتدا نمودار خطی حاصل از غلظت‌های متفاوت BSA ترسیم و معادله خط برای آن محاسبه شد. با قرار دادن مقدار جذب نمونه آگروزومی در معادله، غلظت آگروزوم‌ها معادل  $0.169 \text{ mg/ml}$  بدست آمد (شکل ۴).

### ارزیابی بیان ژن CDK4 در رده سلولی سرطان پستان 4T1 در پی تیمار با آگروزوم‌ها توسط Real-time PCR

به منظور بررسی اثرات آگروزوم‌های مشتق از سلول‌های بنیادی مزانشیمی بر سلول‌های توموری پستان 4T1، ابتدا سطح رونوشت ژن CDK4 در سلول‌های توموری 4T1 در پی تیمار با غلظت آگروزومی  $100$  میکروگرم بر میلی‌لیتر سنجیده شد. نتایج Real-time PCR نشان داد که آگروزوم‌های مشتق از سلول‌های بنیادی مزانشیمی منجر به کاهش معنی‌دار بیان سطوح رونوشت ژن CDK4 در سلول‌های 4T1 نسبت به گروه کنترل پس از  $24$  ساعت می‌شود (شکل ۵).

### بررسی میزان بقا و تکثیر رده سلولی سرطان پستان 4T1 در پی تیمار با آگروزوم‌ها

به منظور بررسی تکثیر رده سلولی سرطان پستان 4T1 تحت تیمار آگروزوم آزمون تکثیر سلولی انجام گرفت. از این رو سلول‌های 4T1 به تعداد مناسب در پلیت‌های  $12$  خانه کشت داده شدند. سپس سلول‌های گروه کنترل با PBS و گروه تیماری با آگروزوم‌ها با غلظت  $100$  میکروگرم بر میلی‌لیتر تحت تیمار و در بازه‌های زمانی صفر،  $24$  و  $48$  ساعت مورد بررسی قرار گرفتند. طبق بازه زمانی گفته شده سلول‌ها رنگ آمیزی شده و شمارش سلولی انجام شد. نتایج به دست آمده از این آزمایش نشان دهنده کاهش در صد میزان بقا و تکثیر سلول‌ها در سلول‌های 4T1 بعد از  $24$  ساعت ( $5/65 \pm 24\%$ ) در مقایسه با گروه کنترل ( $3/52 \pm 39\%$ ) و بعد از  $48$  ساعت ( $4/47 \pm 41\%$ ) در مقایسه با گروه کنترل ( $3/67 \pm 63\%$ ) پس از تیمار با آگروزوم‌ها می‌باشد (شکل ۶).

### بررسی میزان مهاجرت سلول‌های توموری پستان در پی تیمار با آگروزوم‌ها توسط آزمون خراش

به منظور بررسی اثر آگروزوم‌ها در مهاجرت سلول‌های 4T1 از آزمون خراش استفاده شد. آنالیز نتایج این تست که به صورت مجموعه‌ای از عکس‌ها گردآوری شده و مقایسه آنها باهم انجام گرفت به صورت مشخص نشان دهنده کاهش مهاجرت سلول‌ها در سلول‌های 4T1 بعد از  $12$  ساعت (درصد پرشدن خراش  $5/33 \pm 25\%$ ) در مقایسه با گروه کنترل ( $9/62 \pm 56\%$ ) و بعد از  $24$  ساعت (درصد پرشدن خراش  $5/13 \pm 45\%$ ) در مقایسه با گروه کنترل ( $2/82 \pm 95\%$ ) پس از تیمار با آگروزوم‌ها می‌باشد (شکل ۷). و این نتایج به دست آمده نشان داد که در گروه تیماری با آگروزوم‌ها، به صورت معناداری میزان مهاجرت سلولی 4T1 کاهش و تیمار مورد نظر مانع از بسته شدن شکاف شده و به عبارت دیگر مهاجرت سلولی را مهار کرده است.

## بررسی میزان مهاجرت سلول‌های توموری پستان در پی تیمار با آگزوزوم‌ها توسط ازومون ترانسول *transwell*

مطابق با نتایج ازومون خراش، سنجش مهاجرت با استفاده از *transwell* های chamber نشان داد که مهاجرت سلول‌های 4T1 از طریق غشاهای *transwell* در حضور تیمار آگزوزومی (100 µg/ml) در مقایسه با گروه کنترل به صورت معناداری کاهش یافت (شکل ۸).

### بحث:

امروزه سرطان به عنوان یک موضوع مهم در حوزه بهداشت و سلامت جوامع مطرح است. در میان انواع این بیماری، درمان سرطان با ترکیبی از شیمی‌درمانی، ایمونوتراپی، پرتودرمانی و جراحی انجام می‌شود. اما این درمان‌ها محدودیت‌های خاص خود را دارند و نمی‌توانند به طور اختصاصی سلول‌های سرطانی را مورد هدف‌گیری قرار دهند. بنابراین میزان مرگ و میر در بیماران سرطانی همچنان بالا است که نشان‌دهنده کارآمدی ناکافی این راهکارهای درمانی است (۲۲،۱).

در سال‌های اخیر از سلول‌های بنیادی مزانشیمی (MSCs) در استراتژی‌های درمانی جدید برای طیف وسیعی از بیماری‌ها استفاده شده است. در بخشی از این رویکرد‌ها از فعالیت پاراکرین این سلول‌ها به ویژه ترشحات آگزوزومی آن‌ها استفاده شده است. تحقیقات متعددی اثرات آگزوزوم‌های مشتق از MSCs را بر رشد سرطان مورد بررسی قرار داده‌اند، با این حال، نتایج بحث‌برانگیزی همیشه ظاهر شده است (۳۴،۲). بسیاری از مطالعات نشان داده‌اند که آگزوزوم‌های مشتق از سلول‌های بنیادی مزانشیمی اثرات متفاوتی بر سلول‌های سرطانی دارند. علت اصلی این تفاوت اثر، در مطالعات مختلف، به منشأ سلول‌های بنیادی مزانشیمی بر می‌گردد. این مسئله که آگزوزوم‌های سلول‌های بنیادی مزانشیمی باعث مهار یا پیشرفت سرطان شوند، علاوه بر بافت منشأ آنها، به ویژگی‌های دیگری از جمله ترشحات اختصاصی سلول‌های بنیادی مزانشیمی، نوع سرطان، رده سلول سرطانی و همچنین شرایط آزمایشگاهی بستگی دارد (۵). مطالعات اخیر نشان داده‌اند که آگزوزوم‌های مشتق از MSCs در مقاومت دارویی سرطان، ایمونوتراپی و مقاومت در برابر رادیوتراپی از طریق مکانیسم‌های پیچیده‌ای از جمله فرار از آپوپتوز، تعدیل سلول‌های بنیادی سرطانی و تنظیم کمون سرطان شرکت می‌کنند (۳۵،۱۴). به همین جهت با توجه به اهمیت آگزوزوم‌های مشتق از سلول‌های بنیادی مزانشیمی، در این مطالعه تلاش بر این بود که اثر آگزوزوم‌های مشتق شده از سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان بر تکثیر و مهاجرت در رده سلول‌های سرطانی پستان 4T1 بررسی شود.

نتایج به دست آمده در این مطالعه نشان داد که تیمار سلول‌های سرطان پستان با آگزوزوم‌های سلول‌های بنیادی مزانشیمی باعث کاهش تکثیر و مهاجرت سلولی به صورت وابسته به زمان شد. مشابه با نتایج این پژوهش، لی و همکارانش گزارش کردند که متعاقب تیمار سلول‌های گلیوما توسط آگزوزوم‌های مشتق از سلول‌های بنیادی مزانشیمی، نه تنها میزان تکثیر سلول‌ها به صورت معناداری کاهش می‌یابد بلکه میزان مهاجرت آن‌ها نیز به طور قابل توجهی مهار می‌شود (۱۰). علاوه بر این، Shang و همکاران دریافتند که آگزوزوم‌های مشتق از سلول‌های بنیادی مزانشیمی تکثیر و مهاجرت در سرطان پانکراس را مهار می‌کند (۲۳). Xu و همکاران کشف کردند که در سرطان گلیوما، تیمار با آگزوزوم‌های سلول‌های بنیادی مزانشیمی به واسطه مهار کردن مسیر سیگنالینگ Wnt/β-catenin از طریق کاهش سطح بیان EZH2 در سلول‌های سرطانی باعث مهار تکثیر این سلول‌ها و در نتیجه باعث کاهش رشد تومور می‌گردد (۳۳). همچنین ثابت شد که آگزوزوم‌های سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان متاستاز سرطان پستان را کاهش می‌دهد (۱۷،۴). در همین رابطه، نشان داده شده است که آگزوزوم‌های مشتق شده از سلول‌های بنیادی مزانشیمی می‌توانند با مهار تکثیر و القای آپوپتوز در در سلول‌های سرطانی رشد تومور را

سرکوب کنند (۳۱،۲۵،۱۲،۵). هم‌چنین در سال ۲۰۱۷ پاکروان و همکاران نشان دادند که تیمار سلول‌های سرطان پستان با آگروزوم‌های مشتق شده از سلول‌های بنیادی مزانشیمی ممکن است از طریق تعدیل مسیر سیگنالینگ-mTOR/HIF-1 $\alpha$ /VEGF بر رگزایی توموری تأثیر بگذارد (۱۹). این فرضیه توسط گروه دیگری نیز تأیید شد. لی و همکاران نشان دادند که آگروزوم‌های مشتق شده از سلول‌های بنیادی مزانشیمی به طور قابل توجهی بیان VEGF در سلول‌های سرطان پستان را کاهش می‌دهد (۱۱).

در این مطالعه بیان ژن CDK4 در سلول‌های سرطان پستان 4T1 مورد بررسی قرار گرفت و نتایج نشان داد که هنگامی که رده سلولی 4T1 در معرض آگروزوم‌های مشتق شده از سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان قرار می‌گیرد، بیان ژن مذکور کاهش می‌یابد. CDK4 یکی از ژن‌های تنظیم‌کننده‌ی چرخه‌ی سلولی است که به عنوان انکوژن عمل می‌کند به طوری که میزان بیان آن در انواع مختلف سرطان از جمله سرطان پستان افزایش یافته و باعث تسریع در انتقال سلول از فاز G1 به فاز S می‌شود و بدین ترتیب، در افزایش تکثیر سلولی ایفای نقش می‌کند (۱۳). کاهش بیان CDK4 منجر به مهار تکثیر و توقف چرخه‌ی سلولی در فاز G1/S می‌شود. علاوه بر این، مهار بیان این ژن می‌تواند مسیر P13K/AKT را مهار کرده و با القای توقف چرخه سلولی مانع پیشرفت سرطان شود (۵). یکی از مطالعات در این زمینه نشان داد که مهار بیان CDK4 در رده سلولی سرطان پستان منجر به کاهش مهاجرت و فعالیت سلولی شبه بنیادی می‌شود (۹). همچنین مطالعه دیگری نشان داد که مهار بیان CDK4 در رده سلولی سرطان ریه A549 نه تنها از پیشرفت چرخه سلولی جلوگیری می‌کند، بلکه به طور چشمگیری تکثیر سلولی، تشکیل کلونی و مهاجرت را سرکوب می‌کند (۱۶). بنابراین، می‌توان پیشنهاد داد که تیمار با آگروزوم‌های مشتق شده از سلول‌های مزانشیمی مغز استخوان ممکن است از طریق کاهش بیان ژن CDK4 باعث مهار تکثیر و مهاجرت سلول‌ها شود.

#### نتیجه‌گیری

اگرچه ممکن است مکانیسم‌های متعددی در ریزمحیط سرطان پستان درگیر باشند، این مطالعه به جنبه‌ای مهم از بیولوژی سرطان یعنی ارتباطات بین سلولی می‌پردازد که در آن سلول‌های بنیادی مزانشیمی از طریق ترشح آگروزوم‌ها می‌توانند بعنوان یک تعدیل‌کننده در زمینه تکثیر و مهاجرت سلول‌های سرطانی پستان عمل نمایند.

#### تشکر و قدردانی

مطالعه حاضر حاصل بخشی از رساله دکتری رشته ژنتیک دانشگاه تربیت مدرس می‌باشد. نویسندگان مراتب تشکر و قدردانی خود را نسبت به همکاران اعلام می‌دارند.

#### تضاد منافع

نویسندگان اعلام می‌کنند که در این مطالعه، هیچ تضاد منافی وجود ندارد.

## منابع

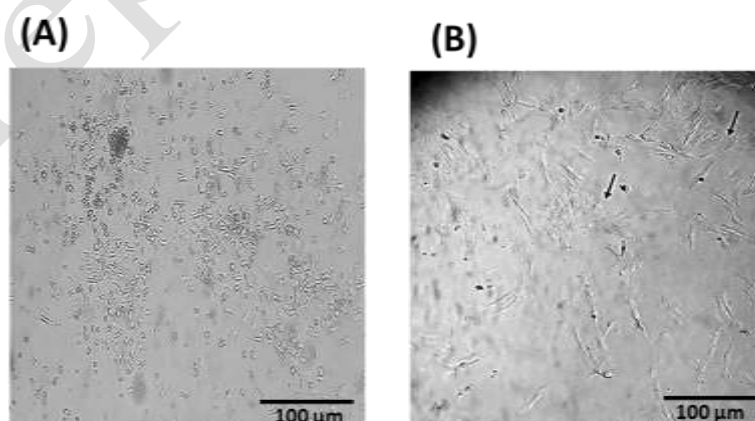
۱. دهقانی، سوده، سلیمی، مونا، & نیکونهادلطف آبادی. (۲۰۱۹). بررسی اثر ضد توموری ترکیب شیمیایی N((پنج- نیترو تیوفن ۲- (۲- ۲-متیلن) -۲- فنیل تیو) بنزوهیدرازید در مدل موشی سرطان پستان. پژوهش‌های سلولی و مولکولی (مجله زیست‌شناسی ایران)، ۳۲(۲)، ۱۹۸-۲۰۷.
۲. علیمزادی، سی سخت نژاد، اکرمی، & حسن. (۲۰۱۸). بررسی اثر تیموکوئینون بر بیان ژن‌های iNos و Cox-1 در سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق شده از مغز استخوان موش. پژوهش‌های سلولی و مولکولی (مجله زیست‌شناسی ایران)، ۳۱(۳)، ۳۴۸-۳۶۰.
3. Baharara, J., Farrokhyar, S., Eidi, A., & HAYATI, N. (2020). The effect of exosomes derived from bone marrow stem cells on the levels of estradiol and testosterone secreted from the ovarian granulosa cells of immature NMRI mice. *Developmental Biology*, 12(4), 1-8.
4. Bliss, S. A., Sinha, G., Sandiford, O. A., Williams, L. M., Engelberth, D. J., Guiro, K., ... & Rameshwar, P. (2016). Mesenchymal stem cell-derived exosomes stimulate cycling quiescence and early breast cancer dormancy in bone marrow. *Cancer research*, 76(19), 5832-5844.
5. Del Fattore, A., Luciano, R., Saracino, R., Battafarano, G., Rizzo, C., Pascucci, L., ... & Muraca, M. (2015). Differential effects of extracellular vesicles secreted by mesenchymal stem cells from different sources on glioblastoma cells. *Expert opinion on biological therapy*, 15(4), 495-504.
6. Dinicola, S., Cucina, A., Antonacci, D., & Bizzarri, M. (2014). Anticancer effects of grape seed extract on human cancers: a review. *J Carcinog Mutagen S*, 8(005).
7. Feng, Y., Spezia, M., Huang, S., Yuan, C., Zeng, Z., Zhang, L., ... & Ren, G. (2018). Breast cancer development and progression: Risk factors, cancer stem cells, signaling pathways, genomics, and molecular pathogenesis. *Genes & diseases*, 5(2), 77-106.
8. Hall, B., Andreeff, M., & Marini, F. (2007). The participation of mesenchymal stem cells in tumor stroma formation and their application as targeted-gene delivery vehicles. *Bone marrow-derived progenitors*, 263-283.
9. Lamb, R., Lehn, S., Rogerson, L., Clarke, R. B., & Landberg, G. (2013). Cell cycle regulators cyclin D1 and CDK4/6 have estrogen receptor-dependent divergent functions in breast cancer migration and stem cell-like activity. *Cell cycle*, 12(15), 2384-2394.
10. Lee, H. K., Finnis, S., Cazacu, S., Bucris, E., Ziv-Av, A., Xiang, C., ... & Brodie, C. (2013). Mesenchymal stem cells deliver synthetic microRNA mimics to glioma cells and glioma stem cells and inhibit their cell migration and self-renewal. *Oncotarget*, 4(2), 346.
11. Lee, J. K., Park, S. R., Jung, B. K., Jeon, Y. K., Lee, Y. S., Kim, M. K., ... & Kim, C. W. (2013). Exosomes derived from mesenchymal stem cells suppress angiogenesis by down-regulating VEGF expression in breast cancer cells. *PLoS one*, 8(12), e84256.
12. Liu, Y., Song, B., Wei, Y., Chen, F., Chi, Y., Fan, H., ... & Ma, F. (2018). Exosomes from mesenchymal stromal cells enhance imatinib-induced apoptosis in human leukemia cells via activation of caspase signaling pathway. *Cytotherapy*, 20(2), 181-188.
13. Mansourabadi, A. H., Aghamajidi, A., Faraji, F., Taghizadeh, S., Mohamed Khosroshahi, L., Bahramkiya, M., & Azimi, M. (2022). Mesenchymal stem cells-derived exosomes inhibit the

- expression of Aquaporin-5 and EGFR in HCT-116 human colorectal carcinoma cell line. *BMC Molecular and Cell Biology*, 23(1), 40.
14. Marleau, A. M., Chen, C. S., Joyce, J. A., & Tullis, R. H. (2012). Exosome removal as a therapeutic adjuvant in cancer. *Journal of translational medicine*, 10(1), 1-12.
  15. Matthews, H. K., Bertoli, C., & de Bruin, R. A. (2022). Cell cycle control in cancer. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 23(1), 74-88.
  16. McKee, C., & Chaudhry, G. R. (2017). Advances and challenges in stem cell culture. *Colloids and surfaces B: Biointerfaces*, 159, 62-77.
  17. Ono, M., Kosaka, N., Tominaga, N., Yoshioka, Y., Takeshita, F., Takahashi, R. U., ... & Ochiya, T. (2014). Exosomes from bone marrow mesenchymal stem cells contain a microRNA that promotes dormancy in metastatic breast cancer cells. *Science signaling*, 7(332), ra63-ra63.
  18. Otto, T., & Sicinski, P. (2017). Cell cycle proteins as promising targets in cancer therapy. *Nature Reviews Cancer*, 17(2), 93-115.
  19. Pakravan, K., Babashah, S., Sadeghizadeh, M., Mowla, S. J., Mossahebi-Mohammadi, M., Ataei, F., ... & Javan, M. (2017). MicroRNA-100 shuttled by mesenchymal stem cell-derived exosomes suppresses in vitro angiogenesis through modulating the mTOR/HIF-1 $\alpha$ /VEGF signaling axis in breast cancer cells. *Cellular oncology*, 40, 457-470.
  20. Sandfeld-Paulsen, B., Jakobsen, K. R., Bæk, R., Folkersen, B. H., Rasmussen, T. R., Meldgaard, P., ... & Sorensen, B. S. (2016). Exosomal proteins as diagnostic biomarkers in lung cancer. *Journal of Thoracic Oncology*, 11(10), 1701-1710.
  21. Santo, L., Siu, K. T., & Rajee, N. (2015, December). Targeting cyclin-dependent kinases and cell cycle progression in human cancers. In *Seminars in oncology* (Vol. 42, No. 6, pp. 788-800). WB Saunders.
  22. Schirmacher, V. (2019). From chemotherapy to biological therapy: A review of novel concepts to reduce the side effects of systemic cancer treatment. *International journal of oncology*, 54(2), 407-419.
  23. Shang, S., Wang, J., Chen, S., Tian, R., Zeng, H., Wang, L., ... & Zuo, C. (2019). Exosomal miRNA-1231 derived from bone marrow mesenchymal stem cells inhibits the activity of pancreatic cancer. *Cancer medicine*, 8(18), 7728-7740.
  24. Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R. L., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A., & Bray, F. (2021). Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: a cancer journal for clinicians*, 71(3), 209-249.
  25. Takahara, K., Ii, M., Inamoto, T., Nakagawa, T., Ibuki, N., Yoshikawa, Y., ... & Azuma, H. (2016). microRNA-145 mediates the inhibitory effect of adipose tissue-derived stromal cells on prostate cancer. *Stem cells and development*, 25(17), 1290-1298.
  26. Théry, C., Amigorena, S., Raposo, G., & Clayton, A. (2006). Isolation and characterization of exosomes from cell culture supernatants and biological fluids. *Current protocols in cell biology*, 30(1), 3-22.
  27. Ullah, I., Subbarao, R. B., & Rho, G. J. (2015). Human mesenchymal stem cells-current trends and future prospective. *Bioscience reports*, 35(2), e00191.
  28. Weinberg, R. A., & Weinberg, R. A. (2006). *The biology of cancer*. WW Norton & Company.
  29. Weng, Y., Sui, Z., Shan, Y., Hu, Y., Chen, Y., Zhang, L., & Zhang, Y. (2016). Effective isolation of exosomes with polyethylene glycol from cell culture supernatant for in-depth proteome profiling. *Analyst*, 141(15), 4640-4646.

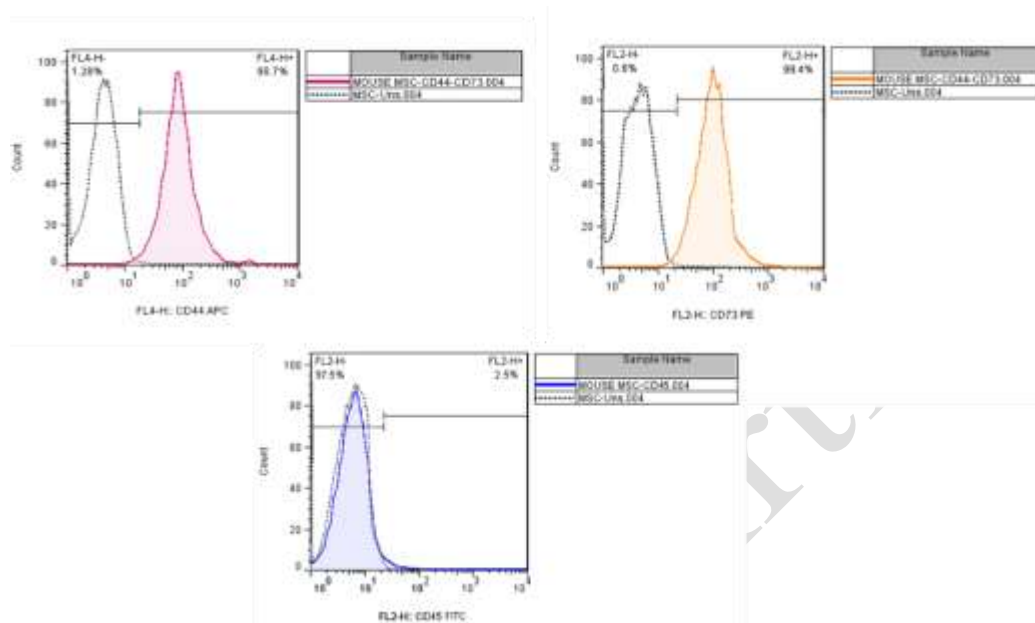
30. Wu, A., Wu, B., Guo, J., Luo, W., Wu, D., Yang, H., ... & Yang, Z. (2011). Elevated expression of CDK4 in lung cancer. *Journal of translational medicine*, 9(1), 1-9.
31. Wu, S., Ju, G. Q., Du, T., Zhu, Y. J., & Liu, G. H. (2013). Microvesicles derived from human umbilical cord Wharton's jelly mesenchymal stem cells attenuate bladder tumor cell growth in vitro and in vivo. *PloS one*, 8(4), e61366.
32. Wu, X. B., Liu, Y., Wang, G. H., Xu, X., Cai, Y., Wang, H. Y., ... & Jin, J. D. (2016). Mesenchymal stem cells promote colorectal cancer progression through AMPK/mTOR-mediated NF- $\kappa$ B activation. *Scientific reports*, 6(1), 21420.
33. Xu, H., Zhao, G., Zhang, Y., Jiang, H., Wang, W., Zhao, D., ... & Qi, L. (2019). Mesenchymal stem cell-derived exosomal microRNA-133b suppresses glioma progression via Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway by targeting EZH2. *Stem cell research & therapy*, 10(1), 1-14.
34. Yassine, S., & Alaaeddine, N. (2022). Mesenchymal stem cell exosomes and cancer: controversies and prospects. *Advanced Biology*, 6(2), 2101050.
35. Zhao, R., Chen, X., Song, H., Bie, Q., & Zhang, B. (2020). Dual role of MSC-derived exosomes in tumor development. *Stem Cells International*, 2020.

جدول ۱: خصوصیات پرایمرهای مورد استفاده برای Real-time PCR.

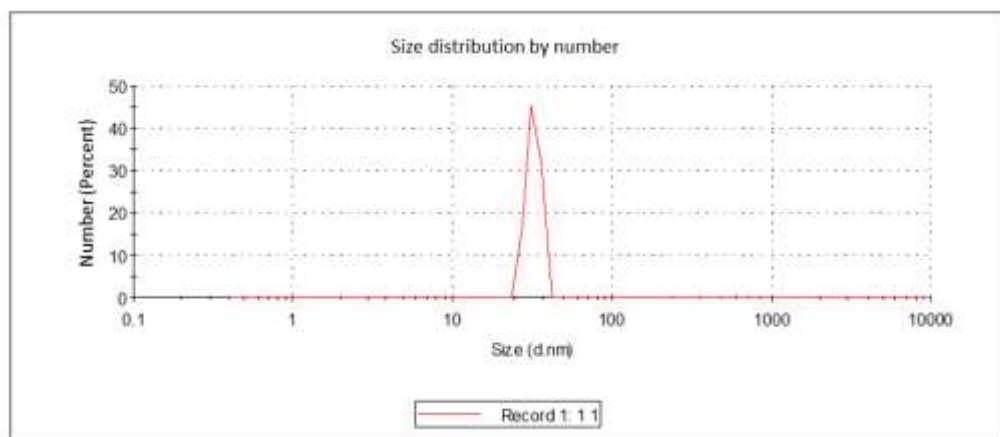
محصول PCR	توالی	ژن
۱۲۰ (bp)	Forward, 5'-AGCTCCTGAAGTTCTTCTGCA-3' Reverse, 5'-TCGGCTTCAGAGTTTCCACA-3'	<b>CDK4</b>
۱۰۷ (bp)	Forward, 5'-TGGTCTTTCTGGTGCTTGTC-3' Reverse, 5'-TATGTTCGGCTTCCCATTCTC-3'	<b><math>\beta</math>2M</b>



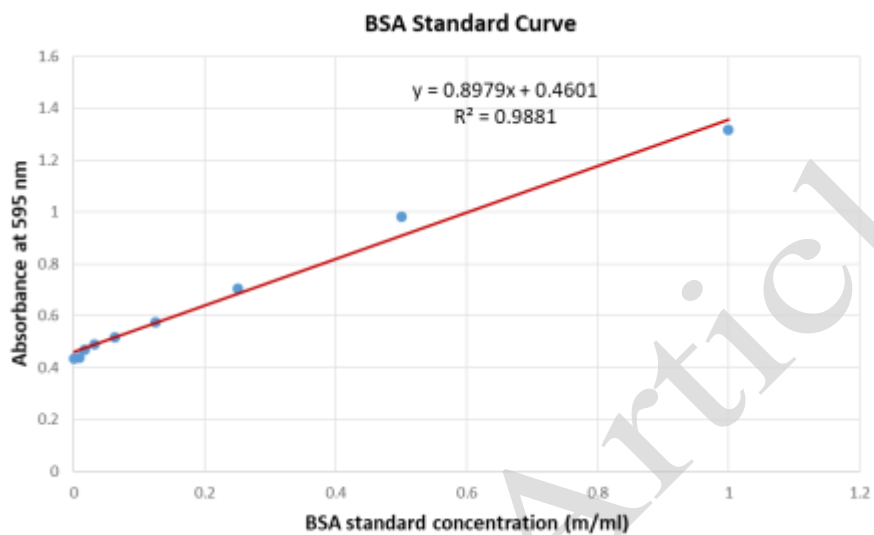
شکل ۱: کشت اولیه و مورفولوژی سلول‌های بنیادی مزانشیمی (A). کشت اولیه سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از مغز استخوان موشی بعد از ۴۸ ساعت کشت سلولی و تعویض محیط کشت. (B) مورفولوژی همه سلول‌ها در پاساژ دوم مشابه سلول‌های فیروبلاست و به شکل دوکی شکل و چسبنده کف فلاسک مشاهده می‌شوند.



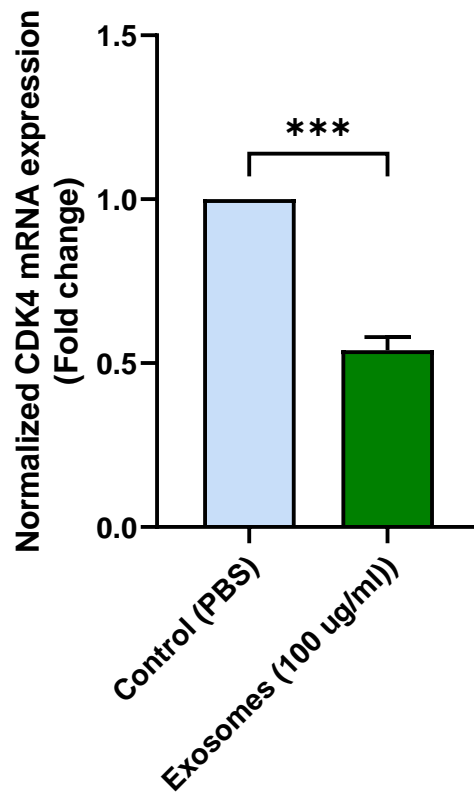
شکل ۲: نتایج مربوط به فلوسایتمتری نشانگرهای سطحی سلول‌های بنیادی مزانشیمی جدا شده از مغز استخوان موشی. نتایج فلوسایتمتری بیان مثبت نشانگرهای سطحی CD44 و CD73 و فقدان بیان نشانگر CD45 را برای سلول‌های بنیادی مزانشیمی نشان می‌دهد. نتایج حاکی از صحت ماهیت سلول‌های بنیادی مزانشیمی جدا سازی شده از مغز استخوان موش است.



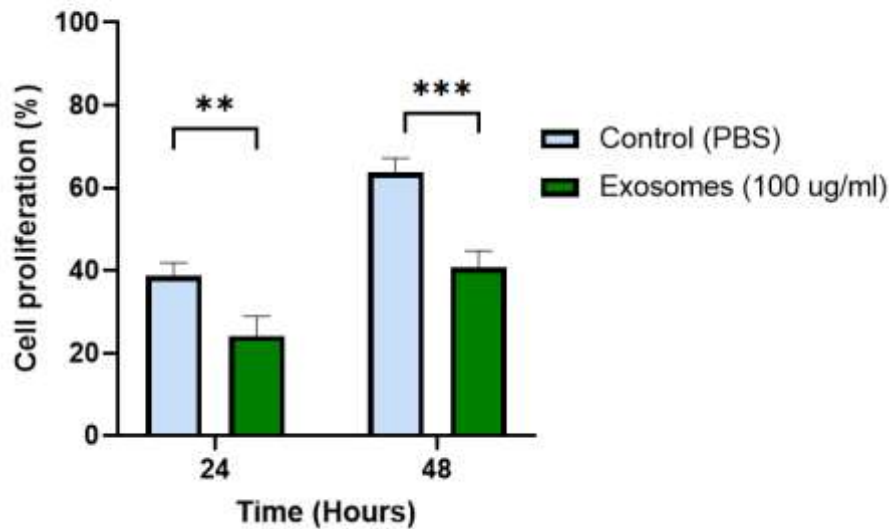
شکل ۳: بررسی آگروزوم‌های سلول‌های بنیادی مزانشیمی جدا سازی شده توسط آنالیز پراکنندگی نور دینامیکی (DLS). نمودار سنجش توزیع اندازه آگروزوم‌ها توسط DLS، توزیع سایز آگروزوم‌ها با پیک ذراتی با سایز حدوداً ۴۰ نانومتر را نشان می‌دهد.



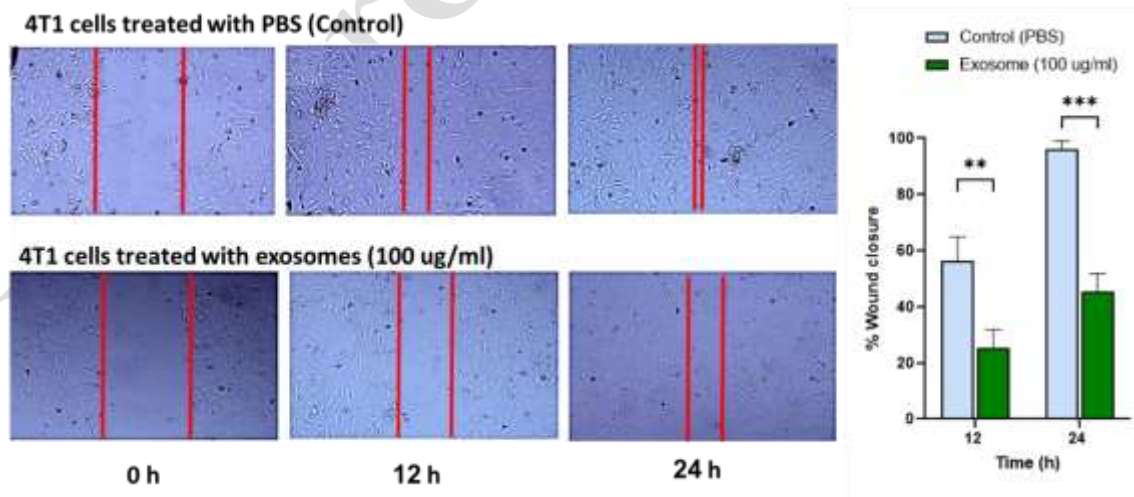
شکل ۴: آزمون برادفورد برای تعیین غلظت آگزوزوم‌های جداسازی شده. جهت تعیین غلظت آگزوزوم‌های جداسازی شده با قرار دادن مقدار جذب نمونه آگزوزومی ( $OD=0.605$ ) در معادله خطی در نمودار استاندارد، غلظت آگزوزوم‌ها معادل  $0.169 \text{ mg/ml}$  بدست آمد.



شکل ۵: بررسی کمی سطوح بیان رونوشت‌های CDK4 در رده سلولی سرطان پستان 4T1 در پی تیمار با آگزوزوم‌ها توسط Real-time PCR. سلول‌های 4T1 در گروه تست با غلظت آگزوزومی ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر و در گروه کنترل با PBS تیمار شد. پس از ۲۴ ساعت سطوح رونوشت ژن CDK4 توسط Real-time PCR اندازه‌گیری و با بیان ژن B2M نرمالایز شد. تیمار آگزوزومی منجر به کاهش معنی‌دار بیان سطوح رونوشت ژن CDK4 در سلول‌های 4T1 شد. داده‌ها به صورت میانگین  $\pm$  انحراف معیار (n = 3) ارائه شده است.  $***P < 0.001$

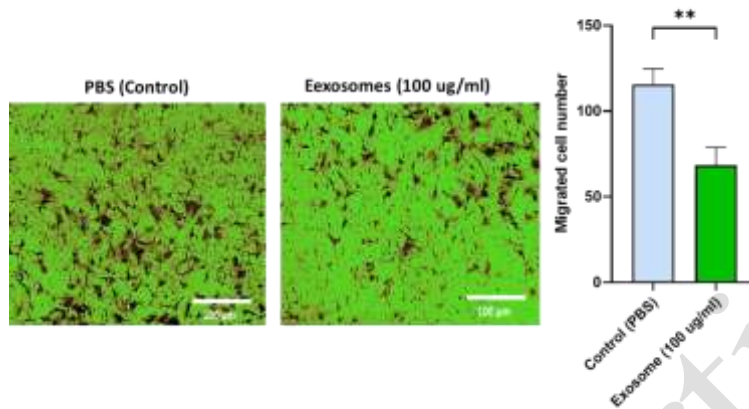


شکل ۶: بررسی میزان تکثیر و بقای سلولی توسط شمارش سلول‌های زنده در بازه‌های زمانی صفر، ۲۴ و ۴۸ ساعت. تیمار آگروزومی باعث کاهش وابسته به زمان نرخ تکثیر سلول‌های توموری شده است. داده‌ها به صورت میانگین  $\pm$  انحراف معیار ( $n = 3$ ) ارائه شده است.  $**P < 0.01$  و  $***P < 0.001$



شکل ۷: بررسی مهاجرت سلولی توسط آزمون خراش. آزمون خراش برای بررسی اثر مهاجرت آگروزوم‌های مشتق از سلول‌های بنیادی مزانشیمی بر مهاجرت سلول‌های توموری انجام شد. شکل پایین قابلیت مهاجرت سلول‌های گروه کنترل را نشان می‌دهد این در حالی است که در شکل بالا تیمار آگروزوم‌ها توانایی مهاجرت سلول‌های توموری را کاهش داده است. آنالیز شماتیک میکروگراف‌ها توسط نرم افزار Image J انجام شد. شکل سمت

راست نمایش کمی داده ها در آزمون خراش را نشان می دهد که نشان دهنده اثر مهارى آگزوزوم ها بر میزان مهاجرت سلول های سرطانی پستان می باشد. داده ها به صورت میانگین  $\pm$  انحراف معیار (n = 3) ارائه شده است.  $**P < 0.01$  و  $***P < 0.001$



شکل ۸: بررسی توانایی مهاجرت سلول های توموری 4T1 پس از تیمار با آگزوزومها توسط آزمون Transwell. تیمار با آگزوزومهای مشتق شده از سلول های مزانشیمی باعث کاهش معنی داری در توانایی مهاجرت سلولی 4T1 شد. شکل سمت راست نمایش کمی داده ها در آزمون Transwell را نشان می دهد که نشان دهنده اثر مهارى آگزوزوم ها بر میزان مهاجرت سلول های سرطانی پستان می باشد. داده ها به صورت میانگین  $\pm$  انحراف معیار (n = 3) ارائه شده است.  $**P < 0.01$