

اثر محیط روی سلول‌های ملانوما A375 در القای تغییرات بدخیمی و افزایش قابلیت مهاجرت ملانوسیت‌های انسانی

داود سنوقی^۱، دکتر شیرین فریور^۲، پریسا صحرانورد^۳، دکتر مرضیه ابراهیمی^{۴*}

۱. کارشناس ارشد ژنتیک، گروه ژنتیک، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه شهید بهشتی، تهران، ایران

۲. استادیار گروه ژنتیک، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه شهید بهشتی، تهران، ایران

۳. دانشجوی دکتری سلولی و مولکولی، پژوهشگاه رویان، پژوهشکده زیست‌شناسی و فناوری سلول‌های بنیادی جهاد دانشگاهی، مرکز تحقیقات علوم سلولی، گروه سلول‌های بنیادی و زیست‌شناسی تکوینی، تهران، ایران

۴. دانشیار پژوهشگاه رویان، پژوهشکده زیست‌شناسی و فناوری سلول‌های بنیادی جهاد دانشگاهی، مرکز تحقیقات علوم سلولی، گروه سلول‌های بنیادی و زیست‌شناسی تکوینی، تهران، ایران

چکیده

سابقه و هدف: سلول‌های سرطانی، مجموعه‌ای از فاکتورهای مختلف را به محیط پیرامونی خود آزاد می‌کنند که می‌توانند به تغییر عملکرد سلول‌های موجود در ریزمحیط تومور و همچنین سلول‌های دورتر از ناحیه‌ی توموری منجر شوند. هدف این مطالعه، بررسی اثر محیط رویی حاصل از رده سلولی ملانوما A375 بر ملانوسیت‌های انسانی در شرایط آزمایشگاهی است.

مواد و روش‌ها: محیط رویی از کشت ۴۸ ساعته رده سلولی ملانوما A375 تهیه شد. ملانوسیت‌ها در گروه تست، در فلاسک T-25 کشت و به مدت ۲۲ روز با محیط رویی حاصل از ملانوما A375 تیمار شدند. در گروه کنترل، همین تعداد سلول در حضور محیط کشت کامل (DMEM حاوی ۱۰٪ FBS) کشت داده شدند. خصوصیات ریخت‌شناسی سلول‌ها با استفاده از میکروسکوپ نوری معکوس بررسی و نرخ رشد سلول‌ها به کمک روش شمارش مستقیم سلول‌ها محاسبه شد. سپس میزان بیان ژن‌های تشخیصی ملانوما (S100A14، S100A4، MITF و TYR) و ژن‌های مرتبط با فرآیند گذار از حالت اپیتلیالی به حالت مزانشیمی (EMT) شامل CDH1، CDH2، SNAI1، SNAI2، TWIST1 و TGF- β 1 به وسیله‌ی Real-Time PCR و میزان مهاجرت سلول‌ها به کمک آزمون خراش، در هر دو گروه مورد بررسی قرار گرفت. از ملانوما A375، به عنوان کنترل مثبت استفاده شد.

یافته‌ها: نتایج نشان داد که تیمار ملانوسیت‌ها با محیط رویی ملانوما A375، سبب تغییر شکل ملانوسیت‌ها، افزایش ۱/۶۲ برابری در میزان تکثیر این سلول‌ها ($P=0/001$)، افزایش معنی‌دار بیان ژن‌های S100A14 ($P=0/003$) و TGF- β 1 ($P=0/001$)، کاهش معنی‌دار بیان ژن CDH1 ($P=0/048$) و افزایش معنی‌دار در قابلیت مهاجرت این سلول‌ها شد ($P<0/05$).

نتیجه‌گیری: بر اساس نتایج این مطالعه، مولکول‌های آزاد شده از رده سلولی ملانوما A375، می‌توانند برخی از ویژگی‌های مولکولی و عملکردی ملانوسیت‌ها را در جهت القای بدخیمی تغییر دهند.

واژگان کلیدی: ملانوما، ملانوسیت، محیط رویی، مرحله گذار از حالت اپیتلیالی به حالت مزانشیمی

لطفاً به این مقاله به صورت زیر استناد نمایید:

Sanooghi D, Farivar S, Sahranavard P, Ebrahimi M. The effects of conditioned medium derived from A375 human melanoma cell line on induction of malignant transformation and increasing the migration ability of the human melanocytes. Pejouhandeh 2016;21(4):174-185.

مقدمه

ملانوسیت‌ها از سلول‌های تاج عصبی (Neural crest)

منشأ گرفته و دارای اندام‌هایی به نام ملانوزوم هستند که کار تولید ملانین را برعهده دارند (۱). ملانوسیت‌ها تحت تأثیر عوامل مختلفی می‌توانند روند بدخیمی را طی کرده و به سلول‌های ملانومایی تبدیل شوند (۲). ملانوما به عنوان یکی از انواع سرطان‌های پوست، از کشنده‌ترین انواع سرطان‌ها بوده و با وجود این که تنها ۳٪ از سرطان‌های پوست را شامل می‌شود،

*نویسنده مسؤول مکاتبات: دکتر مرضیه ابراهیمی؛ پژوهشگاه رویان، پژوهشکده زیست‌شناسی و فناوری سلول‌های بنیادی جهاد دانشگاهی، مرکز تحقیقات علوم سلولی، گروه سلول‌های بنیادی و زیست‌شناسی تکوینی، تهران، ایران؛ کدپستی: ۴۶۴۴-۱۹۳۹۵؛ نامبر: ۲۳۵۶۲۵۰۷ (۰۲۱)؛ پست الکترونیک: mebrahimi@royaninstitute.org، marzieh.ebrahimi@gmail.com

و روند بدخیمی تسریع می‌گردد (۱۹). به نظر می‌رسد که سلول‌های سرطانی با آزادسازی برخی از عوامل و ترکیبات به محیط پیرامونی سبب القای اثرات پاراکرائنی شده و سلول‌های سالم را به سمت بدخیمی سوق می‌دهند. هدف از اجرای این مطالعه، پاسخ به این سؤال است که آیا ترشحات سلول‌های ملانوما قادر به تغییر سلول‌های ملانوسیتی هست یا خیر. برای این منظور، سلول‌های ملانوسیت انسانی با محیط کشت رویی سلول‌های A375 تیمار شده و میزان تکثیر و مهاجرت آنها و نیز بیان ژن‌های مرتبط با بنیادینگی پس از تیمار بررسی گردید.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه تجربی از رده سلولی ملانومای انسانی A375 (اهدا شده از سوی پروفیسور Spagnoli از مرکز سرطان‌شناسی بیمارستان و دانشگاه بازل سوئیس) به‌عنوان منبع تولید محیط رویی و از ملانوسیت‌های جدا شده از پوست انسان (اهدا شده از مرکز زعفرانیه)، به‌عنوان پاسخ‌دهنده استفاده شد. رده سلولی A375، از ناحیه پوست خانمی ۵۴ ساله، مبتلا به بیماری ملانومای بدخیم جدا شده است. این رده، دارای سلول‌هایی چندوجهی با ویژگی‌های ظاهری اپیتلیالی است که ابتدا به‌صورت تک لایه و چسبیده به کف ظرف رشد می‌کنند و پس از افزایش انباشتگی، به‌صورت چندلایه به رشد خود ادامه می‌دهند.

سلول‌های ملانوسیت انسانی با استفاده از نمونه‌برداری از پوست مبتلایان به بیماری ویتیلیگو (Vitiligo) در مرکز زعفرانیه پژوهشگاه رویان به‌دست آمد و پس از جداسازی و انجام ارزیابی‌های تشخیصی و تأیید توسط آن مرکز در اختیار این تحقیق قرار گرفت. ملانوسیت‌ها دوکی شکل بوده و به‌صورت چسبیده به کف ظرف کشت رشد می‌کنند.

برای کشت سلول‌های ملانوسیت و ملانوما از محیط کشت Dulbecco's Modified Eagle Medium- DMEM (Gibco) حاوی ۱٪ گلوتامین، ۱٪ پنی‌سیلین / استرپتومایسین (P/S)، ۱٪ اسیدآمینه‌های غیرضروری (NEAA) و ۱۰٪ سرم (FBS) استفاده شد (تمامی مکمل‌ها از Gibco خریداری شدند). سلول‌ها در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و در حضور ۵٪ CO₂ در انکوباتور (Labotect) کشت داده شد. سلول‌ها پس از رسیدن به انباشتگی مناسب، با استفاده از تریپسین ۰/۰۵٪ (Gibco) از کف فلاسک جدا و پاساژ داده شدند.

به منظور تهیه محیط رویی کشت، ابتدا تعداد ۶×۱۰^۵ سلول ملانومای A375 به فلاسک T-75 حاوی ۱۰ میلی‌لیتر محیط

میزان مرگ‌ومیر بالایی داشته و حدود ۷۵٪ از مرگ‌ومیرهای ناشی از سرطان پوست را شامل می‌شود (۴،۳). یکی از دلایلی که منجر به میزان بالای مرگ و میر مبتلایان به این بیماری می‌شود آن است که این بیماری به سرعت روند بدخیمی، متاستاز و تسری به سایر اندام‌های حساس بدن نظیر مغز را طی می‌کند. از آنجایی که این بیماری به‌شدت تهاجمی و متاستاتیک است و در صورت عدم تشخیص زودهنگام منجر به مرگ می‌شود، شناسایی روند بدخیمی این بیماری و فرآیندهای مرتبط با آن به منظور پیش‌بینی دقیق، تشخیص به‌موقع و نیز درمان مؤثر، ضروری است (۵).

تغییرات بدخیمی در ملانوسیت‌ها فرآیندی متشکل از چند مرحله است و با آغاز پدیده‌ی گذر از حالت اپیتلیالی به حالت مزانشیمی یا EMT (Epithelial-mesenchymal transition) همراه است (۶). مطالعات نشان داده‌اند که محرک‌های محیطی و تغییرات اپی‌ژنتیکی ناشی از آنها در این فرآیند نقش دارند (۷). این فرآیند به واسطه‌ی حضور مولکول‌های پیام‌رسان مختلف نظیر EGF، FGF، TGF-β، IGF، HGF، BMPs، Wnt و Notch تنظیم می‌شود (۷،۶). این مولکول‌های پیام‌رسان، مسیرهای پیام‌رسانی مختلف نظیر TGF-β، MAPK/ERK، PI3K/AKT، Wnt/β-catenin و Notch را فعال می‌کنند (۷،۶). راه‌اندازی این مسیرهای پیام‌رسانی سبب تغییر در بیان فاکتورهای نسخه‌برداری دخیل در فرآیند EMT نظیر خانواده‌ی TGF-β، Twist، Snail، Slug، E-cadherin و N-cadherin می‌شود (۸-۱۰). این فاکتورهای نسخه‌برداری، بیان ژن‌های دیگر از جمله شاخص‌های ملانومایی نظیر S100، MITF و TYR را تغییر می‌دهند (۱۳-۱۰). تغییرات رخ داده در سطح بیان ژن، سبب ایجاد فنوتیپ ملانومایی و افزایش میزان تکثیر در این سلول‌ها می‌شوند (۱۴،۶). شکل ظاهری این سلول‌ها نیز دچار تغییر شده و سبب سست شدن اتصال این سلول‌ها با سلول‌های مجاور و افزایش میزان مهاجرت و تهاجم این سلول‌ها می‌شود (۱۵،۶). این سلول‌های ملانومایی به‌منظور ارتباط با سایر سلول‌ها و ایجاد کنام پیش‌متاستازی ترکیبات و عوامل مختلفی نظیر سایتوکین‌ها، فاکتورهای رشد و اگزوزوم‌ها را در محیط پیرامونی خود آزاد می‌کنند (۱۶،۱۷). در این مرحله، بدخیمی به‌سرعت در سایر سلول‌های نرمال موجود در ریزمحیط (Microenvironment) القا شده و شرایط برای متاستاز مهیا می‌گردد (۱۸). با بررسی‌های صورت گرفته در سرم افراد مبتلا به سرطان، فاکتورهای مرتبط با بدخیمی همزمان با پیشروی بیماری افزایش قابل ملاحظه‌ای نشان داده

این آزمون در دو گروه ملانوسیت‌های تیمار شده (آزمون) و تیمار نشده (شاهد)، هر یک در سه تکرار زیستی مستقل انجام شد.

به منظور بررسی اثر محیط رویی بر تغییرات مولکولی سلول‌های تیمار شده، میزان بیان ژن‌های شاخص ملانوما شامل S100A4، S100A14، MITF و TYR و ژن‌های مرتبط با فرآیند EMT شامل CDH1، CDH2، SNAI1، SNAI2، TWIST1 و TGF- β در سه گروه آزمون، شاهد و رده سلولی ملانوما A375، به وسیله روش Real-Time PCR بررسی و مقایسه شد. به این منظور ابتدا RNA سلول‌های مورد نظر به کمک تریازول (Sigma) استخراج شد و سپس غلظت و خلوص آن با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر (WPA) و همچنین کیفیت آن روی ژل آگارز ۱٪ (SIGMA) در دستگاه الکتروفورز (BIO-RAD) مورد سنجش قرار گرفت. پس از آن، یک میکروگرم از RNA استخراج شده، برای سنتز cdNA به کار برده شد. این واکنش با استفاده از کیت (TaKaRa) و پرایمر هگزامر تصادفی (Random Hexamer) در دستگاه PCR (Eppendorf) صورت گرفت. سرانجام برای cdNA تولید شده، واکنش Real-Time PCR در دستگاه Applied Biosystem 7500 (Life Technologies) و با استفاده از SYBR Green (TaKaRa) Master Mix و هر یک از پرایمرهای مورد نظر (جدول ۱) انجام شد. در این ارزیابی از ژن GAPDH به عنوان کنترل داخلی استفاده شد. بیان نسبی هر یک از ژن‌ها به کمک روش $2^{-\Delta\Delta C_t}$ محاسبه شد. این آزمون در سه تکرار زیستی مستقل، هر تکرار به صورت دوتایی (Duplicate) و در سه گروه ملانوسیت‌های تیمار شده، تیمار نشده و ملانوما A375 انجام شد.

آزمون خراش (Scratch assay) برای سنجش توانایی مهاجرت ملانوسیت‌های تیمار شده در مقایسه با ملانوسیت‌های تیمار نشده صورت گرفت. برای این منظور از یک ظرف کشت ۴ خانه (Falcon) استفاده شد. تعداد 1×10^5 ملانوسیت‌های تیمار شده به همراه یک میلی‌لیتر محیطی مرکب از ۵۰٪ محیط کشت کامل DMEM و ۵۰٪ محیط رویی A375، در دو خانه از این ظرف به عنوان گروه تیمار شده (آزمون) ریخته شد. همچنین تعداد ۱۰۰ هزار سلول از ملانوسیت‌های تیمار نشده نیز (5×10^4 سلول در هر سانتی‌متر مربع) به همراه ۱/۵ میلی‌لیتر محیط کشت کامل DMEM به دو خانه دیگر از این ظرف، به عنوان گروه تیمار نشده (شاهد) اضافه شد. سپس به سلول‌ها زمان کافی داده

کشت کامل منتقل شد. پس از رسیدن به انباشتگی ۷۰ تا ۸۰ درصدی، سلول‌ها با PBS فاقد یون‌های کلسیم و منیزیم (PBS^-) شست‌وشو داده شدند. سپس ۱۰ میلی‌لیتر محیط کشت کامل DMEM فاقد سرم به آن اضافه شد و برای مدت ۲۴ ساعت انکوبه گردید. سپس محیط رویی جمع‌آوری و به منظور حذف بقایای سلولی، به مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ۳۵۰ g در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ (Hettich) شد. محیط رویی حاصل، از فیلتر سرنگی $0.22 \mu m$ عبور داده شد و پس از الیکه کردن در میکروتیوب‌های ۱/۵ میلی‌لیتری در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

به منظور بررسی اثر محیط رویی در عملکرد ملانوسیت‌ها، تعداد $1/8 \times 10^5$ ملانوسیت به فلاسک T-25 حاوی محیط کشت کامل منتقل شد. ملانوسیت‌ها به دو گروه آزمون و شاهد تقسیم شدند. ملانوسیت‌های گروه آزمون، هر دو روز یک‌بار توسط محیط رویی حاصل از ملانوما A375 تیمار شدند. بدین ترتیب که برای تعویض محیط کشت ملانوسیت‌های آزمون، محیطی متشکل از ۵۰٪ محیط رویی ملانوما A375 و ۵۰٪ محیط کشت کامل DMEM مورد استفاده قرار گرفت. تیمار به این شکل تا ۲۲ روز ادامه یافت. در طول این مدت تعویض محیط کشت ملانوسیت‌های شاهد، هر دو روز یک‌بار تنها توسط محیط کشت کامل DMEM انجام شد.

از اولین روز کشت سلول‌ها، به فاصله هر دو روز یک‌بار به کمک دوربین دیجیتال متصل به میکروسکوپ نوری معکوس (Olympus) از ملانوسیت‌های گروه تیمار شده (آزمون) و تیمار نشده (شاهد) و سلول‌های ملانوما A375 عکس‌برداری صورت گرفت. در انتها با استفاده از تصاویر به دست آمده خصوصیات ریخت‌شناسی (Morphology) این سلول‌ها مورد بررسی قرار گرفت.

برای بررسی اثر محیط رویی حاصل از ملانوما A375 بر توانایی رشد و تکثیر ملانوسیت‌ها، از آزمون نرخ رشد به روش شمارش مستقیم سلول‌ها (Direct cell counting) استفاده شد. ابتدا تعداد 4×10^5 سلول از ملانوسیت‌ها، به هریک از دو فلاسک T-25 آزمون و شاهد اضافه شد. تعویض محیط کشت سلول‌ها، هر دو روز یک‌بار به نحوی که پیش از این توضیح داده شد، صورت گرفت. بعد از ۱۴ روز سلول‌ها به کمک تریپسین ۰/۰۵٪ از کف فلاسک‌ها جدا شده و شمارش آنها به طور جداگانه به کمک لام نئوبار (HBG) انجام شد. تعداد سلول‌های شمارش شده در روز ۱۴ نسبت به تعداد سلول‌های کشت شده در روز اول، نرمال شده و نمودار مربوطه رسم شد.

جدول ۱. پرایمرهای مورد استفاده در این مطالعه.

نماد ژن	توالی پرایمر (5'→3')	طول محصول (bp)
<i>GAPDH</i>	F: GAAATCCCATCACCATCTTCC R: GGCTGTTGTCATACTTCTCAT	219
<i>S100A4</i>	F: TCCTCAGCGCTTCTTCTTTC R: AACTTGTACCCCTCTTTGCC	123
<i>S100A14</i>	F: CCTCATCAAGAACTTTCACCAG R: CAATCAGCTCCCAGAACTC	194
<i>MITF</i>	F: GTGCCAACTTCTTTCATCA R: ACCTAAACCGTCCATTCA	137
<i>TYR</i>	F: CTCCAATTAGCCAGTTCTT R: GACAGCATTCCTTCTCCA	155
<i>CDH1</i>	F: GCTCTCCACTCTTACTTCCT R: GTTTGGTCTGATGATGCG	134
<i>CDH2</i>	F: GCCCAAGACAAAGAGACCC R: CTGCTGACTCCTTCACTGAC	94
<i>SNAI1</i>	F: CCAGAGTTTACCTTCCAGCA R: GATGAGCATTGGCAGCGA	102
<i>SNAI2</i>	F: AACTACAGCGAACTGGACAC R: GGATCTCTGGTTGTGGTATGAC	91
<i>TWIST1</i>	F: CCAGGTACATCGACTTCCTC R: TCGTGAGCCACATAGCTG	85
<i>TGF-β1</i>	F: AACCCACAACGAAATCTATGAC R: TAACTTGAGCCTCAGCAGAC	142

همچنین برای ارزیابی داده‌های حاصل از آزمون خراش، روش آنالیز واریانس با اندازه‌گیری مکرر مورد استفاده قرار گرفت. نتایج به صورت $\text{Mean} \pm \text{SE}$ ارائه شد. در تمامی آزمون‌ها، $p\text{-value}$ کمتر از 0.05 ($P < 0.05$) از نظر آماری معنی‌دار در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

ابتدا خصوصیات ریخت‌شناسی سلول‌های مورد مطالعه با استفاده از تصاویر دیجیتال مورد بررسی قرار گرفت. طبق مشاهدات میکروسکوپی، اغلب سلول‌ها در رده سلولی ملانوما A375، اغلب به صورت چندوجهی و اپی‌تلوییدی، با جسم سلولی بزرگ، فاقد زواید و انشعابات و در برخی موارد نسبتاً کشیده، مزانشیم مانند با زواید کوتاه در اطراف بودند (شکل ۱A). در حالی که ملانوسیت‌ها در ابتدای کشت اغلب به صورت دوکی‌شکل، دارای زواید و انشعابات کوتاه و تعداد کمی نیز به صورت چندوجهی و نسبتاً پهن مشاهده شدند (شکل ۱B). تیمار ملانوسیت‌ها توسط محیط رویی حاصل از ملانوما A375 سبب ایجاد تغییراتی در ریخت‌شناسی ملانوسیت‌ها شد. ملانوسیت‌های تیمار شده اغلب به صورت چندوجهی با جسم سلولی مشخص و زواید و انشعابات کوتاه مشاهده شدند. در این جمعیت سلولی، تعدادی از سلول‌ها نیز ظاهری دوکی‌شکل با انشعابات نسبتاً بلند داشتند (شکل ۱C).

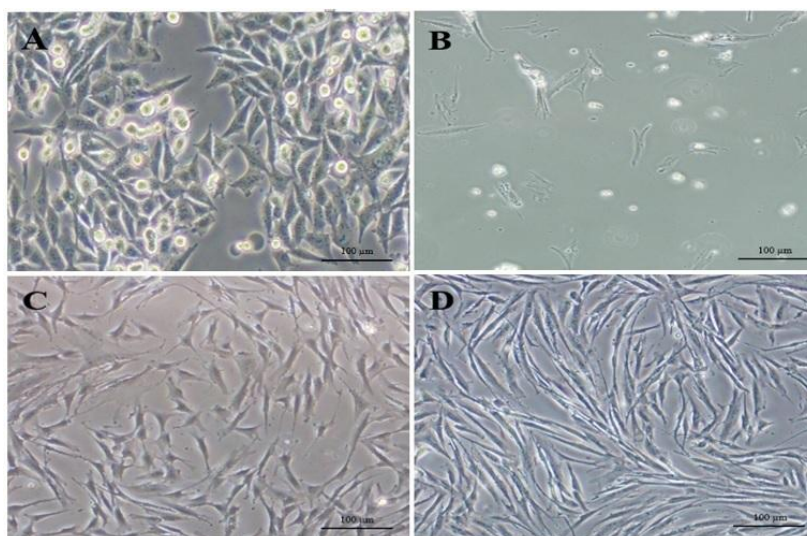
شد تا به صورت یک‌لایه، کف ظرف را پر کنند. پس از آن برای متوقف کردن تکثیر سلول‌ها، از تیمار میتوماکسین 1×10^{-5} (Sigma) استفاده شد. پس از انجام تیمار، با استفاده از نوک سرسمپلر کریستالی (Biohit) در وسط هر خانه به صورت قطری خراشی ایجاد شد. برای حذف سلول‌های کنده شده، محیط رویی تخلیه و پس از شست‌وشو با PBS^- (GIBCO) با محیط کشت DMEM حاوی 5% FBS، جایگزین شد. سپس در فواصل زمانی ۰، ۳، ۶ و ۹ ساعت بعد از خراش، توسط دوربین دیجیتال متصل به میکروسکوپ نوری معکوس (Olympus) با بزرگنمایی $\times 10$ ، عکس‌برداری از نمونه‌ها صورت گرفت. فاصله بین دو لبه خراش توسط چندین خط به وسیله نرم‌افزار Standard cellSens (Olympus) اندازه‌گیری شد و میانگین خطوط اندازه‌گیری شده محاسبه و در فرمول بسته شدن خراش قرار داده شد. سرانجام درصد بسته شدن خراش در هر نقطه زمانی در این دو گروه محاسبه و به صورت نمودار نمایش داده شد. این آزمون در دو تکرار زیستی مستقل صورت گرفت.

آنالیزهای آماری با استفاده از نرم‌افزار IBM SPSS Statistics 22 انجام گرفت. برای آنالیز داده‌هایی که دارای توزیع نرمال بودند از آزمون پارامتریک Student's t-test مستقل و برای آنالیز داده‌هایی که توزیع غیر نرمال داشتند از آزمون غیر پارامتریک Mann-whitney استفاده شد.

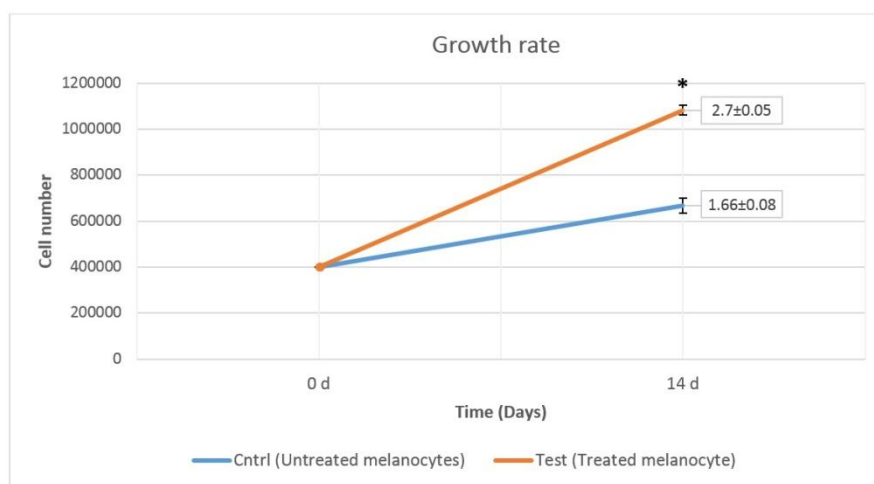
۱۴ روز به کمک لام نئوبار شمارش گردید. نرخ رشد با توجه به تعداد اولیه سلول‌ها (تعداد ۴۰۰ هزار سلول در فلاسک T-25 با سطح ۲۵ سانتی‌متر مربع) محاسبه شد. نتایج حاصل از این آزمون نشان داد نرخ رشد در ملانوسیت‌های تیمار شده ($2/7 \pm 0/05$) نسبت به ملانوسیت‌های تیمار نشده ($1/66 \pm 0/08$) به طور معنی‌داری افزایش یافته است ($1/62$ برابر، $P=0/001$ ؛ شکل ۲).

درحالی‌که در جمعیت ملانوسیت‌های تیمار نشده، اغلب سلول‌ها دوکی‌شکل بوده و در امتداد جسم سلولی کشیده خود انشعابات بلند و باریک داشتند. در این جمعیت سلولی نیز تعداد کمی از سلول‌ها، دارای ظاهری نسبتاً پهن‌تر همراه با انشعابات ثانویه بودند (شکل ۱D).

برای بررسی اثر محیط رویی رده سلولی ملانوما A375 بر روی میزان رشد و تقسیم ملانوسیت‌ها، تعداد سلول‌ها پس از



شکل ۱. تصاویر میکروسکوپی سلول‌ها. (A) رده سلولی ملانوما A375. (B) ملانوسیت‌ها در ابتدای کشت. (C) ملانوسیت‌های تیمار شده. (D) ملانوسیت‌های تیمار نشده.



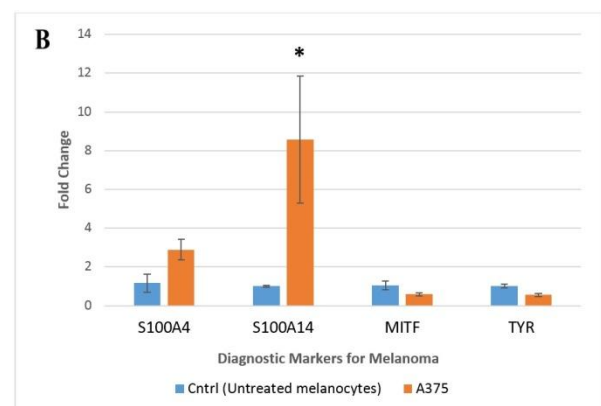
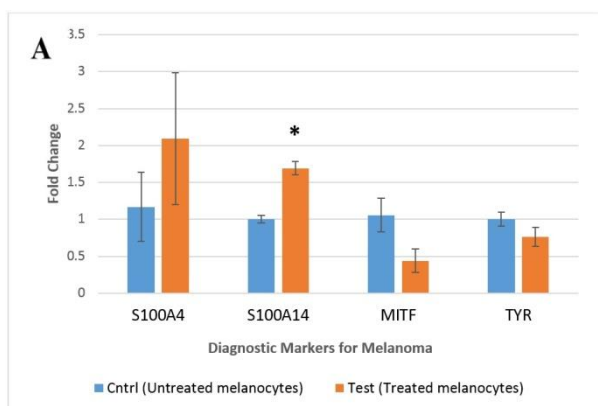
شکل ۲. سنجش میزان نرخ رشد در دو گروه ملانوسیت تیمار شده و ملانوسیت تیمار نشده. نتایج بر اساس $\text{Mean} \pm \text{SE}$ نشان داده شده است و حاصل ۳ تکرار زیستی مستقل ($n=3$) است. $P < 0/05$ به عنوان معنی‌دار در نظر گرفته شد ($*P=0/001$).

اثر محیط رویی ملانوما A375 در تغییر بیان ژن‌های ملانوما (S100, MITF و TYR) در دو گروه ملانوسیت‌های تیمار شده و تیمار نشده و در رده سلولی ملانوما A375 به‌عنوان کنترل مثبت توسط روش Real-Time PCR مورد بررسی قرار گرفت (جدول ۲). نتایج نشان داد که تیمار با محیط رویی ملانوما A375، تنها سبب افزایش معنی‌دار در بیان ژن S100A14 در گروه ملانوسیت‌های تیمار شده (تست) نسبت به گروه تیمار نشده (کنترل) گردید ($P=0/003$ ؛ شکل ۳A). بررسی بیان ژن‌های فوق در رده سلولی ملانوما A375 در مقایسه با ملانوسیت‌های تیمار نشده نشان داد که میزان بیان ژن S100A14 در رده سلولی ملانوما A375 به‌طور معنی‌دار بیشتر از ملانوسیت‌های تیمار نشده بود ($P=0/049$ ؛ شکل ۳B). الگوی افزایش و کاهش بیان سایر ژن‌ها در ملانوما A375 نسبت به

ملانوسیت‌های تیمار نشده مشابه الگوی بیان ژن در ملانوسیت‌های تیمار شده نسبت به ملانوسیت‌های تیمار نشده بود، با این وجود این تفاوت بیان در سایر ژن‌ها معنی‌دار نبود (شکل ۳B). یکی از مهم‌ترین تغییراتی که طی روند بدخیم شدن سلول‌ها رخ می‌دهد، تغییر در بیان ژن‌های مرتبط با فرآیند گذار از حالت اپیتلیالی به حالت مزانشیمی (EMT) است. بنابراین برای ارزیابی اثر محیط رویی حاصل از رده سلولی ملانوما A375 در تغییر ملانوسیت‌ها، میزان بیان ژن‌های مرتبط با فرآیند EMT شامل CDH1, CDH2, SNAI1, SNAI2, TWIST1, TGF- β 1 در گروه‌های ملانوسیت‌های تیمار شده (تست)، ملانوسیت‌های تیمار نشده (کنترل) و همچنین در رده سلولی ملانوما A375 به‌عنوان کنترل مثبت، توسط روش Real-Time PCR مورد بررسی و مقایسه قرار گرفت (جدول ۳).

جدول ۲. میانگین و خطای معیار بیان ژن‌های شاخص ملانوما در گروه‌های ملانوسیت‌های تیمار شده، تیمار نشده و ملانوما A375.

	S100A4	S100A14	MITF	TYR
ملانوسیت‌های تیمار نشده (کنترل)	1/169±0/466	1/003±0/054	1/056±0/226	1/004±0/096
ملانوسیت‌های تیمار شده (تست)	2/094±0/892	1/693±0/087	0/439±0/159	0/761±0/113
رده سلولی ملانوما A375	2/888±0/524	8/577±3/277	0/582±0/076	0/558±0/076



شکل ۳. بررسی بیان ژن‌های شاخص ملانوما توسط روش Real-Time PCR در سه گروه ملانوسیت تیمار شده، ملانوسیت تیمار نشده و رده سلولی ملانوما A375. در این آزمون ۳ تکرار زیستی مستقل ($n=3$)، هریک به‌صورت دوتایی در سه گروه ملانوسیت‌های تیمار شده، تیمار نشده و ملانوما A375 انجام و نتایج بر اساس $Mean \pm SE$ ارائه شد و $P < 0/05$ به‌عنوان معنی‌دار در نظر گرفته شد. از ژن GAPDH به‌عنوان کنترل داخلی استفاده شد. (A) بررسی میزان بیان این ژن‌ها در دو گروه ملانوسیت‌های تیمار شده و تیمار نشده. (B) بررسی میزان بیان این ژن‌ها در رده سلولی ملانوما A375 در مقایسه با ملانوسیت‌های تیمار نشده.

جدول ۳. میانگین و خطای معیار بیان ژن‌های مرتبط با فرآیند EMT در گروه‌های ملانوسیت‌های تیمار شده، تیمار نشده و ملانوما A375.

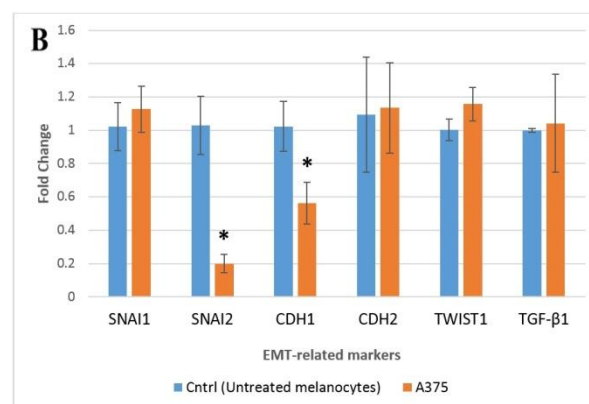
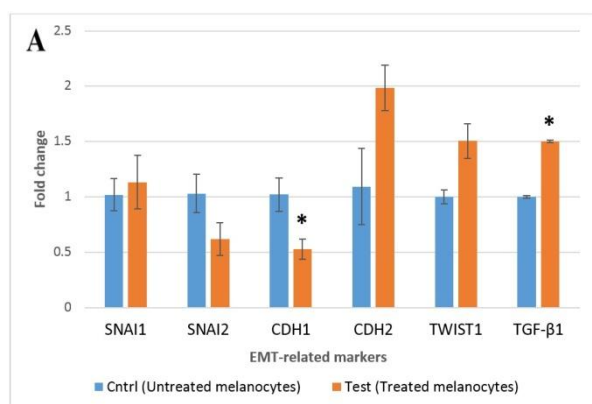
	SNAI1	SNAI2	CDH1	CDH2	TWIST1	TGF- β 1
ملانوسیت‌های تیمار نشده (کنترل)	1/02±0/144	1/031±0/174	1/022±0/15	1/094±0/345	1/002±0/063	1/000±0/012
ملانوسیت‌های تیمار شده (تست)	1/132±0/242	0/619±0/15	0/527±0/091	1/988±0/204	1/506±0/157	1/502±0/012
رده سلولی ملانوما A375	1/126±0/138	0/2±0/055	0/563±0/126	1/133±0/27	1/157±0/101	1/041±0/294

در نتیجه سرعت بسته شدن خراش، در ملانوسیت‌های تیمار شده نسبت به ملانوسیت‌های تیمار نشده بیشتر بود. به این ترتیب که ۹ ساعت پس از خراش، در ملانوسیت‌های تیمار شده دو لبه خراش به یکدیگر رسیدند در حالی که دو لبه خراش در ملانوسیت‌های تیمار نشده هنوز از هم فاصله داشتند (شکل ۵). نتایج نشان داد که میانگین میزان مهاجرت سلول‌ها (درصد بسته شدن خراش) در هر یک از نقاط زمانی ۳ ($P=0/016$)، ۶ ($P=0/004$) و ۹ ($P=0/016$) ساعت پس از خراش، در ملانوسیت‌های تیمار شده به طور معنی‌داری بیشتر از ملانوسیت‌های تیمار نشده بود (شکل ۵). همچنین ارزیابی داده‌ها با استفاده از روش آنالیز واریانس با اندازه‌گیری‌های مکرر نشان داد که تیمار، تأثیر معنی‌داری بر میزان مهاجرت ملانوسیت‌ها دارد ($P=0/001$) و میزان این تأثیر در حدود ۶۸ درصد محاسبه شد (شکل ۶).

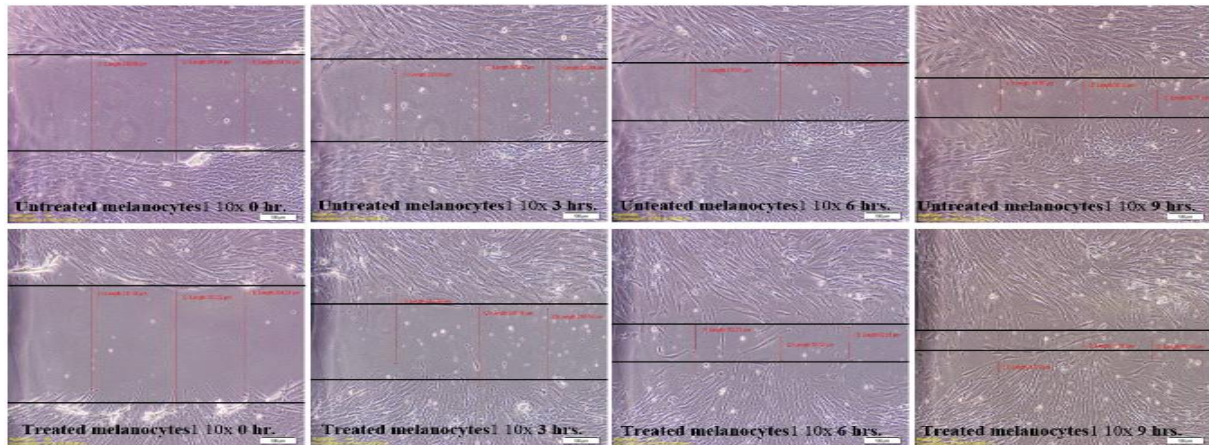
بحث

سلول‌ها به منظور ارتباط با یکدیگر، مجموعه‌ای از مولکول‌های مختلف را به محیط پیرامونی خود آزاد می‌کنند که در مجموع سکرئوم (Secretome) نامیده می‌شوند (۲۰). از جمله این دسته از ترکیبات می‌توان به آنزیم‌های مختلف، فاکتورهای رشد، سایتوکین‌ها، پروتئازهای خارج سلولی (extracellular proteases)، فاکتورهای رگ‌زایی (Angiogenic factors)، فاکتورهای تحرک سلولی (Cell motility factors)، هورمون‌ها، میانجی‌گرهای محلول و سایر مولکول‌های فعال زیستی اشاره کرد (۲۰).

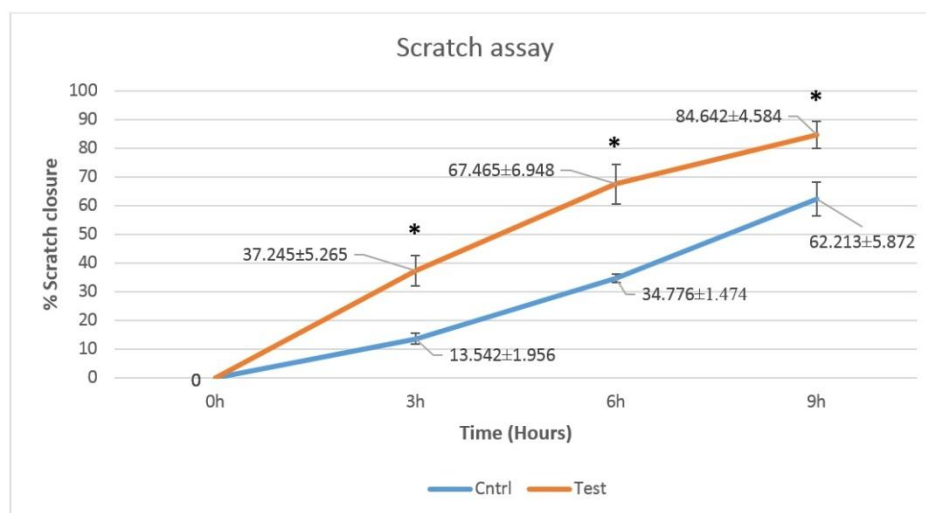
نتایج این بررسی نشان داد که میزان بیان ژن CDH1 در ملانوسیت‌های تیمار شده نسبت به ملانوسیت‌های تیمار نشده به طور معنی‌داری کاهش یافته است ($P=0/048$)؛ شکل ۴A)، در حالی که ژن TGF- β 1 در ملانوسیت‌های تیمار شده نسبت به ملانوسیت‌های تیمار نشده دارای افزایش بیان معنی‌دار بود ($P=0/001$)؛ شکل ۴A). افزایش و کاهش بیان سایر ژن‌ها بین این دو گروه از نظر آماری معنی‌دار نبود ($P>0/05$)؛ شکل ۴A). مقایسه بیان این ژن‌ها در رده سلولی ملانوما A375 و ملانوسیت‌های تیمار نشده نشان داد که میزان بیان ژن CDH1 در ملانوما A375 به طور معنی‌داری پایین‌تر از ملانوسیت‌های تیمار نشده بود ($P=0/049$)؛ شکل ۴B). ژن SNAI2 نیز در رده سلولی ملانوما A375 نسبت به ملانوسیت‌های تیمار نشده کاهش بیان معنی‌داری را نشان داد ($P=0/01$)؛ شکل ۴B). در مورد بیان سایر ژن‌ها اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد ($P>0/05$)؛ شکل ۴B). با مقایسه نتایج به دست آمده در نمودارهای زیر، میزان بیان این ژن‌ها در رده سلولی A375 و ملانوسیت‌های تیمار شده توسط محیط رویی آن در مقایسه با ملانوسیت‌های تیمار نشده، مشابهت بیشتری را نشان دادند. پس از تأیید نقش محیط رویی در تغییرات مولکولی به‌ویژه بیان شاخص‌های مرتبط با فرآیند EMT، در این مرحله توسط یک آزمون عملکردی به نام آزمون خراش، توانایی مهاجرت سلول‌ها در دو گروه ملانوسیت‌های تیمار شده و ملانوسیت‌های تیمار نشده مورد بررسی قرار گرفت. اولین ارزیابی‌های میکروسکوپی (در ساعات‌های صفر و ۳) نشان داد که سلول‌ها در هر دو گروه به داخل خراش، مهاجرت می‌کنند. اگرچه میزان مهاجرت و



شکل ۴. بررسی بیان ژن‌های دخیل در فرآیند EMT توسط Real-Time PCR در سه گروه ملانوسیت تیمار شده، ملانوسیت تیمار نشده و رده سلولی ملانوما A375. در این آزمون ۳ تکرار زیستی مستقل ($n=3$)، هریک به صورت دوتایی در سه گروه ملانوسیت‌های تیمار شده، تیمار نشده و ملانوما A375 انجام و نتایج بر اساس $Mean \pm SE$ ارائه شد و $P<0/05$ به عنوان معنی‌دار در نظر گرفته شد. از ژن GAPDH به عنوان کنترل داخلی استفاده شد. (A) نتایج بررسی و مقایسه بیان ژن‌های دخیل در فرآیند EMT بین دو گروه ملانوسیت‌های تیمار شده و تیمار نشده. (B) نتایج بررسی و مقایسه بیان ژن‌های دخیل در فرآیند EMT بین رده سلولی ملانوما A375 و ملانوسیت تیمار نشده.



شکل ۵. بررسی قابلیت مهاجرت به کمک آزمون سنجش خراش در دو گروه ملانوسیت‌های تیمار شده و ملانوسیت‌های تیمار نشده. نمای میکروسکوپی با بزرگنمایی X10 از روند بهبود خراش (بسته شدن خراش) در طی فواصل زمانی معین (۰، ۳، ۶ و ۹ ساعت پس از خراش) در دو گروه ملانوسیت‌های تیمار شده و تیمار نشده که توسط دوربین دیجیتال متصل به میکروسکوپ نوری معکوس تهیه شده است.



شکل ۶. درصد بسته شدن خراش بین دو گروه ملانوسیت‌های تیمار شده و تیمار نشده در فواصل زمانی ۰، ۳، ۶ و ۹ ساعت پس از خراش. در این آزمون ۲ تکرار مستقل (n=۲) در دو گروه ملانوسیت‌های تیمار شده و تیمار نشده انجام و نتایج بر اساس $Mean \pm SE$ ارائه شد و $P < 0.05$ به عنوان معنی دار در نظر گرفته شد.

تغییر در ترکیبات آزاد شده از سلول‌های سرطانی در مقایسه با سلول‌های نرمال گردد، جهش‌های ژنتیکی است (۲۳). یکی از جهش‌های مهمی که در بیشتر سلول‌های ملانومایی از جمله رده سلولی ملانوما A375 وجود دارد BRAFV600E است (۲۴). در این مطالعه برای بررسی اثر ترکیبات آزاد شده از سلول‌های سرطانی بر سلول‌های نرمال، از تیمار ملانوسیت‌ها توسط محیط رویی سلول‌های سرطانی ملانوما A375 استفاده شد. Eberle و همکارانش در سال ۱۹۹۳ با کشت ملانوسیت‌ها در محیط ملانوما تغییرات ریخت‌شناسی را در

علاوه بر ترکیبات پروتئینی ذکر شده، میکرو RNA ها، mRNA ها و قطعات DNA نیز در قالب ساختارهای نانوزیکولی به نام اگزوزوم به محیط رها می‌شوند (۲۱). این عوامل و ترکیبات به عنوان پیام‌رسان‌های بین سلولی در تنظیم عملکردهای مختلف نظیر رشد، تکثیر، تمایز، مهاجرت، تهاجم، متاستاز، رگ‌زایی، آپوپتوز و پاسخ ایمنی نقش دارند (۲۰). در مطالعات پیشین، مشخص شده است که ترکیبات آزاد شده از سلول‌های سرطانی در مقایسه با سلول‌های نرمال متفاوت است (۲۲). از مهم‌ترین عواملی که می‌تواند سبب

این سلول‌ها مشاهده کردند (۲۵). ملانوسیت‌ها از سلول‌های تاج عصبی مشتق شده‌اند. یکی از فاکتورهای که در تعیین ریخت‌شناسی سلول‌های مشتق شده از تاج عصبی نقش دارد $TGF-\beta 1$ است (۲۶، ۲۷). حضور این فاکتور رشد در محیط رویی ۲۵ رده سلولی ملانوما از جمله A375 توسط Elias و همکارانش در سال ۲۰۱۰ مورد تأیید قرار گرفت (۲۸). بنابراین تغییرات مشاهده‌شده در ریخت‌شناسی سلول‌های تیمار شده قابل توجیه است.

Seftor و همکارانش در سال ۲۰۰۵ گزارش کردند که عوامل و فاکتورهای آزادشده از سلول‌های ملانوما در محیط پیرامونی با راه‌اندازی مسیرهای پیام‌رسانی مختلف و همچنین القای اثرات اپی‌ژنتیک در ملانوسیت‌های تیمار شده ضمن ایجاد تغییرات ریخت‌شناسی سبب افزایش قابلیت‌های مهاجرت و تهاجم در این سلول‌ها می‌شوند (۲۹). یکی از این فاکتورها که در محیط رویی سلول‌های ملانوما تشخیص داده شده و نقش تنظیمی دارد bFGF است (۲۸). Wu و همکارانش در سال ۲۰۰۶ گزارش کردند که bFGF میزان مهاجرت ملانوسیت‌ها را افزایش می‌دهد (۳۰). این فاکتور رشد، از طریق فعال‌سازی مسیرهای پیام‌رسانی PI3K/Akt و ERK سبب بازآرایی اسکلت سلولی و به دنبال آن افزایش مهاجرت ملانوسیت‌ها می‌شود (۳۱). همچنین بر اساس گزارش Halaban و همکارانش در سال ۱۹۸۷ bFGF برای ملانوسیت‌ها به‌عنوان یک میتوژن عمل کرده و تکثیر این سلول‌ها را افزایش می‌دهد (۳۲). بنابراین bFGF موجود در محیط رویی در افزایش میزان تکثیر و مهاجرت ملانوسیت‌ها نقش دارد (۳۳). در این مطالعه نیز میزان تکثیر و مهاجرت ملانوسیت‌های تیمار شده توسط محیط رویی ملانوما A375 افزایش معنی‌دار نشان داد. تغییرات فنوتیپی مشاهده‌شده در ملانوسیت‌های تیمار شده نشان‌دهنده تغییراتی است که در اثر تیمار در بیان برخی ژن‌های مرتبط صورت گرفته است (۲۹). بنابراین برای ارزیابی تغییر ماهیت و پیشروی بدخیمی ملانوسیت‌ها در سطح مولکولی، بیان ژن‌های کدکننده شاخص‌های ملانوما و ژن‌های مرتبط با فرآیند گذر از حالت اپیتلیالی به حالت مزانشیمی (EMT) مورد بررسی قرار گرفت. در فرآیند تغییر ملانوسیت به ملانوما، بیان ژن‌های کدکننده شاخص‌های ملانوما نظیر S100A4، S100A14، MITF و TYR تغییر می‌کند (۳۴، ۳۵). تغییر بیان ژن S100 به‌عنوان یک عامل پیش‌آگهی برای پیشروی بدخیمی‌های ملانوسیتی محسوب می‌شود (۳۶). در این مطالعه بیان ژن S100A14 در رده سلولی ملانوما A375 و گروه تیمار شده

به‌طور معنی‌دار بیشتر از گروه تیمار نشده بود. S100A14 از اعضای خانواده S100، نقش مهمی در تغییرات بدخیمی داشته و با افزایش قابلیت‌های تکثیر، مهاجرت و تهاجم سلول‌ها در ارتباط است (۳۷-۳۹). MITF از تنظیم‌کننده‌های اصلی تکامل ملانوسیتی است (۴۰). این فاکتور همچنین تنظیم‌کننده بیان آنزیم تیروزیناز (TYR) می‌باشد که برای سنتز ملانین ضروری است (۴۱). کاهش بیان MITF و به دنبال آن تیروزیناز (TYR) به‌عنوان یک فرآیند معمول در جریان بدخیمی ملانوسیت‌ها و پیشروی تکامل ملانوما محسوب می‌گردد و با افزایش قابلیت‌های مهاجرت و تهاجم در این سلول‌ها مرتبط است (۴۰، ۴۲). عوامل موجود در محیط رویی سلول‌های ملانوما می‌توانند این تغییرات را در ملانوسیت‌های تیمار شده ایجاد کنند (۲۹). از جمله این عوامل $TGF-\beta 1$ است که در این تغییرات نقش دارد (۴۳). بر اساس نتایج این مطالعه، میزان بیان ژن‌های MITF و TYR در رده سلولی ملانوما A375 و گروه تیمار شده کمتر از گروه تیمار نشده بود، هرچند این کاهش بیان معنی‌دار نبود.

فاکتورهای رشد موجود در محیط رویی سلول‌های سرطانی می‌توانند سبب تغییر در بیان ژن‌های مرتبط با فرآیند EMT شوند (۴۴-۴۵). بنابراین در ادامه، بیان ژن‌های دخیل در فرآیند گذر از حالت اپیتلیالی به حالت مزانشیمی (EMT) شامل SNAIL1، SNAIL2، CDH1، CDH2، TWIST1 و $TGF-\beta 1$ توسط Real-Time PCR مورد بررسی قرار گرفت. $TGF-\beta 1$ از ایزوفرم‌های $TGF-\beta$ است و نقش کلیدی در تنظیم فرآیند EMT دارد (۴۶، ۴۷). در طول پیشروی بدخیمی، بیان $TGF-\beta 1$ در سلول‌ها افزایش می‌یابد و پس از آزادسازی در محیط پیرامونی، سبب راه‌اندازی مسیرهای پیام‌رسانی شده و با ایجاد تغییر در بیان فاکتورهای نسخه‌برداری مختلف سبب القای فرآیند EMT در این سلول‌ها می‌گردد (۴۷-۴۹). Rodeck و همکارانش در سال ۱۹۹۴ گزارش کردند که سلول‌های ملانوما $TGF-\beta$ را به‌صورت پایدار و بدون حساسیت به حضور فاکتورهای رشد خارج سلولی بیان می‌کنند درحالی‌که بیان این فاکتور در ملانوسیت‌ها در پاسخ به غلظت فاکتورهای رشد خارج سلولی تحریک می‌گردد (۵۰). به دلیل حضور فاکتورهای رشد فراوان در محیط رویی سلول‌های ملانوما، انتظار می‌رود بیان این فاکتور در ملانوسیت‌های کشت داده‌شده در این محیط افزایش یابد (۲۸). مطابق با پیش‌بینی صورت گرفته، در این مطالعه نیز افزایش معنی‌داری در بیان ژن $TGF-\beta 1$ در ملانوسیت‌های تیمار شده نسبت به گروه تیمار نشده مشاهده

ملانوسیت‌ها نقش دارند (۴۲). Caramel و همکارانش در سال ۲۰۱۳ گزارش کردند که در روند تغییر سلول‌های ملانوسیت به ملانوما، یک فرآیند تغییر بیان (سویچینگ) از ZEB2/SNAI2 به ZEB1/TWIST1 اتفاق می‌افتد که طی آن، کاهش بیان SNAI2 با افزایش بیان TWIST1 همراه است (۴۲). در این مطالعه نیز میزان بیان ژن SNAI2 در سلول‌های ملانوما A375 در مقایسه با ملانوسیت‌های تیمار نشده به‌طور معنی‌دار کمتر بود. این ژن در ملانوسیت‌های تیمار شده نیز در مقایسه با ملانوسیت‌های تیمار نشده کاهش بیان نشان داد. از طرفی بیان TWIST1 نیز در ملانوما A375 و ملانوسیت‌های تیمار شده نسبت به گروه تیمار نشده افزایش یافته‌است. تغییرات مشاهده‌شده، پیشروی بدخیمی را در ملانوسیت‌های تیمار شده نشان می‌دهد (۴۲).

نتیجه‌گیری

درمجموع بر اساس نتایج این مطالعه، تیمار ملانوسیت‌ها توسط محیط رویی حاصل از رده سلولی ملانوما A375، در سطح مولکولی، بیان برخی از ژن‌ها از جمله ژن‌های کدکننده شاخص‌های ملانوما و ژن‌های مرتبط با فرآیند EMT را در جهت ایجاد شاخص‌های ملانومایی و القای فرآیند EMT تغییر داده و در سطح عملکردی نیز علاوه بر ایجاد تغییراتی در شکل ظاهری سلول‌های تیمار شده، میزان نرخ رشد و قابلیت مهاجرت این سلول‌ها را افزایش داد. این تغییرات نشان داد که عوامل و ترکیباتی که توسط سلول‌های سرطانی ملانوما A375 به‌منظور ارتباط با سایر سلول‌ها در محیط پیرامونی آزاد می‌گردند نقش تنظیمی داشته و با ایجاد تغییر در بیان برخی از ژن‌ها، می‌توانند تغییرات بدخیمی را در ملانوسیت‌های نرمال القا کنند.

گردد. CDH1 و CDH2 دو عضو مهم از خانواده ژنی CDH هستند که به ترتیب E-cadherin و N-cadherin را بیان می‌کنند (۵۱). این مولکول‌ها در اتصالات سلولی نقش دارند و ازجمله مهم‌ترین عوامل مؤثر در پدیده EMT می‌باشند (۵۲). SNAI1 از خانواده ژنی SNAIL، کدکننده فاکتور نسخه‌برداری Snail است که به‌عنوان یک شاخص بدخیمی در طی تغییرات ملانوسیتی محسوب شده و در جریان فرآیند EMT به‌عنوان مهارکننده مستقیم بیان E-cadherin نقش دارد (۵۳، ۵۴). در طی پدیده EMT و پیشروی بدخیمی در ملانوسیت‌ها، مسیرهای پیام‌رسانی TGF- β و PI3K/Akt به‌واسطه حضور سایتوکین‌ها و فاکتورهای رشد آزاد شده از سلول‌های ملانوما راه‌اندازی شده و سبب افزایش بیان فاکتور نسخه‌برداری Snail می‌گردند که این فاکتور نیز خود نقش تنظیمی داشته و با تغییر بیان (سویچینگ) کاده‌رین، از یک‌سو سبب کاهش بیان E-cadherin و از سوی دیگر سبب افزایش بیان N-cadherin می‌شود (۵۵، ۵۶). در این مطالعه نیز ژن‌های SNAI1 و CDH2 در ملانوسیت‌های تیمار شده نسبت به گروه تیمار نشده افزایش بیان نشان داد. میزان بیان ژن CDH1 نیز در سلول‌های ملانوما A375 و ملانوسیت‌های تیمار شده نسبت به ملانوسیت‌های تیمار نشده به‌طور معنی‌دار کاهش یافته‌است. این تغییرات، در افزایش قابلیت‌های تکثیر، مهاجرت و تهاجم سلول‌ها نقش داشته و می‌تواند ویژگی‌های ریخت‌شناسی این سلول‌ها را تغییر دهد (۵۵، ۵۷). SNAI2 از اعضای خانواده ژنی SNAIL، کدکننده فاکتور نسخه‌برداری Slug است (۵۸). SNAI2 به همراه ZEB2 در تمایز ملانوسیت‌ها نقش دارند و به‌عنوان ژن‌های سرکوبگر تومور (Onco-suppressor genes) عمل می‌کنند (۴۲). TWIST1 نیز از اعضای خانواده ژنی TWIST بوده و به‌همراه ZEB1 در تمایز زدایی و تغییرات بدخیمی

REFERENCES

1. Cichorek M, Wachulska M, Stasiewicz A, Tyminińska A. Skin melanocytes: biology and development. *Postepy Dermatol Alergol* 2013; 30(1): 30-41.
2. Volkovova K, Bilanicova D, Bartonova A, Letašiová S, Dusinska M. Associations between environmental factors and incidence of cutaneous melanoma. Review. *Environ Health* 2012; 11 Suppl 1: S12.
3. Bandarchi B, Ma L, Navab R, Seth A, Rasty G. From melanocyte to metastatic malignant melanoma. *Dermatol Res Pract* 2010; 2010: 583748.
4. Brandão FV, Pereira AF, Gontijo B, Bittencourt FV. Epidemiological aspects of melanoma at a university hospital dermatology center over a period of 20 years. *An Bras Dermatol* 2013; 88(3): 344-53.
5. Orzan OA, Șandru A, Jecan CR. Controversies in the diagnosis and treatment of early cutaneous melanoma. *J Med Life* 2015; 8(2): 132-41.
6. Li FZ, Dhillon AS, Anderson RL, McArthur G, Ferrao PT. Phenotype switching in melanoma: implications for progression and therapy. *Front Oncol* 2015; 5: 31.
7. Bertolotto C. Melanoma: from melanocyte to genetic alterations and clinical options. *Scientifica (Cairo)* 2013; 2013: 635203.

8. Gonzalez DM, Medici D. Signaling mechanisms of the epithelial-mesenchymal transition. *Sci Signal* 2014; 7(344): re8.
9. Moustakas A, Heldin CH. Signaling networks guiding epithelial-mesenchymal transitions during embryogenesis and cancer progression. *Cancer Sci* 2007; 98(10): 1512-20. Epub 2007 Jul 23.
10. Kim JE, Leung E, Baguley BC, Finlay GJ. Heterogeneity of expression of epithelial-mesenchymal transition markers in melanocytes and melanoma cell lines. *Front Genet* 2013; 4: 97.
11. Petersson S, Shubbar E, Enerbäck L, Enerbäck C. Expression patterns of S100 proteins in melanocytes and melanocytic lesions. *Melanoma Res* 2009; 19(4): 215-25.
12. Sheffield MV, Yee H, Dorvault CC, Weilbaecher KN, Eltoum IA, Siegal GP, *et al.* Comparison of five antibodies as markers in the diagnosis of melanoma in cytologic preparations. *Am J Clin Pathol* 2002; 118(6): 930-6.
13. Yajima I, Kumasaka MY, Thang ND, Goto Y, Takeda K, Iida M, *et al.* Molecular Network Associated with MITF in Skin Melanoma Development and Progression. *J Skin Cancer* 2011; 2011: 730170.
14. Uong A, Zon LI. Melanocytes in development and cancer. *J Cell Physiol* 2010; 222(1): 38-41.
15. Micalizzi DS, Farabaugh SM, Ford HL. Epithelial-mesenchymal transition in cancer: parallels between normal development and tumor progression. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 2010; 15(2): 117-34.
16. Psaila B, Lyden D. The metastatic niche: adapting the foreign soil. *Nat Rev Cancer* 2009; 9(4): 285-93.
17. Peinado H, Lavotshkin S, Lyden D. The secreted factors responsible for pre-metastatic niche formation: old sayings and new thoughts. *Semin Cancer Biol* 2011; 21(2): 139-46.
18. Quail DF, Joyce JA. Microenvironmental regulation of tumor progression and metastasis. *Nat Med* 2013; 19(11): 1423-37.
19. Palmer SR, Erickson LA, Ichetovkin I, Knauer DJ, Markovic SN. Circulating serologic and molecular biomarkers in malignant melanoma. *Mayo Clin Proc* 2011; 86(10): 981-90.
20. Patel S, Ngounou Wetie AG, Darie CC, Clarkson BD. Cancer secretomes and their place in supplementing other hallmarks of cancer. *Adv Exp Med Biol* 2014; 806: 409-42.
21. Wang Z, Chen JQ, Liu JL, Tian L. Exosomes in tumor microenvironment: novel transporters and biomarkers. *J Transl Med* 2016; 14(1):297.
22. Angi M, Kalirai H, Prendergast S, Simpson D, Hammond DE, Madigan MC, *et al.* In-depth proteomic profiling of the uveal melanoma secretome. *Oncotarget* 2016; 7(31): 49623-35.
23. Paltridge JL, Belle L, Khew-Goodall Y. The secretome in cancer progression. *Biochim Biophys Acta* 2013; 1834(11): 2233-41.
24. Whipple CA, Brinckerhoff CE. BRAF(V600E) melanoma cells secrete factors that activate stromal fibroblasts and enhance tumorigenicity. *Br J Cancer* 2014; 111(8): 1625-33.
25. Eberle J, Krasagakis K, Garbe C, Orfanos CE. Proliferation and morphology of melanoma cells and benign human melanocytes under varying culture conditions. *Melanoma Res* 1993; 3(2): 107-12.
26. Rogers SL, Cutts JL, Gegick PJ, McGuire PG, Rosenberger C, Krisinski S. Transforming growth factor-beta 1 differentially regulates proliferation, morphology, and extracellular matrix expression by three neural crest-derived neuroblastoma cell lines. *Exp Cell Res* 1994; 211(2): 252-62.
27. Janji B, Melchior C, Gouon V, Vallar L, Kieffer N. Autocrine TGF-beta-regulated expression of adhesion receptors and integrin-linked kinase in HT-144 melanoma cells correlates with their metastatic phenotype. *Int J Cancer* 1999; 83(2): 255-62.
28. Elias EG, Hasskamp JH, Sharma BK. Cytokines and growth factors expressed by human cutaneous melanoma. *Cancers (Basel)*. 2010 May 7;2(2):794-808.
29. Seftor EA, Brown KM, Chin L, Kirschmann DA, Wheaton WW, Protopopov A, *et al.* Epigenetic transdifferentiation of normal melanocytes by a metastatic melanoma microenvironment. *Cancer Res* 2005; 65(22): 10164-9.
30. Wu CS, Lan CC, Chiou MH, Yu HS. Basic fibroblast growth factor promotes melanocyte migration via increased expression of p125(FAK) on melanocytes. *Acta Derm Venereol* 2006; 86(6): 498-502.
31. Shi H, Lin B, Huang Y, Wu J, Zhang H, Lin C, *et al.* Basic fibroblast growth factor promotes melanocyte migration via activating PI3K/Akt-Rac1-FAK-JNK and ERK signaling pathways. *IUBMB Life* 2016; 68(9): 735-47.
32. Halaban R, Ghosh S, Baird A. bFGF is the putative natural growth factor for human melanocytes. *In Vitro Cell Dev Biol* 1987; 23(1): 47-52.
33. Wu CS, Yu CL, Wu CS, Lan CC, Yu HS. Narrow-band ultraviolet-B stimulates proliferation and migration of cultured melanocytes. *Exp Dermatol* 2004; 13(12): 755-63.

34. Busam KJ, Iversen K, Coplan KC, Jungbluth AA. Analysis of microphthalmia transcription factor expression in normal tissues and tumors, and comparison of its expression with S-100 protein, gp100, and tyrosinase in desmoplastic malignant melanoma. *Am J Surg Pathol* 2001; 25(2): 197-204.
35. Miettinen M, Fernandez M, Franssila K, Gatalica Z, Lasota J, Sarlomo-Rikala M. Microphthalmia transcription factor in the immunohistochemical diagnosis of metastatic melanoma: comparison with four other melanoma markers. *Am J Surg Pathol* 2001; 25(2): 205-11.
36. Cochran AJ, Lu HF, Li PX, Saxton R, Wen DR. S-100 protein remains a practical marker for melanocytic and other tumours. *Melanoma Res* 1993; 3(5): 325-30.
37. Chen H, Yuan Y, Zhang C, Luo A, Ding F, Ma J, *et al.* Involvement of S100A14 Protein in Cell Invasion by Affecting Expression and Function of Matrix Metalloproteinase (MMP)-2 via p53-dependent Transcriptional Regulation. *J Biol Chem* 2012; 287(21): 17109-19.
38. Pietas A, Schlüns K, Marenholz I, Schäfer BW, Heizmann CW, Petersen I. Molecular cloning and characterization of the human S100A14 gene encoding a novel member of the S100 family. *Genomics* 2002; 79(4): 513-22.
39. Wang X, Yang J, Qian J, Liu Z, Chen H, Cui Z1. S100A14, a mediator of epithelial-mesenchymal transition, regulates proliferation, migration and invasion of human cervical cancer cells. *Am J Cancer Res* 2015; 5(4): 1484-95. eCollection 2015.
40. Levy C, Khaled M, Fisher DE. MITF: master regulator of melanocyte development and melanoma oncogene. *Trends Mol Med* 2006; 12(9): 406-14.
41. Gaggioli C, Buscà R, Abbe P, Ortonne JP, Ballotti R. Microphthalmia-associated transcription factor (MITF) is required but is not sufficient to induce the expression of melanogenic genes. *Pigment Cell Res* 2003; 16(4): 374-82.
42. Caramel J, Papadogeorgakis E, Hill L, Browne GJ, Richard G, Wierinckx A, *et al.* A switch in the expression of embryonic EMT-inducers drives the development of malignant melanoma. *Cancer Cell* 2013; 24(4): 466-80.
43. Kim DS, Park SH, Park KC. Transforming growth factor-beta1 decreases melanin synthesis via delayed extracellular signal-regulated kinase activation. *Int J Biochem Cell Biol* 2004; 36(8): 1482-91.
44. Zhuang J, Lu Q, Shen B, Huang X, Shen L, Zheng X, *et al.* TGFβ1 secreted by cancer-associated fibroblasts induces epithelial-mesenchymal transition of bladder cancer cells through lncRNA-ZEB2NAT. *Sci Rep* 2015; 5: 11924.
45. Mimeault M, Batra SK. Interplay of distinct growth factors during epithelial mesenchymal transition of cancer progenitor cells and molecular targeting as novel cancer therapies. *Ann Oncol* 2007; 18(10): 1605-19.
46. Nagaraj NS, Datta PK. Targeting the transforming growth factor-beta signaling pathway in human cancer. *Expert Opin Investig Drugs* 2010; 19(1): 77-91.
47. Tan EJ, Olsson AK, Moustakas A. Reprogramming during epithelial to mesenchymal transition under the control of TGFβ. *Cell Adh Migr* 2015; 9(3): 233-46.
48. Javelaud D, Alexaki VI, Mauviel A. Transforming growth factor-beta in cutaneous melanoma. *Pigment Cell Melanoma Res* 2008; 21(2): 123-32.
49. Pickup M, Novitskiy S, Moses HL. The roles of TGFβ in the tumour microenvironment. *Nat Rev Cancer* 2013; 13(11): 788-99.
50. Rodeck U, Bossler A, Graeven U, Fox FE, Nowell PC, Knabbe C, *et al.* Transforming growth factor beta production and responsiveness in normal human melanocytes and melanoma cells. *Cancer Res* 1994; 54(2): 575-81.
51. Vleminckx K, Kemler R. Cadherins and tissue formation: integrating adhesion and signaling. *Bioessays*; 21(3): 211-20.
52. Wheelock MJ, Shintani Y, Maeda M, Fukumoto Y, Johnson KR. Cadherin switching. *J Cell Sci* 2008; 121(Pt 6): 727-35.
53. Cano A, Pérez-Moreno MA, Rodrigo I, Locascio A, Blanco MJ, del Barrio MG, *et al.* The transcription factor snail controls epithelial-mesenchymal transitions by repressing E-cadherin expression. *Nat Cell Biol* 2000; 2(2): 76-83.
54. Poser I, Domínguez D, de Herreros AG, Varnai A, Buettner R, Bosserhoff AK. Loss of E-cadherin expression in melanoma cells involves up-regulation of the transcriptional repressor Snail. *J Biol Chem* 2001; 276(27): 24661-6.
55. Araki K, Shimura T, Suzuki H, Tsutsumi S, Wada W, Yajima T, *et al.* E/N-cadherin switch mediates cancer progression via TGF-β-induced epithelial-to-mesenchymal transition in extrahepatic cholangiocarcinoma. *Br J Cancer* 2011; 105(12): 1885-93.
56. Hao L, Ha JR, Kuzel P, Garcia E, Persad S. Cadherin switch from E- to N-cadherin in melanoma progression is regulated by the PI3K/PTEN pathway through Twist and Snail. *Br J Dermatol* 2012; 166(6): 1184-97.
57. Hsu MY, Wheelock MJ, Johnson KR, Herlyn M. Shifts in cadherin profiles between human normal melanocytes and melanomas. *J Invest Dermatol Symp Proc* 1996; 1(2): 188-94.
58. Wu Y, Zhou BP. Snail: More than EMT. *Cell Adh Migr* 2010; 4(2): 199-203.