Iranian Journal of Breast Diseases. 2026; 19(3):37-51

Original Article

Investigating the Effect of the Supernatant of Mesenchymal Stem Cells (MSCs) Derived from the Lung Tissue of Chicken Embryo on the Expression Levels of GLI2 and WNT4 Growth-Regulatory Genes in the Breast Cancer Cell Line (MCF-7)

Maryam Farzaneh[1], Hasti Miri[2], Maryam Cheraghzadeh[3], Negar Sasani[4], Mojtaba Sasani[5,6]✉

[1] Fertility, Infertility and Perinatology Research Center, Ahvaz Jundishapur University of Medical Sciences, Ahvaz, Iran
[2] Student Research Committee, Ahvaz Jundishapur University of Medical Sciences, Ahvaz, Iran
[3] Department of Biochemistry, School of Medicine, Ahvaz Jundishapur University of Medical Sciences, Ahvaz, Iran
[4] Department of Basic Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran
[5] Department of Emergency Medicine, School of Medicine, Ahvaz Jundishapur University of Medical Sciences, Ahvaz, Iran
[6] Cancer, Environmental and Petroleum Pollutants Research Center, Ahvaz Jundishapur University of Medical Sciences, Ahvaz, Iran

Received: 2026/02/12
Accepted: 2026/08/18

***Corresponding Author:**
Mojtabasasani1405@gmail.com

Ethics Approval:
IR.AJUMS.HGOLESTAN.REC.1404.038

Abstract

Introduction: Mesenchymal stem cells (MSCs) can modulate the tumor microenvironment and influence cancer cell behavior by secreting various bioactive factors. This study aimed to investigate the effect of MSC-derived secretions from chick embryo lung tissue on the expression of the tumorigenic genes WNT4 and GLI2 and of inflammatory factors in a human breast cancer cell line (MCF-7).
Materials and Methods: In this in vitro experimental study, cells were isolated and cultured from 10-day-old chick embryo lung tissue. In the third passage, the supernatant (CM; conditioned medium) obtained from MSCs was collected, and its effect on MCF-7 cells was examined. After 48 hours, CM was collected and filtered. ELISA measured the levels of the inflammatory cytokines IL-6 and TNF-α, and qRT-PCR measured the levels of the WNT4 and GLI2 genes. For statistical comparisons between groups, an independent t-test was used. All analyses were performed using SPSS version 26, and 0.05 was considered the significance threshold.
Results: Treatment of MCF-7 cells with MSCs-CM resulted in a significant decrease in the expression of WNT4 (P=0.0034) and GLI2 (P=0.0007) genes in the treatment group compared to the control group. Also, the levels of IL-6 (P=0.0155) and TNF-α (P=0.0073) in the treatment group showed significant decreases.
Conclusion: MSCs-CM can exert inhibitory effects on cancer cells by downregulating key genes in tumorigenic signaling pathways and reducing inflammatory factors.

Keywords: Mesenchymal stem cells, supernatant, breast cancer, lung, chick embryo

Copyright © 2026 Farzaneh et al. Published by Breast Cancer Research Center, ACECR
This work is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License (https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/) Non-commercial uses of the work are permitted, provided the original work is properly cited.

Introduction

Breast cancer is the most common malignancy among women worldwide and one of the leading causes of cancer-related death in this population [1-3]. The Hedgehog pathway, essential for embryonic development and tissue homeostasis [4-6], is aberrantly reactivated in many malignancies [7,8]. GLI2, the terminal transcriptional effector of this pathway, is directly linked to cell proliferation, invasion, metastasis, and drug resistance in breast cancer [9,10]. WNT4, which normally plays a critical physiological role in embryo implantation and pregnancy, has been implicated in gynecological diseases—including breast cancer—as well as in the regulation of mitochondrial metabolism in cancer cells when its activity becomes dysregulated [11,12]. Growing evidence indicates that GLI2 and WNT4 may act synergistically in breast cancer, mutually reinforcing each other's tumorigenic effects [13]. Mesenchymal stem cells (MSCs), owing to their multilineage differentiation capacity and their regulatory roles in immunity and tissue repair, have become a major focus of cancer research [14]. The secretome of these cells—commonly referred to as conditioned medium (CM)—contains a rich array of cytokines, growth factors, and extracellular vesicles [15,16]. Although numerous studies have examined the anti-inflammatory and immunomodulatory effects of MSC-CM on the growth, proliferation, and migration of cancer cells [17], the effect of MSC-derived secretions from avian embryonic tissues—particularly chick embryo lung tissue—on the Hedgehog and Wnt pathways in human breast cancer had not previously been investigated. The present study determined the effect of MSC-CM derived from chick embryo lung tissue on the expression of two key genes, WNT4 and GLI2, and on the inflammatory cytokines IL-6 and TNF-α in the human breast cancer cell line MCF-7.

Methods

This in vitro experimental study was conducted, following approval by the ethics committee of Ahvaz Jundishapur University of Medical Sciences (approval code IR.AJUMS.HGOLESTAN.REC.1404.044), using ten specific-pathogen-free (SPF^{-}) fertilized White Leghorn eggs and the MCF-7 cell line. Fertilized eggs were incubated for 10 days, after which, under strictly sterile conditions, the lung tissue (the translucent tissue flanking the heart) was isolated from the 10-day-old embryo. Following enzymatic digestion with 0.25% trypsin-EDTA, the resulting cells were cultured in DMEM/F12 medium supplemented with fetal bovine serum. At the third passage, once cells reached 80–90% confluence, the serum-containing medium was replaced with serum-free basal medium; after 48 hours of incubation, the supernatant (CM) was collected, centrifuged, and filtered, and its protein concentration (800–1200 µg/mL) was determined by the BCA method. MCF-7 cells, obtained from the Iranian Biological Resource Center, were cultured in RPMI medium containing 10% FBS and divided into two study groups: a control group receiving serum-free basal medium only, and a treatment group receiving CM diluted 1:2 in basal medium for 48 hours (three biological replicates per group). Protein levels of IL-6 and TNF-α in the MCF-7 culture supernatant were measured using human-specific sandwich ELISA kits (Abcam) with absorbance read at 450 nm. Relative expression of WNT4 and GLI2 was assessed by qRT-PCR following total RNA extraction and cDNA synthesis, using gene-specific primers and SYBR Premix Ex Taq™ II, with GAPDH as the reference gene and the 2^-ΔΔCT method for quantification. After confirming the normality of the data using the Shapiro-Wilk test, statistical comparisons were performed with an independent-samples t-test in SPSS (version 26), with a significance threshold of 0.05.

Results

Microscopic examination showed that the lung-derived mesenchymal cells exhibited the characteristic spindle-shaped morphology of MSCs, proliferated rapidly, and maintained

viability consistently above 90% before culture. MCF-7 cells, after 72 hours of culture, exhibited the expected epithelial morphology and grew as dense, confluent monolayers, confirming the intrinsically invasive, highly proliferative behavior of this cell line. Treatment of MCF-7 cells with CM resulted in a statistically significant reduction in WNT4 expression relative to control (P=0.0034), and an even more pronounced reduction in GLI2 expression (P=0.0007), indicating that CM is capable of simultaneously suppressing the Wnt and Hedgehog signaling pathways. In parallel, levels of both pro-inflammatory cytokines examined were significantly reduced in the treatment group: IL-6 (P=0.0155) and TNF-α (P=0.0073).

Discussion

The findings of this study demonstrate, for the first time, an inhibitory effect of chick embryo lung-derived MSC supernatant on the Wnt and Hedgehog pathways in human breast cancer cells. The concurrent decrease in WNT4 and GLI2 aligns with the findings of Visweswaran et al. (2017) [18], who reported that adipose tissue-derived MSC supernatant inhibited the Wnt/β-catenin pathway (accompanied by decreased Cyclin D1 and Bcl-xL) in MCF-7 cells. Likewise, the reduction in IL-6 and TNF-α observed here is consistent with the anti-inflammatory effects of adipose-derived MSC supernatant reported by Li et al. (2017) [19] in inflammatory models, indicating that MSC-secreted factors can target both inflammatory and growth-signaling pathways independent of direct pharmacological intervention. Mechanistically, given prior reports (Massah et al., 2021) [20] that estradiol stabilizes ERα–GLI3 nuclear complexes and enhances Hedgehog target gene expression, it is plausible that CM silences Hedgehog pathway activity in MCF-7 cells by disrupting this estrogen receptor–GLI interaction or by suppressing downstream effectors. Additionally, given the established role of WNT4 in regulating mitochondrial metabolism in breast cancer cells (Sottnik et al., 2024) [12], reduced WNT4 expression may also induce metabolic dysregulation, offering a plausible explanation for the observed reduction in cell proliferation or survival following CM exposure. Comparison with related studies—including Yu et al. (2023) [21] on the anti-inflammatory effects of MSC-CM in acute lung injury, Canals et al. (2022) [22] on the reduced malignant phenotype of lung cancer cells exposed to human embryonic lung mesenchyme-conditioned medium, and Pashaei-Asl et al. (2022) [23] on p53-dependent apoptosis induced by amniotic fluid MSC supernatant—suggests that the anti-tumor and anti-inflammatory effects of mesenchymal secretions represent a relatively consistent and reproducible phenomenon, regardless of the tissue or species of origin (human or chick embryo). This consistency, together with the high conservation of transcription factor binding motifs between avian and mammalian species [24], provides biological justification for using avian-derived cell secretions in studies of human cancer cells. Nevertheless, this study has several limitations that constrain the interpretation of its findings. First, because species-specific antibodies cross-reactive with chicken cell-surface antigens were unavailable, MSC identity was confirmed solely by morphological criteria and viability, without flow cytometric verification of standard markers ($CD44^+/CD90^+/CD45^-/CD34^-$). Second, baseline cytokine levels in CM alone (without MCF-7 cells) were not assessed, limiting precise attribution of the observed cytokine changes to a genuine cellular response rather than to baseline CM content. Third, the absence of a cell viability assay, such as MTT, limits the ability to fully distinguish specific signaling pathway inhibition from non-specific cytotoxic effects.

Conclusion

The supernatant of mesenchymal stem cells derived from chick embryo lung tissue exerts multi-target anti-tumor potential on MCF-7 cells by concurrently suppressing WNT4 and GLI2 gene expression and reducing the

inflammatory cytokines IL-6 and TNF-α. These results provide a foundation for further studies aimed at identifying the bioactive components of this secretome, elucidating the downstream signaling pathways involved, and evaluating its efficacy and safety in preclinical in vivo models—ultimately working toward a minimally invasive, biologically derived adjunctive approach for breast cancer therapy.

References

1. Singareeka Raghavendra A, Damodaran S, Barcenas CH, Fuqua SA, Layman RM, Tripathy D. Personalizing therapies over the course of hormone receptor-positive/HER2-negative metastatic breast cancer. CA: A Cancer Journal for Clinicians. 2026;76(1):e70055.doi:10.3322/caac.70055
2. Xiong X, Zheng L-W, Ding Y, Chen Y-F, Cai Y-W, Wang L-P, et al. Breast cancer: pathogenesis and treatments. Signal Transduction and Targeted Therapy. 2025;10(1):49. doi:10.1038/s41392-024-02108-4
3. Li X, Zhang H, Yang H, Song Y, Zhang F, Wang A. Modifiable risk factors for breast cancer: insights from systematic reviews. Public Health Nursing. 2025;42(2):1060-71. doi:10.1111/phn.13504
4. Hui M, Cazet A, Nair R, Watkins DN, O'Toole SA, Swarbrick A. The Hedgehog signalling pathway in breast development, carcinogenesis and cancer therapy. Breast Cancer Research. 2013;15(2):203. doi:10.1186/bcr3401
5. Gray A. Hedgehog signaling in Triple-Negative Breast Cancer: Effects on the Tumor Immune Microenvironment. University of Toronto (Canada); 2025.
6. García-Martínez A, Pérez-Balaguer A, Ortiz-Martínez F, Pomares-Navarro E, Sanmartín E, García-Escolano M, et al. Hedgehog gene expression patterns among intrinsic subtypes of breast cancer: prognostic relevance. Pathology-Research and Practice. 2021;223:153478. doi:10.1016/j.prp.2021.153478
7. Skoda AM, Simovic D, Karin V, Kardum V, Vranic S, Serman L. The role of the Hedgehog signaling pathway in cancer: A comprehensive review. Bosnian Journal of Basic Medical Sciences. 2018;18(1):8. doi:10.17305/bjbms. 2018.2756
8. Cong G, Zhu X, Chen XR, Chen H, Chong W. Mechanisms and therapeutic potential of the hedgehog signaling pathway in cancer. Cell Death Discovery. 2025;11(1):40. doi:10.1038/s41420-025-02327-w
9. Jaremba EA, Beadle E, Rhoades J. Gli2 regulation of EMT in TNBC invasion. Cancer Research. 2026;86(7_Supplement):4844. doi:10.1158/1538-7445.AM2026-4844
10. Gray A, Shen Q, Marini W, Murakami K, Ohashi P, Reedijk M. Targeting tumoral GLI1 in triple-negative breast cancer: A novel strategy to reverse the immunosuppressive microenvironment. Cancer Research. 2026;86(7_Supplement):173. doi:10.1158/1538-7445.AM2026-173
11. Chronopoulou E, Koika V, Tsiveriotis K, Stefanidis K, Kalogeropoulos S, Georgopoulos N, et al. Wnt4, Wnt6 and β-catenin expression in human placental tissue—is there a link with first trimester miscarriage? Results from a pilot study. Reproductive Biology and Endocrinology. 2022;20(1):51. doi:10.1186/s12958-022-00923-4
12. Sottnik JL, Shackleford MT, Robinson SK, Villagomez FR, Bahnassy S, Oesterreich S, et al. WNT4 regulates cellular metabolism via intracellular activity at the mitochondria in breast and gynecologic cancers. Cancer Research Communications. 2024;4(1):134-51. doi:10.1158/2767-9764.CRC-23-0275
13. Kurzava Kendall L, Ma Y, Yang T, Lubecka K, Stefanska B. Epigenetic effects of resveratrol on oncogenic signaling in breast cancer. Nutrients. 2024;16(5):699. doi:10.3390/nu16050699
14. Wong RSY, Tan EW, Goh BH. Mesenchymal stem cell-based therapies: challenges and enhancement strategies. Cell

Biochemistry and Biophysics. 2026;84(1):131-47. doi:10.1007/s12013-025-01895-z

15. Warzycha M, Oleksiuk A, Suska O, Kolanowski TJ, Rozwadowska N. Engineered Mesenchymal Stromal Cells in Oncology: Navigating Between Therapeutic Delivery and Tumor Promotion. Genes. 2026;17(1):108. doi:10.3390/genes17010108
16. Garcia GL, Baruwal R, Suresh S, Britt AK, Li A, Atiya HI, et al. Mesenchymal stromal/stem cells in tumour initiation, progression and therapy. Nature Reviews Cancer. 2026:1-16. doi:10.1038/s41568-026-00936-w
17. Chang Y-H, Wu K-C, Ding D-C. Extracellular Vesicles from Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells Modulate Proliferation, Migration, and Chemosensitivity in Ovarian Cancer Cells. International Journal of Molecular Sciences. 2026;27(5):2468. doi:10.3390/ijms27052468
18. Visweswaran M, Arfuso F, Dilley RJ, Newsholme P, Dharmarajan A. The inhibitory influence of adipose tissue-derived mesenchymal stem cell environment and Wnt antagonism on breast tumour cell lines. The International Journal of Biochemistry & Cell Biology. 2018;95:63-72. doi:10.1016/j.biocel.2017.12.013
19. Li Y, Gao X, Wang J. Human adipose-derived mesenchymal stem cell-conditioned media suppresses inflammatory bone loss in a lipopolysaccharide-induced murine model. Experimental and Therapeutic Medicine. 2017;15:1839-46. doi:10.3892/etm.2017.5606
20. Massah S, Foo J, Li N, Truong S, Nouri M, Xie L, et al. Gli activation by the estrogen receptor in breast cancer cells: Regulation of cancer cell growth by Gli3. Molecular and Cellular Endocrinology. 2021;522:111136. doi:10.1016/j.mce.2020.111136
21. Yu T, Cui Y, Xin S, Fu Y, Ding Y, Hao L, et al. Mesenchymal stem cell conditioned medium alleviates acute lung injury through KGF-mediated regulation of epithelial sodium channels. Biomedicine & Pharmacotherapy. 2023;169:115896. doi:10.1016/j.biopha.2023.115896
22. Canals J, Navarro A, Vila C, Canals JM, Díaz T, Acosta-Plasencia M, et al. Human embryonic mesenchymal lung-conditioned medium promotes differentiation to myofibroblast and loss of stemness phenotype in lung adenocarcinoma cell lines. Journal of Experimental & Clinical Cancer Research. 2022;41(1):37. doi:10.1186/s13046-021-02206-z
23. Pashaei-Asl R, Pashaiasl M, Ebrahimie E, Ataei ML, Paknejad M. Apoptotic effects of human amniotic fluid mesenchymal stem cells conditioned medium on human MCF-7 breast cancer cell line. BioImpacts: BI. 2022;13:191-206. doi:10.34172/bi.2022.23813
24. Hecker N, Kempynck N, Mauduit D, Abaffyová D, Vandepoel R, Dieltiens S, et al. Enhancer-driven cell-type comparison reveals similarities between mammalian and avian pallia. Science. 2025;387(6735):eadp3957. doi:10.1126/science.adp3957

مقاله‌پژوهشی

مجله علمی
بیماری‌های پستان ایران
۱۴۰۵؛۱۹(۳):۳۷-۵۱

بررسی اثر سوپرناتانت سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از بافت ریه جنین جوجه بر بیان ژن‌های تنظیم کننده رشد *GLI2* و *WNT4* در رده سلولی سرطان پستان (*MCF-7*)

مریم فرزانه[۱]، هستی میری[۲]، مریم چراغ‌زاده[۳]، نگار ساسانی[۴]، مجتبی ساسانی[۵،۶]✉

[۱]مرکز تحقیقات باروری، ناباروری و سلامت جنین، دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز، اهواز، ایران
[۲]کمیته تحقیقات دانشجویی، دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز، اهواز، ایران
[۳]گروه بیوشیمی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز، اهواز، ایران
[۴]گروه علوم پایه، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه چمران اهواز، اهواز، ایران
[۵]طب اورژانس، گروه طب اورژانس، دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز، اهواز، ایران
[۶]مرکز تحقیقات سرطان و آلایندهای محیطی و نفتی، دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز، اهواز، ایران

چکیده

مقدمه: سلول‌های بنیادی مزانشیمی (MSCs) با ترشح فاکتورهای زیستی مختلف، قادر به تعدیل ریزمحیط تومور و تأثیرگذاری بر رفتار سلول‌های سرطانی هستند. این مطالعه با هدف بررسی اثر ترشحات مشتق از MSCs بافت ریه جنین جوجه بر بیان ژن‌های مرتبط با تومورزایی WNT4 و GLI2 و فاکتورهای التهابی در رده سلولی سرطان پستان انسان (MCF-7) انجام شد.

روش بررسی: در این مطالعه تجربی *in vitro*، سلول‌های مشتق از بافت ریه جنین‌های جوجه ۱۰ روزه جداسازی و کشت داده شدند. در پاساژ سوم، سوپرناتانت یا CM (conditioned medium) حاصل از سلول‌های MSCs جمع‌آوری و اثر آن بر روی سلول‌های MCF-7 مورد بررسی قرار گرفت. پس از ۴۸ ساعت، CM جمع‌آوری و فیلتر شد. سطح سیتوکین‌های التهابی IL6 و TNFα به روش الایزا (ELISA) و سطح بیان ژن‌های WNT4 و GLI2 با استفاده از روش qRT-PCR سنجیده شد. برای مقایسه‌های آماری بین گروه‌ها، از آزمون تی‌مستقل استفاده گردید. کلیه تحلیل‌ها با نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۶ انجام شد و ۰/۰۵ به عنوان آستانه معنی‌داری در نظر گرفته شد.

یافته‌ها: تیمار سلول‌های MCF-7 با MSCs-CM منجر به کاهش معنادار در بیان ژن‌های WNT4 (P=0.0034) و GLI2 (P=0.0007) در گروه تیمار نسبت به گروه کنترل گردید. همچنین، میزان IL6 (P=0.0155) و TNFα (P=0.0073) در گروه تیمار کاهش معناداری را نشان داد.

نتیجه‌گیری: MSCs-CM با مهار بیان ژن‌های کلیدی در مسیرهای سیگنالینگ تومورزا و همچنین کاهش فاکتورهای التهابی، می‌تواند اثرات مهاری بر سلول‌های سرطانی داشته باشد.

واژه‌های کلیدی: سلول‌های بنیادی مزانشیمی، سوپرناتانت، سرطان پستان، ریه، جنین جوجه

تاریخ ارسال: ۱۴۰۴/۱۱/۲۳
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۵/۰۵/۲۷

✉ **نویسنده مسئول:**
Mojtabasasani1405@gmail.com

مقدمه

سرطان پستان شایع‌ترین بدخیمی در میان زنان در سراسر جهان و یکی از علل اصلی مرگ‌ومیر ناشی از سرطان در این جمعیت است. از مهم‌ترین عوامل خطر آن می‌توان به جنس مؤنث، سابقه فردی یا خانوادگی سرطان، جهش در ژن‌های BRCA، اندازه بزرگ پستان، یائسگی دیررس، هورمون‌درمانی، چاقی و تماس طولانی با استروژن اشاره کرد. پژوهش در زمینه ژنتیک سرطان پستان برای مدیریت بهتر این بیماری بسیار حائز اهمیت است، زیرا به درک عمیق‌تر مکانیسم‌ها و پیشرفت روش‌های تشخیصی و درمانی هدفمند منجر می‌شود و در نتیجه، به پیشرفت پزشکی فردمحور برای بیماران مبتلا به سرطان پستان کمک می‌کند (۱-۳).

برای درک بهتر سرطان پستان در سطح مولکولی، مطالعات اخیر توجه ویژه‌ای به مسیرهای پیام‌رسانی Hedgehog و WNT معطوف کرده‌اند. مسیر Hedgehog نقش اساسی در تکوین طبیعی و حفظ هموستاز بافت ایفا می‌کند و فرآیندهایی نظیر تمایز، تکثیر و بقای سلولی را تنظیم می‌نماید (۴-۶). این مسیر در بسیاری از سرطان‌ها مجدداً فعال می‌شود (۸،۷). فاکتور رونویسی GLI2، یکی از اجزای کلیدی این مسیر، با پیشرفت تومور، متاستاز و مقاومت دارویی در سرطان پستان مرتبط است (۱۰،۹). از سوی دیگر، WNT4 نقش مهمی در فرایندهایی همچون لانه‌گزینی و بارداری دارد و فعالیت غیرعادی آن در بیماری‌های زنان و از جمله در سرطان پستان مؤثر است (۱۲،۱۱). شواهدی وجود دارد که نشان می‌دهد GLI2 و WNT4 می‌توانند در سرطان پستان به‌صورت هم‌افزا عمل کرده و اثرات توموری یکدیگر را تقویت کنند (۱۳).

سلول‌های بنیادی مزانشیمی (MSCs) از بافت‌های مختلف استخراج می‌شوند و دارای توان تمایز چندتوانی بوده و نقش‌های مهمی در تنظیم ایمنی و ترمیم بافت ایفا می‌کنند (۱۴). تأثیر این سلول‌ها بر سلول‌های سرطانی بسته به منشاء بافتی آن‌ها متفاوت است (۱۶،۱۵). سوپرناتانت حاصل از این سلول‌ها، با داشتن خواص ضدالتهابی و تعدیل کننده ایمنی، می‌تواند رشد، تکثیر و مهاجرت سلول‌های سرطانی را کنترل کند (۱۷).

مطالعه حاضر با هدف بررسی تأثیر MSCs-CM مشتق از بافت ریه جنین جوجه بر بیان دو ژن تنظیم‌کننده رشد (WNT4 و GLI2) و سایتوکاین‌ها در رده MCF-7 طراحی شد. انتخاب محیط شرطی‌شده MSC مشتق از بافت ریه جنین جوجه براساس مبنای زیستی حفاظت بالای موتیف‌های اتصال فاکتورهای رونویسی بین پرندگان و پستانداران و همچنین شباهت مکانیسم‌های مولکولی مسیرهای پیام‌رسانی در این دو گونه است. علاوه بر این، مطالعات تجربی قبلی نشان داده‌اند که ترشحات سلول‌های مزانشیمی مشتق از بافت جنینی، اثرات مهارکننده بر سلول‌های سرطانی انسان دارند. با این حال، تا کنون اثر ترشحات مشتق از MSCs بافت ریه جنین جوجه بر مسیرهای Hedgehog و Wnt در سرطان پستان انسان بررسی نشده است.

مواد و روش‌ها

۱. تهیه تخم مرغ نطفه دار

این مطالعه به صورت تجربی می‌باشد که پس از کسب کد اخلاق IR.AJUMS.HGOLESTAN.REC.1404.044 از دانشگاه علوم پزشکی اهواز بر روی ده تخم مرغ نطفه‌دار (SPF) و یک رده سلولی سرطان پستان (MCF-7) انجام شد. تخم‌های نطفه‌دار از نژاد لگهورن سفید (Gallus gallus domesticus) از یک مزرعه تجاری (اهواز، ایران) که به رعایت استانداردهای صنعتی برای تضمین عملکرد بهینه پرنده معروف بود، تهیه شدند. پروتکل مطالعه کاملاً مطابق با دستورالعمل‌های مراقبت اخلاقی و استفاده از حیوانات آزمایشگاهی تعیین‌شده توسط مؤسسه تحقیقات حیوانات آزمایشگاهی (ILAR) در دانشگاه علوم پزشکی جندی‌شاپور اهواز بود.

۲. آماده‌سازی سوپرناتانت سلول‌های مشتق از بافت ریه جنین جوجه

مرحله نخست تهیه تخم‌مرغ‌های نطفه‌دار انکوبه نشده و تازه به منظور دستیابی به جنین جوجه بود که برای آن ابتدا تخم مرغ‌های نطفه دار (در مرحله تکوینی X) در دستگاه جوجه کشی به مدت ۱۰ روز قرار داده شد. سپس تخم‌مرغ‌های حاوی جنین را از دستگاه جوجه‌کشی خارج کرده و در یک ظرف گذاشته و به هود لامینار انتقال داده شد. شست‌وشوی کامل پوسته آهکی توسط آب گرم و پاک کردن سطح تخم‌مرغ توسط الکل ۷۰٪ (در صورت نیاز استفاده از محلول بتادین) شکستن تخم‌مرغ‌ها زیر هود لامینار کلاس I انجام شد و برای مشاهده بافت از میکروسکوپ استریو استفاده شد. عمل شکستن تخم‌مرغ‌ها

در پلیت استریل، به همراه دستکش و ماسک و پنس استریل انجام شد. قبل از جداسازی بافت، چند میکروتیوپ استریل حاوی بافر PBS و آنتی بیوتیک آماده و در هود لامینار قرار داده شد. سپس به کمک قیچی و پنس استریل شده توسط الکل و حرارت، جنین ۱۰ روزه را از زرده جدا کرده و با حفظ شرایط استریلیته، تمامی بخش‌های اضافی را به درون دو الی سه لایه کیسه فریزر قرار داده شد. در مرحله بعد زیر میکروسکوپ استریو بافت ریه (بافت شفاف دو طرف قلب) را جدا و و پس از افزودن آن به میکروتیوپ حاوی بافر و آنتی بیوتیک، میکروتیوپ‌ها به آزمایشگاه کشت سلول و هود کلاس II منتقل شد. در این مرحله بافر را جدا کرده و آنزیم تریپسین (trypsin-EDTA, ٪0.25 Sigma, USA) جهت لیز کردن بافت ریه و خارج کردن سلول‌ها اضافه شد و به مدت ۱۰ دقیقه در معرض سلول‌ها قرار گرفت. هضم با اضافه کردن محیط کشت حاوی FBS (HyClone) 10% متوقف شد و سلول‌ها با سانتریفیوز ۱۰۰۰ دور بر دقیقه (به مدت ۵ دقیقه) رسوب داده شدند. سپس سلول‌های ریه در محیط کشت DMEM/F12 (DMEM, Invitrogen) حاوی FBS کشت داده شدند و تعویض محیط به صورت روزانه انجام شد.

هنگامی که سلول‌ها به تراکم ۹۰-۸۰ درصد کانفلوئنسی رسیدند، محیط کشت حاوی سرم خارج شد و با ۱ میلی‌لیتر محیط پایه به ازای هر 2×10^5 سلول اضافه شد. پس از ۴۸ ساعت انکوباسیون، سوپرناتانت یا CM (conditioned medium) جداسازی، سانتریفیوژ و فیلتر شد تا هرگونه بقایای سلولی حذف شود و سپس به دمای ۸۰- درجه سانتی گراد انتقال داده شد. غلظت پروتئین با استفاده از کیت سنجش پروتئین (Thermo Fisher Scientific, Pierce™ BCA) اندازه‌گیری شد که محدوده غلظت ۸۰۰ تا ۱۲۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر را نشان داد.

۳. کشت رده سلول‌های سرطان پستان

رده سلولی MCF-7 یک رده سلولی سرطان پستان انسانی است که از یک آدنوکارسینومای پستان متاستاتیک (پلورال افیوژن) در یک بیمار ۶۹ ساله در سال ۱۹۷۰ جدا شد. این رده یکی از پرکاربردترین و معتبرترین مدل‌های تحقیقاتی در مطالعه سرطان پستان، به ویژه زیرگونه گیرنده استروژن مثبت (ER+) است. این رده از بانک سلولی مرکز ذخایر ژنتیک ایران خریداری شدند. سلول‌ها در محیط کشت RPMI (Glutamax) حاوی FBS 10% کشت داده شدند. سپس سلول‌ها در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، رطوبت ٪۹۰ و دی‌اکسیدکربن ٪۵ قرار گرفتند. پنج روز پس از کشت، سلول‌های MCF-7 پاساژ داده شدند و به پلیت ۶ خانه انتقال داده شدند. پس از رسیدن به کانفلوئنسی ۸۰-۷۰٪، محیط قدیمی برداشته شد و CM با غلظت پروتئین ۸۰۰-۱۲۰۰µg/ml که ۱:۲ با محیط پایه رقیق شده بود به سلول‌ها اضافه شد. گروه کنترل تنها محیط پایه بدون سرم دریافت کرد. پس از ۴۸ ساعت، محیط رویی سلول‌های MCF-7 جمع‌آوری و به دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد انتقال داده شد.

۴. گروه‌بندی مطالعه

آ. گروه مدل بیولوژیکی

در مطالعه حاضر، تعداد ۱۰ تخم‌مرغ نطفه‌دار از نژاد لگهورن سفید مورد استفاده قرار گرفت. به منظور جلوگیری از آلودگی سلولی، سلول‌های حاصل از بافت ریه هر جنین به‌طور جداگانه در یک ویال استریل قرار داده و شست و شو داده شدند. سپس سلول‌های حاصل از تمام ۱۰ جنین با هم مخلوط شدند تا یک بانک سلولی یکنواخت و همگن ایجاد شود. این مخلوط سلولی در سه پلیت جداگانه کشت داده شد و به‌عنوان سه تکرار زیستی مستقل در نظر گرفته شد. لازم به ذکر است که در تحلیل آماری، تعداد ۱۰ تخم‌مرغ به‌عنوان ۱۰ تکرار مستقل در نظر گرفته نشد، بلکه تکرارهای زیستی (سه پلیت) و تکرارهای تکنیکی (سه تکرار برای هر آزمایش) به‌طور جداگانه گزارش شده‌اند.

ب. گروه سلولی آزمایشی (مربوط به سرطان پستان)

- گروه کنترل (شاهد): سلول‌های MCF-7 که محیط کشت پایه بدون سرم دریافت کردند (۳ تکرار).
- گروه تیمار (آزمون): سلول‌های MCF-7 که CM با غلظت پروتئین ۸۰۰-۱۲۰۰ µg/ml که ۱:۲ با محیط پایه رقیق شده بود به مدت ۴۸ ساعت دریافت کردند (۳ تکرار).

۵. ارزیابی سطح پروتئینی فاکتورهای التهابی و غیرالتهابی

به منظور ارزیابی تأثیر ترشحات سلول‌های مشتق از بافت ریه بر سلول‌های سرطانی، سطح پروتئینی فاکتور التهابی و فاکتور ضدالتهابی در محیط رویی سلول‌های MCF-7

اندازه‌گیری شد. برای این منظور از کیت الایزای ساندویچی تجاری (شرکت Abcam) ویژه سنجش فاکتورهای انسانی و مطابق با دستورالعمل سازنده استفاده گردید. ابتدا چاهک‌های میکروپلیت پیش‌پوشش‌شده با آنتی‌بادی اختصاصی ضدسیتوکاین موردنظر، با بافر بلاکینگ، بلوک شدند. سپس استانداردها و نمونه‌های سوپرناتانت (با رقت مناسب) به چاهک‌ها اضافه و طی مرحله انکوباسیون، سیتوکاین‌های موجود در نمونه به آنتی‌بادی کف چاهک متصل شدند. پس از شست‌وشو با بافر مخصوص برای حذف مواد متصل‌نشده، آنتی‌بادی ثانویه نشان‌دار شده با آنزیم به هر چاهک افزوده و مجدداً انکوبه و شست‌وشو انجام شد. در نهایت، سوبسترای اختصاصی آنزیم افزوده و واکنش آنزیمی در تاریکی و دمای اتاق انجام شد. واکنش رنگی پس از مدت زمان مشخص با افزودن محلول اسیدی استوپ کننده، متوقف و جذب نوری هر چاهک بلافاصله در طول موج ۴۵۰ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر خوانش میکروپلیت اندازه‌گیری شد. غلظت سیتوکاین‌ها در هر نمونه بر اساس منحنی استاندارد خطی که از میانگین جذب استانداردهای با غلظت مشخص رسم شده بود، محاسبه گردید. تمامی مراحل به صورت تکنیکی تکرار شد و هر نمونه در سه تکرار تکنیکی مورد سنجش قرار گرفت.

۶. بررسی بیان ژن توسط qRT-PCR

برای بررسی تغییرات بیان ژن، RNA کل از سلول‌های سرطان پستان (تیمار و کنترل) استخراج شد و مطابق دستورالعمل کیت، استخراج RNA انجام گرفت. سپس DNA مکمل (cDNA) با استفاده از کیت سنتز cDNA (Yekta Tajhiz Azma، YT4500) ساخته شد. آزمایش Real-Time PCR با استفاده از کیت SYBR Premix Ex Taq™ II (TakaRa، RR820Q) و پرایمرهای اختصاصی (GenIran) برای هر ژن انجام شد (جدول ۱). ژن GAPDH به‌عنوان ژن Housekeeping انتخاب گردید. آنالیز داده‌ها با روش $2^{\Delta\Delta CT}$ و با استفاده از نرم‌افزار REST تحلیل شد.

جدول ۱: لیست پرایمرهای استفاده شده

Table 1: Primers used in the study

GENE NAME	SEQUENCE	LENGTH
GLI2-F	AACACATGACCACCATGCAC	147
GLI2-R	TTTCCAGGATGGAGCCACTT	
WNT4-F	TGCTGTAAGCCCACTTTCCA	132
WNT4-R	TTCAGCCACTGAACACAGGA	
GAPDH-hum-F	CAGCCTCAAGATCATCAGCAATG	100
GAPDH-hum-R	CATGAGTCCTTCCACGATACCA	

۷. روش محاسبه اندازه نمونه و آنالیز آماری

در هر گروه حداقل سه تکرار انجام شد. در قسمت آمار استنباطی ابتدا توزیع طبیعی متغیرها با استفاده از آزمون شاپیروویلک ارائه شده است. آنالیز داده‌ها با استفاده از آزمون t-test مستقل و نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۶ انجام شد و سطح معنی‌داری 05/0 در نظر گرفته شد. اختلاف اماری معنی دار بین گروه‌های مختلف با علامت *،**،***،**** و**** با سطح معنی‌داری $p<0.05$ ، $p<0.01$، $p<0.0001$، $p<0.001$ نشان داده شد.

برای هر گروه، ۳ تکرار زیستی (biological replicate) و ۳ تکرار تکنیکی (technical replicate) در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

۱. کشت، تکثیر و مورفولوژی سلول‌های مشتق از بافت ریه جنین جوجه ۱۰ روزه (E10)

به منظور بررسی تکثیر سلول‌های مشتق از بافت ریه، از روش متداول شمارش سلول با استفاده از لام نئوبار (هموسیتومتر) برای محاسبه تراکم سلولی در ابتدای کشت و هر ۲۴ ساعت استفاده شد. زنده مانی سلول‌ها بلافاصله پس از جداسازی با روش حذف تریپان بلو اندازه‌گیری شد و مشاهده شد که زنده مانی پیش از کشت سلول‌ها، همواره بیش از ٪۹۰ بود. دو روز پس از انکوباسیون، بررسی با میکروسکوپ فاز کنتراست نشان داد که سلول‌های مشتق از بافت ریه بصورت دوکی شکل استطاله دار بودند و با سرعت بالا شروع به تکثیر کردند که نشان‌دهنده قدرت

تکثیر و سازگاری سریع این سلول‌ها در شرایط کشت in vitro بود. این مورفولوژی دوکی شکل، مشابه با MSCهای گزارش‌شده در منابع بود، هرچند تأیید قطعی هویت نیازمند تست‌های تکمیلی (فلوسایتومتری و تمایز) بود که در مطالعه حاضر انجام نشد و به عنوان محدودیت در نظر گرفته شد (شکل A1).

۲. کشت، تکثیر و مورفولوژی سلول‌های سرطانی (MCF-7)

۲۴ ساعت پس از کشت، مشاهده با میکروسکوپ نوری معکوس نشان داد که سلول‌های سرطانی به سطح پلیت چسبیده و شروع به گسترش کرده‌اند. چسبندگی و گسترش سلول‌ها، نشان‌دهنده سلامت و سازگاری خوب رده سلولی با شرایط کشت بود. پس از ۷۲ ساعت، سلول‌های MCF-7 مورفولوژی اپیتلیال (پلی‌گونال تا گرد) با رشد به صورت توده‌های فشرده نشان دادند.

رشد به صورت تک‌لایه همپوشان با تراکم بالا، رفتار تهاجمی و تکثیر سریع ذاتی سلول‌های سرطانی را تأیید می‌کرد. این وضعیت، بستر مناسبی برای آزمایش اثرات یک عامل مداخله‌گر (مانند ترشحات MSC) فراهم می‌کرد (شکل B1).

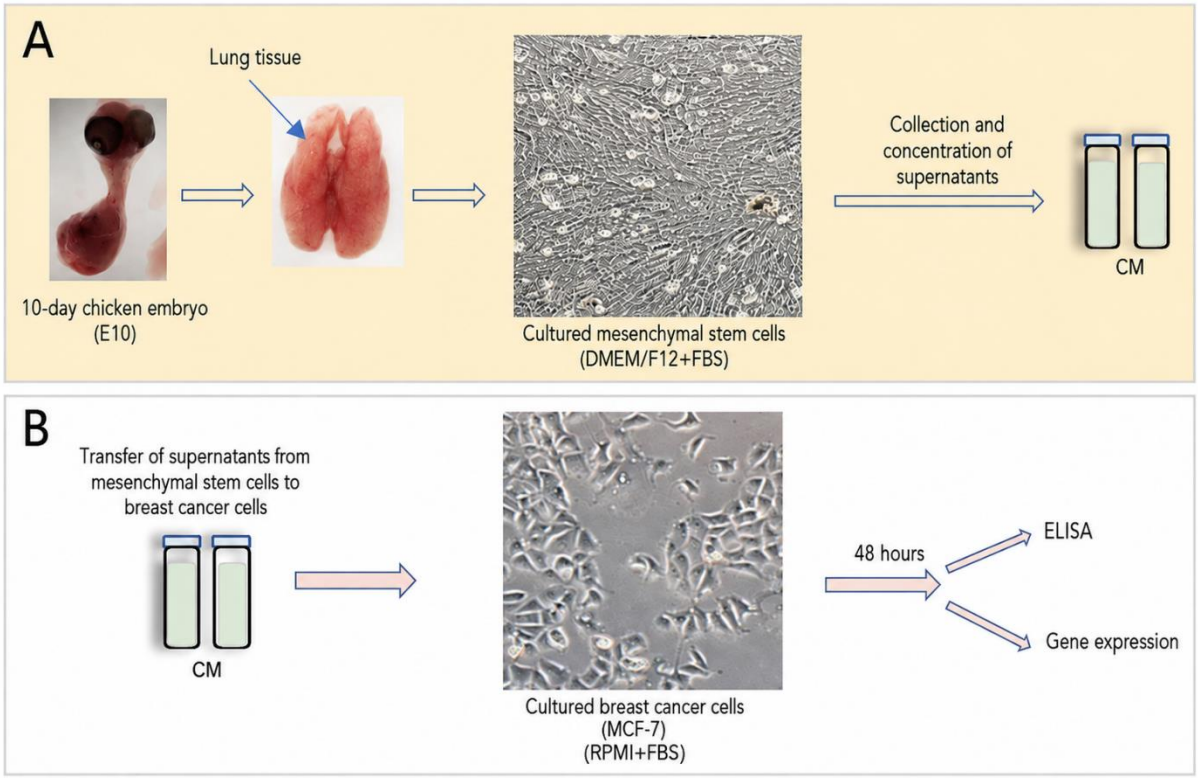


Figure 1: Isolation and culture of MSCs derived from chicken embryo's lung tissue and transfer of the supernatant to breast cancer cells

شکل ۱: جداسازی و کشت سلول‌های MSC مشتق از بافت ریه جنین جوجه و انتقال سوپرناتانت یا CM (conditioned medium) به سلول‌های سرطان پستان (MCF-7)

۳. ارزیابی بیان ژن در سلول‌های سرطانی دریافت کننده CM

میزان بیان ژن WNT4 در گروه تیمار (دریافت‌کننده CM) در مقایسه با گروه کنترل به‌طور معناداری کمتر بود. (P=0.0034). این نتیجه بیانگر آن است که CM مشتق از MSCs می‌تواند مسیر سیگنالینگ وابسته به WNT4 را که اغلب در پیشرفت سرطان پستان نقش دارد، مهار کند.

ژن GLI2 نیز در گروه تیمار نسبت به گروه کنترل کاهش معناداری نشان داده است (P=0.0007). این ژن یک فاکتور رونویسی کلیدی در مسیر سیگنالینگ Hedgehog است که در فرآیندهای سرطان‌زایی مانند تکثیر سلولی و متاستاز نقش دارد. کاهش بیان آن می‌تواند نشان‌دهنده اثر بازدارندگی CM بر این مسیر مهم سرطان‌زایی باشد (شکل ۲).

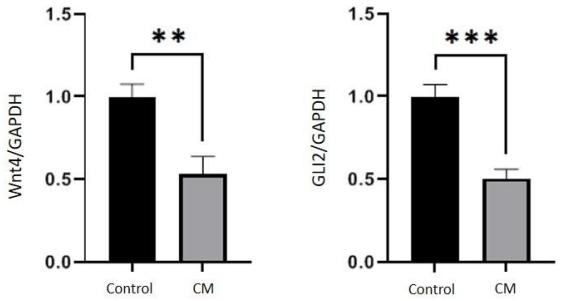


Figure 2: Chart comparing the expression levels of Wnt4 and GLI2 genes in MCF-7 cells between the control and treatment groups

شکل ۲: نمودار مقایسه سطوح بیان ژن‌های Wnt4 و GLI2 در سلول‌های MCF-7 بین گروه‌های کنترل و تیمار

۴. ارزیابی سطح فاکتورهای التهابی و ضدالتهابی در سلول‌های سرطانی دریافت کننده CM

در مقایسه با گروه کنترل، تیمار سلول‌های سرطانی با CM منجر به ایجاد یک اثر ضدالتهابی گردید. این اثر با کاهش معنادار سطح دو سیتوکین کلیدی پیش‌التهابی، IL6 (P=0.0155) و TNFα (P=0.0073) در محیط سلول‌های تیمارشده مشخص شد. این یافته نشان می‌دهد که CM نه تنها مسیرهای رشد سلول سرطانی (مانند WNT و Hedgehog) را مهار می‌کند، بلکه می‌تواند محیط میکروتوموری را نیز با سرکوب التهاب مزمن مرتبط با سرطان، تعدیل کند. این اثر دوگانه، پتانسیل درمانی مشتقات MSCs را در رویکردهای ترکیبی ضد سرطان تقویت می‌نماید (شکل ۳).

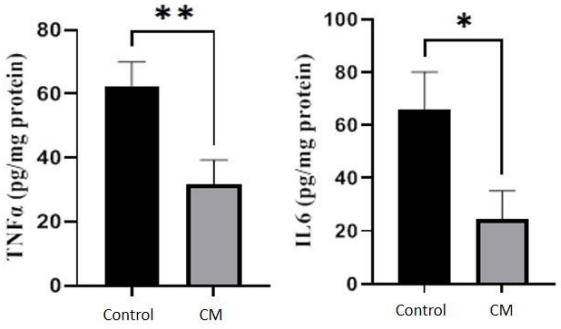


Figure 3: Chart comparing the secretion levels of IL6 and TNFα in MCF-7 cells between the control and treatment groups

شکل ۳: نمودار مقایسه میزان ترشح IL6 و TNFa در سلول‌های MCF-7 بین گروه‌های کنترل و تیمار

بحث

در این مطالعه، برای اولین بار تأثیر سوپرناتانت سلول‌های مشتق از بافت ریه جنین جوجه بر رده سلولی MCF-7 انجام شد. نتایج نشان داد که مواجهه سلول‌های سرطانی با این سوپرناتانت باعث کاهش بیان ژن‌های GLI2 و WNT4، به‌عنوان تنظیم‌کننده‌های کلیدی مسیرهای Hedgehog و Wnt، و همچنین کاهش عوامل التهابی مانند TNFα و IL6 شده است. این یافته می‌تواند حاکی از مهار مسیرهای مولکولی مرتبط با رشد و تکثیر سلول‌های سرطانی در پاسخ به اجزای زیستی ترشح‌شده از سلول‌های بنیادی است. به بیان دیگر، به‌کارگیری سوپرناتانت باعث ایجاد نوعی حالت مهاری در مسیرهای سیگنال‌دهی مرتبط با سرطان پستان شده است.

Li و همکاران (۲۰۱۷) نشان دادند که سوپرناتانت MSC بافت چربی، تولید سایتوکاین‌های التهابی IL1، TNFα و IL6 را در مدل حیوانی و ماکروفاژهای تحریک‌شده با LPS کاهش داده و تخریب استخوان ناشی از التهاب را مهار می‌کند. در مطالعه حاضر نیز سطح TNFα و IL6 در گروه تیمار با LCM پایین‌تر بود. به نظر می‌رسد کاهش این فاکتورها، مسیرهای رشد مانند Wnt و Hedgehog را مهار کرده و بیان WNT4 و GLI2 را کاهش داده است. در هر

دو مطالعه، فاکتورهای ترشح‌شده از سلول‌های بنیادی بدون مداخله دارویی مستقیم، التهاب و تخریب را کاهش دادند که نشان‌دهنده توانایی این ترکیبات در هدف‌گیری چندین مسیر کلیدی التهاب، رشد و بقای سلول است (۱۸).

Ulldemolins و همکاران (۲۰۲۲) نشان دادند که وزیکول‌های حاصل از سلول‌های MSC پتانسیل درمانی بالایی برای ترمیم بافت دارند (۱۹). Visweswaran و همکاران (۲۰۱۷) سوپرناتانت MSCهای بافت چربی موجب کاهش زنده‌مانی MCF-7، القای آپوپتوز و سرکوب β-catenin،Cyclin D1 و Bcl-xL می‌شود. این نتایج با کاهش WNT4 در تحقیق حاضر هم‌راستا است و تأیید می‌کند که مهار مسیر Wnt/β-catenin یکی از مکانیسم‌های اصلی اثر ضدسرطانی MSCهاست (۲۰).

Yu و همکاران (2023) اثرات محافظتی فاکتور رشد کراتینوسیت (KGF) ترشح‌شده توسط سلول‌های MSC بر آسیب حاد ریوی (ALI) بررسی کردند. نتایج این گروه نشان داد که MSC-CM و KGF می‌توانند شدت ادم ریوی مرتبط با التهاب را در موش‌های مبتلا به ALI کاهش دهند (۲۱). Canals و همکاران (۲۰۲۲) فنوتیپ بدخیم سلول‌های سرطان ریه را در محیط شرطی‌شده مزانشیم ریه جنینی انسان (hEML-CM) مورد بررسی قرار دادند. سلول‌های سرطان ریه مورفولوژی اپیتلیالی خود را از دست دادند، ویژگی‌های مزودرمی به دست آوردند و میزان رشد، تکثیر، مهاجرت و توانایی تشکیل کلنی در محیط دوبعدی و سه‌بعدی کاهش یافت (۲۲). پاشایی اصل و همکاران (۲۰۲۲) نشان دادند که سوپرناتانت MSC باعث القای آپوپتوز در سلول‌های سرطانی شده، که با افزایش بیان ژن pro-apoptotic یعنی Bax و کاهش بیان ژن ضد آپوپتوزی Bcl-2 همراه بوده است. همچنین افزایش بیان پروتئین P53 به‌عنوان عامل کلیدی در مرگ برنامه‌ریزی شده سلول مشاهده شد (۲۳). Sottnik و همکاران (۲۰۲۴) گزارش کردند که WNT4 نقش مهمی در تنظیم متابولیسم میتوکندری در سلول‌های سرطان پستان دارد و اختلال در این مسیر با فنوتیپ‌های متابولیکی خاص مرتبط است (۱۲). کاهش بیان WNT4 در مطالعه حاضر می‌تواند به اختلال در تنظیم متابولیسم سلول‌های سرطانی منجر شود و این پدیده ممکن است یکی از دلایل کاهش رشد یا بقاء سلول‌ها تحت تأثیر سوپرناتانت باشد. به عبارت دیگر، تغییر در بیان WNT4 نه تنها یک رویداد مولکولی ساده نیست، بلکه بر فرآیندهای بنیادی متابولیسم سلولی هم تأثیر دارد.

Harman و همکاران (۲۰۲۲) سلول‌های MSC را از خون محیطی جوجه جداسازی کردند. محیط شرطی‌شده این سلول‌ها رشد استافیلوکوکوس اورئوس پلانکتونیک و به‌طور چشمگیرتری، رشد استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین (MRSA) را مهار کرد، چسبندگی فیبروبلاست‌ها را کاهش و مهاجرت آن‌ها را افزایش داد و از تشکیل لوله‌های سلول‌های اندوتلیال پشتیبانی کرد (۲۴). Massah و همکاران (۲۰۲۱) بیان کردند که استرادیول با فعال کردن ERα موجب تثبیت کمپلکس‌های هسته‌ای ERα–GLI3 شده و در نهایت بیان ژن‌های هدف مسیر Hedgehog را افزایش می‌دهد. در چنین شرایطی، سرکوب GLI یا حذف آن باعث کاهش قابل توجه در تکثیر سلول‌های سرطانی می‌شود (۲۵).

طبق یافته‌های مطالعه حاضر، اگر مسیر فعال شدن GLI در سلول‌های سرطانی به واسطه‌ی تعامل با ERα رخ می‌دهد، این احتمال وجود دارد که سوپرناتانت می‌تواند با ایجاد اختلال در این تعامل یا با سرکوب بیان خود گیرنده یا فاکتورهای پایین‌دستی، فعالیت مسیر Hedgehog را خاموش کند.

با وجود اینکه مطالعه حاضر اثر مهاری محیط CM را نشان داد، باید در نظر داشت که تأثیر سلول‌های MSC بر تومور به عواملی مانند بافت منشأ MSC، دوز، زمان و نوع تومور وابسته است. برخی پژوهش‌ها گزارش کرده‌اند که MSCها ممکن است از طریق ترشح فاکتورهای رشد یا ایجاد مقاومت دارویی، روند پیشرفت تومور را نیز تسریع کنند. ازاین‌رو، کاربرد بالینی CM مستلزم ارزیابی‌های ایمنی‌شناختی دقیق و رویکردی شخصی‌سازی شده است (۲۶، ۲۷).

مطالعات تطبیقی نشان داده‌اند که برخی از فاکتورهای رونویسی حفاظت‌شده بین پرندگان و انسان درصد بالایی از همولوژی در سطح پروتئین دارند. موتیف‌های اتصال فاکتورهای رونویسی در مهره‌داران، ازجمله پرندگان و پستانداران، در سطح وسیعی حفاظت شده‌اند و موتیف‌های اتصال یکسانی بین گونه‌های پرندگان و انسان نشان می‌دهند. بنابراین، این همولوژی بالا استفاده از ترشحات سلول‌های پرندگان را در سلول MCF-7 را توجیه می‌کند (۲۸، ۲۹).

یکی از محدودیت‌های اساسی مطالعه حاضر، عدم امکان تأیید ماهیت سلول‌های مشتق از بافت ریه با استفاده از مارکرهای استاندارد بود (۳۰). به دلیل عدم دسترسی به آنتی‌بادی‌های اختصاصی که قابلیت برهم‌کنش متقاطع با آنتی‌ژن‌های سطحی سلول‌های جوجه را داشته باشند، امکان انجام فلوسایتومتری برای مارکرهای CD44+, CD45-, CD90+ و CD34- وجود نداشت. بنابراین، شناسایی سلول‌های MSC صرفاً براساس معیارهای ریخت‌شناختی (مورفولوژی دوکی) و قابلیت حیات (بیش از ۹۰ درصد) صورت پذیرفت. همچنین، سطح پایه IL6 و TNFα در نمونه به تنهایی و در غیاب سلول‌های MCF-7 مورد ارزیابی قرار نگرفت. این امر تفسیر دقیق میزان افزایش واقعی این سیتوکاین‌ها را که صرفاً ناشی از پاسخ سلول‌های توموری به CM باشد، با محدودیت مواجه می‌سازد. عدم انجام تست سمیت سلولی مانند MTT نیز یکی دیگر از محدودیت‌های این پژوهش است. گرچه شواهد غیرمستقیم شامل مورفولوژی سلولی و افزایش p53 حاکی از توقف چرخه سلولی است، اما احتمال اثرات سیتوتوکسیک غیراختصاصی بر کاهش بیان Cyclin D1 را نمی‌توان رد کرد.

نتیجه‌گیری

در این مطالعه، سوپرناتانت سلول‌های مشتق از بافت ریه جنین جوجه باعث کاهش بیان ژن‌های WNT4 و GLI2 در سلول‌های MCF-7 شد که با کاهش سایتوکاین‌های التهابی TNFα و IL6 همراه بود. این یافته‌ها نشان می‌دهد که ترکیبات ترشح شده از سلول‌های ریه، با تأثیر بر مسیرهای التهاب و رشد، می‌توانند به‌عنوان یک مدل پایه در مهار ویژگی‌های تهاجمی سلول‌های سرطان پستان عمل کنند.

تشکر و قدردانی

نویسندگان مراتب تشکر صمیمانه خود را از واحد پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی اهواز و واحد توسعه تحقیقات بالینی بیمارستان امام خمینی (ره) اعلام می‌کنند. مقاله حاضر منتج از پایان‌نامه به شماره CRC-0406 است.

تعارض منافع

هیچکدام از نویسندگان مقاله تعارض منافعی برای انتشار آن ندارند.

منابع

1. Singareeka Raghavendra A, Damodaran S, Barcenas CH, Fuqua SA, Layman RM, Tripathy D. Personalizing therapies over the course of hormone receptor-positive/HER2-negative metastatic breast cancer. CA: A Cancer Journal for Clinicians. 2026;76(1):e70055. doi:10.3322/caac.70055
2. Xiong X, Zheng L-W, Ding Y, Chen Y-F, Cai Y-W, Wang L-P, et al. Breast cancer: pathogenesis and treatments. Signal transduction and targeted therapy. 2025;10(1):49. doi: 10.1038/s41392-024-02108-4
3. Li X, Zhang H, Yang H, Song Y, Zhang F, Wang A. Modifiable risk factors for breast cancer: insights from systematic reviews. Public Health Nursing. 2025;42(2):1060-71. doi:10.1111/phn.13504
4. Hui M, Cazet A, Nair R, Watkins DN, O'Toole SA, Swarbrick A. The Hedgehog signalling pathway in breast development, carcinogenesis and cancer therapy. Breast Cancer Research. 2013;15(2):203. doi:10.1186/bcr3401
5. Gray A. Hedgehog signaling in Triple-Negative Breast Cancer: Effects on the Tumor Immune Microenvironment: University of Toronto (Canada); 2025. 31934138.
6. García-Martínez A, Pérez-Balaguer A, Ortiz-Martínez F, Pomares-Navarro E, Sanmartín E, García-Escolano M, et al. Hedgehog gene expression patterns among intrinsic subtypes of breast cancer: prognostic relevance. Pathology-Research and Practice. 2021;223:153478. doi:10.1016/j.prp.2021.153478
7. Skoda AM, Simovic D, Karin V, Kardum V, Vranic S, Serman L. The role of the Hedgehog signaling pathway in cancer: A comprehensive review. Bosnian journal of basic medical sciences. 2018;18(1):8. doi:10.17305/bjbms. 2018.2756
8. Cong G, Zhu X, Chen XR, Chen H, Chong W. Mechanisms and therapeutic potential of the hedgehog signaling pathway in cancer. Cell Death Discovery. 2025;11(1):40. doi:10.1038/s41420-025-02327-w

9. Jaremba EA, Beadle E, Rhoades J. Gli2 regulation of EMT in TNBC invasion. Cancer Research. 2026;86:4844. doi:10.1158/1538-7445.AM2026-4844
10. Gray A, Shen Q, Marini W, Murakami K, Ohashi P, Reedijk M. Targeting tumoral GLI1 in triple-negative breast cancer: A novel strategy to reverse the immunosuppressive microenvironment. Cancer Research. 2026;86(7)173. doi:10.1158/1538-7445.AM2026-173
11. Chronopoulou E, Koika V, Tsiveriotis K, Stefanidis K, Kalogeropoulos S, Georgopoulos N, et al. Wnt4, Wnt6 and β-catenin expression in human placental tissue–is there a link with first trimester miscarriage? Results from a pilot study. Reproductive Biology and Endocrinology. 2022;20(1):51. doi:10.1186/s12958-022-00923-4
12. Sottnik JL, Shackleford MT, Robinson SK, Villagomez FR, Bahnassy S, Oesterreich S, et al. WNT4 regulates cellular metabolism via intracellular activity at the mitochondria in breast and gynecologic cancers. Cancer Research Communications. 2024;4(1):134-51. doi:10.1158/2767-9764.CRC-23-0275
13. Kurzava Kendall L, Ma Y, Yang T, Lubecka K, Stefanska B. Epigenetic effects of resveratrol on oncogenic signaling in breast cancer. Nutrients. 2024;16(5):699. doi:10.3390/nu16050699
14. Wong RSY, Tan EW, Goh BH. Mesenchymal stem cell-based therapies: challenges and enhancement strategies. Cell Biochemistry and Biophysics. 2026;84(1):131-47. doi:10.1007/s12013-025-01895-z
15. Warzycha M, Oleksiuk A, Suska O, Kolanowski TJ, Rozwadowska N. Engineered Mesenchymal Stromal Cells in Oncology: Navigating Between Therapeutic Delivery and Tumor Promotion. Genes. 2026;17(1):108. doi:10.3390/genes17010108
16. Garcia GL, Baruwal R, Suresh S, Britt AK, Li A, Atiya HI, et al. Mesenchymal stromal/stem cells in tumour initiation, progression and therapy. Nature Reviews Cancer. 2026, 26(8):604-619. doi:10.1038/s41568-026-00936-w
17. Chang Y-H, Wu K-C, Ding D-C. Extracellular Vesicles from Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells Modulate Proliferation, Migration, and Chemosensitivity in Ovarian Cancer Cells. International Journal of Molecular Sciences. 2026;27(5):2468. doi:10.3390/ijms27052468
18. Li Y, Gao X, Wang J. Human adipose-derived mesenchymal stem cell-conditioned media suppresses inflammatory bone loss in a lipopolysaccharide-induced murine model. Experimental and Therapeutic Medicine. 2017;15:1839-46. doi:10.3892/etm.2017.5606
19. Ulldemolins A, Jurado A, Herranz-Diez C, Gavara N, Otero J, Farré R, et al. Lung Extracellular Matrix Hydrogels-Derived Vesicles Contribute to Epithelial Lung Repair. Polymers. 2022;14(22):4907. doi:10.3390/polym14224907
20. Visweswaran M, Arfuso F, Dilley RJ, Newsholme P, Dharmarajan A. The inhibitory influence of adipose tissue-derived mesenchymal stem cell environment and Wnt antagonism on breast tumour cell lines. The International Journal of Biochemistry & Cell Biology. 2018;95:63-72. doi:10.1016/j.biocel.2017.12.013
21. Yu T, Cui Y, Xin S, Fu Y, Ding Y, Hao L, et al. Mesenchymal stem cell conditioned medium alleviates acute lung injury through KGF-mediated regulation of epithelial sodium channels. Biomedicine & Pharmacotherapy. 2023;169:115896. doi:10.1016/j.biopha.2023.115896
22. Canals J, Navarro A, Vila C, Canals JM, Díaz T, Acosta-Plasencia M, et al. Human embryonic mesenchymal lung-conditioned medium promotes differentiation to myofibroblast and loss of stemness phenotype in lung adenocarcinoma cell lines. Journal of Experimental & Clinical Cancer Research. 2022;41(1):37. doi:10.1186/s13046-021-02206-z
23. Pashaei-Asl R, Pashaiasl M, Ebrahimie E, Ataei ML, Paknejad M. Apoptotic effects of human amniotic fluid mesenchymal stem cells conditioned medium on human MCF-7 breast cancer cell line. BioImpacts : BI. 2022;13:191-206. doi:10.34172/bi.2022.23813
24. Harman RM, Churchill KA, Parmar S, Van de Walle GR. Mesenchymal stromal cells isolated from chicken peripheral blood secrete bioactive factors with antimicrobial and regenerative properties. Frontiers in

Veterinary Science. 2022; 9:949836. doi:10.3389/fvets.2022.949836
25. Massah S, Foo J, Li N, Truong S, Nouri M, Xie L, et al. Gli activation by the estrogen receptor in breast cancer cells: Regulation of cancer cell growth by Gli3. Molecular and Cellular Endocrinology. 2021;522:111136. doi:10.1016/j.mce.2020.111136
26. Asadpour A, Cottrell GS, Widera D. Pro- and Anti-tumorigenic effects of MSC secretome in Glioblastoma: mechanisms and therapeutic implications. Stem cell reviews and reports. 2026:1-13. doi:10.1007/s12015-026-11082-z
27. Alpeeva EV, Ryabchenko AS, Vorotelyak EA. Characterization, preconditioning, safety, and other issues of MSC-derived EVs and secretome. International Journal of Molecular Sciences. 2026;27(4):1688. doi:10.3390/ijms27041688
28. Hecker N, Kempynck N, Mauduit D, Abaffyová D, Vandepoel R, Dieltiens S, et al. Enhancer-driven cell-type comparison reveals similarities between mammalian and avian pallia. Science. 2025;387(6735):eadp3957. doi:10.1126/science.adp3957
29. Ye Ge YG, Liang ChaiHong LC, Hua DengGuo HD, Song LeiYong SL, Xiang YangGuo XY, Guang Chen GC, et al. Phylogenetic analysis and pathogenicity assessment of two strains of avian influenza virus subtype H9N2 isolated from migratory birds: high homology of internal genes with human H10N8 virus. 2016. 7:57. doi:10.3389/fmicb.2016.00057
30. Farzaneh M, Attari F, Mozdziak P, Khoshnam S. The evolution of chicken stem cell culture methods. British poultry science 2017;58(6):681-6. doi:10.1080/00071668.2017.1365354