

ارزیابی اثرات پرده‌ی آمیون بر میزان زنده بودن و تکثیر سلول‌های سرطانی در محیط آزمایشگاهی

دکتر حسن نیک نژاد^۱، قاسم یزدان پناه^۲، دکتر مهسا خیاط خویی^۳

نویسنده‌ی مسوول: تهران، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، مرکز تحقیقات نانو تکنولوژی پزشکی و مهندسی بافت niknejad@sbmu.ac.ir

دریافت: ۹۱/۱۰/۲۴ پذیرش: ۹۲/۳/۲۰

چکیده

زمینه و هدف: اخیراً پرده‌ی آمیون به عنوان یک بافت طبیعی با خواص ضد سرطانی معرفی شده است ولی در مورد مکانیسم این خواص مطالعات محدودی وجود دارد. در این مطالعه در نظر بود تا تاثیر محیط کشت روی پرده‌ی آمیون بر روی زیست پذیری سلول‌های سرطانی در دوزهای مختلف و میزان آپوپتوز بررسی شود.

روش بررسی: پرده‌ی آمیون حاصل از سزارین‌های انتخابی به صورت بالا قرار دادن سطح اپی تلیال به مدت ۲۴ ساعت کشت داده شد. پس از آن محیط کشت روی پرده‌های آمیون در حجم‌های مختلف به محیط کشت سلول‌های سرطانی اضافه شد. بعد از ۲۴ ساعت میزان زیست پذیری سلول‌های سرطانی با آزمون *MTT* و آپوپتوز آن‌ها به عنوان مکانیسم احتمالی با آزمون *TUNEL* بررسی شد. نتایج به صورت میانگین $\pm$ انحراف معیار ارائه و با آزمون *ANOVA* یکطرفه بررسی شد.

یافته‌ها: پس از ۲۴ ساعت، آزمون *MTT* نشان داد که محیط کشت پرده‌ی آمیون به صورت معناداری باعث کاهش زیست پذیری سلول‌های سرطانی در مقایسه با گروه کنترل گردید و این اثر وابسته به دوز بود. بررسی آزمون *TUNEL* نشان داد که سلول‌های سرطانی بر اثر آپوپتوز به صورت وابسته به دوز از بین رفته‌اند که این میزان در غلظت‌های بالاتر محیط پرده‌ی آمیون بیشتر است.

نتیجه‌گیری: با توجه به اثر وابسته به دوز پرده‌ی آمیون بر روی سلول‌های سرطانی و القای احتمالی آپوپتوز، می‌توان با مطالعات بیشتر پرده‌ی آمیون را به عنوان یک انتخاب مناسب در درمان سرطان در نظر گرفت.

واژگان کلیدی: پرده‌ی آمیون، سلول سرطانی، آپوپتوز، زیست‌پذیری

مقدمه

درمانی و رادیودرمانی همیشه موثر نیستند و علی‌رغم این درمان‌ها، برگشت بیماری و یا متاستاز به وجود می‌آید (۳ و ۲). به تازگی ایده‌های زیادی در زمینه‌ی درمان سرطان پدیدار شده‌اند که بسیاری از آن‌ها بر روی نقش سلول‌های

سرطان یکی از دلایل مهم مرگ و میر در سراسر دنیا می‌باشد که با وجود پیشرفت روز افزون در پیشگیری و درمان آن، هم چنان باعث مرگ و میر و ناتوانی بیماران می‌شود (۱). درمان‌های معمول برای سرطان از جمله جراحی، شیمی

۱- دکترای فارماکولوژی، استادیار مرکز تحقیقات نانو تکنولوژی پزشکی و مهندسی بافت، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران

۲- دانشجوی پزشکی، مرکز تحقیقات نانو تکنولوژی پزشکی و مهندسی بافت، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران

۳- پزشک عمومی، مرکز تحقیقات نانو تکنولوژی پزشکی و مهندسی بافت، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران

بنیادی در سرطان مانند هدف‌گیری سلول‌های بنیادی سرطانی (۲ و ۱)، تمایز درمانی، پیوند سلول‌های بنیادی (۴) و ژن درمانی سرطان با استفاده از سلول‌های بنیادی عصبی در گلیومای بدخیم (۵) متمرکز شده‌اند. در میان ایده‌های جدید که به نقش سلول‌های بنیادی در درمان سرطان پرداخته‌اند، فرضیه‌ی دارا بودن خواص ضد سرطانی پرده‌ی آمیون مطرح شده است (۷ و ۶). پرده‌ی آمیون، داخلی‌ترین لایه‌ی جفت می‌باشد که به‌عنوان یک حفاظ زیستی جنین را در فضایی که به‌صورت آناتومیک، فیزیولوژیک و ایمونولوژیک مصون می‌باشد، حمایت می‌کند (۸). پرده‌ی آمیون از یک غشای پایه‌ی ضخیم به همراه یک لایه‌ی سلول‌های اپی‌تلیال و یک استرومای بدون رگ حاوی سلول‌های مزانشیمی تشکیل شده است (۹). سلول‌های اپی‌تلیال و مزانشیمال آمیون، خواص سلول‌های بنیادی را دارند که آن‌ها را یک منبع بزرگ برای درمان با سلول‌های بنیادی قرار می‌دهد (۱۰). پرده‌ی آمیون با برخورداری از خواص ضد آنژیوژنز و فعالیت تنظیم‌کنندگی ایمنی، می‌تواند مانع از متاستاز تومور شود. به دنبال گمانه زنی‌هایی در مورد خواص مذکور، این فرضیه بیان شده است که پرده‌ی آمیون می‌تواند خواص ضد سرطانی داشته باشد (۷ و ۶). نشان داده شده است که سلول‌های خارج جنینی دیگر مانند سلول‌های بنیادی بند ناف هم دارای خواص ضد سرطانی می‌باشند و این اثر از طریق القای آپوپتوز می‌باشد (۱۱). از طرفی بیان شده است که پرده‌ی آمیون توانایی القای آپوپتوز بر روی نوتروفیل‌ها (۱۲) و ماکروفاژها (۱۳) را به وسیله‌ی ترشح مواد خاصی دارد. آپوپتوز یک روند مرگ برنامه ریزی شده‌ی سلول با نقش‌های اساسی در نمو و هموستاز ارگانیسم‌های چند سلولی می‌باشد (۱۴). در مطالعات قبلی نشان داده شده است که سلول‌های پرده‌ی آمیون توانایی مهار رشد سلول‌های توموری را در محیط آزمایشگاهی و طبیعی دارند (۱۵). در زمینه‌ی مکانیسم خواص ضدسرطانی پرده‌ی آمیون مطالعات زیادی در

دسترس نیست و مطالعات قبلی انجام شده نیز بیشتر تاکید بر خواص ضد سرطانی اجزای مختلف پرده‌ی آمیون مانند سلول‌های اپی‌تلیال و یا مزانشیمال دارد (۱۸-۱۶). بنابراین، با توجه به مطالب بیان شده هدف از این مطالعه بررسی این فرضیه باشد که پرده‌ی آمیون خواص ضد توموری خود را از طریق القای آپوپتوز بر روی سلول‌های سرطانی اعمال می‌کند. هم چنین احتمال وابسته به دوز بودن خواص ضد سرطانی پرده‌ی آمیون مورد بررسی قرار گرفته است.

روش بررسی

تمام روش‌های آزمایشگاهی در این مطالعه، مورد تایید کمیته‌ی اخلاق دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی می‌باشد. جفت از مادرانی با بارداری طبیعی با سن بارداری ۳۶ تا ۳۸ هفته به‌دنبال سزارین انتخابی تهیه شد. تست‌های آزمایشگاهی انجام شده از نظر HIV، هپاتیت B و C و سیفلیس قبل از زایمان در تمام موارد منفی بودند. با اینکه جفت پس از زایمان دور انداخته می‌شود، اطلاعات کافی به تمام خانواده‌ها داده، رضایت‌نامه‌ی لازم از آن‌ها گرفته شد. بافت جفت به سرعت در شرایط استریل و در دمای ۴ درجه‌ی سانتی‌گراد به آزمایشگاه منتقل شد. سپس پرده‌ی آمیون از کوریون جدا شد و پس از شستشو با بافر فسفات سالین (PBS) سرد از آن برای انجام آزمایشات استفاده شد. برای بررسی اثرات پرده‌ی آمیون بر روی میزان زنده بودن و تکثیر سلول‌های سرطانی، از دو لاین سلول سرطانی شامل سلول‌های سرطانی HeLa و سلول‌های سرطان پستان (MDA-MB-231) استفاده شد. پرده‌ی آمیون به قطعات ۲×۲ سانتی‌متری بریده شد و هر قطعه در یک چاهک پلیت ۱۲ خانه به صورت بالابودن سطح اپی‌تلیال قرار داده شد (سطح اپی‌تلیال در معرض محیط کشت قرار گرفت). به هر چاهک ۱ میلی‌لیتر از محیط کشت DMEM (Sigma-Aldrich) حاوی ۱۰ درصد FBS (Sigma-Aldrich) و ۱ درصد پنی‌سیلین -

ثابت شدند و با Triton-X100 و سدیم سیترات ۰/۱ درصد نفوذپذیر شدند. سپس سلول‌ها با آزمون TUNEL (کیت تشخیص مرگ سلولی Roche)، با توجه به دستورالعمل تولیدکننده، بررسی شدند. به‌طور خلاصه، سلول‌ها با یک مخلوط واکنشی شامل بیوتین-dUTP ترمینال داکسی نوکلئوتیدیل ترانسفراز به مدت ۶۰ دقیقه انکوبه شدند. آویدین متصل شده به فلئوئورسین به نمونه‌ها اضافه شد و پس از آن به مدت ۳۰ دقیقه در تاریکی انکوبه شدند. سلول‌های رنگ آمیزی شده‌ی نشاندار شده با فلئوئورسین با استفاده از میکروسکوپ فلئوئورسنت معکوس شمارش شدند و بر اساس تعداد آن‌ها درصد سلول‌های آپوپتوز شده به دست آمد. تمام نتایج به‌صورت میانگین $\pm$ انحراف معیار بیان شدند. تفاوت بین نتایج حاصل از زیست‌پذیری سلول‌ها با استفاده از آزمون آماری ANOVA یکطرفه (پس آزمون Tukey) بررسی شد. برای بررسی درصد آپوپتوز از آزمون آماری T-Test استفاده گردید. P-value کمتر از ۰/۰۵ از نظر آماری معنادار در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

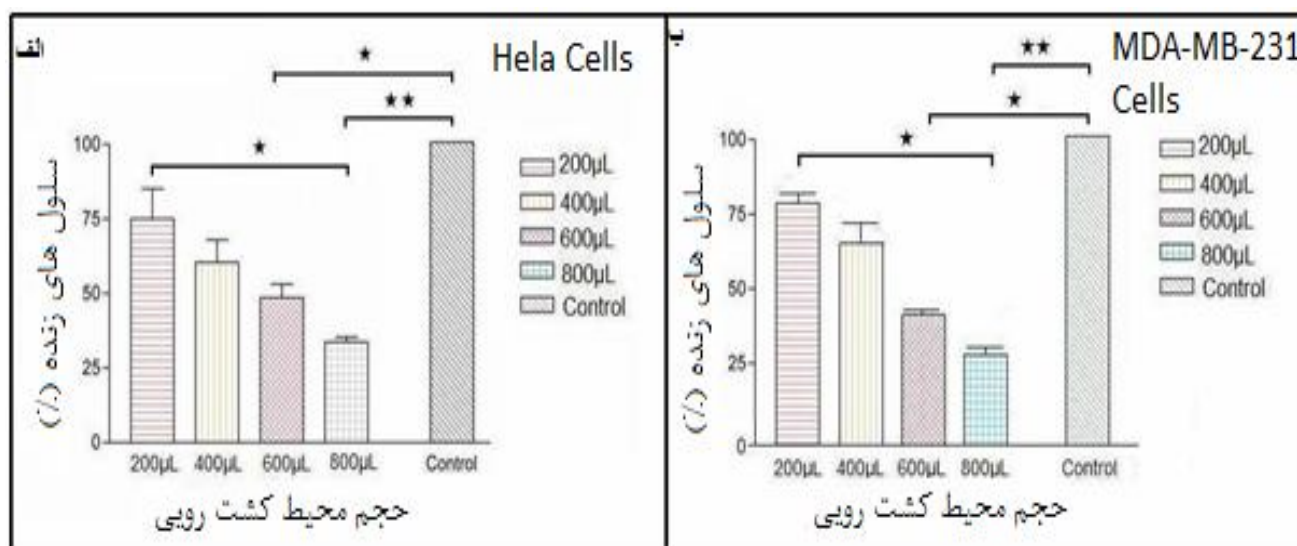
تاثیر محیط کشت روی پرده‌ی آمینون بر روی میزان زنده بودن سلول‌های سرطانی وابسته به دوز بود. با ۸۰۰ میکرولیتر محیط کشت روی پرده‌ی آمینون، کاهش در میزان زنده بودن سلول‌های سرطانی در هر دو سلول‌های سرطانی HeLa و MDA-MB-231 دیده شد. دوزهای بالاتر محیط کشت پرده‌ی آمینون باعث کاهش معنادار بیشتری در میزان زنده بودن سلول‌های سرطانی شدند، به‌صورتی که میزان زنده بودن سلول‌های HeLa زمانی که با ۸۰۰ میکرولیتر محیط کشت روی پرده‌ی آمینون در مقایسه با ۲۰۰ میکرولیتر از آن تیمار شدند، به شکل معناداری تفاوت داشت (شکل ۱، الف). میزان زنده بودن سلول‌های سرطانی MDA-MB-231 هم چنین به‌صورت معناداری پس از تیمار با ۸۰۰ میکرولیتر

استرپتومایسین، اضافه شد. سپس پلیت در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد و دی اکسید کربن ۵ درصد نگهداری شد. پس از ۲۴ ساعت، محیط کشت روی هر چاهک جمع‌آوری شد. محیط کشت رویی جمع‌آوری شده بعد از فیلتراسیون با فیلترهای ۰/۲۲ میکرون، به سلول‌های سرطانی که قبلاً به مدت ۲۴ ساعت در پلیت‌های ۲۴ خانه در محیط RPMI (Chemicon) (حاوی ۱۰ درصد FBS و ۱ درصد پنی‌سیلین-استرپتومایسین) در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد و دی‌اکسید کربن ۵ درصد کشت داده شده بودند، اضافه شد. مقدار محیط کشت اضافه شده به سلول‌های سرطانی به ترتیب ۲۰۰، ۴۰۰، ۶۰۰ و ۸۰۰ میکرولیتر بود (محیط کشت رویی پرده‌ی آمینون). گروه کنترل شامل سلول‌های سرطانی بودند که محیط کشت RPMI (که محیط کشت طبیعی سلول‌های سرطانی بود) به آن‌ها اضافه شده بود. پس از ۲۴ ساعت میزان زنده بودن سلول‌های سرطانی که با محیط کشت روی پرده‌ی آمینون، تیمار شده بودند، به وسیله‌ی آزمون MTT بررسی شد. محلول MTT (۵ میلی‌گرم MTT در یک میلی‌لیتر آب مقطر) فیلتر شده و استریل شد. محلول آماده شده به کشت سلول‌های سرطانی (۴۰ میکرولیتر در هر چاهک) اضافه شد. مخلوط حاصل به مدت ۴ ساعت در ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد انکوبه شد. سپس کریستال‌های فورمازان با اضافه کردن DMSO (Sigma-Aldrich) (۹۰۰ میکرولیتر در هر چاهک) حل شدند. بیشترین جذب فورمازان در طول موج ۵۷۰ نانومتر است. با استفاده از اسپکتروفوتومتر (CE 7500, Cecil, UK) میزان جذب فورمازان به وجود آمده به وسیله‌ی سلول‌های سرطانی زنده اندازه‌گیری شد و بر اساس آن درصد سلول‌های زنده به دست آمد. تمام آزمایشات حداقل سه بار به‌صورت جداگانه و در هر بار چهار تکرار انجام شد.

برای بررسی آپوپتوز سلول‌های سرطانی، آزمون TUNEL انجام شد. سلول‌ها به مدت ۳۰ دقیقه با پارافرمالدهید ۴ درصد

آماري در مقايسه با گروه کنترل معنادار بود ($600 \mu\text{L}$ میکرولیتر در مقايسه با گروه کنترل، $P < 0.01$ و $400 \mu\text{L}$ میکرولیتر در مقايسه با گروه کنترل، $P < 0.05$).

محيط کشت روی پرده‌ی آمینون کاهش یافت و این کاهش به‌صورت معناداری با گروهی که $200 \mu\text{L}$ میکرولیتر از محیط‌رویی را گرفته بودند، متفاوت بود (شکل ۱، ب). در دیگر گروه‌ها نیز کاهش میزان زنده بودن سلول‌ها از نظر



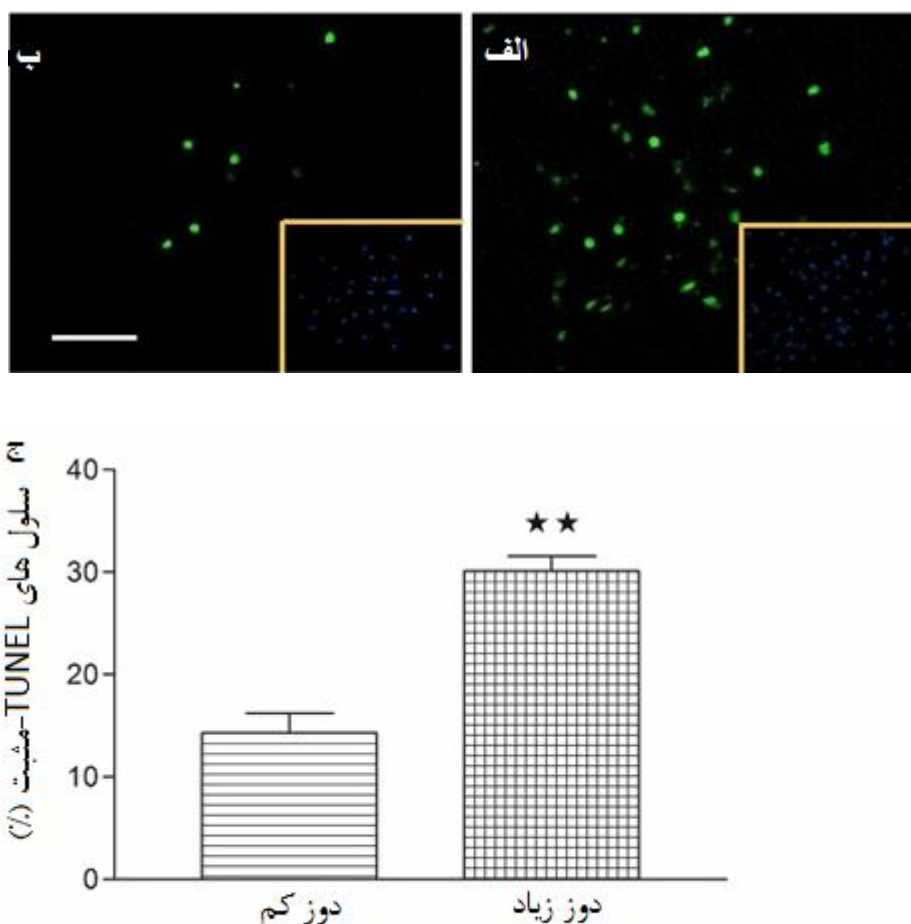
شکل ۱: تاثیر محیط کشت روی پرده‌ی آمینون بر میزان زنده بودن سلول‌های سرطانی

مقایسه با سلول‌های با $200 \mu\text{L}$ میکرولیتر محیط معنادار است $P < 0.05$ و $P < 0.01$.

برای بررسی مکانیسمی که مایع رویی پرده‌ی آمینون با استفاده از آن مرگ سلولی را القا می‌کند، القای آپوپتوز در گروه تیمار شده با محیط روی پرده‌ی آمینون به وسیله‌ی آزمون TUNEL، ارزیابی شد. سلول‌های سرطانی تیمار شده با دوز بالای محیط کشت رویی ($800 \mu\text{L}$ میکرولیتر) به‌طور مشخصی وجود تعداد بیشتر سلول‌های مثبت TUNEL را در مقابل گروه دوز پایین ($200 \mu\text{L}$ میکرولیتر) نشان دادند، که بیان‌کننده‌ی این موضوع بود که سلول‌های سرطانی تیمار شده با محیط کشت روی پرده‌ی آمینون کشت داده شده، آپوپتوز شدند و میزان این آپوپتوز وابسته به دوز بود (شکل ۲).

الف) میزان زنده بودن سلول‌های سرطانی HeLa
مجاورت با محیط کشت پرده‌ی آمینون به مدت ۲۴ ساعت $600 \mu\text{L}$ و $800 \mu\text{L}$ میکرولیتر از محیط پرده‌ی آمینون به‌صورت معناداری میزان زنده بودن سلول‌های HeLa را نسبت به گروه کنترل کاهش داد. افزودن $800 \mu\text{L}$ میکرولیتر در مقایسه با $200 \mu\text{L}$ میکرولیتر از محیط پرده‌ی آمینون نیز زنده بودن سلول‌های HeLa را به صورت معناداری بیشتر کاهش داد.

ب) میزان زنده بودن سلول‌های MDA-MB-231
مجاورت با محیط کشت روی پرده‌ی آمینون. پس از ۲۴ ساعت میزان زنده بودن سلول‌های سرطان پستان به‌صورت معنی‌دار از نظر آماری در تمام دوزهای محیط پرده‌ی آمینون در مقایسه با گروه کنترل به غیر از $200 \mu\text{L}$ میکرولیتر کاهش یافته بود. زنده بودن سلول‌های با $800 \mu\text{L}$ میکرولیتر محیط در



شکل ۲: آزمون TUNEL سلول‌های سرطانی پس از تیمار با محیط کشت روی پرده‌ی آمینون. تعداد سلول‌های آپوپتوز شده (سلول‌های نشان‌دار شده با فلوئورسین) با دوز بالای (۸۰۰ میکرولیتر) محیط پرده‌ی آمینون (الف)، به وضوح بیشتر از دوز کم (۲۰۰ میکرولیتر) محیط پرده‌ی آمینون (ب) می‌باشد. این اختلاف از نظر آماری معنادار می‌باشد که نشان می‌دهد پرده‌ی آمینون به صورت وابسته به دوز آپوپتوز را در سلول‌های سرطانی القا می‌کند (ج). $P < 0.05$ **

بحث

در این مطالعه نشان داده شده است که کاهش در میزان زنده بودن سلول‌های سرطانی و تکثیر آن‌ها، پس از تیمار با محیط کشت پرده‌ی آمینون رخ داد. زمانی که میزان محیط کشت روی پرده‌ی آمینون که به هر کدام از چاهک‌های پلیت سلول‌های سرطانی اضافه گردید، از ۲۰۰ میکرولیتر به ۸۰۰

میکرولیتر (با فاصله‌های ۲۰۰ میکرولیتری) افزایش می‌یافت، زیست‌پذیری در هر دو نوع سلول‌های سرطانی کاهش می‌یافت. با توجه به این نتایج پرده‌ی آمینون می‌تواند تأثیرات ضد سرطانی داشته باشد. به تازگی بعضی مطالعات، تأثیر ضد سرطانی پرده‌ی آمینون را با تأکید بر نقش سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از پرده‌ی آمینون نشان داده‌اند. جیاو و

همکارانش در سال ۲۰۱۲ نشان دادند که سلول‌های مزانشیمال پرده‌ی آمیون رشد سلول‌های گلیوما را از طریق القای آپوپتوز مهار می‌کنند (۱۷) و پارولینی و همکارانش نیز بر خواص ضد سرطانی سلول‌های مزانشیمی پرده‌ی آمیون انسانی تاکید کردند و این گونه بحث نمودند که مواد ترشح شده‌ی نامشخصی از پرده‌ی آمیون می‌توانند باعث توقف چرخه‌ی سلولی (و نه آپوپتوز) سلول‌های سرطانی می‌شوند (۱۶). همانطور که در این مطالعه نشان داده شد این خواص ضد سرطانی پرده‌ی آمیون از طریق مواد ترشح شده از آن و با القای آپوپتوز صورت می‌گیرد. اکنون این سوال مطرح می‌شود که آیا علاوه بر سلول‌های مزانشیمی پرده‌ی آمیون، دیگر اجزای آن از جمله سلول‌های اپی‌تلیال آن نیز در این خواص ضد سرطانی نقش دارند. کنگ و همکاران در سال ۲۰۱۲ نشان داده‌اند که سلول‌های اپی‌تلیال مشتق شده از پرده‌ی آمیون در کشت هم زمان باعث کاهش رشد سلول‌های سرطانی MDA-MB-231 می‌شوند. هم چنین این سلول‌ها در تزریق به موش دارای تومور از همین سلول‌های سرطانی، باعث کاهش اندازه‌ی آن شدند. البته این مطالعه مکانیسم احتمالی مشخصی را برای این کاهش رشد بیان نکرده است (۱۵). در این مطالعه نشان داده شده است که کاهش رشد سلول‌های سرطانی به وسیله‌ی پرده‌ی آمیون توسط آپوپتوز این سلول‌ها القا می‌شود، که با توجه به مطالعات ذکر شده می‌تواند حاصل از سلول‌های اپی‌تلیال، مزانشیمال و یا هر دو باشد. مشخص کردن منبع اصلی القای آپوپتوز سلول‌های سرطانی توسط پرده‌ی آمیون احتیاج به بررسی‌های بیشتری دارد. نشان داده شده است که سلول‌های پرده‌ی آمیون فاکتورها و سایتوکاین‌های کشنده‌ی سلول‌های توموری مانند فاکتور نکروز تومور-آلفا، فاکتور نکروز تومور-بتا، فاکتور رشد ترانسفورمینگ بتا و اینترلوکین‌های ۲، ۳، ۴ و ۸ را آزاد می‌کنند. هم چنین فاکتورهای ناشناخته‌ای به نظر وجود دارند که این خواص ضد توموری پرده‌ی آمیون را باعث می‌شوند

(۱۸). سلول‌های توموری با تولید و ترشح میانجی‌های خاصی تولید عروق جدید از عروق موجود را القا می‌کنند و آنژیوژنز را تحریک می‌نمایند. این اعتقاد وجود دارد که پرده‌ی آمیون خواص ضد آنژیوژنزی دارد (۱۹ و ۷، ۶)، که می‌تواند برای استفاده در جلوگیری از رشد و متاستاز تومور مورد استفاده قرار گیرد. گزارشات مختلف خواص ضد آنژیوژنزی پرده‌ی آمیون را به فاکتورهای ضد آنژیوژنز ترشح شده از سلول‌های اپی‌تلیال آن، مانند ترومبوسپوندین-۱، آنتاگونیست‌های گیرنده‌ی اینترلوکین-۱، اینترلوکین-۱۰ و مهارکننده‌ی‌های متالوپروتئازها نسبت می‌دهند (۲۰). این خاصیت پرده‌ی آمیون در مهار آنژیوژنز، استفاده از آن را برای اهداف ضد سرطانی مناسب می‌سازد. لذا به نظر می‌رسد پرده‌ی آمیون از طریق القای مرگ سلولی و مهار آنژیوژنز می‌تواند انتخاب مناسبی برای درمان سرطان باشد. هم چنین این موضوع که کدام قسمت بافت پرده‌ی آمیون برای مهار تومور مناسب است و آیا استفاده از سلول‌های اپی‌تلیال و یا مزانشیمال جدا شده‌ی پرده‌ی آمیون به تنهایی دارای اثر ضد سرطانی است، باید مورد بررسی بیشتر قرار گیرد. به هر روی مطالعات بیشتر برای استفاده از روش‌های دیگر تشخیصی و اختصاصی مانند بررسی بیان ژن‌ها و پروتئین‌های دخیل در پروسه‌ی آپوپتوز ضروری به نظر می‌رسد. همچنین بررسی مکانیسم‌های القای مسیر خارجی و داخلی آپوپتوز و بررسی میزان بیان پروتئین‌هایی مانند Caspase 3, Caspase 8, Bax/Bcl2 و یا سیتوکروم C و Caspase 9 نیز در مطالعات آینده باید مد نظر قرار گیرد.

نتیجه‌گیری

این مطالعه نشان داد که پرده‌ی آمیون از طریق ترشح مواد محلول باعث القای آپوپتوز در سلول‌های سرطانی می‌شود که این خاصیت پرده‌ی آمیون وابسته به دوز می‌باشد. برای استفاده از این بافت و یا اجزای آن برای مهار سلول‌های

بافت دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی قدردانی می‌نمایم. این تحقیق با حمایت مالی ستاد توسعه و کاربرد سلول‌های بنیادی انجام گرفت. نتایج این مقاله برگرفته از پایان نامه‌ی پزشکی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی می‌باشد.

References

- 1- Sagar J, Chaib B, Sales K, Winslet M, Seifalian A. Role of stem cells in cancer therapy and cancer stem cells: a review. *Cancer Cell Int*. 2007; 7: 9.
- 2- Koch U, Krause M, Baumann M. Cancer stem cells at the crossroads of current cancer therapy failures--radiation oncology perspective. *Semin Cancer Biol*. 2010; 20: 116-24.
- 3- Sun Y, Liu M, Yang B, Li B, Lu J. Role of siRNA silencing of MMP-2 gene on invasion and growth of laryngeal squamous cell carcinoma. *Eur Arch Otorhinolaryngol*. 2008; 265: 1385-91.
- 4- Moreau P, Avet-Loiseau H, Harousseau JL, Attal M. Current trends in autologous stem-cell transplantation for myeloma in the era of novel therapies. *J Clin Oncol*. 2011; 29: 1898-906.
- 5- Ahmed AU, Alexiades NG, Lesniak MS. The use of neural stem cells in cancer gene therapy: predicting the path to the clinic. *Curr Opin Mol Ther*. 2010; 12: 546-52.
- 6- Niknejad H, Khayat-Khoei M, Peirovi H. Inhibition of MMPs might increase anticancer properties of amniotic epithelial cells. *Med Hypotheses*. 2012; 78: 690-1.
- 7- Seo JH, Kim YH, Kim JS. Properties of the

سرطانی در بالین، احتیاج به مطالعات بیشتری است.

تقدیر و تشکر

بدینوسیله از پرسنل محترم اتاق عمل بیمارستان عرفان و همکاران در مرکز تحقیقات نانوتکنولوژی پزشکی و مهندسی

amniotic membrane may be applicable in cancer therapy. *Med Hypotheses*. 2008; 70: 812-4.

8- Niknejad H, Peirovi H, Jorjani M, Ahmadiani A, Ghanavi J, Seifalian AM. Properties of the amniotic membrane for potential use in tissue engineering. *Eur Cell Mater*. 2008; 15: 88-99.

9- Niknejad H, Deihim T, Solati-Hashjin M, Peirovi H. The effects of preservation procedures on amniotic membrane's ability to serve as a substrate for cultivation of endothelial cells. *Cryobiology*. 2011; 63: 145-51.

10- Niknejad H, Deihim T, Ahmadiani A, Jorjani M, Peirovi H. Permanent expression of midbrain dopaminergic neurons traits in differentiated amniotic epithelial cells. *Neurosci Lett*. 2012; 506: 22-7.

11- Zhou H, Chang S, Rao M. Human cord blood applications in cell therapy: looking back and look ahead. *Expert Opin Biol Ther*. 2012; 12: 1059-66.

12- Peirovi H, Rezvani N, Hajinasrollah M, Mohammadi SS, Niknejad H. Implantation of amniotic membrane as a vascular substitute in the external jugular vein of juvenile sheep. *J Vasc Surg*. 2012; 56: 1098-104.

13- Li W, He H, Kawakita T, Espana EM, Tseng

- SC. Amniotic membrane induces apoptosis of interferon-gamma activated macrophages in vitro. *Exp Eye Res.* 2006; 82: 282-92.
- 14- Thompson HJ, Strange R, Schedin PJ. Apoptosis in the genesis and prevention of cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 1992; 1: 597-602.
- 15- Kang NH, Yi BR, Lim SY, et al. Human amniotic membrane-derived epithelial stem cells display anticancer activity in BALB/c female nude mice bearing disseminated breast cancer xenografts. *Int J Oncol.* 2012; 40: 2022-8.
- 16- Magatti M, De Munari S, Vertua E, Parolini O. Amniotic membrane-derived cells inhibit proliferation of cancer cell lines by inducing cell cycle arrest. *J Cell Mol Med.* 2012; 16: 2208-18.
- 17- Jiao H, Guan F, Yang B, et al. Human amniotic membrane derived-mesenchymal stem cells induce C6 glioma apoptosis in vivo through the Bcl-2/caspase pathways. *Molecular Biology Reports.* 2012; 39: 467-73.
- 18- Kang NH, Hwang KA, Kim SU, et al. Potential antitumor therapeutic strategies of human amniotic membrane and amniotic fluid-derived stem cells. *Cancer Gene Ther.* 2012; 19: 517-22.
- 19- Niknejad H, Paeini-Vayghan G, Tehrani FA, Khayat-Khoei M, Peirovi H. Side dependent effects of the human amnion on angiogenesis. *Placenta.* 2013; 34: 340-5.
- 20- Hwang JH, Shim SS, Seok OS, et al. Comparison of cytokine expression in mesenchymal stem cells from human placenta, cord blood, and bone marrow. *J Korean Med Sci.* 2009; 24: 547-54.

In vitro Evaluation of the Effects of Amniotic Membrane on Viability and Proliferation of Cancer Cells

Niknejad H¹, Yazdanpanah GH¹, Khayat-khoei M¹

¹Nanomedicine and Tissue Engineering Research Center, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

Corresponding Author: Niknejad H, Nanomedicine and Tissue Engineering Research Center, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Velenjak, Tehran, Iran.

Email: niknejad@sbm.ac.ir

Received: 13 Jan 2013 **Accepted:** 10 Jun 2013

Background and Objective: Though amniotic membrane has recently been introduced as a natural tissue with anti-cancer properties, there are inadequate studies about involved mechanisms. In this study, the effect of amniotic membrane culture supernatant on viability of cancer cells via applying different doses was evaluated. Apoptosis as a possible mechanism of inducing cancer cell death by amniotic membrane was also investigated.

Materials and Methods: Amniotic membranes prepared from placentas in Caesarian sections which were high in epithelial level were cultured for 24 hours. Then, medium was collected and added in different volumes to the culture of cancer cells. After 24 hours, the viability of cancer cells was evaluated by the MTT assay. Apoptosis of cancer cells as a possible mechanism was assessed with the TUNEL assay. Analysis of data was performed using one-way Anova and post-Tukey test.

Results: After the lapse of 24 hours, the outcome of the MTT assay revealed that supernatant of amniotic membrane significantly led to a decrease in the viability of cancer cells in comparison to the control group. Meanwhile, the TUNEL assay showed that induction of death in cancer cells was possibly through apoptosis which was dose-dependent.

Conclusion: Owing to the dose-dependent effect of amniotic membrane on cancer cells and possible induction of apoptosis, more research is in demand to introduce amniotic membrane as a proper choice in the treatment of cancer.

Keywords: Amnion, Cancer cells, Apoptosis, Viability