**مقاله پژوهشی**
**مجله دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان**
**دوره ۲۵، مرداد ۱۴۰۵، ۵۱۶-۴۹۹**

# اثر اگزوزوم‌های مشتق از سلول‌های بنیادی خون قاعدگی بر بیان VEGF و اندوستاتین در مدل موشی سرطان پستان: یک مطالعه تجربی

**فرشته ده نمکی[۱]، سعیده ظفربالانژاد[۲]، شهریار دبیری[۳]، حمیدرضا بیدخوری[۴]، خدیجه نژاد شاهرخ آبادی[۵]**

**دریافت مقاله: ۱۴۰۵/۰۲/۲۹ ارسال مقاله به نویسنده جهت اصلاح: ۱۴۰۵/۰۴/۰۱ دریافت اصلاحیه از نویسنده: ۱۴۰۵/۰۵/۲۴ پذیرش مقاله: ۱۴۰۵/۰۵/۲۶**

**چکیده**

**زمینه و هدف:** اگزوزم‌ها واسطه‌های بین‌سلولی با پتانسیل درمانی هستند. بنا بر اهمیت آنژیوژنز در پیشرفت سرطان پستان، مطالعه حاضر با هدف تعیین اثر اگزوزوم‌های مشتق از سلول‌های بنیادی قاعدگی بر بیان VEGF و ژن COL18A1 (پیش‌ساز اندوستاتین) در مدل موشی سرطان پستان انجام شده است.

**مواد و روش‌ها:** در این مطالعه تجربی، تعداد ۴۰ موش ماده BALB/c، به چهار گروه تقسیم شدند. تومور در گروه‌های کنترل تومور و تیمار با تزریق $۱\times۱۰^{۶}$ سلول 4T1 القاء شد. اگزوزوم‌ها با دوز ۵۰ میکروگرم در روزهای ۷، ۱۴ و ۲۱ پس از القاء تومور، به گروه تیمار تزریق و حجم تومورها اندازه‌گیری شد. در روز ۲۸، اگزوزوم‌ها از سرم خون جداسازی، RNA آن‌ها استخراج و بیان ژن‌ها با روش qRT-PCR بررسی گردید. داده‌های بیان ژن با استفاده از آزمون ناپارامتریک Kruskal–Wallis و Dunn و تغییرات حجم تومور با آنالیز واریانس دوطرفه با اندازه‌گیری‌های مکرر و آزمون Sidak تجزیه و تحلیل شدند.

**یافته‌ها:** حجم تومور در گروه تیمار ۷۰/۲۰ بر میلی‌متر مکعب در مقایسه با گروه کنترل تومور ۱۶۱/۰۰ بر میلی‌متر مکعب به‌طور معنی‌داری کاهش یافت ($P<۰/۰۰۱$). بیان فاکتور رشد اندوتلیال عروقی (Vascular Endothelial Growth Factor; VEGF) در گروه تیمار (۱/۱۷۵) نسبت به گروه کنترل تومور (۷/۶۴۵) به‌طور معنی‌داری کاهش نشان داد ($P=۰/۰۰۴$). بیان COL18A1 در گروه تیمار (۷/۲۹۵) در مقایسه با گروه کنترل تومور (۰/۰۸) به‌طور معنی‌داری افزایش یافت ($P<۰/۰۰۱$).

**نتیجه‌گیری:** مطالعه حاضر نشان داد که اگزوزوم‌های سلول‌های بنیادی قاعدگی ممکن است با تعدیل بیان VEGF و COL18A1، در فرایندهای مرتبط با آنژیوژنز در مدل موشی سرطان پستان نقش داشته باشند.

**واژه‌های کلیدی:** اگزوزم، سلول‌های بنیادی قاعدگی، رگ‌زایی، سرطان پستان

**ارجاع:** ده نمکی ف، ظفربالانژاد س، دبیری ش، بیدخوری حر ، نژاد شاهرخ آبادی خ. اثر اگزوزوم‌های مشتق از سلول‌های بنیادی خون قاعدگی بر بیان VEGF و اندوستاتین در مدل موشی سرطان پستان: یک مطالعه تجربی. سال ۱۴۰۵، دوره ۲۵، شماره ۵، صفحات: ۵۱۶-۴۹۹.

۱- دانشجوی دکترا، گروه زیست‌شناسی، واحد مشهد، دانشگاه آزاد اسلامی، مشهد، ایران
۲- (نویسنده مسئول) دانشیار،گروه زیست‌شناسی، واحد مشهد، دانشگاه آزاد اسلامی، مشهد، ایران
تلفن:۰۵۱-۳۸۴۳۵۰۵۰، پست الکترونیکی:Saeedeh.zafarbalanezhad@iau.ac.ir
۳- استاد، مرکز تحقیقات پاتولوژی و سلول‌های بنیادی، دانشگاه علوم پزشکی کرمان، کرمان، ایران
۴- استادیار، گروه پژوهشی سلول‌های بنیادی و پزشکی بازساختی، جهاد دانشگاهی خراسان رضوی، مشهد، ایران
۵- دانشیار، گروه زیست‌شناسی، واحد مشهد، دانشگاه آزاد اسلامی، مشهد، ایران

[ Downloaded from journal.rums.ac.ir on 2026-11-04 ]

[ DOI: doi: 1066224/jrums.25.5.499 ]

## مقدمه

سرطان در قرن بیست‌ویکم یکی از مهم‌ترین چالش‌های اجتماعی، بهداشت عمومی و اقتصادی به‌شمار می‌رود. بر اساس برآوردهای آژانس بین‌المللی تحقیقات سرطان (International Agency for Research on Cancer; IARC) در سال ۲۰۲۲ نزدیک به ۲۰ میلیون مورد جدید سرطان در جهان ثبت شده است. بر اساس برآوردهای GLOBOCAN، سرطان پستان شایع‌ترین سرطان در زنان در سراسر جهان است و تقریباً یک‌چهارم موارد جدید سرطان و یک‌ششم مرگ‌های ناشی از سرطان در زنان را به خود اختصاص می‌دهد (۱).

Folkman در سال ۱۹۷۱ در مقاله‌ای در مجله پزشکی نیوانگلند (New England Journal of Medicine) مطرح کرد که «از لحاظ نظری، با مهار آنژیوژنز، تومورها در اندازه کوچک باقی مانده و در نهایت آسیب‌رسان نخواهند بود» (۲). در ریزمحیط تومور، افزایش بیان فاکتور رشد اندوتلیال عروقی (VEGF; Vascular Endothelial Growth Factor) می‌تواند رشد تومور و متاستاز را تسریع کند (۳).

در مقابل عوامل محرک آنژیوژنز، اندوستاتین به‌عنوان یکی از مهارکننده‌های درون‌زاد تشکیل عروق جدید، در تنظیم آنژیوژنز و رشد تومور نقش مهمی دارد. اندوستاتین یک قطعه پروتئولیتیک مشتق از کلاژن نوع XVIII است که توسط ژن COL18A1 کد می‌شود. کلاژن XVIII یکی از اجزای غشای پایه است و در اثر پردازش پروتئولیتیک، بخش C-ترمینال آن می‌تواند به اندوستاتین تبدیل شود. ازاین‌رو، COL18A1 را می‌توان به‌عنوان بخشی از محور زیستی کلاژن XVIII-اندوستاتین در تنظیم آنژیوژنز در نظر گرفت. اندوستاتین با مهار تکثیر و مهاجرت سلول‌های اندوتلیال و تعدیل مسیرهای مرتبط با عوامل پروآنژیوژنیک، از تشکیل عروق جدید جلوگیری می‌کند و در نتیجه می‌تواند رشد و پیشرفت تومور را محدود سازد. بنابراین، تغییر در بیان COL18A1 ممکن است با تغییر در ظرفیت تولید کلاژن XVIII و در ادامه تولید بالقوه اندوستاتین همراه باشد و از این طریق در تنظیم تعادل میان عوامل محرک و مهارکننده آنژیوژنز نقش داشته باشد (۴).

سلول‌های بنیادی مزانشیمی (Mesenchymal Stem Cells; MSCs) سلول‌های چندتوانی با گرایش قابل‌توجه به بافت توموری هستند (۵). با این حال، مطالعات مختلف اثرات متناقضی از این سلول‌ها در سرطان گزارش کرده‌اند که می‌تواند ناشی از تفاوت در منشأ MSCها، ویژگی‌های اختصاصی آن‌ها، نوع سلول‌های سرطانی هدف و شرایط محیطی باشد (۶). در میان منابع مختلف MSCها، سلول‌های بنیادی مزانشیمی خون قاعدگی (Menstrual blood-derived mesenchymal stem cells; MenSCs) به‌دلیل روش استحصال غیرتهاجمی، نرخ تکثیر بالا، ملاحظات اخلاقی کمتر و توانایی تعدیل پاسخ ایمنی گزینه‌ای جذاب برای کاربردهای درمانی محسوب می‌شوند (۷).

اگزوزوم‌ها وزیکول‌های غشایی با منشأ اندوسیتوزی و اندازه تقریبی ۳۰ تا ۱۵۰ نانومتر هستند (۸). این وزیکول‌ها از طریق انتقال اطلاعات مولکولی، نقش مهمی در ارتباطات بین‌سلولی ایفا می‌کنند. محتوای مولکولی اگزوزوم‌ها شامل پروتئین‌ها، DNA، RNA پیام‌رسان و میکروRNAها است که می‌توانند مسیرهای درون‌سلولی مختلف را فعال کرده و بر بیان ژن در سلول‌های گیرنده اثر بگذارند (۹).

با وجود شواهد موجود درباره نقش آنژیوژنز در رشد و پیشرفت سرطان پستان و نیز ظرفیت درمانی MSCها و فرآورده‌های مشتق از آن‌ها، شواهد مربوط به اثر اگزوزوم‌های مشتق از MenSCs بر ریزمحیط تومور و به‌ویژه تنظیم محور آنژیوژنز در سرطان پستان


CCBY-NC.4.0 DEED

[ Downloaded from journal.rums.ac.ir on 2026-11-04 ]
[ DOI: doi: 1066224/jrums.25.5.499 ]

همچنان محدود است. افزون بر این، بیشتر پژوهش‌ها بر کاربردهای ضدتوموری یا اگزوزوم‌های حاصل از منابع سلولی دیگر متمرکز بوده‌اند و نتایج آن‌ها برحسب منشأ سلول‌های بنیادی مزانشیمی، نوع تومور، شرایط کشت و محتوای مولکولی اگزوزوم‌ها متفاوت است (۱۰). بنابراین، بررسی اثر تجویز سیستمیک اگزوزوم‌های مشتق از MenSCs بر رشد تومور پستان و تعادل میان عوامل پیش‌برنده و مهارکننده آنژیوژنز، از اهمیت پژوهشی و درمانی برخوردار است. بر این اساس، مطالعه حاضر با هدف تعیین اثر تجویز داخل‌وریدی اگزوزوم‌های مشتق از MenSCs بر رشد تومور و بیان ژن‌های VEGF و COL18A1، کد کننده کلاژن XVIII که پیش‌ساز اندوستاتین است، در مدل موشی سرطان پستان 4T1 انجام شد.

## مواد و روش‌ها

این مطالعه تجربی در سال‌های ۱۴۰۲-۱۴۰۳ در دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم پزشکی شاهین‌فر مشهد انجام شد. تعداد ۴۰ موش ماده BALB/c، ۵ تا ۷ هفته‌ای و با وزن ۱۷ تا ۱۹ گرم، از دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی مشهد تهیه شدند. حیوانات به‌مدت یک هفته، به‌منظور سازگاری، در شرایط استاندارد حیوان‌خانه شامل چرخه ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی، دمای ۲۲ درجه سانتی‌گراد، رطوبت نسبی ۷۰ درصد و دسترسی آزاد به آب و غذای استاندارد نگه‌داری شدند. در طول مطالعه، وضعیت عمومی، میزان مصرف آب و غذا، وزن بدن و علائم درد یا ناراحتی حیوانات به‌صورت روزانه پایش شدند (۱۱). تمامی مراحل این پژوهش بر اساس دستورالعمل‌های کشوری اخلاق در پژوهش‌های زیست‌پزشکی تحت شماره مصوب IR.IAU.MSHD.REC.1402.147 به تأیید کمیته اخلاق در پژوهش دانشکده پزشکی دانشگاه آزاد اسلامی-واحد علوم پزشکی مشهد اجرا شد.

پس از دوره سازگاری، حیوانات به‌طور تصادفی به چهار گروه شامل ۱۰ موش در هر گروه تقسیم شدند: ۱) گروه شاهد سالم: موش‌های سالم بدون القاء تومور و بدون دریافت اگزوزوم، ۲) گروه کنترل تومور: موش‌های حامل تومور القاء شده با سلول‌های 4T1 و بدون دریافت اگزوزوم، ۳) گروه شم: موش‌های سالم بدون القاء تومور که محلول نمکی بافر فسفات (Phosphate-Buffered Saline; PBS) از (Gibco, USA) را با حجم و مسیر تزریق مشابه گروه‌های دریافت‌کننده سلول توموری و اگزوزوم دریافت کردند، ۴) گروه تیمار: موش‌های حامل تومور القاء شده با سلول‌های 4T1 که اگزوزوم دریافت کردند (۱۲).

رده سلولی سرطان پستان موشی (4T1) از بانک سلولی انستیتو پاستور ایران تهیه شد. سلول‌ها در محیط کشت High glucose Dulbecco's Modified Eagle's Medium; Gibco, USA) DMEM) مکمل شده با ۱۰ درصد سرم جنینی گاوی (Fetal Bovine Serum; FBS) از (Beta Cell Assembled, Iran) و یک درصد اسیدآمینه‌های غیرضروری (NEAA) (PAN-Biotech, Germany) و ۱ درصد آنتی‌بیوتیک پنی‌سیلین/استرپتومایسین (Biosera, France) کشت داده شدند. پس از رسیدن سلول‌ها به تراکم مطلوب، سلول‌ها با استفاده از تریپسین-EDTA (Trypsin-EDTA, Gibco, USA) از سطح کشت جدا شدند. سپس سلول‌ها با PBS شست‌وشو داده شده و سوسپانسیون سلولی برای تزریق آماده شد (۱۳).

برای القاء مدل توموری، تعداد $۱\times۱۰^{۶}$ سلول 4T1 در ۵۰ میکرولیتر PBS سوسپانسیون شد و با استفاده از سرنگ انسولین به‌صورت ارتوتوپیک در پد چربی پستانی (Mammary fat pad)

[ Downloaded from journal.rums.ac.ir on 2026-11-04 ]

[ DOI: doi: 1066224/jrums.25.5.499 ]


CCBY-NC.4.0 DEED

اولین غده پستان سمت راست در ناحیه قفسه سینه تزریق گردید. این تزریق سلولی در موش‌های گروه کنترل تومور و گروه تیمار انجام شد. موش‌های گروه شم نیز به‌طور مشابه، اما بدون سلول، ۵۰ میکرولیتر PBS دریافت کردند (۱۴).

برای جداسازی سلول‌های بنیادی مشتق از خون قاعدگی، مقدار ۵ میلی‌لیتر نمونه خون قاعدگی در روز دوم سیکل از زنان سالم داوطلب ۲۰ تا ۳۴ ساله با استفاده از Diva Cup (Lunette, Finland) جمع‌آوری شد. نمونه‌ها به سرعت به یک لوله فالکون حاوی فونگیزون (Fungizone) (۲/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر)، پنی‌سیلین (۱۰۰ واحد بر میلی‌لیتر)، استرپتومایسین (۱۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر)، EDTA (۰/۵ میلی‌مولار) در PBS منتقل (همه از شرکت Gibco, USA) و با استفاده از گرادیان شیب غلظت فایکول (Sigma, USA) سلول‌های تک هسته‌ای جداسازی شدند. سپس سلول‌ها در فلاسک کشت با سطح ۷۵ سانتی‌مترمربع (Greiner, Germa) در محیط کشت (Dulbecco's Modified DMEM-F12 (Eagle's Medium: Nutrient Mixture F-12 و ۱۵ درصد FBS هر دو از شرکت (Gibco, USA) در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و در شرایط ۵٪ دی اکسیدکربن، در انکوباتور (Memmert, Germany) انکوبه شدند. پس از ۲۴ ساعت با تعویض محیط، سلول‌های غیرچسبان حذف و به سلول‌های بنیادی چسبنده اجازه رشد داده شد. پس از رسیدن فلاسک به تراکم ۷۰ تا ۸۰ درصد با استفاده از محلول تریپسین، سلول‌ها تریپسینه و پاساژ داده شدند (۱۵).

به‌منظور بررسی ماهیت سلول‌های بنیادی مشتق از خون قاعدگی، درصد بیان تعدادی از آنتی‌ژن‌های سطح سلولی بنیادی مزانشیمی نظیر CD73، CD90، CD105 در پاساژ چهارم با روش فلوسایتومتری (PAS Flow Cytometry, Partec GmbH Germany) ارزیابی شدند. هم‌چنین، به‌منظور بررسی عدم آلودگی سلول‌های هماتوپوئتیک، بیان مارکرهای اختصاصی این سلول‌ها نظیر CD34 و CD45 در سلول‌های کشت داده شده مورد بررسی قرار گرفت. ابتدا سلول‌ها تریپسینه گردیده و سپس به‌طور جداگانه از مونوکلونال آنتی‌بادی‌های CD34 (BD Pharmingen, USA)، CD105 (BioLegend, USA) و (BD Pharmingen, USA) CD73 کونژوگه با فیکواریترین (Phycoerythrin; PE) و (BD CD90 (eBioscience, USA)، CD45 (Pharmingen, USA کونژوگه با فلورسنس ایزوتیوسیانات (Fluorescein Isothiocyanate; FITC) و هم‌چنین برای کنترل ایزوتایپ از آنتی‌بادی MOPC-21 (eBioscience, USA) استفاده شد (۱۶).

سلول‌ها در فلاسک‌های کشت ۷۵ سانتی‌مترمربع کشت داده شدند. پس از رسیدن تراکم سلولی به حدود ۸۰ درصد، محیط کشت قبلی حذف و با محیط کشت حاوی سرم جنین گاوی فاقد اگزوزوم (Exosome-depleted FBS; Gibco, USA) جایگزین شد. پس از ۴۸ ساعت، محیط کشت شرطی‌شده جمع‌آوری گردید. به‌منظور حذف بقایای سلولی، نمونه‌ها در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۲۰ دقیقه و با نیروی نسبی گریز از مرکز ۲۰۰g سانتریفیوژ (Sigma, Germany) شدند (۱۷). سپس، اگزوزوم‌ها با استفاده از کیت استخراج اگزوزوم (آناسل، ایران) و مطابق دستورالعمل شرکت سازنده استخراج شدند. پلت نهایی اگزوزومی در PBS سوسپانسیون شد (۱۸).

مشخصه‌یابی اولیه اگزوزوم‌های استخراج شده با استفاده از میکروسکوپ الکترونی عبوری (Transmission Electron Microscopy; TEM) و پراکندگی نور پویا (Dynamic Light Scattering; DLS) انجام شد (۱۹). برای تعیین قطر هیدرودینامیکی (Z-Average) و شاخص پراکندگی اندازه ذرات

[ Downloaded from journal.rums.ac.ir on 2026-11-04 ]

[ DOI: doi: 1066224/jrums.25.5.499 ]


CCBY-NC.4.0 DEED

(Polydispersity Index; PDI)، از روش پراکندگی نور پویا (DLS) و دستگاه Horiba SZ-100 (Japan) اندازه‌گیری شد. به این منظور، ۲۰ میکرولیتر از نمونه اگزوزومی در ۹۸۰ میکرولیتر PBS با pH=۷/۴ رقیق شد. تحلیل داده‌ها در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و بر اساس توزیع‌های شدت و تعداد انجام شد. برای مشاهده مستقیم ساختار غشایی و تأیید اندازه ذرات، از میکروسکوپ الکترونی عبوری (TEM) با روش رنگ‌آمیزی منفی استفاده شد. بدین‌منظور، ۱۰ میکرولیتر از نمونه اگزوزومی روی گرید مسی پوشیده‌شده با کربن ( Formvar carbon 300-mesh copper grid) قرار داده شد و پس از ۳ دقیقه، محلول اضافی با کاغذ صافی آزمایشگاهی سلولزی بدون پرز (Cytiva, UK) حذف گردید. سپس، به‌منظور افزایش کنتراست، نمونه به‌مدت ۲ دقیقه با محلول ۲ درصد استات اورانیل (Uranyl acetate) رنگ‌آمیزی شد. پس از خشک شدن کامل در دمای اتاق، تصویربرداری با میکروسکوپ الکترونی عبوری مدل LEO (Zeiss, Germany) 910 و در ولتاژ شتاب‌دهنده ۸۰ کیلوولت انجام شد (۲۰). مقدار پروتئین کل نمونه اگزوزومی نیز با روش Bradford تعیین و بازده استخراج اگزوزوم‌ها بر اساس مقدار پروتئین کل به‌دست آمده از حجم مشخصی از محیط کشت شرطی‌شده محاسبه و به‌صورت میکروگرم پروتئین کل اگزوزومی به‌ازای هر میلی‌لیتر محیط کشت شرطی‌شده گزارش شد (۲۱).

پس از تشکیل تومورهای قابل لمس (Palpable)، پروتکل درمانی آغاز گردید (۲۲). برای تزریق سیستمیک، موش‌ها ابتدا با تزریق داخل صفاقی ترکیب کتامین ( Ketaject, Mylan Institutional, Ireland) و زایلازین ( AnaSed, Lloyd, Inc., USA)، به‌ترتیب با دوزهای ۱۰۰ و ۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم بیهوش شدند (۲۳). سپس، حیوانات در مهارکننده ثابت شدند و محل تزریق با اتانول ۷۰ درصد (Merck, Germany) ضدعفونی شد. موش‌های گروه تیمار، ۵۰ میکروگرم پروتئین کل اگزوزومی در ۲۰۰ میکرولیتر PBS سوسپانسیون شده را از طریق ورید دمی دریافت کردند. دوز انتخاب شده بر اساس مطالعات پیشین انجام‌شده تعیین شد (۲۵، ۲۴).

پروتکل درمانی با اقتباس از مطالعات پیشین درباره تجویز تکرارشونده اگزوزوم‌ها در مدل‌های حیوانی، در سه نوبت و در روزهای ۷، ۱۴ و ۲۱ پس از القاء تومور اجرا شد (۲۶). موش‌های گروه شم نیز در همین زمان‌ها حجم مشابهی از PBS را از طریق ورید دمی دریافت کردند. طی دوره ۲۱ روزه مطالعه، وزن بدن حیوانات پایش و حجم تومور به‌صورت هفتگی با کولیس ورنیه دیجیتال (Mitutoyo, Japan; Model: 500-196-30 CD-6"ASX) اندازه‌گیری شد (۲۷). در این مطالعه، هفته‌های اول، دوم و سوم به‌ترتیب نشان‌دهنده سه نوبت ارزیابی حجم تومور در طول دوره تیمار بودند. در روز ۲۸ (سه هفته پس از اولین تزریق اگزوزوم)، به‌منظور بررسی تغییرات مولکولی و سنجش بیان ژن‌ها، از حیوانات تمامی گروه‌های مطالعه تحت بیهوشی مناسب از طریق سینوس پشت چشمی نمونه خون تهیه شد (۲۸). نمونه‌ها بلافاصله به لوله‌های حاوی ماده ضدانعقاد (BD Vacutainer, USA) منتقل شدند و اگزوزوم‌ها با استفاده از کیت آناسل، مطابق دستورالعمل شرکت سازنده جداسازی شدند. سپس، حیوانات با دوز بالای کتامین و زایلازین و به روش انسانی اتانازی شدند (۳۰، ۲۹).

برای بررسی بیان ژن‌های VEGF و COL18A1، RNA کل از اگزوزوم‌ها با استفاده از کیت RNA X Plus (سینا کلون، ایران) و معرف TRIzol (آناسل، ایران) مطابق دستورالعمل شرکت‌های سازنده، استخراج شد. RNA استخراج شده تا زمان انجام مراحل بعدی در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شد. سپس، سنتز

[ Downloaded from journal.rums.ac.ir on 2026-11-04 ]

[ DOI: doi: 1066224/jrums.25.5.499 ]


CCBY-NC.4.0 DEED

cDNA با استفاده از کیت سنتز cDNA (بن یاخته، ایران) و مطابق دستورالعمل شرکت سازنده انجام گرفت. بیان نسبی ژن‌های هدف با استفاده از روش qRT-PCR، مسترمیکس RealQ Plus (Ampliqon, Denmark) و دستگاه (QIAGEN, Rotor-Gene Q Real-Time PCR (Germany ارزیابی شد. ژن GAPDH (Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase) به‌عنوان ژن مرجع برای نرمال‌سازی داده‌ها مورد استفاده قرار گرفت (۳۱).

در هر گروه آزمایشی، ۱۰ نمونه بیولوژیک مستقل حاصل از ۱۰ موش مورد بررسی قرار گرفت. واکنش qRT-PCR برای هر نمونه در سه تکرار تکنیکی انجام شد و میانگین مقادیر Ct حاصل از تکرارهای تکنیکی برای محاسبات نهایی مورد استفاده قرار گرفت. بیان نسبی ژن‌های هدف با استفاده از روش $2^{-\Delta\Delta Ct}$ محاسبه شد. ابتدا مقدار ΔCt از تفاضل مقدار Ct ژن هدف و Ct ژن مرجع (GAPDH) به‌دست آمد. سپس مقدار ΔΔCt با مقایسه ΔCt هر نمونه با ΔCt گروه کنترل سالم به‌عنوان کالیبراتور محاسبه شد. با فرض کارایی ۱۰۰ درصدی واکنش PCR، بیان ژن‌ها به‌صورت تغییر نسبی بیان ژن (Fold change) محاسبه و گزارش شد (۳۲). توالی پرایمرهای مورد استفاده برای تکثیر ژن‌های هدف و ژن مرجع در جدول ۱ ارائه شده است.

برای تعیین حجم نمونه از نرم‌افزار G*Power نسخه ۳/۱ استفاده شد. داده‌های حاصل از بررسی بیان نسبی ژن‌های VEGF و COL18A1 با استفاده از نرم‌افزار GraphPad Prism نسخه ۸ (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) تجزیه و تحلیل آماری شدند. به‌منظور بررسی نرمال بودن توزیع داده‌ها، از آزمون Shapiro-Wilk استفاده شد. با توجه به غیرنرمال‌بودن توزیع داده‌های بیان ژن ($P<۰/۰۵$)، برای مقایسه بیان ژن‌ها در گروه‌های مورد مطالعه از آزمون ناپارامتریک Kruskal–Wallis استفاده شد و در صورت مشاهده تفاوت معنی‌دار، مقایسات زوج‌گروهی با استفاده از آزمون تعقیبی Dunn انجام گرفت. داده‌های بیان ژن به‌صورت "(چارک سوم - چارک اول) میانه" گزارش شدند و نتایج به‌صورت تغییر نسبی بیان ژن (Fold change) گزارش شدند (۳۳). به‌منظور بررسی اثر گروه آزمایشی و زمان بر حجم تومور، از آنالیز واریانس دوطرفه با اندازه‌گیری‌های مکرر استفاده شد. در این تحلیل، گروه آزمایشی و زمان اندازه‌گیری به‌عنوان عوامل مورد بررسی در نظر گرفته شدند. در صورت مشاهده تفاوت معنی‌دار، مقایسه‌های چندگانه با استفاده از آزمون تعقیبی Šidák انجام گرفت. حجم تومور به‌صورت "انحراف معیار ± میانگین" گزارش شد. سطح معنی‌داری در آزمون‌ها ۰/۰۵ در نظر گرفته شد (۳۴).

***جدول ۱- توالی آغازگرهای اختصاصی ژن‌های مرتبط با مسیرهای رگ‌زایی و سرکوب تومور مورد استفاده در qRT-PCR در مدل سرطان پستان 4T1***

| نام ژن | آغازگر رفت (Forward primer ′۵→′۳) | آغازگر معکوس (Reverse primer′۵ →′۳) | دمای ذوب |
|---|---|---|---|
| VEGF | CTGCTGTAACGATGAAGCCCTG | GCTGTAGGAAGCTCATCTCTCC | ۶۴ درجه سانتی‌گراد |
| COL18A1 | GTG ACACTGGACCTC AAG GCTT | TTGTCTGAAGGAGGGTCCTGGT | ۶۴ درجه سانتی‌گراد |
| GAPDH | ACTCCACTCACGGCAAATTC | TCTCCATGGTGGTGAAGACA | ۶۴ درجه سانتی‌گراد |

***VEGF; Vascular Endothelial Growth Factor, COL18A1; Collagen Type XVIII Alpha 1, GAPDH; Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase, qRT-PCR; Quantitative Reverse-Transcription Polymerase Chain Reaction.***



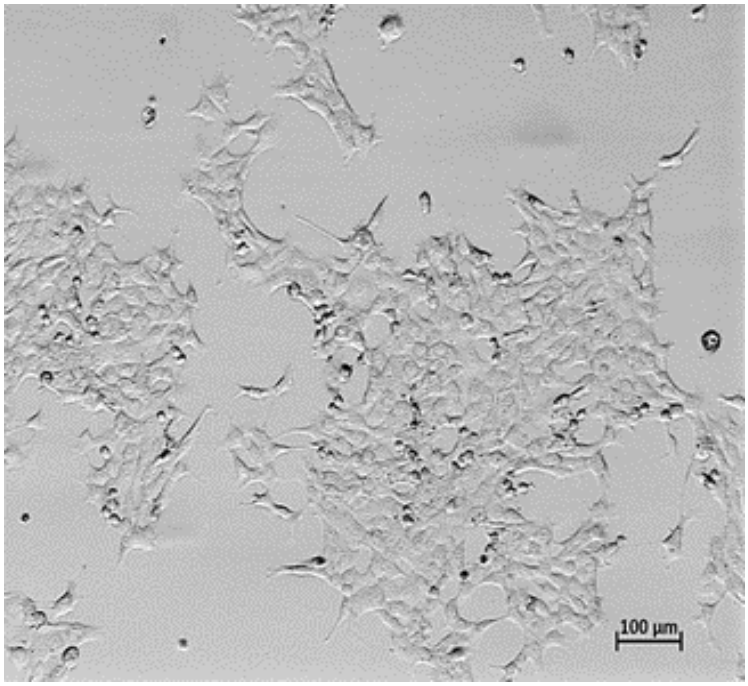
CCBY-NC.4.0 DEED

[ Downloaded from journal.rums.ac.ir on 2026-11-04 ]

[ DOI: doi: 1066224/jrums.25.5.499 ]

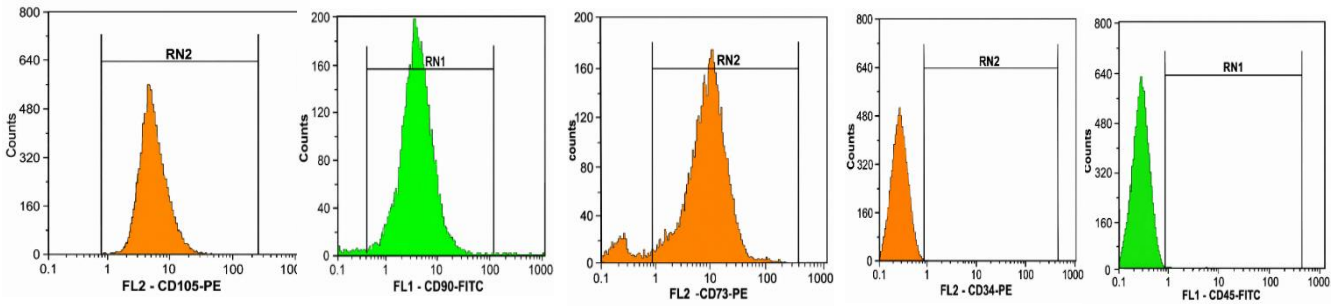
## نتایج

مشاهدات میکروسکوپی نشان داد که سلول‌های جدا شده از خون قاعدگی به سطح پلاستیکی ظروف کشت چسبیده و در پاساژهای اولیه، ریخت‌شناسی دوکی‌شکل و فیبروبلاست مانند داشتند. با افزایش تراکم سلولی، رشد کلونی‌مانند و یکنواخت مشاهده شد که با ویژگی‌های سلول‌های بنیادی مزانشیمی سازگار است (شکل ۱).




***شکل ۱- ریخت‌شناسی سلول‌های بنیادی مشتق از خون قاعدگی در محیط کشت: سلول‌ها به صورت چسبنده رشد کردند و ریخت‌شناسی دوکی‌شکل و فیبروبلاست‌مانند نشان دادند. نوار مقیاس: ۱۰۰ میکرومتر***

نتایج آنالیز فلوسایتومتری نشان داد که درصد بیان مارکرهای CD73، CD90 و CD105 در سلول‌های بنیادی قاعدگی به‌ترتیب ۹۴/۱۳ درصد، ۹۸/۲۱ درصد و ۹۹/۸۸ درصد بود، در حالی‌که مارکرهای ویژه سلول‌های هماتوپوئتیک از جمله CD34 و CD45 به‌ترتیب بیان ۰/۰۹ درصد و ۰/۴۷ درصد را نشان دادند (شکل ۲).

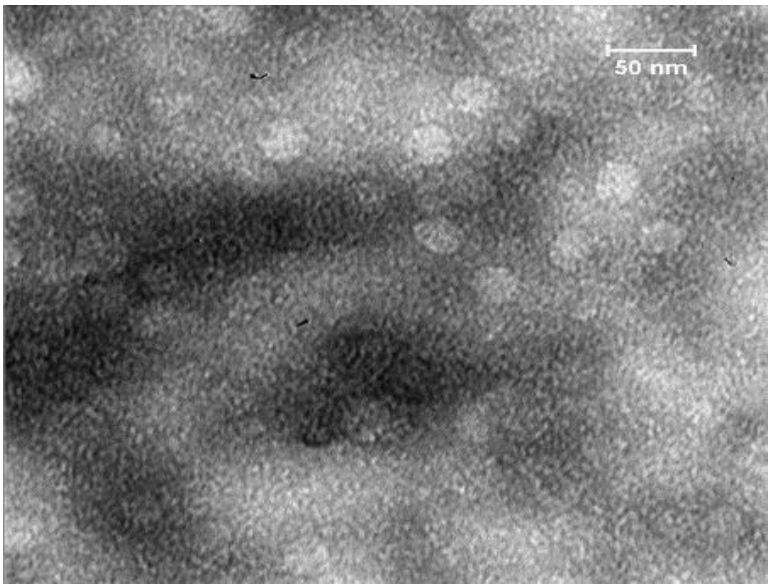



***شکل ۲- ارزیابی ایمونوفنوتایپی سلول‌های بنیادی مشتق از خون قاعدگی با استفاده از فلوسایتومتری. سلول‌ها بیان بالایی از مارکرهای مزانشیمی CD73، CD90 و CD105 را به‌ترتیب با فراوانی ۹۴/۱۳ درصد، ۹۸/۲۱ درصد و ۹۹/۸۸ نشان دادند، در مقابل بیان مارکرهای هماتوپوئتیک CD34 و CD45 به‌ترتیب ۰/۰۹ درصد و ۰/۴۷ درصد بود.***


CCBY-NC.4.0 DEED

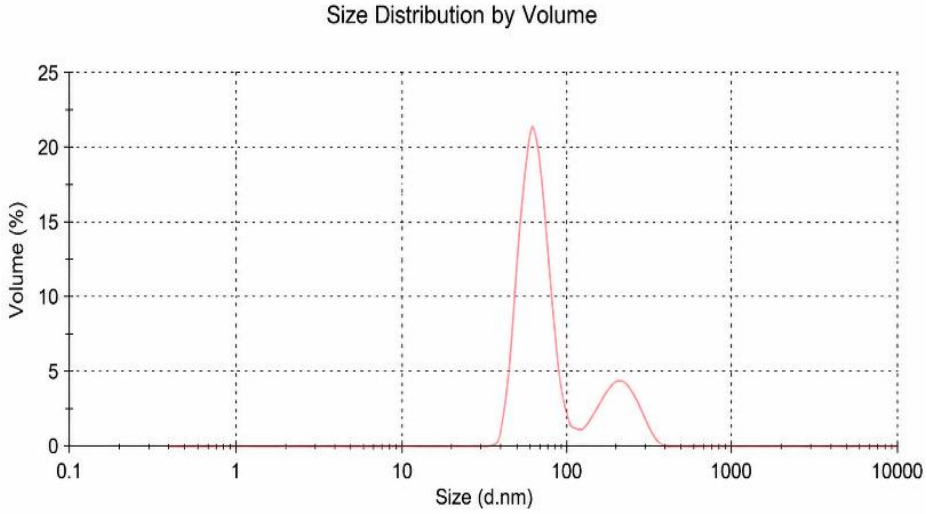
[ Downloaded from journal.rums.ac.ir on 2026-11-04 ]
[ DOI: doi: 1066224/jrums.25.5.499 ]

تصاویر میکروسکوپ الکترونی عبوری (TEM) وجود وزیکول‌های کروی و دارای غشای دولایه را تأیید کرد. ذرات استخراج شده ساختار وزیکولی مشخصی داشتند و اندازه آن‌ها در محدوده نانومتری مورد انتظار برای اگزوزوم‌ها، یعنی کمتر از ۲۰۰ نانومتر، قرار داشت. نوار مقیاس ۵۰ نانومتری نیز ابعاد نانومتری این ساختارها را نشان می‌دهد (شکل ۳).




***شکل۳- تصویر میکروسکوپ الکترونی عبوری (TEM) از اگزوزوم‌های استخراج شده. ذرات دارای ساختار کروی و غشای دولایه هستند. نوار مقیاس: ۵۰ نانومتر***

میانگین قطر هیدرودینامیکی ذرات (Z-Average) ۱۴۰ نانومتر و شاخص پراکندگی اندازه ذرات (PdI) برابر با ۰/۲۶۰ به‌دست آمد که بیانگر توزیع اندازه نسبتاً یکنواخت ذرات در محلول است. هم‌چنین، نمودار توزیع حجمی، پیک اصلی ذرات را در محدوده نانومتری نشان داد که با یافته‌های حاصل از میکروسکوپ الکترونی عبوری (TEM) هم‌خوانی داشت (نمودار ۱).




***نمودار ۱- نتایج آنالیز پراکندگی نور پویا (DLS) اگزوزوم‌ها. میانگین اندازه ذرات (Z-Average) برابر با ۱۴۰ نانومتر و شاخص پراکندگی اندازه ذرات (PdI) برابر با ۰/۲۶۰ گزارش شد که بیانگر توزیع نسبتاً یکنواخت اندازه ذرات است.***

به‌منظور برآورد بازده پروتئینی فرآورده استخراج شده، مقدار پروتئین کل نمونه با روش Bradford اندازه‌گیری شد. نتایج نشان داد که از ۲۰۰ میلی‌لیتر محیط کشت شرطی شده حاصل از کشت سلول‌های بنیادی خون قاعدگی، ۳۲۰۰ میکروگرم


CCBY-NC.4.0 DEED

[ Downloaded from journal.rums.ac.ir on 2026-11-04 ]
[ DOI: doi: 1066224/jrums.25.5.499 ]

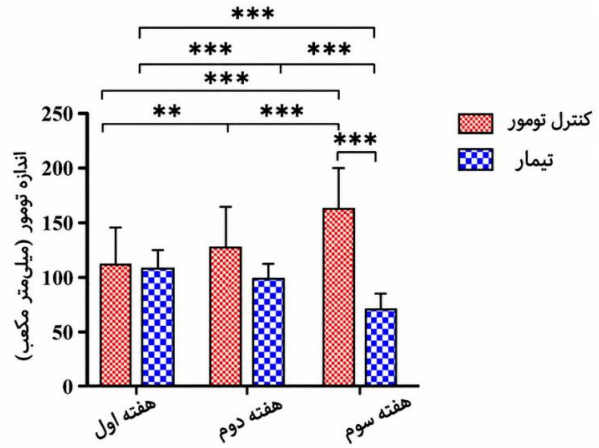
پروتئین کل اگزوزومی در نمونه استخراج شده به‌دست آمد. بر این اساس، بازده پروتئینی فرآورده استخراج شده برابر با ۱۶ میکروگرم پروتئین کل اگزوزومی به‌ازای هر میلی‌لیتر محیط کشت شرطی‌شده بود.

برای بررسی اثر تزریق اگزوزوم بر حجم تومور (میلی‌متر مکعب)، ۲۰ حیوان شامل دو گروه ۱۰تایی کنترل تومور و تیمار طی سه هفته ارزیابی شدند. داده‌ها به‌صورت "انحراف معیار ± میانگین" در جدول ۲ ارائه شده‌اند. تحلیل واریانس دوطرفه با اندازه‌گیری‌های مکرر نشان داد که اثر اصلی زمان بر حجم تومور معنی‌دار نبود (F=۳/۱۲۰، P=۰/۰۵۶)، در حالی‌که اثر اصلی گروه معنی‌دار بود (F=۱۱/۶۳۱، P=۰/۰۰۳). هم‌چنین، اثر متقابل زمان و گروه معنی‌دار بود (F=۸۷/۴۵۶، P<۰/۰۰۱)، که نشان‌دهنده تفاوت الگوی تغییرات حجم تومور در طول زمان بین دو گروه است. مقایسه‌های تعقیبی با آزمون Sidak نشان داد که اختلاف حجم تومور بین دو گروه در هفته‌های اول و دوم معنی‌دار نبود، اما در هفته سوم، حجم تومور در گروه تیمار به‌طور معنی‌داری کمتر از گروه کنترل تومور بود (P<۰/۰۰۱). روند تغییرات حجم تومور در نمودار Error bar به تصویر کشیده شده است (نمودار ۲).

***جدول ۲- مقایسه حجم تومور در گروه کنترل تومور و گروه تیمار طی هفته‌های اول تا سوم دوره تیمار***

| زمان ارزیابی | تعداد حیوانات (n) | کنترل تومور (میلی‌متر مکعب) انحراف معیار ± میانگین | تیمار (میلی‌متر مکعب) انحراف معیار ± میانگین | مقدار P |
|---|---|---|---|---|
| هفته اول | ۱۰ | ۱۰۹/۰۰ ± ۳۵/۴۴ | ۱۰۵/۴۰ ± ۱۴ /۹۱ | ۰/۹۸۸ |
| هفته دوم | ۱۰ | ۱۲۳/۹۰ ± ۳۶/۱۳ | ۹۶/۵۰ ± ۱۱/۱۱ | ۰/۱۲۴ |
| هفته سوم | ۱۰ | ۱۶۱/۰۰ ± ۴۱/۳۹ | ۷۰/۲۰ ± ۹ /۷۸ | <۰/۰۰۱ |

***آزمون تعقیبی Šidák P<۰/۰۵ اختلاف معنی‌دار***




***نمودار ۲- تغییرات حجم تومور در گروه کنترل تومور و گروه تیمار طی هفته‌های اول تا سوم دوره تیمار***
***داده‌ها به‌صورت "انحراف معیار ± میانگین" (۱۰ در هر گروه= تعداد حیوانات) ارائه شدند. در هفته سوم، حجم تومور در گروه تیمار نسبت به گروه کنترل تومور به‌طور معنی‌داری کاهش یافت (P<۰/۰۰۱***).***

نتایج آزمون ناپارامتریک Kruskal–Wallis نشان داد که بیان ژن VEGF بین گروه‌های مطالعه تفاوت معنی‌داری دارد (P<۰/۰۰۱). در مقایسه‌های زوج‌گروهی با آزمون تعقیبی Dunn، بیان ژن VEGF در گروه کنترل تومور نسبت با گروه‌های شاهد سالم و شم تفاوت معنی‌داری داشت (P<۰/۰۵). هم‌چنین، بیان VEGF در گروه تیمار در مقایسه با گروه کنترل تومور به‌طور معنی‌داری کاهش یافت (P=۰/۰۰۴) (جدول ۳، نمودار ۳).

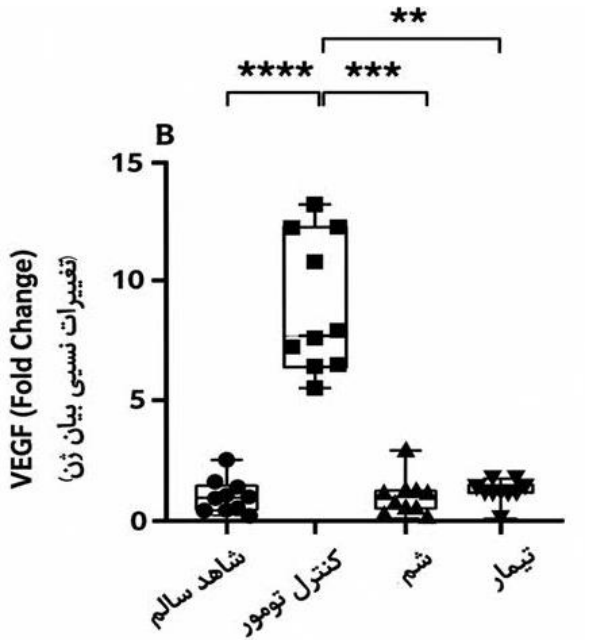

CCBY-NC.4.0 DEED

[ Downloaded from journal.rums.ac.ir on 2026-11-04 ]
[ DOI: doi: 1066224/jrums.25.5.499 ]

*جدول ۳- مقایسه بیان ژن VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) برحسب گروه‌های مورد مطالعه*

| گروه مطالعه | تعداد حیوانات (n) | میانه (چارک اول – چارک سوم) | مقایسه دوتایی (Dunn) | مقدار P |
|---|---|---|---|---|
| **شاهد سالم** | ۱۰ | ۰/۹۵۰ (۰/۴۳ - ۱/۴۲) | شاهد سالم در برابر کنترل تومور | <۰/۰۰۱ |
| **کنترل تومور** | ۱۰ | ۷/۶۴۵ (۶/۳۷ - ۱۲/۲۵) | - | - |
| **شم** | ۱۰ | ۰/۹۴۵ (۰/۴۸ - ۱/۲۲) | شم در برابر کنترل تومور | ۰/۰۰۱ |
| **تیمار** | ۱۰ | ۱/۱۷۵ (۱/۱۱ - ۱/۵۰ ) | تیمار در برابر کنترل تومور | ۰/۰۰۴ |

*آزمون تعقیبی Dunn، P<۰/۰۵ اختلاف معنی‌دار*




*نمودار ۳- مقایسه بیان ژن VEGF در گروه‌های مورد مطالعه پس از دوره تیمار*

*داده‌ها در هر ستون به صورت "(چارک سوم - چارک اول) میانه" نمایش داده شده است. در مقایسه بین گروه شاهد و گروه کنترل تومور (P<۰/۰۰۱****)، در مقایسه بین گروه کنترل تومور و گروه شم (P=۰/۰۰۱***)، در مقایسه بین گروه تیمار و گروه کنترل تومور (P=۰/۰۰۴**).*

نتایج آزمون Kruskal–Wallis نشان داد که بیان ژن COL18A1 بین گروه‌های مطالعه تفاوت معنی‌داری دارد (P<۰/۰۰۱). بر اساس آزمون تعقیبی Dunn، تفاوت بیان این ژن بین گروه کنترل تومور و گروه شاهد سالم معنی‌دار نبود (P>۰/۰۵) و بین گروه کنترل تومور و گروه شم معنی‌دار بود (P<۰/۰۵). درمقابل، بیان COL18A1 در گروه تیمار در مقایسه با گروه کنترل تومور به‌طور معنی‌داری افزایش یافت (P<۰/۰۰۱) (جدول ۴، نمودار ۴).

[ Downloaded from journal.rums.ac.ir on 2026-11-04 ]

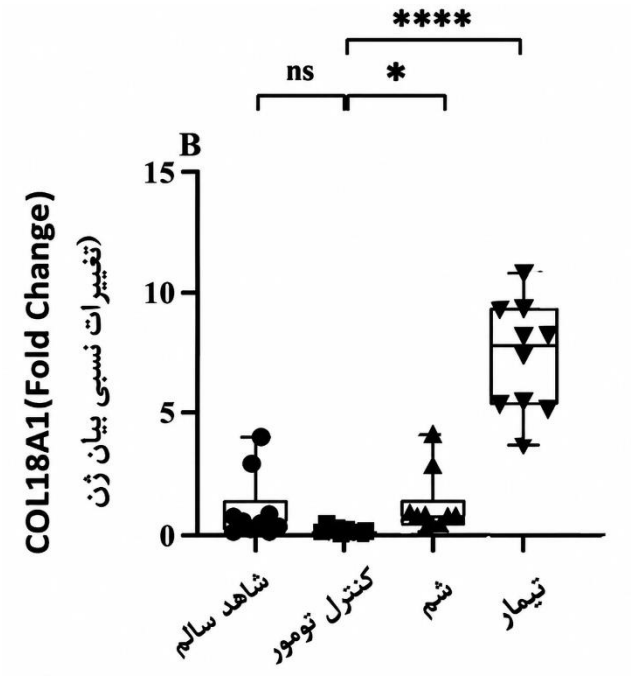
[ DOI: doi: 1066224/jrums.25.5.499 ]


CCBY-NC.4.0 DEED

***جدول ۴- مقایسه بیان ژن (Collagen Type XVIII Alpha 1 Chain) COL18A1 برحسب گروه‌های مورد مطالعه***

| گروه مطالعه | تعداد حیوانات (n) | میانه (چارک اول – چارک سوم) | مقایسه دوتایی (Dunn) | مقدارP |
|---|---|---|---|---|
| **شاهد سالم** | ۱۰ | ۰/۵۰ (۰/۱۹ - ۱/۳۰) | شاهد سالم در برابر کنترل تومور | ۰/۰۹۴ |
| **کنترل تومور** | ۱۰ | ۰/۰۸ (۰/۰۳ - ۰/۱۸) | - | - |
| **شم** | ۱۰ | ۰/۷۶ (۰/۴۴ - ۱/۳۶) | شم در برابر کنترل تومور | ۰/۰۱۳ |
| **تیمار** | ۱۰ | ۷/۲۹۵ (۵/۱۱ - ۸/۶۴) | تیمار در برابر کنترل تومور | <۰/۰۰۱ |

***آزمون تعقیبی Dunn، P<۰/۰۵اختلاف معنی‌دار***




***نمودار ۴- مقایسه بیان ژن COL18A1 در گروه‌های مورد مطالعه پس از دوره تیمار***

***داده‌ها در هر ستون به صورت میانه (چارک اول – چارک سوم) نمایش داده شده است. در مقایسه گروه شاهد سالم با گروه کنترل تومور (غیر معنی‌دار) P=۰/۰۹۴ (Not Significant; ns)، در مقایسه گروه شم با گروه کنترل تومور (معنی‌دار) P=۰/۰۱۳*، در مقایسه گروه تیمار با گروه کنترل تومور(معنی‌دار) P<۰/۰۰۱****.***

## بحث

یافته‌های مطالعه حاضر نشان داد که تجویز اگزوزوم‌های مشتق از سلول‌های بنیادی خون قاعدگی در مدل موشی سرطان پستان با کاهش معنی‌دار حجم تومور همراه بود. هم‌چنین، در RNA استخراج شده از اگزوزوم‌های جداشده گروه تیمار، بیان ژن VEGF کاهش و بیان ژن COL18A1 افزایش یافت. ازآن‌جا که COL18A1کلاژن XVIII پیش‌ساز اندوستاتین را کد می‌کند، این تغییرات می‌توانند نشان‌دهنده تعدیل عوامل مولکولی مرتبط با رگ‌زایی باشند. از سوی دیگر، به‌دلیل نبود ارزیابی مستقیم رگ‌زایی در بافت تومور، نمی‌توان اثر ضدآنژیوژنیک اگزوزوم‌ها را به‌طور قطعی نتیجه‌گیری کرد.

عامل VEGF از عوامل مهم تحریک رگ‌زایی توموری است، در


CCBY-NC.4.0 DEED

[ Downloaded from journal.rums.ac.ir on 2026-11-04 ]
[ DOI: doi: 1066224/jrums.25.5.499 ]

حالی‌که اندوستاتین، مشتق‌شده از کلاژن XVIII، دارای اثرات ضدآنژیوژنیک است (۳۵). بنابراین، کاهش بیان VEGF همراه با افزایش بیان COL18A1 می‌تواند نشان‌دهنده تغییر تعادل عوامل مرتبط با رگ‌زایی به سمت وضعیتی بالقوه ضدآنژیوژنیک باشد، با این وجود، نتایج حاضر در سطح RNA اگزوزومی به‌دست آمده‌اند و افزایش COL18A1 لزوماً به افزایش میزان یا فعالیت پروتئین اندوستاتین منجر نمی‌شود. هم‌چنین، کاهش حجم تومور ممکن است علاوه بر مسیرهای مرتبط با رگ‌زایی، از طریق تغییر تکثیر سلولی، آپوپتوز، پاسخ ایمنی یا ریزمحیط تومور ایجاد شده باشد (۳۶). از نظر مکانیسمی، انتقال miRNAها توسط اگزوزوم‌ها می‌تواند در اثرات مشاهده‌شده نقش داشته باشد. در این میان، miR-100 یک مولکول کاندید است. گزارش شده است که انتقال miR-100توسط اگزوزوم‌های مشتق از سلول‌های بنیادی مزانشیمی می‌تواند از طریق تعدیل محور mTOR/HIF-1α/VEGF، بیان و ترشح VEGF را کاهش داده و رگ‌زایی را مهار کند. در این مطالعه، محتوای miRNA اگزوزوم‌های ارزیابی نشده است. در نتیجه، نقش miR-100 در نتایج حاضر تنها یک فرضیه محسوب می‌شود و نیازمند بررسی‌های تکمیلی است (۳۷).

شواهد موجود نشان می‌دهد که اگزوزوم‌های مشتق از سلول‌های بنیادی قاعدگی (MenSCs) می‌توانند در مدل‌های سرطانی با کاهش ترشح VEGF و مهار رگ‌زایی وابسته به تومور، اثرات بالقوه ضدآنژیوژنیک داشته باشند (۳۸). از سوی دیگر، در مدل‌های ترمیمی نیز اثرات پروآنژیوژنیک این اگزوزوم‌ها، از جمله افزایش رگ‌زایی و تسهیل بازسازی بافت گزارش شده است؛ بنابراین، اثر آن‌ها بر رگ‌زایی احتمالاً به نوع بافت هدف، وضعیت بیماری و شرایط ریزمحیطی وابسته است (۳۹). این تفاوت‌ها احتمالاً به منشأ اگزوزوم‌ها، نوع سلول هدف و شرایط ریزمحیطی وابسته است (۴۰).

در مجموع، اگزوزوم‌های مشتق از سلول‌های بنیادی مزانشیمی خون قاعدگی (MenSCs) با کاهش حجم تومور و تغییر در رونوشت‌های مرتبط با تنظیم رگ‌زایی همراه بودند؛ این تغییرات شامل کاهش بیان ژن VEGF و افزایش بیان ژن COL18A1 بود. از آن‌جا که ژن COL18A1 کدکننده کلاژن نوع XVIII است و اندوستاتین به‌عنوان قطعه‌ای حاصل از پردازش پروتئولیتیک کلاژن XVIII تولید می‌شود، افزایش بیان COL18A1 می‌تواند با تقویت بالقوه محور کلاژن/XVIII اندوستاتین و در نتیجه افزایش ظرفیت ضدآنژیوژنیک همراه باشد. از آن‌جا که در مطالعه حاضر سطح پروتئین اندوستاتین مستقیماً اندازه‌گیری نشد، این ارتباط را نمی‌توان به‌عنوان افزایش قطعی اندوستاتین تلقی کرد. بنابراین، یافته‌های حاضر احتمال اثر اگزوزوم‌ها بر مسیرهای مرتبط با تنظیم رگ‌زایی را مطرح می‌کنند. بر این اساس، تأیید اثر ضدآنژیوژنیک و تعیین نقش مستقیم محور کلاژن/XVIII اندوستاتین و نیز شناسایی محموله مولکولی مسئول این اثر، به سنجش سطوح پروتئینی، ارزیابی بافت‌شناختی تومور، بررسی دقیق‌تر مارکرهای وزیکولی و انجام آزمون‌های عملکردی و مکانیزمی بیشتر نیاز دارد.

در مجموع، اگزوزوم‌های مشتق از MenSCs با کاهش حجم تومور و تغییر در رونوشت‌های مرتبط با رگ‌زایی شامل کاهش VEGF و افزایش COL18A1 همراه بودند. این نتایج احتمال اثر اگزوزوم‌ها بر مسیرهای مرتبط با رگ‌زایی را مطرح می‌کند، اما تأیید اثر ضدآنژیوژنیک و شناسایی محموله مولکولی مسئول آن، به سنجش پروتئین‌ها، ارزیابی بافت تومور، بررسی مارکرهای وزیکولی و آزمون‌های عملکردی بیشتر نیاز دارد.

از محدودیت‌های مطالعه حاضر، نبود ارزیابی هیستوپاتولوژیک

[ Downloaded from journal.rums.ac.ir on 2026-11-04 ]

[ DOI: doi: 1066224/jrums.25.5.499 ]


CCBY-NC.4.0 DEED

بافت تومور، متاستاز، پاسخ ایمنی و مسیرهای مولکولی پایین‌دستی مرتبط با VEGF و COL18A1 بود، درنتیجه مکانیسم دقیق اثر اگزوزوم‌ها در کاهش حجم تومور مشخص نشد. هم‌چنین، اگرچه ریخت‌شناسی و اندازه ذرات اگزوزوم با TEM و DLS بررسی شد، عدم بررسی مارکرهای مثبت و منفی مانند CD9 و Calnexin، یافته‌های ریخت‌شناختی و اندازه‌سنجی مطالعه را نفی نمی‌کند، اما تأیید مولکولی هویت و خلوص وزیکول‌های جداسازی‌شده را محدود می‌سازد. پیشنهاد می‌شود در مطالعات آینده، بررسی هیستوپاتولوژی، متاستاز، پاسخ ایمنی، پروتئین‌های VEGFو اندوستاتین، مسیرهای مولکولی مرتبط و نیز مارکرهای مثبت و منفی وزیکولی انجام شود.

## نتیجه‌گیری

یافته‌های مطالعه حاضر نشان داد که اگزوزوم‌های مشتق از سلول‌های بنیادی خون قاعدگی در دوز به‌کار رفته موجب کاهش حجم تومور و تغییرات معنادار در بیان ژن‌های مرتبط با رگ‌زایی در مدل موشی سرطان پستان شدند، به‌طوری‌که بیان ژن VEGF کاهش یافت و بیان ژن COL18A1 به عنوان پیش‌ساز اندوستاتین افزایش پیدا کرد. این یافته‌ها احتمال اثر ضدرگ‌زایی اگزوزوم‌ها را از طریق کاهش مسیر وابسته به VEGF و تقویت مسیر مرتبط با اندوستاتین مطرح می‌کنند. با وجود یافته‌های گزارش شده، تأیید این اثر مستلزم ارزیابی مستقیم شاخص‌های بافتی، مولکولی و عملکردی رگ‌زایی در مطالعات آینده است.

## تشکر و قدردانی

نویسندگان مراتب سپاس و قدردانی خود را از مرکز تحقیقات پاتولوژی و سلول‌های بنیادی دانشگاه علوم پزشکی کرمان و بیمارستان افضلی‌پور کرمان به‌دلیل حمایت‌های علمی و اجرایی در انجام این پژوهش ابراز می‌دارند.

**تعارض در منافع:** بنا به اظهار نویسندگان این مطالعه تعارض منافع ندارد.

**حمایت مالی:** این پژوهش هیچ‌گونه حمایت مالی از سازمان‌ها، مؤسسات یا نهادهای دولتی و غیردولتی دریافت نکرده است و تمامی هزینه‌های آن توسط نویسنده تأمین شده است.

**ملاحظات اخلاقی (کد اخلاق):**

این مقاله حاصل بخشی از پایان‌نامه با عنوان "بررسی اثر اگزوزوم‌های مستخرج از سلول‌های بنیادی قاعدگی بر روی ژن‌های BRCA1/BRCA2 و سطوح VEGF و اندوستاتین در مدل سرطانی پستان"، در مقطع دکتری، مصوب دانشگاه آزاد اسلامی مشهد با کد اخلاق به شماره IR.IAU.MSHD.REC.1402.147 اخذ شده از کمیته اخلاق دانشکده پزشکی دانشگاه آزاد اسلامی-واحد علوم پزشکی مشهد می‌باشد. تمامی مراحل این مطالعه و کار با حیوانات آزمایشگاهی، طبق دستورالعمل‌های کشوری اخلاق در پژوهش‌های زیست‌پزشکی انجام شده است.

**مشارکت نویسندگان**

**طراحی ایده:** فرشته ده نمکی

**روش کار:** فرشته ده نمکی

**جمع‌آوری داده‌ها:** فرشته ده نمکی

**تجزیه و تحلیل داده‌ها:** سعیده ظفربالانژاد، شهریار دبیری، حمیدرضا بیدخوری، خدیجه نژاد شاهرخ آبادی

**نظارت:** سعیده ظفر بالانژاد

**مدیریت پروژه:** سعیده ظفر بالانژاد

**نگارش-پیش‌نویس:** فرشته ده نمکی

**نگارش-بررسی و ویرایش:** سعیده ظفر بالانژاد

[ Downloaded from journal.rums.ac.ir on 2026-11-04 ]

[ DOI: doi: 1066224/jrums.25.5.499 ]



CCBY-NC.4.0 DEED

# References


1. Bray F, Laversanne M, Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Soerjomataram I, et al. Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin* 2024; 74(3): 229-63.

2. Guo ZH, Jing X, Sun XT, Sun SS, Yang YL, Cao YH. Tumor angiogenesis and anti-angiogenic therapy. *Chin Med J* (Engl) 2024; 137(17): 2043-51.

3. Kaur G, Roy B. Decoding tumor angiogenesis for therapeutic advancements: mechanistic insights. *Biomedicines* 2024; 12(4): 827.

4. Mongiat M, Pascal G, Poletto E, Williams DM, Iozzo RV. Proteoglycans of basement membranes: crucial controllers of angiogenesis, neurogenesis, and autophagy. *Proteoglycan Res* 2024; 2(3): e22.

5. Taheri M, Abdul Tehrani H, Dehghani S, Rajabzadeh A, Alibolandi M, Zamani N, et al. Signaling crosstalk between mesenchymal stem cells and tumor cells: implications for tumor suppression or progression. *Cytokine Growth Factor Rev* 2024; 76: 30-47.

6. Hosseini A, Abdolmaleki A, Nahumi A, Asadi A, Ghanimi HA. Immunomodulatory functions of mesenchymal stem cells in tissue engineering. *Arch Razi Inst* 2025; 80(2): 313-24. [Farsi]

7. Feng Y, He Y. The secrets of menstrual blood: emerging frontiers from diagnostic tools to stem cell therapies. *Front Cell Dev Biol* 2025; 13: 1623959.

8. Dixson AC, Dawson TR, Di Vizio D, Weaver AM. Context-specific regulation of extracellular vesicle biogenesis and cargo selection. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2023; 24: 454-76.

9. Huang S, Dong M, Chen Q. Tumor-derived exosomes and their role in breast cancer metastasis. *Int J Mol Sci* 2022; 23(22): 13993.

10. Wu X, Wang W. Emerging clinical applications of exosomes in breast cancer management from biomarkers to therapeutics. *Discov Oncol* 2026; 17(1): 308.

11. Percie du Sert N, Ahluwalia A, Alam S, Avey MT, Baker M, Browne WJ, et al. Reporting animal research: Explanation and elaboration for the




CCBY-NC.4.0 DEED

[ Downloaded from journal.rums.ac.ir on 2026-11-04 ]

[ DOI: doi: 1066224/jrums.25.5.499 ]

ARRIVE guidelines 2.0. *Lab Anim* 2022; 56(3): 183-202.

12. Zhou M, Li H, Zhao J, Zhang Q, Han Z, Han ZC, et al. Extracellular vesicles derived from mesenchymal stem cells suppress breast cancer progression by inhibiting angiogenesis. *Mol Med Rep* 2024; 30(5): 192.

13. Peyvandi S, Bulliard M, Yilmaz A, Kauzlaric A, Marcone R, Haerri L, et al. Tumor-educated Gr1+CD11b+ cells drive breast cancer metastasis via OSM/IL-6/JAK-induced cancer cell plasticity. *J Clin Invest* 2024; 134(6): e166847.

14. Altea-Manzano P, Doglioni G, Liu Y, Cuadros AM, Nolan E, Fernández-García J, et al. A palmitate-rich metastatic niche enables metastasis growth via p65 acetylation resulting in pro-metastatic NF-κB signaling. *Nat Cancer* 2023; 4(3): 344-64.

15. de Pedro MA, López E, González-Nuño FM, Pulido M, Álvarez V, Marchena AM, et al. Menstrual blood-derived mesenchymal stromal cells: impact of preconditioning on the cargo of extracellular vesicles as potential therapeutics. *Stem Cell Res* Ther 2023; 14: 187.

16. Renesme L, Cobey KD, Lalu MM, Bubela T, Chinnadurai R, De Vos J, et al. Delphi-driven consensus definition for mesenchymal stromal cells and clinical reporting guidelines for mesenchymal stromal cell-based therapeutics. *Cytotherapy* 2025; 27(2): 146-68.

17. Li N, Wang B. Suppressive effects of umbilical cord mesenchymal stem cell-derived exosomal miR-15a-5p on the progression of cholangiocarcinoma by inhibiting CHEK1 expression. *Cell Death Discov* 2022; 8: 205.

18. Soufizadeh P, Nikbakht Brujeni G, Dehghan MM, Jabbari Fakhr M, Houshmand P, Mohebbi M, et al. Preventing the rejection of skin allografts by immunomodulatory and regenerative effects of exosomes derived from bone marrow mesenchymal stem cells in mice. *Iran J Basic Med Sci* 2025; 28(4): 469-76.

19. Liu D, Yan S, Zhang Y, Li J, Wang Y, Liu X, et al. A d-peptide-based oral nanotherapeutic modulates the PD-1/PD-L1 interaction for tumor immunotherapy. *Front Immunol* 2023; 14: 1228581.

20. Hosseini M, Ezzeddini R, Hashemi SM, Soudi S, Salek Farrokhi A. Enhanced anti-tumor efficacy of S3I-201 in breast cancer mouse model through Wharton jelly-derived exosomes. *Cancer Cell Int* 2024; 24: 318.

21. de Pedro MÁ, Pulido M, Álvarez V, Marinaro F, Marchena AM, Sánchez-Margallo FM, et al. Menstrual blood-derived stromal cells: insights into

[ Downloaded from journal.rums.ac.ir on 2026-11-04 ]

[ DOI: doi: 1066224/jrums.25.5.499 ]



CCBY-NC.4.0 DEED

their secretome in acute hypoxia conditions. *Mol Med* 2023; 29: 48.

22. Yu J, Xu X, Griffin JI, Mu Q, Ho RJY. Drug combination nanoparticles containing gemcitabine and paclitaxel enable orthotopic 4T1 breast tumor regression. *Cancers* (Basel) 2024; 16(16): 2792.

23. Arras M, Autenried P, Rettich A, Spaeni D, Rülicke T. Optimization of intraperitoneal injection anesthesia in mice: drugs, dosages, adverse effects, and anesthesia depth. *Lab Anim* 2022; 56(5): 438-49.

24. Lu W, Tang H, Li S, Bai L, Chen Y. Extracellular vesicles as potential biomarkers and treatment options for liver failure: a systematic review up to March 2022. *Front Immunol* 2023; 14: 1116518.

25. Jiang M, Liu J, Hu S, Yan X, Cao Y, Wu Z. Exosomal miR-125b-5p derived from mesenchymal stromal/stem cell enhances anti-PD-1 therapy in mouse colon cancer model. *Stem Cell Res Ther* 2025; 16: 112.

26. Yan F, Cui W, Chen Z. Mesenchymal stem cell-derived exosome-loaded microRNA-129-5p inhibits TRAF3 expression to alleviate apoptosis and oxidative stress in heart failure. *Cardiovasc Toxicol* 2022; 22(7): 631-45.

27. Niavarani SR, St-Cyr G, Daniel L, Lawson C, Giguère H, Alkayyal AA, et al. Heterologous prime-boost cellular vaccination induces potent antitumor immunity against triple negative breast cancer. *Front Immunol* 2023; 14: 1098344.

28. Ahrens Kress APA, Zhang Y, Kaiser-Vry AR, Sauer MB. A comparison of blood collection techniques in mice and their effects on welfare. *J Am Assoc Lab Anim Sci* 2022; 61(3): 287-95.

29. Bettio V, Mazzucco E, Antona A, Cracas S, Varalda M, Venetucci J, et al. Extracellular vesicles from human plasma for biomarkers discovery: Impact of anticoagulants and isolation techniques. *PLoS One* 2023; 18(5): e0285440.

30. Zhevlakova I, Liu H, Dudiki T, Gao D, Yakubenko V, Tkachenko S, et al. Mechanisms and consequences of myeloid adhesome dysfunction in atherogenesis. *Cardiovasc Res* 2025; 121(1): 62-76.

31. Dai G, Yang Y, Liu S, Liu H. Hypoxic breast cancer cell-derived exosomal SNHG1 promotes breast cancer growth and angiogenesis via regulating miR-216b-5p/JAK2 axis. *Cancer Manag Res* 2022; 14: 123-33.

32. Bustin SA, Ruijter JM, van den Hoff MJB, Kubista M, Pfaffl MW, Shipley GL, et al. MIQE 2.0: Revision of the Minimum Information for Publication of

[ Downloaded from journal.rums.ac.ir on 2026-11-04 ]

[ DOI: doi: 1066224/jrums.25.5.499 ]



CCBY-NC.4.0 DEED

Quantitative Real-Time PCR Experiments Guidelines. *Clin Chem* 2025; 71(6): 634-51.

33. Vrbin CM, Gilbert J. Parametric or nonparametric statistical tests: Considerations for choosing the most appropriate option for your data. *Cytopathology* 2022; 33(6): 663-7.

34. Liu B, Huang J, Xiao J, Xu W, Zhang H, Yuan Y, et al. The Streptococcus virulence protein PepO triggers anti-tumor immune responses by reprograming tumor-associated macrophages in a mouse triple negative breast cancer model. *Cell Biosci* 2023; 13(1): 198.

35. Méndez-Valdés G, Gómez-Hevia F, Lillo-Moya J, González-Fernández T, Abelli J, Cereceda-Cornejo A, et al. Endostatin and cancer therapy: a novel potential alternative to anti-VEGF monoclonal antibodies. *Biomedicines* 2023; 11(3): 718.

36. Sun J, Ren S, Zhao Q, He J, Wang Y, Ren M. Endostatin-based anti-angiogenic therapy and immune modulation: mechanisms and synergistic potential in cancer treatment. *Front Immunol* 2025; 16: 1623859.

37. Mir R, Baba SK, Elfaki I, Algehainy N, Alanazi MA, Altemani FH, et al. Unlocking the secrets of extracellular vesicles: orchestrating tumor microenvironment dynamics in metastasis, drug resistance, and immune evasion. *J Cancer* 2024; 15(19): 6383-415.

38. Hasannejad F, Bahraminasab M, Farahmand L, Darvishi B, Taghdiri Nooshabadi V, Parsaei H, et al. A thermosensitive hydrogel for the sustained delivery of exosomes extracted from menstrual blood mesenchymal stem cells and frizzled antibody on triple-negative breast cancer cells in vitro. *J Drug Deliv Sci Technol* 2024; 101: 106144.

39. Vaiciuleviciute R, Pachaleva J, Bernotiene E, Kugaudaite G, Lebedis I, Krugly E, et al. Menstrual blood-derived mesenchymal stromal cell extracellular vesicles: a potential tool for tissue regeneration and disease detection. *Front Bioeng Biotechnol* 2025; 13: 1643408.

40. Lin Z, Wu Y, Xu Y, Li G, Li Z, Liu T. Mesenchymal stem cell-derived exosomes in cancer therapy resistance: recent advances and therapeutic potential. *Mol Cancer* 2022; 21: 179.

[ Downloaded from journal.rums.ac.ir on 2026-11-04 ]

[ DOI: doi: 1066224/jrums.25.5.499 ]



CCBY-NC.4.0 DEED

# Effect of Menstrual Blood Stem Cell-Derived Exosomes on VEGF and Endostatin Expression in a Mouse Model of Breast Cancer: An Experimental Study

**Fereshteh Dehnamaki[1], Saeedeh Zafar Balanezhad[2], Shahriar Dabiri[3], Hamid Reza Bidkhori[4], Khadijeh Nejad Shahrokhabadi[5]**

**Received: 19/05/26 Sent for Revision: 22/06/26 Received Revised Manuscript: 15/08/26 Accepted: 17/08/26**

**Background and Objectives:** Exosomes are intercellular mediators with therapeutic potential. Given the importance of angiogenesis in breast cancer progression, this study aimed to determine the effect of menstrual blood-derived stem cell exosomes on the expression of VEGF and COL18A1 (endostatin precursor) in a mouse model of breast cancer.

**Materials and Methods:** In this experimental study, 40 BALB/c female mice were divided into four groups. Tumors were induced in the tumor control and treatment groups by injecting $1\times10^6$ 4T1 cells. Exosomes at a dose of 50 µg were administered to the treatment group on days 7, 14, and 21 post-induction, and the volume of the tumors was measured. On day 28, exosomes were isolated from the serum, their RNA extracted, and gene expression was evaluated using qRT-PCR. Gene expression data were analyzed using Kruskal–Wallis and Dunn's tests; for tumor volume changes, we used two-way repeated measures ANOVA and Šidák's tes.

**Results:** The tumor volume in the treatment group (70.20 $mm^3$) significantly decreased compared to the tumor control group (161.00 $mm^3$) ($P<0.001$). Vascular endothelial growth factor (VEGF) expression in the treatment group (1.175) showed a significant decrease compared to the tumor control group (7.645) ($P=0.004$). COL18A1 expression in the treatment group (7.295) significantly increased compared to the controls (0.08) ($P<0.001$).

**Conclusion:** Menstrual blood stem cell exosomes may play a role in angiogenesis-related processes in a mouse breast cancer model by modulating VEGF and COL18A1 expression.

**Keywords:** Exosomes, Menstrual blood stem cells, Angiogenesis, Breast cancer

**Funding:** This study did not receive any funds.

**Conflict of interest:** None declared.

**Ethical Considerations (Code of Ethics):** The Ethics Committee of the Faculty of Medicine, Islamic Azad University, Mashhad Branch, approved the study (IR.IAU.MSHD.REC.1402.147)

**Authors' contributions**

**Conceptualization:** Fereshteh Dehnamaki

**Methodology:** Fereshteh Dehnamaki

**Data collection:** Fereshteh Dehnamaki

**Formal analysis:** Saeedeh Zafar Balanezhad, Shahriar Dabiri, Hamid Reza Bidkhori, Khadijeh Nejad Shahrokhabadi

**Supervision:** Saeedeh Zafar Balanezhad

**Project administration:** Saeedeh Zafar Balanezhad

**Writing - original draft:** Fereshteh Dehnamaki

**Writing - review & editing:** Saeedeh Zafar Balanezhad

**Citation:** Dehnamaki F, Zafar Balanezhad S, Dabiri Sh, Bidkhori HR, Nejad Shahrokhabadi Kh. Effect of Menstrual Blood Stem Cell-Derived Exosomes on VEGF and Endostatin Expression in a Mouse Model of Breast Cancer: An Experimental Study. *J Rafsanjan Univ Med Sci* 2026; 25 (5): 499-516. doi: 1066224/jrums.25.5.499. [Farsi].

*1- PhD Student, Department of Biology, Ma.C., Islamic Azad University, Mashhad, Iran*

*2- Associate Professor, Department of Biology, Ma.C., Islamic Azad University, Mashhad, Iran, ORCID: 0000-0002-0530-1270 (Corresponding Author) Tel: (051) 38435050, E-mail: Saeedeh.zafarbalanezhad@iau.ac.ir*

*3- Professor, Department of Pathology and Stem Cell Research Center, Kerman University of Medical Sciences, Kerman, Iran*

*4- Assistant Professor, Stem Cells and Regenerative Medicine Research Group, Academic Center for Education, Culture and Research (ACECR), Khorasan Razavi, Mashhad, Iran*

*5- Associate Professor, Department of Biology, Ma.C., Islamic Azad University, Mashhad, Iran*



CCBY-NC.4.0 DEED

[ Downloaded from journal.rums.ac.ir on 2026-11-04 ]

[ DOI: doi: 1066224/jrums.25.5.499 ]