مجله علوم تغذیه و صنایع غذایی ایران
سال شانزدهم، شماره ۳، پاییز ۱۴۰۰، صفحات ۵۳-۴۵

بررسی اثر سفیده تخم مرغ نابارور بر تکثیر، مهاجرت و بیان ژن‌های مرتبط با بنیادینگی و تمایز سلول‌های سرطانی کولون رده SW480

هادی منجی[۱،۲]، حمید زند[۱]، آرمان قربانی[۱]، کتایون پوروالی[۳]

۱- گروه تغذیه سلولی و مولکولی، دانشکده علوم تغذیه و صنایع غذایی، انستیتو تحقیقات تغذیه‌ای و صنایع غذایی کشور، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران

۲- مرکز تحقیقات سلامت سالمندان، پژوهشکده علوم جمعیتی غدد، پژوهشگاه غدد و متابولیسم، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران

۳- نویسنده مسئول: استادیار گروه تغذیه سلولی و مولکولی، دانشکده علوم تغذیه و صنایع غذایی، انستیتو تحقیقات تغذیه‌ای و صنایع غذایی کشور، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران. پست الکترونیکی: K_pourvali@sbmu.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۱/۳۱ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۴/۴

چکیده

سابقه و هدف: بروز سرطان در دوران جنینی بسیار نادر است. با این حال، هنوز عواملی که مانع ایجاد و یا باعث کنترل روند تومورزایی در محیط جنینی شوند به درستی شناسایی نشده اند. از سوی دیگر، سلول‌های بنیادی تومور، با ویژگی‌هایی مشابه سلول‌های بنیادی جنینی، در پیشرفت و مقاومت به درمان سرطان دخالت دارند. هدف از این مطالعه بررسی اثر سفیده تخم مرغ نابارور، به عنوان یک محیط شبه جنینی، بر خصوصیات تکثیر، آپوپتوز، خودنوزایی، بنیادینگی و قدرت مهاجرت سلول‌های سرطانی کولون رده SW480 و زیرگروهی مقاوم به داروی ۵-فلورواوراسیل (5FU) است.

مواد و روش‌ها: سلول‌های SW480 و 5FU-SW480، با غلظت ۱۰٪ حجمی سفیده تخم مرغ نابارور تیمار شدند. میزان زنده‌مانی سلول‌ها با روش MTT، بررسی سیکل سلولی با فلوسایتومتری، خودنوزایی با روش تشکیل کولونی و تشکیل اسفروئید و مهاجرت سلولی با روش ترمیم زخم سنجیده شدند. همچنین، بیان ژن‌های *c-Myc*، *Nanog*، *Ndrg1* و *E-cadherin* با روش Real time-PCR بررسی شد.

یافته‌ها: سفیده تخم مرغ باعث کاهش میزان بقا، توقف سیکل سلولی در فاز G0/G1، کاهش تشکیل کولونی و اسفروئید و مهار مهاجرت در هر دو گروه سلولی در مقایسه با گروه کنترل شد. همچنین در سلول‌های SW480 منجر به کاهش بیان ژن *c-Myc* و *Nanog* و افزایش بیان ژن‌های *Ndrg1* و *E-cadherin* شد. در حالی که، افزایش بیان ژن *c-Myc*، کاهش بیان ژن *Nanog* و *Ndrg1* در سلول‌های مقاوم به دارو مشاهده شد.

نتیجه گیری: به نظر می‌رسد سفیده تخم مرغ نابارور از طریق مکانیسم‌های متفاوتی باعث جلوگیری و یا کنترل روند تومورزایی می‌شود. مطالعات بیشتری نیاز است تا دقیقاً عواملی که به صورت خاص بر بنیادینگی و تهاجم‌پذیری سلول‌های سرطانی به خصوص در سلول‌های بنیادی سرطانی مؤثرند، را شناسایی کند.

واژگان کلیدی: SW480 ، ۵-فلورواوراسیل، سرطان روده، محیط جنینی، سفیده تخم مرغ، خرد زیست محیط تومور

• مقدمه

سرطان بیماری پیچیده و پیشرونده‌ای است که توسط تکثیر سلولی کنترل نشده و گریز سلول‌ها از برنامه‌های مهاری سیکل سلولی ایجاد و سبب هموار کردن راه‌های تهاجم سلولی و متاستاز می‌شود (۳-۱). درمان‌های مرسوم علاوه بر ایجاد آسیب به سلول‌های سالم، با مقاومت سلول‌های توموری به داروهای مورد استفاده همراه است و در بسیاری موارد سرطان حتی پس از یک دوره موفقیت درمان، دوباره برمی‌گردد (۱).

امروزه عامل این پیشروندگی، مقاومت به درمان و برگشت سرطان را سلول هایی با ویژگی‌های بنیادی درون توده تومور می‌دانند (۵، ۴). طبق این نگرش جمعیت کوچکی از سلول‌های توده توموری که بسیار شبیه به سلول‌های بنیادی بافتی و سلول‌های بنیادی جنینی هستند با توانایی خودنوزایی، عدم تمایز (بنیادینگی) و تکثیر نامیرا عامل ایجاد بدخیمی‌ها می‌شوند (۶). پروفایل بیان ژنی در این سلول‌ها، به خصوص ژن‌های دخیل در بنیادینگی سلولی بسیار شبیه

[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2026-11-06]

سلول‌های بنیادی بافتی و خاصه سلول‌های بنیادی جنینی است (۵، ۱). به این سلول‌ها اصطلاحا سلول‌های بنیادی سرطان CSCs (Cancer Stem Cells) یا سلول‌های آغازگر تومور اطلاق می‌شود و در سرطان‌های سینه، کولون و گلیوما شناسایی شده‌اند (۸، ۷). به نظر می‌رسد این سلول‌ها توسط جهش در سلول‌های بنیادی مقیم در بافت و یا سلول‌های بنیادی جنینی که به صورت نابجا به بافت هدف مهاجرت کردند، حاصل می‌شوند (۶) و دارای خصوصیات خودنوزایی، تکثیر گسترده، مقاومت به دارو و بیان فاکتورهای بنیادینگی مثل c-Myc، *Nanog* و کاهش بیان فاکتورهای تمایز مثل *Ndrg1* و *E-cadherin* هستند (۹).

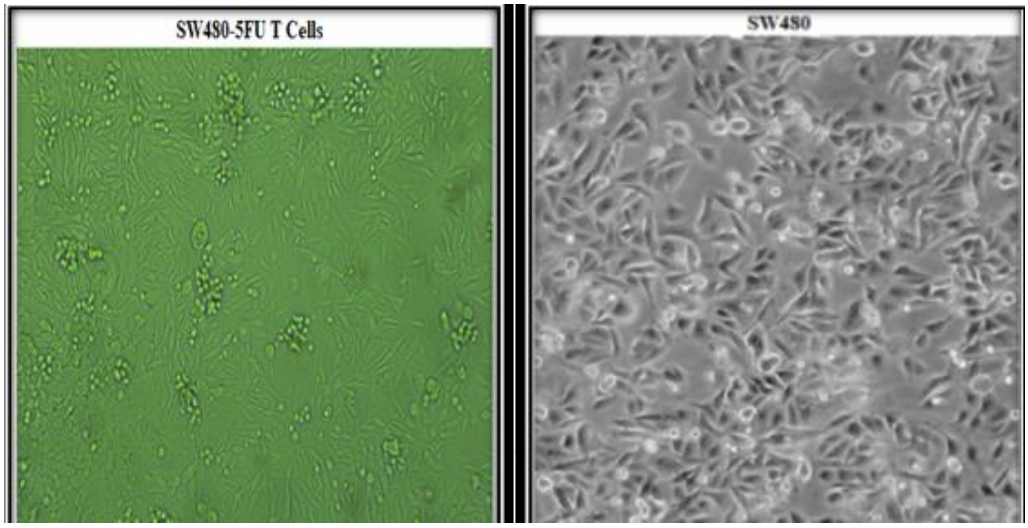
با وجود چنین شباهتی بین سلول‌های بنیادی سرطانی و سلول‌های بنیادی جنینی، ایجاد بدخیمی در دوران رویانی و جنینی نادر است و در واقع مطالعات پیشین نشان دادند که محیط‌های رویانی و جنینی گونه‌های مختلف منجر به القای تمایز و توقف تکثیر سلول‌های بدخیم می‌شوند (۱۱، ۱۰، ۶). خرد زیست محیط (microenvironment) جنینی می‌تواند منجر به تغییر بنیادینگی سلول‌های سرطانی به سوی تمایز یافتگی بیشتر و تهاجم کمتر و سوق دادن آن به سوی فنوتیپی طبیعی‌تر شود (۶). مطالعات نشان دادند خرد زیست محیط رویانی گونه‌های مختلف و اووسیت‌های پستانداران و زنوپوس دارای ترکیباتی هستند که قادر به بازبرنامه‌ریزی سلول‌های سوماتیک می‌باشند و منجر به بازبرنامه‌نویسی هسته‌ی سرطانی و نرمال کردن آن می‌شوند (۱۳، ۱۲).

همچنین کاشت سلول‌های سرطانی در مراحل مختلف جنینی با توقف رشد سلول سرطانی همراه بوده است (۱۴).

به این ترتیب به نظر می‌رسد که احتمالاً محیط جنینی از طریق مسیرهای مولکولی و خاموش/روشن کردن برخی ژن‌های خاص منجر به ایجاد مقاومت در برابر تومورزایی می‌شود. شناسایی مکانیسم‌های عمل دخیل در ایجاد این ویژگی می‌تواند باعث ایجاد راهکارهایی جهت جلوگیری، کند کردن روند و احتمالاً درمان بدخیمی‌ها شود. از این رو در این مطالعه به بررسی اثرات سفیده تخم مرغ نابارور به عنوان نوعی محیط جنینی بر خصوصیات تکثیر، آپوپتوز، خودنوزایی، بنیادینگی، قدرت مهاجرت و بیان ژن‌های مرتبط با تکثیر، بنیادینگی و تمایز در سلول‌های سرطانی کولون رده SW480 و زیر رده‌ای از آن‌ها که مقاوم به درمان با داروی ۵-فلورواوراسیل (5FU) می‌باشند، پرداخته شد.

• مواد و روش‌ها

کشت سلول: رده سلولی سرطان کولون SW480 (شکل ۱) جهت انجام این مطالعه in vitro، از بانک ملی کشت سلول انستیتو پاستور خریداری شد. سلول‌ها تحت شرایط استاندارد (دمای ۳۷ درجه سلسیوس و ۵٪ دی اکسیدکربن) در انکوباتور با استفاده از محیط کشت DMEM همراه با ۱۰٪ سرم جنین گاوی (FBS)، ۱٪ گلوتامین و ۱٪ آنتی بیوتیک پنی سیلین/استروپتومایسین (Gibco, Pittsburgh, PA) کشت داده شدند. محیط کشت هر ۴۸ ساعت تعویض می‌شد و سلول‌ها با رسیدن به ۹۰٪ پرشدگی پاساژ داده می‌شدند.



شکل ۱. سلول‌های SW480 و SW480 مقاوم به داروی (SW480-5FU) استفاده شده در این مطالعه

[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2026-11-06]

آماده سازی سفیده تخم مرغ: پس از تهیه تخم مرغ از کارخانه جوجه‌کشی به سرعت تخم مرغ‌های نابارور به آزمایشگاه منتقل و سپس سفیده تخم مرغ (EW) نابارور پس از یک ساعت غوطه‌وری در الکل ۷۰٪ تحت شرایط استریل زیر هود با استفاده از سرنگ ۲۰ میلی‌لیتری جدا شد و تا رسیدن به غلظت ۱۰٪ حجمی در محیط کشت سلول حل شد (۱۵).

آزمون MTT: تکثیر و زیستایی سلول‌ها با استفاده از آزمون MTT بررسی شد. به صورت خلاصه $3 x10^3$ سلول در هر خانه پلیت‌های ۹۶ خانه ای به مدت ۲۴ ساعت کشت داده شد. سپس سلول‌ها به مدت ۷۲ ساعت با EW ۱۰٪ انکوبه شدند. پس از حذف محیط کشت، ۲۰ میکرولیتر محلول ۵ میلی‌گرم/میلی لیتر MTT -[3 - (4, 5 dimethylthiazolyl-2] 2, 5-diphenyltetrazolium bromide dye) (Sigma, St. Louis, MO, USA) به مدت ۴ ساعت افزوده شد و سپس ۲۰۰ میکرولیتر DMSO برای حلالیت کریستال‌های فورمازان ارغوانی اضافه شد. پس از آن پلیت‌ها با استفاده از دستگاه خوانشگر پلیت در طول موج ۵۷۰ نانومتر و ۵۹۲ نانومتر طول موج مرجع (Bio-Tek, VA, USA) خوانده شدند.

آنالیز فلوسایتومتری: سیکل سلولی با استفاده از آنالیز فلوسایتومتری بررسی شد. بدین منظور سلول‌ها به مدت ۲۴ ساعت در یک پلیت ۱۲ خانه کشت داده شدند و سپس به مدت ۷۲ ساعت با EW ۱۰٪ تیمار شدند. پس از جداسازی سلول‌ها از کف پلیت، سلول‌ها دو بار با PBS شسته شدند و یک شب در اتانول ۷۰٪ و دمای ۲۰- درجه سلسیوس فیکس شدند. سپس سلول‌ها با PBS شسته و ۰٫۵ µM/ml آنزیم RNase (Sigma, St. Louis, MO, USA) به مدت ۳۰ دقیقه افزوده شد. پس از آن سلول‌ها با اضافه شدن غلظت ۵۰µg/ml پروپیدیوم یدید (Sigma, St. Louis, MO, USA) به مدت ۳۰ دقیقه در شرایط تاریکی رنگ آمیزی شدند. در پایان با استفاده از دستگاه فلوسایتومتری (Becton FACScan Dickinson) سیکل سلولی بررسی شد.

آزمون تشکیل اسفروئید (Sphere formation): آزمون تشکیل اسفیر با استفاده از روش معلق سازی سلول‌ها در محیط مایع کشت سلولی انجام شد. سطح پلیت‌های ۲۴ خانه ای ته صاف به وسله‌ی پلی هما (polyHEMA) با غلظت ۱۲ میلی گرم بر میلی لیتر اتانول ۹۵٪ پوشیده شد. سپس 10^4 سلول در این پلیت‌ها همراه با محیط کشت DMEM بدون سرم و با ۳۰ نانوگرم/میلی لیتر فاکتور رشد اپیدرمال (EGF) و ۳۰ نانوگرم/میلی لیتر فاکتور رشد فیبروبلاستی (FGF) reproductive biomedicine and stem cell biology,) Royan Institute, Iran) و آنتی بیوتیک پنی‌سیلین/ استروپتومایسن ۱٪ کشت داده شدند. EGF و FGF یک روز در میان به سلول‌ها اضافه می‌شد. اسفیرهای تشکیل شده پس از گذشت ۸ روز از کشت سلول‌ها توسط میکروسکوپ نوری شمارش شدند.

آزمون تشکیل کولونی (Colony formation): ظرفیت خودنوزایی و تکثیر طولانی مدت سلول‌های تیمار شده با سفیده تخم مرغ نابارور با استفاده از آزمون تشکیل کولونی سنجیده شد. ۱۰۰-۳۰۰ سلول در هر پلیت ۱۲ خانه به مدت ۲۴ ساعت کشت داده شد، سپس سلول‌ها همراه با سفیده تخم مرغ ۱۰٪ به مدت ۱۳ روز در شرایط استاندارد انکوبه شدند. پس از آن محیط کشت هر چاهک تخلیه و توسط محلول PBS شستشو انجام شد، به منظور تثبیت کولونی‌ها از محلول استیک اسید/ متانول (۱/۷) استفاده شد و با ۲۰۰ میکرولیتر رنگ کریستال ویوله ۰/۰۵ ٪ (Sigma Chemical Company, Louis, MO, USA) به مدت ۲ ساعت در دمای اتاق رنگ آمیزی انجام شد و سپس شست و شو با آب انجام شد و سلول‌ها خشک شدند. کولونی‌های بالای ۵۰ سلول با استفاده از میکروسکوپ نوری معکوس شمارش شدند.

آزمون ترمیم زخم (wound healing assay): مهاجرت سلول‌ها با استفاده از ایجاد خراش در پلیت‌های ۶ خانه انجام شد. 10^5 سلول در پلیت‌های ۶ خانه کشت داده شد، پس از ۴۸-۲۴ ساعت انکوباسیون و پرشدن ۹۰ تا ۱۰۰ درصد کف پلیت‌ها، سلول‌ها به مدت ۸ ساعت، بدون FBS جهت توقف تکثیر، انکوبه شدند. با استفاده از نوک سرسمپلر زرد استریل شیاری در محیط کشت ایجاد شد و چاهک‌ها یک بار با بافر PBS شست و شو شدند. سپس محیط کشت غنی با FBS ۱۰٪ را به این پلیت‌ها اضافه کردیم، در انتها توسط میکروسکوپ معکوس در زمان‌های ۰ (شروع)، ۴۸ و ۷۲ ساعت مهاجرت سلول‌ها از لبه شکاف به محل شکاف در نمونه‌های تیمار شده با سفیده تخم مرغ نابارور و کنترل عکس‌برداری شد. تصاویر با استفاده از نرم‌افزار ImageJ (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA) آنالیز و مقایسه شدند.

استخراج RNA و آنالیز Real-time PCR : ابتدا سلول‌ها در پلیت‌های ۶ خانه کشت داده شدند، سپس تیمار با EW ۱۰٪ به مدت ۷۲ ساعت انجام شد. پس از شست و شوی سلول‌ها با PBS و جداکردن سلول ها استخراج DNA با استفاده از محلول RNX-plus (Sinaclon, Tehran, Iran) طبق

[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2026-11-06]

دستورالعمل شرکت سازنده انجام شد. سپس جذب نوری در ۲۶۰ نانومتر جهت تعیین غلظت RNA انجام شد. ۳ میکروگرم از RNA استخراج شده جهت سنتز cDNA با استفاده از کیت سنتز cDNA (2-step RT-PCR kit, Vivantis, USA) استفاده شد. رونویسی cDNA با استفاده از دستورالعمل Takara Master mix و پرایمرهای زیر (جدول ۱) در دستگاه Real-Time PCR (Applied Biosystems, USA) برای ژن‌های *c-Myc*، *Nanog*، *Ndrg1*، *E-cadherin* و ژن خانه‌دار *GAPDH* تحت شرایط: دناتوراسیون ۲۰ ثانیه ۹۵درجه، annealing ۲۰ ثانیه در ۶۰ درجه و گسترش ۳۰ ثانیه در ۷۲ درجه سانتی گراد برای ۴۰ سیکل انجام شد.

جدول ۱: توالی پرایمرهای به کار رفته در مطالعه

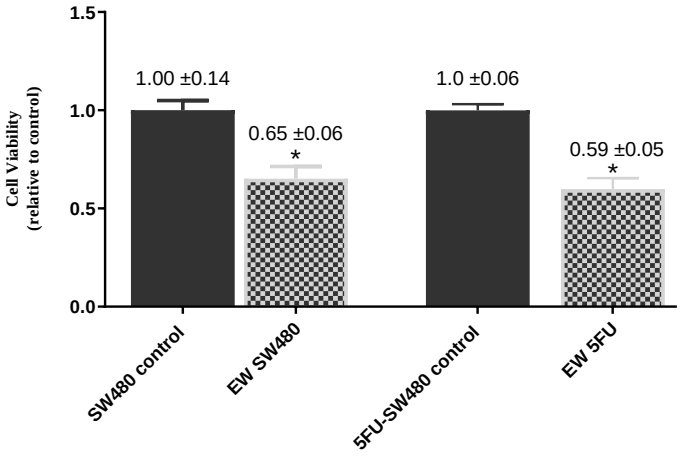
ژن	پرایمر
Nanog	F:AACTCTCCAACATCCTGAACCTC R: CGTCACACCATTGCTATTCTTCG
c-Myc	F:GCATACATCCTGTCCGTCCAAG R:TTCCTTACGCACAAGAGTTCCG
E-cadherin	F:TGCTAATTCTGATTCTGCTGCTC F:TCAAGTCAAAGTCCTGGTCCTC
Ndrg1	F: TTCCTGCTCCCTAACCTTTCG R: ATTCACTCTGACCAAACTTCCTATG
GAPDH	F:CATCAAGAAGGTGGTGAAGCAG R:GCGTCAAAGGTGGAGGAGTG

آنالیز آماری: تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۰ بصورت میانگین ± خطای استاندارد انجام گرفت و $p<۰/۰۵$ به لحاظ آماری سطح معنی‌دار تلقی شد. نرمال بودن توزیع داده‌ها با آزمون کولموگروف-اسمیرنوف ارزیابی شد. برای مقایسه توزیع متغیرهای کمی با توزیع نرمال بین دو گروه از آزمون *student t-test* و در صورتی که متغیرها توزیع نرمال نداشتند از آزمون Mann-Whitney استفاده شد. اندازه گیری محیط خراش ایجاد شده در آزمون scratch assay با استفاده از نرم‌افزار Image J صورت گرفت.

• یافته‌ها

جداسازی سلول‌های سرطان کولون مقاوم به داروی 5FU: ۵-فلورواوراسیل دارویی است که با ایجاد اختلال در سنتز DNA و RNA در فاز S سیکل سلولی برای درمان و مهار سرطان مورد استفاده قرار می‌گیرد. با استفاده از آزمون MTT دوز IC50 برای داروی 5FU مطابق با مطالعه قبلی ما به دست آمد (۱۶). به طور خلاصه سلول‌ها در معرض دوزهای افزایشی (۰، ۱۰، ۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰، ۲۰۰ و ۳۰۰ میکرومول) داروی 5FU به مدت ۷۲ ساعت قرار گرفتند و پس از انجام آزمون MTT و ترسیم دیاگرام پاسخ با نرم‌افزار Graphpad prism، دوز IC50 دارو ۲۰ میکرومول تعیین شد. سپس سلول‌های پرشده در کف پلیت به مدت ۷۲ ساعت در معرض این دوز قرار گرفتند. بعد از این مدت تعداد زیادی از سلول‌ها شستشو خارج شدند. سلول‌هایی که در مقابل دارو مقاومت کرده بودند به صورت عادی در محیط کشت نگهداری شدند. پس از ۲-۳ هفته و حذف سلول‌های مرده گروهی از سلول‌ها که باقی مانده و شروع به رشد کردند به عنوان سلول‌های مقاوم به 5FU شناخته شدند و در سایر آزمایشات استفاده شدند.

اثرات تیمار با سفیده تخم مرغ نابارور بر زیستایی سلول‌ها: نتایج آزمون MTT نشان داد که سفیده تخم مرغ نابارور پس از ۷۲ ساعت به صورت معنی‌داری بقا در سلول‌های SW480 و سلول‌های تیمار شده با دارو را کاهش داد ($p<۰/۰۰۱$). همچنان که در شکل ۲ نشان داده شده است میزان زیستایی در سلول‌های SW80 و مقاوم به دارو به ترتیب ۳۵ و ۴۱٪ کاهش یافت.

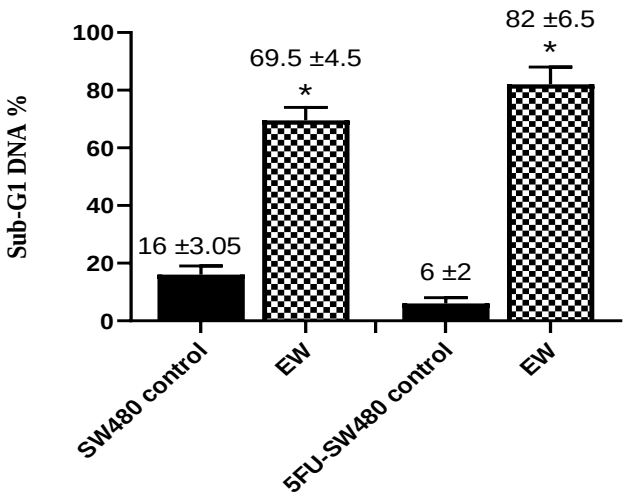


شکل ۲: اثر تیمار با سفیده تخم مرغ نابارور بر بقای سلول‌ها پس از ۷۲ ساعت انکوباسیون با استفاده از روش MTT. نتایج حاصل سه تکرار مختلف (n=۳) است و بر اساس میانگین ± خطای استاندارد نشان داده شده است و نسبت به گروه کنترل نرمالیزه شده اند. *$p<۰/۰۵$ در مقایسه با گروه کنترل سطح معنی‌داری را نشان می‌دهد.

اثرات تیمار با سفیده تخم مرغ نابارور بر سیکل سلولی: جهت بررسی مکانیسم کاهش بقای سلول‌های SW480 و SW480-5FU توسط سفیده تخم مرغ نابارور از فلوسایتومتری با رنگ آمیزی PI استفاده شد. نتایج نشان داد تیمار با سفیده تخم مرغ نابارور پس از ۷۲ ساعت انکوباسیون

[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2026-11-06]

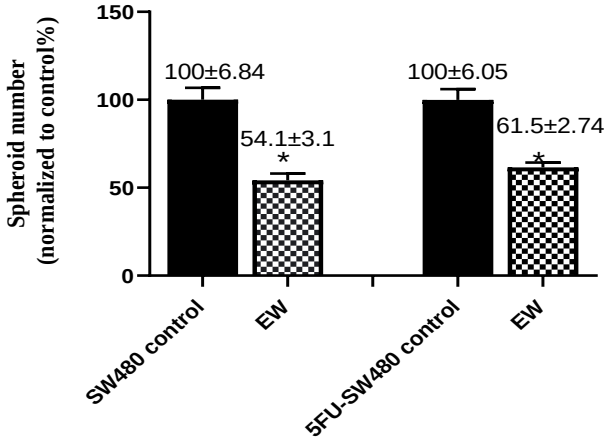
منجر به توقف سیکل سلولی در مرحله G0/G1 در رده SW480 (۴/۵ ± ۶۹/۵) در مقایسه با گروه کنترل ۳/۰۵ ± ۱۶) و سلول‌های SW480-5FU (۶/۵ ±۸۲ در مقایسه با گروه کنترل ۲ ± ۶) شد (شکل ۳).



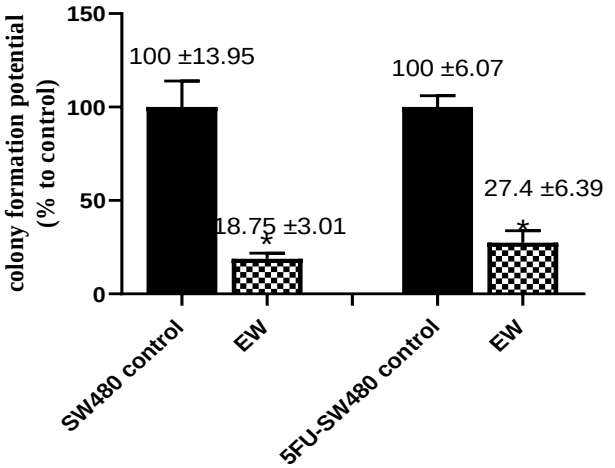
شکل ۳. اثر تیمار با سفیده تخم مرغ نابارور بر سیکل سلولی در سلول‌های SW480 و SW480-5FU پس از ۷۲ ساعت انکوباسیون . داده‌ها حاصل سه تکرار مختلف است و بر اساس میانگین ± خطای استاندارد گزارش شده اند. p<۰/۰۵ * در مقایسه با گروه کنترل همان گروه سطح معنی‌داری را نشان می‌دهد.

اثرات تیمار با سفیده تخم مرغ نابارور بر توانایی تشکیل کولونی و تشکیل اسفروئید: جهت بررسی اثرات تیمار با سفیده تخم مرغ نابارور بر خودنوزایی (self renewal) سلول‌های SW480 و SW480-5FU از آزمون‌های تشکیل کولونی و تشکیل اسفروئید استفاده شد. نتایج نشان داد که انکوباسیون به مدت ۱۴ روز با سفیده تخم مرغ منجر به کاهش معنی‌دار تشکیل کولونی در هر دو گروه سلولی SW480 (۸۱ ٪) و SW480-5FU (۷۳٪) نسبت به گروه کنترل (شکل ۴) و کاهش معنی‌داری (۴۵/۸۱٪) در رده SW480 و ۳۸/۴۲ ٪ در رده SW480-5FU) در تعداد اسفروئیدها پس از ۸ روز انکوباسیون شد (شکل ۵).

اثرات تیمار با سفیده تخم مرغ نابارور بر بیان ژن‌های مرتبط با تکثیر، تمایز و بنیادینگی سلول‌های سرطانی: پس از استخراج RNA و سنتز cDNA، تاثیر تیمار با سفیده تخم مرغ نابارور در سلول‌های SW480 و SW480-5FU به مدت ۷۲ ساعت در گروه تیمار شده و گروه کنترل توسط آزمون qRT-PCR ارزیابی شد. بیان نسبی ژن‌ها نسبت به ژن خانه‌دار *GAPDH* نرمال سازی و با استفاده از روش LIVAK (2^{-DDCT}) محاسبه شد. سفیده تخم مرغ در سلول‌های SW480 منجر به کاهش بیان ژن *c-Myc*، کاهش بیان ژن *Nanog*، و افزایش بیان ژن‌های *Ndrg1* و *E-cadherin* شد. در سلول‌های مقاوم به دارو سفیده تخم مرغ نابارور منجر به افزایش بیان ژن *c-Myc*، کاهش بیان ژن *Nanog* و ژن *Ndrg1* و عدم تغییر بیان ژن *E-cadherin* شد (شکل ۶).

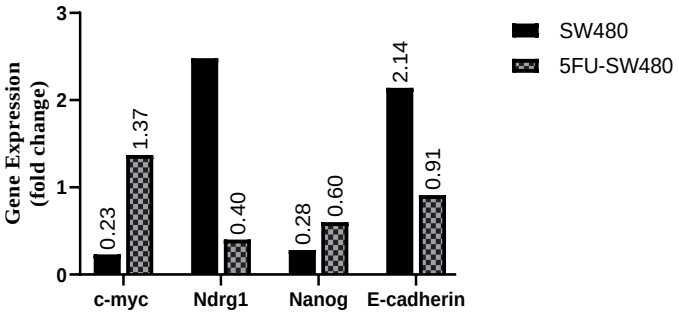


شکل ۴. بررسی میزان تشکیل اسفروئید به دنبال تیمار با سفیده تخم مرغ نابارور .میزان تشکیل اسفروئیدها بر اساس درصد اسفروئیدهای تشکیل شده در هر گروه نسبت به گروه کنترل به دست آمد. داده‌ها حاصل سه تکرار مختلف است و بر اساس میانگین ± خطای استاندارد گزارش شده اند. p<۰/۰۵ * در مقایسه با گروه کنترل همان گروه سطح معنی‌داری را نشان می‌دهد.



شکل ۵. کاهش تشکیل کولونی به دنبال تیمار با سفیده تخم مرغ نابارو در سلول‌های SW480 و SW480-5FU. توانایی تولید کولونی با محاسبه نسبت تعداد کولونی‌های تولید شده با بیش از ۵۰ سلول به تعداد سلول‌های اولیه کشت داده شده به دست آمد که با ۱۰۰٪ گروه کنترل نرمالیزه شد. داده‌ها حاصل حداقل شش تکرار مختلف (n=۶) است و بر اساس میانگین ± خطای استاندارد گزارش شده‌اند. p<۰/۰۵ * در مقایسه با گروه کنترل همان گروه سطح معنی‌داری را نشان می‌دهد.

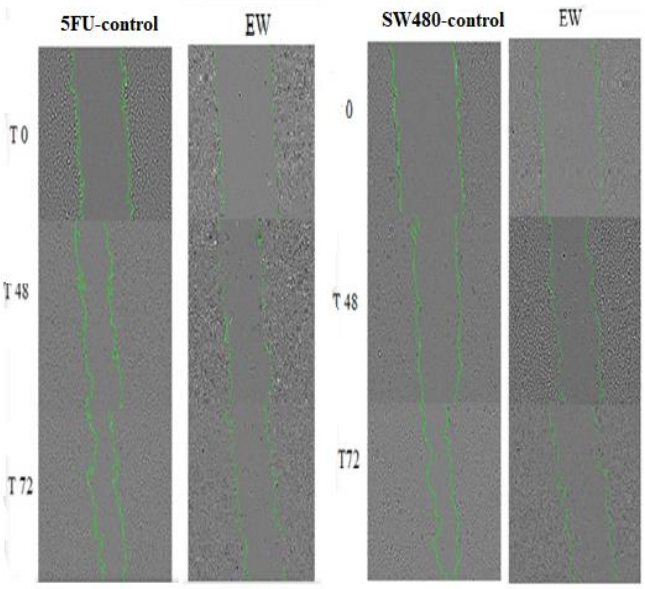
[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2026-11-06]



شکل ۶. بیان نسبی ژن‌های مختلف در سلول‌های SW480 و SW480-5FU تحت تیمار ۷۲ ساعته با سفیده تخم مرغ. بیان نسبی ژن‌ها با ژن خانه‌دار GAPDH نرمالایزه و با استفاده از روش LIVAK (2-DDCT) محاسبه شد.

اثرات تیمار با سفیده تخم نابارور بر مهاجرت سلولی:

برای ارزیابی اثر سفیده تخم مرغ در مهاجرت سلول‌های SW480 و SW480-5FU از ترمیم زخم استفاده شد. بررسی نتایج این تست که به صورت مجموعه ای از عکس‌ها گردآوری شده و مقایسه آن‌ها باهم انجام گرفت به صورت مشخص نشان دهنده کاهش مهاجرت سلول‌ها در سلول‌های SW480 (درصد پرشدن خراش ۲۷/۶۶ ٪ در مقایسه با گروه کنترل ٪۵۹/۳۳) و SW480-5FU (٪۲۹/۶۷ در مقایسه با گروه کنترل ۵۵ ٪) پس از تیمار با سفیده تخم مرغ می‌باشد (شکل ۷).



شکل ۷. تصاویر میکروسکوپی از مهاجرت سلول به سمت مرکز خراش در سلول‌های SW480-5FU در زمان‌های ۰، ۴۸ و ۷۲ ساعت پس از ایجاد خراش. خطوط سبزرنگ مرز سلول‌ها را در هر زمان نشان می‌دهد.

• بحث

مطالعات پیشین نشان داده اند محیط جنینی گونه های مختلف قادر است رفتار سلول‌های سرطانی را تغییر دهد و با تنظیم منفی بسیاری از ژن‌های آنکوژن و تنظیم مثبت مهارکننده تومور منجر به مهار رشد، القای آپوپتوز و ایجاد تمایز در سلول‌های سرطانی به خصوص سلول‌های بنیادی سرطانی شود (۱۱، ۱۰، ۶). در مطالعه حاضر تکثیر، خودنوزایی، بنیادینگی و قدرت مهاجرت سلول‌های سرطانی کولون SW480 و سلول‌های SW480 تیمار شده با داروی 5FU بررسی شد. در نتیجه‌ی این بررسی مشخص شد محیط سفیده تخم مرغ نابارور با کاهش بقا، توقف سیکل سلولی، کاهش تشکیل کولونی و کاهش تشکیل اسفروئید و مهاجرت در هر دو گروه سلولی SW480 و SW480 مقاوم به دارو و کاهش بیان ژن‌های بنیادینگی *Nanog* و c-*Myc* و افزایش بیان ژن‌های دخیل در تمایز *E-cadherin* و *Ndrg1* در سلول‌های SW480 همراه است.

بنیادینگی در سلول‌های سرطانی از عوامل مهم تکثیر نامیرا، گسترش و تهاجم سلول‌های سرطانی تلقی می‌شود (۴). مطالعه حاضر نشان داد سفیده تخم مرغ نابارور تکثیر سلولی را با مهار در فاز G0/G1 کاهش می‌دهد (شکل ۲ و ۳). همچنین کاهش بنیادینگی سلولی با کاهش تشکیل اسفروئید (شکل ۴) و کولونی (شکل ۵) و کاهش بیان مارکرهای بنیادینگی *c-Myc* و *Nanog* (شکل ۶) مشخص شد. *c-Myc* به میزان زیادی در زیررده سلول‌های بنیادی کولون بیان می‌شود و حذف آن با کاهش قابل توجه توانایی تشکیل اسفروئید، آپوپتوز، تهاجم و مهاجرت سلول‌ها و همچنین تومورزایی این سلول‌ها همراه است (۱۷). بیان *Nanog* منجر به القای وضعیت شبه-بنیادی در سلول‌های سرطانی کولون می‌شود که مشابه عملکرد *Nanog* در سرطان پروستات، *Oct4* در ملانوما و *Sox2* در سرطان پستان است (۱۸). مطالعات قبلی نشان دادند میزان زنده‌مانی به واسطه‌ی تیمار با سفیده تخم مرغ نابارور در رده سلولی سرطان پستان MCF-7 و MDA-MB-231 و TCam-2 تفاوت معنی‌داری با گروه کنترل نداشت (۲۰، ۱۹) ، با این حال مشابه مطالعه‌ی حاضر بیان عوامل بنیادینگی *Klf4*، *c-Myc* و *Nanog* پس از تیمار با سفیده تخم مرغ کاهش یافت (۲۰). به علاوه چند مطالعه نشان دادند اوواموسین، لیزوزیم و اووترانسفرین که از اجزای ترکیب سفیده تخم مرغ هستند، منجر به کاهش تکثیر، کاهش متاستاز و آنژیوژنز سلول‌های سرطانی می‌شوند (۲۵-۲۱). اووترانسفرین با افزایش کاسپاز ۹ و ۶، تغییر ریخت شناسی سلول و تغییر

[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2026-11-06]

پتانسل غشای میتوکندری منجر به مهار تکثیر و القای آپوپتوز در سلول‌های سرطان کولون HCT-116 برخلاف سلول سرطان پستان MCF-7 شد (۲۳). بنابراین کاهش تکثیر، القای آپوپتوز و کاهش خودنوزایی متعاقب تیمار با سفیده تخم مرغ می‌تواند ناشی از ترکیبات سازنده سفیده تخم مرغ باشد که در بالا اشاره شد.

با این حال در مطالعه‌ی حاضر بیان پروفایل ژنی در سلول‌های تیمار شده با 5FU متفاوت از سلول‌های SW480 بود بدین صورت که بیان ژن *c-Myc* و *Ndrg1* کاهش یافت و در بیان ژن *E-cadherin* تغییری ایجاد نشد (شکل ۶). نشان داده شده که 5FU می‌تواند با ایجاد تغییرات متابولیک در مسیرهای مختلف سلولی منجر به تغییر بیان ژن‌های مختلف مرتبط با متابولیسم ازجمله *c-Myc* شود (۲۳، ۲۲). بنابراین این تفاوت در بیان پروفایل ژنی بین دو گروه می‌تواند ناشی از اثرات 5FU و از ویژگی های سلول‌های مقاوم به درمان باشد.

متاستاز عامل اصلی اکثر مرگ‌های ناشی از سرطان است. سلول‌های آغازگر متاستاز به زیرگروهی از سلول‌های با خاصیت بنیادی تعلق دارد که با بیان مارکرهای انتقال اپیتلیال به مزانشیمال (Epithelaial to Mesenchima Transition) و سایر مارکرهای سطحی دخیل در قدرت تهاجم و متاستاز توده سرطانی به بافت‌های دیگر مهاجرت می‌کند (۲۶). درواقع پژوهشگران نشان دادند قدرت تهاجم و مهاجرت سلول‌های بنیادی توموری بیشتر از سایر سلول‌های توده تومور می‌باشد و مهار مهاجرت و بنیادینگی سلول با کاهش قدرت متاستاز توده سرطانی و بهبود درمان همراه است (۲۷). محیط‌های جنینی می‌توانند با القای تمایز و افزایش بیان مارکرهای تمایز منجر به مهار تهاجم و متاستاز سلولی شوند (۲۸). در مطالعه حاضر سفیده تخم مرغ نابارور با کاهش مهاجرت در هر دو سلول SW480 و 5FU-SW480 همراه بود (شکل ۷). همچنین افزایش مارکرهای تمایز *E-cadherin* و *Ndrg1* در سلول‌های SW480 نشان از القای تمایز در سلول‌هایی دارد که از آپوپتوز گریختند (شکل ۶). این نتایج همسو با نتایج مطالعات پیشین در سلول‌های seminoma و سلول‌های سرطان پستان MCF-7 و MDA-MB-231 است (۱۶، ۱۲) و توانایی سفیده تخم مرغ در توقف فرایند EMT در این سلول‌ها را نشان می‌دهد (۲۰).

هدف این مطالعه روشن شدن مکانیسم‌های احتمالی دخیل در محیط جنینی که مانع از تومورزایی می‌شود، بود. نتایج حاصل از این مطالعه اطلاعاتی تکمیلی در خصوص کاهش تکثیر، خودنوزایی، بنیادینگی و تهاجم سلول‌های سرطانی کولون توسط سفیده تخم مرغ نابارور را ارائه می‌دهد. با وجود چندین کاندید (به ویژه خانواده آلبومینوئید ها) همچنان ماهیت عوامل اصلی که باعث ایجاد این ویژگی در محیط جنینی می‌شود ناپیداست. مطالعات بیشتری نیاز است تا اجزای مهاری توموری سفیده تخم مرغ که به صورت خاص بر بنیادینگی و تهاجم‌پذیری سلول‌های سرطانی به خصوص در سلول‌های بنیادی سرطانی مؤثرند، را شناسایی کند.

• References

1. Ratajczak MZ, Bujko K, Mack A, Kucia M, Ratajczak J. Cancer from the perspective of stem cells and misappropriated tissue regeneration mechanisms. Leukemia. 2018;32(12):2519-26.
2. Khodabakhshi A, Akbari ME, Mirzaei HR, Seyfried TN, Kalamian M, Davoodi SH. Effects of Ketogenic metabolic therapy on patients with breast cancer: A randomized controlled clinical trial. Clinical Nutrition. 2021;40(3):751-8.
3. Khodabakhshi A, Seyfried TN, Kalamian M, Beheshti M, Davoodi SH. Does a ketogenic diet have beneficial effects on quality of life, physical activity or biomarkers in patients with breast cancer: a randomized controlled clinical trial. Nutrition journal. 2020;19(1):87.
4. Ayob AZ, Ramasamy TS. Cancer stem cells as key drivers of tumour progression. Journal of Biomedical Science. 2018;25(1):20.
5. Pourvali K, Monji H. Obesity and intestinal stem cell susceptibility to carcinogenesis. Nutrition & Metabolism. 2021;18(1):37.
6. Hendrix MJ, Seftor EA, Seftor RE, Kasemeier-Kulesa J, Kulesa PM, Postovit LM. Reprogramming metastatic tumour cells with embryonic microenvironments. Nature reviews Cancer. 2007;7(4):246-55.
7. Capp JP. Cancer Stem Cells: From Historical Roots to a New Perspective. J Oncol. 2019;2019:5189232.
8. E Visvader J, J Lindeman G. Cancer Stem Cells: Current Status and Evolving Complexities2012. 717-28 p.
9. Schoenhals M, Kassambara A, De Vos J, Hose D, Moreaux J, Klein B. Embryonic stem cell markers expression in cancers. Biochemical and biophysical research communications. 2009;383(2):157-62.
10. Hochedlinger K, Blelloch R, Brennan C, Yamada Y, Kim M, Chin L, et al. Reprogramming of a melanoma genome by nuclear transplantation. Genes & development. 2004;18(15):1875-85.
11. Haldi M, Ton C, Seng WL, McGrath P. Human melanoma cells transplanted into zebrafish proliferate, migrate, produce melanin, form masses and stimulate

[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2026-11-06]

angiogenesis in zebrafish. Angiogenesis. 2006;9(3):139-51.

12. Miyamoto K, Tsukiyama T, Yang Y, Li N, Minami N, Yamada M, et al. Cell-free extracts from mammalian oocytes partially induce nuclear reprogramming in somatic cells. Biology of reproduction. 2009;80(5):935-43.
13. Alberio R, Johnson AD, Stick R, Campbell KH. Differential nuclear remodeling of mammalian somatic cells by Xenopus laevis oocyte and egg cytoplasm. Experimental cell research. 2005;307(1):131-41.
14. Astigiano S, Damonte P, Fossati S, Boni L, Barbieri O. Fate of embryonal carcinoma cells injected into postimplantation mouse embryos. Differentiation. 2005;73(9):484-90.
15. Ferranti F, D'Anselmi F, Caruso M, Lei V, Dinicola S, Pasqualato A, et al. TCam-2 Seminoma Cells Exposed to Egg-Derived Microenvironment Modify Their Shape, Adhesive Pattern and Migratory Behaviour: A Molecular and Morphometric Analysis. PLoS ONE. 2013;8(10):e76192.
16. Shakery A, Pourvali K, Ghorbani A, Fereidani SS, Zand H. Beta-Hydroxybutyrate Promotes Proliferation, Migration and Stemness in a Subpopulation of 5FU Treated SW480 Cells: Evidence for Metabolic Plasticity in Colon Cancer. Asian Pac J Cancer Prev. 2018;19(11):3287-94.
17. Zhang H-L, Wang P, Lu M-Z, Zhang S-D, Zheng L. c-Myc maintains the self-renewal and chemoresistance properties of colon cancer stem cells. Oncol Lett. 2019;17(5):4487-93.
18. Zhang J, Espinoza LA, Kinders RJ, Lawrence SM, Pfister TD, Zhou M, et al. NANOG modulates stemness in human colorectal cancer. Oncogene. 2013;32(37):4397-405.
19. Ferranti F, D'Anselmi F, Caruso M, Lei V, Dinicola S, Pasqualato A, et al. TCam-2 seminoma cells exposed to egg-derived microenvironment modify their shape, adhesive pattern and migratory behaviour: a molecular and morphometric analysis. PloS one. 2013;8(10):e76192-e.
20. D'Anselmi F, Masiello MG, Cucina A, Proietti S, Dinicola S, Pasqualato A, et al. Microenvironment promotes tumor cell reprogramming in human breast cancer cell lines. PLoS One. 2013;8(12):e83770.
21. Sava G. Reduction of B16 melanoma metastases by oral administration of egg-white lysozyme. Cancer chemotherapy and pharmacology. 1989;25(3):221-2.
22. Sava G, Ceschia V, Pacor S, Zabucchi G. Observations on the antimetastatic action of lysozyme in mice bearing Lewis lung carcinoma. Anticancer research. 1991;11(3):1109-13.
23. Ibrahim HR, Kiyono T. Novel anticancer activity of the autocleaved ovotransferrin against human colon and breast cancer cells. Journal of agricultural and food chemistry. 2009;57(23):11383-90.
24. Watanabe K, Tsuge Y, Shimoyamada M, Ogama N, Ebina T. Antitumor Effects of Pronase-Treated Fragments, Glycopeptides, from Ovomucin in Hen Egg White in a Double Grafted Tumor System. Journal of agricultural and food chemistry. 1998;46(8):3033-8.
25. Oguro TO, Y.; Asano, G.; Ebina, T.; Watanabe, K. Ultrastructural and immunohistochemical characterization on the effect of ovomucin in tumor angiogenesis. Japanese Journal of Clinical Electron Microscopy. 2001;33(2):89-99.
26. Scheel C, Weinberg RA. Cancer stem cells and epithelial-mesenchymal transition: concepts and molecular links. Semin Cancer Biol. 2012;22(5-6):396-403.
27. Hermann PC, Huber SL, Herrler T, Aicher A, Ellwart JW, Guba M, et al. Distinct Populations of Cancer Stem Cells Determine Tumor Growth and Metastatic Activity in Human Pancreatic Cancer. Cell Stem Cell. 2007;1(3):313-23.
28. Kulesa PM, Kasemeier-Kulesa JC, Teddy JM, Margaryan NV, Seftor EA, Seftor REB, et al. Reprogramming metastatic melanoma cells to assume a neural crest cell-like phenotype in an embryonic microenvironment. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2006;103(10):3752-7.

[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2026-11-06]

Effects of Unfertilized Egg White on Proliferation, Migration and Expression of Genes Linked to Stemness and Differentiation in SW480 Colon Cancer Cell Line

Monji H[1,2], Zand H[1], Ghorbani A[1], Pourvali K[3]*

1- Dept. of Cellular and Molecular Nutrition, Faculty of Nutrition Science and Food Technology, National Nutrition and Food Technology Research Institute, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

2- Elderly Health Research Center, Endocrinology and Metabolism Population Sciences Institute, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

*3-*Corresponding author: Assistant Professor, Dept. of Cellular and Molecular Nutrition, Faculty of Nutrition Science and Food Technology, National Nutrition and Food Technology Research Institute, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran. Email: K_pourvali@sbmu.ac.ir*

Received 20 Apr, 2021 **Accepted 25 Jun, 2021**

Background and Objectives: Embryonic cancers are very rare. However, the exact components preventing cancer development or progression in embryonic microenvironment are largely unknown. On the other hand, cancer stem cells with characteristics similar to embryonic stem cells are involved in cancer progression and resistance to treatment. The aim of this study was to investigate effects of unfertilized egg white, as an embryonic microenvironment model, on proliferation, self-renewal, stemness and migration of SW480 colon cancer cells and 5-fluorouracil (5FU) resistant subgroup.

Materials & Methods: In brief, SW480 and 5FU-SW480 cells were exposed to 10% (v/v) egg white. To assess viability, self-renewal and stemness characteristics and migratory capacity of the colon cancer cells, MTT, flow PI staining and flow cytometry, colony formation, spheroid and wound healing assays were used, respectively. Furthermore, expression levels of c-Myc, Nanog, Ndrg1 and E-cadherin genes were quantified using real-time polymerase chain reaction.

Results: Findings showed that 10% volume of unfertilized egg white significantly decreased cell survival, inhibited cell cycle in G0/G1, decreased colony formation and sphere formation and inhibited migration ability in the two cell groups, compared to the control. Moreover, expression of c-Myc and Nanog decreased while expression of Ndrg1 and E-cadherin increased in SW480 cells. However, c-Myc gene expression increased in 5FU-SW480 with decreases in expression of Nanog and Ndrg1.

Conclusion: It seems that unfertilized egg white includes various mechanisms to control cancer development and progression. Further studies are needed to identify actual components affecting stemness and invasiveness of tumor cells, specifically cancer stem cells.

Keywords: SW480, 5-fluorouracil, Colonic neoplasms, Embryonic microenvironment egg white, Tumor microenvironment

[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2026-11-06]