

**CBD revertuje mezenchymálny invazívny fenotyp  
buniek rakoviny prsníka indukovaný zápalovým  
cytokínom IL-1p  
(Voľný preklad)**

**Autori:**

Lázaro García-Morales, Aída M Castillo, José Tapia Ramírez, Horacio Zamudio-Meza, Ma del Carmen Domínguez-Robles, Isaura Meza

**Publikované:**

Online 35.5.2020

**Originálny článok dostupný na:**

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7177247/>

# **CBD revertuje mezenchymálny invazívny fenotyp buniek rakoviny prsníka indukovaný zápalovým cytokínom IL-1p**

## **Abstrakt**

Kanabidiol (CBD) sa používa na liečbu rôznych druhov rakoviny a zápalových stavov s kontroverznými výsledkami. V predchádzajúcej práci sme ukázali, že bunky rakoviny prsníka MCF-7, vybrané svojou odpoveďou na zápalový IL-1p cytokín, získavajú malígny fenotyp (6D bunky) prostredníctvom epitelovo-mezenchymálneho prechodu (EMT). Hodnotili sme CBD ako potenciálny inhibítor tohto prechodu a induktor reverzie na neinvazívny fenotyp. Znížil životaschopnosť 6D buniek, čím znížil expresiu receptora CB1. CBD blokovalo migráciu a progresiu IL-1p-indukovanej signálnej dráhy IL-1p/IL-1RI/p-ksenínu, hnacej sily EMT. Kanabidiol obnovil organizáciu epitelu stratenú disperziou buniek a re-lokalizoval E-kadherín a  $\beta$ -ksenín na adhézných spojeniach. Zabránil tiež jadrovej translokácii  $\beta$ -ksenínu a znížil nadmernú expresiu génov pre proteíny  $\Delta$ Np63 $\alpha$ , BIRC3 a ID1, indukovanú IL-1 $\beta$  na získanie malígnych znakov. Kanabidiol inhiboval aktiváciu proteínkinázy B (AKT), kľúčový efektor v dráhe IL-1p/IL-1RI/p-ksenínu, čo naznačuje, že v tomto bode existuje presluch medzi signalizáciou IL-1p a CBD, čo vedie k reverzii fenotypu. Náš 6D bunkový systém umožnil krok za krokom analýzu prechodu fenotypu a lepšie pochopenie mechanizmov, ktorými CBD blokuje a vracia účinky zápalového IL-1p v EMT. čo naznačuje, že v tomto bode existuje presluch medzi signalizáciou IL-1p a CBD, čo vedie k reverzii fenotypu. Náš 6D bunkový systém umožnil krok za krokom analýzu prechodu fenotypu a lepšie pochopenie mechanizmov, ktorými CBD blokuje a vracia účinky zápalového IL-1p v EMT. čo naznačuje, že v tomto bode existuje presluch medzi signalizáciou IL-1p a CBD, čo vedie k reverzii fenotypu. Náš 6D bunkový systém umožnil krok za krokom analýzu prechodu fenotypu a lepšie pochopenie mechanizmov, ktorými CBD blokuje a vracia účinky zápalového IL-1p v EMT.

Kľúčové slová: CBD, zápalový IL1 $\beta$ , signálne dráhy, reverzia fenotypu, liečba rakoviny

## **Úvod**

Zápal sa považuje za kritickú zložku progresie rakoviny. Prítomnosť zápalových cytokínov v mikroprostredí nádoru je spojená s agresívnym fenotypom v rakovinových bunkách [ 1 ]. Predovšetkým bolo navrhnuté, že zvýšené hladiny IL-1 $\beta$ , odvodeného z mikroprostredia malígnych buniek, aktivujú zápal, ktorý podporuje invazívnosť [ 2 ].

Predchádzajúca práca našej skupiny ukázala, že väzba zápalového cytokínu IL-1 $\beta$  na jeho receptor IL-1RI, prítomný v neinvazívnych bunkách rakoviny prsníka MCF-7, spustila iniciáciu epitelovo-mezenchymálneho prechodu (EMT) aktiváciou signálna dráha IL-1 $\beta$ /IL-1R/ $\beta$ -ksenín [ 3 , 4 , 5 ]. Prechod bol iniciovaný výraznými modifikáciami medzibunkových spojení a aktívneho cytoskeletu epitelových buniek. Bunky sa od seba oddelili a získali mezenchymálnu morfológiu a zvýšenú migráciu a invazívnosť [ 3 ]. Dezorganizácia kontaktov bunka-bunka viedla k internalizácii proteínov bunkového spojenia medzi tými  $\beta$ -ksenínmi, ktoré boli translokované do jadra.  $\beta$ -ksenín pôsobil ako transkripčný koaktivátor, moduloval expresiu génov a proteínov downstream od IL-1 $\beta$ -aktivovanej signálnej dráhy na dokončenie EMT a získanie agresívneho fenotypu takzvaných 6D buniek. Tieto údaje podporili návrh nás a iných autorov o vzťahu medzi vznikom rakoviny a zápalovým mikroprostredím [ 6 , 7 ].

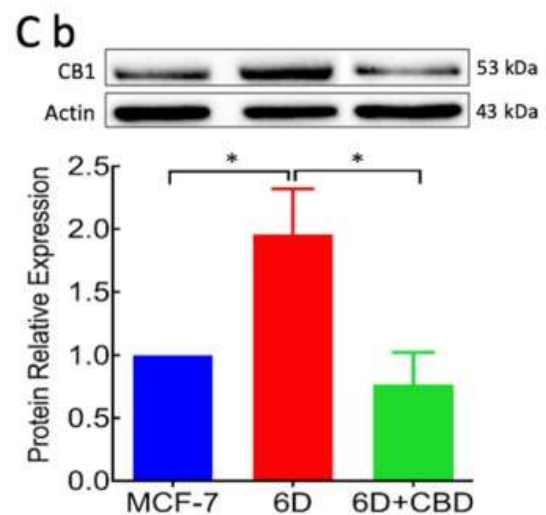
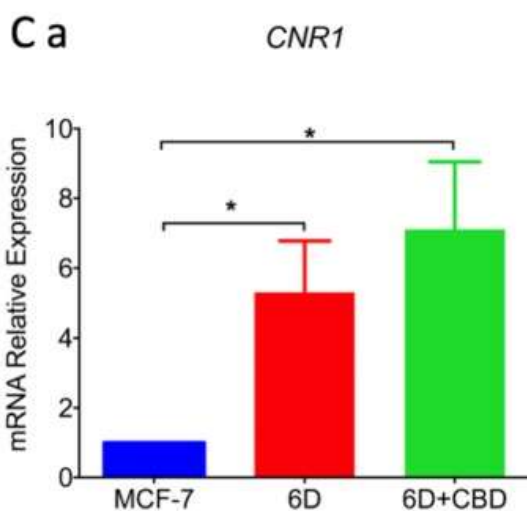
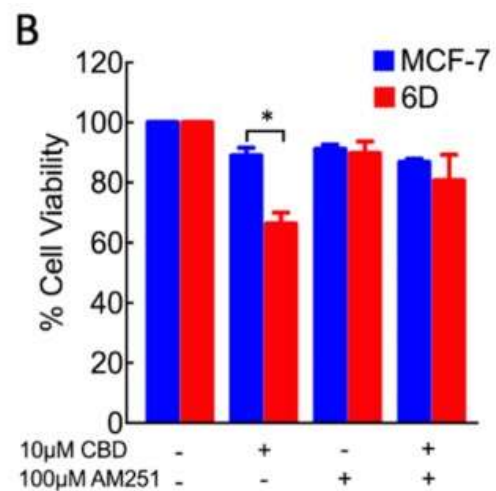
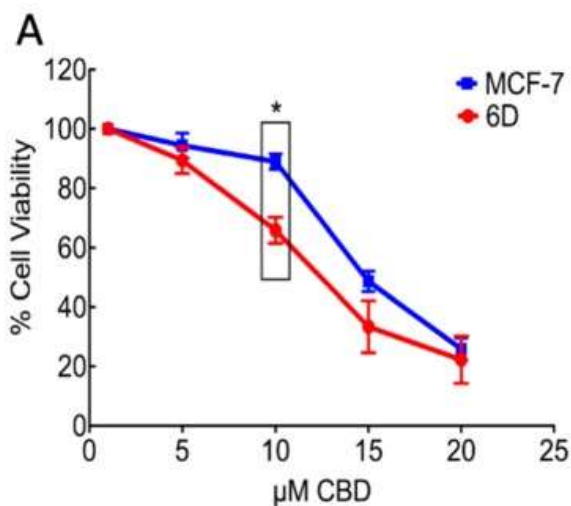
Kanabidiol, CBD, zložka Cannabis sativa bez psychotropných účinkov, sa už niekoľko rokov empiricky používa ako protizápalový liek a modulátor progresie rakoviny. Nedávne štúdie zdôraznili, že CBD je toxický v rôznych koncentráciách v rôznych bunkách, čo sťažuje interpretáciu výsledkov získaných v bunkových modeloch a na klinike, a preto je ťažké definovať správnu dávku pre pacientov [ 8 ]. Na druhej strane štúdie in vitro ukázali, že aktivácia kanabinoidných receptorov moduluje rôzne kroky tumorigenézy pri niekoľkých typoch rakoviny [ 9 , 10 ]. Je známe, že CBD downreguluje metastázy a replikáciu vo vysoko invazívnych bunkách inhibíciou expície ID-1gén [ 11 ]. Kanabidiol bol tiež navrhnutý ako induktor apoptózy a autofágie, dvoch mechanizmov podieľajúcich sa na znížení rastu rakovinových buniek [ 12 ]. Tieto správy naznačujú, že CBD má potenciálnu úlohu pri liečbe nádorov a chronických zápalových ochorení. Lepšie pochopenie bunkových a molekulárnych mechanizmov, ktoré sú základom aktivít CBD, je preto nevyhnutné pre jeho bezpečné podávanie pacientom, najmä ak je liečba predĺžená [ 8 , 13 ].

Naša súčasná práca bola zameraná na preskúmanie, či protizápalová aktivita CBD môže brániť a zvrátiť EMT indukovanú IL-1p, čo vedie k malignancii. Použili sme náš model invazívnych 6D buniek rakoviny prsníka [ 4 , 5 ]. Zistilo sa, že bunky 6D majú vysoké hladiny CBD receptora CB1. CBD naviazaný na CB1 sa internalizuje a uvoľňuje v cytoplazme. V tomto bode inaktivácia AKT pomocou CBD vedie k inhibícii jadrovej translokácie p-kaťenínu a downregulácii génov a proteínov identifikovaných ako markery malignity v aktivovanej EMT. Inaktivácia AKT pomocou CBD zvýšila expresiu  $\beta$ -kaťenínu a E-kadherínu a ich premiestnenie v bunkových kontaktoch, aby sa vytvorili adhézne spojenia a obnovil epitelový fenotyp.

## Výsledky

### 2.1. Životaschopnosť buniek ošetrovaných CBD súvisí s downreguláciou CB1

In vitro CBD protirakovinová aktivita sa uvádza ako selektívna pre agresívne rakovinové bunky v koncentráciách, ktoré neovplyvňujú normálne bunkové línie [ 12 ]. Pochopenie mechanizmov, ktoré sú základom jeho selektivity a jeho rôznych aktivít, sa stalo kritickým problémom pri jeho podávaní ako bezpečného paliatíva alebo adjuvans pri liečbe rakoviny. Ako prvý prístup k tejto štúdii bol vyhodnotený účinok CBD na životaschopnosť buniek v 6D modeli buniek rakoviny prsníka. postava 1A ukazuje, že pri 10 uM CBD bola životaschopnosť neinvazívnych buniek MCF-7, použitých ako kontrola vo všetkých experimentoch, približne 90 % a v bunkách 6D bola znížená na 69 %. Pri vyšších koncentráciách CBD sa životaschopnosť rýchlo znížila. Pri 20 uM bola životaschopnosť iba 25 % v oboch bunkových líniách. Preto sa pre našu štúdiu vybralo 10 uM CBD (IC<sub>50</sub> = 10,24 uM), pretože pri tejto koncentrácii bol štatisticky významný rozdiel v životaschopnosti medzi bunkami MCF-7 a 6D .postava 1B ukazuje údaje z troch nezávislých experimentov s použitím CBD a antagonistu CB1 AM251. Pri 100 nM nemal AM251 žiadny vplyv na životaschopnosť buniek. Keď bol AM251 pridaný pred CBD, životaschopnosť 6D buniek sa neznížila, čo naznačuje, že účinok CBD nastáva prostredníctvom interakcie s receptorom CB1.



Životaschopnosť buniek a expresia receptora CB1 v bunkách MCF-7 a 6D ošetrených CBD. ( A ) Krivka závislosti koncentrácie kanabidiolu podľa buniek po 48 hodinách liečby. Pri 10  $\mu\text{M}$  CBD bol rozdiel v životaschopnosti medzi dvoma typmi buniek štatisticky významný (box). ( B ) Bunková životaschopnosť buniek MCF-7 a 6D ošetrených v troch rôznych experimentálnych podmienkach: (1) bunky bez akéhokoľvek ošetrenia, (2) bunky ošetrené 10  $\mu\text{M}$  CBD, (3) bunky ošetrené 100 nM AM251 a (4) bunky ošetrené AM251 a potom CBD. Bunky MCF7 a 6D bez akéhokoľvek ošetrenia dostali v týchto experimentoch 100 % hodnoty životaschopnosti, údaje predstavujú tri nezávislé šarže buniek (biologické replikáty), každá sa skúmala v troch vyhotoveniach (replikácia testu,  $n = 9$ ). ( Cca ) Expresia génu CNR1 určená pomocou qRT-PCR v bunkách MCF-7 a 6D ošetrených alebo neošetrených CBD. ( Cb ) Reprezentatívny Western blot proteínu CB1 v troch typoch buniek a denzitometrická analýza hladín CB1. Hodnoty sa normalizovali na aktín ako kontrolu proteínovej záťaže a vyjadrili sa relatívne k hodnotám v bunkách MCF-7. Výsledky expresie mRNA a Western blotu predstavujú priemer troch nezávislých experimentov  $\pm$  SD ( $n = 3$ ). Hviezdičky označujú významnosť pri  $p < 0,05$ .

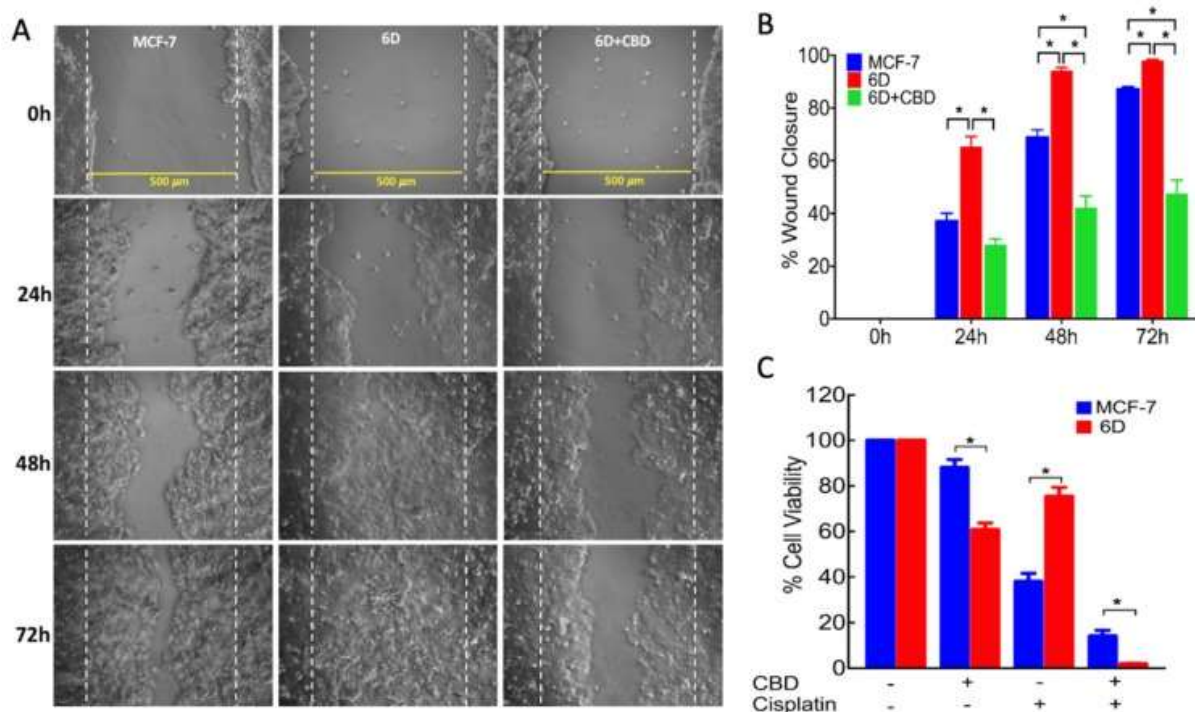
Vzhľadom na to, že rozdiel v životaschopnosti buniek MCF-7 a 6D by mohol súvisieť s odlišnou expresiou CB1, uskutočnila sa qRT-PCR, aby sa preskúmala expresia génu CNR1, ktorý kóduje tento receptor. postava 1Ca ukazuje nízku expresiu CNR1 v bunkách MCF-7, takmer 5-krát vyššiu expresiu v 6D bunkách, ale nevýznamný nárast v 6D bunkách ošetrených CBD. Tieto údaje ukázali, že v bunkách 6D bol CNR1 nadmerne exprimovaný v porovnaní s bunkami MCF-7. Preto CBD neregulovala transkripciu CNR1. postava 1Cb ukazuje reprezentatívny Western blot a denzitometrickú kvantifikáciu hladín CB1 v troch rôznych bunkových extraktach z buniek MCF-7 a 6D. Hladiny receptora v bunkách

6D boli 2-krát vyššie ako hladiny v bunkách MCF-7, zatiaľ čo CB1 v bunkách 6D ošetrených CBD sa znížili pod hladiny v bunkách MCF-7.

Tieto výsledky naznačujú, že CBD znižuje hladiny receptora CB1. Preto sme predpokladali, že 6D bunky po liečbe CBD by mali byť menej agresívne bunky.

## 2.2. CBD znižuje migráciu buniek a odolnosť voči cisplatinu v 6D bunkách

Na testovanie vyššie uvedeného očakávania sa analyzoval účinok CBD na agresívne vlastnosti, ako je migrácia a rezistencia na cisplatinu. V 6D bunkách ošetrených 10 uM CBD sa merala migrácia pomocou testu uzatvorenia rany. Reprezentatívne snímky z mikroskopu s fázovým kontrastom, získané z troch nezávislých testov, ukázali migráciu buniek cez 500 µm poranenú oblasť (obmedzenú prerušovanými čiarami) pri 0, 24, 48 a 72 hodinách v každom experimentálnom stave (Obrázok 2A). Obrázky ukazujú, že migrácia buniek v 6D bunkách ošetrených CBD bola pomalšia ako v 6D bunkách. Kvantifikácia percenta uzavretia rany v priebehu času je uvedená v Obrázok 2B. Po 48 hodinách pokryli bunky 6D 91,7 % plochy rany a bunky 6D ošetrené CBD iba 42,2 %. Po 72 hodinách bola oblasť rany na 100 % uzavretá bunkami 6D, zatiaľ čo bunky ošetrené CBD pokrývali iba 47,5 % oblasti poranenia. V tomto čase bolo uzavretie rany 6D buniek ošetrených CBD v porovnaní s tými, ktoré boli pozorované po 48 hodinách, iba 5,3%, čo ukazuje, že liečba CBD významne oneskorila migráciu buniek 6D.



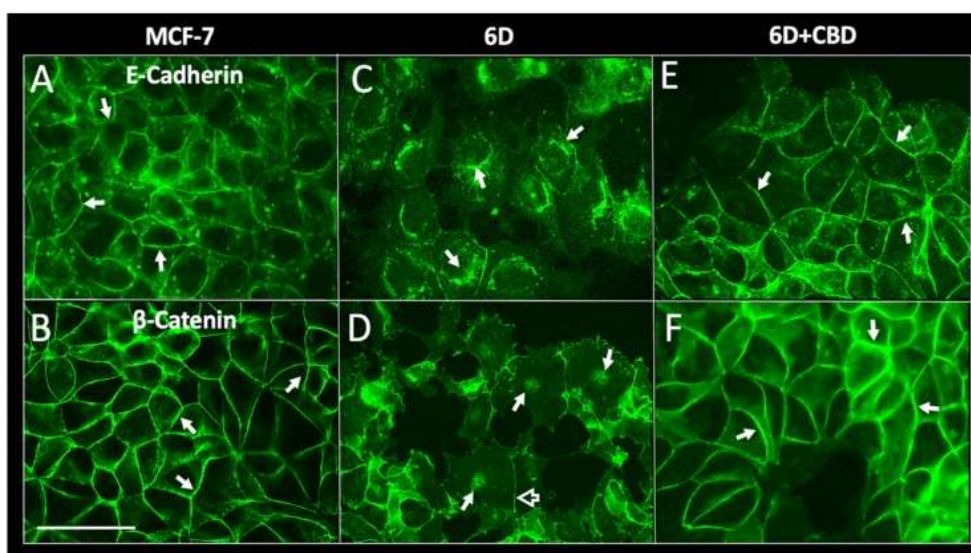
Testy bunkovej migrácie a životaschopnosti buniek. Bunky MCF-7 a 6D sa kultivovali do 90% konfluencie a poranili sa, aby sa získala čistá plocha 500 um ohraničená bodkovanými paralelnými čiarami. Po vytvorení rany bola sada 6D buniek ošetrená 10 uM CBD. ( A ) Uzavretie rany sa zaznamenávalo každých 24 hodín pomocou mikroskopie s fázovým kontrastom až do 72 hodín. ( B ) Percento uzavretia rany sa merala vo všetkých experimentálnych podmienkach analýzou obrazu a predstavuje priemer troch nezávislých dávok buniek (biologické replikáty), z ktorých každá bola skúmaná štvormo (replikácia testu, n = 12). ( C ) Rezistencia na 100 uM cisplatinu bola hodnotená

testami životaschopnosti buniek. Údaje z troch nezávislých experimentov sú prezentované ako percento životaschopných 6D buniek vzhľadom na kontrolné bunky MCF-7 ( n = 9). Hviezdičky označujú významnosť pri  $p < 0,05$ .

Ako ďalší agresívny znak sa určila odolnosť buniek voči protirakovinovému liečivu cisplatine. Obrázok 2C ukazuje, že bunky 6D po ošetrení CBD mali 60,5 % životaschopnosť a v prítomnosti cisplatinu vykazovali životaschopnosť 75 %, zatiaľ čo bunky predtým ošetrené CBD a potom cisplatinou vykazovali životaschopnosť 1,8 %. Nižšia životaschopnosť 6D buniek ošetrených CBD a cisplatinou je v súlade s tým, že CBD zvyšuje citlivosť buniek na liečivo. Bunky MCF-7 ako neinvazívny rakovinový typ vykazovali 88 % životaschopnosť v prítomnosti CBD a iba 38 % pri liečbe cisplatinou. Neočakávane, ak boli tieto bunky vopred ošetrené CBD, ich životaschopnosť v prítomnosti cisplatinu klesla na 24%. To naznačuje, že kombinácia týchto dvoch liečiv zvyšuje citlivosť buniek. Tieto výsledky spolu s vyššie uvedenými výsledkami ukázali, že dva znaky malignity prítomné v 6D bunkách boli znížené liečbou CBD.

### 2.3. CBD indukuje tvorbu adherenských spojov v 6D bunkách

Počas hľadania molekulárnych mechanizmov, ktorými by CBD mohlo spôsobiť zníženie bunkovej migrácie a rezistencie na cisplatinu v 6D bunkách, sme analyzovali morfológiu kontaktov bunka-bunka narušených v 6D bunkách IL-1 $\beta$  [ 3 ]. Obrázok 3 ukazuje imunofluorescenčné obrázky monovrstiev 6D buniek ošetrených MCF-7, 6D a CBD zafarbených špecifickými protilátkami proti E-kadherínu a  $\beta$ -katenínu, dvom proteínom, ktoré sú hlavnými zložkami adherenčných spojení [ 14 , 15 ]. E-kadherín je tiež markerom epitelového fenotypu, zatiaľ čo  $\beta$ -katenín okrem svojej štrukturálnej úlohy v membráne, keď je internalizovaný a transportovaný do jadra, reguluje expresiu niekoľkých génov zapojených do progresie EMT [ 4 , 5 ]. Obrázok 3A, B ukazujú, že konfluentná bunková monovrstva MCF-7 má jasne definované adhézne spojenia na bunkovej periférii, ktoré obsahujú E-kadherín a  $\beta$ -katenín. Naproti tomu Obrázok 3C, D ukazujú, že bunky 6D sú od seba oddelené a získali mezenchymálny fenotyp. E-kadherín je lokalizovaný v cytoplazme a  $\beta$ -katenín je translokovaný do jadier. Zvyšková frakcia proteínov zostáva v dezorganizovaných bunkových spojeniach. Keď boli bunky 6D ošetrené CBD (Obrázok 3E, F), E-kadherín bol pozorovaný v adhézných spojeniach rekonštituovanej monovrstvy.  $\beta$ -katenín už nie je lokalizovaný v jadrách, ale je akumulovaný v zhrubnutých bunkových kontaktoch. Tieto výsledky ukázali, že liečba CBD podporuje relokizáciu komplexu E-kadherín /  $\beta$ -katenín, aby sa obnovil epitelový fenotyp.

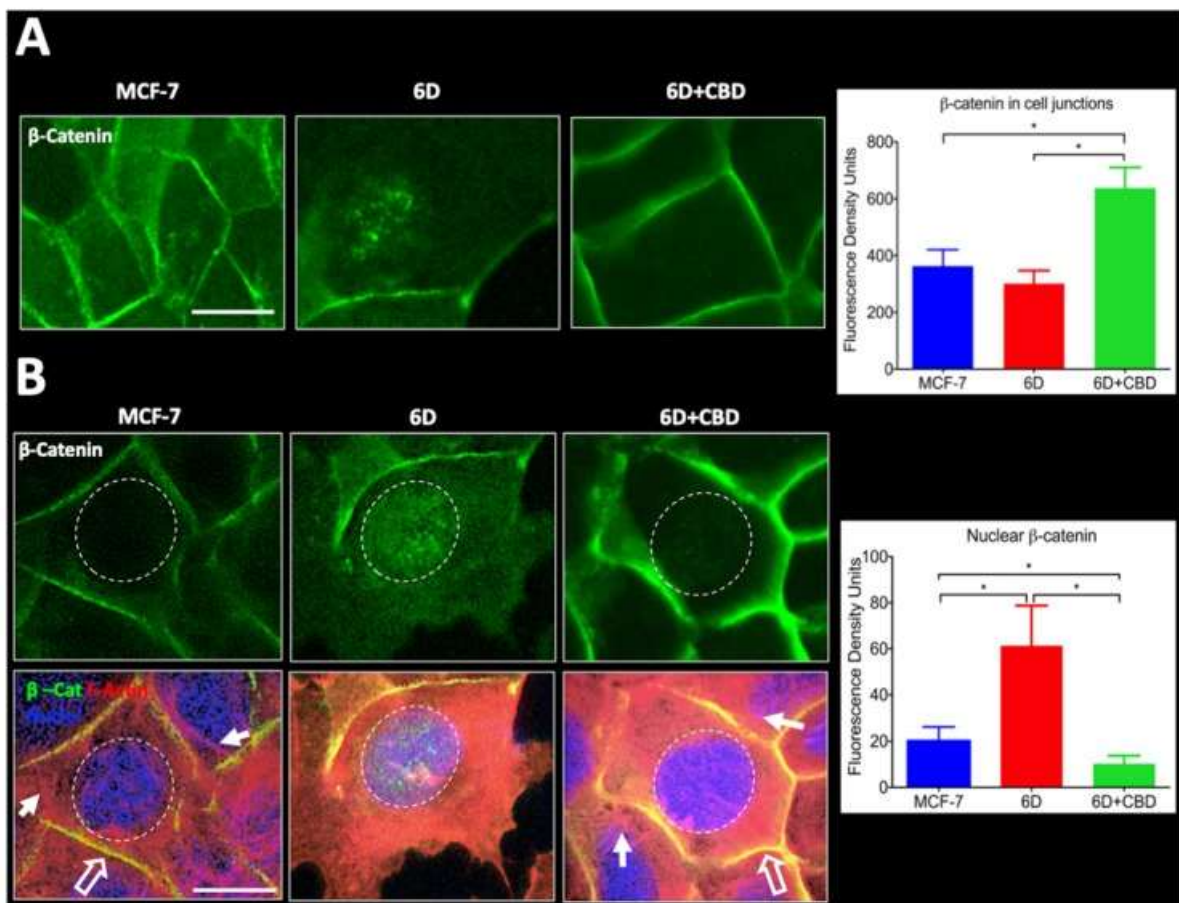




Imunolokalizácia adhézných spojovacích proteínov E-kadherín a  $\beta$ -katenín. Bunky MCF-7 a 6D ošetrené alebo neošetrené 10  $\mu$ M CBD boli kultivované 48 hodín, fixované a zafarbené špecifickými protilátkami proti E-kadherínu a  $\beta$ -katenínu. ( A ) E-kadherín je lokalizovaný na periférii buniek MCF-7. Adherens križovatky sú označené šípkami. ( B )  $\beta$ -katenín v bunkách MCF-7 je tiež lokalizovaný na medzibunkových spojeniach (šípky). ( C ) V 6D bunkách zafarbených na vizualizáciu E-kadherínu je proteín v cytoplazme a okolo jadier (šípky). ( D )  $\beta$ -katenín v dispergovanych 6D bunkách je lokalizovaný v jadrách (šípky) a slabý signál je stále viditeľný v zostávajúcich spojeniach (prázdna šípka). ( E ) 6D bunky ošetrené 10  $\mu$ M CBD vykazovali normálnu lokalizáciu E-kadherínu na periférii kontaktných buniek (šípky). ( F ) V 6D bunkách ošetrených CBD je  $\beta$ -katenín lokalizovaný a väčšinou zvýšený v rekonštituovaných adherentných spojeniach (šípky). Okrem toho  $\beta$ -katenín už nie je detegovaný v jadrách. Stĺpec = 50  $\mu$ m.

#### 2.4. Kvantifikácia $\beta$ -katenínu v bunkových spojeniach a jadrách v 6D bunkách ošetrených CBD

$\beta$ -katenín v 6D bunkách ošetrených a neošetrených CBD sa kvantifikoval v bunkových kontaktoch a v jadrách. Obrázok 4A ukazuje reprezentatívne obrázky buniek zafarbených  $\beta$ -katenínom. Uskutočnil sa profil hustoty fluorescencie cez bunkovú membránu buniek a kvantifikoval sa v 150 bunkách v šiestich náhodných poliach. Integrované hodnoty všetkých meraní sú zobrazené v grafe vpravo. Hodnoty ukázali, že  $\beta$ -katenín v bunkových kontaktoch buniek ošetrených CBD sa zvýšil 2-násobne v porovnaní s  $\beta$ -katenínom v 6D bunkách. Nižšie hladiny tohto proteínu v 6D bunkách možno vysvetliť tým, že je známe, že tento proteín je degradovaný, keď zostáva v cytoplazme.



Kvantifikácia hladín  $\beta$ -katenínu v bunkových spojeniach a jadrách. ( A ) Tri panely na obrázku ukazujú reprezentatívne obrázky odobraté z náhodne vybraných polí na meranie hladín fluorescenčnej hustoty

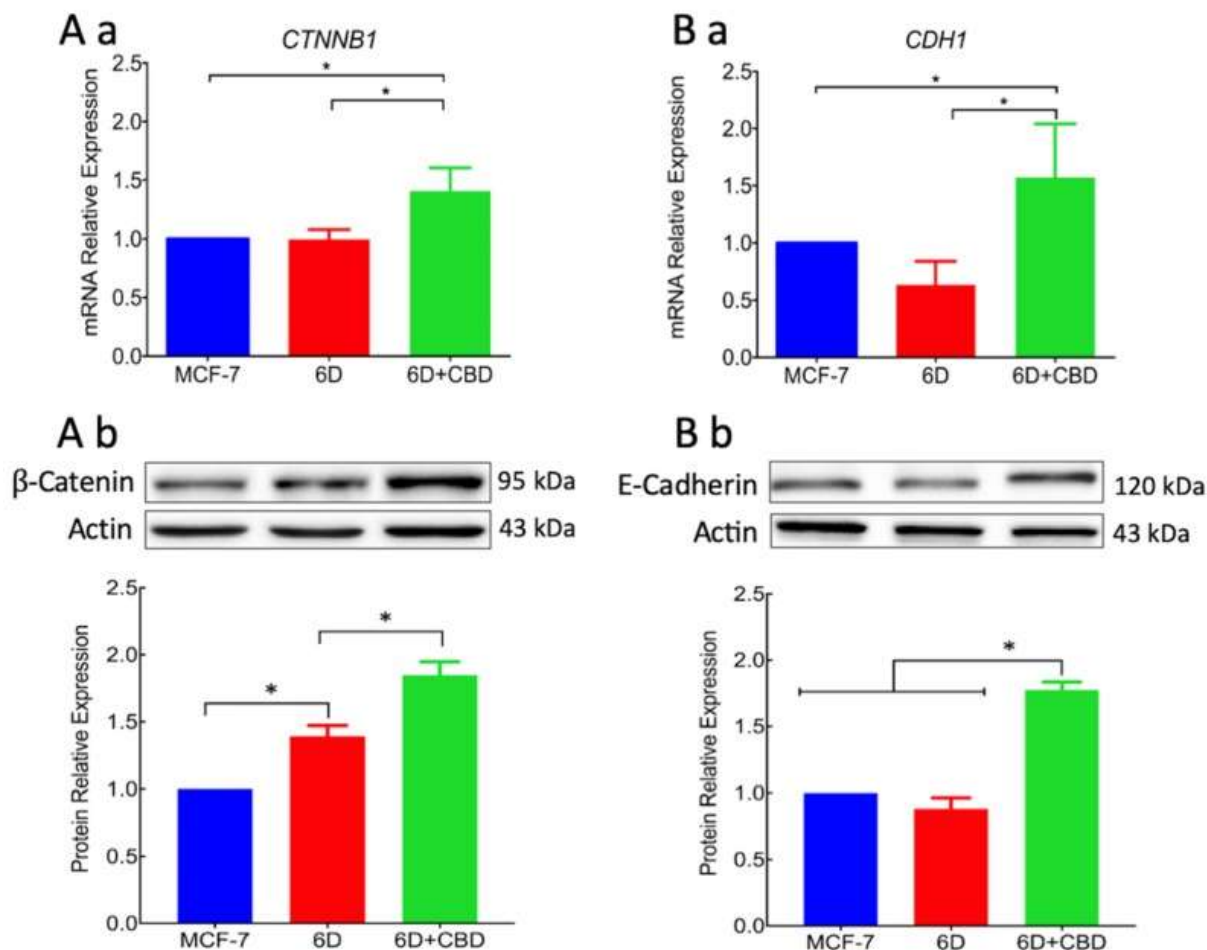
$\beta$ -katenínu v bunkových spojeniach buniek MCF-7 a 6D ošetrovaných alebo neošetrovaných CBD. Graf vpravo ukazuje získané jednotky hustoty fluorescencie. ( B) Horné panely zobrazujú obrázky buniek MCF-7 a 6D ošetrovaných alebo neošetrovaných CBD a zafarbených protilátkou proti  $\beta$ -katenínu na vizualizáciu a meranie proteínu v jadrách. Graf vpravo ukazuje získané hodnoty hustoty fluorescencie. Spodné panely zobrazujú bunky zafarbené faloidínom na vizualizáciu aktínových vlákien (červená), jadier (modrá) a  $\beta$ -katenínu (zelená). Graf v spodnej časti ukazuje získané hodnoty hladín jadrového  $\beta$ -katenínu. Výsledky jednotiek fluorescenčnej hustoty predstavujú priemer troch nezávislých dávok buniek (biologické replikáty,  $n = 3$ )  $\pm$  SD. Plné šípky označujú aktínové vlákna, prázdne šípky označujú kolokalizáciu aktínu a  $\beta$ -katenínu v bunkových spojeniach (žlté). Hviezdičky označujú významnosť pri  $p < 0,05$ . Stĺpec = 20  $\mu$ m.

In Obrázok 4B, horné panely ukazujú, že  $\beta$ -katenín sa nachádzal hlavne v jadrách 6D buniek, hoci v niektorých bunkách bol stále spojený so zvyškami dezorganizovaných bunkových kontaktov. Po ošetrovaní CBD bol  $\beta$ -katenín premiestnený do bunkových spojov a už sa nenachádzal v jadre. Na kvantifikáciu jadrového  $\beta$ -katenínu sa použilo modré fluorescenčné farbenie DNA DAPI (Obrázok 4B, spodné panely). Údaje z profilu intenzity fluorescencie získaného zo 150 buniek v šiestich rôznych poliach sú uvedené v grafe vpravo, čo naznačuje, že hladiny jadrového  $\beta$ -katenínu boli 3-krát vyššie v 6D bunkách ako v MCF-7 a výrazne znížené v 6D ošetrovaných CBD. bunky. Faloidínové kontrastné farbenie sa použilo na vizualizáciu distribúcie aktínových filamentov, pretože majú dôležitú úlohu pri zachovaní morfológie a polarite epitelových buniek. 6D bunky ošetrované CBD ukázali, že periférny kruh aktínu sa lokalizuje spolu s  $\beta$ -katenínom na adhézných spojeniach a stresových vláknach v cytoplazme. Tieto štruktúry nie sú prítomné v 6D bunkách, kde aktín difundoval v cytoplazme a do migračne vytvorených štruktúr.

## 2.5. CBD upregulované mRNA $\beta$ -katenínu a E-kadherínu a hladiny bielkovín

Keďže jadrová translokácia  $\beta$ -katenínu je kľúčovým faktorom v IL-1 $\beta$ -indukovanej EMT, regulácia génov a proteínov, ktoré sa podieľajú na prechode, sa analyzovala v prítomnosti alebo neprítomnosti CBD. Kvantitatívna RT-PCR génov CTNNB1 a CDH1, ktoré kódujú  $\beta$ -katenín a E-kadherín, v uvedenom poradí, ukázala, že v bunkách 6D ošetrovaných CBD bola transkripcia týchto dvoch génov upregulovaná v porovnaní s transkripciou v 6D a v kontrolnej MCF-7 buniek (Obrázok 5Aa, Ba). Western bloty ukázali, že hladiny  $\beta$ -katenínu boli zvýšené v bunkových extraktach buniek 6D v porovnaní s hladinami v MCF-7 a ešte viac v bunkách ošetrovaných CBD (Obrázok 5Ab).Obrázok 5Bb ukazuje, že E-kadherín sa zvýšil iba vtedy, keď boli bunky 6D ošetrované CBD. Densitometrická analýza z troch nezávislých bunkových extraktov ukázala nízky obsah  $\beta$ -katenínu v MCF-7 bunkách, v 6D bunkách bol  $\beta$ -katenín nadmerne exprimovaný 0,5-krát a v 6D bunkách ošetrovaných CBD sa expresia zvýšila 2-násobne. E-kadherín v 6D bunkách bol pod základnými hladinami v kontrolných bunkách, ale bol zvýšený 0,5-krát v bunkách ošetrovaných CBD (Obrázok 5Ab, Bb). Tieto výsledky ukázali, že CBD upreguluje génovú expresiu a proteínové hladiny štrukturálnych komponentov adhérenských spojení. Zvýšené hladiny E-kadherínu a  $\beta$ -katenínu prostredníctvom CBD a ich akumulácia v medzibunkových spojeniach umožní obnovenie epitelovej architektúry.

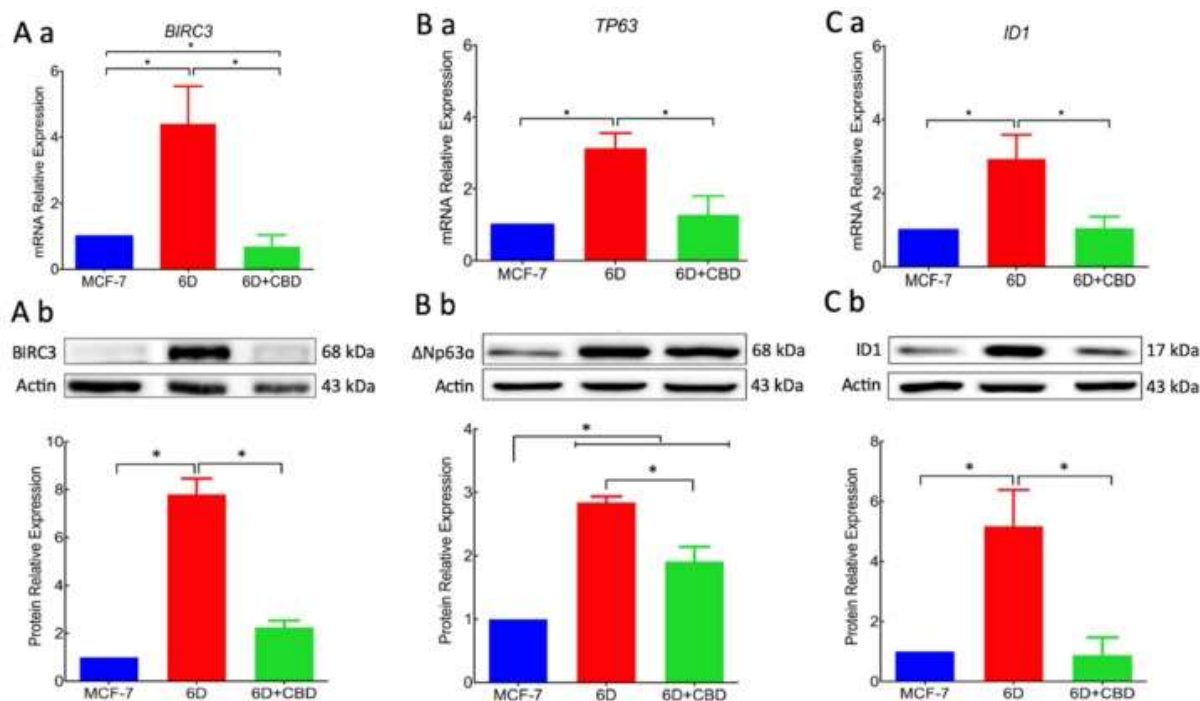




CBD zvýšilo hladiny adherentných spojovacích proteínov. ( Aa ) Expresia génu *CTNNB1* , ktorý kóduje  $\beta$ -katenín, bola stanovená v 6D bunkách ošetrovaných MCF-7, 6D a CBD pomocou qRT-PCR a získané hodnoty boli normalizované na hladiny expície génu *RPLP0*. ( Ab ) Western blot  $\beta$ -katenínu v troch typoch buniek uvedených vyššie. ( Ba ) relatívne hladiny expície mRNA génu *CDH1* , ktorý kóduje E-kadherín v bunkách neošetrovaných a ošetrovaných CBD. ( Bb ) Reprezentatívny Western blot hladín E-kadherínu v troch typoch buniek a denzitometrické hodnoty hladín E-kadherínu. Hodnoty boli normalizované na aktín a vyjadrené relatívne k hodnotám získaným v bunkách MCF7. Expresia mRNA a výsledky Western blotu predstavujú priemer troch nezávislých dávok buniek (biologické replikáty,  $n = 3$ )  $\pm$  SD. Hviezdičky označujú  $p < 0,05$ .

## 2.6. CBD znížilo expresiu proteínov súvisiacich so signálnou dráhou IL-1p

Keďže vyššie uvedené údaje odhalili, že pridanie CBD k 6D bunkám spôsobilo morfológické a molekulárne zmeny opísané v IL-1 $\beta$ -indukovanej EMT, skúmali sme, či CBD môže mať negatívny vplyv na expresiu génov a proteínov, ktoré sa podieľajú na tomto procese [ 16 17 ] . Preto sa vykonala analýza qRT-PCR pre gény *BIRC3*, *TP63* a *ID1* .Obrázok 6Aa ukazuje, že *BIRC3*, ktorý už bol nadmerne exprimovaný 5-krát v 6D bunkách, sa znížil na menej ako 1-násobok, keď boli bunky ošetrované CBD. Expresia *TP63* sa tiež zvýšila v 6D bunkách (3-násobne) a znížila sa na hladiny mRNA MCF-7, keď sa liečila CBD (Obrázok 6Ba).



CBD modifikovala nadmernú expresiu efektorových proteínov v smere dráhy v IL-1p-indukovanej dráhe. ( Aa ) Relatívne úrovne expresie mRNA génu *BIRC3* , ktorý kóduje proteín *BIRC3* , boli stanovené v bunkách MCF-7 a 6D bunkách ošetrovaných alebo neošetrovaných CBD. Údaje o expresii mRNA vo všetkých prípadoch boli normalizované na expresiu génu *RPLPO* . ( Ab ) Reprezentatívny Western blot *BIRC3* v troch typoch buniek uvedených vyššie. Denzitometrické hodnoty zodpovedajúce hladinám *BIRC3* boli normalizované na aktín a vyjadrené relatívne k hodnotám v bunkách MCF-7. ( Ba ) mRNA relatívna expresia génu *TP63* a izoformy  $\Delta$ NP63 $\alpha$  ( Bb ). ( Cca ) mRNA relatívne hladiny expresie génu *ID1* a proteínu *ID1* ( Cb ). Reprezentatívny Western blot hladín *ID1* v bunkách. Expresia mRNA a výsledky Western blotu predstavujú priemer troch nezávislých dávok buniek (biologické replikáty, n = 3)  $\pm$  SD. Hviezdičky označujú p < 0,05.

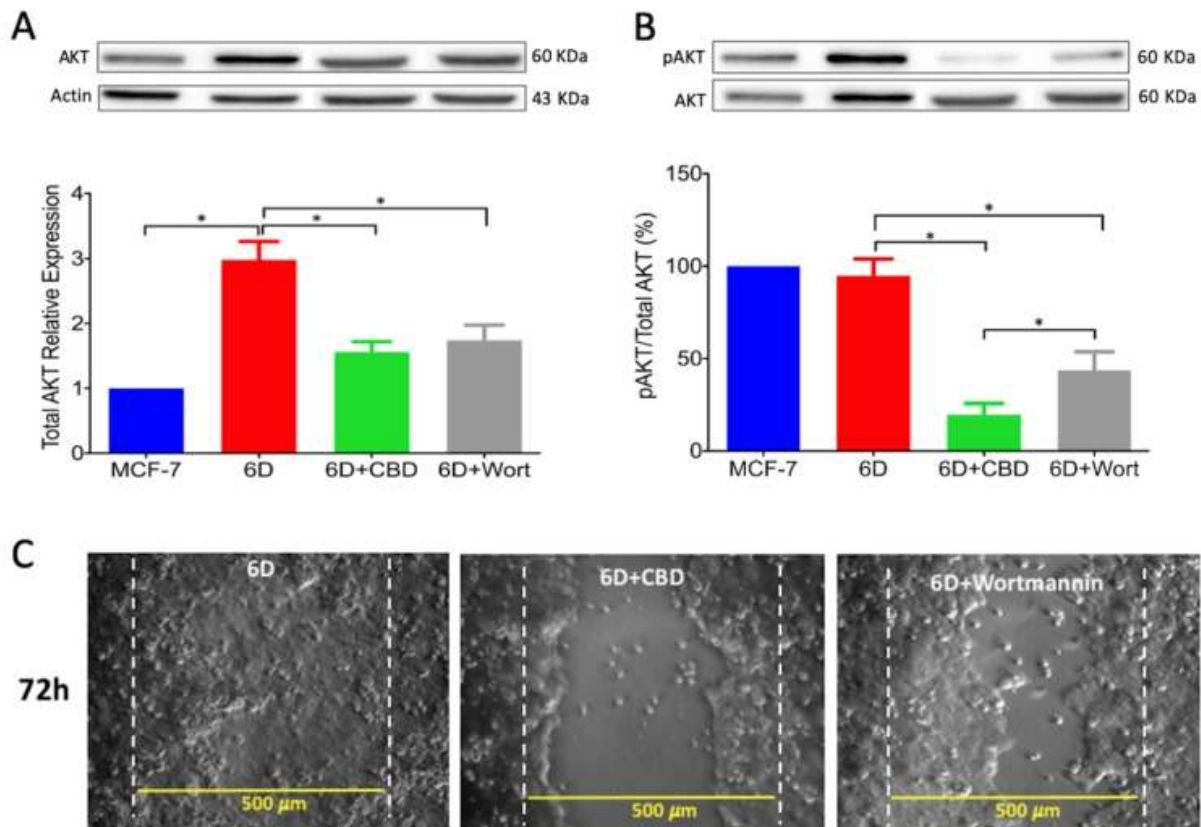
Okrem toho sa hodnotila expresia génu *ID1* kvôli jej asociácii s progresiou rakoviny v niekoľkých bunkových modeloch [ 11 ]. Prvýkrát tu uvádzame, že nadmerná expresia *ID1* je indukovaná stimuláciou IL-1 p. Jeho expresia mRNA bola zvýšená 3-násobne v 6D bunkách a znížená ošetrovaním CBD na úroveň buniek MCF-7 (Obrázok 6Ca). Rovnaký účinok sa ukázal na hladinách proteínov, pretože bunky 6D nadmerne exprimovali *BIRC3* 8-krát,  $\Delta$ NP63 $\alpha$  3-krát a *ID1* 5-krát. V 6D bunkách ošetrovaných CBD boli hladiny *BIRC3* a *ID1* znížené na úrovne v bunkách MCF-7 a  $\Delta$ NP63 $\alpha$  sa znížil o 33 % v porovnaní s hladinami v 6D bunkách (Obrázok 6Ab, Bb, Cb).

Tieto výsledky ukázali, že nadmerná expresia génov a proteínov, ktoré sú efektormi v signálnych dráhach aktivovaných IL-1p, bola znížená prostredníctvom CBD.

## 2.7. CBD inaktívovaný Akt a blokovaná migrácia buniek

Rozhodujúcim krokom v IL-1 $\beta$ -indukovaných signálnych dráhach, ktoré vedú k EMT a iným dráham zapojeným do progresie rakoviny, je zvýšená fosforylácia AKT(ser 473), zložky proteínového komplexu PI3K/AKT [ 5 , 18 ]. Keďže sa ukázalo, že liečba kanabinoidmi znížila fosforyláciu AKT v rôznych modeloch rakoviny [ 12 , 19 , 20 ], skúmali sme, či zníženie celkového AKT CBD, ako aj jeho aktivácia,

môže súvisieť s progresiou IL-1 $\beta$  EMT. Obrázok 7A ukazuje reprezentatívny Western blot celkového AKT v bunkách MCF-7 a 6D ošetrovaných alebo neošetrovaných CBD. Celkové hladiny AKT boli 3-krát vyššie v 6D ako v bunkách MCF-7. CBD a wortmannín znížili hladiny celkového AKT na polovicu hladín nájdených v 6D bunkách. Obrázok 7B ukazuje pomer AKT<sub>Ser473</sub> k AKT (pAKT/AKT). Pridanie CBD k 6D bunkám spôsobilo zníženie pomeru pAKT/AKT o 80 % a pridanie wortmannínu spôsobilo 50 % zníženie. Aby sa potvrdilo, že inaktivácia fosforylácie AKT týmito zlúčeninami môže inhibovať vysokú migračnú schopnosť buniek 6D, uskutočnil sa test hojenia rán. Mikroskopické snímky migrujúcich buniek ukázali, že aj po dlhých časoch mali bunky ošetrované CBD a wortmannínom nižšiu schopnosť migrovať a uzavrieť ranu. Po 72 hodinách 6D bunky uzavreli 100 % poranenej oblasti, zatiaľ čo bunky ošetrované CBD alebo wortmannínom to nedokázali (Obrázok 7C).



CBD znížilo expresiu a aktiváciu AKT, čím blokovalo migráciu buniek. ( A ) Reprezentatívny Western blot AKT v MCF-7 a 6D ošetrovaných alebo neošetrovaných CBD a 6D bunkách ošetrovaných 100  $\mu$ M wortmannínom. Denzitometrické hodnoty zodpovedajú celkovej AKT získanej z troch nezávislých experimentov (  $n = 3$  )  $\pm$  SD. Všetky hodnoty boli normalizované na aktín a vyjadrené relatívne k hodnotám v bunkách MCF7. Hviezdičky označujú  $p < 0,05$ . ( B ) Reprezentatívny Western blot pAKT(Ser473) za podmienok uvedených vyššie. Percento fosforylácie AKT vyjadrené ako pomer pAKT/AKT. ( C ) Na ilustráciu účinku wortmannínovej inhibície fosforylácie AKT pri migrácii buniek sa uskutočnili testy hojenia rán s bunkami 6D, CBD a wortmannínom. Percento uzavretia rany sa vypočítalo tak, ako sa to urobilo v Obrázok 2. Hviezdičky označujú  $p < 0,05$ .

## Diskusia

Štúdie in vitro a in vivo ukázali, že funkcie CBD sa líšia pri každom type rakoviny a závisia od expresie kanabinoidných receptorov spojených s rôznymi signálnymi dráhami [ 13 ]. U agresívnych bunkových línií rakoviny prsníka, ako je MDA-MB-231, CaCo2 bunky hrubého čreva a pľúcne tkanivo A549, sa uvádza, že majú veľkú citlivosť na CBD, zatiaľ čo neinvazívne bunky nie sú ovplyvnené [ 12 , 21]. Táto práca je zameraná na blokovanie CBD a reverziu bunkových a molekulárnych mechanizmov indukovaných IL-1p, ktoré transformovali neinvazívne bunky na invazívny fenotyp. V invazívnych 6D bunkách sa zistilo významné zvýšenie expresie receptora CB1, zatiaľ čo v neinvazívnych kontrolných bunkách MCF-7 bol exprimovaný v nízkych hladinách. Tento stav by mohol vysvetliť vyššiu citlivosť 6D buniek na liečbu CBD, ako je znázornené vpostava 1. Špecifickosť väzby CBD na CB1 bola stanovená s použitím agonistu AM251. Predchádzajúca liečba 6D buniek agonistom a potom CBD zvýšila životaschopnosť buniek, čo naznačuje závislosť životaschopnosti od hladín receptora. Analýza expresie CB1mRNA ukázala, že CBD nemalo žiadny vplyv na transkripciu génu CNR1, ale výrazne znížilo hladiny receptora, migráciu buniek a rezistenciu na cisplatinu. K negatívnej regulácii hladín CB1 pomocou CBD môže dôjsť internalizáciou komplexu CB1/CBD a recykláciou CB1 do rôznych bunkových dráh. V centrálnom nervovom systéme sa uvádza, že komplex CB1/CBD je internalizovaný a degradovaný a tiež, že de novo syntetizovaný receptor je nasmerovaný na bunkový povrch [ 22 , 23]. Bunky ošetrené CBD stratili takmer 50 % svojich receptorov CB1 a dôležité znaky malignity; preto by sa dalo očakávať, že pôjde o menej agresívne bunky.

Aby došlo k migrácii, musí dôjsť k strate bunkových kontaktov a dezorganizácii aktínového cytoskeletu, ktorý zachováva architektúru epitelu. Zistili sme, že CBD upregulovalo hladiny mRNA E-kadherínu a p-katenínu a proteíny obnovili svoju lokalizáciu na adhézných spojeniach. Tieto procesy uprednostňovali obnovu bunkových kontaktov a epiteliálnej morfológie, čím blokovali migráciu buniek.

Ďalej tu uvádzame, že CBD je inhibítorom jadrovej translokácie  $\beta$ -katenínu. Už sme predtým ukázali, že endokanabinoidný anandamid blokuje vstup  $\beta$ -katenínu do jadra indukovaný IL-1 p počas EMT. Degradácia cytoplazmatického  $\beta$ -katenínu inhibovala expresiu génov súvisiacich s malignitou [ 5 ]. V oboch prípadoch dva kanabinoidy blokovali jadrovú translokáciu. Avšak anandamidom indukovaná degradácia cytoplazmatického  $\beta$ -katenínu, zatiaľ čo CBD premiestňovala  $\beta$ -katenín na adhézne spojenia. V oboch prípadoch bola expresia malígnych markerov v 6D bunkách značne znížená [ 5 , 16 , 17 ]. V tejto práci sme analyzovali expresiu dvoch génov, BIRC3 a TP63, ktorého expresia bola zvýšená aktiváciou IL-1p/IL-1R/p-katenínovej dráhy. Nadmerná expresia proteínov BIRC3 a  $\Delta$ Np63 $\alpha$ , dvoch dôležitých efektorov v dráhach, ktoré regulujú rezistenciu na doxorubicín a cisplatinu, bola významne znížená pomocou CBD. Znížená regulácia rezistencie na cisplatinu pomocou CBD vysvetľuje získanú citlivosť na lieky 6D bunkami. Všetky tieto aktivity CBD podporujú jeho úlohu ako inhibítora IL-1 $\beta$ /IL-1R/ $\beta$ -katenínovej dráhy a možného induktora mezenchymálnej reverzie na epiteliálny fenotyp (citlivý na liečivo).

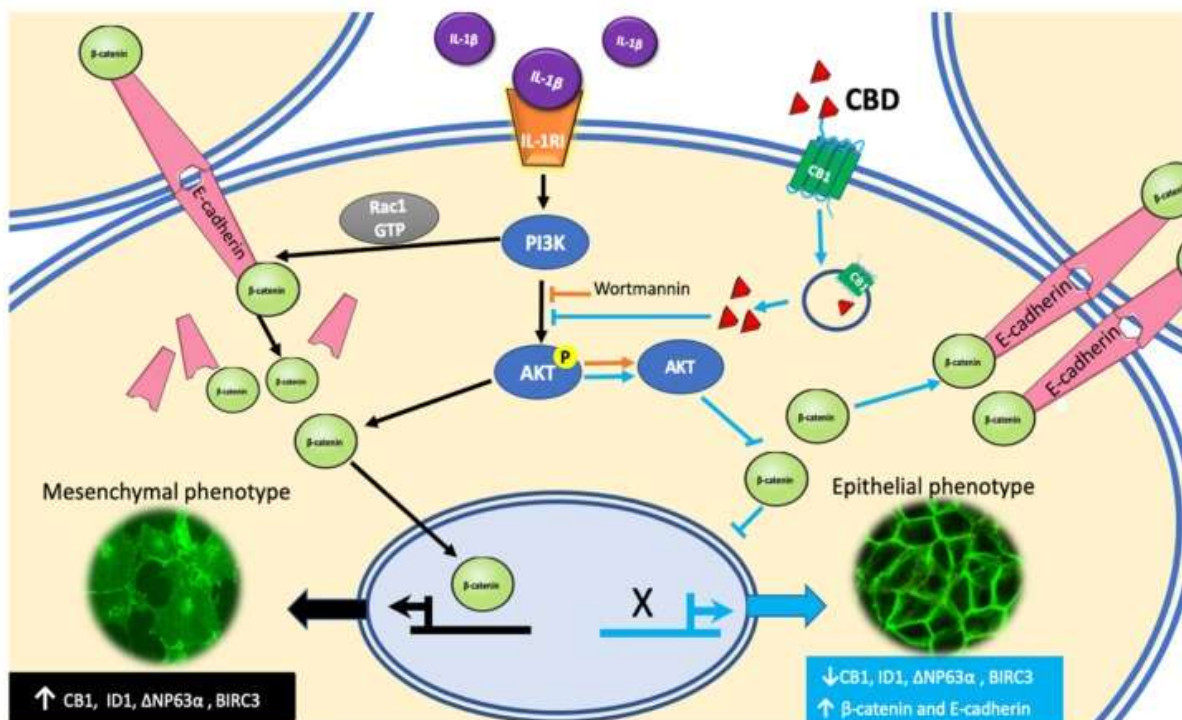
Okrem toho tu poskytujeme prvý dôkaz, že gén ID1 a proteín ID1 sú nadmerne exprimované v 6D bunkách stimulovaných IL-1p. Nemôžeme však dospieť k záveru, že k expresii proteínu dochádza cestou IL-1p/IL-1R/p-katenínu. ID1 proteín bol opísaný v aktívne proliferujúcich bunkách a bol identifikovaný u viac ako 20 tumorigénnych typov rakoviny [ 24 ]. Významné zníženie expresie ID1 a iných proteínových markerov malignity prostredníctvom CBD podporuje našu hypotézu, že CBD má

úlohu pri reverzii malígneho fenotypu. Bolo publikované, že nadmerná expresia ID1 v pokročilých bunkách nádoru močového mechúra je spojená s expresiou mezenchymálnych markerov, a keď je downregulovaná ID-1si-RNA, bunky exprimujú epiteliálne markery [ 25].

Aktivácia AKT je kľúčovým krokom v IL-1p-indukovanej EMT, ktorá reguluje downstream progresiu IL-1p/IL-1R/p-katenínovej dráhy. Súčasný výsledok ukázal, že CBD prostredníctvom downregulácie fosforylácie AKT inhibovalo downstream aktivitu IL-1p dráhy a expresiu malígnych markerov, ako je migrácia a lieková rezistencia. Keď sa k 6D bunkám pridal wortmannín, špecifický inhibítor fosforylácie AKT, tieto vykazovali zníženú migráciu na úrovne podobné tým v bunkách ošetrených CBD. V štúdiu in silico sa nedávno ukázalo, že CBD sa viaže na aktívne miesto PI3K a AKT [ 26 ]. V dôsledku inaktívácie AKT pomocou CBD, kľúčového bodu pre presluchy v dráhach indukovaných IL-1p a CBD, by 6D bunky mohli prejsť reverziou na epiteliálny fenotyp.

Kyslý prekursor CBD (kyselina kanabidiolová, CBDA) bol schopný inhibovať migráciu buniek rakoviny prsníka a downregulovať protoonkogén c-fos a cyklooxygenázu-2 (COX-2), čo poukazuje na možnosť, že CBDA môže pôsobiť na spoločnej dráhe zápalových a rakovinových mechanizmov [ 27 ]. Tu sme prvýkrát demonštrovali túto súvislosť medzi CBD a zápalovou dráhou IL-1p/IL-1R/p-katenínu prostredníctvom aktivácie CB1.

Diagramový model našich výsledkov a hypotézy o indukcii reverzie fenotypu CBD je uvedený v Obrázok 8.



CBD blokuje dráhu IL-1p/IL-1RI/p-katenínu a indukuje epiteliálny fenotyp. Hypotetický model blokády CBD IL-1p-aktivovanej signálnej dráhy, ktorá vedie k malígnemu fenotypu, predstavuje čierna dráha. Vázba CBD na svoj receptor CB1 indukuje aktiváciu AKT a blokuje translokáciu β-katenínu do jadra. CBD

tiež znižuje expresiu malígnych markerov, ako je izoforma  $\Delta$ NP63 $\alpha$ , BIRC3 a ID1 ( modrá dráha ). CBD zvýšilo epiteliálny marker E-kadherín a s ním spojený  $\beta$ -katenín v adhéznom spojení, čo vedie k bunkám s epiteliálnym fenotypom.

Predpokladalo sa, že preprogramovanie buniek závisí hlavne od genetického programu; ukázalo sa však, že nadmerná expresia E-kadherínu nahrádza prítomnosť génu Oct4 , ktorý je považovaný za kľúčového účastníka procesu. Bolo identifikovaných množstvo faktorov, ktoré inhibujú alebo podporujú preprogramovanie prostredníctvom rozpoznávania molekulárnych programov zahŕňajúcich PI3K/AKT a Wnt/ $\beta$ -katenín [ 28]. Tieto procesy sme pozorovali in vitro, keď boli neinvazívne bunky rakoviny prsníka MCF-7 ošetrené IL-1 p, čo vyvolalo program EMT, ktorý zmenil bunky na agresívny mezenchymálny fenotyp. Naše súčasné údaje ukázali, že CBD by mohol byť induktorom mezenchymálno-epiteliálneho prechodu, ktorý by premenil 6D bunky na neinvazívny fenotyp. Táto schopnosť CBD môže byť veľmi užitočná pri liečbe rakoviny, pretože malígne bunky liečené CBD sa stanú citlivými na konvenčnú liečbu rakoviny.

Doplnkové materiály Obrázok S1 ukazuje predbežné výsledky získané s modelom in vivo s použitím samíc myší nu/nu. Keď boli 6D bunky injikované subkutánne do pravého boku tela, po 40 dňoch sa vyvinuli nádory s priemerom približne 8 mm. CBD, injikované v tom čase priamo do nádoru, znížilo veľkosť nádoru na 50 % po 72 dňoch. Tieto údaje ukazujú, že CBD má potenciál pôsobiť ako protinádorové liečivo.

## **Materiály a metódy**

### **4.1. Činidlá**

RH-Oil5™ obsahujúci koncentráciu 23,36 mg/ml purifikovaného CBD bol získaný od (HempMeds™, Monterrey, NL, Mexiko). 1000 uM zásobný roztok sa pripravil zriedením v DMSO. Alikvóty z tejto zásoby sa odobrali na získanie koncentrácií CBD, aby sa vytvorila krivka dávka-odozva. Ako vehikulum sa použil kokosový olej (do TERRA™ Pleasant Grove, UT, USA) s konečnou koncentráciou 0,01 %. Wortmannín (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) bol použitý v koncentrácii 250 nM a cisplatina (CDDP, PISA™ Pharmaceuticals, Guadalajara, Mexiko) bola použitá v koncentrácii 100  $\mu$ M. Obidve zlúčeniny sa použili, ako už bolo uvedené v 6D bunkách [ 3 , 17 ]. AM251 (Sigma-Aldrich, St. Missouri, MO, USA) sa použil pri 100 nM ako antagonist receptoru CB1.

### **4.2. Primárne protilátky**

Použité ľudské protilátky boli anti- $\Delta$ Np63a, anti-CB1, anti-clAP2/BIRC3 a anti-ID1 (GeneTex, Irvine, CA, USA). Anti-AKT a anti-Phospho-AKT-Ser473 (Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA); anti-E-kadherín (BD; Baltimore, MD, USA); anti- $\beta$ -katenín (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA).

### **4.3. Bunková kultúra**

Bunky MCF-7 boli získané od (ATCC, Manasas, VA, USA). Ako bunkový model boli použité bunky 6D, klon vybraný z neinvazívnych buniek MCF-7, ktorý vysoko reagoval na stimul IL-1p a transformáciu na malignitu prostredníctvom IL-1p-indukovanej EMT [ 4 , 5 ]. Všetky bunky sa kultivovali v médiu DMEM-F12 doplnenom 10% fetálnym bovinným sérom (FBS), penicilínom (5000 U/ml) a streptomycínom (5000 ug/ml) od Gibco BRL (Grand Island, NY, USA). Kultúry sa inkubovali pri 37 °C s 5 % CO<sub>2</sub> . Pred



vykonaním experimentov s CBD sa bunky 6D inkubovali s 20 ng/ml ľudského rekombinantného IL-1p počas 48 hodín (na zosilnenie ich reakcie na stimul IL-1p) a potom sa opláchlili a kultivovali s bežným médiom (PeproTech, Rocky Hill, NJ, USA).

#### 4.4. Testy bunkovej životaschopnosti v prítomnosti CBD

Bunky MCF7 a 6D (2 × 10<sup>4</sup> bunky/jamka) kultivované v 96-jamkových doštičkách počas 48 hodín, ako je uvedené vyššie, sa preniesli do kultivačného média doplneného iba 1% FBS počas 18 hodín a potom sa rozdelili do dvoch skupín: (1) bunky ošetrované CBD v konečných koncentráciách 5, 10, 15 a 20 μM; a (2) bunky ošetrované kokosovým olejom (vehikulum) v konečnej koncentrácii 0,01 %. Po 48 hodinách sa do každej jamky pridalo 10 μl roztoku WST-1 (Roche Applied Science, Mannheim, Nemecko) a po 2 hodinách sa merala optická hustota, ktorá je výsledkom redukcie tetrazóliovej soli v roztoku životaschopnými bunkami. pri 450 nm v čítačke mikrodostičiek (Sunrise™, Tecan, Švajčiarsko). Životaschopnosť buniek MCF-7, použitých ako kontrola neinvazívnosti, a 6D buniek kultivovaných v médiu s iba 1% FBS v neprítomnosti CBD boli dané 100% hodnotami. Ak chcete analyzovať údaje o životaschopnosti, n = 9).

#### 4.5. Antagonista CB1 receptora

Špecifický antagonista CB1 receptora AM251 bol použitý v konečnej koncentrácii 100 nM [9]. AM251 sa pridalo k bunkovým kultúram pred pridaním CBD a potom sa bunky kultivovali 48 hodín, ako je uvedené vyššie.

#### 4.6. Rezistencia na cisplatinu

Päťdesiat tisíc buniek (MCF-7 alebo 6D) na jamku sa naočkovalo do 96-jamkových kultivačných platní a inkubovalo sa 24 hodín, potom sa prešlo na médium s iba 1 % FBS na 18 hodín. Potom boli bunky ošetrované rôznymi podmienkami: (1) bunky so 100 μM cisplatinou; (2) bunky s 10 μM CBD; (3) bunky s 10 μM CBD a 100 μM cisplatinou; (4) bunky inkubované iba v 1 % FBS kultivačnom médiu. Všetky bunky sa inkubovali 48 hodín pri 37 °C. Na kvantifikáciu životaschopnosti buniek pre každý stav sa použil test WST-1 opísaný vyššie.

#### 4.7. Test hojenia rán

Migračná schopnosť buniek bola určená testom hojenia rán prispôbeným od Shi a spolupracovníkov [29]. Rodičovské bunky MCF-7 a 6D boli pestované v 24-jamkových miskách, aby sa dosiahlo 90% konfluencie v normálnom kultivačnom médiu. Potom sa médium vymenilo tak, aby obsahovalo iba 1 % FBS a bunky sa kultivovali 18 hodín. Monovrstvy boli poranené v konfluentnej zóne poškrábaním buniek sterilizovanou špičkou 10 μl pipety, aby sa získala čistá oblasť šírky 500 μm. Zranené monovrstvy sa premyli 1 x PBS, aby sa odstránili zvyšky, a inkubovali sa v 1 % kultivačnom médiu FBS v prítomnosti alebo neprítomnosti 20 ng/ml IL-1 p, 10 μM CBD alebo 250 μM wortmannínu počas 1 hodiny. Po tomto čase sa migrácia buniek zaregistrovala po 0, 24, 48 a 72 hodinách pomocou objektívu s fázovým kontrastom v inverznom mikroskope Olympus. Bunky vyčnievajúce z okrajov rany a bunky, ktoré migrovali do poranenej oblasti, sa kvantitatívne vyhodnotili obrazovou analýzou pomocou softvéru Image-Pro Plus. n = 12).

#### 4.8. Génová expresia a kvantitatívna PCR v reálnom čase (qRT-PCR)

Celková RNA bola extrahovaná z buniek pomocou činidla Trizol™ (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) podľa odporúčaní výrobcu. Integrita zložiek celkovej RNA bola hodnotená elektroforézou v 2% agarózových géloch. Výťažok nukleovej kyseliny, kvantifikácia a čistota (pomer 260/280 nm) sa analyzovali použitím Nanodrop 2000, Microvolume UV-visible spectrophotometer (Thermo-Scientific, Wilmington, DE, USA). Vzorky sa skladovali pri -20 °C.

Syntéza cDNA sa uskutočnila podľa protokolu reverznej transkripcie s vysokou kapacitou cDNA (Applied Biosystems, CA USA) s použitím 500 ng celkovej RNA. Reakcie obsahovali 2 ul 10x RT tlmivého roztoku, 0,8 ul 25x dNTPs zmesi (100 mM), 2 ul 10x náhodnej sady primérov, 50 U Multi-Scribe reverznej transkriptázy a vody bez nukleázy na objem 10 ul. Tabuľka S1 ukazuje sekvencie primérov vybraných génov [ 5 , 30] a podmienky qRT-PCR. Každý pár primérov pre cieľový gén bol navrhnutý na základe sekvenčných údajov získaných z GenBank. Real-time PCR sa uskutočnila s použitím Luminaris color HiGreen qPCR master mix (Thermo Fisher Scientific) v systéme Step One Real-Time PCR (Thermo Fisher Scientific) podľa protokolu výrobcu. qPCR obsahovali 0,3 uM každého páru primérov RT-PCR, 5 ul 2x Master mix, 1 ug cDNA a vodu bez nukleázy do konečného objemu 10 ul. Podmienky tepelného cyklovania boli nasledujúce: 1 cyklus pri 50 °C počas 2 minút, 1 cyklus pri 95 °C počas 10 minút, 40 cyklov pri 95 °C počas 15 s, 60 °C počas 30 s a 72 °C počas 30 s. Z každého stavu boli analyzované tri vzorky cDNA. Údaje sa normalizovali pomocou RPLP0housekeeping gen. Kvantifikácia expresie génu a relatívna expresia sa vypočítali pomocou analýzy kvantitatívnych údajov RT-qPCR ( $\Delta Rn$ ) pomocou softvéru LinRegPCR (ver. 11.0, Academic Medical Centre, University of Amsterdam, Amsterdam, Holandsko).

#### 4.9. SDS-PAGE a Western blotting

Proteínové extrakty sa získali z bunkových lyzátov s použitím 1 x RIPA pufru doplneného o Complete™ Protease Inhibitor Cocktail (Roche Applied Science, Mannheim, Nemecko). Koncentrácie proteínov boli stanovené metódou BCA (Pierce™ BCA Protein Assay Kit). Tridsať mikrogramov proteínu bolo nanosených na dráhu a separované pomocou SDS-PAGE v 10% polyakrylamidových géloch, blotované na nitrocelulózoové membrány a blokovanie odtučneným mliekom. Membrány boli vystavené anti-ľudským protilátkam uvedeným v časti Materiály. Na detekciu aktínu sa použila anti-aktínová monoklonálna protilátka, láskavo darovaná JM Hernándezom (CINVESTAV-IPN). Sekundárne protilátky označené HRP boli anti-kráľčie alebo anti-myšie (1:5000) (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA, USA). Chemiluminiscenčná detekcia sa uskutočnila pomocou Immobilon™ a zaznamenané na zobrazovacom zariadení ChemiDoc (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) na denzitometrické analýzy so softvérom ImageLab™ (v 6.0, Bio-Rad Laboratories, CA, USA). Všetky proteíny boli identifikované Western blotom z troch nezávislých experimentov (biologické replikáty, n = 3).

#### 4.10. Imunofluorescencia

Na imunolokalizáciu boli bunky MCF-7 a 6D pestované na sklenených krycích sklíčkach a fixované 3,7% formaldehydom počas 20 minút a permeabilizované 0,1% Tritonom X-100 v PBS 1x počas 5 minút pri teplote miestnosti. Bunky boli ošetrené PBS obsahujúcim 0,1 % Tween 20, 2 % BSA a premyté PBS pred

vystavením na 1 hodinu pri 37 °C rôznym primárnym protilátkam:  $\beta$ -katenínu (riedenie 1:100) a E-kadherínu (1 : 100 riedenie). Bunky sa potom inkubovali s anti-myším IgG alebo anti-králičím IgG konjugovaným s Alexa 488 v riedení 1:100 počas 1 hodiny pri teplote miestnosti. Vizualizácia aktínu sa uskutočnila farbením TRITC-faloidínom počas 20 minút pri teplote miestnosti. Jadrá boli zafarbené 0,1% 4',6-diamidino-2-fenylindolom (DAPI) v roztoku PBS/Triton počas 5 minút. Krycie sklíčka boli namontované pomocou VectaShield H-1000. Bunky boli pozorované v 50-násobnom epifluorescenčnom inverznom mikroskope Olympus. n = 3). Obrázky získané digitálnym fotoaparátom Olympus DP72 boli analyzované softvérom Image-pro Plus (v. 3.0, Media Cybernetics, Rockville, MD, USA).

#### 4.11. Kvantifikácia p-katenínu analýzou obrazu

Bunkové obrázky zachytené na imunolokalizáciu sa použili na kvantifikáciu množstva p-katenínu v špecifických bunkových kompartmentoch (medzibunkové spojenia a jadrá) pomocou analýzy hustoty fluorescencie. Pred začatím analýzy boli zachytené obrázky podrobené procesu dekonvolúcie na odstránenie šumu pozadia (softvér Deconvolution Image J, Rasband, WS, US National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA). Následne sa vybralo 150 buniek v šiestich náhodne vybraných poliach na kvantifikáciu relatívnych hladín signálu  $\beta$ -katenínu spojeného s medzibunkovými spojeniami pomocou nástroja povrchového grafu. Získané údaje boli použité na štatistickú analýzu. Na meranie jadrového  $\beta$ -katenínu, bunky boli zafarbené Alexa 488 a kontrastne zafarbené TRITC-faloidínom, aby sa nastavili bunkové limity a vizualizovala sa organizácia aktínu a DAPI na identifikáciu jadier. Vzhľadom na veľkosť a okrúhlosť jadier (označených bodkovaným krúžkom) bola vykonaná IF kvantifikácia týchto oblastí. Z troch nezávislých experimentov sa skúmalo 150 buniek. Údaje IF sa použili na štatistické stanovenia. Zachytené obrázky buniek boli spracované v Image-Pro Plus Ver. 7.0 a softvér Image J.

#### 4.12. Štatistická analýza

Údaje sú prezentované ako priemer  $\pm$  SD. Vo všetkých prípadoch predstavujú aspoň tri nezávislé stanovenia (biologické replikáty), každé uskutočnené v troch vyhotoveniach. Na štatistickú analýzu bola použitá v 6.0 od GraphPad Software (La Jolla CA, USA). Viacnásobné porovnania sa uskutočnili pomocou 2-cestnej ANOVA a Dunnettovho testu viacnásobného porovnávania. Hodnoty  $p \leq 0,05$  sa považovali za významné.

## Záver

Prvýkrát sme uviedli, že CBD vracia epitelovo-mezenchymálny prechod indukovaný zápalovým cytokínom IL-1 $\beta$ , preprogramovaním invazívnych 6D buniek, aby sa stali bunkami s epitelovým fenotypom.

## Referencie

1. Yang L., Lin P.C. Mechanisms that drive inflammatory tumor microenvironment, tumor heterogeneity, and metastatic progression. *Semin. Cancer Biol.* 2017;47:185–195. doi: 10.1016/j.semcancer.2017.08.001. [PMC free article] [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
2. Apte R.N., Dotan S., Elkabets M., White M.R., Reich E., Carmi Y., Song X., Dvozkin T., Krelin Y., Voronov E. The involvement of IL-1 in tumorigenesis, tumor invasiveness, metastasis and tumor-host interactions. *Cancer Metastasis Rev.* 2006;25:387–408. doi: 10.1007/s10555-006-9004-4. [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
3. Franco-Barraza J., Valdivia-Silva J.E., Zamudio-Meza H., Castillo A., García-Zepeda E.A., Benítez-Bribiesca L., Meza I. Actin Cytoskeleton Participation in the Onset of IL-1 $\beta$  Induction of an Invasive Mesenchymal-like Phenotype in Epithelial MCF-7 Cells. *Arch. Med. Res.* 2010;41:170–181. doi: 10.1016/j.arcmed.2010.04.010. [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
4. Perez-Yepe E.A., Ayala-Sumuano J.-T., Reveles-Espinoza A.M., Meza I. Selection of a MCF-7 Breast Cancer Cell Subpopulation with High Sensitivity to IL-1  $\beta$ : Characterization of and Correlation between Morphological and Molecular Changes Leading to Increased Invasiveness. *Int. J. Breast Cancer.* 2012;2012:1–12. doi: 10.1155/2012/609148. [PMC free article] [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
5. Perez-Yepe E.A., Ayala-Sumuano J.-T., Lezama R., Meza I. A novel  $\beta$ -catenin signaling pathway activated by IL-1 $\beta$  leads to the onset of epithelial–mesenchymal transition in breast cancer cells. *Cancer Lett.* 2014;354:164–171. doi: 10.1016/j.canlet.2014.08.015. [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
6. Lim B., Woodward W.A., Wang X., Reuben J.M., Ueno N.T. Inflammatory breast cancer biology: The tumour microenvironment is key. *Nat. Rev. Cancer.* 2018;18:485–499. doi: 10.1038/s41568-018-0010-y. [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
7. Kalluri R., Weinberg R.A. The basics of epithelial-mesenchymal transition. *J. Clin. Invest.* 2009;119:1420–1428. doi: 10.1172/JCI39104. [PMC free article] [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
8. Mouhamed Y., Vishnyakov A., Qorri B., Sambhi M., Frank S.S., Nowierski C., Lamba A., Bhatti U., Szewczuk M.R. Therapeutic potential of medicinal marijuana: An educational primer for health care professionals. *Drug. Healthc. Patient Saf.* 2018;10:45–66. doi: 10.2147/DHPS.S158592. [PMC free article] [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
9. Preet A., Qamri Z., Nasser M.W., Prasad A., Shilo K., Zou X., Groopman J.E., Ganju R.K. Cannabinoid Receptors, CB1 and CB2, as Novel Targets for Inhibition of Non-Small Cell Lung Cancer Growth and Metastasis. *Cancer Prev. Res.* 2011;4:65–75. doi: 10.1158/1940-6207.CAPR-10-0181. [PMC free article] [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
10. Massi P., Solinas M., Cinquina V., Parolaro D. Cannabidiol as potential anticancer drug. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 2013;75:303–312. doi: 10.1111/j.1365-2125.2012.04298.x. [PMC free article] [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
11. McAllister S.D., Christian R.T., Horowitz M.P., Garcia A., Desprez P.-Y. Cannabidiol as a novel inhibitor of Id-1 gene expression in aggressive breast cancer cells. *Mol. Cancer Ther.* 2007;6:2921–2927. doi: 10.1158/1535-7163.MCT-07-0371. [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
12. Shrivastava A., Kuzontkoski P.M., Groopman J.E., Prasad A. Cannabidiol Induces Programmed Cell Death in Breast Cancer Cells by Coordinating the Cross-talk between Apoptosis and Autophagy. *Mol.*

Cancer Ther. 2011;10:1161–1172. doi: 10.1158/1535-7163.MCT-10-1100. [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]

13. Alexander A., Smith P.F., Rosengren R.J. Cannabinoids in the treatment of cancer. *Cancer Lett.* 2009;285:6–12. doi: 10.1016/j.canlet.2009.04.005. [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]

14. Meng W., Takeichi M. Adherens Junction: Molecular Architecture and Regulation. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 2009;1:a002899. doi: 10.1101/cshperspect.a002899. [PMC free article] [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]

15. Castillo A., Ortuño-Pineda C., Flores-Maldonado C., Larre I., Rendón J.M., Hinojosa L., Ponce A., Ogazón A., Serrano M., Valdes J., et al. Ouabain modulates the adherens junction in renal epithelial cells. *Cell. Physiol. Biochem.* 2019;52:1381–1397. doi: 10.33594/000000097. [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]

16. Mendoza-Rodríguez M., Arévalo Romero H., Fuentes-Pananá E.M., Ayala-Sumuano J.-T., Meza I. IL-1 $\beta$  induces up-regulation of BIRC3, a gene involved in chemoresistance to doxorubicin in breast cancer cells. *Cancer Lett.* 2017;390:39–44. doi: 10.1016/j.canlet.2017.01.005. [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]

17. Mendoza-Rodríguez M., Ayala-Sumuano J., García-Morales L., Zamudio-Meza H., Pérez-Yepez E., Meza I. IL-1 $\beta$  Inflammatory Cytokine-Induced TP63 Isoform  $\Delta$ NP63 $\alpha$  Signaling Cascade Contributes to Cisplatin Resistance in Human Breast Cancer Cells. *Int. J. Mol. Sci.* 2019;20:270. doi: 10.3390/ijms20020270. [PMC free article] [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]

18. Liu P., Cheng H., Roberts T.M., Zhao J.J. Targeting the phosphoinositide 3-kinase pathway in cancer. *Nat. Rev. Drug Discov.* 2009;8:627–644. doi: 10.1038/nrd2926. [PMC free article] [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]

19. Ozaita A., Puighermanal E., Maldonado R. Regulation of PI3K/Akt/GSK-3 pathway by cannabinoids in the brain. *J. Neurochem.* 2007;102:1105–1114. doi: 10.1111/j.1471-4159.2007.04642.x. [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]

20. Caffarel M.M., Andradas C., Mira E., Pérez-Gómez E., Cerutti C., Moreno-Bueno G., Flores J.M., García-Real I., Palacios J., Mañes S., et al. Cannabinoids reduce ErbB2-driven breast cancer progression through Akt inhibition. *Mol. Cancer.* 2010;9:196. doi: 10.1186/1476-4598-9-196. [PMC free article] [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]

21. ChoiPark W.-H.-D., Baek S.-H., Chu J.-P., Kang M.-H., Mi Y.-J. Cannabidiol Induces Cytotoxicity and Cell Death via Apoptotic Pathway in Cancer Cell Lines. *Biomol. Ther.* 2008;16:87–94. doi: 10.4062/biomolther.2008.16.2.087. [CrossRef] [Google Scholar]

22. Gyombolai P., Boros E., Hunyady L., Turu G. Differential  $\beta$ -arrestin2 requirements for constitutive and agonist-induced internalization of the CB1 cannabinoid receptor. *Mol. Cell. Endocrinol.* 2013;372:116–127. doi: 10.1016/j.mce.2013.03.013. [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]

23. Nogueras-Ortiz C., Yudowski G.A. The Multiple Waves of Cannabinoid 1 Receptor Signaling. *Mol. Pharmacol.* 2016;90:620–626. doi: 10.1124/mol.116.104539. [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]

24. Ling M.-T., Wang X., Zhang X., Wong Y.-C. The multiple roles of Id-1 in cancer progression. *Differentiation.* 2006;74:481–487. doi: 10.1111/j.1432-0436.2006.00083.x. [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]

25. Hu H., Wang Y.L., Wang G.W., Wong Y.C., Wang X.F., Wang Y., Xu K.X. A novel role of Id-1 in regulation of epithelial-to-mesenchymal transition in bladder cancer. *Urol. Oncol. Semin. Orig. Investig.* 2013;31:1242–1253. doi: 10.1016/j.urolonc.2011.12.003. [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
26. Mittal R., Chaudhry N., Mukherjee T.K. Targeting breast cancer cell signaling molecules PI3K and Akt by phytochemicals Cannabidiol, Nimbin and Acetogenin: An in silico approach. *J. Biomed.* 2018;3:60–63. doi: 10.7150/jbm.25815. [CrossRef] [Google Scholar]
27. Pellati F., Borgonetti V., Brighenti V., Biagi M., Benvenuti S., Corsi L. Cannabis sativa L. and Nonpsychoactive Cannabinoids: Their Chemistry and Role against Oxidative Stress, Inflammation, and Cancer. *Biomed Res. Int.* 2018;2018:1–15. doi: 10.1155/2018/1691428. [PMC free article] [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
28. Bizzarri M., Cucina A., Proietti S. Tumor Reversion: Mesenchymal-Epithelial Transition as a Critical Step in Managing the Tumor-Microenvironment Cross-Talk. *Curr. Pharm. Des.* 2017;23:1–11. doi: 10.2174/1381612823666170609082757. [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
29. Shi H., Wang J., Dong F., Wang X., Li H., Hou Y. The effect of proteoglycans inhibited by RNA interference on metastatic characters of human salivary adenoid cystic carcinoma. *BMC Cancer.* 2009;9:456. doi: 10.1186/1471-2407-9-456. [PMC free article] [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]
30. Wang X., Seed B. A PCR primer bank for quantitative gene expression analysis. *Nucleic Acids Res.* 2003;31:e154. doi: 10.1093/nar/gng154. [PMC free article] [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]