Applied Molecular Biology
Vol.1, issu.3, Summer. 2023

A Brief Review of Cancer Stem Cell Isolation and Characterization

Zahra ghanei[۵]

Abstract

Cancer stem cells (CSCs) are a small subset of cancer cells responsible for drug resistance. CSCs are known as tumor initiating cells. In fact, the CSCs are the origin of heterogeneity of tumors. Other biological activity of the CSC are self-renewal activity, tumor recurrence, and metastasis. CSCs have been derived from diverse tumors and cell lines and characterized by different methods. In this paper, the general concept, characterization of CSCs and the isolation methods of these cells are briefly discussed. In this way, by increasing the knowledge obtained from the studies related to the biology of CSCs after their isolation, new approaches for targeted treatment of cancers can be provided.

Keywords: cancer stem cell, CD24, CD44, CD133, pluripotency transcription factors

۵. Animal Biotechnology Group, Department of Agricultural Biotechnology, National Institute of Genetic Engineering and Biotechnology, Tehran, Iran; Genetic Group, Department of Basic Science, Ale-Taha Institute of Higher Education, Tehran, Iran. ghaneiz@yahoo.com

زیست شناسی مولکولی کاربردی
سال اول/ شماره ۳/ تابستان ۱۴۰۲

مروری کوتاه بر جداسازی و خصوصیات سلول‌های بنیادی سرطانی

زهرا قانعی[۶]

چکیده

سلول‌های بنیادی سرطان (CSC[۷]) زیرمجموعه‌ای از سلول‌های سرطانی هستند که معمولاً به درمان‌های رایج مقاوم هستند و به‌عنوان سلول‌های شروع‌کننده تومور شناخته می‌شوند. درواقع منشأ ناهمگون بودن یا هتروژنیتی تومورها همین سلول‌های بنیادی سرطان هستند. سایر فعالیت‌های بیولوژیکی سلول‌های بنیادی سرطان خود نوسازی، بازگشت بیماری بعد از درمان اولیه و متاستاز می‌باشد. سلول‌های بنیادی سرطان از تومورها و رده‌های سلولی مختلف جداسازی و تعیین خصوصیت شده‌اند. در این مقاله، مفهوم کلی، خصوصیات CSCها و روش‌های جداسازی این سلول‌ها به اختصار مورد بحث قرار می‌گیرد. به‌این‌ترتیب، با افزایش دانش به دست آمده از مطالعات مربوط به بیولوژی CSCها بعد از جداسازی آن‌ها، می‌توان رویکردهای جدیدی را برای درمان هدفمند سرطان‌ها ارائه کرد.

واژه‌های کلیدی: سلول‌های بنیادی سرطان، CD24، CD44، CD133، فاکتورهای رونویسی پرتوانی

---

۶. گروه زیست فناوری دامی، پژوهشکده زیست فناوری کشاورزی، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری، تهران، ایران؛ گروه ژنتیک، دانشکده علوم پایه، مؤسسه آموزش عالی آل‌طه، تهران، ایران.ghaneiz@yahoo.com

۷. Cancer Stem Cell

مقدمه

سرطان‌ها بیماری‌های پیچیده‌ای هستند که زندگی انسان‌ها را به‌طور جدی تهدید می‌کنند. راهکارهای زیادی برای درمان این بیماری شامل جراحی، پرتودرمانی، شیمی درمانی و... توسعه یافته‌اند. به خاطر همین درمان‌های موجود نرخ مرگ و میر ناشی از سرطان کاهش یافته است. با این وجود روش‌های درمانی کنونی فقط در درمان برخی از سرطان‌ها مؤثر هستند. دلیل اصلی شکست در درمان سرطان، متاستاز، بازگشت بیماری بعد از درمان، هتروژنیتی تومور و مقاومت به شیمی‌درمانی و پرتودرمانی است. همه این دلایل را می‌توان با بررسی ویژگی‌های سلول‌های بنیادی سرطان توضیح داد. این سلول‌ها می‌توانند با توقف در فاز G0 و مقاومت به درمان‌های معمولی باعث متاستاز و ایجاد تومورهای جدید بعد از درمان شوند. بنابراین CSCها هدف‌های درمانی جذابی برای درمان سرطان می‌باشند [۱-۳].

سلول‌های CSC برای اولین‌بار در سرطان خون شناسایی شدند و از طریق بیان نشانگرهای سطحی CD34 و CD38 در دهۀ ۱۹۹۰ جداسازی شدند [۴،۵]. سلول‌های CSC مختلف نشانگرهای سطحی مختلفی ازجمله CD24، CD44، CD133، نستین[۸] و... را بیان می‌کنند. این سلول‌ها در تعداد زیادی از تومورهای جامد و غیرجامد شناسایی شدند. این سلول‌ها از طریق خودنوسازی و تمایز به انواع مختلف سلول‌ها تومورها را ایجاد می‌کنند. فعالیت CSCها با فاکتورهای داخل و خارج سلولی زیادی کنترل می‌شود و این فاکتورها می‌توانند به‌عنوان هدف‌های درمانی مورد استفاده قرار بگیرند [۶-۷]. در این مقاله برای فهم طبیعت CSCها خصوصیات و روش‌های شناسایی و جداسازی این سلول‌ها بیان خواهد شد.

مفهوم CSC

شواهد روبه‌رشدی مبنی بر اینکه سرطان‌ها شامل یک زیرمجموعه کوچکی از سلول‌های

۸. Nestin

شبه‌بنیادی به نام سلول‌های بنیادی سرطانی هستند، وجود دارد. سلول‌های بنیادی دارای ظرفیت تقسیم سلولی نامتقارن هستند که به این وسیله با تقسیم خود یک سلول بنیادی دختری و سلولی که الگوی تمایزی خاصی را می‌پیماید، به وجود می‌آورند. در حالت دوم سلول‌ها دستخوش یک‌سری تقسیمات و مراحل تمایزی می‌شوند که در نهایت جمعیتی از سلول‌های کامل تمایزیافته را ایجاد می‌کند. مفهوم CSC فرض می‌کند که مشابه با بافت‌های تکثیرشونده نرمال مثل مغز استخوان، پوست یا اپی‌تلیوم، در سلول‌های سرطانی هم یک تعداد خاصی از سلول‌ها مسئول تکثیر، مهاجرت، مقاومت به درمان و... هستند. اصطلاح سلول‌های آغازکننده تومور به جای سلول‌های بنیادی سرطانی استفاده می‌شود که یک تعریف عملکردی از این زیرمجموعه است [۸-۹].

این سلول‌ها در بسیاری از تومورهای جامد شامل پستان، مغز، ریه، پروستات، بیضه، تخمدان، کلون، پوست و کبد شناسایی شده‌اند. تئوری CSC موضوع آغاز تومورزایی، توسعه، متاستاز و عود بیماری و همچنین ناکارامد بودن روش‌های درمانی رایج و سنتی را توضیح می‌دهد. درمان‌های مستقیم بر علیه عمده سلول‌های سرطانی، ممکن است در ابتدا پاسخ قابل‌توجهی ایجاد کنند اما اگر CSCهای کمیاب مورد هدف قرار نگیرند، متأسفانه باعث بازگشت بیماری در درازمدت خواهد شد. بنابراین توسعهٔ روش‌های درمانی که CSCها را مورد هدف قرار می‌دهند، راهکاری طلایی در تحقیقات سرطان می‌باشد. برای درمان بسیار مؤثر سرطان به شناسایی دقیق، جداسازی و تعیین خصوصیت CSCها از انواع مختلف تومورها احتیاج داریم. به‌عنوان مثال با شناسایی نشانگرهای سطحی ویژهٔ CSCها و درمان با آنتی‌بادی‌های خنثی‌کنندهٔ این نشانگرها، می‌توان مسیرهای پیام‌رسانی CSCها را مورد هدف قرار داد. همچنین با تولید واکسن‌هایی که CSCها را مورد هدف قرار می‌دهند می‌توان CSCها را به سیستم ایمنی حساس کرد و بدین‌ترتیب مسیرهای حیاتی CSCها که باعث آغاز تومورزایی می‌شوند را مهار کرد [۱۰-۱۲].

نشانگرهای سلول‌های بنیادی سرطان

سلول‌های بنیادی سرطانی دارای نشانگرهای سطح سلولی ویژه‌ای هستند که برای

تعیین خصوصیت و جداسازی آن‌ها استفاده می‌شود. به علاوه این نشانگرهای سطحی هدف‌های دارویی را فراهم می‌کنند. اولین مطالعه‌ای که CSCها را از سرطان پستان جداسازی کرد توسط Al-Hajj و همکارانش صورت گرفت. آن‌ها یک جمعیت سلولی $CD44^{+}CD24^{-/low}$ را توصیف کردند که دارای ظرفیت بالایی برای ایجاد تومور در موش بود [۱۳]. همچنین فعالیت بالای آنزیم آلدهید دهیدروژناز ۱ (AlDH1) برای شناسایی جمعیت تومورزا در بعضی از سرطان ها مثل سرطان پستان و پروستات استفاده می‌شود [۱۴-۱۵]. نشانگر CD133 به‌عنوان نشانگر CSCها در انواع مختلف تومورهای مغزی شناسایی شد. همچنین این نشانگر سطحی برای شناسایی و جداسازی CSCها در کارسینوماهای پستان، کلورکتال و پانکراس به‌کار می‌رود [۱۶].

نشانگر CD44

نشانگر CD44 فعالیت‌های زیستی مهمی را هم در سلول‌های نرمال و هم در سلول‌های سرطانی انجام می‌دهد. محققان ثابت کردند که CD44 نشانگر CSCها می‌باشد که می‌تواند به تنهایی یا در ترکیب با دیگر نشانگرهای سرطانی برای شناسایی CSCها به‌کار رود. این نشانگر یک گلیکوپروتئین گذرنده از غشا است که علاوه بر هیالورونیک اسید، به فیبرینوژن، فیبرونکتین، کلاژن، لامین، فاکتور ۲ رشد فیبروبلاست، دیگر فاکتورهای رشد متصل شونده به هپارین و استئوپونتین که یک سیتوکین التهابی مرتبط با پیشرفت متاستاز است، متصل می‌شود. نشانگر CD44 یک مولکول چند ساختاری و چند عملکردی است که در تکثیر، تمایز و مهاجرت سلولی، رگزایی، ارائه سیتوکین‌ها، کموکین‌ها و فاکتورهای رشد به گیرنده‌های مربوط به آن‌ها نقش دارد. نشانگر CD44 از طریق اتصالات سلول با سلول و سلول با ماتریکس، لانه‌گزینی سلول‌های سرطانی در بافت هدف و کلنی شدن آن‌ها در بافت‌های ثانویه را تسهیل کرده و بدین ترتیب می‌تواند سلول‌های توموری را از سیستم ایمنی محافظت کند. بیان نشانگر CD44 با مقاومت دارویی و پیش‌آگهی ضعیف در اکثر بدخیمی‌ها مرتبط است [۱۷-۱۸]. سلول‌های بنیادی سرطان پستان دارای بیان بالای این نشانگر بودند که با فنوتیپ مهاجرت و تکثیر بالای این سلول‌ها مرتبط است. علاوه بر سرطان پستان بیان بالای

نشانگر CD44 در سرطان‌های تخمدان، پروستات، کبد و ریه هم مشاهده شده است [۱۹-۲۰].

نشانگر CD24

CD24 یک سیالوگلیکوپروتئین است که روی گرانولوسیت‌ها و B سل‌ها بیان می‌شود و پیام‌های رشد و تمایز را برای این سلول‌ها تنظیم می‌کند. این نشانگر که از طریق لنگر گلیکوزیل فسفاتیدیل اینوزیتول (GPI) به غشای سلول متصل می‌شود، به‌عنوان تنظیم‌کنندهٔ منفی CXC24 عمل می‌کند که یک گیرنده مهم سیتوکین و تسهیل‌کنندهٔ متاستاز در سرطان می‌باشد. نشانگر CD24 همچنین در تنظیم تکثیر سلولی و واکنش‌های بین دو سلول درگیر است. نشانگر CD24 لیگاندی برای P-selectin (گیرنده چسبندگی روی سلول‌های اندوتلیال و پلاکت‌ها) هم در سلول‌های موشی و هم در سلول‌های انسانی است و مسیر اتصالی CD24- P-selectin برای اتصال سلول‌های سرطان پستانی به سلول‌های اندوتلیال و پلاکت‌ها ضروری است. نشانگر CD24 به‌عنوان یک نشانگر مولکولی برای تشخیص و پیش‌بینی بیماران دارای تومورهای بدخیم نیز به‌کار می‌رود [۲۱-۲۲]. البته این نشانگر دارای نقش‌های دوگانه‌ای می‌باشد. به‌عنوان مثال بعضی از CSCهای جدا شده از سرطان پستان با بیان پایین این نشانگر شناسایی می‌شوند درحالی‌که CSCهای جدا شده از تومورهای کبدی دارای بیان بالای این نشانگر بودند [۱۳-۲۳].

نشانگر CD133

CD133 یک گلیکوپروتئین با دومین‌های گذرنده از غشا و دو لوپ بزرگ خارج سلولی گلیکوزیله است. یک فرم تغییر یافته آن به کلسترول متصل می‌شود و ممکن است در مسیر پیام‌رسانی Hedgehog که برای تمایز اولیه سلولی و گذر از حالت اپی‌تلیالی به مزانشیمی (EMT) لازم است، درگیر باشد. فرایند EMT نقش مهمی در جنین‌زایی و فرایندهای مرتبط با پیشرفت سرطان دارد. در طول این فرایند سلول‌های اپی‌تلیال

ارتباط سلول ـ سلول خود را از دست داده و اسکلت سلولی آن‌ها دچار تغییر می‌شود. این وضعیت باعث از دست رفتن قطبیت سلول می‌شود و سلول‌های اپی‌تلیال مورفولوژی مزانشیمی به دست می‌آورند. در یک مطالعه که از رده‌های سلول پستان موشی دارای نقص در ژن Brca1 برای جداسازی CSCها استفاده شده بود. دو نوع جمعیت سلولی با خصوصیت CSCها جداسازی شد، یک گروه از CSCها دارای بیان نشانگر CD133 بودند و گروه دیگر خصوصیت $CD44^{+}/CD24^{-}$ را داشتند [۲۵، ۲۴]. این نشانگر در CSCهای تعداد زیادی از سرطان‌ها از جمله تومورهای مغزی، سرطان پستان، پروستات، معده، کلورکتال، کبد، تخمدان و ریه و... بیان می‌شود [۲۶].

فاکتورهای رونویسی پرتوانی

فاکتورهای رونویسی Nanog، Sox2 و Oct4 برای نگهداری فنوتیپ پرتوانی و خودنوسازی سلول‌های بنیادی جنینی ضروری هستند. فاکتور Oct4 یکی از اولین فاکتورهای رونویسی که در جنین بیان می‌شود و این فاکتور توسط ژن دارای هومئوباکس *Pou5f1* کد می‌شود. فاکتور Nanog هم یک فاکتور رونویسی همئودومین است که عملکرد مهمی در حفظ حالت پرتوانی سلول‌های بنیادی جنینی دارد. بیان فاکتور Oct4 و Sox2 در تعدادی از تومورهای انسانی شناسایی شده است. همچنین بیان خارجی این دو فاکتور باعث القاء پتانسیل سرطانی شدن در سلول‌های اپی‌تلیالی می‌شود. بیان این فاکتورهای پرتوانی در چندین نوع تومور مختلف ازجمله سرطان پستان به اثبات رسیده است. فاکتورهای Nanog و Oct4 در سلول‌های شبه‌بنیادی سرطان استخوان که سارکواسفیرها[۹] را ایجاد می‌کنند، بیان می‌شوند. در یک مطالعه وکتور حامل ژن گزارشگر تحت کنترل پروموتر Pou5f1 به سلول‌های سرطان پستان موشی وارد شد و سلول‌ها به دو دستهٔ سلول‌های با بیان بالای Oct4 و سلول‌ها با بیان پایین Oct4 تقسیم شدند. سلول‌های با بیان بالای Oct4 در مقایسه با دسته دیگر، دارای

۹. Sarcospheres

توانایی بیشتری برای تشکیل تومروسفر بودند و بیان نشانگرهای سلول‌های بنیادی مثل CD133 و ALDH1 در آن‌ها بالاتر بود. این سلول‌ها همچنین دارای پتانسیل تومورزایی قوی‌تری در موش بودند. بنابراین بیان Oct4 با حفظ و گسترش CSCها مرتبط است [۲۸-۲۷]. فاکتور رونویسی Sox2 هم که تنظیم‌کننده پرتوانی در سلول‌های بنیادی جنینی است، در بسیاری از تومورها بیان می‌شود و در تومورزایی آن‌ها نقش دارد. این فاکتورهای رونویسی برای حفظ حالت پرتوانی سلول‌های بنیادی سرطان ضروری هستند و می‌توان از آن‌ها به‌عنوان هدف‌های دارویی استفاده کرد (Ling et al., 2012, Liu et al., 2013a) [۳۰-۲۸].

هتروژنیتی در جمعیت CSC

ناهمگونی فنوتیپی در زیرجمعیت CSCها وجود دارد. در گلیوما بیان CD133 همیشه جمعیت CSCها را نشان نمی‌دهد. همچنین گلیوبلاستوماها می‌توانند از سلول‌های $CD133^-$ هم ایجاد شوند. حتماً لازم نیست فنوتیپ CSCها در بین زیرمجموعهٔ سرطان‌ها یا حتی تومورهای یک زیرمجموعه، یکسان باشد. در یک بیمار سرطان پستان جمعیت سلولی تومورزا دارای نشانگرهای $CD44^+/CD24^+/EpCAM^+$ بود. در این تومور ممکن است جمعیت CSC متمایزی، یک مدل جایگزین را برای تومورزایی ایجاد کند. همین‌طور ناهمگونی جمعیت CSC در رده‌های سلولی که از تومورهای پستان موشی دارای نقص در ژن Brca1 به‌دست آمد، بودند، نشان داده شد. در این مورد جمعیت‌های CSC یا دارای نشانگر $CD133^+$ و یا دارای $CD44^+/CD24^-$ بودند که تعداد کم سلول از هر دو گروه (۱۰۰-۵۰) در موش دارای نقص ایمنی ایجاد تومور می‌کرد. هتروژنیتی در CSCها و در نتیجه تومورها، باعث پیچیدگی در درمان این بیماری می‌شود و معمولاً از ترکیب چند درمان برای این بیماری استفاده می‌شود [۳۱-۳۳ ، ۲۵].

جداسازی سلول‌های بنیادی سرطان

شناسایی و تعیین خصوصیت CSCها برای سهولت در نظارت، درمان و پیشگیری از

سرطان ضروری است. برای اثبات خصوصیات عملکردی CSCها، جداسازی آن‌ها لازم است. اگرچه CSCها می‌توانند در آزمایشگاه به وسیلهٔ کشت سوسپانسیون غیرچسبنده در محیط فاقد سرم تکثیر شوند، اما خصوصیات زیستی تومورسفرها[۱۰] با خصوصیات CSCها در تومورهای واقعی متفاوت است. این تفاوت ناشی از فاکتورهای محیطی از قبیل وجود سلول‌های استرومایی، التهاب و کمبود اکسیژن در تومور است که باعث تغییر برنامهٔ اساسی CSCها می‌شود. بنابراین برای توضیح بیشتر مکانیسم‌های اساسی دربرگیرندهٔ ویژگی‌های CSC، جداسازی و غنی‌سازی این سلول‌ها ضروری است [۳۴].

روش‌های مختلفی برای جداسازی این سلول‌ها نظیر جداسازی سلول‌های فعال شده با فلورسنت (FACS[۱۱])، استفاده از راهکارهای عملکردی مثل آنالیز SP[۱۲] و آنالیز Aldefluor وجود دارد. به غیر از روش‌های مبتنی بر فلوسیتومتری، از روش‌های دیگری نیز برای جداسازی و غنی‌سازی CSC استفاده کرده‌اند. برای نمونه از آنجایی که CSCها در مقایسه با سایر سلول‌ها به شیمی درمانی مقاوم هستند، می‌توان به وسیله کشتن سلول‌های سرطانی مستعد به آپوپتوز، جمعیت CSCها را جداسازی و غنی کرد. در روش دیگر برای شناسایی و جداسازی سلول‌های بنیادی از بیان ژن‌های گزارشگر تحت کنترل پروموترهای ژن‌های پرتوانی استفاده کرده‌اند که در ادامه به توضیح آن می‌پردازیم.

روش‌های مبتنی بر فلوسایتومتری

به وسیلهٔ نشانگرهای سطحی سلول می‌توان CSCها را با استفاده از فلوسیتومتری جدا کرد. مولکول‌های CD44 و CD133 دو نشانگر سطحی معمول برای شناسایی و جداسازی CSCها هستند. نشانگر CD133 تعدادی از تومورهای جامد را شناسایی می‌کند. برای مثال سلول‌های $CD133^+$ جدا شده توسط فلوسایتومتری از تومورهای

۱۰. Tumorspheres

۱۱. Fluorescence-activated cell sorting

۱۲. Side population

گلیوبلاستوما و مدلوبلاستوما ظرفیت بالایی برای شروع تومور داشتند [۳۵]. نشانگر CD44 می‌تواند به تنهایی و یا در ترکیب با دیگر نشانگرها برای جداسازی CSCها به‌کار رود. برای مثال در سرطان پستان سلول‌های دارای نشانگر CD44 زیاد و CD24 کم با استفاده از فلوسیتومتری جدا شده‌اند و نشان داده شد که این سلول‌ها دارای خصوصیات CSCها هستند (۱۳). همین‌طور در یک مطالعه برای جداسازی CSCهای سرطان پروستات، با کمک فلوسیتومتری سلول‌های $CD44^{+}/CD24^{-/low}$ جدا شدند و مشخص شد که این‌ها خصوصیات سلول‌های بنیادی سرطان ازجمله بیان ژن‌های پرتوانی مثل Oct4 را داشتند [۳۶].

آنالیز Aldefluor از یک واکنش بیوشیمی برای برچسب زدن به سلول‌هایی که دارای فعالیت بالای ALDH1 هستند، استفاده می‌کند. جمعیت سلولی که سطح بالایی از ALDH1 را بیان می‌کنند، با استفاده از آنتی‌بادی ALDH1 شناسایی شده و سپس با استفاده از فلوسیتومتری جدا می‌شوند. نشان داده شد که افزایش فعالیت ALDH1 در سلول‌های جدا شده باعث مقاومت به شیمی درمانی در این سلول‌ها می‌شود [۳۷].

آنالیز SP روشی مبتنی بر فلوسیتومتری است که برای شناسایی سلول‌های بنیادی بر اساس توانایی‌شان در خروج رنگ‌های آبگریز فلورسنت مانند Hoechst 33342 به وسیلهٔ انتقال‌دهنده‌های ABC[۱۳] استفاده می‌شود. بدین صورت که تمام سلول‌ها رنگ را جذب می‌کنند، اما سلول‌های بنیادی به خاطر بیان انتقال‌دهنده‌های ABC رنگ‌ها را از سلول خارج می‌کنند. بنابراین جمعیت سلولی فاقد رنگ توسط فلوسایتومتری جدا می‌شود. سلول‌های بنیادی سرطان نیز به دلیل داشتن این انتقال‌دهنده‌ها (دلیل مقاومتشان به شیمی درمانی)، با آنالیز SP قابل جداسازی هستند [۳۸].

روش‌های مبتنی بر مقاومت به شیمی درمانی

به غیر از روش‌های مبتنی بر فلوسیتومتری، از روش‌های دیگری نیز برای جداسازی و

۱۳. ATP-binding cassette

غنی‌سازی CSC استفاده کرده‌اند. برای نمونه از آنجایی که CSCها نسبت به سایر سلول‌ها به شیمی درمانی مقاوم هستند، می‌توان به وسیله کشتن سلول‌های سرطانی مستعد به آپوپتوز، جمعیت CSC را جداسازی و غنی کرد.

در رده سلولی انسانی سرطان پروستات، سلول‌های دارای نشانگر CD133 و CD44 با استفاده از فلوسیتومتری جدا شدند. نشان داده شده که نسبت سلول‌های $CD133^{+}/CD44^{+}$ کشت شده در شرایط شیمی درمانی و یا پرتودرمانی در مقایسه با سلول‌های کشت شده در شرایط معمولی افزایش یافته است. در سرطان رحم جمعیتی از سلول‌های دارای بیان نشانگرهای CSC در پاسخ به cisplatin و paclitaxel و یا ترکیب این دو غنی‌سازی شدند [۳۹-۴۰].

تاکنون از کشت سه‌بعدی با استفاده از دانه‌های آلژینات، القای هیپوکسی و در بعضی موارد شیمی درمانی که سلول‌های سرطانی به استثنای CSCها را از بین می‌برد، برای غنی‌سازی و بهینه کردن رشد CSCها استفاده شده است. به خاطر اینکه در کشت سه‌بعدی تقلید ریز محیط داخل بدن موجود زنده بهتر از کشت دوبعدی است، خصوصیات CSCها در کشت سه‌بعدی بهتر حفظ می‌شود. بیان ژن‌های مرتبط با CSC در دانه‌های آلژینات بیشتر از کشت دوبعدی بودند. همین‌طور سلول‌های کشت شده روی دانه‌های آلژینات دارای توانایی تومورزایی و متاستاز بیشتر و نیز مقاومت دارویی بالاتری بودند. ایجاد هیپوکسی در محیط رشد CSCها همچنین باعث افزایش و غنی‌سازی این سلول‌ها می‌شود. در یک مطالعه مشخص شد که هیپوکسی ایجاد شده در تومور پستانی به وسیلهٔ داروی ضدرگزایی sunitinib و bevacizumab، جمعیت CSCها را افزایش می‌دهد که این غنی شدن در ارتباط با فاکتور HIF1α است [۴۱-۴۲].

روش‌های مبتنی بر فعالیت پروموتر ژن‌های پرتوانی

برای شناسایی CSCها به صورت عملکردی می‌توان از بیان ژن‌های پرتوانی استفاده کرد. از آنجایی که پروموتر ژن‌های پرتوانی فقط در سلول‌های بنیادی فعال است، بنابراین با وارد کردن وکتور حاوی ژن گزارشگر تحت کنترل پروموتر ژن پرتوان، سلول‌های بنیادی

قادر بـه بیـان ژن گزارشـگر خواهنـد بـود. بـرای شناسـایی CSCهـا در استئوسـارکوما، سلول‌های سرطانی با پلاسمید حاوی ژن پروتئین فلورسنت سبز (GFP[۱۴]) تحت کنتـرل پروموتر Oct4 ترانسفکت شدند و تعدادی از CSC دارای خاصیت شروع‌کنندگی تومور بر اساس فعالیت ژن گزارشگر در این سلول‌ها شناسایی شـدند [۴۳]. در مطالعـه‌ای دیگـر برای جداسازی CSCهای تومور گلیوبلاستوما از داروی تموزولوآمید (TMZ) استفاده شد که باعث توقف رشد تومور می‌شود. ترانس‌ژن nestin-ΔTK-IRES-GFP به سـلول‌هـای توموری تیمار شده با TMZ منتقل شد که به علت فعال بـودن پرومـوتر ژن Nestin در CSCها باعث سبز شدن این سلول‌ها شد. آزمایشات نشان داد که رشد دوباره تومـور از سلول‌های نشاندار شده توسط این ترانس‌ژن منشأ می‌گیرد. همین‌طور حذف سلول‌هـای نشاندار شده به وسیله گانسیکلوویر[۱۵] با اثر سمی قوی، باعث توقف رشد تومور و ترکیـب گانسیکلوویر و TMZ باعث حذف کامل رشد تومور شد. بنابراین مشـخص شـد کـه ایـن جمعیت سلولی نشاندار شده توسط GFP خصوصیات CSCها را دارند که مسـئول رشـد طولانی مدت تومور از طریق ایجاد سلول‌های با قدرت تکثیر فراوان هستند [۴۴]. بـرای جداسازی سلول‌های سرطان همچنین می‌توان از یک سازه ژنـی دارای ژن مقاومـت بـه آنتی‌بیوتیک تحـت کنتـرل پروموترهـای ژن‌هـای پرتـوان مثـل OCT4 اسـتفاده کـرد. سلول‌های توموری ترانسفکت شده با ایـن سـازه فقـط در صـورت بنیـادی بـودن (فقـط CSCها) می‌توانند ژن مقاومت به آنتی‌بیوتیک را بیان کنند و در ایـن صـورت بـا تیمـار کردن سلول‌ها با آنتی بیوتیک می‌توان CSCها را جداسازی کرد [۴۵].

نتیجه‌گیری

سلول‌های بنیادی سرطان دارای خصوصیاتی هستند که باعث می‌شود تا ایـن سـلول‌هـا مقاومت به درمان را داشته باشند و بعد از درمان‌های اولیه دوباره با مساعد شدن شرایط تکثیر شده و باعث بازگشت بیماری می‌شوند. به علاوه این سلول‌ها با مهاجرت بـه سـایر

۱۴. Green fluorescent protein

۱۵. Ganciclovir

نقاط بدن متاستاز را هم ایجاد می‌کنند. بنابراین تعیین خصوصیت و جداسازی این سلول‌ها می‌تواند راهکارهای درمانی جدید و مکملی را برای درمان سرطان ارائه دهد. سلول‌های بنیادی سرطان می‌توانند نشانگرهای متفاوتی را بیان کنند که در ایجاد خصوصیات بنیادی این سلول‌ها نقش دارند و با مهار کردن این مسیرهای پیام‌رسانی، می‌توان به درمان سرطان کمک کرد. همچنین این سلول‌ها، ژن‌های پرتوانی مثل OCT4 و SOX2 را بیان می‌کنند که می‌توان از این طریق هم برای جداسازی و در ادامه برای درمان استفاده کرد. استفاده از راهکارهای درمانی که این سلول‌ها را هدف قرار می‌دهند در کنار روش‌های درمانی متداول می‌تواند منجر به موفقیت‌های بیشتر در درمان سرطان شود.

منابع

1. Batlle E, Clevers H. Cancer stem cells revisited. Nature medicine. 2017;23(10):1124-34.
2. Chen W, Dong J, Haiech J, Kilhoffer M-C, Zeniou M. Cancer stem cell quiescence and plasticity as major challenges in cancer therapy. Stem cells international.2016.
3. Siegel RL, Miller KD, Wagle NS, Jemal A. Cancer statistics, 2023. Ca Cancer J Clin. 2023;73(1):17-48.
4. Bonnet D, Dick JE. Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. Nature medicine. 1997;3(7):730-7.
5. Lapidot T, Sirard C, Vormoor J, Murdoch B, Hoang T, Caceres-Cortes J, et al. A cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation into SCID mice. Nature. 1994;367(6464):645-8.
6. Ajani JA, Song S, Hochster HS, Steinberg IB, editors. Cancer stem cells: the promise and the potential. Seminars in oncology; 2015: Elsevier.
7. Shibata M, Hoque MO. Targeting cancer stem cells: a strategy for effective eradication of cancer. Cancers. 2019;11(5):732.
8. Bjerkvig R, Tysnes BB, Aboody KS, Najbauer J, Terzis A. The origin of the cancer stem cell: current controversies and new insights. Nature Reviews Cancer. 2005;5(11):899-904.
9. Panyam J. Cancer stem cells. Springer; 2013.
10. Ricci-Vitiani L, Pallini R, Biffoni M, Todaro M, Invernici G, Cenci T, et al. Tumour vascularization via endothelial differentiation of glioblastoma stem-

like cells. Nature. 2010;468(7325):824-8.
11. Soltanian S, Matin MM. Cancer stem cells and cancer therapy. Tumor Biology. 2011;32:425-40.
12. Xiong Y-Q, Sun H-C, Zhang W, Zhu X-D, Zhuang P-Y, Zhang J-B, et al. Human hepatocellular carcinoma tumor-derived endothelial cells manifest increased angiogenesis capability and drug resistance compared with normal endothelial cells. Clinical Cancer Research. 2009;15(15):4838-46.
13. Al-Hajj M, Wicha MS, Benito-Hernandez A, Morrison SJ, Clarke MF. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. Proceedings of the National Academy of Sciences. 2003;100(7):3983-8.
14. Ginestier C, Hur MH, Charafe-Jauffret E, Monville F, Dutcher J, Brown M, et al. ALDH1 is a marker of normal and malignant human mammary stem cells and a predictor of poor clinical outcome. Cell stem cell. 2007;1(5):555-67.
15. Wei Y, Li Y, Chen Y, Liu P, Huang S, Zhang Y, et al. ALDH1: A potential therapeutic target for cancer stem cells in solid tumors. Frontiers in Oncology. 2022;12:1026278.
16. Wu Y, Wu PY. CD133 as a marker for cancer stem cells: progresses and concerns. Stem cells and development. 2009;18(8):1127-34.
17. Azevedo R, Gaiteiro C, Peixoto A, Relvas-Santos M, Lima L, Santos LL, et al. CD44 glycoprotein in cancer: a molecular conundrum hampering clinical applications. Clinical proteomics. 2018;15:1-5.
18. Naor D, Nedvetzki S, Golan I, Melnik L, Faitelson Y. CD44 in cancer. Critical reviews in clinical laboratory sciences. 2002;39(6):527-79.
19. Kuşoğlu A, Avcı ÇB. Cancer stem cells: A brief review of the current status. Gene. 2019;681:80-5.
20. Zhang S, Balch C, Chan MW, Lai H-C, Matei D, Schilder JM, et al. Identification and characterization of ovarian cancer-initiating cells from primary human tumors. Cancer research. 2008;68(11):4311-20.
21. Fogel M, Friederichs J, Zeller Y, Husar M, Smirnov A, Roitman L, et al. CD24 is a marker for human breast carcinoma. Cancer letters. 1999; 143(1):87-94.
22. Lim S. CD24 and human carcinoma: tumor biological aspects. Biomedicine & pharmacotherapy. 2005;59:S351-S4.
23. Lee TKW, Castilho A, Cheung VCH, Tang KH, Ma S, Ng IOL. CD24+ liver tumor-initiating cells drive self-renewal and tumor initiation through STAT3-mediated NANOG regulation. Cell stem cell. 2011; 9(1):50-63.
24. Liu S, Cong Y, Wang D, Sun Y, Deng L, Liu Y, et al. Breast cancer stem cells transition between epithelial and mesenchymal states reflective of their normal counterparts. Stem cell reports. 2014;2(1):78-91.
25. Wright MH, Calcagno AM, Salcido CD, Carlson MD, Ambudkar SV, Varticovski L. Brca1 breast tumors contain distinct CD44+/CD24-and CD133+ cells with cancer stem cell characteristics. Breast cancer research.

2008; 10(1):1-16.
26. Yang L, Shi P, Zhao G, Xu J, Peng W, Zhang J, et al. Targeting cancer stem cell pathways for cancer therapy. Signal transduction and targeted therapy. 2020; 5(1):8.
27. Kim R-J, Nam J-S. OCT4 expression enhances features of cancer stem cells in a mouse model of breast cancer. Laboratory animal research. 2011;27(2):147-52.
28. Ling G-Q, Chen D-B, Wang B-Q, Zhang L-S. Expression of the pluripotency markers Oct3/4, Nanog and Sox2 in human breast cancer cell lines. Oncology letters. 2012.
29. Koury J, Zhong L, Hao J. Targeting signaling pathways in cancer stem cells for cancer treatment. Stem cells international. 2017; 2017.
30. Liu A, Yu X, Liu S. Pluripotency transcription factors and cancer stem cells: small genes make a big difference. Chinese journal of cancer. 2013; 32(9):483.
31. Fisher R, Pusztai L, Swanton C. Cancer heterogeneity: implications for targeted therapeutics. British journal of cancer. 2013;108(3):479-85.
32. Beier D, Hau P, Proescholdt M, Lohmeier A, Wischhusen Jr, Oefner PJ, et al. CD133+ and CD133− glioblastoma-derived cancer stem cells show differential growth characteristics and molecular profiles. Cancer research. 2007; 67(9):4010-5.
33. Sun X-x, Yu Q. Intra-tumor heterogeneity of cancer cells and its implications for cancer treatment. Acta Pharmacologica Sinica. 2015; 36(10):1219-27.
34. Kuo W-Y, Hwu L, Wu C-Y, Wang H-E, Liu R-S. In vivo enrichment of cancer stem cells in histone deacetylase inhibitor resistant xenograft of lung cancer in mouse model .Soc Nuclear Med; 2014.
35. Singh SK, Clarke ID, Terasaki M, Bonn VE, Hawkins C, Squire J, et al. Identification of a cancer stem cell in human brain tumors. Cancer research. 2003; 63(18):5821-8.
36. Hurt EM, Kawasaki BT, Klarmann GJ, Thomas SB, Farrar WL. CD44+ CD24- prostate cells are early cancer progenitor/stem cells that provide a model for patients with poor prognosis. British journal of cancer. 2008; 98(4):756-65.
37. Muzio G, Maggiora M, Paiuzzi E, Oraldi M, Canuto RA. Aldehyde dehydrogenases and cell proliferation. Free Radical Biology and Medicine. 2012; 52(4):735-46.
38. Golebiewska A, Brons NH, Bjerkvig R, Niclou SP. Critical appraisal of the side population assay in stem cell and cancer stem cell research. Cell stem cell. 2011;8(2):136-47.
39. Abubaker K, Latifi A, Luwor R, Nazaretian S, Zhu H, Quinn MA, et al. Short-term single treatment of chemotherapy results in the enrichment of ovarian cancer stem cell-like cells leading to an increased tumor burden. Molecular cancer. 2013;12(1):1-15.

40. Wang L, Huang X, Zheng X, Wang X, Li S, Zhang L, et al. Enrichment of prostate cancer stem-like cells from human prostate cancer cell lines by culture in serum-free medium and chemoradiotherapy. International journal of biological sciences. 2013; 9(5):472.
41. Conley SJ, Gheordunescu E, Kakarala P, Newman B, Korkaya H, Heath AN, et al. Antiangiogenic agents increase breast cancer stem cells via the generation of tumor hypoxia. Proceedings of the National Academy of Sciences. 2012; 109(8):2784-9.
42. Xu X-x, Liu C, Liu Y, Yang L, Li N, Guo X, et al. Enrichment of cancer stem cell-like cells by culture in alginate gel beads. Journal of Biotechnology. 2014;177:1-12.
43. Levings PP, McGarry SV, Currie TP, Nickerson DM, McClellan S, Ghivizzani SC, et al. Expression of an exogenous human Oct-4 promoter identifies tumor-initiating cells in osteosarcoma. Cancer research. 2009; 69(14):5648-55.
44. Chen J, Li Y, Yu T-S, McKay RM, Burns DK, Kernie SG, et al. A restricted cell population propagates glioblastoma growth after chemotherapy. Nature. 2012; 488(7412):522-6.
45. Ghanei Z, Jamshidizad A, Joupari MD, Shamsara M. Isolation and characterization of breast cancer stem cell-like phenotype by Oct4 promoter-mediated activity. Journal of cellular physiology. 2020; 235(1).