

## ارزیابی اثرات محیط کشت رویی پرده آمینون بر فعالیت Heat Shock Protein 90 در سلول‌های سرطانی سرویکس و پستان

معصومه میرمعصومی<sup>۱</sup>، سارا عزیزیان<sup>۲</sup>، خشایار مدرس‌فر<sup>۳</sup>، دکتر حمیده مروج<sup>۳</sup>، دکتر حسن نیک‌نژاد<sup>۴</sup>

نویسنده‌ی مسئول: گروه فارماکولوژی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران

niknejad@sbmu.ac.ir

دریافت: ۹۵/۶/۲ پذیرش: ۹۵/۱۰/۵

### چکیده

**زمینه و هدف:** اخیراً نشان داده شده است که استفاده از محیط کشت رویی پرده آمینون در درمان بیماری سرطان می‌تواند تاثیرگذار باشد. در این مطالعه اثر محیط کشت رویی پرده آمینون بر روی فعالیت *Hsp90* و بیان *Cdk4* در سلول‌های سرطانی بررسی شده است. **روش بررسی:** ابتدا دو رده سلول سرطانی *HeLa* و *MDA-MB-231* به مدت ۲۴ ساعت با محیط کشت رویی پرده آمینون تیمار شدند. سپس درصد زیست‌پذیری این سلول‌ها با استفاده از آزمون *MTT* بررسی شد. به منظور بررسی تاثیر محیط کشت رویی پرده آمینون روی چرخه سلولی سلول‌های سرطانی میزان بیان *Cdk4* از آزمون ایمنوسیتوشیمی استفاده شد. سپس با استفاده از روش *RT-PCR* میزان بیان ژن *Hsp90α(aal)* قبل و بعد از تیمار سلول‌های سرطانی مطالعه شد.

**یافته‌ها:** نتایج آزمون *MTT* نشان داد که زیست‌پذیری سلول‌های سرطانی پس از قرارگیری در معرض محیط کشت رویی پرده آمینون کاهش می‌یابد. نتایج حاصل از ایمنوسیتوشیمی نشان‌دهنده‌ی کاهش بیان پروتئین *Cdk4* سلول‌های سرطانی پس از تیمار بود. بررسی بیان ژن *Hsp90* با استفاده از *RT-PCR* حاکی از کاهش بیان آن در سلول‌های سرطانی تحت تاثیر محیط کشت رویی پرده آمینون بود. **نتیجه‌گیری:** بر اساس نتایج به دست آمده، محیط کشت رویی سلول‌های بنیادی پرده آمینون علاوه بر کاهش زیست‌پذیری سلول‌های سرطانی، منجر به القای آپوپتوز از طریق مهار بیان ژن *Hsp90* و همچنین کاهش بیان کلاینت آن، *Cdk4* می‌شود. با توجه به نتایج، به نظر می‌رسد که مهار *Hsp90* می‌تواند یکی از مکانیسم‌های احتمالی برای خاصیت ضد سرطان پرده آمینون باشد.

**واژگان کلیدی:** پرده آمینون، آپوپتوز، *Hsp90* سرطان

### مقدمه

ژنتیکی و یک انتقال پیام نابجاست. تقریباً در همه‌ی موارد، تومورهای بدخیم حاصل تجمع چندین تغییر انکوژنی در سلول‌ها می‌باشند. با پیشروی سرطان، جهش‌های بیشتری در پروتئین‌های تنظیم‌کننده‌ی رشد سلولی، پیشروی چرخه

امروزه سرطان یک مشکل چالش برانگیز و دومین علت مرگ و میر در اغلب کشورهای دنیا می‌باشد و به نظر می‌رسد در چند سال آینده تلفات ناشی از سرطان بیشتر از میزان تلفات بیماری‌های قلبی شود (۱). سرطان، یک بیماری

۱- کارشناسی ارشد بیوشیمی، گروه فارماکولوژی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران

۲- کارشناسی ارشد مهندسی پزشکی، گروه بیومتریال، دانشکده‌ی مهندسی پزشکی، دانشگاه صنعتی امیرکبیر، تهران

۳- متخصص پوست، دانشیار مرکز تحقیقات پوست، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران

۴- دکترای تخصصی فارماکولوژی، دانشیار گروه فارماکولوژی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران

سلول‌های اپیتلیال مشتق شده از پرده‌ی آمنیون به صورت قابل ملاحظه‌ای افزایش یافته است که می‌تواند بیان‌کننده این امر باشد که سلول‌های اپیتلیال پرده آمنیون عامل اصلی در ترشح فاکتورهایی با خاصیت القای آپوپتوز می‌باشند (۲۰ و ۲۱). همچنین نشان داده شده است که محیط کشت رویی سلول‌های استرومال مزانشیمی مشتق شده از پرده آمنیون، از تکثیر سلول‌های سرطان پروستات جلوگیری می‌کند (۲۲). سلول‌های آمیوتیک حاوی فاکتوره‌های رشدی همانند PDGF, VEGF, EGF, bFGF و TGF $\beta$  می‌باشند که از طریق اثر بر چرخه‌ی سلولی باعث افزایش تکثیر سلول‌ها می‌گردند.

ما اخیراً فرضیه‌ای را مبنی بر اینکه اجزای نامشخصی که از پرده آمنیون و به ویژه سلول‌های اپیتلیال آمنیون ترشح می‌شوند، قابلیت ممانعت از فعالیت Hsp90 (پروتئین شوک گرمایی ۹۰) و پروتئین‌های کلاینت آن را دارند، مطرح کرده‌ایم. این فرضیه القای آپوپتوز، توقف چرخه سلولی سرطان و ممانعت از رگزایی را به عنوان مکانیسم‌های ممکن در عملکرد ضدسرطانی پرده آمنیون معرفی می‌کند (۲۳). پروتئین Hsp90 توانایی پایدارسازی تعداد زیادی از پروتئین‌های مورد نیاز رشد تومورها را دارد، از این رو ممانعت از فعالیت آن به‌عنوان یک هدف اصلی در درمان سرطان مطرح می‌شود (۲۳). در این تحقیق تاثیر محیط کشت رویی پرده آمنیون بر روی فعالیت Hsp90 و کلاینت آن، Cdk4، به‌عنوان مکانیسم احتمالی عملکرد ضدسرطانی پرده آمنیون بر روی دو رده سلولی HeLa و MDA مورد بررسی قرار گرفته است.

### روش بررسی

جفت از مادران با بارداری طبیعی با سن بارداری ۳۶ تا ۳۸ هفته به دنبال سزارین انتخابی، تهیه شد. تست‌های آزمایشگاهی انجام شده از نظر HIV، هپاتیت B و C و

سلولی، آپوپتوز (مرگ برنامه‌ریزی شده‌ی سلول) و تمایز سلولی رخ می‌دهد. پیشرفت‌های اخیر در حوزه‌ی کنترل انتقال پیام و چگونگی قطع شدن مسیر پیام‌رسانی در سرطان به سمت توسعه‌ی داروهای تعدیل‌کننده انتقال پیام است که به منظور ممانعت از رشد تومور بدون اثرات جانبی زیان بار به‌صورت کاملاً اختصاصی برای انکوپروتئین‌های هدف طراحی شده‌اند (۲). یکی از رویکردهای جدید در درمان بیماری‌ها، استفاده از منابع طبیعی می‌باشد. از جمله این منابع طبیعی، بافت آمیوتیک جفت است که در دهه‌ی گذشته بسیار مورد توجه قرار گرفته است. این بافت در واقع یکی از لایه‌های جفت بوده و به کوریون متصل است. بافت یا پرده آمنیون از لایه‌های سلول‌های اپیتلیال، غشای پایه و لایه‌ی استرومایی که حاوی سلول‌های بنیادی مزانشیمی است، تشکیل شده است (۳ و ۴). سلول‌های اپیتلیال و مزانشیمی استخراج شده از پرده آمنیون ویژگی‌های سلول‌های بنیادی را از خود نشان داده‌اند (۵-۷). خواص بیولوژیکی پرده آمنیون مانند خاصیت ضدفیروزی (۸)، ضدزخم و ضد میکروبی (۹) و همچنین ایمنی‌زایی کم، آن را به بافتی مناسب در کاربردهای کلینیکی تبدیل کرده است (۳). به‌طوری که تا به حال از این بافت در ترمیم جراحی (۱۰)، سوختگی و زخم‌های پوستی (۱۱)، به‌عنوان جایگزینی مناسب برای مهندسی بافت عروق (۱۲ و ۱۳) و همچنین در پیوند پوست (۱۴ و ۱۵) و تهیه داربستی برای کشت و رساندن سلول‌های مختلف در بدن (۱۵ و ۱۶) استفاده شده است.

اخیراً ویژگی ضدسرطانی بودن پرده‌ی آمنیون مطرح شده است (۱۶-۱۸). خاصیت ضدسرطانی نه تنها در کشت مستقیم پرده آمنیون و همچنین سلول‌های اپیتلیال پرده با سلول‌های سرطانی بروز می‌کند، بلکه در محیط کشت رویی هر دوی این منابع (پرده آمنیون و سلول‌های اپیتلیال آمنیونی) نیز وجود دارد (۱۹). در مطالعات مختلف نشان داده شده که بیان کاسپاز-۸ و کاسپاز-۳ در سلول‌های سرطانی تحت درمان با

شدند. پس از آن، کریستال‌های فورمازان در ۹۰۰ میکرولیتر DMSO(Sigma-Aldrich) درون هر چاهک حل شدند. سپس میزان جذب نوری فورمازان در هر چاهک در طول موج ۵۷۰ نانومتر (بیشترین جذب فورمازان) با استفاده از اسپکتروفوتومتر (CE 7500, Cecil, UK) اندازه‌گیری گردید و درصد سلول‌های زنده به دست آمد. تمام آزمایش‌ها حداقل سه بار به صورت جداگانه و در هر بار چهار تکرار انجام شد. به منظور بررسی فعالیت Cdk4، سلول‌های سرطانی با ۸۰۰ میلی‌لیتر محیط کشت رویی پرده آمینون به مدت ۲۴ ساعت تیمار شدند و در دو گروه کنترل و تیمار شده مورد بررسی با روش ایمنوسیتوشیمی قرار گرفتند (۵). به طور خلاصه سلول‌ها، با پارافرمالدئید ۵/۲ درصد و در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۱۵ دقیقه تثبیت شدند. بعد از شستشو با PBS برای نفوذپذیر کردن سلول‌ها، از Triton ۰/۱ درصد به مدت ۱۰ دقیقه استفاده شد. پس از شستشو با PBS، جهت بلاک کردن سلول‌ها و جلوگیری از واکنش با آنتی‌بادی‌های غیراختصاصی، Goat serum ۱۰ درصد به مدت ۱۰ دقیقه به کار برده شد و سپس آنتی‌بادی اولیه‌ی Anti-Cdk4(abcam;ab108357)، روی سلول‌ها اضافه شد و به مدت ۲۴ ساعت در درجه حرارت ۴ درجه‌ی سانتی‌گراد انکوبه گشت. سپس با PBS شستشو داده شد و به مدت ۲ ساعت در آنتی‌بادی ثانویه Goat Anti Rabbit IgG(Millipore;AP132R) در دمای محیط و بدون نور قرار داده شد. نمونه‌ها توسط میکروسکوپ اینورت فلورسنت مربوطه مورد بررسی قرار گرفتند. میزان بیان ژن Hsp90α(aa1) در سلول‌های سرطانی تیمار شده با محیط کشت رویی پرده آمینون با استفاده از آزمون RT-PCR مورد بررسی قرار گرفت (۵). به این منظور سلول‌های سرطانی با ۸۰۰ میکرولیتر از محیط کشت پرده آمینون به مدت ۲۴ ساعت انکوبه شدند. سپس سلول‌ها تریپسینه و سانتریفیوژ شده و در دو گروه کنترل و تیمار شده با محیط

سیفلیس قبل از زایمان، در تمام موارد منفی بودند و رضایت‌نامه‌ی لازم از آن‌ها جهت استفاده از جفت گرفته شد. بافت جفت به سرعت در شرایط استریل و در دمای ۴ درجه‌ی سانتی‌گراد به آزمایشگاه منتقل گردید. سپس پرده آمینون از کوریون جدا شد و پس از شستشو با بافر فسفات سالین سرد برای انجام آزمایشات مورد استفاده قرار گرفت. پرده آمینون به قطعات ۲×۲ سانتی‌متری بریده و هر قطعه در یک چاهک پلیت ۱۲ خانه در حالی که سطح اپیتلیال آن رو به بالاست، قرار داده شد. به هر چاهک ۱ میلی‌لیتر از محیط کشت DMEM(Sigma-Aldrich) حاوی FBS ۱۰ درصد و پنی سیلین - استرپتومایسین ۱ درصد، اضافه گردید. سپس پلیت در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد و CO<sub>2</sub> ۵ درصد نگهداری شد. برای بررسی تاثیر مواد محلول ترشح شده از پرده آمینون بر روی درصد زنده ماندن و تکثیر سلول‌های سرطانی، از دو رده‌ی سلولی HeLa و MDA-MB-231 استفاده شد. سلول‌های سرطانی در محیط کشت RPMI به همراه FBS ۱۰ درصد و پنی سیلین استرپتومایسین ۱ درصد در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد و دی اکسید کربن ۵ درصد کشت داده شدند.

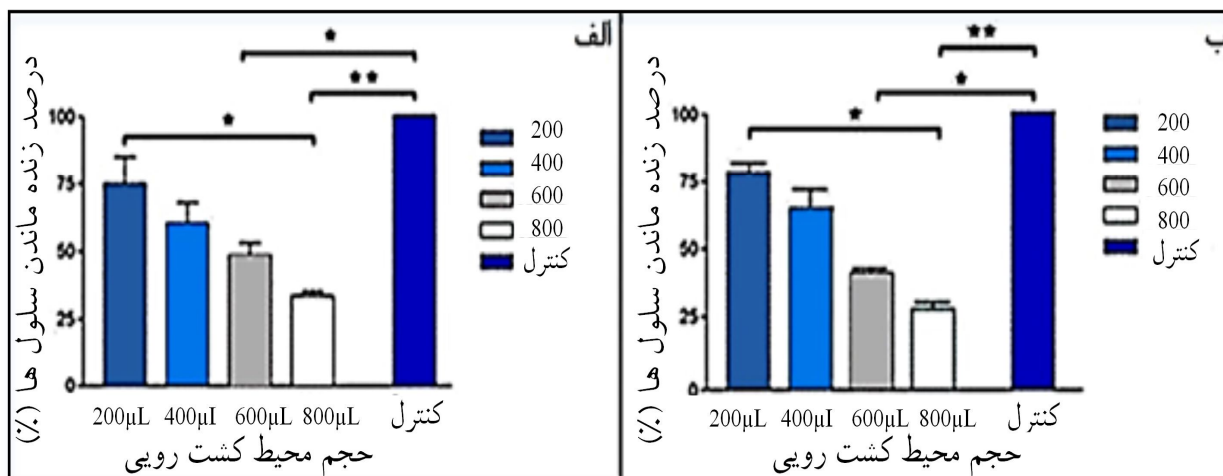
پس از ۲۴ ساعت محیط کشت درون هر چاهک حاوی پرده جمع‌آوری گردید. محیط کشت رویی جمع‌آوری شده بعد از فیلتراسیون با فیلترهای ۰/۲۲ میکرون، به منظور بررسی تاثیر دوز به ترتیب به میزان ۲۰۰، ۴۰۰، ۶۰۰، ۸۰۰ میکرولیتر به سلول‌های سرطانی اضافه شد. گروه کنترل شامل سلول‌های سرطانی در محیط کشت RPMI بود. پس از ۲۴ ساعت درصد زنده ماندن سلول‌های سرطانی که با محیط کشت رویی پرده‌ی آمینون تیمار شده بودند، به وسیله‌ی آزمون MTT بررسی گردیدند. در این آزمون محلول ۰/۵ درصد MTT پس از استریل شدن به وسیله‌ی فیلتر ۰/۲۲ میکرومتر به محیط سلول‌های سرطانی اضافه شد. سپس پلیت‌های کشت سلول به مدت ۴ ساعت در محیط ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد انکوبه

درصد زنده ماندن سلول‌های سرطانی HeLa می‌شود. همان‌طور که در شکل ۱ (الف) نشان داده شده است با افزایش غلظت محیط کشت روی پرده آمینون، درصد زنده ماندن سلول‌های سرطانی کاهش یافت. تمامی غلظت‌ها نسبت به گروه کنترل (محیط کشت RPMI) دارای اختلاف معناداری بودند. غلظت ۸۰۰ نسبت به غلظت ۲۰۰ با  $P < 0/05$  و غلظت ۸۰۰ نسبت به کنترل با  $P < 0/01$  دارای اختلاف معنادار بود. تکرار این روند بر روی سلول‌های MDA نیز نتایج مشابهی را نشان داد (شکل ۱-ب). در این حالت نیز غلظت‌ها نسبت به گروه کنترل (محیط کشت RPMI) دارای اختلاف معناداری بودند. غلظت ۸۰۰ نسبت به غلظت ۲۰۰ با  $P < 0/05$  و غلظت ۸۰۰ نسبت به کنترل با  $P < 0/01$  دارای اختلاف معنادار بود.

کشت رویی پرده آمینون جهت بررسی بیان Hsp90α(aa1) آماده شدند. برای انجام PCR نیمه کمی، بیان ژن Hsp90α(aa1) در این دو نمونه نسبت به کنترل داخلی بتا اکتین سنجیده شدند. پرایمرهای ژن Hsp90 (173bp) شامل F:5'-ggcaagaccttggtgtctgt و R:5'-gatgtcaccagtcggttga و پرایمرهای بتا اکتین (214bp) به صورت F:5'-cttgggtatggaatcctgtgg و R:5'-gtactgcgctcaggaggag بودند (۲۴). پرایمرها با نرم‌افزار Generuner مورد تایید قرار گرفتند.

### یافته‌ها

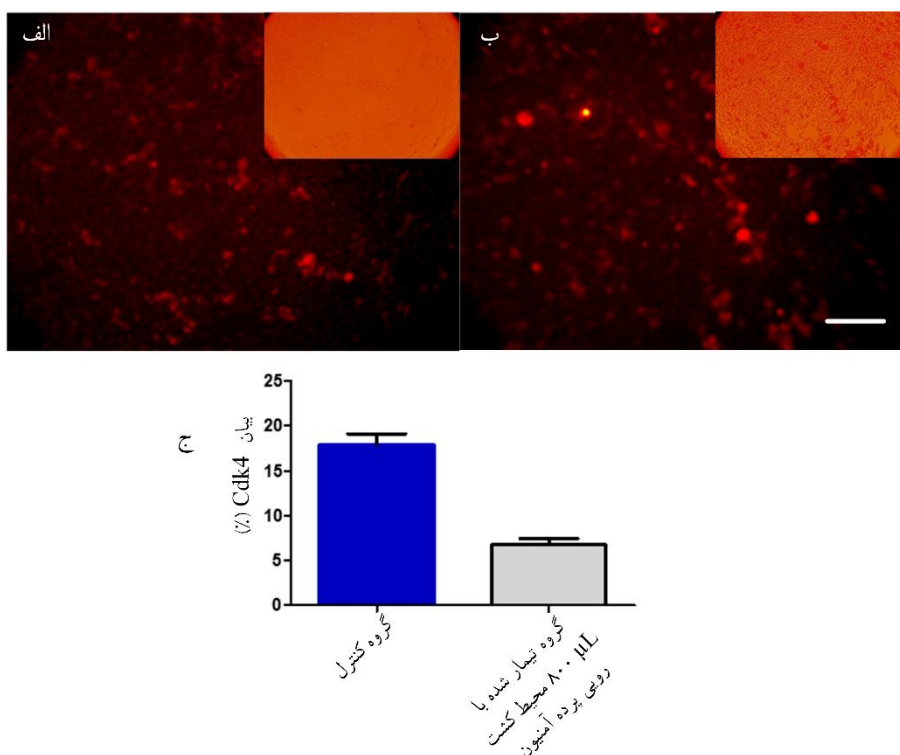
نتایج حاصل از آزمون MTT نشان داد که محیط کشت رویی پرده آمینون به صورت وابسته به غلظت، باعث کاهش



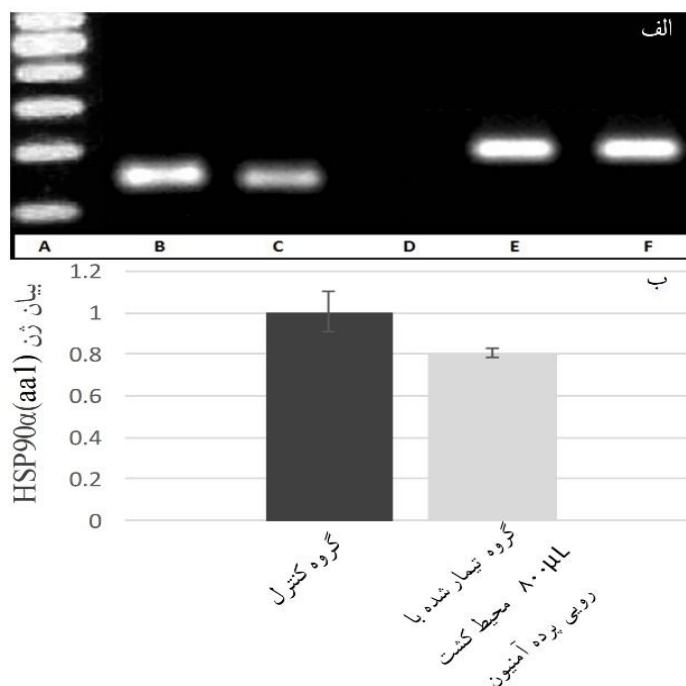
شکل ۱: تاثیر محیط کشت رویی پرده آمینون بر درصد زنده ماندن سلول‌های سرطانی HeLa (الف)  $P < 0/05$  و  $P < 0/01$  و سلول‌های سرطانی MDA-MB-231 (ب)  $P < 0/05$  و  $P < 0/01$ . مطابق قسمت الف شکل، با افزایش غلظت محیط کشت رویی پرده آمینون، درصد زنده ماندن سلول‌های سرطانی HeLa کاهش یافت. تمامی غلظت‌ها نسبت به گروه کنترل (محیط کشت RPMI) دارای اختلاف معناداری هستند. غلظت ۸۰۰ نسبت به غلظت ۲۰۰ با  $P < 0/05$  و غلظت ۸۰۰ نسبت به کنترل با  $P < 0/01$  دارای اختلاف معنادار است. تکرار این روند بر روی سلول‌های سرطانی MDA نیز نتایج مشابهی را نشان داد که در قسمت ب قابل مشاهده هستند.

(شکل ۳ الف). همان طور که در شکل مشخص است Hsp90α(aa1) درصد بیان متفاوتی در گروه کنترل و تیمار شده با ۸۰۰ میکرولیتر محیط کشت رویی پرده آمینون دارد. همچنین ژن بتا اکتین، در هر دو گروه کنترل و تیمار شده بیان می‌شود. بررسی شدت باندهای حاصل از PCR با نرم‌افزار Total lab ۱۳/۲ انجام شد و نشان داد که میزان بیان ژن Hsp90α(aa1) بعد از تیمار با ۸۰۰ میکرولیتر محیط کشت رویی پرده آمینون به صورت معناداری نسبت به گروه کنترل کاهش می‌یابد (شکل ۳ ب).

Cdk4، به عنوان کیناز چرخه‌ی سلولی و کلازینت پروتئین Hsp90 در سلول‌های سرطانی در دو گروه کنترل و تیمار شده با ۸۰۰ میکرولیتر از محیط کشت رویی پرده آمینون بررسی شد. درصد سلول‌های سرطانی بیان کننده‌ی Cdk4 بعد از تیمار با ۸۰۰ میکرولیتر از محیط کشت رویی پرده آمینون نسبت به سلول‌های تیمار نشده (گروه کنترل)، به صورت معناداری کاهش یافت ( $P < 0/01$ ) (شکل ۲). آشکارسازی محصول RT-PCR، یک باند منفرد برای هر کدام از ژن‌ها به صورت ۱۷۳ جفت باز برای ژن Hsp90α(aa1) و ۲۱۴ جفت باز برای ژن بتا اکتین نشان داد



شکل ۲: تصویر میکروسکوپی سلول‌های سرطانی کونزوگه شده با anti-Cdk4 و آنتی بادی ثانویه کونزوگه با رودامین قبل از تیمار با محیط کشت رویی پرده آمینون (الف) و بعد از تیمار با ۸۰۰ میکرولیتر محیط کشت رویی پرده آمینون (ب). کاهش بیان Cdk4 در سلول‌های سرطانی تیمار شده با محیط کشت رویی پرده آمینون پس از ۲۴ ساعت. (ج) (scale bar=۱۰۰ میکرومتر). Cdk4، به عنوان کلازینت Hsp90 در سلول‌های سرطانی در دو گروه کنترل و تیمار شده با ۸۰۰ میکرولیتر از محیط کشت رویی پرده آمینون بررسی شد. درصد سلول‌های سرطانی بیان کننده‌ی Cdk4 بعد از تیمار با ۸۰۰ میکرولیتر از محیط کشت رویی پرده آمینون نسبت به سلول‌های تیمار نشده (گروه کنترل)، به صورت معناداری کاهش یافت ( $P < 0/01$ ).



شکل ۳. (الف) تصویر حاصل از الکتروفورز ژل آگاروز محصول RT-PCR ژن *Hsp90* ردیف A. (نشانهگر اندازه bp). ردیف B. *Hsp90α(aa1)* در گروه کنترل، ردیف C. *Hsp90α(aa1)* در گروه تیمار شده با ۸۰۰ میکرولیتر محیط کشت رویی پرده آمینون، ردیف D. کنترل منفی بدون ترانس کریپتاز معکوس، ردیف E.  $\beta$ -اکتین در گروه کنترل، ردیف F.  $\beta$ -اکتین در گروه تیمار شده با ۸۰۰ میکرولیتر محیط کشت رویی پرده آمینون. (ب) مقایسه بیان ژن *Hsp90α* در گروه سلول‌های کنترل و سلول‌های تیمار شده با ۸۰۰ میکرولیتر محیط کشت رویی پرده آمینون. آشکارسازی محصول RT-PCR یک باند منفرد برای هر کدام از ژن‌ها به صورت ۱۷۳ جفت باز برای ژن *Hsp90α(aa1)* و ۲۱۴ جفت باز برای ژن بتا اکتین نشان داد. مطابق شکل، *Hsp90α(aa1)* درصد بیان متفاوتی در گروه کنترل و تیمار شده با ۸۰۰ میکرولیتر محیط کشت رویی پرده آمینون دارد. همچنین ژن بتا اکتین، در هر دو گروه کنترل و تیمار شده بیان می‌شود. بررسی شدت باندهای حاصل از PCR نشان داد که میزان بیان ژن *Hsp90α(aa1)* بعد از تیمار با ۸۰۰ میکرولیتر محیط کشت رویی پرده آمینون به صورت معناداری نسبت به گروه کنترل کاهش می‌یابد.

## بحث

تیمار شده بودند مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد زیست پذیری سلول‌های سرطانی بعد از تیمار با محیط کشت رویی پرده آمینون، به طور معناداری کاهش پیدا می‌کند. اخیراً نشان داده شده است که این کاهش از طریق القای مسیر پیام رسانی آپوپتوز و افزایش بیان کاسپاز ۳ و ۸ در سلول‌های سرطانی است که با توجه به مطالعات ذکر شده می‌تواند حاصل از سلول‌های اپیتلیال، مزانشیمی و یا هر دو باشد (۲۰). به‌طور مشابه کانگ و همکارانش در سال ۲۰۱۲ نشان دادند که

این تحقیق بر مبنای بررسی فرآیند القای آپوپتوز و وقفه‌ی چرخه‌ی سلولی حاصل از مواد مترشحه از پرده آمینون در سلول‌های سرطانی HeLa و MDA-MB-231 صورت گرفته است؛ لذا فعالیت *Hsp90* به‌عنوان نقطه‌ی فزاینده این فرآیندها مورد بررسی قرار گرفته است (۲۳). بر این اساس القای آپوپتوز به‌عنوان یکی از مکانیسم‌های مورد نظر در سلول‌های سرطانی که با محیط حاصل از کشت پرده آمینون

ژن‌های هدف این فاکتور رونویسی می‌شود که مسئول گذر از فاز G1 چرخه‌ی سلولی هستند (۳۱ و ۳۰). گزارش اخیر پارولینی و همکاران نیز حاکی از این است که خاصیت ضد تکثیر پرده آمینون با القای وقفه در چرخه‌ی سلولی در فاز G0/G1 از طریق فاکتورهای محلول ناشناخته‌ای همراه است. آن‌ها پیشنهاد کرده‌اند که سلول‌های پرده آمینون می‌توانند در سلول‌های سرطانی، بیان ژن‌های مرتبط با پیشروی چرخه‌ی سلولی، همانند سایکلین‌ها (سایکلین E1, D2 و H) را کاهش دهند (۲۵).

همچنین Hsp90 اکثر فازهای چرخه‌ی سلولی را به صورت کاهشی تنظیم می‌کند؛ به طوری که سایکلین‌های D, B و E و کینازهای وابسته به سایکلین، شامل Cdk‌های ۱، ۲، ۴ و ۶، به عنوان تنظیم کننده‌های اصلی چرخه‌ی سلولی به طور مستقیم و غیرمستقیم توسط Hsp90 به صورت افزایشی تنظیم می‌شوند. مهار Cdk2 و سایکلین E، از طریق مهار Hsp90 منجر به وقفه‌ی چرخه‌ی سلولی در G1/S می‌شود (۳۲).

### نتیجه‌گیری

بر اساس نتایج این مطالعه، قرار گرفتن سلول‌های سرطانی HeLa و MDA-MB-231 در معرض محیط کشت رویی پرده آمینون منجر به کاهش زیست‌پذیری آن‌ها در حالت وابسته به دوز می‌شود. همچنین بررسی انجام شده در سطح ژن Hsp90α(aa1) و بیان پروتئین Cdk4 در این مطالعه نشان داد که تیمار سلول‌های سرطانی با محیط کشت رویی پرده آمینون باعث مهار بیان ژن Hsp90α(aa1) و همچنین کاهش بیان کلانت آن (Cdk4)، می‌شود. این یافته نشان دهنده‌ی این است که مهار Hsp90α(aa1) می‌تواند به عنوان یک مکانیسم اثر ضد سرطانی برای پرده‌ی آمینون مطرح باشد. البته محیط کشت رویی پرده آمینون و یا سلول‌های آن، حاوی فاکتورهای متفاوت و ناشناسی می‌باشند که هر کدام می‌تواند با مکانیسم‌های متفاوتی منجر به تداخل در روند بیماری

کشت هم‌زمان سلول‌های اپیتلیال مشتق شده از پرده آمینون با سلول‌های سرطانی، منجر به کاهش رشد سلول‌ها می‌شود. همچنین تزریق سلول‌های اپیتلیال آمینونی به موش دارای تومور باعث کاهش اندازه‌ی آن شد. البته در این مطالعه مکانیسم احتمالی مشخصی برای کاهش رشد تومور بیان نشد (۲۱). مشخص کردن منبع اصلی القای آپوپتوز سلول‌های سرطانی توسط پرده‌ی آمینون احتیاج به بررسی‌های بیشتری دارد. سائوکاین‌های زیادی در سلول‌های اپیتلیال آمینوتیک وجود دارند که می‌توانند در القای مرگ سلولی دخیل باشند ولی گزارشات متعدد و متناقضی در مورد اثراتشان و یا اینکه مکانیسم‌های دیگری غیر از سائوکاین‌ها می‌توانند علت اثرات ضد سرطان این سلول‌ها باشند وجود دارند (۲۹-۲۵).

آنچه باعث می‌شود تا مهار Hsp90 به عنوان مکانیسم القای آپوپتوز توسط پرده آمینون مطرح شود اثرات متضاد بین ترشحات پرده آمینون و اثرات Hsp90 است. بر خلاف اثرات پرده‌ی آمینون، Hsp90 از طریق فعال‌سازی NF-KB، آپوپتوز را به صورت منفی تنظیم می‌کند و دارای اثرات آنتی‌آپوپتوزی است (۳۰ و ۲۹).

مکانیسم دیگری که در فرضیه‌ی این تحقیق نیز مطرح شده است، بررسی القای وقفه در چرخه‌ی سلولی سلول‌های سرطانی است که با محیط کشت رویی پرده آمینون تیمار شده‌اند، به این دلیل میزان بیان آنتی‌بادی anti-Cdk4 از طریق آزمون ایمنوسیتوشیمی مورد بررسی قرار گرفت. نتایج حاصل از این مطالعات نشان داد که محیط کشت رویی پرده آمینون که حاوی مواد مترشحه از آن است باعث کاهش بیان این کیناز شده است. در واقع Cdk4 به عنوان یک سرین ترئونین کیناز و به عنوان یکی از کلاینت‌های پروتئین Hsp90 (که اعضای خانواده‌ی پروتئین رتینوبلاستوما (RB) را فسفریله و مهار می‌کند)، چرخه‌ی سلولی را در گذر G1/S تنظیم می‌نماید. فسفریلاسیون و مهار این کیناز باعث جدایی RB از فاکتور رونویسی E2F شده و منجر به رونویسی

بدین وسیله از جناب آقای دکتر حبیب الله پیروی، خانم دکتر مریم ذوالقدر و پرسنل محترم اتاق عمل بیمارستان عرفان تهران تشکر و قدردانی می‌گردد.

سرطان شوند که نیاز به انجام مطالعات بیشتر می‌باشد.

### تقدیر و تشکر

این مقاله حاصل پایان نامه کارشناسی ارشد می‌باشد.

### References

- 1- Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2015. *CA Cancer J Clin.* 2015; 65: 5-29.
- 2- Zhang H, Burrows F. Targeting multiple signal transduction pathways through inhibition of Hsp90. *J Mol Med.* 2004; 82: 488-99.
- 3- Niknejad H, Peirovi H, Jorjani M, Ahmadiani A, Ghanavi J, Seifalian AM. Properties of the amniotic membrane for potential use in tissue engineering. *Eur Cells Mater.* 2008; 15: 88-99.
- 4- Mamede AC, Botelho MF. Amniotic Membrane: Origin, Characterization and Medical Applications. *Springer*; 2015.
- 5- Niknejad H, Deihim T, Ahmadiani A, Jorjani M, Peirovi H. Permanent expression of midbrain dopaminergic neurons traits in differentiated amniotic epithelial cells. *Neurosci Lett.* 2012; 506: 22-7.
- 6- Lim R, Tan J, Hodges RJ, Wallace EM. Amniotic membrane stem cell populations. fetal stem cells in regenerative Medicine: *Springer.* 2016. p. 149-66.
- 7- Niknejad H, Peirovi H, Ahmadiani A, Ghanavi J, Jorjani M. Differentiation factors that influence neuronal markers expression in vitro from human amniotic epithelial cells. *Eur Cell Mater.* 2010; 19: 22-9.
- 8- Ricci E, Vanosi G, Lindenmair A, et al. Anti-fibrotic effects of fresh and cryopreserved human amniotic membrane in a rat liver fibrosis model. *Cell Tissue Bank.* 2013; 14: 475-88.
- 9- Tehrani FA, Ahmadiani A, Niknejad H. The effects of preservation procedures on antibacterial property of amniotic membrane. *Cryobiology.* 2013; 67: 293-8.
- 10- Riau AK, Beuerman RW, Lim LS, Mehta JS. Preservation, sterilization and de-epithelialization of human amniotic membrane for use in ocular surface reconstruction. *Biomaterials.* 2010; 31: 216-25.
- 11- Stern M. The grafting of preserved amniotic membrane to burned and ulcerated surfaces, substituting skin grafts: a preliminary report. *J Am Med Assoc.* 1913; 60: 973-4.
- 12- Kakavand M, Yazdanpanah G, Ahmadiani A, Niknejad H. Blood compatibility of human amniotic membrane compared with heparin-coated ePTFE for vascular tissue engineering. *J Tissue Eng Regen Med.* 2015.
- 13- Peirovi H, Rezvani N, Hajinasrollah M, Mohammadi SS, Niknejad H. Implantation of amniotic membrane as a vascular substitute in the external jugular vein of juvenile sheep. *J Vasc Surg.* 2012; 56:98-104.



- 14- Mermet I, Pottier N, Sainthillier JM, et al. Use of amniotic membrane transplantation in the treatment of venous leg ulcers. *Wound Repair Regen.* 2007; 15: 459-64.
- 15- Niknejad H, Deihim T, Solati-Hashjin M, Peirovi H. The effects of preservation procedures on amniotic membrane's ability to serve as a substrate for cultivation of endothelial cells. *Cryobiology.* 2011; 63: 145-51.
- 16- Niknejad H, Khayat-Khoei M, Peirovi H. Inhibition of MMPs might increase anticancer properties of amniotic epithelial cells. *Med Hypotheses.* 2012; 78: 690-1.
- 17- Seo JH, Kim YH, Kim JS. Properties of the amniotic membrane may be applicable in cancer therapy. *Med Hypotheses.* 2008; 70: 812-4.
- 18- Niknejad H, Yazdanpanah G, Khayat-khoei M. In vitro evaluation of the effects of amniotic membrane on viability and proliferation of cancer cells. *Zanjan Unive Med Sci.* 2013; 21: 13-21.
- 19- Niknejad H, Khayat-Khoei M, Peirovi H, Abolghasemi H. Human amniotic epithelial cells induce apoptosis of cancer cells: a new anti-tumor therapeutic strategy. *Cytotherapy.* 2014;16: 33-40.
- 20- Niknejad H, Yazdanpanah G. Anticancer effects of human amniotic membrane and its epithelial cells. *Med Hypotheses.* 2014; 82: 488-9.
- 21- Kang N-H, Yi B-R, Lim SY, Hwang K-A, Baek YS, Kang K-S, et al. Human amniotic membrane-derived epithelial stem cells display anticancer activity in BALB/c female nude mice bearing disseminated breast cancer xenografts. *Int J Oncol.* 2012; 40: 2022-8.
- 22- Rolfo A, Giuffrida D, Giuffrida MC, Todros T, Calogero AE. New perspectives for prostate cancer treatment: in vitro inhibition of LNCaP and PC3 cell proliferation by amnion-derived mesenchymal stromal cells conditioned media. *Aging Male.* 2014; 17: 94-101.
- 23- Niknejad H, Yazdanpanah G, Mirmasoumi M, Abolghasemi H, Peirovi H, Ahmadiani A. Inhibition of HSP90 could be possible mechanism for anti-cancer property of amniotic membrane. *Med Hypotheses.* 2013; 81: 862-5.
- 24- Guess A, Agrawal S, Wei C-C, Ransom RF, Benndorf R, Smoyer WE. Dose- and time-dependent glucocorticoid receptor signaling in podocytes. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2010; 299: F845-F53.
- 25- Magatti M, Munari S, Vertua E, Parolini O. Amniotic membrane - derived cells inhibit proliferation of cancer cell lines by inducing cell cycle arrest. *J Cell Mol Med.* 2012; 16: 2208-18.
- 26- Li W, He H, Kawakita T, Espana EM, Tseng SC. Amniotic membrane induces apoptosis of interferon- $\gamma$  activated macrophages in vitro. *Exp Eye Res.* 2006; 82: 282-92.
- 27- Jiao H, Guan F, Yang B, et al. Human amniotic membrane derived-mesenchymal stem cells induce C6 glioma apoptosis in vivo through the Bcl-2/caspase pathways. *Mol Biol Rep.* 2012; 39: 467-73.
- 28- Niknejad H, Paeni-Vayghan G, Tehrani F, Khayat-Khoei M, Peirovi H. Side dependent effects of the human amnion on angiogenesis. *Placenta.* 2013; 34: 340-5.

- 29- Niknejad H, Deihim T, Peirovi H, Abolghasemi H. Serum-free cryopreservation of human amniotic epithelial cells before and after isolation from their natural scaffold. *Cryobiology*. 2013; 67: 56-63.
- 30- Niknejad H, Yazdanpanah G, Ahmadiani A. Induction of apoptosis, stimulation of cell-cycle arrest and inhibition of angiogenesis make human amnion-derived cells promising sources for cell therapy of cancer. *Cell Tissue Res*. 2016; 363: 599-608.
- 31- Liu DX, Greene LA. Neuronal apoptosis at the G1/S cell cycle checkpoint. *Cell Tissue Res*. 2001; 305: 217-28.
- 32- Burrows F, Zhang H, Kamal A. Hsp90 activation and cell cycle regulation. *Cell Cycle*. 2004; 3: 1530-6.

## Evaluation of the Effect of Amniotic Membrane Condition Medium on the Activity of Heat Shock Protein 90 in Cervical and Breast Cancer Cells

Mirmasoumi M<sup>1</sup>, Azizian S<sup>2</sup>, Modaresifar KH<sup>2</sup>, Moravvej H<sup>3</sup>, Niknejad H<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Dept. of Pharmacology, Faculty of Medicine, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

<sup>2</sup>Dept. of Biomaterials, Faculty of Biomedical Engineering, Amirkabir University of Technology, Tehran, Iran.

<sup>3</sup>Skin Research Center, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

<sup>4</sup>Dept. of Pharmacology Faculty of Medicine, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

**Corresponding Author:** Niknejad H, Dept. of Pharmacology, Faculty of Medicine, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

**E-mail:** niknejad@sbmu.ac.ir

**Received:** 23 Aug 2016    **Accepted:** 25 Dec 2016

**Background and Objective:** It has recently been shown that the application of amniotic membrane conditioned medium is effective in cancer treatment. In this study, the effect of amniotic stem cells conditioned medium on the activity of Hsp90 and Cdk4 expression, were investigated in cancer cells.

**Materials and Methods:** Two cancer cell lines HeLa and MDA-MB-231 were treated with the supernatant amniotic membrane conditioned medium for 24 hours and then the viability of cancer cells was evaluated by MTT assay. Immunocytochemistry assay was used to investigate changes in Cdk4 expression in cancer cells after being treated with the amniotic membrane conditioned medium. RT-PCR analysis was carried out to study the expression of Hsp90 $\alpha$  (aa1) gene before and after treatment.

**Results:** The results from the MTT assay indicated that the viability of cancer cells decreased after treatment with amniotic membrane conditioned medium. The outcomes of immunocytochemistry showed a decrease in Cdk4 expression in treated cancer cells. Evaluation of Hsp90 $\alpha$  (aa1) expression with RT-PCR analysis for cancer cells treated with amniotic membrane conditioned medium revealed a reduction in the expression of the Hsp90 $\alpha$  (aa1) gene.

**Conclusion:** Based on the results, treatment of cancer cells with amniotic membrane conditioned medium, in addition to the reduction of cancer cell viability, leads to the induction of apoptosis through the inhibition of Hsp90 and Cdk4. According to the results, it seems that the inhibition of Hsp90 could be the possible mechanism behind the anticancer properties of amniotic membrane.

**Keywords:** Amniotic membrane, Apoptosis, Hsp90, Cancer