Iranian Journal of Breast Diseases. 2026; 19(2):134-149

Original Article

Investigating the effect of supernatant from embryonic chicken liver hepatocyte cells on the secretion of the inflammatory factor IL-6, the anti-Inflammatory factor IL-10, and the expression of CyclinD1 and P53 genes in the MCF-7 breast cancer cell line

Mojtaba Sasani[1,2], Arezoo Oraki[3], Zahra Nazeri[4], Negar Sasani[5], Maryam Farzaneh[2,6]✉

[1] Department of Emergency Medicine, School of Medicine, Ahvaz Jundishapur University of Medical Sciences, Ahvaz, Iran
[2] Fertility, Infertility and Perinatology Research Center, Ahvaz Jundishapur University of Medical Sciences, Ahvaz, Iran
[3] Student Research Committee, Ahvaz Jundishapur University of Medical Sciences, Ahvaz, Iran
[4] Department of Biochemistry, School of Medicine, Ahvaz Jundishapur University of Medical Sciences, Ahvaz, Iran
[5] Department of Basic Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran
[6] Clinical Research Development Unit, Imam Khomeini Hospital, Ahvaz Jundishapur University of Medical Sciences, Ahvaz, Iran

Received: 2025/09/15
Accepted: 2026/06/13

***Corresponding Author:**
Maryamfarzaneh1394@gmail.com

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

Abstract

Introduction: The tumor microenvironment and factors secreted by adjacent cells play a crucial role in the progression or inhibition of cancer. This study was designed to investigate the effect of supernatant from chick embryo hepatocytes on the protein levels of the inflammatory (IL-6) and anti-inflammatory (IL-10) factors, as well as the expression of cell cycle-related genes, in a breast cancer cell line (MCF-7).

Methods: In this in vitro experimental study, hepatocytes were isolated from chick embryo livers on the 10th day of incubation and cultured in DMEM/F12 medium containing 10% fetal bovine serum (FBS). After 48 hours, the supernatant was collected and filtered. MCF-7 cells were divided into two groups: control (treated with basal medium) and intervention (treated with supernatant), and incubated for 48 hours. IL-6 and IL-10 cytokine levels in the supernatant of MCF-7 cells were assessed using ELISA, and relative expression of cyclin D1 and P53 genes was assessed using Real-Time PCR. Data analysis was performed using SPSS version 26, and an independent t-test was conducted at a significance level of 0.05.

Results: Treatment of MCF-7 cells with hepatocyte supernatant significantly increased the protein levels of IL-10 (P=0.015) and IL-6 (P=0.013) in MCF-7 cells. Also, in these cells, P53 expression increased significantly (P=0.002), and Cyclin D1 expression decreased significantly (P=0.045).

Conclusion: Hepatocyte cell supernatant can exert regulatory and potential antitumor effects on the MCF-7 cell line by inducing IL-10 expression, activating the P53-dependent pathway, and inhibiting Cyclin D1 expression. However, the concomitant increase in inflammatory factor IL-6 requires further mechanistic studies.

Keywords: Breast cancer, Supernatant, Hepatocyte cell, Liver, Chicken, Interleukin-6, Interleukin-10

[Downloaded from ijbd.ir on 2026-09-15]

[DOI: 10.66224/ijbd.19.2.8]

Copyright © 2026 Sasani 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 remains the most common malignancy among women worldwide and the second leading cause of cancer-related death in this population (1); even with adjuvant chemotherapy, five-year survival in metastatic disease remains below 30% (2). Tumor behavior is shaped not only by cell-intrinsic genetic and epigenetic alterations arising from mutations in genes such as Breast Cancer Gene 1/2 (BRCA1/2) but also by hormonal, lifestyle, and environmental exposures. However, it is increasingly recognized as being modulated by paracrine signals originating from the surrounding and even distant non-malignant tissue microenvironment.(3).

Two processes central to malignant progression are cytokine-driven remodeling of the tumor immune milieu and dysregulation of apoptosis. Interleukin-6 (IL-6) promotes invasion, metastasis, and angiogenesis via vascular endothelial growth factor (VEGF) induction (4), whereas interleukin-10 (IL-10) is a pleiotropic anti-inflammatory cytokine that suppresses pro-inflammatory mediators such as tumor necrosis factor- α (TNF-α), interleukin-6 (IL-6), and interleukin-1β (IL-1β) (5). In parallel, Cyclin D1, which is overexpressed in 34–81% of breast cancers and associated with more favorable prognostic features, drives G1-to-S phase progression through cyclin-dependent kinases4/6 (CDK4/6) complexes under estrogenic stimulation (6), while p53 functions as the principal guardian against unchecked proliferation, triggering cell-cycle arrest or apoptosis in response to cellular stress.

Hepatocyte cultures are known to secrete a broad range of cytokines and signaling molecules capable of modulating immune responses (7)Whether the secretome of a distant, non-malignant tissue, such as embryonic liver, can influence breast tumor cell behavior has not previously been examined. This gap in the literature motivated the present investigation into chick embryo hepatocyte-derived conditioned medium (CM) as a paracrine modulator of the Michigan Cancer Foundation-7 (MCF-7) breast cancer cell line.

This study aimed to determine, in an in vitro model, whether the secretome of primary hepatocytes isolated from day-10 chick embryos alters (i) the inflammatory (IL-6) and anti-inflammatory (IL-10) cytokine profile secreted by MCF-7 cells, and (ii) the expression of the cell-cycle regulators Cyclin D1 and P53 in this same cell line. The principal contribution of this work is proof-of-concept evidence that a heterologous, non-malignant, non-stem-cell secretome derived from differentiated avian embryonic hepatocytes, rather than from mesenchymal stem cells, which dominate the existing paracrine-oncology literature, can simultaneously reprogram proliferative and immunological signaling pathways in a human breast cancer model. This extends the conceptual framework of tumor-microenvironment paracrine modulation beyond stem-cell secretomes to differentiated somatic cell sources.

Materials and Methods

Following approval by the institutional ethics committee of Ahvaz Jundishapur University of Medical Sciences (approval code IR.AJUMS.HGOLESTAN.REC.1404.03), ten specific-pathogen-free fertilized (SPF^{-}) White Leghorn (Gallus gallus domesticus) eggs were obtained from a commercial farm and incubated for ten days (embryonic day 10, E10) under standard hatchery conditions, in accordance with institutional Laboratory Animal Care and Use guidelines. The embryonated eggs were then removed from the incubator and transferred to a laminar flow hood. The eggshells were thoroughly washed with warm water, and their surface was disinfected with 70% alcohol. Under a stereo microscope, brown liver tissue in the abdominal area was separated and transferred to a microtube containing buffer and antibiotics, and then cut into small

[Downloaded from ijbd.ir on 2026-09-15]

[DOI: 10.66224/ijbd.19.2.8]

pieces with a sterile blade or scissors. 0.25% trypsin-EDTA (Sigma, USA) was used for 10 minutes to digest the pieces. The cells were quenched with 10% FBS-supplemented medium, pelleted by centrifugation (1000 rpm, 5 min), and expanded in DMEM/F12 supplemented with FBS. After 2-3 days of incubation, phase contrast microscopy revealed hexagonal hepatocytes forming large and monolayer colonies. Once cultures reached a density of 2×10^5 cells/mL, they were switched to serum-free medium for 48 hours to generate CM. The CM was then centrifuged and filtered to remove cellular debris and stored at −80°C; protein concentration, measured by Thermo Fisher Scientific, Pierce™ BCA assay, ranged from 800–1200 µg/mL.

MCF-7 cells (obtained from the Iranian Biological Resource Center) were cultured in RPMI/Glutamax medium with 10% FBS at 37°C, 90% humidity, and 5% CO_2. At 85% confluence, cells were randomly assigned to a control group (serum-containing basal medium only) or an intervention group (treated with CM for 48 hours). IL-6 and IL-10 protein levels in MCF-7 cell supernatants were quantified by sandwich ELISA (Abcam human-specific kits) in technical triplicate, following the manufacturer's protocol, with quantification against a standard curve at 450 nm. Cyclin D1 and P53 mRNA expression was assessed by qRT-PCR (SYBR Premix Ex Taq II reagent, ABI StepOne instrument) using GAPDH as the housekeeping gene, with relative expression calculated by the $2^{-}\Delta\Delta CT$ method (REST software).

All assays were performed with 3–5 biological replicates per group. Data normality was assessed using the Shapiro-Wilk test; between-group comparisons were performed using an unpaired t-test (GraphPad Prism 9.0), with statistical significance set at $p<0.05$.

Results

Hepatocytes isolated from E10 chick embryo livers formed broad, confluent monolayer colonies within two to three days of culture. Individual cells displayed the characteristic polygonal (five- to six-sided) morphology, prominent nucleoli, and peripheral cytoplasm typical of differentiated, functional hepatocytes, confirming both the viability and phenotypic identity of the secretome source.

MCF-7 cells adhered and began spreading within 24 hours of plating and, by 72 hours, formed confluent, high-density monolayers with fibroblastoid/epithelioid morphology consistent with the known invasive and rapidly proliferative phenotype of this line, providing a suitable and reproducible substrate for testing the intervention.

Following 48-hour exposure to hepatocyte-derived CM, MCF-7 cells showed a statistically significant increase in P53 mRNA expression relative to control cells (P=0.0018) and a statistically significant decrease in Cyclin D1 expression (P=0.0446). In parallel, both cytokines assessed were significantly elevated in the CM-treated group relative to control: IL-10 protein levels increased (P=0.0153), as did IL-6 protein levels (P=0.0134). Taken together, hepatocyte CM concurrently activated a p53–Cyclin D1 axis consistent with cell-cycle arrest and induced a mixed cytokine response combining an anti-inflammatory signal (IL-10) with a pro-inflammatory one (IL-6).

Discussion

The concurrent rise in p53 and fall in Cyclin D1 provides complementary molecular evidence of an anti-proliferative, likely G1-arrest-inducing, effect of hepatocyte-derived secretory factors on MCF-7 cells. By analogy with Noori et al., who showed that the natural compound tehranolide induces G1 arrest and apoptosis in MCF-7 cells via suppression of the PI3K/Akt pathway upstream of Cyclin D1 transcription (8). The pattern observed here is compatible with inhibition of this same signaling axis by hepatocyte CM, although

[Downloaded from ijbd.ir on 2026-09-15]

[DOI: 10.66224/ijbd.19.2.8]

downstream pathways were not directly interrogated in the present study.

The increase in IL-10 parallels prior reports that paracrine secretomes from mesenchymal stem cells. For instance, Wharton's jelly-derived stem cells similarly modulate the cytokine output of MCF-7 cells (9), lending support to a broader principle that secretory factors from diverse normal-tissue sources, whether stem or fully differentiated, can substantially reprogram tumor cytokine signaling networks.

The simultaneous increase in IL-6, a cytokine generally associated with tumor promotion, appears at first paradoxical alongside an otherwise anti-proliferative molecular signature. One plausible interpretation is that IL-6 elevation reflects an adaptive cellular stress response, potentially engaging IL-6/JAK/STAT3 survival signaling as an escape mechanism against p53-mediated growth suppression. This dual pattern differs from that reported by Kostolomova et al., who found that chick-embryo-cell supernatant exerted a uniformly anti-inflammatory effect (reduced IL-6, TNF-α, and IL-1β; increased IL-4 and IL-5) in an animal model of parasitic infection (10). This divergence underscores that the direction of cytokine modulation by hepatocyte-derived secretome is highly context-dependent. Within an already pro-inflammatory tumor microenvironment, such as that of MCF-7 cells, the same secretome elicits a mixed, rather than uniformly anti-inflammatory, response.

This study has several limitations. Reliance on a single breast cancer cell line (MCF-7) and two-dimensional culture does not fully capture tumor heterogeneity or the complexity of in vivo microenvironmental interactions. Future studies should incorporate multiple hepatocyte cell lines and 3D spheroid/organoid models better to mimic tumor heterogeneity and the in vivo microenvironment.

Our assessment was restricted to four molecular markers (IL-6, IL-10, Cyclin D1, and P53) without direct interrogation of downstream signaling pathways such as PI3K/Akt, JAK/STAT3, or NF-κB, which limits mechanistic certainty. Finally, the xenogeneic (avian) origin of the secretome and the absence of in vivo validation warrant caution in extrapolating these findings to human physiology.

Conclusion

Chick embryo hepatocyte-derived secretome exerts a dual, context-dependent effect on MCF-7 breast cancer cells: activation of a p53-dependent, Cyclin D1-suppressing anti-proliferative program, occurring alongside a mixed cytokine response marked by increases in both IL-10 and IL-6. These findings support a potential regulatory and antitumor relevance of this secretome while highlighting the need for further mechanistic work to clarify the concurrent IL-6 elevation, ideally through three-dimensional culture models, omics-based profiling of the active secretome constituents, and validation in in vivo breast cancer models.

References

1. Xiong X, Zheng LW, Ding Y, Chen YF, Cai YW, Wang LP, et al. Breast cancer: pathogenesis and treatments. Signal Transduct Target Ther. 2025;10(1):49. doi:10.1038/s41392-024-02108-4
2 .Wilkinson L, Gathani T. Understanding breast cancer as a global health concern. Br J Radiol.2022;95. doi:10.1259/bjr.20211033
3.Agostinetto E, Bruzzone M, Hamy AS, Kim HJ, Chiodi C, Bernstein-Molho R, et al. Characteristics and clinical outcomes of breast cancer in young BRCA carriers according to tumor histology. ESMO Open. 2024;9(10):103714. doi:10.1016/j.esmoop.2024.103714
4. Hirano T. IL-6 in inflammation, autoimmunity and cancer. Int Immunol. 2021;33(3):127-48. doi:10.1093/intimm/dxaa078

[Downloaded from ijbd.ir on 2026-09-15]

[DOI: 10.66224/ijbd.19.2.8]

5. Gao J, Chen Z, Wang Y, Guo L, Fan M, Zhou L, et al. Tumoral IL-10-activated SHP2 in macrophages promotes mammary carcinoma progression. Fundamental Research. 2024. doi:10.1016/j.fmre.2024.03.026
6. Montalto FI, De Amicis F. Cyclin D1 in cancer: a molecular connection for cell cycle control, adhesion and invasion in tumor and stroma. Cells. 2020;9(12):2648. doi:10.3390/cells9122648
7. Wang X, Rao J, Tan Z, Xun T, Zhao J, Yang X. Inflammatory signaling on cytochrome P450-mediated drug metabolism in hepatocytes. Frontiers in pharmacology. 2022;13:1043836. doi:10.3389/fphar.2022.1043836
8. Noori S, Hassan ZM. Tehranolide inhibits proliferation of MCF-7 human breast cancer cells by inducing G0/G1 arrest and apoptosis. Free Radical Biology and Medicine. 2012;52(9):1987. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2012.01.026.
9. Mirabdollahi M, Javanmard SH, Sadeghi-Aliabadi H. In vitro assessment of cytokine expression profile of MCF-7 cells in response to hWJ-MSCs secretome. Advanced Pharmaceutical Bulletin. 2019;9(4):649. doi:10.15171/apb. 2019.075
10. Kostolomova E, Lozovaya P, Polyanskih E, Timokhina TK, Paromova YI. Studying the anti-inflammatory activity of Bifidobacterium bifidum supernatants and chicken embryo cells on a model of opisthochic invasion. Russian Journal of Immunology. 2024;27(2):181-6.

[Downloaded from ijbd.ir on 2026-09-15]

[DOI: 10.66224/ijbd.19.2.8]

مقاله‌پژوهشی

مجله علمی
بیماری‌های پستان ایران
۱۴۰۵؛۱۹(۲):۱۳۴-۱۴۹

بررسی اثر ترشحات سلول‌های هپاتوسیتی بافت کبد جنین جوجه بر میزان ترشح فاکتور التهابی *IL-6*، فاکتور ضدالتهابی *IL-10* و بیان ژن‌های *Cyclin D1* و *P53* در رده سلولی سرطان پستان (*MCF-7*)

مجتبی ساسانی[۱و۲]، آرزو اورکی[۳]، زهرا ناظری[۴]، نگار ساسانی[۵]، مریم فرزانه[۲و۶]✉

[۱]طب اورژانس، گروه طب اورژانس، دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز، اهواز، ایران
[۲]مرکز تحقیقات باروری، ناباروری و سلامت جنین، دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز، اهواز، ایران
[۳]کمیته تحقیقات دانشجویی، دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز، اهواز، ایران
[۴]گروه بیوشیمی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز، اهواز، ایران
[۵]گروه علوم پایه، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه چمران اهواز، اهواز، ایران
[۶]واحد توسعه تحقیقات بالینی، بیمارستان امام خمینی، دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز، اهواز، ایران

تاریخ ارسال: ۱۴۰۴/۰۵/۲۴
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۵/۰۳/۲۳

✉ نویسنده مسئول:
Maryamfarzaneh1394@gmail.com

چکیده

مقدمه: ریز محیط تومور و فاکتورهای ترشح‌شده توسط سلول‌های مجاور نقش تعیین‌کننده‌ای در پیشرفت یا مهار سرطان ایفا می‌کنند. این مطالعه با هدف بررسی اثر سوپرناتانت حاصل از سلول‌های هپاتوسیتی جنین جوجه بر سطوح پروتئینی فاکتورهای التهابی (IL-6) و ضدالتهابی (IL-10) و نیز بیان ژن‌های مرتبط با چرخه سلولی در رده سلولی سرطان پستان (MCF-7) طراحی شد.

روش بررسی: در این مطالعه تجربی *in vitro*، سلول‌های هپاتوسیتی از کبد جنین‌های جوجه در روز دهم انکوباسیون جداسازی و در محیط DMEM/F12 حاوی ۱۰٪ سرم جنینی گاو (FBS) کشت داده شدند. پس از ۴۸ ساعت، سوپرناتانت جمع‌آوری و فیلتر شد. سلول‌های MCF-7 در دو گروه شاهد (تیمار با محیط پایه) و مداخله (تیمار با سوپرناتانت) قرار گرفتند و به مدت ۴۸ ساعت انکوبه شدند. سطوح سیتوکاین‌های IL-6 و IL-10در سوپرناتانت سلول‌های MCF-7 با استفاده از الایزا و بیان نسبی ژن‌های cyclinD1 و P53 با روش Real-Time PCR ارزیابی شد. آنالیز داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۶ و آزمون t-test مستقل انجام شد و سطح معنی‌داری ۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

یافته‌ها: تیمار سلول‌های MCF-7 با سوپرناتانت هپاتوسیتی به‌طور معنی‌داری منجر به افزایش سطح پروتئینی IL-10 (P=0.015)و IL-6 (P=0.013) در سلول‌های MCF-7 شد. همچنین در این سلول‌ها بیان P53 افزایش (P=0.002) و بیان Cyclin D1 کاهش (P=0.045) معنی‌داری یافت.

نتیجه‌گیری: سوپرناتانت سلول‌های هپاتوسیتی می‌تواند با القای بیان IL-10، فعال‌سازی مسیر وابسته به P53 و مهار بیانCyclin D1 ، اثرات تنظیمی و بالقوه ضدتوموری بر رده سلولی MCF-7 اعمال کند. با این حال، افزایش همزمان فاکتور التهابی IL-6 نیازمند بررسی‌های مکانیسمی بیشتر است.

واژه‌های کلیدی: سرطان پستان، سوپرناتانت، سلول هپاتوسیتی، کبد، جوجه، اینترلوکین-۶، اینترلوکین-۱۰

[Downloaded from ijbd.ir on 2026-09-15]

[DOI: 10.66224/ijbd.19.2.8]

مقدمه

سرطان پستان شایع‌ترین سرطان در میان زنان و دومین علت اصلی مرگ‌ومیر ناشی از سرطان در جمعیت زنان جهان به‌شمار می‌رود (۱). میزان بقای پنج‌ساله در بیماران مبتلا به سرطان پستان متاستاتیک، حتی با دریافت شیمی‌درمانی کمکی، کمتر از ۳۰ درصد گزارش شده است (۲). عوامل خطر شناخته‌شده این بیماری شامل سن بالا، جنس مؤنث، سابقه شخصی یا خانوادگی سرطان پستان، برخی ناهنجاری‌های بافت پستان نظیر کارسینوم لوبولار درجا و نیز عوامل ژنتیکی می‌باشد (۳، ۴). اگرچه سرطان پستان در سراسر جهان مشاهده شده و امکان بروز آن پس از بلوغ در هر سنی وجود دارد، احتمال ابتلا با افزایش سن به‌طور چشمگیری افزایش می‌یابد. علیرغم پیشرفت‌های قابل توجه در روش‌های درمانی، اختلاف فاحشی در نرخ بروز و مرگ‌ومیر ناشی از این بیماری میان کشورهای مختلف دیده می‌شود (۵). سرطان پستان یک بیماری ناهمگون و چندعاملی است که در اثر تجمع تدریجی اختلالات ژنتیکی و اپی‌ژنتیکی در سلول‌های اپیتلیال پستان ایجاد می‌شود. این اختلالات می‌تواند ناشی از عوامل درونزاد (مانند جهش‌های ارثی در ژن‌هایی نظیر BRCA1 و BRCA2) یا عوامل برونزاد (مانند مواجهه‌های هورمونی، سبک زندگی و عوامل محیطی) باشد. در نتیجه، وجود سابقه خانوادگی سرطان‌های وابسته به این ژن‌ها، مانند سرطان پستان و تخمدان، یکی از شناخته‌شده‌ترین عوامل خطر برای ابتلای فرد محسوب می‌شود (۶).

یکی از مکانیسم‌های اصلی در درمان سرطان، القای آپوپتوز در سلول‌های سرطانی است. اختلال در تنظیم مرگ برنامه‌ریزی‌شده سلولی (آپوپتوز) نقش کلیدی در ایجاد و پیشرفت سرطان دارد (۷). سلول‌های توموری با بیان فزاینده پروتئین‌های ضدآپوپتوز (BCL-2) یا کاهش/جهش در پروتئین‌های پیش‌برنده آپوپتوز (Bax)، در برابر آپوپتوز مقاومت می‌یابند. بنابراین، هدف قرار دادن مسیرهای آپوپتوز یک راهبرد درمانی مهم محسوب می‌شود (۸). اینترلوکین-۶ (IL-6) که به عنوان یک عامل رشد عمل می‌کند، می‌تواند تهاجم، متاستاز و رگ زایی از طریق القای VEGFدر تومور را افزایش دهد که همگی به بقا و پیشرفت سرطان کمک می‌کنند. از این رو، مطالعه مکانیسم‌های عمل IL-6 در سرطان پستان حائز اهمیت است (۹). در مقابل، IL-10 یک سیتوکاین ضدالتهابی چندوجهی است که عمدتاً توسط سلول‌های ایمنی ترشح شده و با مهار تولید سیتوکاین‌های التهابی مانند TNF-α، IL-6 و IL-1β پاسخ ایمنی را تنظیم می‌کند. این ویژگی آن را به یک کاندید مورد توجه در درمان بیماری‌های التهابی و خودایمنی تبدیل کرده است (۱۰).

Cyclin D1 تنظیم‌کننده‌ای حیاتی در پیشبرد چرخه سلولی از فاز G1 به S است. بیش‌بیانی آن در بخش قابل توجهی (۸۱٪-۳۴٪) از سرطان‌های پستان مشاهده شده و با ویژگی‌های پیش‌آگهی بهتر (مانند مثبت بودن گیرنده‌های هورمونی و درجه تومور پایین) مرتبط است. عملکرد آن از طریق تشکیل کمپلکس با CDK4/6 و تحت تأثیر تحریکی استروژن صورت می‌گیرد (۱۱).

در این میان، کشت سلول‌های هپاتوسیتی ابزار ارزشمندی در تحقیقات زیست‌پزشکی فراهم می‌آورد. ترشحات این سلول‌ها حاوی طیف وسیعی از سیتوکاین‌ها و مولکول‌های سیگنال‌دهنده هستند که پاسخ ایمنی را تنظیم می‌کنند (۱۲، ۱۳). مطالعه این ترشحات در مدل‌های آزمایشگاهی، امکان بررسی تأثیر عوامل مختلف بر سلول‌های سرطانی را فراهم می‌سازد (۱۴).

با وجود نقش کلیدی ریزمحیط تومور در پیشرفت سرطان، بیشتر مطالعات به بررسی اثرات سلول‌های استرومایی هم‌بافت (همانند فیبروبلاست‌های مرتبط با سرطان) بر سلول‌های توموری پرداخته‌اند، در حالی که تأثیر بالقوه ترشحات سلول‌های طبیعی و سالم از بافت‌های دوردست کمتر مورد توجه قرار گرفته است. از این رو، مطالعه حاضر با هدف پاسخ به دو سوال اساسی طراحی شد. اول، بررسی این فرضیه که آیا یک ریزمحیط سلولی «سالم» و در حال تکامل (مانند کبد جنین جوجه) پتانسیل اعمال اثرات تنظیمی بر رفتار سلول‌های سرطانی یک بافت دیگر را دارد یا خیر (اثر فرابافتی یا پاراکرین سیستمیک)؟ و دوم، ارزیابی پتانسیل درمانی این ترشحات به عنوان یک رویکرد تعدیل‌کننده ایمنی و مهارکننده چرخه سلولی. این ایده از مفهوم «اثر ریزمحیطی فرابافتی» در متاستاز نشأت می‌گیرد، نظریه‌ای که بیان می‌کند سلول‌های سرطانی در محل متاستاز (به عنوان مثال، کبد به عنوان یک مقصد شایع متاستاز برای سرطان پستان (۱۵)) تحت تأثیر قابل توجه ترشحات سلول‌های میزبان سالم قرار گرفته و با آنها تعامل برقرار می‌کنند (۱۶). مطالعات متعدد نشان داده‌اند که برهمکنش هتروتایپیک بین سلول‌های سرطانی پستان

[Downloaded from ijbd.ir on 2026-09-15]
[DOI: 10.66224/ijbd.19.2.8]

و سلول‌های کبدی (هپاتوسیت‌ها) می‌تواند منجر به فعال شدن مسیرهای سیگنالینگ کلیدی مانند MAPK و AKT شده و بر سرنوشت سلولی مانند متاستاز و یا خروج از فاز خاموشی تأثیر بگذارد (۱۷، ۱۸). بنابراین، انتخاب رده سلولی سرطان پستان MCF-7 به عنوان مدل سلول هدف، نه‌تنها تصادفی نیست، بلکه بر اساس شواهد محکمی از تمایل ذاتی (ارگانوتروپیسم) سلول‌های سرطان پستان به متاستاز به سمت کبد و وجود تعاملات بیولوژیکی معنادار میان این دو نوع سلول استوار است. هدف این مطالعه، شبیه‌سازی این تعاملات در شرایط آزمایشگاهی و با استفاده از مدل متقابل (کبد-پستان) به منظور درک عمیق‌تر از مکانیسم‌های تعدیل تومور توسط بافت‌های سالم و بررسی قابلیت‌های درمانی بالقوه آن‌ها می‌باشد.

مواد و روش کار

- تهیه تخم مرغ نطفه دار

این مطالعه به صورت تجربی می‌باشد که پس از کسب کد اخلاق IR.AJUMS.HGOLESTAN.REC.1404.038 از دانشگاه علوم پزشکی اهواز بر روی ده تخم مرغ نطفه دار (SPF^-) و یک رده سلولی سرطان پستان (MCF-7) انجام شد. تخم‌های نطفه‌دار از نژاد لگهورن سفید (Gallus gallus domesticus) از یک مزرعه تجاری در اهواز، ایران، که به رعایت استانداردهای صنعتی برای تضمین عملکرد بهینه پرنده معروف است، 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.

- آماده‌سازی سوپرناتانت سلول‌های هپاتوسیتی مشتق از جنین جوجه

در ابتدا تخم مرغ‌های نطفه دار انکوبه نشده و تازه به مدت ده روز در دستگاه جوجه کشی قرار داده شدند. سپس، تخم مرغ‌های حاوی جنین از دستگاه جوجه کشی خارج شدند و به هود لامینار منتقل شدند. پوسته آهکی تخم مرغ‌ها بطور کامل با آب گرم شسته شد و سطح آن با الکل ۷۰٪ پاک گردید و در صورت نیاز از محلول بتادین نیز استفاده شد. جداسازی بافت کبد (بافت قهوه ای رنگ روی ناحیه شکمی) زیر میکروسکپ استریوو انجام شد و سپس به میکروتیوپ حاوی بافر و آنتی بیوتیک انتقال داده شدند.کبد در PBS حاوی آنتی بیوتیک شست وشو داده شد و سپس با تیغ استریل یا قیچی به قطعات ریز تقسیم گردید، قطعات بافتی با آنزیم تریپسین (0.25% trypsin-EDTA, Sigma, USA) به مدت ۱۰ دقیقه هضم شدند. هضم با اضافه کردن محیط کشت حاوی 10% FBS (HyClone) متوقف شد و سلول‌ها با سانتریفیوز ۱۰۰۰ دور بر دقیقه (به مدت ۵ دقیقه) رسوب داده شدند. سپس سلول‌های کبدی در محیط کشت DMEM/F12 (DMEM, Invitrogen) حاوی FBS کشت داده شدند و تعویض محیط به صورت روزانه انجام شد. پس از رسیدن سلول‌ها به تراکم ۸۰ تا ۹۰ درصد کانفلوئنسی، محیط حاوی سرم خارج شد و به ازای هر ۲×۱۰^۵ سلول، ۱ میلی‌لیتر محیط پایه اضافه گردید تا محیط کشت شرطی شده (conditioned medium یا CM) آماده شد. پس از ۴۸ ساعت انکوباسیون، CM جداسازی شد و با انجام سانتریفیوژ و فیلتراسیون، بقایای سلولی از آن حذف و 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 (۱۹).

- 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 10% FBS کشت داده شدند. سپس سلول‌ها در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، رطوبت ۹۰٪ و دی‌اکسیدکربن ۵٪ قرار گرفتند. پنج روز پس از کشت اولیه، سلول‌های MCF-7 پاساژ داده شد و به پلیت ۶ خانه منتقل شدند. پس از رسیدن سلول‌ها به تراکم ۷۰ تا ۸۰ درصد کانفلوئنسی، محیط قدیمی برداشته شد و CM با غلظت پروتئین ۸۰۰ تا ۱۲۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر که به نسبت ۱:۲ با محیط پایه رقیق شده بود، به سلول‌ها اضافه گردید. به گروه کنترل نیز فقط محیط پایه بدون سرم افزوده شد. پس از ۴۸ ساعت،

[Downloaded from ijbd.ir on 2026-09-15]

[DOI: 10.66224/ijbd.19.2.8]

سوپرناتانت سلول‌های MCF-7 جمع‌آوری و در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

- ارزیابی سطح پروتئینی فاکتورهای التهابی و غیر التهابی

به منظور ارزیابی تأثیر ترشحات هپاتوسیتی بر ترشح سیتوکاین‌ها، سطح پروتئینی فاکتور التهابی IL-6 و فاکتور ضدالتهابی IL-10 در سوپرناتانت سلول‌های MCF-7، ۴۸ ساعت پس از تیمار، 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 با آنتی‌بادی اختصاصی ضد سیتوکاین مورد نظر، 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 (۲۰).

- بررسی بیان ژن توسط qRT-PCR

برای بررسی تغییرات بیان ژن، RNA کل از سلول‌های MCF-7 (تیمار و کنترل) استخراج شد و مطابق دستورالعمل کیت، استخراج RNA انجام گرفت. سپس DNA مکمل (cDNA) با استفاده از کیت RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis ساخته شد. آزمایش Real-Time PCR با استفاده از کیت SYBR Premix Ex Taq™ II و دستگاه ABI Step One و پرایمرهای اختصاصی برای هر ژن انجام شد. ژن GAPDH به‌عنوان ژن Housekeeping انتخاب گردید. آنالیز داده‌ها با روش $\Delta\Delta CT-^{\wedge}۲$ و با استفاده از نرم‌افزار REST تحلیل شد (۲۱).

- روش محاسبه اندازه نمونه و آنالیز آماری

در هر گروه حداقل سه الی ۵ تکرار انجام شد. در قسمت آمار استنباطی ابتدا توزیع طبیعی متغیرها با استفاده از آزمون شاپیروویلک ارائه شده است. سپس بررسی تغییرات بین گروهی متغیرهای تحقیق توسط تحلیل محاسبات آماری با استفاده از نرم افزار GraphPad Prism (9.0) با استفاده از آنالیز Unparied T test و سپس آزمون Shapiro-Wilk test در سطح معنی داری 0.05 ارزیابی شدند. داده‌ها به صورت میانگین ± انحراف معیار گزارش شدند. سطح معنی داری داده‌ها در سطح $p<0.05$ در نظر گرفته شد. اختلاف اماری معنی دار بین گروه‌های مختلف با علامت *،**،***،**** با سطح معنی داری، $p<0.01$ ، $p<0.05$ ، $p<0.001$، $p<0.0001$ نشان داده شد.

نتایج

- کشت، تکثیر و مورفولوژی سلول‌های هپاتوسیتی از جنین جوجه ۱۰ روزه (E10)

برای بررسی تکثیر هپاتوسیت‌ها، 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 و تأیید می‌کرد که پروتکل جداسازی، آسیب شدیدی به سلول‌ها وارد نکرده است (۲۶). دو الی سه روز پس از انکوباسیون، بررسی با میکروسکوپ فاز کنتراست نشان داد که سلول‌ها هپاتوسیتی کلونی‌های وسیع و تک لایه تشکیل دادند که نشان‌دهنده قدرت تکثیر و سازگاری سریع این سلول‌ها در شرایط کشت in vitro بود. هپاتوسیت‌های منفرد درون این کلونی‌ها، ساختار پنج یا شش وجهی، همراه با هسته‌ها و هسته‌های برجسته و سیتوپلاسم حاشیه‌ای را نشان دادند که این ویژگی شاخص هپاتوسیت‌های تمایزیافته و دارای عملکرد بود. این مورفولوژی نشان می‌دهد که سلول‌های کشت داده شده نه تنها زنده بودند، بلکه ویژگی‌های اختصاصی سلول کبدی بالغ را نیز حفظ کرده بودند. این نکته برای این مطالعه حیاتی بود، زیرا هدف،

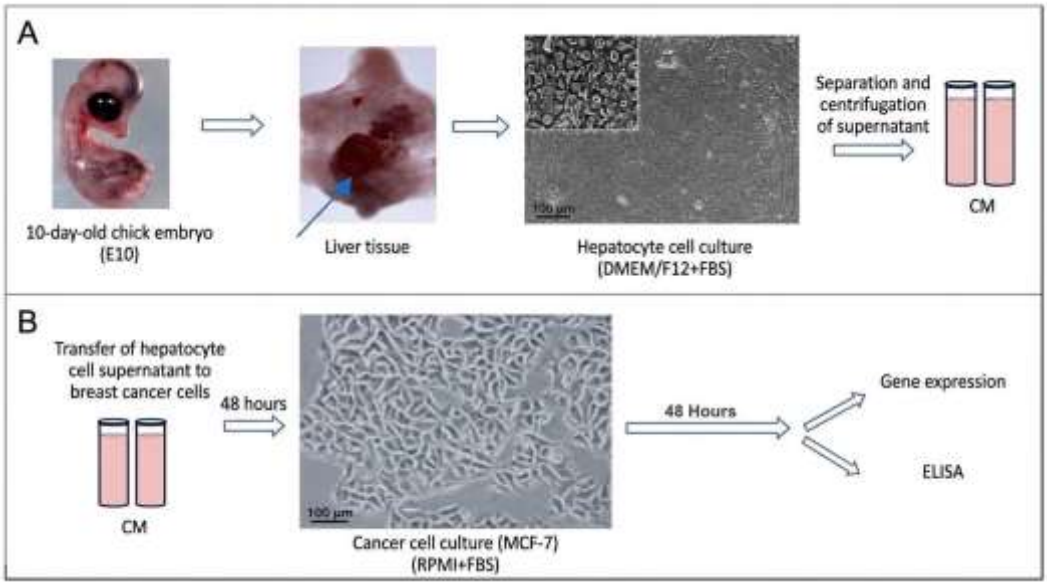
[Downloaded from ijbd.ir on 2026-09-15]

[DOI: 10.66224/ijbd.19.2.8]

استفاده از ترشحات سلول‌هایی بود که فنوتیپ هپاتوسیتی واقعی را داشتند (شکل ۱A).

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

ارزیابی با میکروسکوپ نوری معکوس ۲۴ ساعت پس از کشت، نشان‌دهنده چسبندگی و گسترش سلول‌های سرطانی بر سطح پلیت بود. پس از ۷۲ ساعت، سلول‌های MCF-7مورفولوژی اپیتلیال (چندضلعی تا گرد) یافته و به صورت توده‌های فشرده رشد نمودند. الگوی رشد تک‌لایه همپوشان با تراکم بالا، تأییدی بر رفتار تهاجمی و نرخ تکثیر سریع ذاتی این سلول‌ها بود. بدین‌ترتیب، شرایط مذکور بستر مناسبی برای بررسی اثر CM را فراهم آورد (شکل ۱B).



شکل ۱: جداسازی و کشت سلول‌های هپاتوسیتی جنین جوجه و انتقال سوپرناتانت (conditioned medium) به سلول‌های MCF-7

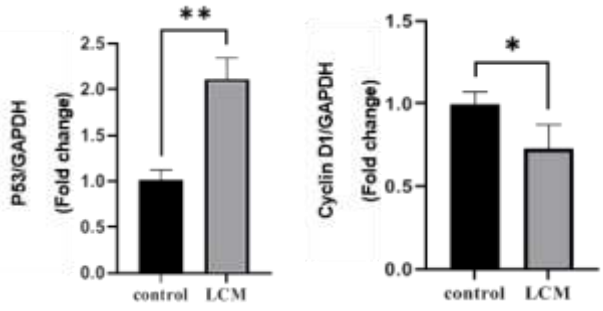
Figure 1: Isolation and Culture of Embryonic Chick Hepatocytes Followed by the Transfer of Their Conditioned Medium to MCF-7 Cells

- ارزیابی بیان ژن در سلول‌های سرطانی دریافت کننده CM

با توجه به نتایج، میزان بیان ژن P53 افزایش ($P=0.001$) و بیان ژن Cyclin D1 به طور معنی‌داری در مقایسه با گروه کنترل کاهش یافته بود ($P=0.04$) (شکل ۲). افزایش بیان p53 قوی‌ترین شاهد مولکولی دال بر فعال شدن مسیرهای دفاعی ضد تومور در سلول‌های MCF-7 تحت تأثیر CM است. p53 پروتئینی است که در پاسخ به استرس‌های سلولی مانند آسیب DNA، استرس اکسیداتیو، سیگنال‌های خارجی فعال می‌شود. افزایش آن می‌تواند به توقف چرخه سلولی برای دادن فرصت ترمیم و القای آپوپتوز (مرگ برنامه‌ریزی‌شده سلولی) در صورت آسیب غیرقابل ترمیم منجر شود. کاهش معنی‌دار بیان Cyclin D1مستقیماً با افزایش p53 مرتبط است و یک شاهد عملکردی مکمل ارائه می‌دهد. Cyclin D1 یک پیش‌برنده ضروری برای پیشروی از فاز G1 به فاز S چرخه سلولی است. کاهش آن به وضوح نشان می‌دهد که سلول‌ها سیگنال‌های تکثیری خود را از دست داده‌اند و چرخه سلولی آن‌ها متوقف شده است. این توقف احتمالاً در فاز G1 رخ داده است. به نظر می‌رسد CM با فعال کردن p53، منجر به سرکوب رونویسی ژن CCND1 (کدکننده Cyclin D1) و در نتیجه مهار پیشروی چرخه سلولی و مهار رشد تومور می‌شود.

[Downloaded from ijbd.ir on 2026-09-15]

[DOI: 10.66224/ijbd.19.2.8]

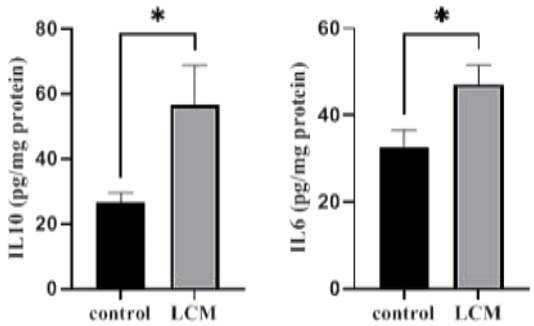


شکل ۲: نمودار مقایسه سطوح بیان ژن‌های P53 و Cyclin D1 بین گروه‌های کنترل و تیمار

Figure 2: Comparison of P53 and Cyclin D1 Gene Expression Levels Between the Control and Treatment Groups

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

در مقایسه با گروه کنترل، میزان IL-10 به طور معنی داری در سلول‌های سرطانی افزایش پیدا کرده بود (P=0.01). از سوی دیگر، میزان IL-6 نیز در مقایسه با گروه کنترل افزایش پیدا کرده بود (P=0.01) (شکل ۳). این نتایج نشان می‌دهد CM نه تنها بر رشد، بلکه بر رفتار ایمونولوژیک سلول‌های تومور نیز تأثیر می‌گذارد و یک پاسخ پیچیده را القا می‌کند. افزایش IL-10 با اثرات ضدتوموری احتمالی همسو است و می‌تواند فعالیت سلول‌های ایمنی پیش‌التهابی را مهار کند. در این سلول‌ها، افزایش آن ممکن است نشانه‌ای از تلاش سلول برای کاهش التهاب درون‌توموری یا یک پاسخ تطابقی به سیگنال‌های القا شده توسط CM باشد. افزایش IL-6 در نگاه اول متناقض با اثرات مهاری به نظر می‌رسد. IL-6 یک سیتوکاین چندوجهی است که در سرطان اغلب نقش تقویت‌کننده تومور را ایفا می‌کند و می‌تواند باعث بقا، تکثیر و مقاومت به درمان شود. واکنش IL-6 می‌تواند به عنوان بخشی از پاسخ استرس سلولی به ترشحات سلول‌های هپاتوسیتی محسوب شود. سلول‌های سرطانی ممکن است در پاسخ به سیگنال‌های مهارکننده رشد از طریق p53، مسیرهای بقا مانند مسیر-IL-6/JAK/STAT3) را به‌عنوان یک مکانیزم فرار فعال کنند این پاسخ دوگانه IL-10 و IL-6 نشان‌دهنده یک بازبرنامه‌ریزی پیچیده شبکه سیگنالینگ درون سلولی است. نتیجه نهایی (توقف رشد یا بقای مقاوم) به برآیند نهایی این سیگنال‌های متعارض بستگی دارد.



شکل ۳: نمودارمقایسه میزان ترشح IL-10 و IL-6 در سلول‌های MCF-7 بین گروه‌های کنترل و تیمار

Figure 3: Comparison of IL-6 and IL-10 Secretion Levels in MCF-7 Cells Between the Control and Treatment Groups

بحث

نتایج حاصل از این مطالعه نشان‌دهنده تأثیر پیچیده و دوگانه ترشحات هپاتوسیتی جنین جوجه بر رده سلولی سرطان پستان است. این یافته‌ها حاکی از ایجاد یک تنظیم مجدد (Reprogramming) در سیگنال‌دهی سلول‌های سرطانی تحت تأثیر این محیط ترشحی است که همزمان

[Downloaded from ijbd.ir on 2026-09-15]

[DOI: 10.66224/ijbd.19.2.8]

مکانیسم‌های مهارکننده و محرک رشد را فعال می‌کند. افزایش معنی‌دار بیان p53، به عنوان "نگهبان ژنوم"، قویاً از فعال شدن مسیرهای آپوپتوز یا توقف چرخه سلولی در سلول‌های MCF-7 حکایت دارد. همچنین، افزایش همزمان IL-10، به عنوان یک سیتوکاین ضدالتهابی قوی، می‌تواند نشان‌دهنده تلاش سلول برای ایجاد یک محیط میکروبی ضدالتهابی و تعدیل‌شده باشد که در برخی مطالعات با مهار متاستاز و آنژیوژنز مرتبط دانسته شده است. با این حال، نقش دوگانه IL-10 در تنظیم ایمنی تومور و امکان ایجاد تحمل ایمنی نیز باید در نظر گرفته شود. کاهش معنی‌دار بیان Cyclin D1، که یک تنظیم‌کننده کلیدی پیشبرنده فاز G1 به S چرخه سلولی است، شاهدی محکم بر اثر مهاری مستقیم ترشحات هپاتوسیتی بر تکثیر سلولی MCF-7 ارائه می‌دهد.

کبد به‌عنوان دومین یا سومین مقصد شایع متاستاز دوردست در بیماران مبتلا به سرطان پستان، به ویژه در زیرگروه‌های لومینال و HER2 مثبت، شناخته می‌شود (۲۲، ۲۳). مطالعات نشان داده‌اند که سلول‌های سرطانی پستان توانایی ذاتی برای برقراری تعاملات هتروتایپیک با هپاتوسیت‌ها را از طریق مولکول‌های چسبان سلولی مانند E-cadherin دارند (۲۴، ۲۵). این تعامل، برخلاف سلول‌های سرطان کبد که منشأ بافتی مشترکی با هپاتوسیت‌ها دارند، یک مدل بیولوژیکی جذاب برای مطالعه «اثر میزبان» بر روی سلول مهاجم فراهم می‌کند. بنابراین، استفاده از مدل متقابل پستان_کبد اجازه می‌دهد تا نحوه تأثیر یک ریزمحیط سالم و در حال رشد (کبد جنینی) را بر روی سلول‌های یک بافت هدف متاستاتیک (پستان) بررسی کنیم، که این از نظر بالینی بسیار مرتبط‌تر از بررسی اثر هپاتوسیت بر روی سلول سرطان کبد (هم‌بافت) است، چرا که در حالت متاستاز، سلول سرطانی با یک بافت بیگانه (غریبه) مواجه می‌شود نه بافت اصلی خود. این رویکرد با مطالعاتی که تعامل بین سلول‌های سرطان کولون و هپاتوسیت‌ها را بررسی کرده‌اند و همچنین پژوهش‌های نوینی که نقش سلول‌های استرومایی اختصاصی بافت (TSMs) را در شکل‌دهی به ریزمحیط متاستاتیک ارگان‌های مختلف روشن ساخته‌اند، همسو بوده و درکی عمیق‌تر از پدیده متاستاز ارائه می‌دهد (۲۶، ۲۷).

همسویی نتایج حاضر با گزارش میرعبدالهی و همکاران (۱۳۹۸) که نشان دادند ترشحات سلول‌های بنیادی ژله وارتون نیز می‌توانند بیان سایتوکاین‌های خاصی (از جمله IL-2، IL-4 و IL-1α) را در سلول‌های MCF-7 افزایش دهند، حاکی از یک اصل کلی است. ترشحات حاصل از سلول‌های طبیعی (چه بنیادی و چه تمایزیافته مانند هپاتوسیت) حاوی کوکتلی از فاکتورهای محلول (سیتوکاین‌ها، فاکتورهای رشد، miRNAها و ...) هستند که می‌توانند شبکه سیگنالینگ سلول سرطانی را به طور گسترده‌ای مدوله کنند. این مشاهدات تأکید می‌کنند که ترشحات سلولی قادر به تحریک یا مهار مسیرهای ایمونولوژیک در سلول هدف است. نکته مهم در مطالعه حاضر، افزایش IL-6 است که علی‌رغم نقش شناخته شده آن در پیشبرد التهاب مرتبط با سرطان، در این بافت خاص (تحت تأثیر ترشحات جنینی) ممکن است بخشی از یک واکنش استرس سلولی اولیه یا حتی یک پاسخ دوگانه (پروتومور و ضد تومور) باشد. تفاوت در منشأ سلول‌های ترشح‌کننده (انسانی در مقابل جوجه) نیز می‌تواند منجر به تفاوت در ترکیب دقیق این فاکتورها و در نتیجه، شدت یا کیفیت متفاوت پاسخ شود (۲۸).

یافته‌های این تحقیق در خصوص کاهش Cyclin D1 و افزایش بیان p53 به خوبی با مطالعه نوری و همکاران (۱۳۹۱) که اثر ترکیب طبیعی تهرانولید را بر سلول‌های MCF-7 بررسی کرد، قابل مقایسه است. پژوهش آنان نشان داد که مهار مسیر PI3K/Akt منجر به کاهش Cyclin D1 و توقف چرخه سلولی در فاز G1 می‌شود. اگرچه در مطالعه حاضر مسیرهای سیگنالینگ پایین‌دست به‌طور مستقیم بررسی نشده‌اند، اما الگوی تغییرات مشاهده شده (کاهش Cyclin D1 و افزایش p53) به شدت موید فعال شدن مسیرهای مهارکننده رشد سلولی مشابه، از جمله احتمالاً مهار مسیر PI3K/Akt/mTOR است. این هم‌راستایی نشان می‌دهد که ترشحات هپاتوسیتی جنین جوجه نیز احتمالاً حاوی فاکتورهایی هستند که این مسیرهای کلیدی کنترل چرخه سلولی و تکثیر را هدف قرار می‌دهند. علاوه بر این، افزایش p53 که در اینجا مشاهده شد، با گزارش نوری و همکاران در مورد القای آپوپتوز از طریق مسیر میتوکندریایی (با افزایش Bax و کاهش Bcl-2) هم‌خوانی مفهومی دارد، چرا که p53 یک القاکننده کلیدی آپوپتوز وابسته به میتوکندری است. این مقایسه، نقش تبیینی برای مطالعه نوری و همکاران فراهم می‌آورد

[Downloaded from ijbd.ir on 2026-09-15]

[DOI: 10.66224/ijbd.19.2.8]

و مکانیسم‌های احتمالی زیربنایی یافته‌های حاضر را روشن‌تر می‌سازد (۲۹).

خاموشی و همکاران (۲۰۲۳) اثرات محیط MSC-CM تیمار شده با لیپوپلی‌ساکارید (LPS) را بر رده سلولی سرطان کولورکتال بررسی کردند. نتایج نشان داد که LPS-CM به‌طور معنی‌داری درصد آپوپتوز را افزایش می‌دهد. همچنین، بیان ژن‌های bax و p53 به‌طور معنی‌داری افزایش پیدا کرد (۳۰). پاشایی اصل و همکاران (۲۰۲۲) اثر MSC-CM مشتق از مایع آمنیون را بر روی سلول‌های MCF-7 مورد بررسی قرار دادند. نتایج این مطالعه نشانگر الگوی افزایشی بیان پروتئین P53 و کاهش بیان Bcl2 بود (۳۱).

مطالعه کستولوموا و همکاران (۲۰۲۴) در یک مدل حیوانی عفونت انگلی، اثرات ضدالتهابی بارز سوپرناتانت سلول‌های جنین جوجه را نشان داد (کاهش IL-6، TNF-α و IL-1β و افزایش IL-4 و IL-5). این الگو با الگوی مشاهده‌شده در مطالعه حاضر (افزایش همزمان IL-6 التهابی و IL-10 ضدالتهابی) متفاوت به نظر می‌رسد (۳۲). این تفاوت‌ها به خوبی نشان‌دهنده وابستگی زمینه‌ای اثرات ترشحات سلولی است. در مدل توموری MCF-7، سلول‌های سرطانی ذاتاً ظرفیت تولید سیتوکاین‌های پیش‌التهابی مانند IL-6 را دارند و محیط میکروتومور از قبل التهاب‌زا است. بنابراین، ترشحات هپاتوسیتی ممکن است در این بستر خاص، یک پاسخ تطابقی پیچیده ایجاد کند که شامل هر دو مؤلفه التهابی و ضدالتهابی است. از سوی دیگر، در مدل عفونی که التهاب حاد غالب است، این ترشحات ممکن است بیشتر به سمت سرکوب پاسخ ایمنی Th1/Th17 و تقویت پاسخ Th2 جهت حل التهاب عمل کنند. نکته مشترک و کلیدی هر دو مطالعه، توانایی تعدیل‌کنندگی قوی ترشحات جنینی جوجه بر سیستم ایمنی است، اگرچه جهت این تعدیل به شدت به فیزیولوژی بافت هدف و بیماری زمینه‌ای وابسته است.

این مطالعه با محدودیت‌هایی همراه بود که باید در نظر گرفته شود. تنها استفاده از رده MCF-7 و محیط کشت دوبعدی، به ترتیب تنوع بیولوژیکی تومورها و پیچیدگی تعاملات ریزمحیط تومور را به طور کامل بازنمایی نمی‌کند. همچنین، بررسی تنها چهار نشانگر مولکولی (IL-6، IL-10، Cyclin D1 و P53) و عدم ارزیابی مستقیم مسیرهای سیگنالینگ پایین‌دست، تحلیل دقیق مکانیسم‌های عمل را محدود کرده است. منشأ حیوانی (جوجه) سلول‌های ترشح‌کننده و نبود داده‌های آزمایشگاهی در مدل‌های حیوانی (in vivo) نیز تعمیم نتایج به شرایط فیزیولوژیک انسان را با احتیاط همراه می‌سازد. بر این اساس، پیشنهاد می‌شود مطالعات آینده با بهره‌گیری از رده‌های سلولی متنوع‌تر و مدل‌های کشت سه‌بعدی (مانند اسفروئیدها) به شبیه‌سازی دقیق‌تری از تومور دست یابند. بررسی نشانگرهای گسترده‌تر مرتبط با آپوپتوز، چرخه سلولی، مهاجرت و EMT می‌تواند تصویر جامع‌تری از اثرات ترشحات ارائه دهد. استفاده از تکنیک‌های اومیکس (مانند پروتئومیکس و ترنسکریپتومیکس) برای شناسایی ترکیبات فعال در سوپرناتانت و نیز تعیین مسیرهای سیگنالینگ کلیدی ضروری است. تکمیل این یافته‌ها با مطالعات in vivo بر روی مدل‌های حیوانی سرطان پستان، پتانسیل درمانی این ترشحات را به طور کاربردی مورد بررسی قرار خواهد داد.

نتیجه‌گیری

ترشحات هپاتوسیتی جنین جوجه با کاهش Cyclin D1 و افزایش p53، توقف چرخه سلولی را در رده MCF-7 القا می‌کنند. افزایش همزمان IL-6 و IL-10 نشان‌دهنده پاسخ التهابی و ضدالتهابی دوگانه در این سلول‌هاست. افزایش IL-6 و کاهش همزمان Cyclin D1 در نگاه نخست متناقض به‌نظر می‌آید با این‌حال این پاسخ می‌تواند بازتابی از یک پاسخ تطبیقی در شرایط استرس زای ناشی از تماس با ترشحات سلول‌های هپاتوسیتی کبد جنین جوجه باشد، به گونه ای که افزایش گذرای IL-6 می‌تواند نشان‌دهنده افزایش مکانسیم مقاومت سلول در برابر آسیب و همینطور فعال‌شدن مکانسیم‌های بقا باشد، پیش از آنکه مسیرهای توقف چرخه سلولی بر آن غالب گردد. با وجود محدودیت‌هایی نظیر استفاده از یک رده سلولی و کشت دوبعدی، این یافته‌ها وجود مسیرهای نهایی مشترک در تنظیم چرخه سلولی (احتمالاً از طریق مهار PI3K/Akt) را آشکار می‌سازد. از دیدگاه کاربرد بالینی این پژوهش می‌تواند برای متخصصین حوزه آنکولوژی حائز اهمیت باشد.الگوی تغییرات فاکتورهای بررسی شده در این پژوهش می‌تواند به‌عنوان یک مارکر در ارزیابی پاسخ سلول‌های تومور به عوامل زیستی مورد توجه قرار گیرد. این پژوهش می‌تواند در طراحی رویکردهای درمان بصورت

[Downloaded from ijbd.ir on 2026-09-15]

[DOI: 10.66224/ijbd.19.2.8]

مکمل در کنار درمان‌های استاندارد شناخته شده سرطان پستان مورد توجه قرار گیرد؛ برای تبدیل این رویکرد به یک استراتژی درمانی معتبر، توصیه می‌شود مطالعات آتی با استفاده از مدل‌های سه‌بعدی، رده‌های سلولی متنوع، بررسی مسیرهای سیگنالینگ پایین‌دست و آزمون‌های in vivo انجام گردد.

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 پایان نامه به شماره FIRC-0406 است.

تعارض منافع

هیچکدام از نویسندگان مقاله تعارض منافعی برای انتشار آن ندارند.

سپاسگزاری

نویسندگان اعلام می‌دارند که از هوش مصنوعی برای ویرایش نگارشی و بهبود روانی متن این مقاله استفاده شده است و تمامی محتوای علمی، تحلیل داده‌ها و نتیجه‌گیری‌ها توسط نویسندگان انجام شده است.

References

1. Obeagu EI, Obeagu GU. Breast cancer: A review of risk factors and diagnosis. Medicine. 2024;103(3):e36905. doi: 10.1097/MD.0000000000036905
2. Wilkinson L, Gathani T. Understanding breast cancer as a global health concern. The British journal of radiology. 2022;95(1130):20211033. doi: 10.1259/bjr.20211033
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. García-Sancha N, Corchado-Cobos R, Pérez-Losada J. Understanding susceptibility to breast cancer: from risk factors to prevention strategies. International Journal of Molecular Sciences. 2025;26(7):2993. doi:10.3390/ijms26072993
5. Dessie ZG, Zewotir T. Global determinants of breast cancer mortality: a comprehensive meta-analysis of clinical, demographic, and lifestyle risk factors. BMC Public Health. 2025;25(1):2640. doi: 10.1186/s12889-025-24036-w
6. Li T, Isautier J, Lee JM, Marinovich ML, Houssami N. Performance of Digital Breast Tomosynthesis Versus Digital Mammography in Women With a Family History of Breast Cancer: A Systematic Review. Clinical Breast Cancer. 2025;25(2):e103-e12. doi: 10.1016/j.clbc.2024.09.013
7. Wang H, Guo Q, Shen Y, Ding K, Chen Y, Wang X, et al. ARTS Confers Chemoresistance of Breast Cancer by Inducing Apoptosis-Dependent Autophagy via Livin–MDM2–p53 Pathway. Research. 2026;9:1086. doi:10.34133/research. 1086
8. Anand V, El-Dana F, Baran N, Borgman J, Yin Z, Zhao H, et al. GD3 synthase drives resistance to p53-induced apoptosis in breast cancer by modulating mitochondrial function. Oncogene. 2025;44(30):2646-61. doi: 10.1038/s41388-025-03432-x
9. Choy EH, De Benedetti F, Takeuchi T, Hashizume M, John MR, Kishimoto T. Translating IL-6 biology into effective treatments. Nature Reviews Rheumatology. 2020;16(6):335-45. doi:10.1038/s41584-020-0419-z
10. El-Shemi AG, Alqurashi A, Abdulrahman JA, Alzahrani HD, Almwalad KS, Felfilan HH, et al. IL-10-Directed cancer immunotherapy: Preclinical advances, clinical insights, and future perspectives. Cancers. 2025;17(6):1012. doi:10.3390/cancers17061012
11. Rubin SM, Sage J, Skotheim JM. Emerging Strategies to Inhibit the G1/S Transition for Cancer Therapy. Cancer Research. 2026. doi:10.1158/0008-5472.CAN-25-0916
12. Miura Y, Sakai Y, Nishikawa M, Leclerc E. A computational model of inflammation reveals crosstalk among energy metabolism, oxidative stress, insulin, and cytokines in hepatocytes during early MASLD progression. Toxicological Sciences. 2026;209(2):kfaf176. doi:10.1093/toxsci/kfaf176

[Downloaded from ijbd.ir on 2026-09-15]

[DOI: 10.66224/ijbd.19.2.8]

13. Ge W, Wang Z, Chen Y, Tang X, Lou Z, Chen J, et al. Hepatocyte-like cell therapy for end-stage liver disease: From basic science to clinical application. Liver Research. 2026. doi:10.1016/j.livers.2026.01.005
14. Kostallari E, Schwabe RF, Guillot A. Inflammation and immunity in liver homeostasis and disease: a nexus of hepatocytes, nonparenchymal cells and immune cells. Cellular & Molecular Immunology. 2025;22(10):1205-25. doi:10.1038/s41423-025-01313-7
15. Obenauf AC, Massagué J. Surviving at a Distance: Organ-Specific Metastasis. Trends Cancer. 2015;1(1):76-91. doi:10.1016/j.trecan.2015.07.009
16. Liu C, Mohan SC, Wei J, Seki E, Liu M, Basho R, et al. Breast cancer liver metastasis: Pathogenesis and clinical implications. Frontiers in Oncology. 2022;12:1043771. doi:10.3389/fonc.2022.1043771
17. Taylor DP. Breast cancer metastatic dormancy and emergence in the hepatic niche: University of Pittsburgh, 2013.
18. Wang C, Fan P, Zhou Y, Ma M, Zhong H, Liu L, et al. Heterogeneous tissue-specific macrophages orchestrate metastatic organotropism of breast cancer: implications for promising therapeutics. Journal of Translational Medicine. 2025;23(1):692. doi:10.1186/s12967-025-06660-7
19. Shooshtari MK, Vastegani SM, Farbood Y, Sarkaki A, Bayati V, Nejaddehbashi F, et al. Neuroprotective Potential of Conditioned Medium from Adipose and Liver Mesenchymal Stem Cells in a Rat Model of Global Cerebral Ischemia-Reperfusion Injury. Current Molecular Medicine. 2025. doi:10.2174/0115665240351634250506164609
20. Mahdavi R, Jonoush ZA, Ghafourian M, Khoshnam SE, Dehbashi FN, Farzaneh M. The Effect of Remdesivir as an anti-COVID-19 Drug on Chicken Hepatocyte Enzymes; an in vitro Study. Iranian Journal of Medical Microbiology. 2023;17(3):309. doi:10.30699/ijmm.17.3.309
21. Abdollahi MR, Kianersi F, Moosavi SS, Dastan D, Asadi S. Identification and expression analysis of two genes involved in the biosynthesis of t-anethole in fennel (Foeniculum vulgare Mill.) and their up-regulation in leaves in response to methyl jasmonate treatments. Journal of Plant Growth Regulation. 2023;42(2):759-70. doi:10.1007/s00344-022-10583-8
22. Ibragimova MK, Tsyganov MM, Kravtsova EA, Tsydenova IA, Litviakov NV. Organ-specificity of breast cancer metastasis. International journal of molecular sciences. 2023;24(21):15625. doi:10.3390/ijms242115625
23. He M, Hu Y, Wang D, Sun M, Li H, Yan P, et al. Value of CT-based radiomics in predicting the efficacy of anti-HER2 therapy for patients with liver metastases from breast cancer. Frontiers in Oncology. 2022;12:852809. doi:10.3389/fonc.2022.852809
24. Bullock E, Brunton VG. E-cadherin-mediated cell–cell adhesion and invasive lobular breast cancer. A Guide to Breast Cancer Research: From Cellular Heterogeneity and Molecular Mechanisms to Therapy. 2025:259-75. doi:10.1007/978-3-031-70875-6_14
25. Zhang W, Wang J, Li H, Zhang X, Yao D, Zhang H, et al. TAF7 directly targets SAA1 to enhance triple-negative breast cancer metastasis via phosphorylating E-cadherin and N-cadherin. iScience. 2025;28(3). doi:10.1016/j.isci.2025.111989
26. Ge C, Huang X, Zhang S, Yuan M, Tan Z, Xu C, et al. In vitro co-culture systems of hepatic and intestinal cells for cellular pharmacokinetic and pharmacodynamic studies of capecitabine against colorectal cancer. Cancer Cell International. 2023;23(1):14. doi:10.1186/s12935-023-02853-6
27. Rada M, Tsamchoe M, Kapelanski-Lamoureux A, Hassan N, Bloom J, Petrillo S, et al. Cancer cells promote phenotypic alterations in hepatocytes at the edge of cancer cell nests to facilitate vessel Co-option establishment in colorectal cancer liver metastases. Cancers. 2022;14(5):1318. doi:10.3390/cancers14051318
28. Mirabdollahi M, Javanmard SH, Sadeghi-Aliabadi H. In vitro assessment of cytokine expression profile of MCF-7 cells in response to hWJ-MSCs secretome. Advanced Pharmaceutical Bulletin. 2019;9(4):649. doi:10.15171/apb. 2019.075
29. Noori S, Hassan ZM. Tehranolide inhibits proliferation of MCF-7 human breast cancer

[Downloaded from ijbd.ir on 2026-09-15]

[DOI: 10.66224/ijbd.19.2.8]

cells by inducing G0/G1 arrest and apoptosis. Free Radical Biology and Medicine. 2012;52(9):1987-99. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2012.01.026
30. Khamooshi R, Salimi A, Halabian R, Saeedi P. Apoptotic effects of mesenchymal stem cells' conditioned medium on colorectal cancer cell lines. Tissue and Cell. 2023;85:102247. doi:10.1016/j.tice.2023.102247
31. 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(3):191. doi:10.34172/bi. 2022.23813
32. Kostolomova E, Lozovaya P, Polyanskih E, Timokhina TK, Paromova YI. Studying the anti-inflammatory activity of Bifidobacterium bifidum supernatants and chicken embryo cells on a model of opisthochic invasion. Russian Journal of Immunology. 2024;27(2):181 6.

[Downloaded from ijbd.ir on 2026-09-15]

[DOI: 10.66224/ijbd.19.2.8]