انتقال هدفمند عوامل درمانی به سلول‌های تومور پستان در موش‌های BALB/c با استفاده از باکتری

نیلوفر حسینی گیو[۱]، احمد رضا بهرامی [۱،۲،۳]، مریم مقدم متین[۱،۲،۳]*

۱. گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران
۲. گروه پژوهشی تشخیص‌ها و درمان‌های نوین، پژوهشکده فناوری زیستی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران
۳. گروه پژوهشی سلول‌های بنیادی و پزشکی بازساختی، سازمان جهاد دانشگاهی خراسان رضوی، مشهد، ایران

E. mail: hosseinigiv@mail.um.ac.ir

چکیده

یکی از مشکلات پیش روی عمده‌ی روش‌های درمانی رایج سرطان، عدم اختصاصیت آن‌ها برای تومور می‌باشد. بنابراین نیاز روز افزون به روش‌های جدیدی برای غلبه بر این مشکل حس می‌شود. در این روش‌ها تحویل اختصاصی دارو یا ژن مورد نظر به سلول‌های تومور با بهره‌گیری از حامل‌های خاص انجام می‌شود. یکی از رایج‌ترین حامل‌ها، باکتری‌ها می‌باشند که به علت دست‌ورزی آسان، استفاده از آن‌ها درحال گسترش است. حامل‌های باکتریایی باید قادر به رشد و تجمع اختصاصی در تومور باشند.

در پژوهش پیش‌رو، از سویه‌ی *E. coli* DH5α به منظور تحویل ژن مورد نظر به تومور استفاده می‌شود. به این منظور برای ردیابی باکتری، خوشه‌ی ژنی lux CDABE با استفاده از پلاسمید وارد باکتری می‌شود. با بیان این کاست ژنی، آنزیم لوسیفراز حاصل باعث اکسید شدن لوسیفرین شده و در نتیجه نور لومینسانس قابل ردگیری ایجاد می‌نماید. به منظور القای سرطان پستان، سلول‌های 4T1 به صورت زیر پوستی به موش‌های BALB/c ماده تزریق شدند. در ادامه پس از ایجاد تومور، باکتری نوترکیب از طریق سیاهرگ دمی تزریق شده و در روز ۴ بعد از تزریق باکتری، موش‌ها قربانی و هوموژنای بافتی تهیه گردید. به منظور بررسی نشر لومینسانس هوموژنای بافتی حاصل، دستگاه لومینومتر مورد استفاده قرار گرفت.

میزان نشر لومینسانس هوموژنای حاصل از تومور نزدیک به ۱۱۰۰۰ برابر بیشتر از طحال، معده، کلیه، روده‌ی باریک، کولون و کبد بود. روش مورد استفاده تجمع اختصاصی باکتری *E. coli DH5α* نوترکیب در سلول‌های تومور پستان را تایید می‌نماید. این ویژگی می‌تواند در مطالعات آینده به منظور تحویل هدفمند دارو یا ژن مورد نظر به محل تومور و کاهش سمّیت غیر اختصاصی این عوامل مورد استفاده قرار گیرد.

کلمات کلیدی: سرطان پستان، هوموژنای بافتی، موش BALB/c، باکتری *E. coli* DH5α

مقدمه

سرطان یکی از شایع ترین بیماری‌هاست که سالانه باعث مرگ بسیاری از افراد می‌شود. بر اساس آمارهای سال ۲۰۱۸ GLOBOCAN شایع‌ترین سرطان در هر دو جنس سرطان ریه بوده و در رتبه‌ی بعدی سرطان پستان قرار دارد. از ابتدای شناخت بیماری سرطان، در طول تاریخ و در جوامع مختلف تلاش‌های بسیاری در جهت درمان این بیماری صورت گرفته است. عمده‌ی درمان‌های رایج در کنار مزایای موجود، به علت اختصاصیت پایینی که دارند منجر به ایجاد سمّیت برای بافت-های سالم می‌شوند و در نتیجه میزان دوز قابل استفاده و کارآیی روش‌درمانی با محدودیت روبرو خواهد بود. بنابراین یافتن روشی که عامل درمانی را به طور اختصاصی به محل تومور تحویل می‌دهد و کمترین میزان سمّیت برای بافت‌های سالم را به همراه دارد، ضروری به نظر می‌رسد (۶). اولین بار حدود ۱۵۰ سال پیش توانایی باکتری‌ها در حمله به تومورها و آلوده نمودن آن‌ها مشاهده شد. ویلیام کولی[1] تلاش زیادی در زمینه‌ی استفاده از باکتری‌ها در درمان سرطان انجام داد (۴). بافت تومور ویژگی‌های خاصی دارد که باعث تمایز آن از بافت سالم می‌شود. برخی از این ویژگی‌ها شرایط مناسب را برای رشد باکتری در تومور فراهم می‌نمایند. به عنوان مثال، ریزمحیط[2] اطراف تومور که از آن در برابر عوامل کشنده محافظت می‌کند به نقطه‌ی ضعفی در برابر باکتری‌ها تبدیل شده است. تجمع اختصاصی بعضی باکتری‌ها در بافت تومور مورد بررسی قرار گرفته است؛ به عنوان مثال، برخی مطالعات تجمع اختصاصی سویه‌ی VNP20009 باکتری *Salmonella* در ناحیه‌ی توموری را گزارش داده‌اند (۸-۶). به مرور با رشد تومور میزان اکسیژن در مرکز آن کاهش می‌یابد و مناطق هیپوکسی[3] در آن نواحی ایجاد می-شود. در مرحله‌ی بعد برای اکسیژن رسانی به مرکز تومور، عمل رگ‌زایی تحریک می‌شود. رگ‌های جدید ایجاد شده ساختار و عملکرد غیر عادی داشته و به این صورت تحویل دارو و انتقال سلول‌های ایمنی به محل تومور با مشکل مواجه می‌شود (۱،۲). در دیواره‌ی این رگ‌های غیر عادی منافذی وجود دارند که این امکان را به میکروارگانیسم‌ها می‌دهند که از رگ‌ها خارج شده و در تومور تجمع یابند (۳). در پژوهش پیش‌رو تجمع باکتری *E. coli* DH5α نوترکیب در سلول‌های توموری سرطان پستان موشی حاصل از رده‌ی سلولی 4T1 در موش‌های BALB/c مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

کشت باکتری و سلول‌های سرطانی

باکتری *E. coli* DH5α نوترکیب[4] شده با پلاسمید حامل خوشه‌ی ژنی lux CDABE ، در محیط کشت LB دارای آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین با غلظت ۱۰۰ µg/ml کشت و در دمای ۳۷ ºC نگهداری شد. سلول‌های رده‌ی 4T1 سرطان پستان موش در محیط کشت RPMI-1640 حاوی ۱۰٪ سرم جنینی گاو کشت و در دمای ۳۷ ºC و میزان CO_2 ۵٪ نگهداری شدند.

القای تومور در موش‌ها و تزریق باکتری *E. coli* DH5α نوترکیب

---

[1] William Coley
[2] Microenvironment
[3] Hypoxic zone
[4] Transformed

موش‌های BALB/c ماده ۸-۶ هفته‌ای در حیوانخانه‌ی بیولوژی سلول سلول دانشگاه فردوسی مشهد و زیر نظر کمیته‌ی اخلاق ان دانشگاه با دسترسی آزاد به آب و غذا و تهویه‌ی مناسب هوا، نگهداری شدند.

به منظور القای تومور، ۱×۱۰^{۶} سلول 4T1 در PBS استریل با حجم ۱۰۰ µl به صورت زیر پوستی در بالای ران راست موش‌ها تزریق شد. زمانی که حجم تومور به $۳۰۰\ mm^3$ رسید، تعداد ۴×۱۰^{۷} باکتری *E. coli* DH5α نوترکیب از طریق سیاهرگ دمی به موش‌ها تزریق شد.

تهیه‌ی هوموژنای بافتی

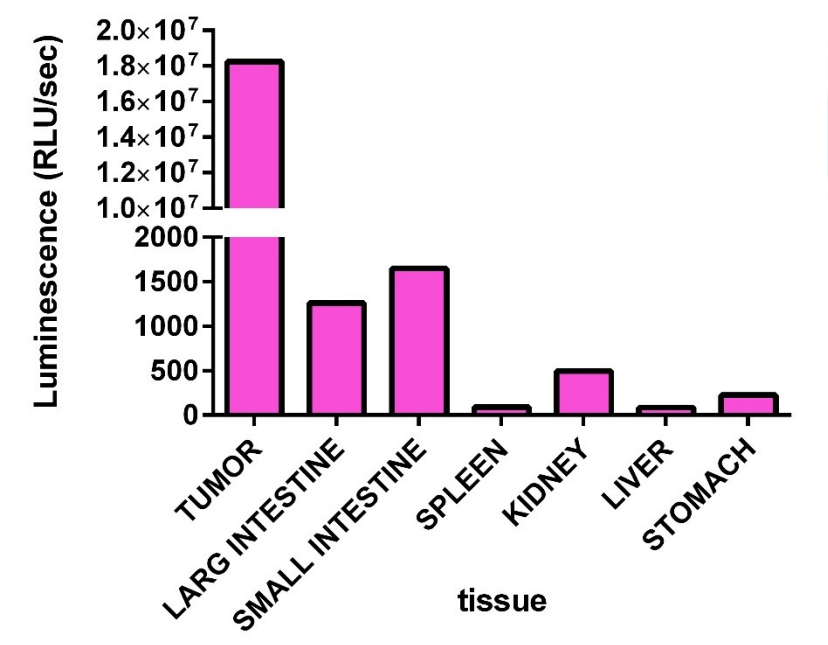
در روز ۴ بعد از تزریق باکتری، موش‌ها قربانی شده و بافت‌های تومور، کبد، طحال، کلیه، معده، روده‌ی باریک و کولون در شرایط غیر عفونی خارج شدند. در ادامه، از هر بافت به صورت جداگانه در هاون چینی استریل همراه با محیط کشت LB حاوی آنتی‌بیوتیک با غلظت ۱۰۰ µg/ml هوموژنای بافتی تهیه شد. حجم ۱ ml از هوموژنای حاصل از هر بافت به منظور اندازه‌گیری نشر لومینسانس آن‌ها در میکروتیوب استریل ریخته شده و در ادامه نمونه‌ها با استفاده از دستگاه لومینومتر بررسی شدند.

بررسی آماری داده‌ها

به منظور مقایسه‌ی معنی‌داری نتایج به دست آمده از بررسی نشر لومینسانس هوموژنای بافتی، تجزیه و تحلیل‌های آماری با استفاده از نرم افزار GraphPad Prism 6 انجام شد.

نتایج و بحث

به منظور بررسی خانه‌گزینی باکتری *E. coli* DH5α نوترکیب، تومور سرطان پستان در موش‌های BALB/c ماده ایجاد شده و سپس باکتری تزریق شد. در ادامه با تهیه‌ی هوموژنای بافتی تجمع باکتری در بافت‌های مختلف بررسی شد. با توجه به نمودار ۱ میزان نشر لومینسانس هوموژنای تومور تقریبا ۱۱۰۰۰ برابر بیشتر از روده‌ی باریک می‌باشد که بعد از تومور بیشترین نشر لومینسانس را نشان داده است. بر اساس نتایج به دست آمده، باکتری *E. coli* DH5α نوترکیب در تومور پستان موش‌های BALB/c ماده به صورت اختصاصی تجمع یافته است و تفاوت معنی‌داری ($p\leq0.0001$) با سایر اندام‌ها نشان می‌دهد.



نمودار ۱ میزان نشر لومینسانس تومور و اندام‌های سالم در روز ۴ بعد از تزریق باکتری *E. coli* DH5α حامل خوشه‌ی ژنی lux CDABE

بنابراین می‌توان ژن آنزیم و یا داروی مورد نظر را به منظور تحویل اختصاصی به محل تومور وارد باکتری نمود. در ادامه با انتقال باکتری به محل تومور، آنزیم به صورت اختصاصی بیان شده و باعث سمّیت اختصاصی در محل تومور می‌شود.

منابع

1. **Carmeliet, P. & Jain, R.K.,** (2000). "Angiogenesis in cancer and other diseases". *Nature*, **407**(6801): 249–257.
2. **Hamzah, J., Jugold, M., Kiessling, F., Rigby, P., Manzur, M., Marti, H.H., Rabie, T., Kaden, S., Grone, H.J., Hammerling, G.J., Arnold, B. & Ganss, R.,** (2008). "Vascular normalization in Rgs5-deficient tumours promotes immune destruction". *Nature,* **453** (7193): 410–414.
3. **Hobbs, S.K., Monsky, W.L., Yuan, F., Roberts, W.G., Griffith, L., Torchilin, V.P. & Jain, R.K.,** (1998). "Regulation of transport pathways in tumor vessels: role of tumor type and microenvironment". *Proceedings of the National Academy of Sciences of the U. S. A.*, 95 (8): 4607–4612.
4. **Hoption, S. A., van Netten, J. P. & van Netten, C.,** (2003). "Dr William Coley and tumor regression: a place in history or in the future". *Postgraduate Medical Journal*, **79**(938): 672-680.
5. **Lehouritis, P., Springer, C. & Tangney, M.,** (2013). "Bacterial-directed enzyme prodrug therapy". *Journal of Controlled Release,* **170**(1): 120-131.
6. **Luo, X., Li, Z., Lin, S., Le, T., Ittensohn, M., Bermudes, D., Runyab, J.D., Shen, S.Y., Chen, J., King, I.C. & Zheng, L.M.,** (2001). **"**Antitumor effect of VNP20009, an attenuated Salmonella, in murine tumor models". *Oncology research,* **12**(11-12): 501–508.
7. **Pawelek, J.M., Low, K.B. & Bermudes, D.,** (1997). "Tumor-targeted *Salmonella* as a novel anticancer vector". *Cancer research,* **57**(20): 4537–4544.
8. **Zheng, L.M., Luo, X., Feng, M., Li, Z., Le, T., Ittensohn, M., Trailsmith, M., Bermudes, D., Lin, S. L. & King, I. C.,** (2000). "Tumor amplified protein expression therapy: *Salmonella* as a tumor-selective protein delivery vector". *Oncology research*, 12(3): 127–135.

Targeting breast tumor cells by bacteria in BALB/c mice

Niloufar Hosseini Giv[1], Ahmad Reza Bahrami[1, 2, 3], Maryam M. Matin[1, 2, 3*]

1 Department of Biology, Faculty of Science, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran.

2 Novel Diagnostic and Therapeutics Research Group, Institute of Biotechnology, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran

3 Stem Cell and Regenerative Medicine Research Group, Iranian Academic Center for Education, Culture and Research (ACECR), Khorasan Razavi Branch, Mashhad, Iran

E. mail: hosseinigiv@mail.um.ac.ir

Abstract

One of the most important issues in cancer therapy is the specificity of drug delivery to tumor site. Many of the usual cancer treatment methods cannot cover this requirement and new strategies are needed. In these new methods some carriers are used to transfer drugs or genes of interest specifically to tumor cells. Bacteria are one of the most popular gene carriers. Bacterial vectors should be able to localize and grow in tumors.

In this study, *E. coli* DH5α was used to deliver the gene of interest to the tumor site. For this purpose, *E. coli* DH5α which is capable of colonization in tumor site, was transformed with a plasmid carrying Lux gene cascade for tracing the bacteria.

Oxidation of luciferine by luciferase which is encoded by Lux gene, leads to luminescent emission. In the next step, breast cancer was induced in female BALB/c mice with 4T1 cells and then transformed bacteria were intravenously injected.

On day 4 after injection of bacteria, mouse was sacrified and tissue homogenates were prepared. The luminescent emission of homogenate suspensions were evaluated by a luminometer.

The light emission of tumor suspension was 11000 folds higher than other tissues, including spleen, stomach, kidney, small intestine, colon and liver.

Using this system, confirmed aggregation of transformed *E. coli* DH5α in Breast tumor cells. This outstanding feature can be used for specific drug or gene delivery to tumor locations in future studies in order to reduce off-target toxicity of these agents.

Key words: breast cancer, bacteria, BALB/c mice, 4T1 cell line