

تولید، مطالعه ویژگی و حساسیت دارویی یک رده سلولی جدید از یووینگ سارکوما (SS-ES-1)

چکیده

زمینه و هدف: یووینگ سارکوما یکی از بدخیم‌ترین تومورهای کودکان و نوجوانان است. رده‌های سلولی اندکی از تومورهای این خانواده تولید شده است که مطالعه جنبه‌های بیولوژیک این تومورها را مشکل می‌سازد. ما اخیراً یک رده سلولی جدید از تومور یووینگ سارکوما ناحیه توراسیک چپ دختری ۱۶ ساله تولید کردیم که با نام SS-ES-1 نام‌گذاری گردید. سلول‌های SS-ES-1 تاکنون بیش از ۹۰ بار به صورت پیوسته پاساژ شده‌اند. در مطالعه حاضر برخی از ویژگی‌های سلول‌های SS-ES-1 گزارش می‌شود. **روش بررسی:** کشت سلول در محیط کشت DMEM حاوی ۱۰٪ سرم جنین گاوی، ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر استرپتومايسين، ۱۰۰ واحد در میلی‌لیتر پنی‌سیلین در اتمسفر مرطوب دارای ۷٪ دی‌اکسیدکربن در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انجام شد. مطالعه ویژگی‌های این رده سلولی با استفاده از مجموعه‌ای از آنتی‌بادی‌های منوکلونال و پلی‌کلونال با روش ایمنوسیتوشیمی انجام شد. همچنین حساسیت این سلول‌ها به تعدادی از داروهای ضد توموری با روش سنجش MTT تعیین شده و به صورت ارزش‌های IC50 گزارش گردید. **یافته‌ها:** ویژگی مورفولوژیکی رده سلولی SS-ES-1 شامل سلول‌های کوچک و گرد است که به صورت چند لایه تکثیر می‌شود. رنگ‌آمیزی ایمنوسیتوشیمی حضور برجسته پروتئین‌های CD99، p53، Ki67، سیتوکراتین، نوروفیلانت و همچنین عدم بیان پروتئین GFAP را در این رده سلولی نشان داد. بر پایه ارزش‌های IC50، این سلول‌ها حساسیت قابل توجهی به وین‌بلاستین (2 ± 0.7 picomole) نشان دادند که به دنبال آن وین‌کریستین (0.12 ± 0.03 nm) و دوکسو رویسین (0.03 ± 0.005 μm)، اتوپوزاید (0.28 ± 0.064 μm) و سیس‌پلاتین (0.45 ± 0.067 μm) قرار گرفتند. **نتیجه‌گیری:** ویژگی‌های منحصر به فرد رده سلولی SS-ES-1 این رده سلولی را به عنوان مدل مطالعاتی ارزشمند برای بررسی جنبه‌های بیولوژیک مختلف تومورهای یووینگ سارکوما مطرح می‌سازد.

کلمات کلیدی: یووینگ سارکوما، رده سلولی، سیتوکراتین، نوروفیلانت، CD99، P53

مرضیه بادینلو،^۱ سعید رجبعلیان،^{۲*} ایران پورابولی،^۱ حسین اسکندری،^۲ حمید جنگی اقدم،^۳ میترا حری^۴

۱- گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم دانشگاه باهنر کرمان
۲- مرکز تحقیقات علوم اعصاب کرمان، دانشگاه علوم پزشکی کرمان
۳- مرکز تحقیقات فیزیولوژی کرمان، دانشگاه علوم پزشکی کرمان
۴- کارشناس پرستار، بیمارستان شهید باهنر کرمان

* نویسنده مسئول، کرمان، چهارراه طهماسب آباد، مرکز تحقیقات علوم اعصاب کرمان
تلفن: ۰۹۱۳۱۹۹۵۳۶
email: Srajabalian@yahoo.com

مقدمه

پاتولوژیکی یکسان بوده و آنچه آنها را از یکدیگر متمایز می‌سازد درجه تمایز نورونی این تومورهاست. منشأ تومورهای یووینگ سارکوما، بقایای سلولی ستیغ عصبی جنینی عنوان شده است و ریخت‌شناسی آنها شامل سلول‌های گرد، کوچک و تمایز نیافته است.^{۱-۳} حدود ۸۵٪ از تومورهای خانواده یووینگ سارکوما از استخوان و ۱۵٪ از بافت نرم منشأ می‌گیرند.^۴ امروزه ترکیبی از جراحی، شیمی درمانی و رادیوتراپی برای درمان یووینگ سارکوما تجویز می‌شود. رژیم‌های شیمی درمانی بر اساس ترکیبی از داروهای وینکریستین (Vincristine)، اتوپوزاید (Etoposide)، سیس‌پلاتین

یووینگ سارکوما (Ewing's sarcoma) از بدخیم‌ترین سرطان‌های افراد زیر ۲۰ سال است. درصد شیوع این تومورها، سالانه دو تا سه مورد در یک میلیون نفر گزارش شده است. متاستاز به ریه، استخوان‌ها و مغز استخوان در ۲۵٪ مبتلایان مشاهده شده است. خانواده این نوع تومور از سه گروه یووینگ سارکوما استخوانی، خارج استخوانی و تومورهای نوروکتودرمال اولیه محیطی (Peripheral Primitive Neuroectodermal Tumor; pPNET) تشکیل شده است. تومورهای این خانواده از نظر کلینیکی و

، GFAP (Fibrillary Acidic Protein)، CD99، سیتوکراتین، نوروفیلامنت، پروتئین سرکوب‌کننده تومور p53 و Ki67 با روش ایمنوسیتوشیمی بررسی شد. همچنین حساسیت دارویی سلول‌های SS-ES-1 به پنج داروی ضد تومور Cisplatin، Etoposide، Vinblastine، Vincristine و Doxorubicin ارزیابی شد.

روش بررسی

بیمار مورد مطالعه دختری ۱۶ ساله بود که با علائم درد دست چپ به بیمارستان مراجعه کرد. سی‌تی‌اسکن ناحیه سینه وجود توده‌ای فشرده را در ناحیه همی توراکس فوقانی سمت چپ با گسترش به نخاع گردنی نشان داد. بیمار به دنبال پیشرفت تومور دچار تب و تعریق شبانه، بی‌اختیاری ادرار و فلج اندام‌های تحتانی شد. بررسی‌های پاتولوژیک ماهیت توده را یووینگ سارکوما از نوع pPNET تشخیص داد. بیمار تحت عمل جراحی و در ادامه چندین نوبت شیمی درمانی و رادیوتراپی قرار گرفت. علی‌رغم درمان‌های فوق بیمار شش ماه پس از اولین مراجعه به دلیل پیشرفت بیماری فوت شد. رده سلولی و کشت سلول: رده سلولی SS-ES-1 از کشت اولیه نمونه بافت تومور یووینگ سارکوما با منشاء توراسیک ریوی متعلق به دختری ۱۶ ساله در مرکز تحقیقات علوم اعصاب کرمان تهیه شده است. تشخیص روتین پاتولوژی در مورد تومور فوق با توجه به بیان CD99 یووینگ سارکوما بوده است. نمونه بافت جراحی در محیط کشت به آزمایشگاه منتقل گردید. بافت پس از شستشو به قطعات یک تا دو میلی‌متر مکعب تقسیم شد. قطعات بافت در محیط کشت DMEM حاوی ۱۰٪ سرم جنین گاوی، صد واحد در میلی‌لیتر پنی‌سیلین و ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر استرپتومایسین (محیط کشت کامل) در اتمسفر مرطوب شده دارای هفت درصد دی‌اکسیدکربن در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد انجام شد. کشت‌های سلول شامل سلول‌های شبه فیبروبلاست و توده‌هایی از سلول‌های گرد و کوچک بود که به صورت ضعیف به سطح فلاسک متصل بودند. محیط کشت فلاسک‌ها هر سه روز یک بار تعویض می‌شد. ما جهت بهبود شرایط رشد سلول از سطوح کشت پوشانده شده از پلی‌لیزین استفاده کردیم. بدین منظور ابتدا سطح ظروف با محلول ۳۰ میکروگرم در میلی‌لیتر پلی‌لیزین به مدت دو ساعت در دمای آزمایشگاه مجاور شد. پس از تخلیه محلول پلی‌لیزین، سطح ظروف با آب خالص استریل شستشو

(Cisplatin)، دوکسوروبی‌سین (Doxorubicin) و سیکلوفوسفامید (Cyclofosfamide) متداول است.^{۵۶} جابه‌جایی در کروموزوم‌های شماره ۱۱ و ۲۲ به صورت (q24,q12) (t(11,22)) در بیش از ۸۵٪ موارد تومورهای یووینگ سارکوما مشاهده شده است. نتیجه جابه‌جایی فوق ادغام ژن EWS مستقر بر کروموزوم شماره ۲۲ با ژن FLI1 مستقر بر کروموزوم شماره ۱۱ است که در نهایت به ایجاد پروتئین نوترکیب EWS-FLI1 می‌انجامد. پروتئین فوق به عنوان فاکتور رونویسی عمل کرده و با رونویسی تعدادی از ژن‌های پایین دست خود بدخیمی را به دنبال دارد.^{۱۹} حضور گلیکو پروتئین غشایی CD99 در ۸۵ تا ۹۰ درصد تومورهای یووینگ سارکوما گزارش شده است که در حال حاضر شاخص اصلی تشخیص پاتولوژیک این تومورها محسوب می‌شود.^{۷۸} بسته به تمایز نورونی حضور انولاز ویژه عصب، نوروفیلامنت، پروتئین s-100، سیناپتوفیزین و CD57 در تومورهای یووینگ سارکوماها محتمل است.^{۹۱۰} همچنین حضور سیتوکراتین‌ها و پروتئین غشاء سلول اپیتelial (EMA) بسته به تمایز اپی‌تلیال در درصدی از این تومورها گزارش شده است.^{۱۱-۱۳} پروتئین ۵۳ کیلودالتونی p53 در غالب فاکتور رونویسی بیان چندین ژن درگیر در رشد سلول و آپوپتوز را تنظیم می‌کند. موتاسیون در ژن p53 و اختلال در عملکرد طبیعی پروتئین مربوطه در انواع تومورها گزارش شده است.^{۱۴} امکان تولید رده‌های سلولی سرطانی از کشت اولیه بافت‌های توموری از اهمیت بسیاری برخوردار است. رده‌های سلولی سرطانی بررسی بیولوژی تومورها را در محیط‌های کشت سلولی امکان‌پذیر ساخته و مطالعه پیرامون دست‌یابی به روش‌های جدید درمانی را تسهیل کرده است. در واقع بخش زیادی از دانش مرتبط با انواع سرطان‌ها، حاصل مطالعه سلول‌های سرطانی در محیط کشت است. تعداد اندکی رده سلولی تولید شده از تومورهای یووینگ سارکوما گزارش شده است.^{۱۵-۱۷} جستجو در بانک سلولی ایالت متحده آمریکا (ATCC)، وجود تنها چهار رده سلولی از یووینگ سارکوما را نشان می‌دهد. بنابراین تولید هرچه بیشتر رده‌های سلولی از این تومورها ارزشمند بوده و بررسی گسترده‌تر روند ایجاد، پیشرفت و پاسخ این تومورها به درمان را فراهم می‌کند. مطالعه حاضر به بررسی ویژگی‌های یک رده سلولی جدید تولید شده از یووینگ سارکوما با نام SS-ES-1 می‌پردازد. ماهیت سلول‌های SS-ES-1 با توجه به حضور پروتئین اسیدی رشته‌ای سلول گلیال Glial

نانویه کونژوگه به بیوتین و در ادامه به مدت ۳۰ دقیقه با streptavidin-HRP مجاور شدند. اسمیر سلولی در صورت نیاز در هر مرحله سه مرتبه با PBS شستشو شد. سپس سلول‌ها به مدت پنج تا ده دقیقه با کروموزن DAB انکوبه شدند.

در پایان پلیت‌ها با آب مقطر به مدت پنج دقیقه (سه مرتبه) شستشو داده شده و رنگ‌آمیزی زمینه با همتوکسیلین به مدت ۱۰ ثانیه انجام گرفت. لایه سلولی پس از شستشو با آب مقطر با چسب مخصوص ایمونوسیتوشیمی پوشانده شد. پلیت‌ها جهت تصویربرداری و جمع‌آوری نتایج نگهداری شدند. تمام مراحل آزمون فوق حداقل پنج بار در پاساژهای ۱۰ تا ۶۵ انجام شد.

بررسی حساسیت رده سلولی SS-ES-1 به داروهای Cisplatin, Doxorubicin, Vincristine Etoposide, Vinblastine: این مرحله با روش سنجش MTT انجام شد.^{۱۸} ابتدا سطح چاهک‌های پلیت ۹۶ حفره‌ای با ۷۰ میکرولیتر از محلول ۳۰ میکروگرم در میلی‌لیتر پلی‌لیزین به مدت یک ساعت مجاور شده و سپس شستشو و خشک شد. سپس سوسپانسیون سلولی معادل 1×10^6 سلول در میلی‌لیتر از کشت‌های در فاز رشد و تکثیر تهیه شد. ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون درون هر چاهک ریخته شد و پلیت به مدت یک شب انکوبه گردید. به چاهک‌های حاشیه پلیت آب مقطر استریل افزوده شد. پس از اتمام انکوباسیون، رقت‌های لگاریتمی داروها در محیط کشت تهیه شد. سپس ۵۰ میکرولیتر از هر رقت دارو به شش چاهک پلیت وارد شد. بدین ترتیب غلظت نهایی داروها به ترتیبی که در نمودار ۱ رسم شده است تنظیم گردید. برای کنترل رشد سلول، ۵۰ میکرولیتر محیط کشت کامل به شش چاهک پلیت افزوده شد. پلیت به مدت ۷۲ ساعت دیگر در شرایط استاندارد انکوبه شد. پس از پایان انکوباسیون، ۳۰ میکرولیتر محلول MTT به هر چاهک اضافه شده و به آرامی تخلیه شده و فورمازان راسب شده در ۱۰۰ میکرولیتر DMSO به صورت کامل حل شد. سپس شدت رنگ چاهک‌ها با دستگاه ثبت الیزا در طول موج ۴۹۲ نانومتر تعیین شد. تمام مراحل آزمون حداقل سه بار تکرار شد.

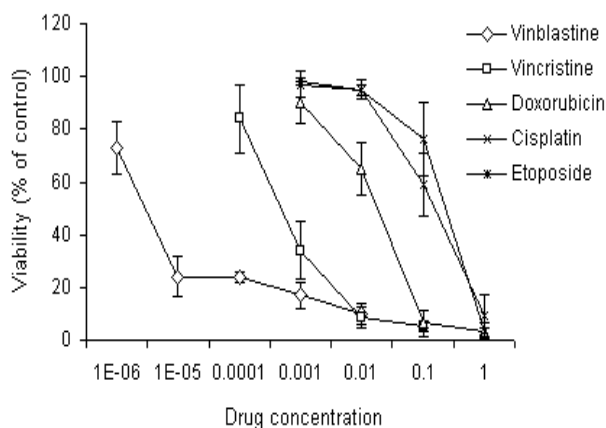
یافته‌ها

خصوصیات مورفولوژیکی و دینامیکی سلول‌ها: شرایط بهینه رشد سلول‌های SS-ES-1 در محیط کشت DMEM کامل با استفاده از

کشت سلول‌های SS-ES-1 در مرحله‌ای که ۹۰٪ سطح را می‌پوشاندند به وسیله محلول تریپسین ۰/۲ درصد به نسبت یک به پنج واگشت می‌شدند. سلول‌های SS-ES-1 در مدت ۱۷ ماه کشت مداوم بیش از ۹۰ مرتبه در محیط‌های کشت، واگشت شدند. بخشی از سلول‌ها در هر واگشت در محیط کشت کامل حاوی ۱۰٪ DMSO در ازت مایع ذخیره شدند.

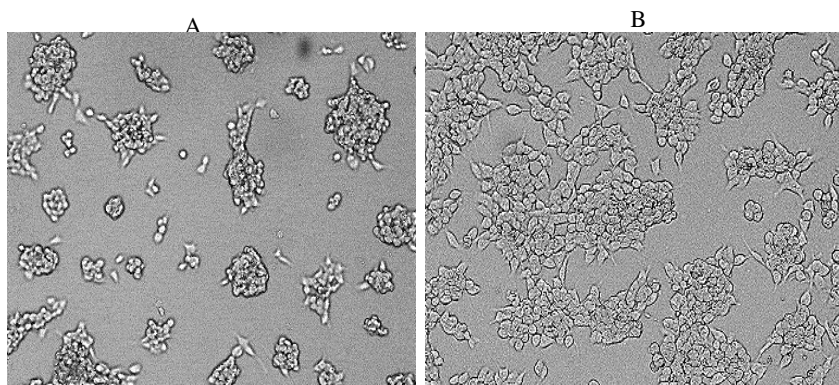
مطالعه ایمونوسیتوشیمی رده سلولی SS-ES-1: حضور پروتئین‌های GFAP, Ki67, p53, Nuro فیلامنت و سیتوکراتین در سلول‌های SS-ES-1 با روش Avidin-biotin Immunoperoxidase بررسی شد. آنتی‌بادی‌ها و کیت ایمونوسیتوشیمی از کمپانی DAKO دانمارک خریداری شدند. بدین منظور ابتدا مرکز پلیت‌های ۳۵ میلی‌متری با دایره‌ای به قطر یک سانتیمتر در پشت آنها مشخص شد. سپس مرکز پلیت با ۲۰۰ میکرولیتر از محلول ۳۰ میکروگرم در میلی‌لیتر پلی‌لیزین به مدت یک ساعت مجاور شد. پس از یک ساعت پلی‌لیزین تخلیه شده و مرکز پلیت با آب مقطر استریل شستشو شد و پلیت‌ها به مدت دو ساعت برای خشک شدن سطح مورد نظر در دمای اتاق نگهداری شدند. سپس سوسپانسیون سلولی معادل یک میلیون سلول در میلی‌لیتر در محیط کشت کامل تهیه شد. ۲۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون به مرکز پلیت‌ها ریخته شد و پلیت‌ها تا زمان چسبیدن سلول‌ها به سطح به مدت شش ساعت در شرایط استاندارد انکوبه شدند. آنگاه ۱/۵ میلی‌لیتر محیط کشت کامل به پلیت‌ها اضافه شده و پلیت‌ها به مدت ۴۲ ساعت انکوبه شدند. پس از پایان انکوباسیون لایه سلول پس از شستشو با PBS با متانول سرد حاوی ۳٪ استون به مدت ۱۰ دقیقه فیکس شد. اسمیر سلولی در ادامه به مدت ۱۵ دقیقه با آلبومین سرم گاوی ۲٪ پوشانده شد. پس از تخلیه آلبومین، اسمیر سلولی با آنتی‌بادی‌های منوکلونال سیتوکراتین (۱۰۰-۱)، نورو فیلامنت (رقیق شده برای استفاده به وسیله کمپانی سازنده)، GFAP (۱۰۰-۱)، p53 (۱۰۰-۱) و Ki67 (۱۰۰-۱) به مدت یک شب در دمای چهار درجه سانتیگراد انکوبه شدند. لایه سلولی در کنترل منفی به جای انکوباسیون با آنتی‌بادی اختصاصی اولیه با PBS انکوبه شد. پس از پایان انکوباسیون آزمون ایمونوسیتوشیمی به روش Avidin-biotin Immunoperoxidase با توجه به دستورالعمل کارخانه سازنده کیت انجام شد. بدین ترتیب که سلول‌ها به مدت ۳۰ دقیقه با پراکسید هیدروژن، سپس به مدت نیم ساعت با آنتی‌بادی

حضور برجسته پروتئین p53 را در هسته صد درصد سلول‌های رنگ‌آمیزی شده نشان داد (شکل 2E). پروتئین GFAP در صد درصد از سلول‌های رنگ‌آمیزی شده مشاهده نشد (شکل نشان داده نشده است). کنترل منفی در تمام آزمون‌ها هیچ گونه رنگ‌آمیزی اختصاصی ایمنوسیتوشیمی را نشان نداد. آزمون‌های ایمنوسیتوشیمی حداقل پنج بار در پاساژهای مختلف تکرار شدند و نتایج مشابهی مشاهده گردید. حساسیت سلول‌های SS-ES-1 به داروهای Vinblastine, Cisplatin, Doxorubicin, Vincristine, Etoposide: حساسیت رده سلولی SS-ES-1 به پنج داروی ضد توموری Cisplatin, Doxorubicin, Etoposide, Vincristine و Vinblastine با روش MTT assay بررسی

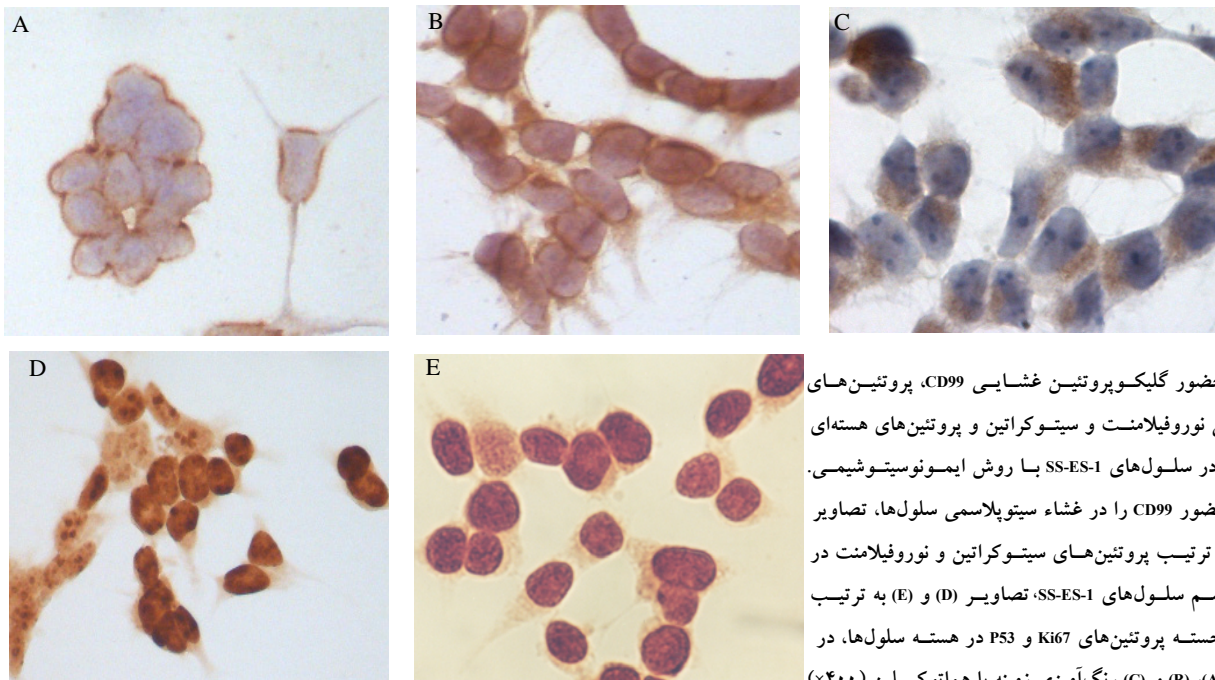


نمودار - ۱: حساسیت سلول‌های SS-ES-1 به داروهای ضد توموری، حساسیت سلول‌های SS-ES-1 به داروهای وین‌بلاستین، وین‌کریستین، دوکسوروبیسین، سیس‌پلاتین و اتوپوزاید با روش MTT بررسی شد. سلول‌های SS-ES-1 بیشترین حساسیت را به وین‌بلاستین نشان دادند و وین‌کریستین، دوکسوروبیسین، سیس‌پلاتین و اتوپوزاید در مراتب بعدی فعالیت سائوتوکسیک قرار گرفتند.

ظروف پوشیده شده با پلی‌لیزین مشاهده شد. سلول‌ها در این حالت به صورت چند لایه تا مرحله پوشاندن تمامی سطح کشت رشد می‌کردند (شکل 1A)، در صورتی که بدون استفاده از پلی‌لیزین سلول‌ها به صورت توده‌های فشرده با اتصال ضعیف به سطح تکثیر می‌شدند (شکل 1B). مورفولوژی سلول‌های SS-ES-1 در ظروف کشت پوشیده شده با پلی‌لیزین به شکل دوکی تا هرمی بود، در حالی که هسته حدود سه چهارم از حجم سلول را تشکیل می‌داد. بین دو تا سه میلیون سلول (۳۰۰ تا ۴۰۰ هزار سلول در میلی‌لیتر) در هر بار واکشت در هر فلاسک ۲۵ سانتی‌متر مربع کشت می‌شد و پس از پنج روز ۱۴ تا ۱۸ میلیون سلول از هر فلاسک به دست می‌آمد. به دنبال واکشت‌های متعدد تغییری در مورفولوژی سلول‌ها مشاهده نشد و تاکنون رده سلولی SS-ES-1 توانایی رشد و تکثیر را تا بیش از ۹۰ واکشت متوالی حفظ کرده است. درصد سلول‌های زنده در هر بار واکشت توسط تریپسین بیش از ۹۵٪ بود، که این امر امکان تکثیر و استفاده از این سلول‌ها را به خوبی امکان‌پذیر می‌کرد. ذخیره و انجماد سلول‌ها با تعداد ۲/۵ میلیون سلول در حجم ۰/۵ میلی‌لیتر محیط انجماد در هر ویال انجام گرفت و پس از خارج کردن از انجماد رنگ‌آمیزی با رنگ تریپان بلو بقاء بیش از ۹۰٪ از سلول‌ها را نشان داد. نتایج ایمنوسیتوشیمی: نتایج آزمون‌های ایمنوسیتوشیمی از طریق بررسی ۵۰۰ سلول در میدان‌های مختلف دید میکروسکوپ با درشت‌نمایی هزار برابر جمع‌آوری شد. ^{۱۹} گلیکوپروتئین غشایی CD99 در غشاء سلولی صد درصد از سلول‌ها مشاهده شد (شکل 2A). پروتئین سیتوکراتین در سیتوپلاسم بیش از ۹۵٪ از سلول‌ها مشاهده شد (شکل 2B). حضور پروتئین نوروفیلانت در سیتوپلاسم بیش از ۹۰ درصد سلول‌ها اثبات شد (شکل 2C). پروتئین هسته‌ای Ki67 در هسته صد درصد از سلول‌های رنگ‌آمیزی شده مشاهده شد (شکل 2D). نتایج



شکل - ۱: مورفولوژی سلول‌های SS-ES-1 در محیط کشت: شکل (A) مورفولوژی و نحوه رشد سلول‌ها را در ظرف کشت معمولی نشان می‌دهد. سلول‌ها در این وضعیت به صورت توده‌های سلولی گرد و کوچک که با اتصال ضعیف به سطح کشت متصل بودند مشاهده می‌شدند. شکل (B) مورفولوژی و نحوه رشد سلول‌ها را در فلاسک‌های پوشیده شده با پلی‌لیزین نشان می‌دهد. سلول‌ها در این وضعیت به صورت چسبیده به سطح به اشکال دوکی شکل تا هرمی شکل مشاهده می‌شدند. بزرگ‌نمایی ۱۰۰ برابر



شکل - ۲: حضور گلیکوپروتئین غشایی CD99، پروتئین‌های سیتوپلاسمی نوروفیلانمنت و سیتوکراتین و پروتئین‌های هسته‌ای P53 و Ki67 در سلول‌های SS-ES-1 با روش ایمونوسیتوشیمی. شکل (A) حضور CD99 را در غشاء سیتوپلاسمی سلول‌ها، تصاویر (B) و (C) به ترتیب پروتئین‌های سیتوکراتین و نوروفیلانمنت در سیتوپلاسم سلول‌های SS-ES-1، تصاویر (D) و (E) به ترتیب حضور برجسته پروتئین‌های Ki67 و P53 در هسته سلول‌ها، در تصاویر (A)، (B) و (C) رنگ‌آمیزی زمینه با هماتوکسیلین ($\times 400$)

شرح داد.^{۲۰} محققین دیگر موارد متعددی از تومورهای بافت‌های نرم دیواره قفسه سینه و ریه بیماران معمولاً زیر ۲۰ سال را گزارش کردند.^{۲۱-۲۳} این گروه از تومورها که با نام تومورهای Askin نیز شناخته می‌شوند، با توجه به ویژگی‌های مورفولوژیکی، ایمونوفنوتیپی و ترانسسلوکاسیون (q24,q12) (t(11, 22) در خانواده تومورهای یووینگ سارکوما قرار می‌گیرند.^{۱-۳} تعداد اندکی رده سلولی تولید شده از تومورهای Askin گزارش شده است.^{۱۶,۲۴}

در مطالعه حاضر ویژگی‌های مورفولوژی و سیتولوژی یک رده سلولی جدید تولید شده از تومور یووینگ سارکوما با نام SS-ES-1 بررسی شد. تصاویر رادیولوژی موقعیت تومور را درون قفسه سینه و متصل به قله ریه بیمار نشان داد. برای منشأ تومور فوق دو وضعیت مختلف مطرح می‌شود. تومور ممکن است از بافت استخوان بیمار و یا از بافت‌های نرم مجاور منشأ گرفته باشد. یووینگ سارکوما استخوانی و خارج استخوانی از نظر هیستوپاتولوژیکی متفاوت نیستند، با این حال نوع استخوانی تومور با تغییر شکل و تخریب بافت استخوان درگیر شده همراه است که در تصاویر رادیولوژی قابل تشخیص است.^{۲۵} در مطالعه حاضر با توجه به اینکه تصاویر رادیولوژی تغییر شکل یا تخریب استخوان‌های مجاور تومور را نشان نداده است، احتمالاً منشأ تومور از ریه یا بافت‌های نرم مجاور بوده

شد. داروی Vinblastine بیشترین سمیت را بر سلول‌های SS-ES-1 نشان داد، به صورتی که رشد سلول در غلظت‌های ۱۰ و ۱ میکروگرم در میلی‌لیتر این دارو به ترتیب ۷۶ و ۲۷٪ نسبت به کنترل کاهش یافت ($IC_{50}=2\pm 0/\text{picomole}$) (نمودار ۱). داروی Vincristine در مرتبه دوم فعالیت سائیتونوکسیک قرار گرفت به نحوی که در غلظت‌های ۱، ۱۰، ۱ و ۰/۱ نانوگرم در میلی‌لیتر دارو رشد سلول به ترتیب ۹۰، ۷۲ و ۱۶ درصد کاهش یافت ($IC_{50}=0/3\pm 0/12\text{nM}$). داروی Doxorubicin در مرتبه سوم فعالیت قرار گرفت به نحوی که مجاورت با ۰/۱ و ۰/۱ میکروگرم در میلی‌لیتر رشد سلول‌های SS-ES-1 را به ترتیب ۹۳/۵ و ۳۸ درصد نسبت به کنترل کاهش داد ($IC_{50}=0/05\pm 0/03\mu\text{M}$). رشد سلول‌های SS-ES-1 در مجاورت با ۱ و ۰/۱ میکروگرم در میلی‌لیتر Cisplatin ۸۶ و ۲۶ درصد کاهش یافت ($IC_{50}=0/67\pm 0/45\mu\text{M}$). همچنین داروی Etoposide سمیت سلولی مشابه با Cisplatin بر سلول‌های SS-ES-1 اعمال کرد ($IC_{50}=0/64\pm 0/28\mu\text{M}$).

بحث

Askin برای نخستین بار گروهی از تومورهای قفسه سینه را که از سلول‌های بدخیم گرد و کوچک و تمایز نیافته تشکیل شده بودند،

p53 را نشان می‌دهند، گزارش کردند.^{۳۲} همچنین، محققین دیگر با استفاده از آنتی‌بادی DO7 بیان افزایش یافته p53 را در ۱۶ تومور از ۳۷ تومور یووینگ سارکوما نشان دادند.^{۱۹} جالب توجه اینکه در هر سه مطالعه بیان افزایش یافته پروتئین p53 با عود سریع تومور، عدم پاسخ مناسب به درمان و کاهش طول عمر بیمار همراه بوده است. بیمار مطالعه ما علی‌رغم جراحی و در ادامه چندین نوبت پرتو درمانی و شیمی درمانی، شش ماه پس از اولین مراجعه فوت شد. بنابراین ما با توجه به نتایج محققین دیگر عدم عملکرد طبیعی پروتئین p53 را با عدم پاسخ بیمار مطالعه حاضر به درمان و پیشرفت سریع تومور مرتبط می‌دانیم. شیمی درمانی از راهکارهای اصلی درمان تومورهای یووینگ سارکوما است. بنابراین ما از نقطه نظر کلینیکی حساسیت سلول‌های SS-ES-1 را به طیف وسیعی از داروهای شیمی درمانی سرطان بررسی کردیم. داروها با توجه به استفاده برای درمان تومورهای یووینگ سارکوما و گوناگونی مکانیسم عمل انتخاب شدند. آلکالوئیدهای Vinblastine و Vincristine از طریق ممانعت از پلیمریزاسیون میکروتوبول‌ها سلول‌های میتوتیک را هدف قرار می‌دهند. سمیت سلولی داروهای Etoposide, Doxorubicin و Cisplatin از طریق آسیب به DNA اعمال می‌شود.

سلول‌های SS-ES-1 حساسیت قابل توجهی در حد پیکوگرم در میلی‌لیتر به داروی Vinblastine نشان دادند. داروی Vincristine در مرتبه دوم فعالیت سایتوتوکسیک قرار گرفت و در ادامه Etoposide, Doxorubicin و Cisplatin به ترتیب بیشترین فعالیت سایتوتوکسیک را در برابر سلول‌های SS-ES-1 نشان دادند. گروهی از محققین مکانیسم مولکولی فعالیت سه داروی Vinblastine, Doxorubicin و Etoposide را در کشت سلول‌های KB-3 بررسی کردند.^{۳۳} در مطالعه فوق، فعالیت طبیعی پروتئین p53 سمیت داروهای Doxorubicin و Etoposide را افزایش داده است، به نحوی که همزمان با غیر فعال کردن p53 فعالیت این داروها کاهش یافته است. جالب توجه اینکه در همین مطالعه، فعالیت پروتئین p53 سمیت Vinblastine را کاهش داده و همزمان با غیر فعال کردن این پروتئین سمیت دارو افزایش یافته است. بنابراین با توجه به نتایج تحقیق فوق، حساسیت قابل توجه سلول‌های SS-ES-1 به Vinblastine و مقاومت نسبی این سلول‌ها به داروهای Etoposide و Cisplatin را می‌توان به دلیل عدم عملکرد طبیعی p53 دانست. نتایج مطالعه حاضر رده سلولی

است. حضور بالای پروتئین غشایی CD99 در بیش از ۹۵ درصد از تومورهای یووینگ سارکوما گزارش شده است.^{۷،۸} بنابراین پروتئین فوق به عنوان یکی از شاخص‌های اصلی برای تشخیص این نوع از تومورها مطرح است. نتایج ما حضور بالای CD99 را در غشاء سلول‌های SS-ES-1 نشان داد.

همانگ با نتایج ما محققین بیان CD99 را در رده‌های سلولی تولید شده از تومورهای یووینگ سارکوما گزارش کرده‌اند.^{۲۶} سیتوکراتین و نوروفیلانمنت از پروتئین‌های ساختمانی سلول‌های اپیتلیال و عصبی هستند که در تشخیص پاتولوژیک این سلول‌ها کاربرد دارند. نتایج ما بیان سیتوکراتین و نوروفیلانمنت را در رده سلولی SS-ES-1 نشان داد که منشأ نوروپیتلیال این سلول‌ها را مشخص می‌کند. همچنین سلول‌های SS-ES-1 در محیط کشت با گسترش نوریت‌های سلولی تمایز نوری را نشان دادند. تومورهای pNET با ویژگی‌های نوری نظیر تمایز نوروکتودرمال، وجود نوریت‌های عصبی و بیان مارکرهای نوری مانند نوروفیلانمنت‌ها از خانواده تومورهای یووینگ سارکوما مشخص می‌شوند.^{۲۷}

همانگ با نتایج ما محققین حضور شاخص‌های مولکولی اپیتلیالی و نوری نظیر سیتوکراتین و نوروفیلانمنت را در رده‌های سلولی تولید شده از تومورهای یووینگ سارکوما گزارش کردند.^{۲۹،۲۸} Ki67، پروتئین ناپایدار هسته‌ای غیر هیستونی است. پروتئین فوق در سلول‌های که وارد مرحله تکثیر می‌شوند در اواسط فاز G1 سیکل سلولی ظاهر می‌شود و در فازهای S و G2 بیان آن افزایش یافته و در فاز M به حداکثر می‌رسد.

پروتئین Ki67 در انتهای فاز M به سرعت تجزیه می‌شود به ترتیبی که در فازهای G0 و ابتدای G1 غیرقابل تشخیص می‌شود. ویژگی‌های فوق پروتئین Ki67 را به عنوان شاخص مهم برای ارزیابی قابلیت رشد و تکثیر سلولی مطرح کرده است.^{۳۰} نتایج ما حضور برجسته Ki67 را در هسته سلول‌های SS-ES-1 نشان داد که قابلیت بالای رشد و تکثیر این سلول‌ها را نشان می‌دهد. آنتی‌بادی مونوکلونال DO7 بیان بالای پروتئین p53 را در هسته سلول‌های SS-ES-1 نشان داد. همانگ با این نتایج، یک گروه از محققین با استفاده از آنتی‌بادی DO7 بیان افزایش یافته p53 را در شش تومور از ۵۵ تومور یووینگ سارکوما نشان دادند.^{۳۱} همین گروه در مطالعه دیگر شکل موتاسیون یافته p53 را در تومورهایی که بیان بالای پروتئین

به امکان ذخیره‌سازی و واکشت مطلوب می‌تواند به عنوان یک ابزار مطالعاتی پیرامون بیولوژی تومورهای یوئینگ سارکوما مطرح شود. مطالعات تکمیلی ملکولی و سیتوژنتیک برای شناسایی کامل‌تر و دقیق‌تر این رده سلولی در حال انجام است.

SS-ES-1 را رده سلولی پایدار از خانواده تومورهای یوئینگ سارکوما معرفی می‌کند. در این مطالعه، برخی از خصوصیات سیتولوژیک و حساسیت دارویی سلول‌های SS-ES-1 بررسی شد که گامی اولیه در شناسایی این سلول‌ها به شمار می‌رود. رده سلولی SS-ES-1 با توجه

References

- Riggi N, Stamenkovic I. The Biology of Ewing sarcoma. *Cancer Lett* 2007; 254: 1-10.
- de Alava E, Gerald WL. Molecular biology of the Ewing's sarcoma/primitive neuroectodermal tumor family. *J Clin Oncol* 2000; 18: 204-13.
- Carvajal R, Meyers P. Ewing's sarcoma and primitive neuroectodermal family of tumors. *Hematol Oncol Clin North Am* 2005; 19: 501-25.
- Carpentieri DF, Qualman SJ, Bowen J, Krausz T, Marchevsky A, Dickman PS; Cancer Committee, College of American Pathologists. Protocol for the examination of specimens from pediatric and adult patients with osseous and extraosseous ewing sarcoma family of tumors, including peripheral primitive neuroectodermal tumor and ewing sarcoma. *Arch Pathol Lab Med* 2005; 129: 866-73.
- Bacci G, Ferrari S, Longhi A, Donati D, De Paolis M, Forni C, et al. Therapy and survival after recurrence of Ewing's tumors: the Rizzoli experience in 195 patients treated with adjuvant and neoadjuvant chemotherapy from 1979 to 1997. *Ann Oncol* 2003; 14: 1654-9.
- Pinkerton CR, Bataillard A, Guillo S, Oberlin O, Fervers B, Philip T. Treatment strategies for metastatic Ewing's sarcoma. *Eur J Cancer* 2001; 37: 1338-44.
- Ambros IM, Ambros PF, Strehl S, Kovar H, Gadner H, Salzer-Kuntschik M. MIC2 is a specific marker for Ewing's sarcoma and peripheral primitive neuroectodermal tumors. Evidence for a common histogenesis of Ewing's sarcoma and peripheral primitive neuroectodermal tumors from MIC2 expression and specific chromosome aberration. *Cancer* 1991; 67: 1886-93.
- Perلمان EJ, Dickman PS, Askin FB, Grier HE, Miser JS, Link MP. Ewing's sarcoma: routine diagnostic utilization of MIC2 analysis: a Pediatric Oncology Group/Children's Cancer Group Intergroup Study. *Hum Pathol* 1994; 25: 304-7.
- Linnoila RI, Tsokos M, Triche TJ, Marangos PJ, Chandra RS. Evidence for neural origin and PAS-positive variants of the malignant small cell tumor of thoracopulmonary region ("Askin tumor"). *Am J Surg Pathol* 1986; 10: 124-33.
- Fletcher CDM, Unni K, Mertens F. World Health Organization Classification of Tumors: Pathology and Genetics of Tumors of Soft Tissue and Bone, 2003.
- Srivastava A, Rosenberg AE, Selig M, Rubin BP, Nielsen GP. Keratin-positive Ewing's sarcoma: an ultrastructural study of 12 cases. *Int J Surg Pathol* 2005; 13: 43-50.
- Gu M, Antonescu CR, Guiter G, Huvos AG, Ladanyi M, Zakowski MF. Cytokeratin immunoreactivity in Ewing's sarcoma: prevalence in 50 cases confirmed by molecular diagnostic studies. *Am J Surg Pathol* 2000; 24: 410-6.
- Vakar-López F, Ayala AG, Raymond AK, Czerniak B. Epithelial Phenotype in Ewing's Sarcoma/Primitive Neuroectodermal Tumor. *Int J Surg Pathol* 2000; 8: 59-65.
- Fuster JJ, Sanz-González SM, Moll UM, Andrés V. Classic and novel roles of p53: prospects for anticancer therapy. *Trends Mol Med* 2007; 13: 192-9.
- Homma C, Kaneko Y, Sekine K, Hara S, Hata J, Sakurai M. Establishment and characterization of a small round cell sarcoma cell line, SCCH-196, with t(11;22)(q24;q12). *Jpn J Cancer Res* 1989; 80: 861-5.
- Moritake H, Sugimoto T, Kuroda H, Hidaka F, Takahashi Y, Tsuneyoshi M, et al. Newly established Askin tumor cell line and overexpression of focal adhesion kinase in Ewing sarcoma family of tumors cell lines. *Cancer Genet Cytogenet* 2003; 146: 102-9.
- Metwaly H, Cheng J, Maruyama S, Ohshiro K, Suzuki I, Hoshina Y, et al. Establishment and characterization of new cell lines derived from melanotic neuroectodermal tumor of infancy arising in the mandible. *Pathol Int* 2005; 55: 331-42.
- Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 1983; 65: 55-63.
- Amir G, Issakov J, Meller I, Sucher E, Peyser A, Cohen II, et al. Expression of p53 gene product and cell proliferation marker Ki-67 in Ewing's sarcoma: correlation with clinical outcome. *Hum Pathol* 2002; 33: 170-4.
- Askin FB, Rosai J, Sibley RK, Dehner LP, McAlister WH. Malignant small cell tumor of the thoracopulmonary region in childhood: a distinctive clinicopathologic entity of uncertain histogenesis. *Cancer* 1979; 43: 2438-51.
- Manshani N, Jones M, Graham A, Davis R. Peripheral primitive neuroectodermal tumour of the pleura: case report and literature review. *Int J Clin Pract* 2007; [Epub ahead of print].
- Tsuji S, Hisaoka M, Morimitsu Y, Hashimoto H, Jimi A, Watanabe J, et al. Peripheral primitive neuroectodermal tumour of the lung: report of two cases. *Histopathology* 1998; 33: 369-74.
- Takagi-Takahashi Y, Shijubo N, Yamada G, Saitoh E, Sawada K, Ohnishi T, et al. Peripheral primitive neuroectodermal tumor of the chest wall of a 69-year-old man. *Intern Med* 2004; 43: 578-81.
- Fujii Y, Hongo T, Nakagawa Y, Nasuda K, Mizuno Y, Igarashi Y, et al. Cell culture of small round cell tumor originating in the thoracopulmonary region. Evidence for derivation from a primitive pluripotent cell. *Cancer* 1989; 64: 43-51.
- Kodama K, Doi O, Higashiyama M, Mori Y, Horai T, Tateishi R, et al. Establishment and characterization of a new Ewing's sarcoma cell line. *Cancer Genet Cytogenet* 1991; 57: 19-30.
- Hatori M, Doi H, Watanabe M, Sasano H, Hosaka M, Kotajima S, et al. Establishment and characterization of a clonal human extraskeletal Ewing's sarcoma cell line, EES1. *Tohoku J Exp Med* 2006; 210: 221-30.
- Hara S, Adachi Y, Kaneko Y, Fujimoto J, Hata J. Evidence for heterogeneous groups of neuronal differentiation of Ewing's sarcoma. *Br J Cancer* 1991; 64: 1025-30.
- Fukushige T, Nagoshi M, Hachitanda Y, Ueno T, Zaizen Y, Suita S, et al. Establishment and characterization of a cell line of congenital primitive neuroectodermal tumor of soft tissue. *Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol* 1992; 62: 159-66.
- Llombart-Bosch A, Carda C, Peydro-Olaya A, Noguera R, Perez-Bacete M, Pellin A, et al. Soft tissue Ewing's sarcoma. Characterization in established cultures and xenografts with evidence of a neuroectodermic phenotype. *Cancer* 1990; 66: 2589-601.
- Gerdes J, Lemke H, Baisch H, Wacker HH, Schwab U, Stein H. Cell cycle analysis of a cell proliferation-associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody Ki-67. *J Immunol* 1984; 133: 1710-5.

31. de Alava E, Antonescu CR, Panizo A, Leung D, Meyers PA, Huvos AG, et al. Prognostic impact of P53 status in Ewing sarcoma. *Cancer* 2000; 89: 783-92.
32. Huang HY, Illei PB, Zhao Z, Mazumdar M, Huvos AG, Healey JH, et al. Ewing sarcomas with p53 mutation or p16/p14ARF homozygous deletion: a highly lethal subset associated with poor chemoresponse. *J Clin Oncol* 2005; 23: 548-58.
33. Brantley-Finley C, Lyle CS, Du L, Goodwin ME, Hall T, Szwedo D, et al. The JNK, ERK and p53 pathways play distinct roles in apoptosis mediated by the antitumor agents vinblastine, doxorubicin, and etoposide. *Biochem Pharmacol* 2003; 66: 459-69.

Establishment, characterization and drug sensitivity of a new Ewing's sarcoma cell line (SS-ES-1)

Abstract

Badinloo M^{1,3}
Rajabalian S^{2*}
Pooraboli I¹
Eskandari H²
Jangi- Aghdam H²
Horri M⁴

1-Department of Biology,
Faculty of Basic Sciences,
Shahid Bahonar University of
Kerman

2- Kerman Neuroscience
Research Center, Kerman
University of Medical Sciences

3- Kerman Physiology
Research Center, Kerman
University of Medical Sciences
4- Shahid Bahonar Hospital of
Kerman

Background: Ewing's sarcoma is one of the most malignant tumors in children and young adults. Only a few established cell lines of Ewing's sarcoma have been reported, which makes it difficult to study the biological features of these tumors. We have recently established a new Ewing's sarcoma cell line designated SS-ES-1, originating from a thoracic tumor of a 16-year-old female patient. The SS-ES-1 cells have been grown continuously in culture for over 90 passages. In this report, some characteristics of SS-ES-1 cells are presented.

Methods: The cells were grown in DMEM medium supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS), 100 µg/ml streptomycin and 100 U/ml penicillin in a humidified atmosphere with 7% CO₂ at 37 °C. The cells were immunocytochemically characterized using a panel of monoclonal and polyclonal antibodies. Furthermore, the chemo-sensitivity of this cell line to some anticancer drugs was assessed using MTT assay and IC₅₀ values were determined.

Results: Morphologically, the SS-ES-1 cell line is composed of poorly differentiated small round cells growing in a multilayer pattern. The immunocytochemical staining demonstrates strong reactivity to CD99, cytokeratin, neurofilament, p53 and Ki67 proteins, but no reactivity to GFAP. Based on IC₅₀ values, SS-ES-1 cells display considerable sensitivity to vinblastine (2±0.7 pM), followed by vincristine (0.3±0.12 nM), doxorubicin (0.05±0.03 µM), etoposide (0.64±0.28 µM) and cisplatin (0.67±0.45 µM).

Conclusions: In conclusion, the SS-ES-1 cell line demonstrates unique cellular properties, which make it a useful model for studying various aspects of the biology of Ewing's sarcoma.

Keywords: Ewing's sarcoma, cell line, cytokeratin, neurofilament, CD99, P53

*Corresponding author: Kerman,
Tahmasb Abad Crossroads, Kerman
Neuroscience Research Center
Tel: +913-1999536
email: Srajabalian@yahoo.com