بررسی بیان شاخص‌های بنیادینگی ALDH1 و CD133 در رده‌های سلولی ملانوما A375 و D10

مهرداد نصرالله زاده ثابت: دکترای تخصصی پزشکی مولکولی، دپارتمان پزشکی مولکولی، دانشکده فناوری‌های نوین پزشکی و مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران. Dr.m.sabet@gmail.com

راحله رودی: دکترای تخصصی پزشکی مولکولی، مرکز تحقیقات آسیب شناسی و سرطان، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران. Raheleroudi@gmail.com

مرضیه ابراهیمی: دانشیار گروه سلول‌های بنیادی و زیست‌شناسی تکوینی، مرکز تحقیقات علوم سلولی، پژوهشکده زیست‌شناسی و فناوری سلول‌های بنیادی جهاد دانشگاهی، پژوهشگاه رویان، تهران، ایران. Marzieh.ebrahimi@gmail.com

علی صمدی کوچکسرایی: دانشیار گروه بیوتکنولوژی پزشکی و مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران. Samadikuchaksaraei@yahoo.com

مطهره رجبی فومشی: کارشناسی ارشد زیست‌شناسی علوم جانوری، گروه سلول‌های بنیادی و زیست‌شناسی تکوینی، مرکز تحقیقات علوم سلولی، پژوهشکده زیست‌شناسی و فناوری سلول‌های بنیادی جهاد دانشگاهی، پژوهشگاه رویان، تهران، ایران. M.rajabi.2627@gmail.com

* **زهرا مجد:** دانشیار، مرکز تحقیقات آسیب شناسی و سرطان، دپارتمان پزشکی مولکولی، دانشکده فناوری‌های نوین پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران (*نویسنده مسئول) zahra.madjd@yahoo.com, madjd.z@iums.ac.ir.

تاریخ دریافت: ۹۲/۱۰/۴ تاریخ پذیرش: ۹۳/۲/۱۴

چکیده

زمینه و هدف: سلول‌های بنیادی سرطان در تهاجم و متاستاز ملانوما، کشنده‌ترین و تهاجمی‌ترین شکل سرطان پوست، دخیل می‌باشند. در پژوهش حاضر بیان شاخص‌های کاندید بنیادینگی CD133 و ALDH1 در رده‌های سلولی ملانوما ارزیابی و سپس جداسازی این سلول‌ها بر اساس بیان این شاخص‌ها بررسی شد.

روش کار: در این مطالعه بیان شاخص‌های ALDH1 و CD133 در رده‌های سلولی A375 و D10 با استفاده از روش فلوسایتومتری ارزیابی شد. سپس رده‌ی سلولی و شاخص مناسب انتخاب و سلول‌ها بر اساس بیان و عدم بیان شاخص موردنظر به دو جمعیت مثبت و منفی جداسازی شدند.

یافته‌ها: نتایج این مطالعه نشان داد که شاخص ALDH1 به میزان ٪۷/۸۸±۵۵/۷ و ٪۶/۴۳± ۴۹/۹ به ترتیب در رده‌های سلولی A375 و D10 بیان می‌شود، درحالی‌که شاخص CD133 تنها در رده‌ی سلولی D10 به میزان ٪۲/۸۳ ± ۲۶/۸ بیان شد. جداسازی بر اساس بیان ALDH1 در هر دو رده‌ی سلولی و بر اساس بیان CD133 در رده‌ی سلولی D10 با درصد خلوص بالا (>۹۰٪) انجام شد، ولی درصد خلوص جمعیت‌های $ALDH1^+$ و $ALDH1^-$ جداسازی شده بسیار پایین بود.

نتیجه‌گیری: یافته‌های این پژوهش نشان داد که جداسازی سلول‌ها بر اساس شاخص بنیادینگی CD133 در رده‌ی سلولی D10 به‌خوبی انجام‌شده و این شاخص می‌تواند به‌عنوان کاندید مناسب برای شناسایی سلول‌های بنیادی سرطان در این رده سلولی در نظر گرفته شود.

کلیدواژه‌ها: ملانوما، شاخص‌های بنیادینگی، CD133، ALDH1، A375، D10

مقدمه

ملانومای بدخیم تهاجمی‌ترین شکل سرطان پوست است و بر اساس گزارش‌های سازمان بهداشت جهانی مرگ‌ومیرهای ناشی از ملانوما با سرعت بیشتری نسبت به انواع دیگر سرطان در حال پیشرفت است. اگرچه ملانوما فقط ۴٪ از سرطان‌های پوستی را شامل می‌شود ولی مسئول ۷۴٪ از مرگ‌ومیرهای ناشی از سرطان پوست می‌باشد (۱). هنگامی‌که ملانوما به‌صورت بدخیم در می‌آید نسبت به درمان و آپوپتوز مقاوم می‌شود و به قسمت‌های عمیق پوست و همچنین اندام‌های داخلی بدن ازجمله طحال، کبد و گره‌های لنفی متاستاز می‌دهد. مطالعات اخیر نشان‌دهنده نقش سلول‌های بنیادی سرطان (Cancer Stem Cells) در پیشروی، عود و متاستاز سرطان و همچنین نقش آن‌ها در مقاومت‌های دارویی می‌باشد (۲). وجود تشابه در خصوصیات سلول‌های بنیادی سرطان با سلول‌های بنیادی نرمال (Normal stem cells) امکان شناسایی این سلول‌ها را فراهم می‌کند که از آن جمله بیان شاخص‌های سطحی مانند CD133 و ALDH1 است (۳). CD133 یک گلیکوپروتئین غشایی است که به‌طور نرمال در سلول‌های بنیادی هماتوپویتیک، سلول‌های پیش‌ساز اندوتلیال، سلول‌های بنیادی عصبی و

گلیالی بیان می‌شود. شاخص CD133 برای شناسایی سلول‌های بنیادی سرطان بسیاری از بدخیمی‌ها ازجمله مغز، کولون و ریه بکار گرفته شده است (۴-۶). در ملانوما اگرچه یک بررسی نشان می‌دهد که هر دو جمعیت سلولی بیان‌کننده و فاقد بیان CD133 ازلحاظ قدرت تومورزایی مشابه می‌باشند، مطالعه دیگر دلالت دارد که تنها سلول‌های با بیان بالای CD133 پتانسیل تومورزایی دارند (۷، ۸).

نقش آنزیم آلدهید دهیدروژناز (ALDH1) نیز به‌عنوان یک شاخص در سلول‌های بنیادی سرطان چندین بدخیمی ازجمله پانکراس، پستان، پروستات و ریه شناخته شده است. این عامل در اکسیداسیون آلدهیدها و تمایز اولیه سلول‌های بنیادی نقش ایفا می‌کند. همچنین مطالعات انجام‌شده در نمونه‌های ملانومای متاستازی و رده‌ی سلولی WM-266-4 (ملانومای متاستاز دهنده به گره لنفی) نشان می‌دهد که سلول‌هایی با فعالیت بالای ALDH1 دارای قابلیت خودنوزایی (Self-renewal) و غنی از سلول‌های آغازکننده تومور هستند، درحالی‌که سلول‌های با فعالیت پایین ALDH1دارای قدرت خودنوزایی بسیار کمی می‌باشند (۹، ۱۰).

با توجه به شیوع بالای ملانوما و قابلیت بسیار زیاد این تومور در متاستاز و تهاجم به سایر اندام‌ها و درنتیجه افزایش میزان مرگ‌ومیر ناشی از آن، شناسایی سلول‌های بنیادی سرطان ملانوما به‌منظور استفاده در درمان هدفمند سرطان حائز اهمیت می‌باشد؛ بنابراین مطالعه حاضر به بررسی بیان شاخص‌های بالقوه سلول‌های بنیادی سرطان CD133 و ALDH1 در دو رده سلولی ملانومای متاستاتیک A375 و D10 پرداخت، سپس جداسازی سلول‌های بنیادی سرطان در این رده‌های سلولی بر اساس بیان و عدم بیان این دو شاخص انجام شد.

روش‌کار

رده‌های سلولی مورد مطالعه: در این مطالعه از رده‌های سلولی A375 و D10 که از رده‌های سلولی ملانومای متاستاتیک هستند، استفاده شد که توسط اسپاگنولی از مرکز آنکولوژی بیمارستان وابسته به دانشگاه بازل سوئیس به آزمایشگاه سلول‌های بنیادی سرطان پژوهشگاه رویان اهدا گردید و در این آزمایشگاه موجود است.

کشت و پاساژ سلول‌ها: رده‌های سلولی A375 و D10، برای رشد و تکثیر در محیط مایع RPMI 1640 که به آن ۱۰٪ سرم (FBS)، ۱٪ گلوتامین، ۱٪ پنی‌سیلین/ استرپتومایسین و ۱٪ اسیدآمینه‌های غیرضروری اضافه شد، کشت داده شدند. جهت کشت سلول حدود ۱۵۰ هزار سلول زنده به فلاسکT-25 حاوی ۵ میلی لیتر محیط کشت انتقال داده شد. محیط کشت سلول‌ها هر ۴۸ ساعت تعویض و تقریباً پس از ۴ روز که سلول‌ها به انباشتگی حدود ۷۵٪ رسیدند، توسط تریپسین ۰/۰۵٪ جداسازی و منفرد شده و طبق شرایط قبل (۱۵۰ هزار سلول در فلاسک T-25 با ۵ میلی لیتر محیط کشت کامل) به ظروف کشت جدید انتقال داده شدند (جدول ۱).

بررسی بیان شاخص‌های ALDH1 و CD133 توسط تکنیک فلوسایتومتری: مراحل اولیه‌ی آماده‌سازی سلول‌ها جهت شناسایی میزان بیان این دو شاخص، به‌طور مشابه انجام شد که در طی آن ابتدا سلول‌های در حال کشت با انباشتگی حدود ۷۵٪، توسط آنزیم تریپسین از کف فلاسک

جدول ۱- مشخصات مواد مورد استفاده در کشت سلول‌ها

نام ماده	شماره کاتالوگ	شرکت سازنده
Liquid RPMI 1640	21870-025	GIBCO
L-glutamine	25030-081	GIBCO
Penicillin/streptomycin	15070-063	GIBCO
Non-essential amino acids	11140-035	GIBCO
Fetal bovine serum (FBS)	10270-16	GIBCO
Dulbecco's phosphate-buffered saline (DPBS)	21600-010	GIBCO
Trypsin-EDTA	15400-054	GIBCO

جدول ۲- آنتی‌بادی‌های مورد استفاده درروش فلوسایتومتری و جداسازی سلول‌ها

نام آنتی بادی	شماره کاتالوگ	شرکت سازنده
Anti-human CD133/2 (293C3)	130-090-853	Miltenyi Biotec
IgG2b-PE	130-092-215	Miltenyi Biotec
kitALDEFLUOR	01700	Stem Cell Technologies, Vancouver

جدا، منفردسازی و شمارش شدند. مراحل بعدی آماده‌سازی سلول‌ها به‌طور متفاوت انجام شد. جهت بررسی بیان ALDH1 از کیت (StemCell Technologies, Vancouver, Canada) (ALDEFLUOR) استفاده و مراحل آماده‌سازی نمونه‌ها طبق دستورالعمل کیت انجام شد. سپس نمونه‌ها توسط دستگاه FACSAria II (Becton, Dickinsonand Company, USA) موردبررسی قرار گرفت. اطلاعات حاصل توسط نرم‌افزار Flowing software آنالیز شد.

جهت بررسی بیان CD133، پس از شمارش، ۱۵×۱۰^{۴} عدد سلول زنده به لوله‌ی ۵ میلی‌لیتری مخصوص فلوسایتومتری انتقال و حجم مخلوط سلولی توسط PBS^{-} به ۱۰۰ میکرولیتر رسانده شد. به لوله تست ۳ میکرولیتر از آنتی‌بادیCD133 ؛ و به لوله کنترل نیز ۳ میکرولیتر ایزوتیپ کنترل آنتی بادی CD133 نیز اضافه گردید (جدول ۲). نمونه‌ها به مدت ۴۵ دقیقه روی یخ و در شرایط تاریکی انکوبه شد و سپس جهت شستشو به هر لوله حدود ۵۰۰ میکرولیتر PBS^{-} اضافه گردید و با سرعت rpm ۱۵۰۰ به مدت ۵ دقیقه و در دمای ۴ درجه‌ی سانتیگراد سانتریفیوژ شد. سپس نمونه‌ها توسط دستگاه فلوسایتومتری FACSAria II مورد بررسی قرار گرفت و اطلاعات حاصل توسط نرم‌افزار Flowing software آنالیز شد.

جداسازی سلول‌ها بر اساس شاخص‌های CD133 و ALDH1: جداسازی سلول‌ها بر اساس بیان این دو شاخص به‌طور متفاوت به شرح زیر انجام شد. جهت جداسازی سلول‌ها بر اساس بیان ALDH1 مشابه مراحل فلوسایتومتری برای شناسایی این شاخص، بر اساس روش ذکر شده در کیت ALDEFLUOR انجام شد. سپس نمونه‌ها توسط دستگاه FACSAria II خوانده شد و پس از تعیین جمعیت‌های سلولی مورد نظر، جداسازی انجام شد.

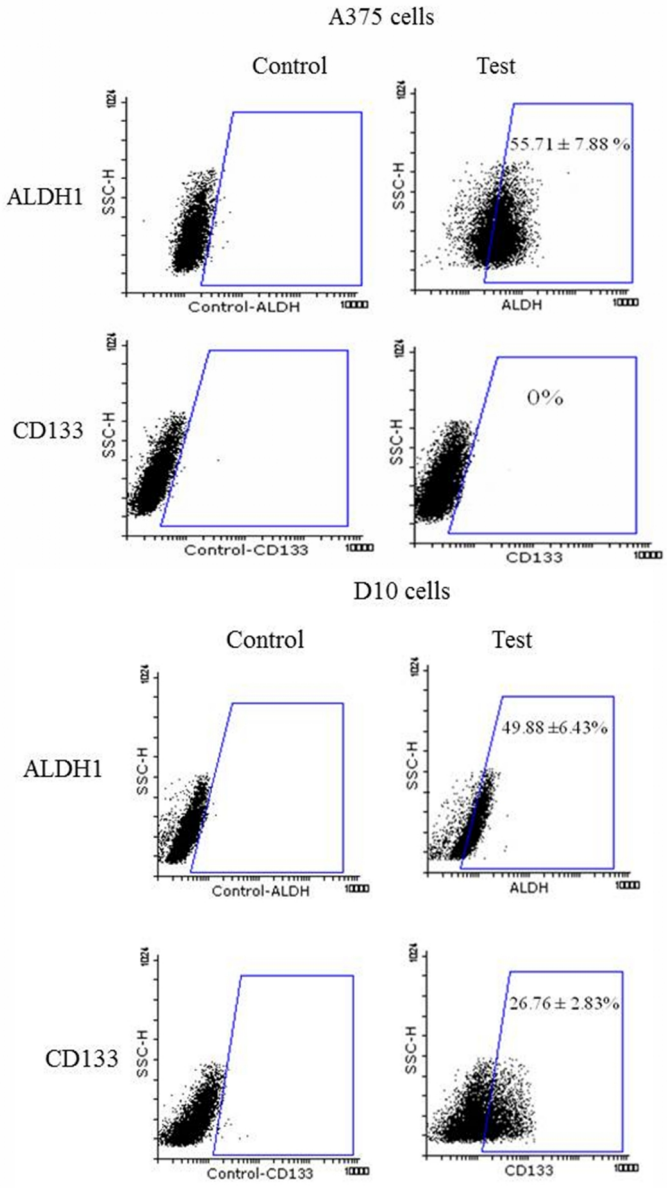
جهت جداسازی سلول‌ها بر اساس بیان CD133، ابتدا سلول‌ها توسط آنزیم تریپسین از کف فلاسک جدا و منفرد شدند و پس از خنثی‌سازی اثر آنزیم، شستشو (سانتریفیوژ: سرعت rpm ۱۵۰۰، ۵ دقیقه، دمای ۴ درجه‌ی سانتیگراد) و دور ریختن محیط رویی، حجم رسوب سلولی توسط محلول $PBS1X^{-}$ / FBS 2% به ۵/. میلی لیتر رسانده شد و پس از معلق‌سازی، سلول‌ها در این حجم شمارش شدند و به سه گروه تقسیم شدند که عبارتند از: ۱-گروه سلول‌های بدون رنگ‌آمیزی (حدود ۱۵۰×۱۰^{۳}) ۲-گروه کنترل ایزوتیپ که به آن ۳ میکرولیتر از ایزوتیپ کنترل آنتی‌بادی اضافه شد (حدود ۱۵۰×۱۰^{۳}) ۳- گروه تست که به آن ۳ میکرولیتر آنتی‌بادی CD133 به ازای هر $۱۰^{۶}$ عدد سلول اضافه شد. سپس تمام نمونه‌ها به مدت ۴۵ دقیقه بر روی یخ انکوبه شدند. پس از اتمام زمان انکوباسیون تمامی گروه‌ها توسط ۱ میلی لیتر محلول $PBS1X^{-}$ / FBS 2% شستشو داده شدند. (سانتریفیوژ: با سرعت rpm ۱۵۰۰ به مدت ۵ دقیقه در دمای ۴ درجه‌ی سانتیگراد). پس از شستشو محیط رویی تخلیه و رسوب سلولی نمونه‌ی تست در بافر مخصوص جداسازی معلق گردید (۱ میلی لیتر به ازای هر ۲×۱۰^{۶}) و در مرحله‌ی بعد جهت حذف تجمعات سلولی، سوسپانسیون سلولی از فیلتر مش عبور داده شد. سرانجام جمعیت‌های سلولی مورد نظر مشخص شد و توسط دستگاه FACSAria II جداسازی گردید.

یافته‌ها

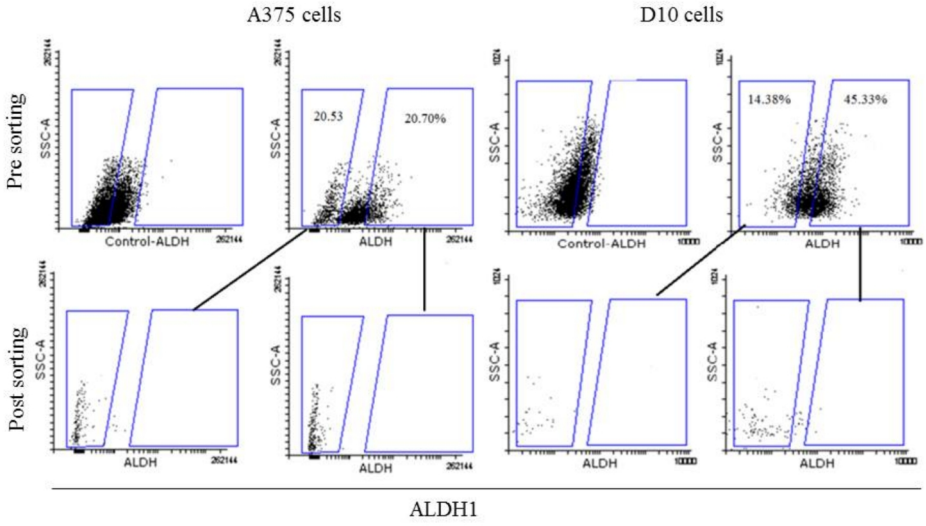
بررسی شاخص‌های ALDH1 و CD133 در رده‌های سلولی مورد مطالعه: میزان بیان شاخص‌های ALDH1 و CD133 در رده‌های سلولی مورد مطالعه شامل D10 و A375 توسط روش فلوسایتومتری مورد ارزیابی قرار گرفت.

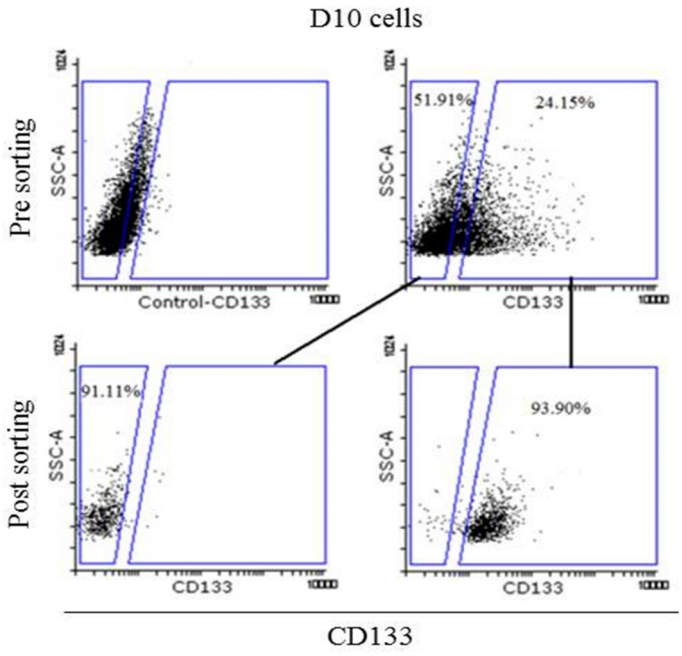
همان‌طور که در شکل ۱ نشان داده شده است، در رده‌ی سلولی A375 شاخص ALDH1 به میزان ٪ ۵۵/۷±۷/۸۸ بیان شد درحالی که شاخص CD133 در این رده‌ی سلولی بیان نداشت (شکل ۱). در رده‌ی سلولی D10 شاخص ALDH1 به میزان ٪ ۴۹/۹±۶/۴۳ و شاخص CD133 به میزان ٪ ۲/۸۳ ±۲۶/۸ بیان شد (شکل ۱).

خالص‌سازی سلول‌ها بر اساس بیان و عدم بیان شاخص مورد نظر: بر اساس داده‌های حاصل از آنالیزهای فلوسایتومتری، شاخص ALDH1 در هر دو رده‌ی سلولی و شاخص CD133 تنها در رده‌ی سلولی D10 بیان شد. به‌این‌ترتیب رده‌ی سلولی D10 بر اساس شاخص‌های ALDH1 و CD133 و رده‌ی سلولی A375 بر اساس بیان و عدم بیان ALDH1 جداسازی گردید و پس از جداسازی، جهت تائید جداسازی و تعیین درصد خلوص گروه‌ها، حدود ۵۰۰۰ عدد سلول از هر گروه توسط دستگاه خوانده شد (شکل ۲). همان‌طور که در شکل ۲ نشان داده‌شده است، شاخص ALDH1 به علت درصد خلوص بسیار پایین، در جداسازی جمعیت‌های سلولی بنیادی سرطان مورد استفاده قرار نگرفت و جداسازی سلول‌ها تنها بر اساس شاخص CD133 در رده‌ی سلولی D10 با درصد



شکل ۱- بررسی بیان شاخص‌های ALDH1 و CD133 در رده‌های سلولی A375 و D10 با استفاده از روش فلوسایتومتری





شکل ۲- بررسی بیان و عدم بیان شاخص‌های ALDH1 و CD133 در رده‌های سلولی A375 و D10 با استفاده از روش فلوسایتومتری

خلوص بالا انجام شد؛ بنابراین شاخص CD133 در رده‌ی سلولی D10 به‌عنوان یک شاخص بالقوه مناسب جهت شناسایی سلول‌های بنیادی سرطان مورد استفاده قرار گرفت.

بحث و نتیجه‌گیری

شواهد فزاینده‌ای نشان می‌دهد که سرطان از جمعیت کوچکی از سلول‌های سرطانی با قابلیت خودنوزایی و تمایز به رده‌های مختلف سلولی به نام سلول‌های بنیادی سرطان منشأ می‌گیرد که در ایجاد و حفظ تومور و متاستاز نقش دارند. این سلول‌ها خصوصیات مشابه با سلول‌های بنیادی نرمال ازجمله مقاومت به آپوپتوز و درمان‌های دارویی مرسوم در درمان سرطان را دارا می‌باشند و به این سبب جداسازی و شناسایی این سلول‌ها در استراتژی‌های درمانی هدفمند نقش مهمی ایفا می‌کند (۳).

در این مطالعه بیان شاخص‌های بالقوه سلول‌های بنیادی CD133 و ALDH1 در رده‌های سلولی ملانومای متاستاتیک A375 و D10 توسط تکنیک

فلوسایتومتری موردبررسی قرار گرفت. ALDH1 از آنزیم‌های درون‌سلولی است که در تبدیل آلدهیدها به اسیدهای کربوکسیلیک و در مراحل ابتدایی تمایز سلول‌های بنیادی نقش ایفا می‌کند و به همین سبب به‌عنوان یک شاخص کاندید برای شناسایی سلول‌های بنیادی سرطان در طیف وسیعی از سرطان‌ها مطرح‌شده است (۱۱). به‌عنوان‌مثال در سرطان ریه سلول‌های با افزایش بیان ALDH1 خصوصیات سلول‌های بنیادی را از خود نشان می‌دهند و همچنین سلول‌های سرطان پستان بیان کننده‌ی ALDH1 حتی با تعداد کم هم قدرت تومور زایی دارند (۱۲، ۱۳). نتایج ارزیابی بر روی دو رده سلولی A375 و D10 نشان داد که هر دو رده‌ی سلولی ازلحاظ بیان ALDH1 هتروژن بوده و شامل جمعیت بیان‌کننده‌ی ALDH1 ($ALDH1^+$) و جمعیت فاقد بیان ALDH1 ($ALDH1^-$) می‌باشند، اما درصد خلوص در جمعیت‌های جداسازی شده بسیار پایین بود که این امر بررسی دو جمعیت سلولی مذکور را ازلحاظ شاخص‌های سلول‌های بنیادی در محیط *In vitro* و *In vivo* مشکل می‌سازد. یافته‌های مطالعه ما در جداسازی سلول‌های بنیادی سرطان ملانوما با شاخص ALDH1 در راستای یک مطالعه اخیر در زمینه جداسازی سلول‌های بنیادی سرطانی ریه با استفاده از این شاخص است (۱۴). همچنین در زمینه بررسی شاخص ALDH1 به‌عنوان یک شاخص سلول بنیادی سرطان در ملانوما اختلاف نظر وجود دارد. درحالی‌که یک ارزیابی در این زمینه دلالت دارد که هر دو جمعیت $ALDH1^+$ و $ALDH1^-$ قابلیت کلنی زایی یکسانی دارند، مطالعه مستقل دیگری نشان می‌دهد که سلول‌های ملانوما با افزایش بیان شاخص ALDH1 خصوصیات تومورزایی بالاتری را در بررسی‌های *In vitro* و *In vivo* نسبت به سلول‌های با کاهش بیان ALDH1 از خود نشان می‌دهند (۱۰،۹). این اختلاف در نتایج مطالعات ممکن است ناشی از هتروژن بودن رده سلولی مورد ارزیابی، شرایط ارزیابی مختلف سلول‌ها شامل مدت زمان انکوباسیون با آنتی بادی باشد.

شاخص دیگر یعنی CD133 نیز به‌طور وسیع در زمینه شناسایی سلول‌های بنیادی سرطانی ازجمله در بدخیمی‌های مغز، کولون و ریه مورد استفاده قرارگرفته است (۴، ۶، ۱۵). در این مطالعه شاخص CD133 تنها در رده‌ی سلولی D10 به‌صورت هتروژن بیان شد و رده‌ی سلولی A375 فاقد جمعیت سلولی بیان‌کننده‌ی شاخص CD133 بود؛ بنابراین احتمالاً شاخص دیگری به‌عنوان مشخصه سلول‌های بنیادی سرطان در این رده سلولی مطرح می‌باشد. در زمینه بررسی نقش شاخص CD133 به‌عنوان یک شاخص بالقوه در سلول‌های بنیادی ملانوما اتفاق نظر وجود ندارد، درحالی‌که برخی مطالعات بیانگر آن است که سلول‌های با بیان بالای CD133 حتی در تعداد اندک هم قابلیت تشکیل تومور دارند، سایر مطالعات نشان می‌دهد که هر دو جمعیت با بیان زیاد و کم CD133 قابلیت تومورزایی دارند (۸, ۹). در این مطالعه فرآیند جداسازی سلول‌ها بر اساس بیان و عدم بیان شاخص CD133 در رده‌ی سلولی D10 با درصد خلوص بالا انجام شد. اگرچه مطالعات متعددی دال بر وجود سلول‌های بنیادی در رده سلولی D10 وجود دارد، اما دلیل محکمی در زمینه وجود سلول‌های بنیادی سرطانی در رده سلولی A375 وجود ندارد (۱۶).

جهت تائید این یافته‌ها، لازم است سلول‌های جداسازی شده از رده‌های سلولی D10 و A375 با استفاده از شاخص‌های ALDH1 و CD133 ازلحاظ قدرت تومورزایی در محیط *In vitro* با تست‌هایی مانند کلنی زایی و تشکیل اسفروئید و در محیط *In vivo* با بررسی تشکیل تومور در موش‌هایی که سیستم ایمنی در آن‌ها سرکوب شده است (Severe combined immune-odeficiency mice) موردبررسی قرار گیرند.

با توجه به مطالعات انجام‌شده بر روی شاخص CD133 در انواع سرطان‌ها و جداسازی موفق این سلول‌ها در رده‌ی سلولی D10، به نظر می‌رسد که سلول‌های بیان‌کننده CD133 در رده‌ی سلولی D10 ملانوما نیز می‌تواند به‌عنوان سلول‌های بنیادی سرطان در نظر گرفته شوند. البته آنالیزهای بیشتر شامل آنالیزهای مولکولی در سطح بیان ژن و پروتئین عوامل دخیل در

بنیادینگی، آنالیزهای سلولی شامل تست کلنی زایی و تشکیل اسفروئید و مدل حیوانی شامل تزریق جمعیت‌های سلولی $CD133^+$ و $CD133^-$ از رده‌ی سلولی D10 به موش‌های سرکوب شده‌ی سیستم ایمنی و مقایسه‌ی قدرت تومورزایی آن‌ها به جهت شناسایی دقیق سلول‌های بنیادی سرطان، لازم خواهد بود.

تقدیر و تشکر

این مقاله بخشی از پایان‌نامه دکتر مهرداد نصرالله زاده ثابت در مقطع PhD رشته پزشکی مولکولی به راهنمایی دکتر زهرا مجد و دکتر علی صمدی کوچکسرایی و مشاوره دکتر مرضیه ابراهیمی و دکتر محمدرضا نورانی در سال ۱۳۹۳ و کد ۱۰۴۰/پ می‌باشد که با حمایت دانشگاه علوم پزشکی ایران اجراشده است.

منابع

1. Siegel R, Naishadham D, Jemal A. Cancer statistics, 2012. CA: a cancer journal for clinicians, 2012. 62(1): 10-29.

2. Reya T, Morrison SJ, Clarke MF, Weissman IL. Stem cells, cancer, and cancer stem cells. Nature, 2001. 414(6859): 105-111.

3. Jordan CT, Guzman ML, Noble M. Cancer stem cells. New England Journal of Medicine, 2006. 355(12): 1253-1261.

4. Eramo A, Lotti F, Sette G, Pilozzi E, Biffoni M, Di Virgilio A, et al. Identification and expansion of the tumorigenic lung cancer stem cell population. Cell Death & Differentiation, 2008. 15(3): 504-514.

5. 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, 2007. 445 (7123): 111-115.

6. Singh SK, Hawkins C, Clarke ID, Squire JA, Bayani J, Hide T, et al. Identification of human brain tumour initiating cells. Nature, 2004. 432 (7015): 396-401.

7. Monzani E, Facchetti F, Galmozzi E, Corsini E, Benetti A, Cavazzin C, et al. Melanoma contains CD133 and ABCG2 positive cells with enhanced tumourigenic potential. European journal of cancer, 2007. 43(5): 935-946.

8. Quintana E, Shackleton M, Sabel MS, Fullen DR, Johnson TM, Morrison SJ. Efficient tumour formation by single human melanoma cells. Nature , 2008. (7222) 456: 593-598.

9. Kumar SM, Liu S, Lu H, Zhang H, Zhang PJ, Gimotty PA, et al. Acquired cancer stem cell phenotypes through Oct4-mediated dedifferentiation. Oncogene, 2012. 31(47): 4898-4911.

10. Schatton T, Murphy GF, Frank NY, Yamaura K, Waaga-Gasser AM, Gasser M, et al. Identification of cells initiating human melanomas. Nature, 2008. (7176) 451: 345-349.

11. Yoshida A, Hsu L, Dave V. Retinal oxidation activity and biological role of human cytosolic aldehyde dehydrogenase. Enzyme, 1991. 46(4-5): 239-244.

12. Jiang F, Qiu Q, Khanna A, Todd NW, Deepak J, Xing L, et al. Aldehyde dehydrogenase 1 is a tumor stem cell-associated marker in lung cancer. Molecular Cancer Research, 2009. 7(3): 330-338.

13. Ricardo S, Vieira AF, Gerhard R, Leitão D, Pinto R, Cameselle-Teijeiro JF, et al. Breast cancer stem cell markers CD44, CD24 and ALDH1: expression distribution within intrinsic molecular subtype. Journal of clinical pathology, 2011. 64(11): 937-946.

14. Roudi R, Madjd Z, Ebrahimi M, Samani FS, Samadikuchaksaraei A. CD44 and CD24 cannot act as cancer stem cell markers in human lung adenocarcinoma cell line A549. Cellular & molecular biology letters, 2013: 1-14.

15. Choi D, Lee HW, Hur KY, Kim JJ, Park GS, Jang SH, et al. Cancer stem cell markers CD133 and CD24 correlate with invasiveness and differentiation in colorectal adenocarcinoma. World J Gastroenterol, 2009. 15(18): 2258-2264.

16. Zimmerer RM, Korn P, Demougin P, Kampmann A, Kokemüller H, Eckardt AM, et al. Functional features of cancer stem cells in melanoma cell lines. Cancer cell international, 2013. 13(1): 78.

Evaluating the expression of putative stem cell markers ALDH1 and CD133 in melanoma cell lines A375 and D10

Mehrdad Nasrollahzadeh Sabet, PhD of Molecular Medicine, Department of Molcular Medicine, Faculty of New Medical Technology, Cellular and Molecular Research Center, Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran. Dr.m.sabet@gmail.com
Raheleh Roudi, PhD of Molecular Medicine, Oncopathology Research Center, Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran. Raheleroudi@gmail.com
Marziyeh Ebrahimi, Associate Professor, Department of Stem Cell and Evolutionary Biology, Research Center of Cellular Sciences, Biology and Stem Cell Technology Institute of Jahad-e Daneshgahi, Royan Institute, Tehran, Iran. Marzieh.ebrahimi@gmail.com
Ali Samadi Kochaksarayi, Associate Professor, Department of Medical Biotechnology and Cellular and Molecular Research Center, Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran. Samadikuchaksaraei@yahoo.com
Motahareh Rajabi Fomeshi, MA of Animal Biology, Department of Stem Cell and Evolutionary Biology, Research Center of Cellular Sciences, Biology and Stem Cell Technology Institute of Jahad-e Daneshgahi, Royan Institute, Tehran, Iran. M.rajabi.2627@gmail.com
***Zahra Majd**, Associate Professor, Oncopathology Research Center, Department of Molcular Medicine, Faculty of New Medical Technology, Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran (*Corresponding author). zahra.madjd@yahoo.com, madjd.z@iums.ac.ir

Abstract

Background: The cancer stem cells (CSCs) are involved in invasion and metastasis of melanoma, the most lethal and aggressive form of skin cancer. In the present study, the expression of putative stem cell markers CD133 and ALDH1 were evaluated in melanoma cell lines and then the cells sorted based on the expression of these markers.

Methods: In the present study expression of CD133 and ALDH1 was evaluated in A375 and D10 cell lines using flow cytometry. Then, selected cell line was sorted up on the expression of selected stem cell marker into positive and negative populations.

Results: Our results indicated that ALDH1 marker expressed in 55.71 ± 7.88% and 49.88 ± 6.43% in A375 and D10 cell lines, respectively, while the CD133 only expressed in D10 cells in 26.76 ± 2.83%. Cell sorting was performed according to ALDH1 expression in both cell lines and CD133 expression only in D10 cells. The purity of isolated cells was high according to CD133 expression (90% <), whereas the purity of ALDH1+ and ALDH1- populations was very low.

Conclusion: Findings of this study showed that cell sorting based on stem cell marker CD133 was suitable in D10 cells, therefore this marker could be a reliable marker for isolating of CSCs in this cell line.

Keywords: Melanoma, Stem cell marker, CD133, ALDH1, A375, D10