

## Evaluation of the Effect of DCA-Treated Mesenchymal Stem Cell Conditioned Media on Biological Behaviors of Breast Cancer

Narges Toolabi<sup>1</sup>, Mahmood Talkhabi<sup>2</sup>,  
Fattane Sam Daliri<sup>3</sup>, Farnoosh Attari<sup>4</sup>, Leila Taghiyar<sup>5</sup>  
1. M.A., Department of Animal Sciences and Marine Biology,  
Faculty of Life Sciences and Biotechnology, Shahid Beheshti  
University, Tehran, Iran.  
2. Assistant Professor, Department of Animal Sciences and Marine  
Biology, Faculty of Life Sciences and Biotechnology, Shahid  
Beheshti University, Tehran, Iran.  
3. M.A., Department of Animal Sciences and Marine Biology,  
Faculty of Life Sciences and Biotechnology, Shahid Beheshti  
University, Tehran, Iran.  
4. Assistant Professor, Department of Animal Biology, School of  
Biology, College of Science, University of Tehran, Tehran, Iran.  
5. Assistant Professor, Department of Stem Cells and Developmental  
Biology, Cell Science Research Center, Royan Institute for Stem Cell  
Biology and Technology, ACECR, Tehran, Iran.

(Received: Feb. 3, 2022 - Accepted: Jan. 4, 2023)

### Abstract

Cancer is the result of the overgrowth of malignant cells that have the ability to spread to other parts of the body. Dichloroacetate (DCA) has been considered as a new drug to control various cancers. The effects of stem cells or their conditioned media (CM) on the treatment or control of some cancers have also been shown. In this study, human adipose-derived mesenchymal stem cells (h-ADMSCs) and breast cancer cell line 4T1 were first treated with different concentrations of DCA and their viability was assessed by MTT assay and 1mM were selected for CM collection. h-ADMSCs with four groups including groups with no FBS media, ± DCA (-FBS /±1mM DCA) and groups with 5% FBS ± DCA (+5%FBS/±1mM DCA) were treated to prepare CM. Then the viability, colony forming potential, cell cycle profile and apoptosis of CM-treated 4T1 cells were investigated. The results showed that CM in the -FBS/+DCA group decreased the viability ( $P$ -Value <0.05) and increased the proliferation of 4T1 cells, compared to the -FBS-/DCA group, respectively. Compared to +5%FBS-/DCA group, CM of +5% FBS/+DCA were able to increase viability and proliferation of 4T1 cells. Also, CM of the four studied groups caused changes in the rate of apoptosis and cell cycle profile of 4T1 cells. It seems that, DCA can increase the viability and proliferation of 4T1 breast cancer cells by affecting on the composition of mesenchymal stem cells CM.

**Keywords:** Adipose-derived Mesenchymal Stem Cells, Breast Cancer, Cell Cycle, Cell Proliferation, Conditional Medium, Dichloroacetate, Morphology.

مقاله پژوهشی:

## بررسی تأثیر محیط شرطی سلول‌های بنیادی مزانشیمی تیمارشده با DCA بر رفتارهای زیستی سلول‌های سرطان پستان

نرگس طولابی<sup>۱</sup>، محمود تلخایی<sup>۲\*</sup>، فتحه سام دلیری<sup>۳</sup>  
فرنوش عطاری<sup>۴</sup>، لیلا تقی‌بار<sup>۵</sup>

۱. کارشناس ارشد، گروه علوم جانوری و زیست‌شناسی دریا، دانشکده علوم و فناوری زیستی، دانشگاه شهید بهشتی، تهران، ایران.
۲. استادیار، گروه علوم جانوری و زیست‌شناسی دریا، دانشکده علوم فناوری زیستی، دانشگاه شهید بهشتی، تهران، ایران.
۳. کارشناس ارشد، گروه علوم جانوری و زیست‌شناسی دریا، دانشکده علوم و فناوری زیستی، دانشگاه شهید بهشتی، تهران، ایران.
۴. استادیار، گروه علوم جانوری، دانشکده زیست‌شناسی، دانشگاه تهران، تهران، ایران
۵. استادیار، پژوهشگاه رویان، پژوهشکده زیست‌شناسی و فناوری سلول‌های بنیادی جهاد دانشگاهی، مرکز تحقیقات علوم سلولی و مولکولی، گروه سلول‌های بنیادی و زیست‌شناسی تکوینی، تهران، ایران.

(تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۱۱/۱۴ - تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۱۰/۱۴)

### چکیده

سرطان نتیجه رشد بی رویه سلول‌های بد الخیم است که توانایی گسترش به سایر اعضای بدن را دارند. دی‌کلرواستات (DCA) به عنوان یک داروی جدید برای کنترل سرطان‌های مختلف مورد توجه قرار گرفته است. همچنین اثرات سلول‌های بنیادی یا محیط شرطی (CM) این سلول‌ها در درمان یا کنترل برخی سرطان‌ها نشان داده شده است. در این تحقیق ابتدا سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از چربی انسانی (-h-ADMSCs) و سلول‌های سرطان پستان رده 4T1 با غلظت‌های مختف DCA تیمار شده و میزان زنده‌مانی آنها به وسیله تست MTT بررسی شد و غلظت ۱ میلی‌مولاًر جمجم آوری CM انتخاب شد. با چهار گروه شامل گروه‌های فاقد FBS با و بدون FBS/±1mM DCA) DCA با و بدون (h-ADMSCs +5% FBS/±1mM DCA) برای تهییه CM تیمار شدند. سپس میزان زیست‌نای، پتانسیل کلونی‌زایی، پروفایل چرخه سلولی و میزان آپاپتوز سلول‌های 4T1 تیمارشده با CM بررسی شد. نتایج بررسی‌ها نشان داد CM در گروه FBS/+DCA نسبت به گروه FBS-/DCA، به ترتیب باعث کاهش زنده‌مانی ( $P < 0.05$ ) و افزایش تکثیر سلول‌های 4T1 می‌شوند. همچنین گروه CM +5% FBS/+DCA نسبت به گروه FBS/-DCA زنده‌مانی و تکثیر سلول‌های 4T1 می‌باشد. همچنین CM گروه‌های چهارگانه مورد مطالعه، باعث تغییراتی در میزان آپاپتوز و پروفایل چرخه سلولی سلول‌های 4T1 شد. به نظر می‌رسد که DCA با تأثیر بر ترکیبات CM سلول‌های بنیادی مزانشیمی، می‌تواند باعث افزایش زنده‌مانی و تکثیر سلول‌های 4T1 سرطان پستان شود.

**واژه‌های کلیدی:** تکثیر سلولی، چرخه سلولی، دی‌کلرواستات، سرطان پستان، سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از چربی، محیط شرطی، مورفولوژی.

## مقدمه

مطالعه قرار گرفته‌اند. در سال‌های اخیر، کوچک مولکول DCA که در گذشته برای درمان اسیدوز لاتکتیک حاد و مزمن و دیابت استفاده می‌شد، به عنوان داروی ضدسرطان مقوون به صرفه مورد توجه قرار گرفته است (Tataranni, 2019). DCA و نمک‌های آن، آنزیم پیروات دهیدروژناز کیناز (PDK)<sup>۲</sup> را مهار می‌کنند و تاکنون به عنوان داروهای بالقوه در مطالعات مختلف مورد بررسی قرار گرفته‌اند (Kato, 2007).

دستاوردهای اخیر در تحقیقات سلول‌های بنیادی<sup>۳</sup> چشم‌انداز جدیدی را در درمان مبتنی بر سلول فراهم می‌کند و تعامل بین سلول‌های بنیادی مزانشیمی (MSCs)<sup>۴</sup> و سرطان به طور گسترده مورد مطالعه قرار گرفته است. MSCs سلول‌های بالغ، چند توان و غیرخون‌ساز<sup>۵</sup> هستند. MSCs را می‌توان از منابع مختلف مانند مغز استخوان<sup>۶</sup>، خون محیطی<sup>۷</sup> و بافت چربی<sup>۸</sup> جدا کرد. سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از چربی (ADMSCs) به عنوان مناسب‌ترین و فراوان‌ترین منبع سلول برای درمان‌های مبتنی بر سلول‌های بنیادی در نظر گرفته می‌شود و می‌توان مقادیر زیاد آنها را با استفاده از روش‌های کم تهاجم، از افراد استخراج کرد (Maj, 2018). محیط شرطی (CM) مشتق‌شده از سلول‌های بنیادی و نیز فاکتورهای موجود در آن به عنوان یک چشم‌انداز امیدوارکننده برای کاربردهای درمانی مطرح شده است. CM مشتق‌شده از سلول‌های بنیادی بخارطه دارا بودن فاکتورهای رشد، سیتوکین‌ها و دیگر مولکول‌های زیستی، در ترمیم پوست مورد مطالعه و استفاده قرار گرفته است. CM مشتق‌شده از ADMSCs نیز غنی از عوامل رشد می‌باشد و نقش مهمی در ترمیم زخم بافت پوششی، کاهش چین و

آخرین داده‌های آرنس بین‌المللی تحقیقات سرطان نشان می‌دهد که سرطان پستان به عنوان سرطان پیشرو در زنان و عامل اصلی مرگ در بین سرطان‌های زنان و Carbine, (2018). سرطان شامل طیف وسیعی از بیماری‌ها است که در نتیجه رشد بی‌رویه سلول‌های بدخیم به وجود می‌آیند، که توانایی گسترش به سایر اعضای بدن را دارند (Senapati, 2018). القای گونه‌های واکنش‌پذیر اکسیژن (ROS)<sup>۹</sup> و استرس اکسیداتیو به عنوان یک نتیجه از اختلال در تعادل بین اکسیژن‌ها و آنتی‌اکسیدان‌ها، در القا و پیشرفت سرطان پستان دخیل هستند. سلول‌های سرطانی در مقایسه با سلول‌های طبیعی سطح بالاتری از ROS را نشان می‌دهند (Hecht, 2016). در طی پیشرفت سرطان، تومورها بسیار ناهمگن می‌شوند و مخلوطی از جمعیت سلول‌ها را ایجاد می‌کنند که با ویژگی‌های مختلف مولکولی و پاسخگویی متنوع به روش‌های درمانی مشخص می‌شوند. تا به امروز، بسیاری از روش‌های درمانی مؤثر به عنوان مثال شیمی درمانی، جراحی و پرتو درمانی استفاده می‌شود، اما با عوارض جانبی شدیدی همراه هستند. اگرچه پیشرفت زیادی در پزشکی حاصل شده است، هنوز موارد زیادی وجود دارد که برای بهبود درمان سرطان باید به آن‌ها توجه شود. به همین دلیل، پژوهش‌های مرتبط با سرطان تلاش زیادی را برای یافتن روش‌های درمانی جدید و کارآمد انجام می‌دهد که بتواند عوارض جانبی حیاتی ناشی از درمان‌های معمول را کاهش دهد (Pucci, 2019).

با وجود پیشرفت قابل توجه در رویکردهای تشخیصی و درمانی، ریشه‌کن کردن سرطان هنوز هم یک چالش است. در دهه‌های گذشته داروهایی که متابولیسم سرطان را تحت تأثیر قرار می‌دهند مورد

2. Pyruvate dehydrogenase kinase  
3. Stem cells  
4. Mesenchymal stem cells  
5. Non hematopoietic stem cells  
6. Bone marrow  
7. Peripheral blood  
8. Adipose tissue

1. Reactive Oxygen Species

تکثیر و نگهداری شدند (دما $37^{\circ}\text{C}$  درجه سانتی‌گراد،  $5\text{ CO}_2$  درصد).

برای پیداکردن غلظت مناسب DCA از تست MTT (شرکت Sigma-Aldrich) و از هر دو سلول ADMSCs و 4T1 استفاده شد. ابتدا ۳۰۰۰ سلول 4T1 در هر چاهک پلیت ۹۶ خانه کشت داده شدند. بعد از ۴۸ ساعت، سلول‌ها با محیط کشت تازه حاوی غلظت‌های مختلف DCA (۱، ۲، ۳، ۴ و ۵ میلی‌مولار) و گروه کنترل (فاقد DCA) تیمار شدند. همچنین ۳۰۰۰ سلول ADMSCs در پاساژ ۳ درون هر چاهک پلیت ۹۶ خانه کشت داده شدند. پس از انکوباسیون به مدت ۴۸ ساعت، محیط با محیط کشت سلول DMEM تازه حاوی غلظت‌های مختلف DCA و گروه کنترل تعویض شد. ۲۴ ساعت پس از تیمار با غلظت‌های مختلف MTT، سلول‌ها با محیط کشت حاوی محلول DCA (شرکت Sigma-Aldrich) تیمار شدند. سپس سلول‌ها میزان جذب نوری با دستگاه اسپکتروفوتومتری BioTek® 800™ TS در طول موج ۵۷۰ نانومتر خوانش انجام شد. لازم به ذکر است که هر آزمایش با سه تکرار انجام شد.

**تهیه و جمع‌آوری محیط شرطی (CM) مشتق شده از ADMSCs**  
برای تهیه CM، سلول‌های ADMSCs در پاساژ ۳ در پلیت‌های شش خانه کشت داده شدند و زمانی که ۷۰ درصد کف چاهک‌ها توسط سلول‌ها پوشیده شد، محیط روبی سلول‌ها خارج شده و سپس محیط کشت جدید FBS و فاقد FBS (-FBS-DCA) DCA و فاقد FBS (+FBS-DCA) DCA و حاوی یک میلی‌مولار  $1\text{mM}$  FBS به  $+5\%$  (DCA)، حاوی ۵ درصد FBS و فاقد FBS (FBS-DCA) و حاوی ۵ درصد FBS و حاوی یک میلی‌مولار  $1\text{mM}$  DCA به  $+5\%$  FBS (+FBS DCA) به چاهکها اضافه شد. پس از ۲۴ ساعت CM مربوط به هر گروه جمع‌آوری و به فریزر  $-20^{\circ}\text{C}$  درجه سانتی‌گراد جهت نگهداری منتقل شد.

Noverina, 2019). همچنین مطالعات نشان داده که CM به دست آمده از MSCs به تنهایی و یا همراه با دارو در درمان سرطان مؤثر می‌باشد و اثر مهاری بر رشد تومور دارند (Aravindhan, 2021). CM مشتق شده از ADMSCs با القای آپاپتوز در رده‌های مختلف سلولی، به طور قابل توجهی زنده‌مانی سلول را کاهش می‌دهد (Wu, 2019). با توجه به پتانسیل بالا و اثرات بسیار مفید CM در مهار سلول‌های سرطانی، ممکن است CM در ترمیم و سلول درمانی آینده کمک کند. رده‌های سلولی مختلف پاسخ‌های متفاوتی به CM مشتق شده از DCA تیمارشده با غلظت‌های مختلف ADMSCs نشان می‌دهند (Tataranni, 2019; He, 2018). احتمالاً CM تیمارشده با غلظت‌های پایین DCA باعث بهبود عملکرد و در نهایت مهار آپاپتوز در سلول‌های می‌شود (Niewisch, 2012). این مطالعه به بررسی تأثیر CM سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از چربی انسانی (h-ADMSCs) تیمارشده با DCA بر زیستایی و رفتار تکثیری سلول‌های سرطان پستان (رده 4T1) در محیط برون تنی می‌پردازد.

## مواد و روش‌ها

### کشت سلول‌های ADMSCs و 4T1 و انتخاب غلظت DCA

ADMSCs در پاساژ یک از آزمایشگاه بن یاخته (ایران-تهران) تهیه شد و با محیط کشت DMEM (شرکت Gibco) حاوی ۱۰ درصد سرم جنین گاو (FBS) (شرکت DNA biotech) و ۱ درصد پنی‌سیلین/استرپتومایسین (شرکت Gibco) کشت، تکثیر و نگهداری شدند (دما $37^{\circ}\text{C}$  درجه سانتی‌گراد،  $5\text{ CO}_2$  درصد). پس از آنکه سلول‌ها حدود ۸۰ درصد کف فلاسک کشت را پر کردند، پاساژ سلولی به وسیله آنزیم تریپسین (شرکت Gibco) انجام گرفت. سلول‌های سرطان پستان رده 4T1 نیز از دانشگاه تهران تهیه شدند و در محیط کشت DMEM حاوی ۱۰ FBS کشت

### بررسی چرخه سلولی<sup>۲</sup> و آپاپتوز سلول‌های 4T1

سلول‌های رده 4T1 در پاساز ۱۰ در چاهک‌های پلیت ۶ خانه کشت داده شدند. زمانی که ۷۰ درصد هر چاهک توسط سلول‌ها پوشیده شد، محیط رویی سلول‌ها خارج شده و سپس، سلول‌ها با CM-FBS/+1mM-FBS/-DCA (DCA) تیمار شدند. بعد از ۲۴ ساعت، سلول‌ها برای انجام ارزیابی چرخه سلولی و نیز آپاپتوز به آزمایشگاه بافت آزمایشگاهی (ایران-تهران) منتقل شدند. این ارزیابی‌ها با یک بار تکرار زیستی انجام شدند.

### آنالیز آماری

آنالیز داده‌های به دست آمده در Prism<sup>۹</sup> انجام گرفت. پس از بررسی وضعیت نرمال بودن داده، در مقایسه دو نمونه t-test و در بررسی بیش از سه گروه از One way ANOVA استفاده شد. نمودارهای به کار رفته نیز Prism<sup>۹</sup> رسم شد. مرز استنتاج آماری ( $P < 0.05$ ) در نظر گرفته شد. تعداد تکرار زیستی هر آزمایش در بخش مربوطه، مشخص شده است.

### نتایج

#### بررسی مورفولوژی سلول‌های 4T1 و ADMSCs

سلول‌های ADMSCs نیز در محیط DMEM حاوی ۱۰ درصد FBS کشت شدند. این سلول‌ها نیز در تمام مدت کشت بصورت چسبنده رشد و تکثیر شدند و مورفولوژی کشیده و دوکی شکل خود را حفظ کردند (شکل A-1، بالا). همچنین سلول‌های 4T1 در این مطالعه در محیط DMEM حاوی ۱۰ درصد FBS کشت شدند. این سلول‌های در پاساژهای مختلف به صورت چسبنده رشد کرده و مورفولوژی طبیعی و اپیتیلیالی خود را حفظ کردند (شکل A-1، پایین).

2. Cell Cycle Assay

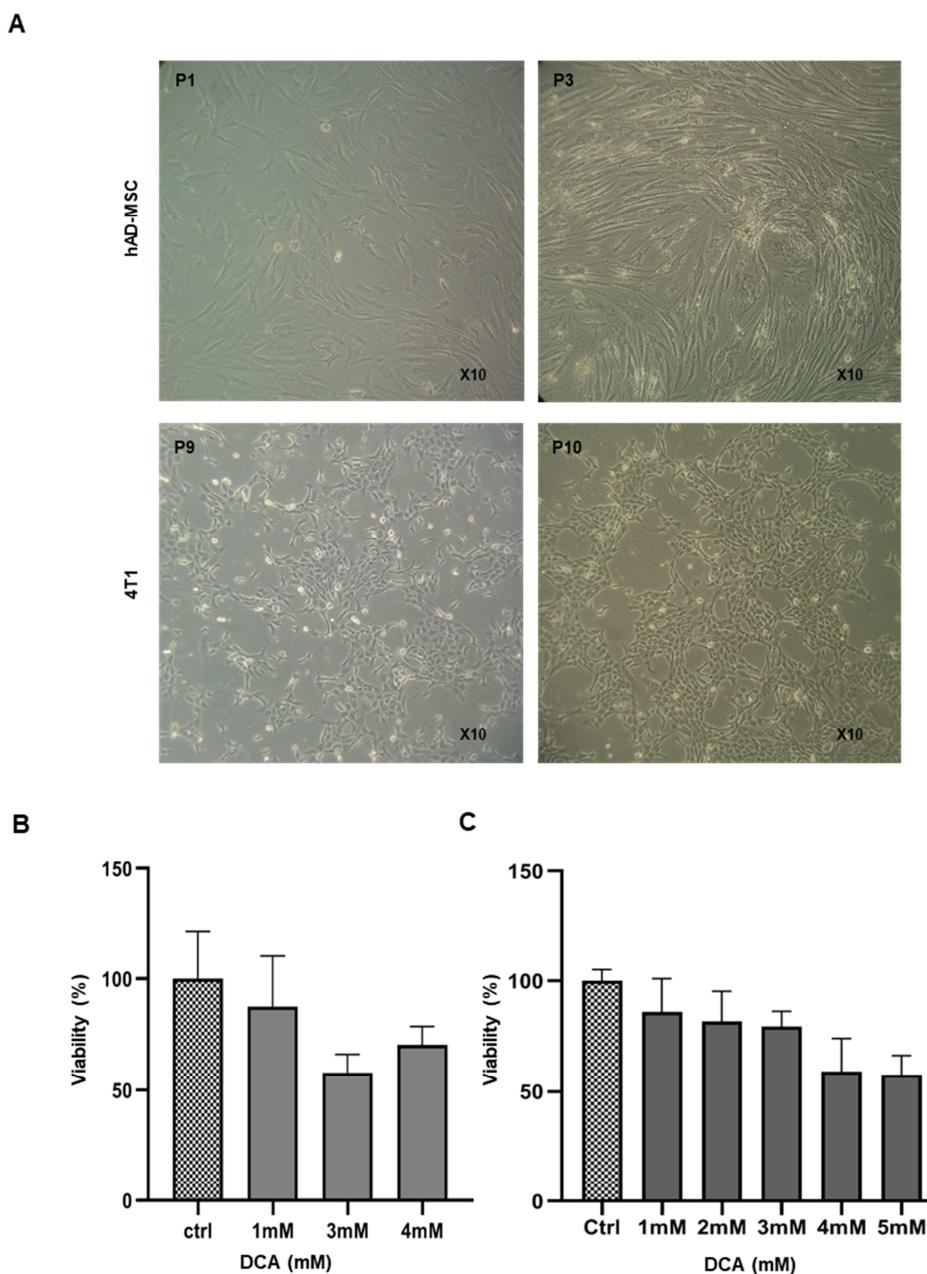
### ارزیابی زیستایی سلول‌های 4T1

برای انجام تست MTT ابتدا تعداد ۴۰۰۰ سلول 4T1 در هر چاهک پلیت ۹۶ خانه کشت شدند. بعد از ۲۴ ساعت، محیط روی سلول‌ها خارج شده و سپس به هر چاهک از CM-های گروه‌های مختلف (FBS/-DCA، +5% FBS/-DCA، -FBS/+1mM DCA و +5% FBS/+1mM DCA) اضافه شد. برای هر یک از گروه‌های چهارگانه مطالعه، سه تکرار زیستی انجام شد. بعد از ۲۴ ساعت، محیط روی سلول‌ها خارج شده و سلول‌ها سپس، تست MTT (شرکت Sigma-Aldrich) انجام شد.

### ارزیابی تشکیل کلونی<sup>۱</sup> سلول‌های 4T1

سنجرش تشکیل کلونی یک روش زنده‌مانی سلول در شرایط آزمایشگاهی است که بر اساس توانایی تک سلول برای رشد به کلونی (متتشکل از حداقل ۵۰ سلول) است. در این مطالعه، ابتدا سلول‌های 4T1 در پاساز ۱۰ مورد شمارش قرار گرفته و به تعداد ۷۵ سلول در هر چاهک پلیت ۱۲ چاهکی کشت شدند. بعد از اتصال سلول‌ها به کف چاهک و شروع شکل گیری کلونی، سلول‌ها با CM-های گروه‌های مختلف (+5% FBS/+1mM DCA، FBS/-DCA) تیمار شدند. بعد از یک هفته، محیط رویی سلول‌ها خارج شده و یک بار شستشو توسط PBS<sup>-</sup> انجام شد. سپس سلول‌ها/کلونی‌ها با فرمالدهید ۴ درصد (دکتر محلی) به مدت ۱۵ دقیقه در دمای اتاق فیکس شده و با کریستال ویوله رنگ‌آمیزی شدند. کلونی‌های سلولی با استفاده از استریومیکروسکوپ شمارش شده و تصاویر آنها به وسیله میکروسکوپ اینورت (ZEISS) (Franken, 2006) گرفته شد (Primovert). آزمایش با سه بار تکرار انجام شد.

1. Colony Forming Assay



شکل ۱. تصویر میکروسکوپ اینورت با بزرگنمایی ۱۰، A. از hAD-MSCs (بالا) و سلول‌های 4T1 (پایین)، B. نتایج تست MTT بر روی سلول‌های 4T1 و ADMSCs و C. نتایج تست MTT در غلظت‌های مختلف DCA

سلول‌های 4T1 نیز نشان داد که میزان زنده‌مانی سلول‌های 4T1 در غلظت‌های ۱، ۲ و ۳ میلی‌مولار DCA و گروه کنترل بیش از ۷۰ درصد است در حالی که در غلظت‌های ۴ و ۵ میلی‌مولار زنده‌مانی کمتر از ۷۰ درصد است (شکل C-۱) طبق نتایج به دست آمده به علت این که غلظت‌های ۱، ۲ و ۳ اختلاف معنی‌داری با هم نداشتند، بنابراین در هر دو گروه

ارزیابی زیستایی سلول‌های 4T1 و ADMSCs در غلظت‌های مختلف DCA

نتایج تست MTT نشان داد که میزان زنده‌مانی ADMSCs در گروه کنترل و غلظت ۱ میلی‌مولار DCA بیش از ۷۰ درصد است درحالی که در غلظت ۳ و ۴ میلی‌مولار Znده‌مانی کمتر از ۷۰ درصد است (شکل B-۱). نتایج حاصل از تست MTT

گروه FBS/+ 1mM DCA درصد زنده‌مانی کمتر از گروه -FBS/-DCA است، و اختلاف بین دو گروه معنی‌دار است ( $P\text{-Value} < 0.05$ ) (شکل ۲-B، بالا). در گروه FBS/+1mM DCA +5% درصد زنده‌مانی بیشتر از گروه -FBS/-DCA است و این افزایش معنی‌دار نیست (شکل ۲-B، پایین).

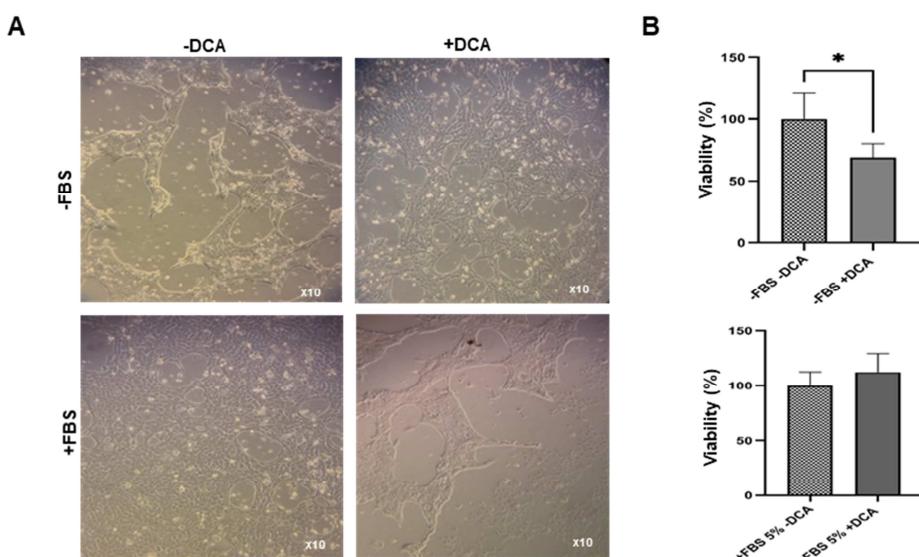
#### ۴T1 ارزیابی پتانسیل کلونی‌زایی سلول‌های CM تیمار شده با

بررسی مورفولوژی کلونی‌های کلونی‌های تشکیل‌شده سلول‌های 4T1 نشان داد که در گروه‌های حاوی DCA اندازه کلونی‌ها نسبت به گروه‌های فاقد DCA بزرگ‌تر می‌باشد (شکل ۳-A). همچنین بررسی تعداد کلونی‌های سلول‌های 4T1 نشان داد که در گروه FBS/+ 1mM DCA تعداد کلونی‌ها بیشتر از گروه -FBS/-DCA است، اما این افزایش معنی‌دار نمی‌باشد. همچنین مشخص شد که تعداد کلونی‌های سلول‌های 4T1 در گروه +5% FBS/+1mM FBS/-DCA بیشتر از گروه DCA هرچند این افزایش معنی‌دار نبود (شکل ۳-B).

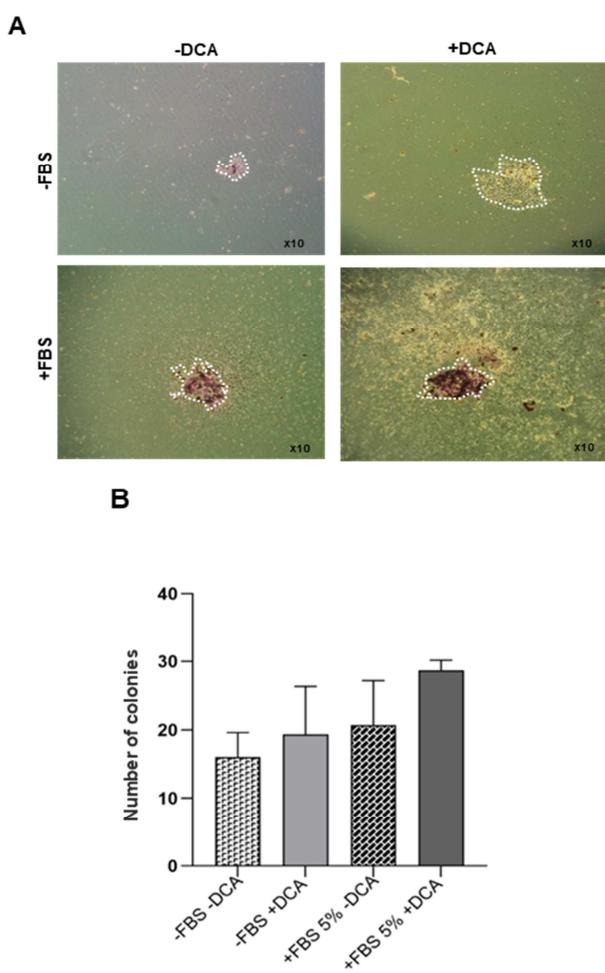
سلولی غلظت پایین (۱ میلی‌مولار) برای انجام مراحل بعدی آزمایش انتخاب شد.

#### بررسی تغییرات مورفولوژیکی و زیست‌ایی سلول‌های CM 4T1 تیمار شده با

بررسی تغییرات مورفولوژیکی 4T1 بعد از ۲۴ ساعت تیمار با CM‌های مختلف نشان داد که سلول‌های 4T1 در گروه -FBS/-DCA در ظرف کشت به صورت کلونی و دارای زواید سلولی بلند می‌باشند و در بعضی قسمت‌ها سلول‌ها از ظرف کشت جدا شده‌اند و تراکم سلولی کم می‌باشد (شکل ۲-A). در حالی که در گروه +FBS/+1mM DCA مشاهده شد که سلول‌ها به صورت کلونی با تراکم سلولی بالایی می‌باشند. همچنین در گروه +5% FBS/-DCA مشاهده شد که سلول‌ها به صورت کلونی با تراکم سلولی بالایی +5% FBS/+1mM می‌باشند. در حالی که در گروه DCA سلول‌ها دارای تراکم سلولی پایین و زواید سلولی بلند بودند و در بعضی قسمت‌های ظرف کشت هیچ سلولی مشاهده نشد (شکل ۲-A). نتایج حاصل از تست MTT بر روی سلول‌های 4T1 نشان داد



شکل ۲. A) تغییرات مورفولوژی سلول‌های 4T1 تیمار شده با گروه‌های مختلف CM، B) نتایج حاصل از تست MTT بر روی سلول‌های 4T1 تیمار شده با گروه‌های مختلف CM، میزان زنده‌مانی گروه -FBS/-DCA بیشتر از گروه +5% FBS/+1mM DCA (+5% FBS/-DCA) کمتر از گروه -FBS/-DCA (P-Value < 0.05) (پایین).



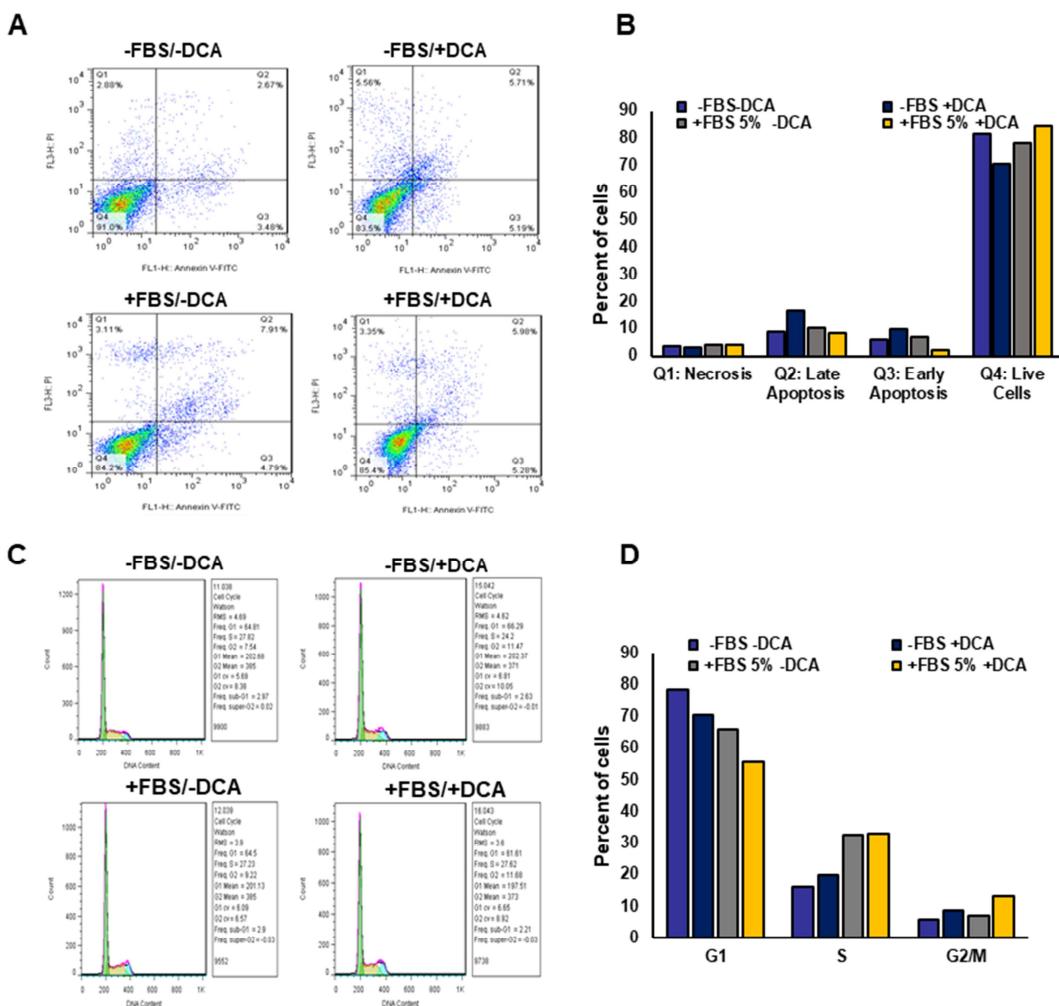
شکل ۳. A) موپولوژی کلونی‌های تشکیل شده سلول‌های 4T1 تیمارشده با گروه‌های مختلف CM، B) نمودار تعداد کلونی سلول‌های 4T1 تیمارشده با گروه‌های مختلف CM

سلول‌ها در مرحله G1 در گروه گروه C, -FBS/-DCA از گروه DCA کمتر است (شکل ۴-D). همچنین درصد سلول‌ها در مرحله G1 در گروه +5% FBS/-DCA از گروه +5% FBS/+1mM کمتر می‌باشد. بررسی پروفایل چرخه سلولی نشان داد که درصد سلول‌ها در مرحله S در گروه‌های -FBS/+1mM DCA از گروه -FBS/-DCA بیشتر بوده و در گروه +5% FBS/+1mM از گروه +5% FBS/-DCA بیشتر بوده و در مرحله G2/M در گروه DCA بیشتر است. همچنین درصد سلول‌های 4T1 در گروه +5% FBS/+1mM DCA نسبت به گروه -FBS/-DCA بیشتر بوده و در گروه +5% FBS/-DCA نسبت به گروه +5% FBS/+1mM بیشتر می‌باشد (شکل ۴-C, D).

#### ارزیابی آپاپتوز و چرخه سلولی سلول‌های 4T1 تیمارشده با CM

بررسی میزان آپاپتوز سلول‌های 4T1 تیمارشده با CM‌های مختلف نشان داد که درصد سلول‌های زنده در گروه -FBS/+1mM DCA کمتر از گروه FBS/-DCA می‌باشد (شکل ۴-A, B). همچنین میزان آپاپتوز سلول‌های 4T1 در گروه +5% FBS/-DCA بیشتر از گروه +5% FBS/+1mM DCA می‌باشد. درصد سلول‌ها در فاز تأخیری آپاپتوز DCA می‌باشد. آپاپتوز اولیه در گروه -FBS/+1mM DCA و آپاپتوز اولیه در گروه -FBS/-DCA بیشتر از بقیه گروه‌ها می‌باشد (شکل ۴-A, B).

بررسی پروفایل چرخه سلولی سلول‌های 4T1 تیمارشده با CM‌های مختلف نشان داد که درصد



شکل ۴. A و B) نتایج بررسی میزان آپاتوز سلول‌های 4T1 تیمارشده با گروه‌های مختلف CM به مدت ۲۴ ساعت. C و D) نتایج بررسی پروفایل چرخه سلولی سلول‌های 4T1 تیمارشده با گروه‌های مختلف CM به مدت ۲۴ ساعت.

از داروها نیز می‌توانند هدف‌گیری کارآمد سلول‌های توموری را تقویت کند (Aravindhan, 2021). MSCs رایج‌ترین سلول‌های بنیادی در کاربردهای بالینی هستند. برخی از مطالعات اخیر نشان داده است که اثرات بیولوژیکی MSCs بستگی به ترشحات آنها دارد. علاوه بر این، فاکتورهای ترشحی مشتق شده از MSCs می‌توانند اثرات زیستی مختلفی روی سلول‌های مختلف بدن داشته باشند (Bhang, 2014). استفاده از CM سلول‌های بنیادی که حاوی انواع فاکتورهای ترشحی این سلول‌ها می‌باشد، می‌توانند جایگزین مناسبی برای پیوند سلول‌های بنیادی باشند. استفاده از CM این سلول‌ها از

## بحث و نتیجه‌گیری

به تازگی مشاهده شده که تداخل بین ریز محیط تومور و سلول‌های تومور منجر به مشارکت یا مهار پیشرفت تومور می‌شود. MSCs، سلول‌های مهمی هستند و عملکردهای متضاد و متفاوتی به فعالیت در MSCs در ریز محیط تومور نسبت داده شده است. آن‌ها می‌توانند پتانسیل تومورزا یا ضد تومور را در سلول‌های تومور القاء کنند. با این وجود، MSCs با یک پتانسیل تعديل کننده ریز محیط تومور، به نفع سرکوب سلول‌های سرطانی همراه بوده و نتایج امیدوارکننده‌ای از مطالعات پیش بالینی و همچنین بالینی گزارش شده است. در کنار پتانسیل تعديل کننده‌گی MSCs، استفاده

به نوع تومور و مرحله‌ای که سلول سرطانی در آن قرار دارد و کنام آن می‌تواند باعث پیشرفت بیماری شود (Gwendal, 2016). درصد سلول‌ها در فاز تأخیری FBS/+ 1mM DCA آپاپتوز و آپاپتوز اولیه در گروه DCA بیشتر از بقیه گروه‌ها می‌باشد و مطالعات قبلی بر روی سلول‌های سرطانی نشان داده که غلظت‌های بالای DCA برای القای آپاپتوز موردنیاز است (Stockwin, 2010). همچنین یافته‌ها نشان داده اند که DCA آپاپتوز و توقف چرخه سلولی را در سلول‌های سرطانی روده بزرگ القا می‌کند، هرچند این ماده تأثیری در کاهش رشد سلول‌های غیرسرطانی نداشته و تنها تکثیر سلول‌های سرطانی را به طور قابل توجهی کاهش می‌دهد (Madhok, 2010). نتایج به دست آمده از بررسی چرخه سلولی نشان داد، درصد سلول‌های 4T1 در مرحله G2/M در گروه -FBS/-DCA FBS/+1mM DCA نسبت به گروه FBS/+1mM DCA بیشتر بوده و در گروه +5% FBS/+1mM DCA نسبت به گروه -FBS/-DCA +5% FBS/-DCA بیشتر می‌باشد. مطالعات انجام شده بر روی سلول پاراگانگلیوما (PGL) پیشنهاد می‌کند که احتمالاً DCA از طریق مکانیزم‌هایی که شامل مهار PDK می‌شود، باعث کاهش زنده‌ماندن سلول‌های PGL می‌شود و در نتیجه دوباره مجموعه PDH را فعال می‌کند که منجر به ارتقای متابولیسم اکسیدانتیو، کاهش تولید لاکتان و افزایش تولید داخل سلولی ROS می‌شود که در نهایت باعث توقف چرخه سلولی و آپاپتوز در سلول‌های PGL می‌شود (Florio, 2018). به نظر می‌رسد که ممکن است مکانیسم‌های ناشناخته‌ای وجود داشته باشد که از سلول‌های سرطانی 4T1 در برابر CM مشتق از ADMSCs تیمارشده با DCA محافظت می‌کند. براساس تحقیقات گذشته روی اثرات FBS در محیط کشت و همچنین نتایج به دست آمده در این پژوهش میزان تکثیر سلول‌های 4T1 در گروه‌های +5% FBS در مقایسه با گروه‌های -FBS بیشتر است. میزان گیرنده‌های اریتروپویتین (EPORs) نه تنها در

توموزایی احتمالی جلوگیری می‌کند، اما میزان فاکتورهای رشد رگزا در CM بسیار کم است (Li, 2020). البته بررسی‌های مختلف پاسخ‌های متفاوتی را در انواع مختلف سلول‌های سرطانی هنگام تعامل با CM مشتق از ADMSCs نشان داده‌اند، که ممکن است اختلاف بین این مطالعات ناشی از منشأهای ADMSCs متفاوت و شرایط کشت متفاوت باشد (Schweizer, 2015). در حالی که CM به دست آمده T24 از ADMSCs از تکثیر سلول‌های EJ و (Yu, 2015) سرطانی مثانه انسان جلوگیری می‌کند در این مطالعه میزان زیستایی، پتانسیل کلونی‌زایی، میزان آپاپتوز و پروفایل چرخه سلولی سلول‌های 4T1 تیمارشده با CM سلول‌های ADMSCs کشت شده در شرایط مختلف بررسی شد. نتایج حاصل از بررسی زنده‌مانی و پتانسیل کلونی‌زایی نشان داد که CM گروه -FBS/-DCA به گروه -FBS/-DCA، باعث کاهش زنده‌مانی و افزایش تکثیر سلول‌های 4T1 می‌شوند. همچنین گروه CM گروه +5% FBS/+DCA به گروه +5% FBS/-DCA تکثیر سلول‌های 4T1 می‌باشد. به نظر می‌رسد که DCA ممکن است با تأثیر بر روی فاکتورهایی که توسط MSCs ترشح می‌شوند فعالیت آن‌ها را تحت تأثیر قرار دهد. مطالعات قبلی تأثیرات متفاوتی از MSCs بر رفتار سلول‌های سرطانی نشان داده‌اند. برای مثال گزارش شده است که MSCs می‌تواند در شرایط درون بدن باعث تکثیر سلول‌های سرطانی شود به این صورت که سلول‌های سرطانی تعدادی کموکین شامل خانواده ccl و cxcl را ترشح می‌کنند که MSCs را به سمت سلول‌های سرطانی جذب می‌شوند. و همچنین با ترشح سایتوکین‌هایی از جمله PDGF-B, NT-3, VEGF و HGF و عواملی مانند LL-37 و سیکلوفیلین B بر MSCs تأثیر cxcl می‌گذارند. در نتیجه MSCs فاکتورهای خانواده MSCs و متالوپروتئینازها ترشح کرده که این برهمکنش بسته

مشتق شده از ADMSCs تیمارشده با غلظت ۱ میلی‌مولار DCA منجر به تکثیر سلولی، افزایش زنده‌مانی و در نهایت مهار آپاپتوز سلولی در سلول‌های رده 4T1 سرطان پستان می‌شود. این مطالعه اطلاعات اولیه در مورد تأثیرات متفاوت و دوگانه CM سلول‌های MSCs تیمارشده با DCA بر زیستایی و رفتار تکثیری سلول‌های سرطان پستان می‌دهد و استفاده از غلظت‌های مختلف DCA، بررسی فاکتورهای ترشحی موجود در CM، استفاده از شرایط همکشتی سلول‌های سرطان پستان و MSCs و نیز مطالعات درون تنی می‌تواند به آشکار سازی مکانسیم مولکولی برهمکنش سلول‌های MSCs و سلول‌های سرطان، و بهویژه در بیمارانی که تحت درمان با DCA قرار دارند، کمک کند.

پیش سازهای گلبول قرمز بلکه در سلول‌های غیر خون‌ساز از جمله سلول‌های سرطانی نیز وجود دارند و در مطالعه‌ای تأثیر FBS در محیط کشت بر بیان EPOR و زنده‌ماندن سلول‌های سرطان پستان %10 MCF-7 و MDA-MB-231 نشان داد، که FBS در محیط باعث افزایش بیان EPOR و قابلیت MCF-7 MDA-MB-231 سلول‌های زنده‌ماندن در %10 FBS نیز باعث افزایش تعداد سلول‌های سرطانی پستان شد که وارد فاز سنتز چرخه سلولی می‌شوند (Teo, 2020). و ممکن است حضور FBS با همپوشانی اثر DCA و دیگر فاکتورهای موجود باعث تکثیر سلول‌های سرطانی شود.

به طور خلاصه، مطالعه ما نشان داد که CM

## REFERENCES

- Carbine, N. E.; Lostumbo, L.; Wallace, J.; Ko, H. (2018). Risk-reducing mastectomy for the prevention of primary breast cancer. *Cochrane Database Syst. Rev.*; 4 doi: 10.1002/14651858.CD002748.pub4
- Senapati, S. (2018). Controlled drug delivery vehicles for cancer treatment and their performance. November 2017, 1-19. doi: 10.1038/s41392-017-0004-3.
- Hecht, F.; Pessoa, C.F.; Gentile, L.B.; Rosenthal, D.; Carvalho, D.P.; Fortunato, R.S. (2016). The role of oxidative stress on breast cancer development and therapy. *Tumor Biol.*; 37(4): 4281-4291, 2016, doi: 10.1007/s13277-016-4873-9.
- Pucci, C.; Martinelli, C.; Ciofani, G. (2019). Innovative approaches for cancer treatment: Current perspectives and new challenges. *Ecancermedicalscience*, 3: 1-26. doi: 10.3332/ecancer.2019.961.
- Tataranni, T.; Piccoli, C. (2019). Dichloroacetate (DCA) and Cancer: An Overview towards Clinical Applications. *Oxid. Med. Cell. Longev.*; 2019: 1-14. doi: 10.1155/2019/8201079.
- Kato, M.; Li, J.; Chuang, J.L.; Chuang, D.T. (2007). Distinct Structural Mechanisms for Inhibition of Pyruvate Dehydrogenase Kinase Isoforms by AZD7545, Dichloroacetate, and Radicicol. *Structure*; 15(8): 992-1004. doi: 10.1016/j.str.2007.07.001.
- Maj, M.; Kokocha, A.; Bajek.; Drewa, T. (2018). The interplay between adipose-derived stem cells and bladder cancer cells. *Sci. Rep.*; 8(1), 85-92. doi: 10.1038/s41598-018-33397-9.
- Noverina, R.; Widowati, W.; Ayuningtyas, W.; Kurniawan, D. (2019). Growth factors profile in conditioned medium human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells (CM-hATMSCs). *Clin. Nutr. Exp.*; 24: 34-44. doi: 10.1016/j.yclnex.2019.01.002.
- Aravindhan, S.; Ejam, S. S.; Lafta, M. H.; Markov, A. A.; Yumashev, V.; Ahmadi, M. (2021). Mesenchymal stem cells and cancer therapy: insights into targeting the tumour vasculature. *Cancer Cell Int.*; 21(1): 1-15. doi: 10.1186/s12935-021-01836-9.

- Wu, Y. C.; Wang, W.T.; Huang, L.J.; Cheng, R.Y. (2019) Differential response of non-cancerous and malignant breast cancer cells to conditioned medium of adipose tissue-derived stromal cells (Ascs). *Int. J. Med. Sci.*; 16(6): 893-901. doi: 10.7150/ijms.27125.
- He, N.; Kong, Y.; Lei, X.; Liu, Y. (2018). MSCs inhibit tumor progression and enhance radiosensitivity of breast cancer cells by down-regulating Stat3 signaling pathway. *Cell Death Dis.*; 9(10), doi: 10.1038/s41419-018-0949-3.
- Niewisch, M. R.; Kuçi, Z.; Wolburg, H.; Sautter, M. (2012). Influence of dichloroacetate (DCA) on lactate production and oxygen consumption in neuroblastoma cells: Is DCA a suitable drug for neuroblastoma therapy?. *Cell. Physiol. Biochem.*; 29(3): 373-380. doi: 10.1159/000338492.
- Franken, N. A. P.; Rodermond, H. M. J.; Stap, J.; Haveman.; van Bree, C. (2006). Clonogenic assay of cells in vitro. *Nat. Protoc.*; 1(5): 2315-2319. doi: 10.1038/nprot.2006.339.
- Bhang, S. H.; Lee, S.; Shin, J. Y.; Lee, T. J.; Jang, H. K.; Kim, B. S. (2014). Efficacious and clinically relevant conditioned medium of human adipose-derived stem cells for therapeutic angiogenesis. *Mol. Ther.*; 22(4): 862-872. doi: 10.1038/mt.2013.301.
- Li, L.; Ngo, H.T.; Hwang, U.; Wei, X. (2020). Conditioned medium from human adipose-derived mesenchymal stem cell culture prevents uvb-induced skin aging in human keratinocytes and dermal fibroblasts. *Int. J. Mol. Sci.*; 21(1): 1-11. doi: 10.3390/ijms21010049.
- Schweizer, R.; Tsuji, W.; Gorantla, V. S.; Marra, K. G.; Rubin, J. P.; Plock, J. A. (2015). The role of adipose-derived stem cells in breast cancer progression and metastasis. *Stem Cells Int.*; 2015, doi: 10.1155/2015/120949.
- Yu, X.; Su, B.; Ge, P.; Wang, Z. (2015). Human adipose derived stem cells induced cell apoptosis and s phase arrest in bladder tumor. *Stem Cells Int.*; 2015, doi: 10.1155/2015/619290.
- Gwendal, L.; Paula Y, L. (2016). Recent discoveries concerning the tumor-mesenchymal stem cell interactions. *Biochim. Biophys. Acta - Rev.*; 1866(2): 290-299. doi: 10.1016/j.bbcan.2016.10.004.
- Stockwin, L. H.; Wu, S.X.; Borgel, S.; Hanckok, C. (2010). Sodium dichloroacetate selectively targets cells with defects in the mitochondrial ETC. *Int. J. Cancer.*; 127(11): 2510-2519. doi: 10.1002/ijc.25499.
- Madhok, B. M.; Yeluri, S.; Perry, S. L.; Hughes, T. A.; Jayne, D. G. (2010). Dichloroacetate induces apoptosis and cell-cycle arrest in colorectal cancer cells. *Br. J. Cancer.*; 102(12): 1746-1752. doi: 10.1038/sj.bjc.6605701.
- Florio, R., Lellis, L.D.; Veschi, S.; Verginelli, F. (2018). Effects of dichloroacetate as single agent or in combination with GW6471 and metformin in paraganglioma cells. *Sci. Rep.*; 8(1): 1-14. doi: 10.1038/s41598-018-31797-5.
- Teo, G. Y.; Rasedee , A.; AL-Haj, A.; Beh, C.Y.; How, C.W. (2020). Effect of fetal bovine serum on erythropoietin receptor expression and viability of breast cancer cells. *Saudi J. Biol. Sci.*; 27(2): 653-658. doi: 10.1016/j.sjbs.2019.11.032.

## COPYRIGHTS



© 2022 by the authors. Lisensee PNU, Tehran, Iran. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution 4.0 International (CC BY4.0) (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0>)