

ارزیابی اثر هایپرترمی بر تکثیر، بقا و بیان ژن‌های مرتبط با خصوصیات بنیادینگی، مسیر سیگنالینگ Wnt و آپوپتوز در سلول‌های بنیادی سرطان کولورکتال

نویسندگان:

بهناز ولی بیگی^۱، عباس بهزاد بهبهانی^{۲*}، محسن فروزانفر^۳، فرزانه ضرعام پور^{۴**}، مجتبی جعفری نیا^۵

- ۱- دانشجوی دکتری، گروه زیست‌شناسی، واحد مرودشت، دانشگاه آزاد اسلامی، مرودشت، ایران
- ۲- استاد، مرکز تحقیقات علوم و تکنولوژی تشخیص آزمایشگاهی، دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شیراز، شیراز، ایران
- ۳- استادیار، گروه زیست‌شناسی، واحد مرودشت، دانشگاه آزاد اسلامی، مرودشت، ایران
- ۴- دکتری، مرکز تحقیقات علوم و تکنولوژی تشخیص آزمایشگاهی، دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شیراز، شیراز، ایران
- ۵- استادیار، گروه زیست‌شناسی، واحد مرودشت، دانشگاه آزاد اسلامی، مرودشت، ایران

Pars Journal of Medical Sciences, Vol.20, No.2, Summer 2022

چکیده:

مقدمه: امروزه، سلول‌های بنیادی سرطانی به عنوان سلول‌های آغاز کننده تومور بسیار مورد توجه قرار گرفته‌اند. از طرف دیگر، در مطالعات زیادی به هایپرترمی به عنوان یک روش مناسب برای کمک به روش‌های درمانی سرطان توجه نشان داده شده است. در مطالعه‌ی حاضر، اثرات تیمار سلول‌های سرطان کولون (HT-29) و سلول‌های بنیادی سرطانی مشتق از آن (CSCs) با استفاده از سازوکار هایپرترمی مورد ارزیابی قرار گرفت.

روش کار: ابتدا CSCs از رده‌ی سلولی HT-29 جداسازی و سپس میزان بیان مارکرهای پروتئینی و ژن‌های مربوط به حالت بنیادینگی در این سلول‌ها بررسی شد. سلول‌های HT-29 و CSCs با هایپرترمی تیمار شدند و سمیت این روش تیمار مورد بررسی قرار گرفت. در نهایت، میزان بیان ژن‌های مربوط به بنیادینگی، تکثیر سلولی، مسیر پیام‌رسانی Wnt و آپوپتوز مورد ارزیابی و تحلیل آماری داده‌ها انجام شد.

یافته‌ها: CSCs مشتق از HT-29، برای مارکر سطحی CD133 مثبت بودند و ژن‌های بنیادینگی افزایش بیان معناداری داشت ($P < 0.05$). میزان بقای HT-29 و CSCs تیمار شده با هایپرترمی کاهش پیدا کرده بود. بیان *OCT3/4*، *NANOG*، *PCNA*، *WNT1*، *CTNBI* و *BCL2* در هر دو گروه سلولی کاهش داشت. همچنین، در CSCs بیان ژن‌های *KLF4*، *P53* و *BAX* افزایش چشمگیری پیدا کرده بود ($P < 0.05$).

نتیجه گیری: نتایج نشان داد که هایپرترمی تاثیر به سزایی بر سلول‌های HT-29 ندارد، اما سبب تغییر چشمگیری در درصد سلول‌های زنده، منحنی رشد، میزان بیان ژن‌های درگیر در آپوپتوز و *KLF4* در CSCs می‌شود. از این رو، هایپرترمی می‌تواند تاثیر مثبتی در جلوگیری از رشد و تکثیر CSCs داشته باشد.

واژگان کلیدی: سرطان کولورکتال، هایپرترمی و سلول بنیادی سرطان

Pars J Med Sci 2022;20(2):21-30

مقدمه:

اخیر در این زمینه نشان داده است که یک افزایش سریع در نرخ بروز سرطان کولورکتال به دلیل تغییر سبک زندگی، کاهش فعالیت بدنی، سیگار کشیدن و رژیم غذایی نامناسب رخ داده است [۴].

موثرترین روش‌های درمانی این نوع سرطان، جراحی، شیمی درمانی و پرتودرمانی است. با وجود پیشرفت‌های انجام شده در

سرطان کولورکتال (Colorectal cancer, CRC) بعد از سرطان‌های پوست، پستان و معده یکی از شایع‌ترین بدخیمی‌های دستگاه گوارش است که چهارمین عامل مرگ و میر ناشی از سرطان‌ها را به خود اختصاص داده است [۱، ۲]. منشأ این نوع سرطان سلول‌های اپی‌تلیال بافت کولون یا رکتوم می‌باشد و عوامل ژنتیکی و محیطی در ایجاد آن نقش دارند [۳]. مطالعات

* نویسنده مسئول، نشانی: مرکز تحقیقات علوم و تکنولوژی تشخیص آزمایشگاهی، دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شیراز، شیراز، ایران.

تلفن تماس: +۹۸ ۷۱ ۳۲۲۷۰۳۰۱ پست الکترونیک: behzadba@sums.ac.ir, behzadba@gmail.com

**پست الکترونیک: f.zarghampoor@gmail.com

از محیط کشت DMEM حاوی ۱۰ درصد FBS استفاده شد و تا زمانی که اجسام کروی تشکیل شدند، سه بار در هفته و هر بار یک میلی لیتر محیط کشت کامل به سلول‌ها اضافه شد.

تایید سلول‌های بنیادی سرطانی

به منظور تایید بنیادی بودن سلول‌های جداسازی شده از رده سلولی HT-29، بیان مارکرهای سطحی سلول از جمله CD133 با استفاده از روش فلوسایتومتری مورد ارزیابی قرار گرفت. بدین منظور، سلول‌های جداسازی شده با استفاده از بافر فسفات سالین (Phosphate Buffer Saline, PBS) شستشو شد. سپس تعداد 2×10^4 سلول در ۵۰۰ میکرولیتر PBS معلق و حدود ۵ میکرولیتر از آنتی‌بادی CD133 (SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY, INC.) به سلول‌ها افزوده شد. پس از ۲۰ دقیقه انکوباسیون در دمای اتاق، سلول‌ها توسط دستگاه فلوسایتومتری (BDFACSCalibur system) مورد بررسی قرار گرفتند. علاوه بر این، برای تایید بنیادی بودن سلول‌های جداسازی شده از HT-29، میزان بیان mRNA ژن‌های وابسته به شرایط بنیادینگی از جمله *KLF4*، *NANOG*، *C-MYC*، *OCT3/4* با استفاده از روش qRT-PCR (quantitative Real-time PCR) مورد ارزیابی قرار گرفت.

تیمار سلول‌ها با هایپرترمی

به منظور بررسی اثر هایپرترمی روی سلول‌های سرطانی HT-29 و CSCs جداسازی شده، تعداد 3×10^4 سلول در پلیت ۲۴ خانه کشت داده شد. چهل و هشت ساعت پس از کشت سلول‌ها، پلیت‌ها به مدت ۳ ساعت در دمای ۴۲ و ۴۳ درجه سانتیگراد، ۵٪ دی‌اکسید کربن و ۹۵٪ رطوبت انکوبه شدند. تعداد 3×10^4 سلول سرطانی HT-29 و CSCs نیز در پلیت ۲۴ خانه به عنوان گروه کنترل و در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد و ۵٪ دی‌اکسید کربن و ۹۵٪ رطوبت کشت داده شدند.

رنگ‌آمیزی MTT (Microculture Tetrazolium Test)

به منظور بررسی سمیت هایپرترمی بر سلول‌های HT-29 و CSCs مشتق شده از آن، از روش رنگ‌آمیزی MTT استفاده شد. بدین منظور ابتدا تعداد 2×10^4 سلول در پلیت ۹۶ خانه کشت داده شدند، سپس سلول‌ها با روش هایپرترمی تیمار شدند. پس از ۲۴ و ۴۸ ساعت، محیط روی سلول‌ها برداشته و به آرامی با PBS شستشو داده شد. میزان ۱۰۰ میکرولیتر از محلول MTT (۵ mg/ml، Sigma، آمریکا) به هر خانه اضافه و به مدت ۳ ساعت در انکوباتور ۵ درصد دی‌اکسیدکربن قرار داده شد. پس از سانتریفیوژ پلیت مورد نظر به مدت ۵ دقیقه با دور ۳۰۰۰ rpm، مایع رویی

روش‌های درمان سرطان، میزان زنده ماندن و بقای عمر بیماران مبتلا به سرطان محدود است و اغلب عود مجدد بیماری پس از درمان مشاهده می‌شود [۵، ۶]، که به علت ناتوان بودن این روش‌ها در از بین بردن گروهی از سلول‌های سرطانی به نام سلول‌های بنیادی سرطانی است [۷]. این سلول‌ها دارای قابلیت خودنوزایی نامحدود و تمایز به سلول‌های مختلف بوده که می‌توانند از طریق تقسیمات سلولی متقارن و نامتقارن تکثیر شده و سلول‌های بنیادی سرطانی و سایر سلول‌های تشکیل دهنده ی تومور را به وجود آورند [۸].

یکی از درمان‌های نوین سرطان، هایپرترمی است که دمای بدن را به صورت محلی، منطقه‌ای یا سراسر بدن از حالت نرمال به ۳۹-۴۵ درجه سانتی‌گراد (محدوده دمایی ملایم) افزایش می‌دهند. تحمیل دمای بالای ۴۵ درجه سانتی‌گراد برای مدت زمان کافی باعث از بین رفتن و تغییر ساختار پروتئین‌ها و مرگ نکروزی سلول‌ها خواهد شد. مطالعات زیادی نشان داده‌اند زمانی که هایپرترمی به طور هم‌زمان یا مدت زمان کوتاهی پس از شیمی‌درمانی یا پرتودرمانی استفاده شود، می‌تواند اثربخشی درمان‌های مذکور را افزایش دهد [۹، ۱۰].

باتوجه به اهمیت بیان شده در خصوص CSCs و نقش این سلول‌ها در مقاومت به درمان و عود مجدد بیماری، پژوهش حاضر با هدف ارزیابی اثر احتمالی هایپرترمی بر تکثیر، بقا و بیان ژن‌های مرتبط با خصوصیات بنیادینگی، مسیر سیگنالینگ Wnt و آپوپتوز در رده سلولی سرطان کولون (HT-29) و CSCs مشتق از آن طراحی شد.

روش کار:

کشت سلول‌های HT-29

در ابتدا رده سلولی سرطان کولون انسانی HT-29 (ATCC Number: HTB-38) از بانک سلولی انستیتو پاستور (تهران، ایران) تهیه شد. سپس سلول‌های HT-29، در محیط کشت DMEM (Gibco, Dulbecco's Modified Eagle Medium، آمریکا) به همراه ۱۰٪ سرم جنین گاوی یا FBS (Gibco، آمریکا) و ۱٪ آنتی‌بیوتیک پنی‌سیلین / استرپتومایسین در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و ۵٪ دی‌اکسید کربن (CO₂) کشت داده شدند. محیط کشت سلول‌ها هر دو روز یک بار تعویض شدند و زمانی که تراکم سلول‌ها به ۸۰٪-۷۰٪ رسید سلول‌ها پاساژ داده شدند.

جداسازی سلول‌های بنیادی سرطانی از HT-29

رده سلولی HT-29 به تعداد 4×10^4 در پلیت ۱۰ سانتی‌متری تیمار شده با آگار یک درصد (Bacto™ Agar)، در شرایط غیر چسبنده و سه بعدی کشت داده شدند [۱۱، ۱۲]. برای نگهداری سلول‌ها

به مدت ۵۰ دقیقه و ۸۵ درجه سانتیگراد به مدت ۵ دقیقه و در یک سیکل انجام شد.

ارزیابی بیان ژن‌ها با استفاده از روش qRT-PCR

به منظور بررسی اثر هایپرترمی روی سلول‌های HT-29 و CSCs مشتق شده از آن، میزان بیان ژن‌های مربوط به خصوصیات بنیادینگی (*OCT4*، *KLF4* و *NANOG*)، مسیر پیام رسانی Wnt (*WNT1* و *CTNBN1*)، آپوپتوز (*BAX*، *P53* و *BCL2*) و تکثیر سلولی (*PCNA*) با استفاده از آزمون qRT-PCR مورد ارزیابی قرار گرفت. بدین منظور در ابتدا با استفاده از نرم افزارهای AlleleID و GeneRunner پرایمرهای مورد نظر طراحی شدند (جدول ۱). همچنین، میزان اختصاصی بودن پرایمرها توسط نرم افزارهای primer-BLAST (پایگاه NCBI) و In-Silico PCR (پایگاه UCSC) مورد بررسی قرار گرفت. ژن گلیسیرالدهید-۳ فسفات دهیدروژناز (*GAPDH*) به عنوان کنترل داخلی استفاده شد.

به منظور بررسی میزان بیان ژن‌های مذکور، از کیت سایبرگرین SG qPCR mastermix (2X) (ERUX، لهستان) استفاده شد. از اینرو، ۵ میکرولیتر از SG qPCR Master Mix (2X)، ۰٫۵ میکرولیتر از پرایمر مستقیم، ۰٫۵ میکرولیتر از پرایمر معکوس، ۰٫۱ میکرولیتر از محلول ROX و ۲ میکرولیتر از الگوی cDNA سنتز شده در حجم نهایی ۱۰ میکرولیتر فراهم شد. پس از مخلوط کردن ترکیبات فوق، تکثیر قطعات با استفاده از دستگاه Applied Biosystem) StepOnePlus™ Real-Time PCR (آمریکا) طبق برنامه دمایی: مرحله واسرشت ابتدایی ۱ سیکل با دمای ۹۵ درجه سانتیگراد به مدت ۱۰ دقیقه، ۳۰ سیکل با دمای ۹۴ درجه سانتیگراد به مدت ۱۵ ثانیه، X درجه سانتیگراد به مدت ۳۰ ثانیه و ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ۳۰ ثانیه انجام شد. اتصال (Annealing) برای هر ژن که با X نمایش داده شده است، متفاوت بود.

تحلیل آماری

تمامی آزمایش‌ها حداقل سه بار تکرار شدند. به منظور بررسی تغییر بیان ژن‌ها از تحلیل $2^{-\Delta\Delta CT}$ استفاده شد. برای تحلیل داده‌هایی که بیشتر از دو نمونه بودند از تحلیل واریانس یک سویه (One-way ANOVA) و سپس برای مقایسه دوتایی نمونه‌ها از آزمون توکی با کمک نرم افزار SPSS استفاده شد. سطح معناداری کمتر از ۰٫۰۵ در نظر گرفته شد. کنترل کیفی نتایج qRT-PCR، تغییر بیان ژن و نیز تحلیل آماری توسط نرم افزار GenEX نسخه ۶/۱ انجام شد.

دور ریخته شد و ۱۰۰ میکرولیتر از محلول دی متیل سولفوکساید به هر خانه افزوده شد. در نهایت، با استفاده از دستگاه الیزا ریدر (Biotech Elisa Reader) میزان جذب نوری خانه‌ها در طول موج ۵۴۰ و ۶۳۰ نانومتر در مقابل کنترل قرائت شد و درصد سلول‌های زنده با استفاده از فرمول: $100 \times \text{جذب متوسط نمونه‌های کنترل} / \text{جذب متوسط نمونه‌های تیمار شده} = \text{سلول‌های زنده} \%$ محاسبه شد.

تاثیر هایپرترمی بر تکثیر سلول‌ها

جهت بررسی اثر هایپرترمی بر میزان تکثیر سلول‌های HT-29 و CSCs مشتق شده از آن، از روش رنگ‌آمیزی تریپان بلو استفاده شد. بدین منظور 3×10^4 سلول در پلیت ۲۴ خانه کشت داده شدند و سپس سلول‌ها با هایپرترمی تیمار شدند. پس از ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت، محیط روی سلول‌ها برداشته شد و به آرامی با PBS شستشو شد. سپس سلول‌ها با استفاده از آنزیم Trypsin-EDTA ۲۵٪ از کف پلیت جدا شد، جهت غیرفعالسازی آنزیم Trypsin-EDTA از محیط کشت کامل استفاده شد. پس از سانتریفیوژ سلول‌ها به مدت ۵ دقیقه با سرعت ۱۵۰۰rpm، حدود ۱۰ میکرولیتر از سلول‌ها را با ۱۰ میکرولیتر از رنگ تریپان بلو (Sigma، آمریکا) مخلوط کرده و شمارش سلول‌ها با استفاده از لام نتوبار انجام شد. تعداد سلول‌های زنده با استفاده از فرمول: $10^4 \times \text{ضریب رقت} \times \text{میانگین تعداد سلول‌های شمارش شده در ۴ مربع} = \text{سلول‌های زنده محاسبه شد}$.

استخراج RNA و سنتز cDNA

پس از تیمار سلول‌ها با هایپرترمی، سلول‌ها تریپسینه و در فالكون استریل جمع آوری شدند. از سلول‌های HT-29 و CSCs تیمار نشده نیز به عنوان گروه کنترل، RNA استخراج شد. استخراج RNA از سلول‌ها با استفاده از کیت (Qiagen) RNeasy Mini و طبق دستورالعمل شرکت سازنده کیت انجام شد. سپس غلظت RNA استخراج شده با نانودراپ (Thermo Fisher Scientific، آمریکا) مورد بررسی قرار گرفت و تا زمان استفاده در دمای ۸۰- درجه سانتیگراد قرار داده شد. برای سنتز cDNA، از کیت NG dART RT (EURX، لهستان) استفاده شد. بدین منظور حدود ۴ میکرولیتر از 5x NG cDNA buffer، ۱ میکرولیتر از پرایمر، ۱ میکرولیتر NG dART RT mix، و حدود ۶۰۰ نانوگرم از RNA استخراج شده در حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر مخلوط شد. سپس واکنش سنتز cDNA با استفاده از ترموسایکلر (Applied Biosystem) Thermal Cycler (آمریکا) طبق برنامه دمایی: ۲۵ درجه سانتیگراد به مدت ۱۰ دقیقه، ۵۰ درجه سانتیگراد

جدول ۱. پرایمرهای مورد استفاده در آزمون qRT-PCR.

Name	Primer name	Primer sequence	Tm (°C) *X	Product length
<i>OCT4</i>	OF	5'GAGAACCGAGTGAGAGGCAACC3'	68	166
	OR	5'CATAGTCGCTGCTTGATCGCTTG3'		
<i>NANOG</i>	NF	5'GTCCCGGTCAAGAAACAGAAG3'	58	156
	NR	5'GTCTTACCTGTTTGTAGCTG3'		
<i>KLF4</i>	KF	5'GTGCCCCGAATAACCGCTG3'	62	203
	RF	5'CAGGTCCAGGAGATCGTTGAAC3'		
<i>C-MYC</i>	MF	5'CACTTTGCACTGGAACCTTACAACACCC3'	64	183
	MR	5GCGGGAGGCTGCTGGTTTTTC3'		
<i>WNT1</i>	DF	5'CGATGGTGGGGTATTGTGAAC3'	60	133
	DR	5'CCGATTTTGGCGTATCAGAC3'		
<i>CTNNB1</i>	LF	5'ACGTACAATAGCAGACACCATC3'	60	146
	LR	5'TCAGGGAGTCAGGGGAGG3'		
<i>P53</i>	SF	5'TAACAGTTCCTGCATGGGCGGC3'	66	121
	SR	5'AGGACAGGCACAAACACGCACC3'		
<i>BAX</i>	GF	5'CCTGTGCACCAAGGTGCCGGAAC3'	68	99
	GR	5'CCACCCTGGTCTTGGATCCAGCCC3'		
<i>BCL2</i>	BF	5'TTGTGGCCTTCTTTGAGTTCGGTG3'	64	114
	BR	5'GGTGCCGTTTCAGGTAAGTCA3'		
<i>PCNA</i>	CF	5'TAACAGTTCCTGCATGGGCGGC3'	60	126
	CR	5'CGTGCAAATTCACCAGAAGGC3'		
<i>GAPDH</i>	GF	5'GGACTCATGACCACAGTCCA3'	60	119
	GR	5'CCAGTAGAGGCAGGGATGAT3'		

*دمای اتصال برای هر ژن با X نشان داده شده است.

یافته‌ها:

جداسازی و تایید CSCs

رده سلولی HT-29 سرطان کلون انسان، سلول‌هایی چسبیده، دارای سرعت رشد بالایی بودند و حدود ۷۲ ساعت پس از کشت سلولی به تراکم ۷۰ الی ۸۰ درصد رسیدند و پاساژ داده شدند (شکل ۱، A). برای جداسازی CSCs، سلول‌های HT-29 به صورت معلق کشت داده شد. در طی ۴ روز اول پس از کشت سلول‌ها که به صورت منفرد و تک سلولی بودند، میزان مرگ سلولی زیاد بود. با گذشت زمان، سلول‌ها شروع به رشد و تکثیر کردند و کلونی‌های کروی شروع به شکل‌گیری کردند. کلونی‌ها در مرکز تیره تر و در لبه‌ها روشن تر بودند. پس از ۱۴ روز، CSCs جهت بررسی و تایید جداسازی شد (شکل ۱، B). به منظور تایید بنیادی بودن سلول‌های جداسازی شده از رده سلولی سرطان کولورکتال (HT-29)، بیان مارکر CD133 با استفاده از روش فلوسایتومتری مورد بررسی قرار گرفت. همانگونه که در شکل ۱ (C) نمایش داده شده است، ۸۷٫۴٪ از سلول‌های جداسازی شده برای آنتی بادی CD133 مثبت بودند.

علاوه بر این، به منظور تایید CSCs جداسازی شده، میزان بیان ژن‌های بنیادینگی در سلول‌های اولیه HT-29 و CSCs مشتق شده از آن مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که در مقایسه با گروه کنترل میزان بیان mRNA ژن‌های *NANOG*، *OCT3/4*، *KLF4* و *C-MYC* به ترتیب ۲٫۷، ۲٫۳، ۱٫۹۴ و ۳٫۸ برابر افزایش پیدا کرده اند (شکل ۲)، که این افزایش بیان از لحاظ آماری معنادار بود ($P\text{-value} < 0.05$).

بررسی سمیت هایپرترمی بر سلول‌ها

به منظور بررسی سمیت هایپرترمی بر سلول‌ها، میزان بقای رده‌ی سلولی HT-29 و CSCs مشتق از آن، پس از ۲۴ و ۴۸ ساعت با استفاده از MTT assay مورد ارزیابی قرار گرفت. همان گونه که در شکل ۳ (A) نشان داده شده است، درصد سلول‌های زنده HT-29 و CSCs تیمار شده با هایپرترمی (۴۲ و ۴۳ درجه سانتی‌گراد) پس از ۲۴ و ۴۸ ساعت، نسبت به گروه کنترل (۳۷ درجه

نشان داده شده است، میزان بیان mRNA های *OCT3/4*، *CTNBN1* و *WNT1*، *PCNA*، *NANOG* و سلول‌های HT-29 در CSCs تیمار شده با دما (۴۲ و ۴۳ درجه سانتی‌گراد) نسبت به گروه کنترل (۳۷ درجه سانتی‌گراد) کاهش پیدا کرده، اما این تغییر بیان در هیچ‌کدام از گروه‌ها قابل توجه نبود ($P\text{-value} > 0.05$). میزان بیان ژن *KLF4* در سلول‌های HT-29 و CSCs تیمار شده با هایپرترمی نسبت به گروه کنترل افزایش بیان پیدا کرده بود، اما این تغییر بیان فقط در CSCs چشمگیر بود. همچنین، میزان بیان ژن‌های *BAX*، *P53* در سلول‌های HT-29 و CSCs تیمار شده با دما (۴۲ و ۴۳ درجه سانتی‌گراد) نسبت به گروه کنترل (۳۷ درجه سانتی‌گراد) افزایش و میزان بیان *BCL2* کاهش پیدا کرده بود. این تغییرات در سلول‌های HT-29 معنی‌دار نبود ($P\text{-value} > 0.05$)، ولی در CSCs به صورت چشمگیری تغییر بیان در mRNA های آپوپتوزی مشاهده شد ($P\text{-value} < 0.05$). علاوه بر این، بین گروه‌های تیمار شده با دمای ۴۲ و ۴۳ درجه سانتی‌گراد تفاوت معناداری در میزان بیان mRNA ژن‌ها، در سلول‌های HT-29 و CSCs مشاهده نشد ($P\text{-value} > 0.05$).

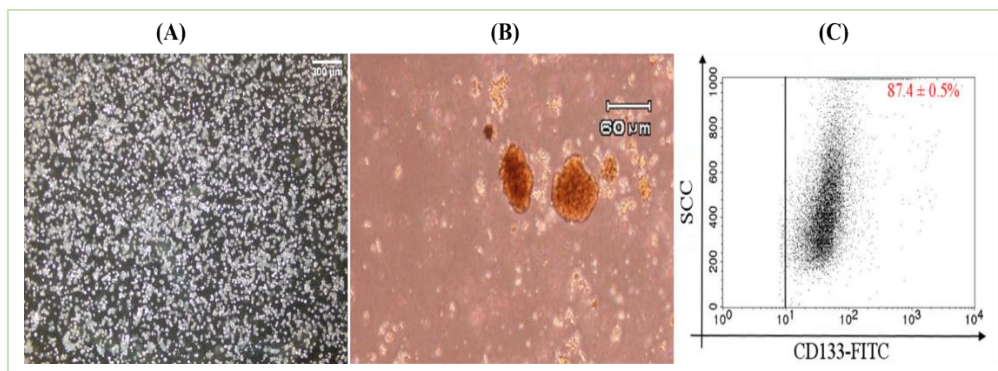
سانتی‌گراد) کاهش یافته بود، با این حال این کاهش بقا فقط در CSCs از لحاظ آماری معنادار بود ($P\text{-value} < 0.05$).

تاثیر هایپرترمی بر تکثیر سلول‌ها

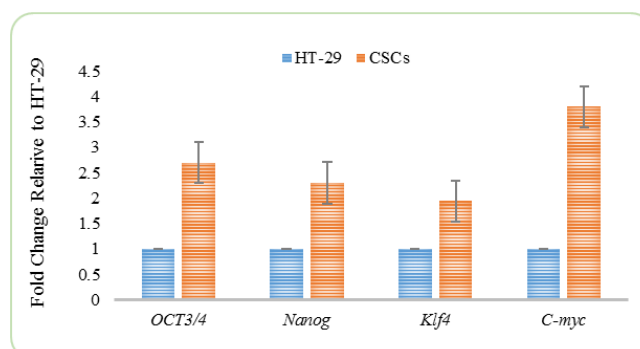
شمارش سلول‌های تیمار شده با هایپرترمی پس از سه بازه زمانی (۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت) با استفاده از روش رنگ آمیزی تریپان بلو، نتایج به دست آمده از آزمون MTT را تایید کرد (شکل ۳، B و C). تعداد سلول‌های HT-29 تیمار شده با هایپرترمی نسبت به گروه کنترل کاهش پیدا کرده بود، اما از لحاظ آماری معنادار نبود ($P\text{-value} > 0.05$)، با این حال، تعداد CSCs تیمار شده با هایپرترمی پس از ۲۴ ساعت به صورت چشمگیری کاهش پیدا کرده بود ($P\text{-value} < 0.05$).

بررسی اثر هایپرترمی بر میزان بیان ژن‌ها

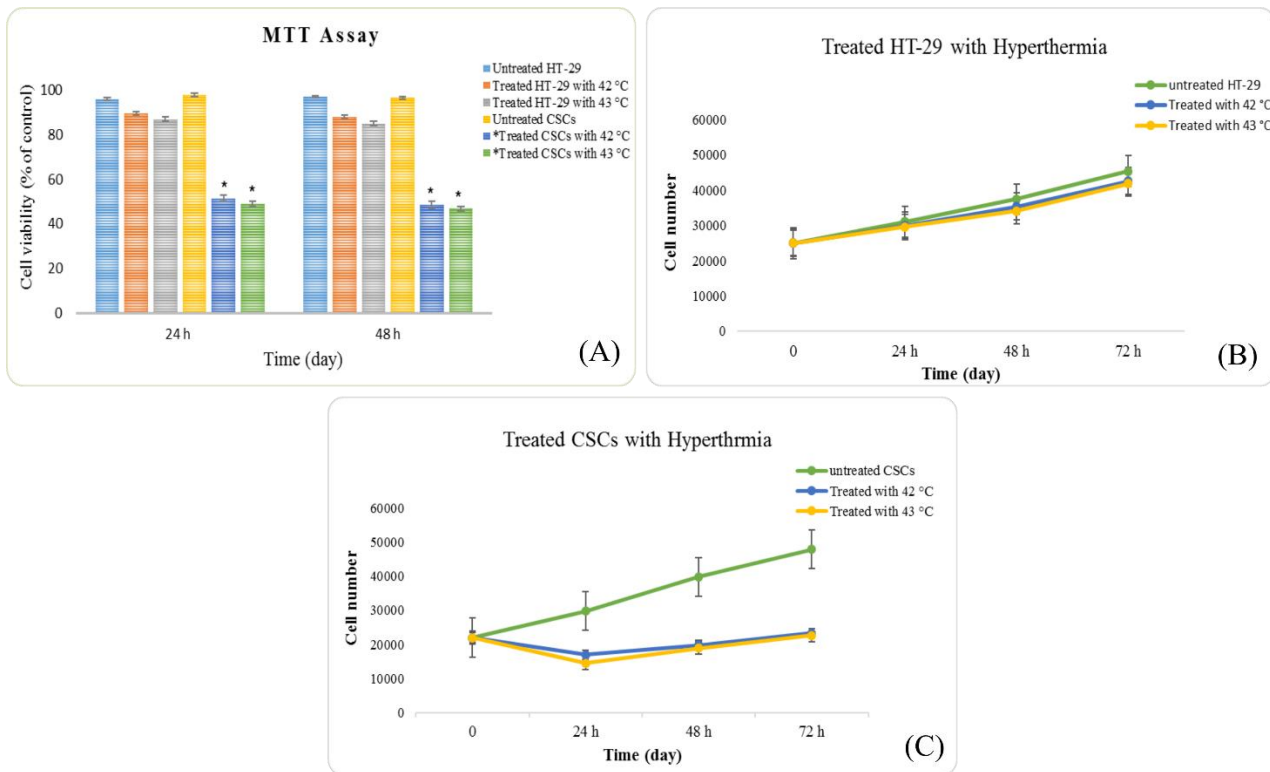
به منظور بررسی اثر هایپرترمی روی سلول‌های سرطانی و CSCs، میزان بیان mRNA ژن‌های مربوط به خصوصیات بنیادینگی، مسیر پیام رسانی Wnt، تکثیر سلولی و آپوپتوز با استفاده از آزمون qRT-PCR مورد ارزیابی قرار گرفت. همان گونه که در شکل ۴



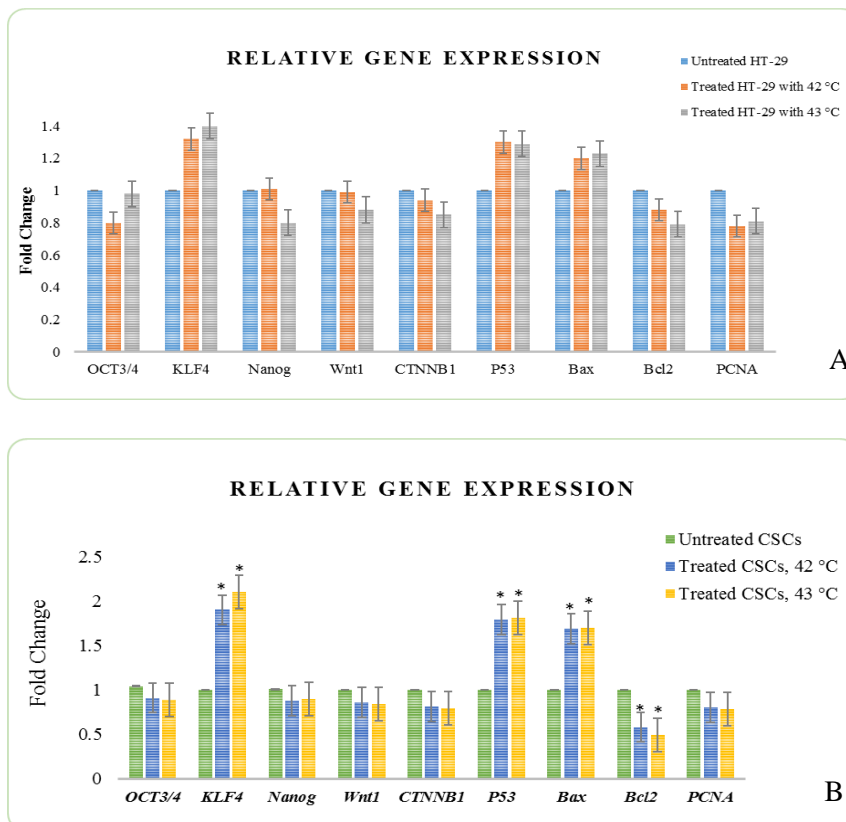
شکل ۱. (A) کشت سلول‌های HT-29 (Scale bar=300 μm)، (B) CSCs مشتق شده از رده سلولی HT-29 (Scale bar= 60 μm) و (C) نتایج فلوسایتومتری با استفاده از آنتی بادی CD133.



شکل ۲. میزان بیان ژن‌های بنیادینگی در CSCs جداسازی شده نسبت به HT-29.



شکل ۳. (A): بررسی سمیت هایپرترمی بر رده سلولی HT-29 و CSCs مشتق از آن با استفاده از MTT assay، (B): منحنی رشد سلول‌های HT-29 تیمار شده با هایپرترمی، (C): منحنی رشد CSCs تیمار شده با هایپرترمی. علامت (*) نشان دهنده اختلاف معنی دار آماری است (P-value < 0.05).



شکل ۴. تاثیر هایپرترمی بر بیان mRNA ژن‌های مربوط به خصوصیات بنیادینگی، مسیر پیام رسانی Wnt، آپوئوز و تکثیر سلولی: (A) در سلول HT-29 و CSCs. علامت (*) نشان دهنده اختلاف معنی دار آماری است (P-value < 0.05).

بحث:

علاوه بر این، توانایی فرار از آپوپتوز یکی از علت‌های تغییر فیزیولوژی سلول و ایجاد سرطان است. مطالعات نشان داده است که بین فعال شدن مسیر Wnt/catenin و القای آپوپتوز از طریق مسیرهای بیرونی و درونی، شامل بیان بیش از حد *Bax*، *c-myc* و کاهش بیان *Bcl2* یک ارتباط و همبستگی وجود دارد [۲۴]. مجموعه این شرایط به همراه ظرفیت بالای CSCs در ترمیم آسیب‌های DNA و بیان بالای انتقال دهنده‌های ABC که باعث خارج کردن داروهای ضد سرطان از CSCs می‌شوند، پژوهشگران را بر این داشته تا راهبردهای درمانی موثرتری برای مقابله با CSCs در نظر بگیرند [۱۵، ۲۵، ۲۶].

در مطالعات زیادی به هایپرترمی به عنوان یک روش مناسب برای پیشگیری و یا کمک به روش‌های درمانی سرطان از جمله شیمی درمانی و پرتودرمانی توجه شده است. هایپرترمی با استفاده از چندین سازوکار میزان حساسیت پرتودرمانی را افزایش می‌دهد [۲۷]. این سازوکارها عبارتند از: ۱- ممانعت از ترمیم آسیب وارد شده به DNA، ۲- مرگ سلول‌های هایپوکسی و سلول‌هایی که در فاز S چرخه‌ی سلولی قرار دارند [۲۸]، ۳- اختلال در عملکرد غشای سلولی (از طریق تاثیر بر ثبات، سیالیت و نفوذپذیری غشاها) [۲۹]، ۴- دنا توره شدن پروتئین‌ها به ویژه پروتئین‌هایی که در فرآیندهایی از جمله متابولیسم سلولی، سنتز پروتئین، سنتز اسید نوکلئیک و پلیمریزاسیون DNA/RNA نقش دارند [۳۰] و ۵- تولید گونه‌های اکسیژن فعال (ROS)، که این افزایش ROS خود می‌تواند آپوپتوز را تسهیل کند [۳۰، ۳۱].

از این رو در مطالعه‌ی حاضر، تاثیر هایپرترمی بر بقا و مسیرهای پیام رسانی مهم در رده سلولی سرطانی HT-29 و CSCs جداسازی شده از آن بررسی شد. نتایج حاصل از مطالعه‌ی هایپرترمی بر سلول‌های HT-29 و CSCs از آن نشان داد که هایپرترمی سبب کاهش بقای هردو نوع سلول می‌شود که این کاهش بقا در CSCs چشمگیرتر بود. علاوه بر این، بررسی میزان بیان ژن در گروه‌های مختلف مورد مطالعه نشان داد که هایپرترمی سبب کاهش میزان بیان mRNA ژن‌های مربوط به بنیادینگی، تکثیر سلولی، مسیر پیام رسانی Wnt می‌شود، ولی این تغییر بیان در هیچ گروه ژنی قابل توجه نبود. با وجودی که میزان بیان mRNA ژن‌های درگیر در آپوپتوز در هردو نوع سلول افزایش پیدا کرده بود، این افزایش بیان فقط در CSCs معنادار بود.

همچنین نتایج نشان داد که میزان بیان mRNA ژن *KLF4* در سلول‌های تیمار شده با هایپرترمی افزایش پیدا کرده بود، اما این افزایش بیان فقط در CSCs معنادار بود. مطالعات مختلف نشان داده است که مارکر *KLF4* می‌تواند به عنوان یک سرکوب کننده تومور یا یک انکوژن، بسته به بافت تومور، عمل کند [۳۴، ۳۵].

در سال‌های اخیر، نظریه‌ای مبنی بر نقش CSCs در گسترش بدخیمی، تهاجم، متاستاز و همچنین عود مجدد سرطان مطرح شده است [۱۳، ۱۴]. حدود ۲۵ درصد از کل سلول‌های تشکیل دهنده‌ی تومور در بافت‌های توموری را سلول‌هایی با ویژگی بنیادی تشکیل می‌دهند [۱۵]. این سلول‌ها دارای توانایی خودنوزایی نامحدود و تمایز به سلول‌های دیگر هستند. نشانگرهای اختصاصی برای شناسایی CSCs عبارتند از: ۱- بیان مارکرهای پروتئینی اختصاصی در غشای سلولی، ۲- بیان ژن‌های ویژه حالت بنیادینگی، ۳- تشکیل اجسام کروی در *in vitro* و ۴- تولید تومور در *in vivo* [۱۶]. به منظور شناسایی CSCs در تومورهای انسانی یا رده‌های سلولی، از یک مارکر به تنهایی و یا از مجموعه‌ای از مارکرها استفاده می‌شود. از میان مارکرهای پروتئینی شناسایی شده، دو مارکر CD44 و CD133 به میزان زیادی در تومورهای با منشاء اپیتلیال - مزانشیم همچون CSCs کولون مشاهده شده است و به عنوان یک مارکر اصلی جمعیت آغاز کننده تومور در بسیاری از تومورهای جامد مشابه کولون در نظر گرفته می‌شود [۱۷-۲۰].

در مطالعه‌ی حاضر، ابتدا با استفاده از روش تشکیل اجسام کروی روی آگار، یک محیط غیر چسبنده‌ی برای رشد CSCs ایجاد شد و پس حدود ۱۳ الی ۱۴ روز، مشابه مطالعات پیشین [۲۱]، بدون نیاز به فاکتورهای رشد و تنها با استفاده از محیط کشت کامل جداسازی CSCs انجام شد، سپس ماهیت این سلول‌ها از طریق بررسی بیان مارکرهای پروتئینی و ژنی مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج نشان داد که CSCs جداسازی شده برای مارکر CD133 مثبت بودند. همچنین، بیان ژن‌های اختصاصی سلول‌های بنیادی شامل *OCT3/4*، *NANOG*، *C-MYC* و *KLF4* در CSCs جداسازی شده در مقایسه با سلول‌های HT-29 به طور قابل ملاحظه‌ای افزایش نشان داد، که خود تاییدی بر بنیادی بودن سلول‌های جداسازی شده از HT-29 بود.

مطالعات نشان داده است که CSCs، مارکرهای انتقال اپیتلیال به مزانشیم (EMT، Epithelial-to-mesenchymal transition) را نشان می‌دهند و با به دست آوردن خصوصیات مزانشیمی می‌توانند به عنوان سلول‌های آغاز کننده تومور در نقطه ثانویه عمل کنند [۲۲]. بنابراین، روش‌های درمانی که در آن مسیرهای پیام رسانی مهم CSCs را هدف قرار می‌دهند، می‌توانند هدف‌های مناسبی برای درمان سرطان باشند. از جمله مسیرهای مهم پیام رسانی سلول‌های بنیادی می‌توان به مسیر پیام رسانی Wnt/ β -Catenin اشاره کرد که به طور رایجی در CSCs تغییر می‌کند، در حفظ و نگهداری این سلول‌ها نقش دارند و با بیان ژن‌های EMT نیز در ارتباط می‌باشند [۲۳].

کم تیمار با هایپرترمی باشد. از طرفی دیگر، سلول‌های HT-29 شامل مجموعه‌ای از سلول‌های سرطانی و بنیادی است و به همین دلیل هایپرترمی ممکن است بر این سلول‌ها تاثیر کمتری داشته باشد.

نتیجه‌گیری:

در این مطالعه، CSCs با موفقیت از رده سلولی HT-29 جداسازی شد و ماهیت بنیادینگی این سلول‌ها با استفاده از بیان مارکر CD133 و افزایش بیان mRNA ژن‌های ویژه بنیادینگی تایید شد. در مجموع نتایج حاصل از تیمار سلول‌های HT-29 و CSCs مشتق از آن با هایپرترمی نشان داد که افزایش دما دارای اثر سیتوتوکسیک بر سلول‌ها، به ویژه CSCs است. هایپرترمی سبب کاهش بیان معناداری در mRNA ژن‌های مربوط به بنیادینگی، تکثیر سلولی، مسیر پیام رسانی Wnt نشد. همچنین، هایپرترمی سبب افزایش بیان چشمگیر mRNA ژن‌های وابسته به آپوپتوز و سرکوب کننده تومور سلولی در CSCs شد. از این رو پیشنهاد می‌شود که دماهای بالاتر، مدت زمان بیشتر و ترکیب هایپرترمی با سایر روش‌های درمانی مورد ارزیابی قرار گیرد.

تشکر و قدردانی:

این مقاله مستخرج از پایان نامه خانم بهناز ولی بیگی در مقطع دکتری سلولی و مولکولی با کد پژوهشی (۱۶۲۲۶۸۱۸۷) است که با همکاری گروه زیست شناسی دانشگاه آزاد اسلامی واحد مرودشت و همچنین مرکز تحقیقات علوم و تکنولوژی تشخیص آزمایشگاهی دانشکده پیراپزشکی و گروه پاتولوژی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی شیراز انجام شد.

تضاد منافع:

نویسندگان این مقاله هیچ گونه تضاد منافی را ذکر نکردند.

شواهد حاکی از آن است که پروتئین KLF4 می‌تواند با موفقیت تکثیر یا مهاجرت سلول‌های سرطانی کولورکتال را سرکوب کند [۳۶، ۳۷]. افزایش بیان mRNA ژن *KLF4* در مطالعه حاضر خود تاییدی بر نقش سرکوب کنندگی توموری این مارکر است. در مطالعه‌ای که توسط قربانی و همکاران انجام شد نتایج حاکی از آن بود که هایپرترمی می‌تواند سبب کاهش میزان بقا و کاهش بیان ژن‌های مقاومت دارویی *MDR1* و *MRP4* شود، ولی این کاهش از لحاظ آماری معنادار نبود [۳۲].

در مطالعه‌ای که توسط Eynali و همکارانش انجام شد، اثرات سیتوتوکسیک هایپرترمی و نانوذره دارای هسته اکسید آهن به عنوان حامل داروی ۵-فلورواوراسیل بر رده سلولی سرطان روده بزرگ انسانی (HT-29) مورد ارزیابی قرار گرفت. در این مطالعه، ابتدا رده سلولی HT-29 به صورت کروی کشت داده شد و سپس با غلظت‌های مختلف داروی ۵-فلورواوراسیل به تنهایی یا در حالت متصل به نانوذره به مدت ۷۴ ساعت تیمار شدند. سلول‌های کشت شده به مدت ۱ ساعت در دمای ۴۳ درجه سانتی‌گراد حرارت داده شدند. نتایج این مطالعه نشان داد استفاده همزمان هایپرترمی با نانوذره متصل به دارو دارای اثرات سیتوتوکسیک قابل توجهی نسبت به گروه‌های بدون تیمار است. در این مطالعه، برای هایپرترمی از نانوذره دارای اکسید آهن استفاده شد. در شرایط هایپرترمی، اکسید آهن موجود در نانوذره حرارت را جذب می‌کند و منجر به افزایش دمای داخل سلول‌های تومور به صورت موضعی می‌شود که باعث افزایش میزان مرگ سلولی خواهد شد. از طرفی، استفاده از هایپرترمی به عنوان یک محرک خارجی سبب افزایش آزاد شدن دارو از نانوذره می‌شود که به نوبه‌ی خود از بین رفتن سلول‌های سرطانی را به دنبال خواهد داشت [۳۳].

بنابراین، علت این که در مطالعه‌ی حاضر تاثیر معناداری بر برخی از ویژگی‌های سلول‌های HT-29 و CSCs مشاهده نشد، می‌تواند ناشی از هایپرترمی معمولی، درجه حرارت پایین و یا مدت زمان

References:

- Torrey LA, Bray F, Siegel RL, Ferlay J, Lortet-Tieulent J, Jemal A. Global cancer statistics, 2012. *CA Cancer J Clin.* 2015;65(2):87-108.
- Azadeh S, Reza FS, Sara A, Mohsen V, Bijan M-D, Zali ZR. Four years incidence rate of colorectal cancer in Iran: a survey of national cancer registry data-implications for screening. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2012;13(6):2695-8.
- Kámory E, Olasz J, Csuka O. Somatic APC inactivation mechanisms in sporadic colorectal cancer cases in Hungary. *Pathol Oncol Res.* 2008;14(1):51-6.
- Johnson CM, Wei C, Ensor JE, Smolenski DJ, Amos CI, Levin B, et al. Meta-analyses of colorectal cancer risk factors. *Cancer Causes Control.* 2013;24(6):1207-22.
- Bhardwaj A, Parekh K, Jain N. In vitro hyperthermic effect of magnetic fluid on cervical and breast cancer cells. *Sci Rep.* 2020;10(1):1-13.
- Ghanbarei S, Sattarahmady N, Zarghampoor F, Azarpira N, Hossein-Aghdaie M. Effects of labeling human mesenchymal stem cells with superparamagnetic zinc-nickel ferrite nanoparticles on cellular characteristics and adipogenesis/osteogenesis differentiation. *Biotechnol Lett.* 2021;43(8):1659-73.
- Walcher L, Kistenmacher A-K, Suo H, Kitte R, Dlucek S, Strauß A, et al. Cancer stem cells—origins

- and biomarkers: perspectives for targeted personalized therapies. *Front Immunol.* 2020; 11:1280.
8. Majumdar S, Liu S-T. Cell division symmetry control and cancer stem cells. *AIMS Mol Sci.* 2020;7(2):82.
 9. Ademaj A, Veltsista DP, Ghadjar P, Marder D, Oberacker E, Ott OJ, et al. Clinical Evidence for Thermometric Parameters to Guide Hyperthermia Treatment. *Cancer.* 2022;14(3):625.
 10. Elming PB, Sørensen BS, Spejlborg H, Overgaard J, Horsman MR. Does the combination of hyperthermia with low LET (linear energy transfer) radiation induce anti-tumor effects equivalent to those seen with high LET radiation alone? *Int J Hyperthermia.* 2021;38(1):105-10.
 11. Chen S-F, Chang Y-C, Nieh S, Liu C-L, Yang C-Y, Lin Y-S. Nonadhesive culture system as a model of rapid sphere formation with cancer stem cell properties. *PLoS One.* 2012;7(2):e31864.
 12. Yuhas JM, Li AP, Martinez AO, Ladman AJ. A simplified method for production and growth of multicellular tumor spheroids. *Cancer Res.* 1977;37(10):3639-43.
 13. Roukos DH. Breast-cancer stromal cells with TP53 mutations. *N Engl J Med.* 2008;358(15):1636.
 14. Aramini B, Masciale V, Grisendi G, Bertolini F, Maur M, Gwaitoli G, et al. Dissecting Tumor Growth: The Role of Cancer Stem Cells in Drug Resistance and Recurrence. *Cancer.* 2022;14(4):976.
 15. Montazersaheb S, Fathi E, Mamandi A, Farahzadi R, Heidari HR. Mesenchymal stem cells and cancer stem cells: an overview of tumor-mesenchymal stem cell interaction for therapeutic interventions. *Curr Drug Targets.* 2022;23(1):60-71.
 16. Goričan L, Gole B, Potočnik U. Head and neck cancer stem cell-enriched spheroid model for anticancer compound screening. *Cell.* 2020;9(7):1707.
 17. Gao J, Yang T, Wang X, Zhang Y, Wang J, Zhang B, et al. Identification and characterization of a subpopulation of CD133+ cancer stem-like cells derived from SK-UT-1 cells. *Cancer Cell Int.* 2021;21(1):1-11.
 18. Tsunekuni K, Konno M, Haraguchi N, Koseki J, Asai A, Matsuoka K, et al. CD44/CD133-positive colorectal cancer stem cells are sensitive to trifluridine exposure. *Sci Rep.* 2019;9(1):1-8.
 19. Clevers H. The cancer stem cell: premises, promises and challenges. *Nat Med.* 2011;17(3):313-319.
 20. Mohammad-Bagher G, Arash A, Morteza B-R, Naser M-S, Ali M. Synergistic effects of acetyl-L-carnitine and adipose-derived stromal cells on improving regenerative capacity of acellular nerve allograft in sciatic nerve defect. *J Pharmacol Exp Ther.* 2019;368(3):490-502.
 21. Liu J, Ma L, Xu J, Liu C, Zhang J, Liu J, et al. Spheroid body-forming cells in the human gastric cancer cell line MKN-45 possess cancer stem cell properties. *Int J Oncol.* 2013;42(2):453-9.
 22. Sampieri K, Fodde R, editors. *Cancer stem cells and metastasis.* Semin Cancer Biol. 2012 – Elsevier.
 23. Clara JA, Monge C, Yang Y, Takebe N. Targeting signalling pathways and the immune microenvironment of cancer stem cells—A clinical update. *Nat Rev Clin Oncol.* 2020;17(4):204-32.
 24. Rubio C, Mendoza C, Trejo C, Custodio V, Rubio-Osornio M, Hernández L, et al. Activation of the extrinsic and intrinsic apoptotic pathways in cerebellum of kindled rats. *Cerebellum.* 2019;18(4):750-60.
 25. Alizadeh AM, Shiri S, Farsinejad S. Metastasis review: from bench to bedside. *Tumour Biol.* 2014;35(9):8483-523.
 26. Vidal S, Rodriguez-Bravo V, Galsky M, Cordon-Cardo C, Domingo-Domenech J. Targeting cancer stem cells to suppress acquired chemotherapy resistance. *Oncogene.* 2014;33(36):4451-63.
 27. Kaur P, Hurwitz MD, Krishnan S, Asea A. Combined hyperthermia and radiotherapy for the treatment of cancer. *Cancer.* 2011;3(4):3799-823.
 28. Sun X, Xing L, Clifton Ling C, Li GC. The effect of mild temperature hyperthermia on tumour hypoxia and blood perfusion: relevance for radiotherapy, vascular targeting and imaging. *Int J Hyperthermia.* 2010;26(3):224-31.
 29. Nikfarjam M, Muralidharan V, Christophi C. Mechanisms of focal heat destruction of liver tumors. *J Surg Res.* 2005;127(2):208-23.
 30. Milleron RS, Bratton SB. Heat shock induces apoptosis independently of any known initiator caspase-activating complex. *Biol Chem.* 2006;281(25):16991-7000.
 31. Curley SA, Palalon F, Sanders KE, Koshkina NV. The effects of non-invasive radiofrequency treatment and hyperthermia on malignant and nonmalignant cells. *Int J Environ Res Public Health.* 2014;11(9):9142-53.
 32. Ghorbani Z, Heidari M, Jafarinia M, Rohani M, Akbari A. The Effect of Hyperthermia on the Gene Expression of MDR1 and MRP4 Drug Efflux in Colorectal Cancer Cells. *J Babol Univ Med Sci.* 2020;22(1):388-95.
 33. Eynali S, Khoei S, Khoee S, Esmaelbeygi E. Evaluation of the cytotoxic effects of hyperthermia and 5-fluorouracil-loaded magnetic nanoparticles on human colon cancer cell line HT-29. *Int J Hyperthermia.* 2017;33(3):327-35.
 34. Rowland BD, Bernards R, Peeper DS. The KLF4 tumour suppressor is a transcriptional repressor of p53 that acts as a context-dependent oncogene. *Nat Cell Biol.* 2005;7(11):1074-82.
 35. Tetreault M-P, Yang Y, Katz JP. Krüppel-like factors in cancer. *Nat Rev Cancer.* 2013;13(10):701-13.
 36. Shie J-L, Chen ZY, Fu M, Pestell RG, Tseng C-C. Gut-enriched Krüppel-like factor represses cyclin D1 promoter activity through Sp1 motif. *Nucleic Acids Res.* 2000;28(15):2969-76.
 37. Ma Y, Wu L, Liu X, Xu Y, Shi W, Liang Y, et al. KLF4 inhibits colorectal cancer cell proliferation dependent on NDRG2 signaling. *Oncol Rep.* 2017;38(2):975-84.

Evaluation of Hyperthermia Effects on Proliferation, Survival, and Gene Expression of Stemness-Related, Wnt signaling, and Apoptosis Pathways in Colorectal Cancer Stem Cell

Behnaz Valibeigi¹, Abbas Behzad- Behbahani^{2*}, Mohsen Forouzanfar³
Farzaneh Zarghampoor^{4**}, Mojtaba Jaafarinia⁵

Received: 2022.05.07

Revised: 2022.06.25

Accepted: 2022.06.29

1. Department of Biology, Marvdasht Branch, Islamic Azad University, Marvdasht, Iran
2. Professor, Diagnostic Laboratory Sciences and Technology Research Center, School of Paramedical Sciences, Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, Iran
3. Assistant Professor, Department of Biology, Marvdasht Branch, Islamic Azad University, Marvdasht, Iran
4. PhD, Diagnostic Laboratory Sciences and Technology Research Center, School of Paramedical Sciences, Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, Iran
5. Assistant Professor, Department of Biology, Marvdasht Branch, Islamic Azad University, Marvdasht, Iran

Pars Journal of Medical Sciences, Vol.20, No.2, Summer 2022

Pars J Med Sci 2022;20(2):21-30

Abstract:

Introduction:

Today, cancer stem cells have attracted a lot of attention as tumour-initiating cells. Hyperthermia was also found to be beneficial in cancer treatment in many studies. In the present study, we assessed the effects of hyperthermia on colorectal cancer cells (HT-29) and their derived cancer stem cells (CSCs).

Materials and Methods:

CSCs were isolated from the HT-29 cell lines and then, the expression of surface marker and stemness-related genes were evaluated. Next, the toxicity effect of hyperthermia on HT-29 and CSCs was assessed. In addition, the effect of hyperthermia on the expression of stemness, proliferation, Wnt signaling pathway, and apoptosis genes was evaluated. Finally, the data were statistically analyzed.

Results:

Isolated-CSCs were positive for CD133 surface marker and the expression of stemness genes in the isolated-CSCs was significantly higher than HT-29 cells (P -value < 0.05). Treatment with hyperthermia reduced the survival rate of HT-29 and CSCs. In both groups, the gene expression of *OCT3/4*, *NANOG*, *PCNA*, *WNT1*, and *CTNNB1*, was decreased (P >0.05). In addition, the expression of *P53*, *KLF4*, and *BAX* genes was significantly increased in CSCs (P < 0.05).

Conclusion:

The results showed that hyperthermia did not have a significant effect on HT-29 cells. However, it had a significant effect on the cell viability, growth curve, expression of genes involved in apoptosis and *KLF4* in treated-CSCs. Therefore, hyperthermia can have a beneficial effect on inhibiting the growth and proliferation of CSCs.

Keywords: Colorectal Cancer, Hyperthermia, and Cancer Stem Cell

* Corresponding author Email: behzadba@sums.ac.ir, behzadba@gmail.com, f.zarghampoor@gmail.com