جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

مقاله تحقیقی

اثر مهار کننده آنزیم گلیکوژن سنتاز کیناز-۳ بتا بر تمایز سلول‌های بنیادی سوماتیکی نامحدود به سلول‌های استخوانی

عاطفه صفرپور M.Sc.*، بهمن زینلی Ph.D.*، مسعود سلیمانی Ph.D.، آزیتاپروانه تفرشی Ph.D.*****
* دانشکده زیست شناسی، پردیس علوم، دانشگاه تهران، ایران
** گروه هماتولوژی، دانشکده پزشکی ، دانشگاه تربیت مدرس، ایران
*** گروه علوم پایه، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فن آوری، ایران
تاریخ دریافت: تیرماه ۹۰، تاریخ پذیرش: شهریور ماه ۹۰

چکیده

هدف: نقص بافت اسکلتی که به دلیل جراحت یا بیماری‌هایی مثل تروما، سرطان یا جراحی رخ می‌دهد و همین‌طور آسیب‌های استخوانی که باعث جابه‌جایی مفاصل می‌شود، بخش مهمی‌از مشکلات مربوط به سلامت جامعه را تشکیل می‌دهد. از آن جا که مسیر Wnt از جمله اصلی‌ترین مسیرهای تنظیم کننده در کنترل سلول‌های بنیادی چند توان است، فعال سازی Wnt می‌تواند موجب ایجاد پاسخ‌های مختلف سلولی شود.

مواد و روش ها: در پژوهش حاضر اثر BIO به عنوان مهارکننده اختصاصی گلیکوژن سنتاز کیناز-۳بتا (GSK-3β) و بنابراین فعال کننده مسیر اصلی Wnt، بر سلول‌های USSC در حال تمایز به استخوان در روزهای ٤ و ۷ و١٤ و ۲۱ با استفاده از روش‌های MTT، سنجش ماتریکس استخوانی و RT-PCR بررسی شد.

یافته‌ها: نتایج بررسی بیان ژنی نشان داد که BIO تا ١٤ روز پس از کشت بیان ژنهای اختصاصی تمایز استخوانی (Alkaline phosphatase , Runx2) را افزایش و پس از ۲۱ آنها را کاهش می دهد. نتایج بررسی سنتز ماتریکس استخوانی نشان داد که BIO پس از ۲۱ روز کشت باعث کاهش معنی دار سنتز ماتریکس استخوانی شده است. همچنین نتایج نشان داد که BIO توانایی زیستی USSC های در حال تمایز به سلولهای استخوانی را کاهش می‌دهد.

نتیجه گیری: در مجموع نتایج حاضر نشان می دهد که BIO به عنوان مهار کننده GSK-3β و فعال کننده مسیر Wnt ، بطور کلی باعث کاهش تمایز USSC ها به سلولهای استخوانی می شود.

کلید واژه‌ها: سلول‌های بنیادی، تمایز استخوانی، Wnt، BIO ، GSK-3β

مقدمه

نقص بافت اسکلتی که به دلیل جراحت یا بیماری‌هایی مثل تروما، سرطان یا جراحی رخ می‌دهد و همین‌طور آسیب‌های استخوانی که باعث جابه‌جایی مفاصل می‌شود، بخش مهمی از مشکلات مربوط به سلامت جامعه را تشکیل می‌دهد. به همین دلیل ابداع روش‌های درمانی که باعث تولید غضروف و استخوان می‌شود، ضروری به نظر می‌رسد. سلول بنیادی را می‌توان یک سلول مادر نامید، یعنی سلولی که علاوه بر خودتجدیدی می‌تواند مولد سلول‌های دیگر نیز باشد [۱]. خون بند ناف انسان حاوی

آدرس مکاتبه: ایران، تهران، دانشگاه تهران، پردیس علوم، دانشکده زیست شناسی
E-mail: bzeynali@khayam.ut.ac.ir

جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

سلول‌های بنیادی و پیش‌ساز نابالغ بسیاری است که می‌تواند منبع جایگزین خوبی برای مغز استخوان در بحث دست‌یابی به سلول‌های بنیادی باشد. سلول‌های بنیادی سوماتیکی نامحدود (USSCs) که از خون بند ناف مشتق می‌شوند، منبع سلولی خوبی را برای کاربردهای سلول درمانی فراهم می‌کنند[۲و۳] این سلول‌ها به عنوان یک سلول استرومایی مزانشیمی با منشاء خون بند ناف می‌توانند به سلول‌های هر سه لایه جنینی (اندودرمی، مزودرمی و اکتودرمی) تمایز یابند. از یافته‌های مهم در مورد این سلول‌ها عدم وجود خاصیت تومورزایی است، به طوری‌که با پیوند این سلول‌ها به مدل‌های مختلف، تاکنون هیچ موردی از ایجاد تومورهای میکروسکوپیک یا ماکروسکوپیک گزارش نشده است [٤]. استئوبلاست‌های تشکیل دهنده استخوان از سلول بنیادی مزانشیمی منشا می‌گیرند. در روند تمایز بیان نشانگرهای عمده استخوانی یعنی فاکتورهای نسخه‌برداری Runx2 و استریکس باعث تولید سلول‌های استخوانی می‌شود. Runx2 عضوی از خانواده فاکتورهای نسخه‌برداری دارای زیر واحد runt است و نقش حیاتی در تکوین استئوبلاست‌ها بازی می‌کند. حذف Runx2 در موش منجر به ایجاد حیواناتی می‌شود که در آن‌ها اسکلت تن‌ها متشکل از سلول‌های غضروفی و مفاصل است و نشانه‌ای از استخوان در آن دیده نمی‌شود[۳]. Runx2 به عنوان یک فاکتور نسخه‌برداری اولین نشانگر تمایزی استئوبلاست است که تا کنون شناخته شده است و بیان آن طی تکوین و بعد از تولد در استئوبلاست‌ها بسیار بالاست. این فاکتور نسخه‌برداری به‌طور مستقیم بر بیان ژن‌های آلکالاین فسفاتاز و استئوکلسین اثر مثبت می‌گذارد.

از مهمترین ژن‌های دخیل در مسیر تمایز به استخوان می‌توان استئونکتین (ON osteonectin) ، آلکالاین فسفاتاز (ALP alkaline phosphatase)، سیالوپروتئین استخوانی (Bone sialo protein) و استئوکلسین (osteocalcin) را نام برد که اغلب در فاصله ۲۱ روزه تمایز به استئوبلاست‌ها در سلول بیان می‌شود [۵].

پروتئین گلیکوژن سنتاز کیناز-β۳ (GSK-3β)، یک سرین-ترئونین کیناز است که برای اولین بار در اواخر دهۀ هفتاد به عنوان آنزیمی که سنتز گلیکوژن را تنظیم می کند، شناسایی شد. امروزه مشخص شده است که مهار این آنزیم باعث فعال‌سازی مسیر پیام‌رسانی اصلی Wnt می‌شود؛ به این صورت که پس از قرار گرفتن لیگاند Wnt روی کمک گیرندۀ LRP5/6 ، این آنزیم با فسفریله کردن انت‌های سیتوپلاسمی LRP5/6 و در نتیجه افزایش تمایل Axin برای اتصال به این ناحیه، باعث جدا شدن از کمپلکس تخریبی می‌شود و بدین ترتیب نقش مثبتی در فعال‌سازی مسیر Wnt بازی می‌کند [٦]. از آن جا که مسیر Wnt از جمله اصلی‌ترین مسیرهای تنظیم کننده در سلول‌های بنیادی چند توان است، فعال‌سازی Wnt می‌تواند موجب ایجاد پاسخ‌های مختلف سلولی شود [۷]. تحقیقات روی سلول‌های بنیادی مزانشیمی نشان داده است که فعال شدن مسیر Wnt در متعهد کردن اجداد مزانشیمی برای تمایز به رده‌های استئوبلاستی نقش مهمی را بازی می‌کند و علاوه بر این Wnt با مهار بیان ژن اختصاصی تمایز چربی، PPARγ، تمایز استخوان را افزایش می‌دهد[۵]. مطالعات روی سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از بافت چربی نشان داده است که فعال شدن مسیر سیگنال‌دهی اصلی Wnt در این سلول‌ها از تمایز آن‌ها به چربی جلوگیری کرده است و سرنوشت آن‌ها را از تمایز به سلول چربی به سمت تبدیل شدن به سلول استخوانی تغییر داده است [۸]. همچنین مطالعات روی سلول‌های بنیادی مزانشیمی‌انسانی نشان داده است که در حضور لیتیم یا Wnt3a نوترکیب، تمایز به استخوان در این سلول‌ها مهار می‌شود[۹]. مطالعات در شرایط *in vivo* نیز تایید می‌کند که مسیر سیگنال‌دهی اصلی Wnt با افزایش بیان RUNX2 در شکل‌گیری سلول‌های استخوانی نقش مثبت دارد [۱۰].

با توجه به موارد یاد شده و اطلاعات محدود و البته ضد

جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

و نقیض در مورد نقش مسیر اصلی Wnt در تمایز سلول‌ها به سمت سلول‌های استخوانی، بررسی نقش این مسیر بر مدل‌های سلولی دیگر ضروری به نظر می‌رسد. در پژوهش حاضر اثر BIO به عنوان مهارکننده اختصاصی و فارماکولوژیک GSK-3β [۷] و بنابراین فعال کننده مسیر اصلی Wnt، در تمایز سلول‌های USSC به سمت سلول‌های استخوانی بررسی شد. نتایج این پژوهش نشان داد که BIO بر تمایز سلول‌های USSC به سلول‌های استخوانی اثر دوگانه دارد، بدین ترتیب که در روزهای ابتدایی باعث افزایش و سپس باعث کاهش تمایز به سمت استخوان می‌شود.

مواد و روش‌ها

سلول‌های USSC جدا شده از خون بند ناف از شرکت فن‌آوری بن یاخته تهیه شد. نشانگرهای سطحی این سلول‌ها قبلاً به کمک روش فلوسایتومتری بررسی شده و نتایج نشان داده بود که این سلول‌ها نشانگر سطحی CD105 را به میزان ۸۰ درصد بیان کرده ولی برای نشانگرهای CD49، CD146، CD29 و CD14 منفی بودند [۱۱]. این سلول‌ها به منظور رشد و تکثیر به کف پتری دیش می‌چسبند. محیط مناسب برای تکثیر این سلول‌ها DMEM (L-Glucose) (Gibco) است که حاوی ۱۰ درصد سرم جنینی گاو است. سلول‌های USSC سرعت تکثیر به‌نسبت خوبی دارند به این شکل که در شرایط کشت استاندارد و در یک فلاسک ۲۵ میلی‌متری به‌طور متوسط هر روز یک‌بار باید پاساژ داده شوند. برای تمایز سلول‌های USSC به سلول‌های استخوانی به مدت ۲۱ روز از محیط کشت DMEM(L-Glucose) حاوی ۱۰ میلی‌مولاربتا گلیسرول فسفات (Sigma)، ۵۰ میکرومولار آسکوربیک اسید ۲-فسفات (Sigma) و ۰/۱ میکرومولار دگزامتازون (Sigma)، استفاده شد.

آزمون MTT

برای انجام این آزمایش، پودر MTT (Sigma) با غلظت ۵میلیگرم در میلیلیتر در بافر PBS(Phosphate Buffer Saline) حل شد و سپس به‌وسیله فیلتر سر سرنگی با قطر منافذ ۰/۲۲ میکرون فیلتر و استریل شد. تعیین جذب محلول فورمازان تشکیل شده در پلیت کشت ۹۶ خانه به وسیله دستگاه Elisa reader ساخت شرکت Ratio انجام شد.

رنگ‌آمیزی سلول‌های استخوانی

به‌منظور رنگ‌آمیزی سلول‌های استخوانی از رنگ آلیزارین رد (Alizarin red) (Sigma) استفاده شد. این رنگ به رسوب‌های کلسیم سلول‌های استخوانی متصل می‌شود و در حضور یون‌های دوظرفیتی کلسیم به رنگ قرمز در می‌آید. به این منظور لایه سلولی در کف ظرف با محلول PBS شسته شد. سپس سلول‌ها به مدت ۱۰ دقیقه با متانول (Merck) در دمای اتاق تثبیت شدند. برای رنگ آمیزی، سلول‌ها با رنگ آلیزارین رد به مدت ۲ دقیقه انکوبه شدند و سپس رنگ‌های اضافی به وسیله شستشوی سلول‌ها با آب مقطر خارج شد. به‌منظور سنجش ماتریکس استخوانی ابتدا محیط روی سلول‌ها پس از طی زمان انکوباسیون برداشته شد و سپس سلول‌ها با PBS شستشو شدند. سلول‌ها سپس به مدت ۱۰ دقیقه با متانول (Merck) تثبیت و به مدت ۱۰ دقیقه تحت رنگ آلیزارین رد قرار گرفتند. بعد از دو بار شستشو با PBS، ۴۰۰ میکرولیتر اسید استیک (Merck) ۱۰درصد به هر چاهک اضافه و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. سپس لایه سلولی به آرامی توسط نوک سمپلر جدا و به همراه مایع رویی به میکروتیوب ۱/۵ منتقل شد. میکروتیوب‌های ۱/۵برای جلوگیری از تبخیر با پارافیلم پوشانده و ۱۰ دقیقه در دمای ۸۵ درجه سانتی‌گراد حرارت داده شد. میکروتیوب‌ها بلافاصله به مدت ۵ دقیقه در یخ قرار گرفته و سپس به مدت ۱۵ دقیقه در ۲۰۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ شد. ۴۰۰ میکرولیتر از محیط رویی برداشته و به میکروتیوب ۱/۵ جدید وارد شد. ۱۵۰ میکرولیتر هیدروکسید

آمونیوم (Merck) ۱۰ درصد به محلول فوق اضافه شد تا pH اسیدی خنثی شود.۱۰۰ میکرولیتر از این محلول به پلیت ۹۶ خانه منتقل شد و جذب آن در ٤٠٥ نانومتر به وسیله دستگاه Elisa reader خوانده شد.

بررسی بیان ژن‌های تمایزی با استفاده از روش semi-quantitative RT-PCR

برای استخراج RNA از محلول RNX-Plus محصول شرکت سیناژن استفاده شد. به منظور استخراج RNA، سلول‌ها در فلاسک ۲۵ میلی‌متری کشت داده شدند. پس از طی زمان انکوباسیون مورد نظر محیط کشت سلول‌ها خارج و ۱ میلی‌لیتر از محلول RNX-Plus روی سلول‌ها ریخته شد. پس از ۷-٦ دقیقه در دمای اتاق سلول‌ها به طور کامل از کف فلاسک جدا شدند. محلول حاوی سلول‌ها پیپتاژ و همگن شد و سپس به درون میکروتیوب ۱/۵ تمیز انتقال داده یافتند. ۲۰۰ میکرولیتر کلروفورم (Merck) به محلول اضافه و ۱۵ ثانیه ورتکس شد تا محلول درون آن کدر شود. سپس میکروتیوب ۱۵دقیقه در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد در ۱۳۰۰۰ دور در دقیقه (rpm) سانتریفوژ شد تا دو فاز تشکیل شود. فاز رویی به یک میکروتیوب فاقد RNase منتقل و هم حجم آن ایزوپروپانول به آن اضافه شد. میکروتیوب یک شب در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد و پس از آن میکروتیوب ۱۵ دقیقه در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد در ۱۳۰۰۰ دور در دقیقه (rpm) سانتریفوژ شد تا RNA در کف میکروتیوپ رسوب کند. محلول روی رسوب دور ریخته شد. سپس برای شستشوی رسوب، ۱ میلی‌لیتر اتانول ۷۵ درصد اضافه و تخلیه شد. پس از آن حدود ۱۵دقیقه رسوب RNA در دمای اتاق رها شد تا خشک و بی‌رنگ شود. رسوب در ۵۰-۳۰ میکرولیتر آب فاقد RNase حل شد و در یخ قرار گرفت. به‌منظور تعیین غلظت، ۲ میکرولیتر از محلول RNA برداشته شد و با دستگاه Nano drop (Thermo) میزان RNA آن بر حسب میکروگرم بر میکرولیتر به‌دست آمد.

به‌منظور سنتز cDNA از کیت سنتز cDNA شرکت Fermentase با شماره k1622 استفاده شد. برای انجام این بخش مراحل زیر انجام گرفت:

ابتدا ۲ میکروگرم از محلول RNA وارد یک میکروتیوب ۰/۲ میلی‌لیتری فاقد RNase شد. ۱/۵ میکرولیتر از Random Hexamer (۰/۲ µg/µl) به آن اضافه شد و به مدت ۵ دقیقه در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد در دستگاه ترموسایکلر ساخت شرکت Corbett قرار گرفت. سپس به میکروتیوب موارد زیر اضافه شد: ٤ میکرولیتر بافر واکنش‌دهنده (۵X)، پروتئین مهار کننده ریبو نوکلئاز (۲۰unit/µl) ۰/۵ میکرولیتر، دی نوکلئوتید تری فسفات (۱۰ mM) ۱ میکرولیتر، آنزیم ترانس کریپتاز معکوس (۲۰۰unit/µl) ۱ میکرولیتر، آب فاقد RNase تا رسیدن به حجم ۲۰ میکرولیتر. میکروتیوب داخل دستگاه ترموسایکلر قرار گرفت و ساخت cDNA با استفاده از چرخه زمانی انجام شد.

به‌منظور انجام واکنش زنجیره پلی‌مرازی (PCR) در این پژوهش از آنزیم تک پلی مراز دی نوکلئوتید تری فسفات شرکت سیناژن استفاده شد.

برای انجام واکنش زنجیره پلی‌مرازی این مراحل انجام گرفت: ابتدا مواد زیر داخل یک میکروتیوب ۰/۲با یکدیگر مخلوط شد:۲ میکرولیتر بافر PCR ۱۰X (سولفات آمونیم)، ۱ میکرولیتر مخلوط ٤ دی نوکلئوتید تری فسفات (۰/۲ میلی‌مولار از هرکدام) (سیناژن)، ۱میکرولیتر کلرید منیزیم ۵۰ میلی‌مولار (سیناژن)، ۳/۲ میکرولیتر cDNA، ۰/۹میکرولیتر پرایمر Forward که در جدول ۱ آمده است، ۰/۹ میکرولیتر پرایمر Reverse که در جدول ۱ آمده است (۰/۵ میکرومولار از هرکدام از پرایمرها)، ۰/۲ میکرولیتر آنزیم DNA Tag پلی مراز(۲/۵ واحد در هر ۱۰۰ میکرولیتر) (سیناژن)، ۱۱/۸ میکرولیتر آب فاقد RNase (حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر). میزان ۱۰ میکرولیتر مینرال اویل (Mineral oil) محصول شرکت

سیناژن روی محتویات میکروتیوب ریخته شد و خوب فیوژ شد تا فاز روغنی روی فاز آبی قرار گیرد و سپس میکروتیوپ‌ها در ترموسایکلر قرار گرفت و بعد از طی مراحل زیر آماده راندن روی ژل الکتروفورز شد: ۵ دقیقه دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد، ۳۵ سیکل شامل: ۱ دقیقه دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد، ۱ دقیقه دمای اتصال ™ پرایمر، ۱دقیقه دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد و سپس ۱۰ دقیقه دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد. به منظور راندن نمونه‌ها روی ژل، از ژل آگارز ۱/۵ درصد در بافر TAE استفاده شد. ژل به مدت یک ساعت تحت ولتاژ ۱۰۰ و آمپر ۸۰ فراهم شده توسط دستگاه قدرت پایاپژوهش قرار گرفت و سپس در دستگاه ترانس لومیناتور (UV-TEC) از آن تصویر تهیه شد. با استفاده از نرم افزار Total Lab میزان بیان ژن‌های مورد نظر نسبت به ژن کنترل داخلی ارزیابی شد و به این وسیله نتایج RT-PCR به صورت کمی (Semi-Quantitative RT-PCR) در آمد.

بررسی آماری

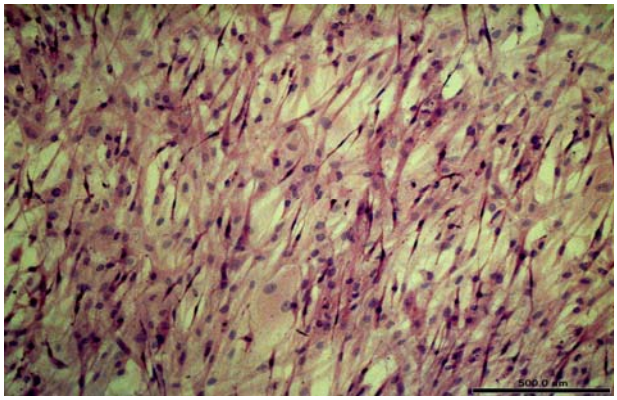
نتایج توسط نرم افزار SPSS نسخه ۱۶ و با استفاده از آزمون ANOVA یک طرفه تجزیه و تحلیل و نمودارها نیز توسط این نرم افزار رسم شد.

جدول ۱. ژن‌ها و پرایمرهای مورد استفاده

نام ژن	مورد استفاده	توالی پرایمر	دمای اتصال	طول قطعه
ALP	سلول استخوانی	F: GCA CCT GCC TTA CTA ACT C R: AGA CAC CCA TCC CAT CTC	۵۷	۱۶۱
RUNX2	سلول استخوانی	F: CTC TTC CCA AAG CCA GAG TG R: CAG CGT CAA CAC CAT CAT TC	۵۷	۲۷۰
GAPDH	کنترل داخلی	F: AGG GTC TCT CTC TTC CTC TTG TGC TCT R: CCA GGT GGT CTC CTC TGA CTT CAA CAG	۵۹	۱۸۶

یافته‌ها

سلول‌های USSC سلول‌های بنیادی پرتوانی هستند که قابلیت تمایز آن‌ها به انواع مختلف سلول‌ها نظیر سلول‌های غضروفی، استخوانی، چربی و عصبی مشخص شده است(۲). سلول‌هایUSSC، سلول‌هایی دوکی شکل با هسته درشت و مشخص هستند (شکل ۱).

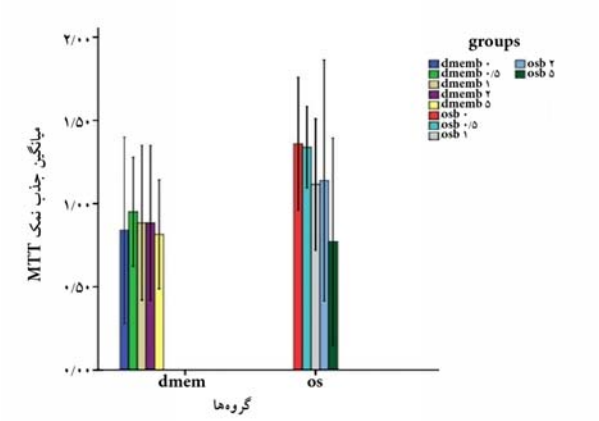


شکل ۱. فتومیکروگراف از سلول‌های USSC در محیط کشت (رنگ‌آمیزی: H&E، بار: ۵۰۰ میکرومتر)

اثر BIO به عنوان مهار کننده GSK-3β در تمایزسلول‌هایUSSC به سلول‌های استخوانی

همان‌طور که اشاره شد مسیر سیگنال‌دهی Wnt یکی از مهم‌ترین مسیرهای پیام‌رسانی طی دوران تکوینی جنین است[۱۲]. به علاوه گزارش‌های ضد و نقیضی در خصوص نقش این مسیر در کنترل تکثیر یا تمایز سلول‌های بنیادی وجود دارد [۱۳]. بنابراین در این پژوهش با استفاده از BIO به عنوان مهار کننده اختصاصی GSK-3β، نقش مسیر پیام رسانی Wnt طی مراحل تمایز این سلول‌ها ارزیابی شد. به منظور بررسی احتمال اثر سمی BIO روی سلول‌های USSC، اثر غلظت‌های مختلف آن در حضور محیط کنترل (DMEM) و محیط تمایز استخوانی با استفاده از روش MTT ارزیابی شد (شکل ۲). نتایج نشان دادند که در کلیه غلظت‌ها در هر دو محیط کنترل و تمایز استخوانی تفاوت معنی‌داری در توانایی زیستی گروه‌های مختلف وجود ندارد. با توجه به این نتایج و

نتایج به‌دست آمده قبلی در این آزمایشگاه [۱٤] که بر اساس آن BIO بیشترین مهار آنزیم GSK-3β را در غلظت‌های ۱و ۲ میکرومولار داشته است، بنابراین در پژوهش حاضر این دو غلظت BIO برای تیمار کردن سلول‌های USSC انتخاب شد (جدول ۲). لازم به ذکر است که استفاده از این دوزها قبلاً نیز گزارش شده است [۱۵].



شکل ۲. نتایج مربوط به آزمون MTT نمونه‌های تحت محیط کنترل (DMEM) و محیط تمایزی استخوانی به همراه غلظت‌های صفر، ۰/۵، ۱، ۲ و ۵ BIO ، ۲٤ ساعت پس از کشت. همان‌طور که مشاهده می‌شود بین کلیه گروه‌ها تفاوت معنی‌داری وجود ندارد که این نشان می‌دهد غلظت‌های مختلف BIO طی ۲٤ ساعت کاهش معنی‌داری در توانایی زیستی گروه‌های مختلف ایجاد نمی‌کند ($P<0.05$).

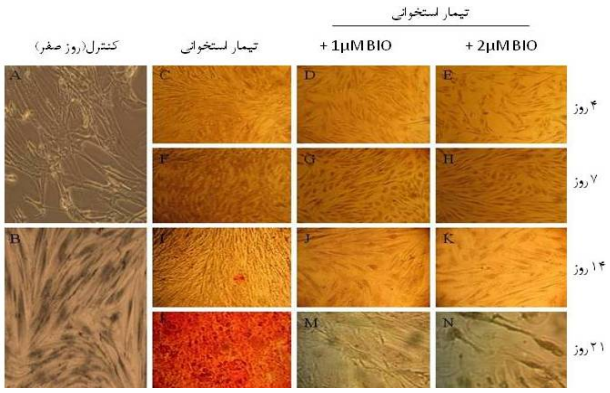
جدول۲. گروه‌های تیماری مورد استفاده

نام گروه ها	محیط تمایز استخوان	غلظت ۱میکرومولار BIO	غلظت ۲میکرومولار BIO
Cont (کنترل)	-	-	-
Os T (تیمار)	X	-	-
Os T+B1 (BIO ۱ میکرومولار)	X	X	-
Os T+B2 (BIO ۲ میکرومولار)	X	-	X

نوع تیماری که هر گروه دریافت کرده است با علامت X مشخص شده است.

۲-۳-BIO سبب کاهش سنتز ماتریکس استخوانی پس از ۲۱ روز می‌شود

برای بررسی اثر BIO در تمایز سلول‌های USSC به سلول‌های استخوانی، ابتدا میزان سنتز ماتریکس استخوانی به‌عنوان یک شاخص تمایز استخوانی با استفاده از رنگ‌آمیزی اختصاصی آلیزارین رد بررسی شد. نتایج حاصل از این رنگ‌آمیزی نشان داد که میزان تمایز سلول‌ها در روزهای ٤، ۷ و ۱٤ در حضور تیمار استخوانی و هر دو غلظت BIO تقریبا به یک میزان است، به‌طوری‌که پس از رنگ‌آمیزی با Alizarin red تمایزی مشاهده نشد، اما ۲۱ روز پس از کشت، ماتریکس سلول‌هایی که فقط محیط تمایزی را دریافت کرده بودند، به طرز چشمگیری پس از رنگ‌آمیزی کاملاً به رنگ قرمز در آمده بود که این نشان‌دهنده تمایز سلول‌های USSC به سلول‌های استخوانی بود. اما در محیط کشت سلول‌هایی که همراه محیط تمایزی، BIO نیز دریافت کرده بودند، ماتریکس قرمز رنگ مشاهده نشد که این بیانگر عدم تمایز به سلول‌های استخوانی بود. بدین ترتیب می‌توان نتیجه گرفت که BIO سبب مهار سنتز ماتریکس، به‌عنوان یکی از شاخص‌های تمایز استخوانی در این سلول‌ها شده است (شکل ۳).

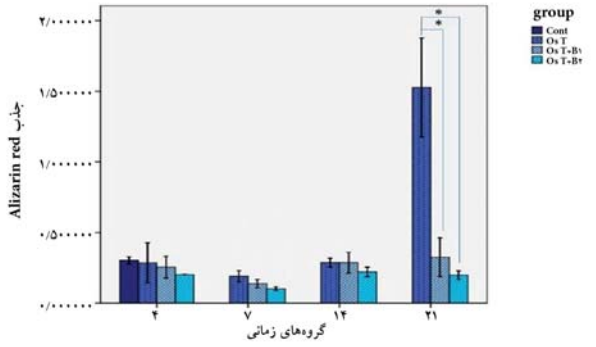


شکل ۳. فتومیکروگراف (فازکنتراست) سلول های USSC پس از کشت در حضور محیط تمایز استخوانی و BIO. نمونه‌ها (به‌جز A) با رنگ Alizarin red رنگ‌آمیزی شده است. A و B سلول‌های کنترل (روز صفر)، C، F، I و L سلول‌هایی که با محیط تمایزی تیمار شده‌اند. D، G، J و M سلول‌هایی که علاوه بر محیط تمایزی غلظت ۱ میکرومولار BIO را نیز دریافت کرده‌اند. E، H، K و N سلول‌هایی که علاوه بر محیط تمایزی غلظت دو میکرومولار BIO را دریافت کرده‌اند. (بزرگنمایی A و B:۸۰۰×، بزرگنمایی سایر تصاویر: ٤۰۰×)

همان‌طور که مشاهده می‌شود ٤ روز پس از کشت تعداد سلول‌ها در محیط تمایزی (C) نسبت به سلول‌های کنترل (A) افزایش یافته است ولی ماتریکس قرمز رنگ که نشان‌دهنده تمایز استخوانی است مشاهده نمی‌شود. ۷ روز پس از کشت تعداد سلول‌ها در محیط تمایزی (F) نسبت به سلول‌های کنترل و تیمار ٤ روز افزایش یافته است ولی همچنان ماتریکس قرمز رنگ دیده نمی‌شود. ١٤روز پس از کشت تعداد سلول‌ها در محیط تمایزی (I) نسبت به سایر گروه‌ها افزایش یافته است و همچنین ماتریکس قرمز رنگ محدودی دیده می‌شود. ۲۱روز پس از کشت تعداد سلول‌ها در محیط تمایزی (L) نسبت به سایر گروه‌ها افزایش بسیار زیادی یافته است و همچنین ماتریکس قرمز رنگ به‌طور چشمگیری افزایش یافته است. اضافه کردن BIO (۱ و ۲ میکرومولار) به محیط تمایزی (D,E,G,H,J,K,N,M) باعث کاهش تعداد سلول‌ها شده و تغییر تمایزی (مشاهده ماتریکس قرمز رنگ) ایجاد نکرده است.

به منظور مقایسه دقیق‌تر تمایز استخوانی در گروه‌های مختلف سلولی از نظر ترشح ماتریکس، میزان رنگ Alizarin red جذب شده توسط سلول‌ها پس از رنگ‌آمیزی ارزیابی شد. در این روش سلول‌ها در ٤ بازه زمانی ٤، ۷ ، ١٤ و ۲۱ روز و در سه گروه تیمار استخوانی، BIO با غلظت‌های ۱ و ۲ میکرومولار بررسی شدند. همچنین یک گروه از سلول‌هایی که تن‌ها محیط کشت پایه را دریافت کرده بودند به‌عنوان کنترل در نظر گرفته شدند (جدول ۲).

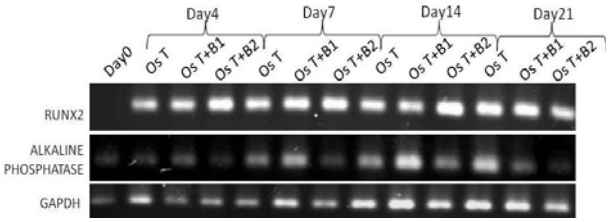
همان‌طور که در شکل ٤ مشاهده می‌شود در روزهای ٤، ۷ و ١٤ اختلاف معنی‌داری در میزان جذب Alizarin red گروه‌های مختلف دیده نمی‌شود. اما در روز ۲۱ اگرچه افزایش بسیار بالای میزان جذب رنگ Alizarin red در گروه تیمار مشاهده شد، سلول‌های هردو گروه BIO کاهش شدید و معنی‌داری ($p<0.05$) را نسبت به گروه تیمار نشان دادند. بنابراین به‌طور کلی می‌توان نتیجه گرفت که در حضور BIO به همراه محیط تمایز استخوانی توانایی سلول‌ها برای ایجاد ماتریکس نسبت به نمونه تیمار بسیار کم شده است.



شکل ٤. نمودار مربوط به سنجش میزان رنگ Alizarin red در سلول‌های کشت یافته در حضور تیمار استخوانی و BIO. همان‌طور که مشاهده می‌شود در روزهای ٤، ۷ و ١٤ تفاوت معنی‌داری در میزان جذب رنگ Alizarin red گروه‌های مختلف وجود ندارد، اما در روز ۲۱ گروه‌هایی که با محیط تمایزی و هر دو غلظت BIO. تیمار شده‌اند، کاهش معنی‌دار جذب رنگ Alizarin red را نسبت به گروه تیمار استخوانی خود نشان می‌دهند (*: $P<0.05$).

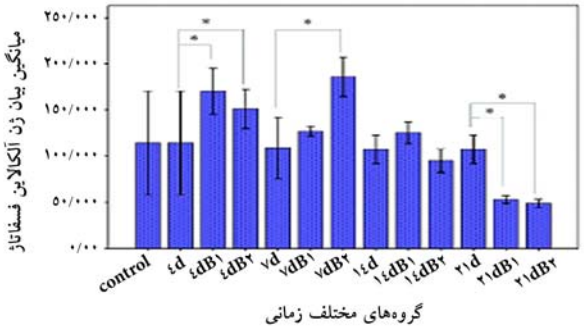
کاهش بیان ژن‌های استخوانی در حضور BIO پس از ۲۱ روز

به‌منظور بررسی بیان ژن‌های اختصاصی تمایز استخوانی در سطح نسخه‌برداری بیان ژن‌های Alkaline phosphatase و RUNX2 در روزهای ٤، ۷، ١٤ و ۲۱ روز پس از کشت در سلول‌های روز صفر (گروه کنترل)، تیمار (Os T) و ۱ و ۲ میکرومولار BIO (جدول ۲) از طریق روش RT-PCR بررسی شد (شکل‌های ۵ تا ۷). نتایج نشان داد که BIO در روزهای ٤، ۷ و ١٤ باعث افزایش و در روز ۲۱ باعث کاهش معنی‌دار بیان این دو ژن شده است.

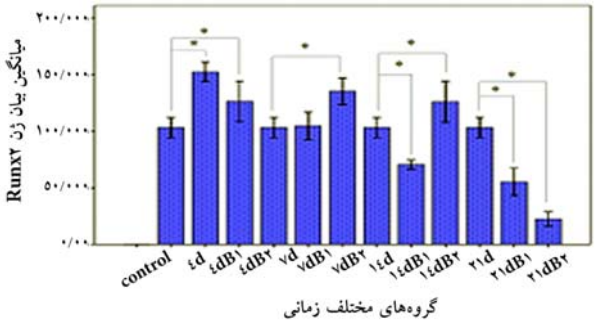


شکل ۵. بررسی RT-PCR ژن‌های اختصاصی تمایز استخوانی در گروه‌های کنترل (day0)، تیمار استخوانی (Ost T)، غلظت ۱میکرومولارBIO به همراه تیمار استخوانی(OsT+B1)، غلظت ۲ میکرومولارBIO به همراه تیمار استخوانی(OsT+B2) در ١٤،۷،٤و۲۱ روز (day4-21) پس از کشت. همان‌طور که مشاهده می‌شود BIO سبب کاهش بیان هر ۲ ژن تمایزی در روز ۲۱ شده است. از ژن GAPDH به

عنوان ژن مرجع استفاده شده است.



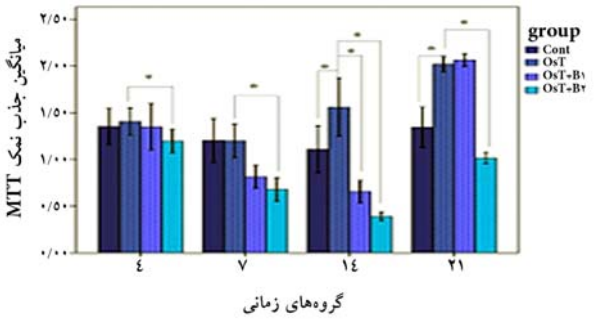
شکل ٦. نمودار میانگین میزان بیان ژن آلکالاین فسفاتاز در گروه کنترل (روز صفر) و گروه های تیمار استخوانی (4d-21d) و تیمار استخوانی و غلظت ۱و ۲ میکرومولار BIO (4-21dB1,4-21dB2) در ٤، ۷، ١٤، ۲۱ روز پس از کشت. همان‌طور که مشاهده می‌شود میزان بیان ژن آلکالاین فسفاتاز در روز ۲۱ به میزان معنی‌داری در گروه‌هایBIO نسبت به گروه تیماری کم شده است. البته در روز های٤ و ۷ نمونه‌هایی که BIO دریافت کرده‌اند، افزایش معنی‌دار بیان این ژن را نسبت به گروه تیماری نشان می‌دهند. میزان بیان ژن الکالاین فسفاتاز در روز صفر مساوی میزان بیان این ژن در روز ٤ پس از تیمار استخوانی بود.(نتایجRT-PCR به وسیله نرم افزار Total Lab کمی شده‌اند و نسبت به ژن کنترل داخلی یکسان‌سازی صورت گرفته است.) (*:P<0.05).



شکل ۷. نمودار میانگین میزان بیان ژن RUNX2 در گروه کنترل (روز صفر) و گروه‌های تیمار استخوانی (4d-21d) و تیمار استخوانی و غلظت ۱و ۲ میکرومولار BIO (4-21dB1,4-21dB2) در ٤، ۷، ١٤، ۲۱ روز پس از کشت. همان‌طور که مشاهده می‌شود میزان بیان ژن RUNX2 در روز ۲۱ به میزان معنی‌داری در گروه‌هایBIO نسبت به گروه تیماری کم شده است. البته BIO در روز های ٤ و ۷ با هر دو غلظت و با غلظت ۲ میکرومولار در روز١٤، سبب افزایش معنی‌دار میزان بیان این ژن نسبت به نمونه تیمار همان روز می‌شود. (نتایجRT-PCR به وسیله نرم افزار Total Lab کمی شده‌اند و نسبت به ژن کنترل داخلی یکسان سازی صورت گرفته است.) (*:P<0.05).

کاهش بقای سلولی درحضور BIO پس از ۲۱ روز

نتایج قبلی محققان حاضر نشان داد که BIO علاوه بر اثر کاهشی در شاخص‌های استخوانی، تعداد سلول‌های در حال تمایز را نیز کاهش می‌دهد. به‌منظور بررسی دقیق‌تر سلول‌های USSC با همان گروه‌بندی ذکر شده در جدول ۲، به مدت ۲۱ روز تیمار شدند و میزان بقای سلولی در روزهای ٤، ۷، ١٤ و ۲۱ با استفاده از روش MTT بررسی شد. همان‌طور که در شکل ۸ مشاهده می‌شود، در روزهای ٤ و۷ میزان بقای سلولی در سلول‌هایی که تنها محیط تمایزی استخوانی (گروه تیمار) را دریافت کرده‌اند، تفاوت معنی‌داری با سلول‌های گروه کنترل نشان نمی‌دهد، ولی در روزهای ١٤ و ۲۱ بقای سلول‌های گروه تیمار افزایش معنی‌داری را نسبت به گروه کنترل نشان می‌دهد. این نتایج نشان می‌دهد که نه تنها محیط تمایز استخوانی بقای سلولی را کاهش نمی‌دهد بلکه باعث افزایش تعداد سلول‌ها نیز می‌شود. در مورد سلول‌هایی که علاوه بر محیط تمایزی، BIO نیز دریافت کرده بودند، نتایج نشان داد که ٤ و ۷ روز پس از کشت سلول‌ها، میزان بقای سلول‌ها در سلول‌هایی که غلظت ۲ میکرومولارBIO را دریافت کرده‌اند، نسبت به سلول‌های گروه تیمار کاهش معنی‌داری را نشان می‌دهد. این در حالی بود که میزان بقا در سلول‌های گروه ۱ میکرومولار BIO تغییری را نسبت به گروه تیمار نشان نداد. در روز ١٤میزان بقای سلول‌های هر دو گروه BIO کاهش معنی‌داری را نسبت به گروه تیمار نشان داد و در روز ۲۱ میزان بقا تن‌ها در گروه ۲میکرومولارBIO نسبت به گروه تیمار کاهش یافته بود. به این ترتیب می‌توان نتیجه گرفت که غلظت ۲ میکرومولار BIO سبب کاهش توانایی زیستی سلول‌ها در مقایسه با گروه‌های تیمار استخوانی شده است. البته این میزان کاهش هرگز به ۵۰ درصد سلول‌های گروه تیمار نرسید که به عنوان دوز سمی محسوب شود.



شکل ۸. نتایج مربوط به آزمون MTT گروه‌هایی که تحت تیمار استخوانی قرار گرفته بودند. همان‌طور که مشاهده می‌شود در روز ٤، ۷ و ۲۱ اختلاف معنی‌داری بین گروه تیمار استخوانی و گروه ۲ میکرومولار BIO دیده می‌شود. در روز ١٤ این اختلاف بین گروه تیمار استخوانی و هردو غلظت BIO مشاهده می‌شود (*: $p<0.05$).

بحث

با توجه به کمبود اطلاعات و گزارش‌های ضد و نقیض در خصوص نقش مسیر اصلی سیگنال دهی Wnt در تمایز سلول‌های بنیادی به سلول‌های استخوانی، در پژوهش حاضر با استفاده از BIO به‌عنوان مهار کننده GSK3-β و درنتیجه تقلید کننده مسیر Wnt، نقش این مسیر برای اولین بار در سلول‌های USSC بررسی شد.

نتایج به دست آمده در این پژوهش نشان داد که BIO توانایی زیستی سلول‌های USSC در حال تمایز به سلول‌های استخوانی را به صورت وابسته به غلظت کاهش می‌دهد و اینکه اثر BIO در تمایز سلول‌های USSC به سلول‌های استخوانی، بسته به مرحله تمایزی سلول‌ها متفاوت است.

کاهش توانایی زیستی سلول‌های USSC در حال تمایز به استخوان توسط BIO به صورت وابسته به غلظت

نتایج حاصل از آزمون MTT نشان داد که غلظت ۲ میکرومولار BIO به همراه محیط تمایزی استخوان در کلیه روزها سبب کاهش توانایی زیستی سلول‌ها می‌شود. این نتایج گزارش‌های قبلی مبنی بر نقش BIO در کاهش توانایی زیستی سلول‌ها را تأیید می‌کند[۱۵]. غلظت ۱ میکرومولار BIO تنها در روز ١٤ اثر کاهندگی بر توانایی زیستی سلول‌های USSC در حال تمایز به استخوان را دارد و در سایر روزها تفاوت معنی‌داری در توانایی زیستی این سلول‌ها ایجاد نمی‌کند. این نتایج نیز یافته‌های قبلی مبنی بر اثر وابسته به غلظت BIO در میزان اثر بر توانایی زیستی سلول‌ها را تأیید می‌کند [۱۵].

بنابراین به‌نظر می‌رسد که BIO به‌عنوان مهارکننده GSK-3β و شبیه‌ساز مسیر سیگنال‌دهی Wnt با پایدار کردن β-catenin سیتوپلاسمی و رونویسی بیشتر ژن‌های مربوط به آن سبب کاهش توانایی زیستی سلول‌های در حال تمایز به استخوان می‌شود. مطالعات انجام شده توسط اولمدا (Olmeda) و همکارانش نیز این نتیجه‌گیری را تأیید می‌کند[١٦].

تفاوت اثر BIO در تمایز سلول‌های USSC به سلول‌های استخوانی، بسته به مرحله تمایزی سلول‌ها

نتایج حاصل از جذب رنگ Alizarin red نشان داد که در حضورBIO ، میزان تولید ماتریکس معدنی در روز ۲۱ کاهش معنی‌داری نسبت به نمونه تیماری همان روز می‌یابد و این به این معنی است که مهار GSK-3β در نهایت سبب کاهش تولید ماتریکس معدنی و در نتیجه تمایز سلول‌های USSC به سمت سلول‌های استخوانی می‌شود. در تأیید نتایج فوق، بررسی بیان ژن‌های اختصاصی تمایز به استخوان نشان داد که BIO پس از ۲۱ روز به‌طور کلی سبب کاهش معنی‌دار بیان این ژن‌ها می‌شود. بنابراین براساس این نتایج می‌توان نتیجه گرفت که BIO تمایز سلول‌های USSC به سلول‌های استخوانی را پس از ۲۱ روز کشت کاهش داده است. در تأیید این نتایج بوئر (Boer) و همکاران [۹] نشان دادند که در حضور لیتیم به عنوان مهارکننده GSK3-β و همچنین در حضور مولکول Wnt3a (القاکننده مسیر اصلی سیگنال دهی Wnt)، تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی انسانی به سلول‌های استخوانی مهار می‌شود.

درحالی‌که BIO اثر قابل ملاحظه‌ای در ترشح ماتریکس سلول‌های USSC در روزهای ٤، ۷ و ١٤ پس از کشت نداشت ولی بررسی نتایج RT-PCR نشان داد که بیان ژن‌های اختصاصی استخوانی توسط BIO افزایش یافته است. این نتایج نشان می‌دهد که BIO اثر دوگانه‌ای (وابسته به مرحله تمایزی) در تمایز استخوانی دارد. به این ترتیب که در ابتدا سبب افزایش بیان نشانگرهای تمایزی اولیه و در انت‌ها سبب کاهش تمایز سلولی می‌شود. گزارش‌های متعددی مبنی بر اثر دوگانه مسیر Wnt بر تمایز سلول‌های بنیادی به استخوان وجود دارد به این ترتیب که فعال شدن این مسیر ابتدا نقش افزاینده و سپس نقش کاهنده بر تمایز استخوانی دارد [۱۷]. به صورت دقیق‌تر تا حدود روز ١٤ نقش Wnt بر تمایز سلول‌های استخوانی افزاینده و پس از آن کاهنده است.

از آنجایی‌که BIO مهارکننده GSK3-β و در واقع فعال کننده مسیر اصلی Wnt است، بنابراین نتایج این پژوهش پیشنهاد می‌کند که مسیر اصلی Wnt می‌تواند نقش دوگانه در تمایز سلول‌های USSC به سلول‌های استخوانی داشته باشد.

با توجه به موارد یاد شده می‌توان نتیجه‌گیری کرد که BIO به‌طور کلی نقش کاهنده بر میزان بقای سلول‌های USSC و همچنین تمایز آن‌ها به سلول‌های استخوانی دارد و همان‌طور که گفته شد این نتایج مطالعات قبلی در این زمینه را تأیید می‌کند [۱۵]. البته برای تأیید بیشتر نتایج به‌دست آمده در این پژوهش می‌توان در مطالعات آینده از روش‌های مولکولی دقیق‌تری مانند Real-time PCR استفاده کرد و همچنین با اثر پروتئین‌های نوترکیب Wnt نقش مسیر سیگنال‌دهی اصلی Wnt در تمایز سلول‌های USSC به سلول‌های استخوانی و چربی را به‌طور دقیق‌تر بررسی نمود.

References

1. **Evans MJ, Kaufman MH.** Establishment in culture of pluripotent cells from mouse embryos. Nature 1981; 292: 154-6.
2. **Kogler G, Sensken S, Airey JA ,Trapp T, Muschen M, Feldhahn N, et al.** A new human somatic stem cell from placental cord blood with intrinsic pluripotent differentiation potential. J Exp Med 2004; 200: 123-35.
3. **Degistirici O, Jager M, Knipper A.** Applicability of cord blood-derived unrestricted somatic stem cells in tissue engineering concepts. Cell Prolif 2008; 41: 421-40.
4. **Jager M, Zilkens C, Bittersohl B, Krauspe R.** Cord blood-an alternative source for bone regeneration. Stem Cell Rev 2009; 5: 266-77.
5. **Aubin J.** Mesenchymal stem cells and osteoblast differentiation. Principles of Bone Biology 2008; 3: 85-100.
6. **Nusse R.** Wnt signaling in disease and in development. Cell Res 2005; 15: 28-32.
7. **Meijer L, Skaltsounis AL, Magiatis P, Polychronopoulos P, Knockaert M, Leost M.** GSK-3 selective inhibitors derived from Tryian purple indirubins. Chem Biol 2003; 10: 1-2.
8. **Li HX, Lou X, Liu RY, Yang GS.** Roles of wnt/β-catenin signaling in adipogenic differentiation potential of adipose-derived mesenchymal stem cells. Mol Cell Endocrin 2008; 291:116-24.
9. Boer JD, Siddappa R, Gaspar C, van Apeldoorn AV, Fodde R, van Blitterswijk C. Wnt signaling inhibits osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. Bone 2004; 34: 818-26.
10. **Gilbert FS.** Developmental Biology. 7th ed. Sinauer Associates, Inc 2006 455-7.
11. **Fallahi-Sichani M, Soleimani M, ArabNajafi SM, Kiani J, Arefian E, Atashi A.** In vitro differentiation of cord blood unrestricted somatic stem cells expressing dopamine- associated genes into neuron-

like cells. Cell Biol Int 2007; 31: 299-303.

12. **Mikels AJ, Nusse R.** Wnts as ligands: processing, secretion and reception. Oncogene 2006; 25, 7461-8.
13. **Kelber M, Sommer L.** Wnt signaling and the regulation of stem cell function. Curr Opin Cell Biol 2004; 16: 681-7.
14. **Vahid Dastjerdi F, Parvaneh Tafreshi A, Mahmoudi N, Soleimani M, Zeynali B.** Differentiation of USSC into dopaminergic neurons by inhibition. Mech Dev 2009; 126: S271-84.
15. **Zaragosi LE, Wdziekonski B, Fontaine C, Villageois P, Peraldi P, Dani C.** Effects of of GSK3 inhibitors on in vitro expansion and differentiation of human adipose-derived stem cells into adipocytes. BMC Cell Biol 2008; 9:11-20.
16. **Olmeda D, Castel S, Vilaro S, Cano A.** Beta-catenin regulatin during the cell cycle:implications in G2/M and apoptosis. Mol Biol Cell 2003; 14, 2844-60.
17. **Rodda SJ, McMahon AP.** Distinct role for hedgehog and canonical wnt signaling in specification, differentiation and maintenance of osteoblast progenitors. Development 2006; 133: 3231-44.