

جداسازی و تکثیر سلول‌های بنیادی بافت سرطانی کولون در محیط *in vitro*

حمیدرضا میرزایی^۱، دکتر مرجان قراگوزلو^۲، دکتر عباس رضایی^۳، دکتر حمید کلانتری^۴،
دکتر محمد حسین صانعی^۵، دکتر سید محسن حسینی^۶، دکتر غلامرضا مهاجری^۷،
دکتر عباس طباطبایی^۸، دکتر مظفر هاشمی^۹

خلاصه

مقدمه: تحقیقات اخیر در ارتباط با بیولوژی سرطان کولون نشان می‌دهد که رشد تومور توسط سلول‌های بنیادی سرطان کولون هدایت می‌شود. سلول‌های بنیادی سرطانی مسؤول آغاز، حفظ، گسترش و عود تومور می‌باشند. هدف از این مطالعه، جداسازی و تکثیر سلول‌های بنیادی کولون در محیط *in vitro* بود.

روش‌ها: نمونه‌های توموری تازه‌ی سرطان کولون مورد هضم مکانیکی و آنزیمی قرار گرفتند. بعد از عبور سوسپانسیون سلولی از فیلتر سلولی، سلول‌ها شمارش شده و درصد حیات آن‌ها مشخص شد. سپس سلول‌های توموری در محیط کشت اختصاصی (محیط DMEM/F12 غنی شده با فاکتورهای رشد و فاقد سرم) کشت داده شدند. رشد سلول‌های توموری در این محیط توسط میکروسکوپ معکوس مورد بررسی قرار گرفت.

یافته‌ها: بعد از حدود سه هفته از کشت سلول‌ها در محیط کشت اختصاصی، سلول‌های بنیادی سرطان کولون به صورت کولونی‌های سلولی گرد (اسفیر) ظاهر شدند، در حالی که سلول‌های تمایز یافته‌ی توموری و سالم قادر به رشد نبودند. اسفیرهای سرطان کولون در محیط کشت اختصاصی سلول‌های بنیادی قادر به تکثیر و پاساژ بودند.

نتیجه‌گیری: جداسازی و تکثیر سلول‌های بنیادی تومورونیک در محیط *in vitro* می‌تواند به ایجاد روش‌های تشخیصی و درمانی سرطان کولون کمک کند. از این سلول‌ها می‌توان برای مطالعات سیگنالینگ و بررسی اثر داروهای ضد سرطان استفاده کرد.

واژگان کلیدی: سرطان کولون، سلول‌های بنیادی سرطانی، تکثیر در محیط *in vitro*.

مقدمه

سرطان کولون شده است (۱). تحقیقات اخیر نشان داده است در چندین سرطان انسانی از جمله سرطان کولون یک جمعیت کوچک سلولی توانایی آغاز و حفظ تومور را دارند (۲-۶). مهم‌ترین ویژگی این سلول‌ها مانند سلول‌های بنیادی، خود تجدید شوندگی، تقسیم نامتقارن سلولی، توانایی تمایز به رده‌های سلولی است.

سرطان کولون یکی از عوامل اصلی مرگ و میر در کشورهای پیشرفته می‌باشد. اگر چه بیشتر کشورهای آسیایی بروز بسیار کمی از سرطان کولون را نشان می‌دهند، به نظر می‌رسد جایگزینی رژیم غذایی خاص در این کشورها از جمله ایران منجر به افزایش بروز

^۱ کارشناس ارشد، گروه ایمونولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران.

^۲ استادیار، گروه ایمونولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران.

^۳ استاد، گروه ایمونولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران.

^۴ دانشیار، گروه بیماری‌های داخلی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران.

^۵ دانشیار، گروه پاتولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران.

^۶ دانشیار، گروه آمار زیستی و اپیدمیولوژی، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران.

^۷ استادیار، گروه جراحی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران.

^۸ دانشیار، گروه جراحی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران.

^۹ استادیار، گروه جراحی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران.

برای سلول‌های بنیادی سرطانی کولون (حداقل در مورد نمونه‌های متاستازی) مطرح کرد (۱۶). با توجه به مطالعات بالا چنین استنباط می‌شود که مولکول CD133 حداقل به تنهایی نمی‌تواند به عنوان مارکری قابل اعتماد برای شناسایی سلول‌های بنیادی سرطانی کولون استفاده شود. علاوه بر CD133، مطالعات دیگر مولکول CD44 و آنتی‌ژن اختصاصی اپی‌تلیال (ESA) یا Epithelial specific antigen را به عنوان مارکر سلول‌های بنیادی کولون در نظر گرفته‌اند (۱۷-۱۸). به هر حال ممکن است شرایطی مشابه CD133 نیز برای این مارکرها وجود داشته باشد که نیاز به مطالعه‌ی بیشتر دارد.

با توجه به مطالعات گفته شده و نبود یک مارکر واحد و قابل اعتماد در شناسایی سلول‌های سرطان کولون و همچنین با توجه به اهمیت شناسایی این سلول‌ها در درمان سرطان کولون و پیش‌گویی عود سرطان بعد از درمان‌های ضد سرطان رایج، به نظر می‌رسد که جداسازی و تکثیر این سلول‌ها در محیط *in vitro* (جدای از فنوتیپ سطحی این سلول‌ها) می‌تواند قابل اعتماد بوده، به شناسایی بهتر و بررسی خواص بیولوژیک این سلول‌ها و فاکتورهای مرتبط با آغاز، پیشرفت و متاستاز آن‌ها کمک کند تا به این وسیله بتوان روش‌های درمانی و تشخیصی مناسب برای سرطان کولون یافت. مطالعه‌ی حاضر نحوه‌ی جداسازی و تکثیر این سلول‌ها را در محیط *in vitro* ارائه کرد.

روش‌ها

در ابتدا از بیماران مبتلا به سرطان کولون بر اساس پروتکل کمیته‌ی اخلاق دانشگاه علوم پزشکی اصفهان و رضایت‌نامه‌ی اخذ شده، نمونه‌های جراحی سرطان

به همین دلیل به آن‌ها سلول‌های بنیادی سرطانی (Cancer stem cells یا CSCs) اطلاق می‌گردد (۷). سلول‌های بنیادی سرطانی علاوه بر مسؤولیت آغاز، حفظ و گسترش تومور، در مقاومت تومورها به رژیم‌های ضد سرطانی رایج مانند شیمی‌درمانی، رادیوتراپی و در نتیجه عود بیماری نقش دارند (۱۴-۸). اولین بار دو گروه تحقیقاتی مستقل یک جمعیت سلولی آغاز کننده‌ی سرطان کولون را در تومورهای انسانی شناسایی کردند (۳-۴). در هر دو مطالعه سلول‌های بنیادی سرطانی کولون بر اساس آنتی‌بادی ضد مارکر CD133 جدا شدند. به این مولکول پرومیین-۱ انسانی نیز می‌گویند. این مولکول یک گلیکوپروتئین ترنس ممبرین است که دارای ۸۶۵ اسید آمینه است و وزن مولکولی آن ۱۲۰ کیلودالتون می‌باشد. عملکرد این مولکول هنوز مشخص نیست. تصور بر این است که CD133 به طور معمول بر روی سلول‌های تمایز نیافته مثل سلول‌های پیش‌ساز، سلول‌های بنیادی نرمال و سلول‌های بنیادی بدخیم بافت‌های مختلف یافت می‌شوند، ولی در سلول‌های تمایز یافته (سالم یا بدخیم) بیان نمی‌شود و یا به میزان بسیار کم بیان می‌شوند (۱۵، ۳-۴). در دو مطالعه‌ی مذکور مشاهده شد که سلول‌های CD133+ می‌توانند تومور را در مدل گزینوگرفت تشکیل دهند، در حالی که سلول‌های CD133- قادر به تشکیل تومور در مدل گزینوگرفت نیستند. مطالعه‌ی دیگری که توسط Shmelkov و همکاران انجام شد، نشان داد که سلول‌های CD133- جدا شده از نمونه‌های متاستازی کبد نیز می‌توانند باعث تولید تومور در مدل گزینوگرفت شوند (۱۵). مطالعه‌ی Shmelkov و همکاران نیز نشان داد که مولکول CD133 را نمی‌توان به عنوان مارکری منحصر به فرد

کولون گرفته شد. نمونه‌ها در دمای ۴ درجه‌ی سانتی‌گراد و در محلول نمکی بافرشده‌ی فسفات (Phosphate buffered saline یا PBS) استریل که حاوی ۲۵ واحد در میلی‌لیتر پنی‌سیلین و ۲۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر استرپتومایسین بود، به محل آزمایشگاه کشت سلولی منتقل شد. همه‌ی نمونه‌ها از بیمارستان الزهرای (س) اصفهان تهیه شد.

به منظور این که سلول‌های بافت سرطان کولون به شکل سوسپانسیون سلولی در آیند، نمونه‌های توموری توسط روش‌های مکانیکی و آنزیمی از هم پاشیده می‌شوند. بافت‌های سرطان، به دلیل محل آناتومیک، بعد از کشت دادن مستعد آلودگی باکتریایی می‌باشند. بنابراین بعد از جداسازی، نمونه‌های جراحی شده به مقدار فراوان با محلول PBS یا محیط کشت DMEM که حاوی آنتی‌بیوتیک‌ها و آنتی‌مایکوتیک‌ها بود، شسته شدند. بعد از شستشوی بسیار زیاد، نمونه‌ی کولون در محلول PBS (سیگما) یا DMEM/F12 (سیگما) که حاوی ۵۰۰ واحد در میلی‌لیتر پنی‌سیلین (سیگما)، ۵۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر استرپتومایسین (سیگما)، ۱/۲۵ میکروگرم در میلی‌لیتر آمفوتریسین (سیگما) بود و دمای ۴ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت یک شب انکوبه شد. روز بعد بخش‌های نکروز شده و چربی حذف شدند و بافت توسط قیچی استریل به قطعات کوچک بریده شد. سپس قطعات بافتی با ۱/۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر کلاژناز (سیگما) و ۲۰ میکروگرم در میلی‌لیتر هیالورونیداز (سیگما)، همراه با تکان آرام با کمک روتاتور در محیط DMEM/F12 به مدت یک ساعت در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد (با حجم کلی ۱۰ میلی‌لیتر) هضم می‌شوند. به قطعات بافتی اجازه داده شد تا به خوبی هضم شده و رسوب کنند. سپس سوپرناتانت در یک لوله‌ی جدید جمع‌آوری و از فیلتر سلولی با قطر ۷۰ میکرومتر (شرکت BD) عبور داده شد. در مرحله‌ی بعد

سوسپانسیون سلولی در g ۴۵۰ به مدت ۵ دقیقه در دمای ۴ درجه‌ی سانتی‌گراد سانتریفیوژ گردید. پس از سانتریفیوژ، سوپرناتانت دور ریخته و رسوب سلولی در ۵ میلی‌لیتر محلول کلرید آمونیوم (نسبت ۰/۸ درصد با mM EDTA ۰/۱) به عنوان بافر لیز کننده به مدت ۱۰ دقیقه در دمای اتاق سوسپانسیون شد. هدف از استفاده از بافر لیز کننده، لیز گلوبول‌های قرمز موجود در نمونه‌های جراحی بود. بعد از گذشت ۱۰ دقیقه ۱۰ میلی‌لیتر محیط کشت DMEM/F12 به بافر لیز کننده در مرحله‌ی قبل اضافه گردید. سپس سوسپانسیون سلولی در g ۴۵۰ به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌فیوژ شد. بعد از سانتریفیوژ سوپرناتانت دور ریخته و دوباره رسوب سلولی در یک حجم مناسب (حدود ۱۰^۵ سلول در میلی‌لیتر) از محیط اختصاصی سوسپانسیون شد. در مرحله‌ی آخر درصد حیات سلول‌ها و شمارش سلول‌ها توسط تریپان بلو و لام نئوبار انجام گردید.

به منظور انتخاب سلول‌های بنیادی سرطانی کولون، بهترین گزینه برای کشت سوسپانسیون سلولی بافت‌های هضم شده، فلاسک‌های سلولی غیر چسبان حاوی محیط کشت اختصاصی است. محیط کشت سلول‌های بنیادی حاوی DMEM/F12 (سیگما) که با چندین فاکتور مطلوب رشد سلول‌های بنیادی (مثل bFGF و EGF) غنی شده‌اند و فاقد FBS (سرم جنین گاوی) می‌باشند، برای رشد سلول‌های توموری نابالغ مناسب است. اما سلول‌های تمایز یافته یا غیر سرطانی به طور منفی انتخاب می‌شوند و می‌میرند. در نهایت این فرایند منجر به تشکیل کولونی‌های گرد سلولی به نام اسفیر می‌شود. سلول‌هایی که در این محیط رشد می‌کنند فعالیت خود تجدید شوندگی دارند. برای انجام کشت سلولی، سوسپانسیون سلولی به اندازه‌ی ۱۰^۳ سلول در هر میلی‌متر با محیط کشت فاقد سرم رقیق شد. در این

g ۴۵۰ به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتیگراد می‌شود. بعد از سانتریفیوژ سوپرناتانت دور ریخته شد و رسوب سلولی در ۳ میلی‌لیتر محیط کشت سلول‌های بنیادی دوباره سوسپانسیون گردید. در این بخش سوسپانسیون سلولی با کمک پیپت استریل به مدت ۱۰ دقیقه بالا و پایین شد. بعد از ۱۰ دقیقه پیپت کردن، سوسپانسیون از لحاظ وجود اسفیر با چشم بررسی گردید. در این حالت نباید هیچ اسفیری با چشم قابل مشاهده باشد. در صورت مشاهده اسفیرها، پایتینگ برای ۵ تا ۱۰ دقیقه دیگر ادامه یافت. در مرحله آخر درصد حیات سلول‌ها با تریپان بلو بررسی و سلول‌ها شمارش و در نهایت به پلیت‌های جدید منتقل شدند.

در روش آنزیمی نیز مشابه روش مکانیکی، ابتدا سوسپانسیون سلولی به لوله‌ی سانتریفیوژ منتقل و بعد از این که به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۴ درجه نگهداری شد، سوپرناتانت دور ریخته و رسوب سلولی دوباره در ۳ تا ۵ میلی‌لیتر Trypsin/EDTA \times ۱ (سیگما) سوسپانسیون شد. در این جا هم سوسپانسیون سلولی به مدت ۳ دقیقه بالا و پایین شد. بعد از این مرحله، سوسپانسیون سلولی به انکوباتر ۳۷ درجه منتقل و سوسپانسیون به مدت ۱۰ دقیقه انکوبه گردید. با گذشت ۱۰ دقیقه سوسپانسیون از انکوباتور خارج شده، به آن ۳ تا ۵ میلی‌لیتر محیط کشت سلول‌های بنیادی اضافه شد. در مرحله‌ی بعد رسوب سلولی مرحله‌ی قبل در محیط کشت دوباره سوسپانسیون گردید. در این مرحله درصد حیات سلول‌ها با تریپان بلو بررسی شد و سلول‌ها شمارش و در نهایت به پلیت‌های جدید منتقل شدند.

یافته‌ها

برای کشت و جداسازی سلول‌های بنیادی سرطانی اولین مرحله‌ی مهم تهیه‌ی سوسپانسیون تک سلولی بود. به منظور این که سوسپانسیون تک سلولی با بازده

جا محیط کشت فاقد سرم، DMEM-F12 بود که با فاکتورهای متعدد غنی شده بود. اجزای محیط کشت اختصاصی شامل گلوکز به مقدار ۶ میلی‌گرم در میلی‌لیتر، کربنات سدیم به مقدار ۱ میلی‌گرم در میلی‌لیتر، HEPES به میزان ۵ میلی‌مول، ال-گلوتامین به مقدار ۲ میلی‌مول، هپارین به مقدار ۴ میکروگرم در میلی‌لیتر، BSA به مقدار ۴ میلی‌گرم در میلی‌لیتر، BFGF به مقدار نانوگرم در میلی‌لیتر، EGF به مقدار ۲۰ نانوگرم در میلی‌لیتر، آپوترانسفرین به مقدار ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر، انسولین به مقدار ۲۵ میکروگرم در میلی‌لیتر، پوترسین به مقدار ۹/۶ میکروگرم در میلی‌لیتر، Sodium selenite anhydrous به مقدار ۳۰ نانومول و پروژسترون به مقدار ۲۰ نانومول بودند. ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون سلولی رقیق شده با دانسیته‌ی ۱۰^۲ سلول به هر چاهک 96-well low attached plate (کرنینگ کواستار، سیگما) اضافه شد. هر هفت روز به هر چاهک ۱۰۰ میکرولیتر از DMEM-F12 اضافه شد. بعد از گذشت حدود سه هفته اسفیرها توسط میکروسکوپ فاز معکوس (شرکت الیمپوس) قابل مشاهده بودند. سلول‌های موجود در پلیت قابل پاساژ هستند. تمامی مواد و محلول‌ها برای کشت سلولی تست شده بودند. بعد از مشاهده‌ی کولونی‌ها رشد اسفیرها به صورت روزانه بررسی شد تا در صورت لزوم سلول‌ها پاساژ داده شوند. این زمان حدود چهار روز بود؛ یعنی سلول‌ها بعد از گذشت چهار روز امکان پاساژ داشتند. پاساژ کولونی‌ها نیازمند از هم پاشیده شدن آن‌ها و تولید سوسپانسیون تک سلولی بود. دو روش برای پاساژ کولونی‌های سلولی وجود دارد که شامل روش مکانیکی یا روش آنزیمی است.

در روش مکانیکی ابتدا سوسپانسیون سلولی به لوله‌ی سانتریفیوژ انتقال داده شد و سوسپانسیون در

بالای سلولی و درصد حیات بالا از بافت توموری تازه به دست آید، می‌بایست شرایط مناسب دمایی، غلظت مناسب آنزیم‌ها، حجم مناسب بافت توموری برای هر بار هضم، حجم مناسب محیط کشت برای تهیه‌ی سوسپانسیون هضم بافتی، میزان تکان (روتاسیون) مناسب برای محلول حاوی بافت در حال هضم و زمان مناسب اتکوباسیون را برای نمونه‌های مختلف بافت توموری تعیین شود. به همین دلیل آزمون‌های مختلفی در دفعات مختلف انجام شد تا یک پروتکل مناسب برای تهیه‌ی سوسپانسیون تک سلولی از بافت توموری تازه طراحی گردد. حدود بیش از ۲۰ بار آزمون با تغییر در فاکتورهای اثرگذار در هضم بافتی انجام شد که در این جا فقط سه آزمون آن به طور مختصر در جدول ۱ ارائه شده است.

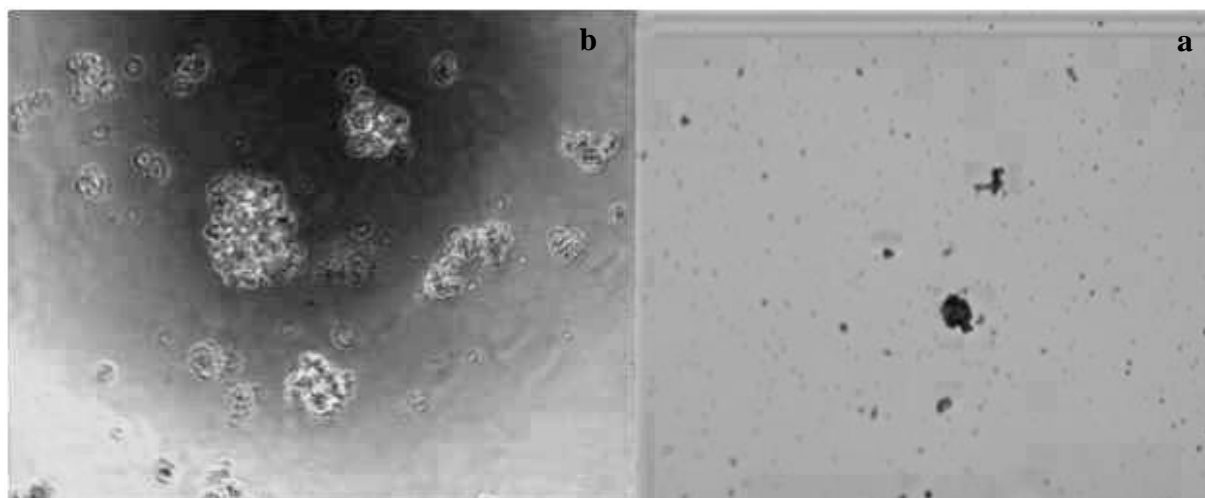
جدول ۱. نمونه‌هایی از آزمون‌های انجام شده جهت بهینه سازی پارامترهای مختلف برای تهیه‌ی سوسپانسیون تک سلولی از بافت سرطان کولون

آزمون‌ها	پارامترها	مقدار	درصد حیات سلول	بازده سلولی
آزمون ۱	غلظت آنزیم‌ها	۲ میلی‌لیتر با غلظت ۱ میلی‌گرم در میلی‌لیتر ۲۰ میلی‌لیتر با غلظت ۲۰ میکروگرم در میلی‌لیتر	صفر درصد	سلولی مشاهده نشد
	روتاسیون	-		
	حجم کلی سوسپانسیون حاوی بافت توموری	۵ میلی‌لیتر		
آزمون ۲	اندازه‌ی بافت توموری	۱ سانتی‌متر مکعب	کمتر از ۵۰ درصد	۲-۱/۵ در ۱۰ ^۶
	زمان اتکوباسیون	۳ ساعت		
	دما	۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد		
آزمون ۳	غلظت آنزیم‌ها	۲/۵ میلی‌لیتر با غلظت ۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر ۱/۵ میلی‌لیتر با غلظت ۲۰ میکروگرم در میلی‌لیتر	بیش از ۹۵ درصد	۱-۱/۵ در ۱۰ ^۶
	روتاسیون	۵ دور در دقیقه		
	حجم کلی سوسپانسیون حاوی بافت توموری	۱۰ میلی‌لیتر		
آزمون ۳	اندازه‌ی بافت توموری	۱ میلی‌متر مکعب	بیش از ۹۵ درصد	۱-۱/۵ در ۱۰ ^۶
	زمان اتکوباسیون	۱ ساعت		
	دما	۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد		
آزمون ۳	غلظت آنزیم‌ها	۱/۸ میلی‌لیتر با غلظت ۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر ۱/۵ میلی‌لیتر با غلظت ۲۰ میکروگرم در میلی‌لیتر	بیش از ۹۵ درصد	۱-۱/۵ در ۱۰ ^۶
	روتاسیون	۳ دور در دقیقه		
	حجم کلی سوسپانسیون حاوی بافت توموری	۱۰ میلی‌لیتر		
آزمون ۳	اندازه‌ی بافت توموری	۱ میلی‌متر مکعب	بیش از ۹۵ درصد	۱-۱/۵ در ۱۰ ^۶
	زمان اتکوباسیون	۱ ساعت		
	دما	۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد		

بحث

مطالعه‌ی حاضر یک ابزار مهم را برای جداسازی و تکثیر سلول‌های بنیادی سرطان کولون فراهم می‌کند. این مطالعه بر اساس تجربیات و کارهای آزمایشگاهی سخت، موفق به جداسازی و تکثیر این سلول‌ها از بافت سرطانی کولون گردید. به منظور دسترسی آسان‌تر به این ابزار، تعداد سلول‌های مورد نیاز، شرایط انکوباسیون، میزان غلظت مواد و معرف‌های مهم، شرایط دمایی مناسب و حجم مصرفی تمامی معرف‌های لازم به طور دقیق بیان شد. ذکر این نکته لازم است که با وجود این که پروتکل‌های مختلف در جداسازی سلول‌های بنیادی سرطانی در سرطان‌های مختلف وجود دارند، این مطالعه نتوانست با کمک این پروتکل‌ها سلول‌های بنیادی سرطانی را از بافت کولون جدا کند. بنابراین تمامی مراحل انجام شده برای اولین بار به صورت آزمون و خطا انجام شد که فرایندی بسیار سخت و زمان‌بر بود تا بتواند میزان بافت مورد نیاز برای هر بار هضم، غلظت‌ها، دماها، میزان سانتریفیوژ و زمان انکوباسیون مناسب را تعیین کند.

با توجه به جدول ۱، آزمون سوم بهترین حالات ممکن را برای تولید سلول با بازده و درصد حیات بالا فراهم می‌کند. بعد از هضم مکانیکی و آنزیمی (بر اساس پروتکل بالا) و عبور محلول حاوی بافت هضم شده از فیلتر سلولی ۷۰ میکرومتری، در نهایت سوسپانسیون تک سلولی به دست آمد. سپس این سوسپانسیون تک سلولی به پلیت‌های خاص حاوی محیط کشت اختصاصی انتقال داده شد. بعد از حدود سه هفته از کشت سلول‌ها، سلول‌های بنیادی سرطان کولون به صورت کلونی‌های سلولی (اسفیر شکل) در محیط کشت اختصاصی قابل مشاهده بودند (شکل ۱a). تشکیل کلونی سلولی در محیط کشت نشان دهنده‌ی فعالیت خود تجدید شونده‌ی این سلول‌ها در محیط *in vitro* و در نتیجه بازگوکننده‌ی بنیادی بودن (Stemness) آن‌ها بود. در محیط کشت اختصاصی سلول‌های تمایز یافته‌ی توموری قادر به رشد نبودند (شکل ۲b) و همه‌ی آن‌ها براساس فرایند انتخاب منفی از بین رفتند. علاوه بر این، اسفیرهای تشکیل شده در محیط کشت اختصاصی سلول‌های بنیادی قادر به تکثیر زیاد و قابل پاساژ بودند.



شکل ۱. (a) نمایی از تشکیل کلونی سلولی (اسفیر) توسط سلول‌های بنیادی سرطانی کولون در محیط کشت اختصاصی (بزرگ‌نمایی $\times 400$) (b) نمایی از عدم تشکیل کلونی‌های سلولی (اسفیر) توسط سلول‌های توموری تمایز یافته‌ی سرطان کولون (بزرگ‌نمایی $\times 400$)

سلول‌های بنیادی در محیط *in vitro* می‌توانند برای تعیین اثر داروهای ضد سرطانی و یا آزمایش ترکیبات ضد سرطانی جدید مورد استفاده قرار گیرند. در نهایت می‌توان با استفاده از این سلول‌ها، مدل رده‌ی سلولی سرطان کولون با ویژگی‌های سلول‌های بنیادی سرطانی را ایجاد کرد.

تشکر و قدردانی

مطالعه‌ی حاضر حاصل اجرای طرح پژوهشی به شماره‌ی ۱۸۸۱۲۰ بود که توسط معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی اصفهان تصویب و هزینه‌ی آن توسط این معاونت تأمین شد. نویسندگان این مقاله از همکاری صمیمانه بیماران کمال تشکر و قدردانی را دارند.

برای تهیه‌ی سوسپانسیون منفرد سلولی از بافت تومور، اندازه‌ی بافت مناسب (۱ میلی‌متر مکعب) برای بالاترین مقدار تولید سلول (حداقل 10^6 سلول، البته با توجه به حالت، نوع و قوام بافت توموری تعداد سلول تفاوت می‌کند) بعد از هضم در یک حجم مناسب (۱۰ میلی‌لیتر) و با یک میزان تکان مناسب، محلول حاوی بافت توموری در حین هضم بافتی (۳ دور در دقیقه به صورت دوره‌های چرخشی) توسط روتاتور تعیین شد که نتیجه‌ی آن به صورت مقاله پیش‌رو در آمده است.

جداسازی و تکثیر سلول‌های بنیادی سرطانی در محیط *in vitro* می‌تواند برای کاربردهای درمانی بسیار مناسب باشد. از این سلول‌ها می‌توان برای بررسی مسیرهای سیگنالینگ و مولکولی دخیل در پیدایش، حفظ و متاستاز این سلول‌ها استفاده کرد. علاوه بر این،

References

- Foroutan M, Rahimi N, Tabatabaeifar M, Darvishi M, Hashemi M, Hossein-Panah F, et al. Clinical features of colorectal cancer in Iran: a 15-year review. *J Dig Dis* 2008; 9(4): 225-7.
- 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.
- 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): 111-5.
- O'Brien CA, Pollett A, Gallinger S, Dick JE. A human colon cancer cell capable of initiating tumour growth in immunodeficient mice. *Nature* 2007; 445(7123): 106-10.
- Fang D, Nguyen TK, Leishear K, Finko R, Kulp AN, Hotz S, et al. A tumorigenic subpopulation with stem cell properties in melanomas. *Cancer Res* 2005; 65(20): 9328-37.
- Fillmore CM, Kuperwasser C. Human breast cancer cell lines contain stem-like cells that self-renew, give rise to phenotypically diverse progeny and survive chemotherapy. *Breast Cancer Res* 2008; 10(2): R25.
- Ricci-Vitiani L, Fabrizi E, Palio E, De MR. Colon cancer stem cells. *J Mol Med (Berl)* 2009; 87(11): 1097-104.
- Todaro M, Perez AM, Scopelliti A, Medema JP, Stassi G. IL-4-mediated drug resistance in colon cancer stem cells. *Cell Cycle* 2008; 7(3): 309-13.
- Croker AK, Allan AL. Inhibition of aldehyde dehydrogenase (ALDH) activity reduces chemotherapy and radiation resistance of stem-like ALDH(hi)CD44 (+) human breast cancer cells. *Breast Cancer Res Treat* 2011.
- Pajonk F, Vlashi E, McBride WH. Radiation resistance of cancer stem cells: the 4 R's of radiobiology revisited. *Stem Cells* 2010; 28(4): 639-48.
- Debeb BG, Xu W, Woodward WA. Radiation resistance of breast cancer stem cells: understanding the clinical framework. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 2009; 14(1): 11-7.
- Dylla SJ, Beviglia L, Park IK, Chartier C, Raval J, Ngan L, et al. Colorectal cancer stem cells are enriched in xenogeneic tumors following chemotherapy. *PLoS One* 2008; 3(6): e2428.
- Pang R, Law WL, Chu AC, Poon JT, Lam CS, Chow AK, et al. A subpopulation of CD26+ cancer stem cells with metastatic capacity in human colorectal cancer. *Cell Stem Cell* 2010; 6(6): 603-15.
- Bao S, Wu Q, McLendon RE, Hao Y, Shi Q, Hjelmeland AB, et al. Glioma stem cells promote

- radioresistance by preferential activation of the DNA damage response. *Nature* 2006; 444(7120): 756-60.
15. Shmelkov SV, St CR, Lyden D, Rafii S. AC133/CD133/Prominin-1. *Int J Biochem Cell Biol* 2005; 37(4): 715-9.
16. Shmelkov SV, Butler JM, Hooper AT, Hormigo A, Kushner J, Milde T, et al. CD133 expression is not restricted to stem cells, and both CD133+ and C. *J Clin Invest* 2008; 118(6): 2111-20.
17. Du L, Wang H, He L, Zhang J, Ni B, Wang X, et al. CD44 is of functional importance for colorectal cancer stem cells. *Clin Cancer Res* 2008; 14(21): 6751-60.
18. Dalerba P, Dylla SJ, Park IK, Liu R, Wang X, Cho RW, et al. Phenotypic characterization of human colorectal cancer stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007; 104(24): 10158-63.

Isolation and Propagation of Colon Cancer Stem Cells In vitro

Hamidreza Mirzaii MSc¹, Marjan Gharegozloo PhD², Abbas Rezaii PhD³,
Hamid Kalantari MD⁴, Mohammad Hossein Sanei MD⁵, Sayed Mohsen Hosseini PhD⁶,
Gholamreza Mohajeri MD⁷, Abbas Tabataba MD⁸, Mozaffar Hashemi MD⁹

Abstract

Background: Recent investigations in colon cancer biology suggest that cancer growth is driven by colon cancer stem cells (CSCs). CSCs are responsible for tumor initiation, maintenance, spreading and relapse. The aim of this study was to isolate and propagate tumorigenic colon CSCs in vitro.

Methods: Tumor samples from colon cancers were subjected to mechanical and enzymatic disassociation. After passing of tumor cell suspensions through the cell strainers, tumor cells were counted and their viability was determined. Then tumor cells were plated in the special stem cells medium (contains serum-free DMEM/F12 supplemented by growth factors). Tumor cells growth was evaluated by inverted microscope.

Findings: After about 3 weeks of plating in specific medium, colon CSCs were appeared as cell spheres whereas differentiated tumor cells and nonmalaginent cells were unable to grow. Colon cancer spheres were able to propagated and passaged in the specific stem cells medium.

Conclusion: Isolation and propagation of tumorigenic colon CSCs in vitro would help to devise novel diagnostic and therapeutic methods. Isolated colon CSCs can be applied for the studying of cell signaling and assessment of the effect of anti-cancer drugs.

Keywords: Colon cancer, Cancer stem cells, In vitro propagation.

¹ Department of Immunology, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran.

² Assistant Professor, Department of Immunology, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran.

³ Professor, Department of Immunology, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran.

⁴ Associate Professor, Department of Internal Medicine, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran.

⁵ Associate Professor, Department of Pathology, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran.

⁶ Associate Professor, Department of Biostatistics and Epidemiology, School of Public Health, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran.

⁷ Assistant Professor, Department of Surgery, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran.

⁸ Associate Professor, Department of Surgery, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran.

⁹ Assistant Professor, Department of Surgery, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran.

Corresponding Author: Marjan Gharegozloo PhD, Email: marjanghai@gmail.com