

مهار عملکردی ژن نوکلئوستمین – یک کنترل کننده توانائی خودبازسازی – در سلول‌های بنیادین مزانشیمی مغز استخوان با واسطه استراتژی RNAi

سید مهدی جعفر نژاد M.Sc.*، سید جواد مولی Ph.D.*، مریم مقدم متین Ph.D.**

* دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم پایه، گروه ژنتیک

** دانشگاه فردوسی، دانشکده علوم، گروه زیست‌شناسی، موسسه تحقیقات بیوتکنولوژی

وصول: مردادماه ۸۵، پذیرش: مهرماه ۸۵

چکیده

هدف: مهار بیان ژن نوکلئوستمین به عنوان فاکتوری موثر در توانائی خودبازسازی سلولهای بنیادین و انواعی از رده‌های سلول سرطانی در سلولهای بنیادین مزانشیمی مغز استخوان به وسیله استراتژی RNAi برای بررسی اثرات عدم حضور است. **مواد و روشها:** siRNA دورشتهای اختصاصی نوکلئوستمین و کنترل، طراحی و از طریق لیپوفکشن وارد سلولهای مزانشیمی مغز استخوان موش صحرایی شدند. تغییرات در بیان ژنها پس از مهار نوکلئوستمین با کمک RT-PCR، ایمونوسیتوشیمی و وسترن بلات بررسی گردیدند. همچنین تغییرات در نرخ تکثیر سلولی و نیز توزیع سلولها در فازهای چرخه سلولی مطالعه شدند. **یافته‌ها:** سلولهای استخراج شده مورفولوژی فیبروبلاستی داشته و قادر به تمایز به سلولهای شبه عصبی بوده و ژنهای اختصاصی سلولهای بنیادین و رده مزانشیمی را بیان می‌نمایند. بیان نوکلئوستمین پس از ترانسفکشن با siRNA اختصاصی کاهش قابل توجهی می‌یابد که همراه با کاهش تکثیر سلولی، ورود سلولها به فاز خفتگی و کاهش بیان ژنهای cyclin D1 و survivin می‌باشد. **نتیجه‌گیری:** بررسی نشان داد که ورود الیگوهای siRNA اختصاصی نوکلئوستمین به سلولهای کشت داده شده، موفقیت‌آمیز بوده و سبب کاهش بیان نوکلئوستمین شده است. تغییرات در نرخ تکثیر سلولی، نمایه فازهای چرخه سلولی و بیان برخی ژنهای موثر در فرایند خودبازسازی نشان‌دهنده نقش بالادستی نوکلئوستمین در کنترل خودبازسازی در سلولهای مزانشیمی مغز استخوان است.

کلید واژه‌ها: نوکلئوستمین، سلول بنیادین، RNAi، خودبازسازی

مقدمه

کامل و قطع و وصل در زمان‌های دقیق دارند، نقشی فعال ایفاء می‌نمایند [۱]. نوکلئوستمین یکی از جدیدترین اعضاء خانواده پروتئین‌های متصل شونده به GTP است. این پروتئین

پروتئین‌های متصل شونده به GTP (Guanosine-Tri-Phosphate) از فاکتورهای تنظیمی پراهمیتی هستند که در مکانیسمهای متفاوت سیگنال‌رسانی و نیز در مسیرهایی که نیاز به کنترل

آدرس مکاتبه: تهران، دانشگاه تربیت مدرس دانشکده علوم پایه، گروه ژنتیک

E-mail: sjmowla@yahoo.com

سلولهای موجود در جمعیت در فازهای مختلف چرخه سلولی بررسی خواهد شد. علاوه بر آن تغییرات در بیان برخی از ژنهای مهم و شناخته شده در کنترل فرایندهای تکثیر و تقسیم سلولی نیز مورد بررسی قرار خواهد گرفت.

مواد و روشها

جداسازی و کشت سلولهای بنیادین مزانشیمی

مغز استخوان موش صحرایی

موشهای صحرایی جوان (۳-۱ ماه) از موسسه تحقیقاتی رازی (کرج، ایران) تهیه شدند. برای استخراج سلول مطابق گزارشهای قبلی [۱۰] پس از کشتن موش، اندامهای تحتانی تشریح، استخوانهای ران و ساق پا خارج و بقایای ماهیچهها و سایر متعلقات از آن جدا شدند. سپس استخوانهای تمیز شده در پتری دیش حاوی PBS (Phosphate Buffer Saline) سرد قرار داده شده و سریعاً به زیر هود کشت سلول انتقال داده شدند. پس از آن دو انتهای استخوانها با کمک قیچی استخوان بر قطع و از طریق فروبردن سرسرنگ در یکی از دو انتهای استخوان و تزریق همراه با فشار محیط کشت به داخل استخوان محتوای آن در فلاسک کشت سلول تخلیه شد. سپس سرم تا غلظت ۲۰ درصد به محیط کشت افزوده شده و فلاسک به انکوباتور کشت سلول با دمای ۳۷ درجه سانتیگراد و هوای مرطوب حاوی ۵ درصد CO₂ منتقل شد. محیط کشت سلولها در روز بعد تخلیه و پس از شستشو با PBS (Phosphate Buffer Saline) محیط کشت جدید به آن افزوده شد.

محیط کشت سلولها در هر ۲-۳ روز با محیط جدید حاوی سرم ۲۰ درصد تعویض و پس از پر شدن فلاسک، سلولها به نسبت ۱:۳ پاساژ داده شدند.

RNA interference

برای طراحی الیگوهای siRNA از نرم افزار siRNA design موجود در پایگاه اینترنتی موسسه Whitehead دانشگاه MIT

تک زیرواحدی که به صورت عمده در داخل هستک و به صورت کم رنگی در شیره هسته حضور دارد با کمک مکانیسم اتصال به مولکول GTP و هیدرولیز آن، بین هستک و نوکلئوپلاسم مهاجرت می نماید [۲]. بیان ژن نوکلئوستمین تاکنون در سلولهای بنیادین جنینی و انواع متعددی از سلولهای بنیادین بالغ گزارش گردیده است [۵-۲]. علاوه بر آن بیش بیان این ژن در بافت های سرطانی مختلف و نیز انواع متعددی از رده های سلولی سرطانی گزارش شده است [۸-۶]. همچنین مشاهده شده است که بیان آن در طی باززایی اندامهای قطع شده موجوداتی همانند سمندر افزایش قابل توجهی می یابد [۹]. با این حال تاکنون گزارش درخور توجهی از بیان آن در سلولهای تمایز یافته غیر ترانسفورم شده ارایه نشده است. با توجه به این مشاهدات و نیز این واقعیت که بیان نوکلئوستمین در حین تمایز سلولهای بنیادین، در مرحله سلولهای پیش ساز و پیش از خاموشی ژن های دخیل در پیش برد تکثیر سلولی نظیر PCNA، متوقف می شود، از این ژن به عنوان یک مارکر سلولهای بنیادین نام برده می شود [۲].

نوکلئوستمین بیان به نسبت بالایی در سلولهای بنیادین مزانشیمی مغز استخوان دارد. اما به فاصله چند ساعت پس از القای تمایز عصبی در این سلولها بیان آن خاموش می شود [۳]. با این حال این حقیقت روشن نیست که آیا توقف بیان نوکلئوستمین در حین فرایند تمایز، یک عامل خروج سلولهای فوق از چرخه سلولی است و یا خود به عنوان یک اثر ثانویه و جانبی حاصل از فرایند تمایز و توقف چرخه سلولی است؟ هدف از تحقیق حاضر آن است تا پس از استخراج و کشت سلولهای مزانشیمی مغز استخوان موش صحرایی، بیان ژن نوکلئوستمین در این سلولها از طریق ترانسفکشن با الیگونوکلوئوتیدهای سنتزی siRNA مورد اخلاص قرار گرفته و تاثیرات این تیمار در وحله اول بر میزان رشد و تکثیر این سلولها سنجیده شود. سپس با به کارگیری تکنیک فلوسیتومتری نتایج مهار بیان ژن نوکلئوستمین بر روی توزیع

میکرولیتر از محیط α -MEM^۱ بدون سرم و آنتی‌بیوتیک به هر چاهک حاوی سلول‌های آماده شده برای ترانسفکشن منتقل گردید. پس از گذشت ۴ ساعت، ۰/۵ میلی‌لیتر محیط کشت حاوی ۶۰ درصد سرم به هر چاهک اضافه و در هر روز محیط کشت سلولها با محیط تازه تعویض شد.

استخراج RNA تام سلولی و RT-PCR

RNA تام سلولی ۲۴ ساعت پس از انجام ترانسفکشن، با کمک کیت RNX plus (سیناژن، تهران) از دو گروه سلول‌های ترانسفکت شده با siRNA اختصاصی نوکلئوستمین (NS) و siRNA کنترل (IR) استخراج شد. برای ساخت cDNA از ۱/۰ RNA تام در حجم واکنش ۲۰ μ l با کمک هگزامر تصادفی و آنزیم RevertAidTM M-MuLV (Fermenras) و بر اساس پروتکل ارائه شده توسط کمپانی استفاده شد.

پس از انجام واکنش رونویسی معکوس، به منظور تکثیر قطعه مورد نظر واکنش PCR با استفاده از ۲ μ l از cDNA تهیه شده به همراه ۱ واحد آنزیم Taq (Fermentas) و $MgCl_2$ به غلظت ۱.۵mM، dNTPs به غلظت ۲۰۰، ۲/۵ μ l میکرولیتر از بافر آنزیم، ۱۰pm از هر پرایمر و آب در حجم ۲۵ μ l انجام گرفت. ترادف پرایمرهای به کار رفته به شرح زیر است:

NS (NM-175580):

Forward: TCCGAAGTCCAGCAAGTATTG

Reverse: AATGAGGCACCTGTCCACTC

Cyclin D1 (NM-171992):

Forward: ATGTTCGTGGCCTCTAAGATG

Reverse: TGCGGATGATCTGCTTGTTT

Survivin (NM-022274):

Forward: TCTACACCTTCAAGAACTGGC

Reverse: CTGGAAAGCTGGGACAAGTG

Beta 2 microglobulin (NM-012512):

Forward: CCGTGATCTTCTGCTGCTT

Reverse: TTTTGGGCTCCTTCAGAGTG

استفاده شد. ترادفهای پیشنهادی برای siRNA اختصاصی نوکلئوستمین (NS) به وسیله نرم‌افزار BLAST در برابر پایگاه اطلاعاتی ژنوم موش صحرایی جهت جستجوی ترادفات غیراختصاصی احتمالی استفاده شد. پس از بررسی مشخص شد که در هیچ‌کدام از توالی‌های گزارش شده مرتبط با موش صحرایی (به استثناء mRNA ژن نوکلئوستمین) مشابهتی بیش از ۱۵ نوکلئوتید از مجموع ۲۱ نوکلئوتید وجود ندارد. علاوه بر این یک siRNA نامرتبط (IR) نیز با همین مشخصات طراحی شد که طی BLAST مشخص شد که دارای هیچ‌گونه توالی بیش از ۱۵ نوکلئوتید مکمل در ژنوم موش صحرایی نیست. توالی siRNA های طراحی شده به شرح زیر است:

NS:

GAACUAAAACAGCAGCAGAdTdT Sense:

UCUGCUGCUGUUUUAGUUCdTdT Antisense:

IR:

Sense: CUGAUGCAGGUAAUCGCGUdTdT

Antisense: ACGCGAUUACCUGCAUCAGdTdT

سنتز الیگوها توسط شرکت Qiagen انجام پذیرفت.

برای انجام ترانسفکشن سلولها به تعداد ۴۰۰۰۰ سلول به ازاء هر چاهک پلیت ۶-خانه به همراه ۳ میلی‌لیتر از محیط کشت حاوی سرم و فاقد آنتی‌بیوتیک کشت داده شدند. در روز بعد محیط کشت سلولها تخلیه و با PBS شستشو داده شدند. سپس الیگوهای siRNA در غلظت ۲۰ μ M به میزان ۱۰ میکرولیتر (NS و یا IR) به ۱۷۵ میکرولیتر Opti-MEM اضافه شد. در یک تیوپ جداگانه ۴ میکرولیتر از الیگوفکتامین (Invitrogen) و ۱۱ میکرولیتر از Opti-MEM به ازای هر چاهک با یکدیگر مخلوط و پس از پیمتاژ کامل در مکان ثابت به مدت ۵ دقیقه انکوبه شدند. آنگاه این محلولها با یکدیگر مخلوط و سوسپانسیون حاصله به مدت ۲۰ دقیقه در دمای اتاق به صورت ثابت نگهداری شد. در پی آن کل سوسپانسیون به همراه ۸۰۰

1. α - Minimum Essential Medium

تریپسین جداسازی و با استفاده از لام هموسیتومتر شمارش شدند.

بررسی چرخه سلولی

سلولها ۲۴ ساعت پس از ترانسفکشن تریپسینه شده و با اتانول ۷۰ درصد تثبیت شدند. سپس در محلول ۶۰ mg/ml آیدید پروپیدیم (Sigma) حاوی 20 mg/ml RNase A (Fermentas) به مدت ۳۰ دقیقه رنگ آمیزی و با کمک دستگاه فلوسیتومتر (Becton Dickinson) آنالیز و نتایج حاصل با نرم افزار WinMDI (ویرایش ۲/۸) تفسیر شدند.

یافته‌ها

سلولهای مزانشیمی مغز استخوان در شرایط سترون از استخوانهای ران و ساق پای موش صحرایی جوان استخراج و در فلاسکهای T75 وارد شدند. در روز بعد بدنبال تعویض محیط کشت سلولها (αMEM همراه با ۲۰٪ سرم جنینی گاو) همراه با شستشو با PBS سلولهای گرد متعلق به رده خون ساز خارج و تعداد معدودی سلول با مورفولوژی فیبروبلاستی در محیط باقی می ماند. به تدریج در روزهای بعد این سلولها تکثیر شده و کلونیهای پراکندهای در اطراف خود تشکیل می دهند. رشد این سلولها فزاینده بوده و در عرض چند روز سطح فلاسک را می پوشانند. سلولهای استخراج شده تعدادی از ژنهای مارکر رده مزانشیمی همانند کلاژن نوع Ia و ویمنتین را در کنار برخی از مارکرهای سلولهای بنیادین همانند نوکلئوستیمین بیان می نمایند، اما بیان ژنهای OCT4 و Nanog که از مارکرهای سلولهای بنیادین جنینی هستند در آنها قابل تشخیص نیست [۳].

اختلال در بیان نوکلئوستیمین با واسطه

استراتژی RNAi

در آزمایش RNAi از siRNA طراحی شده اختصاصی ژن نوکلئوستیمین (NS) و نیز یک siRNA نامرتبط (IR/Irrelevant)

میزان بیان ژن Beta 2 microglobulin به عنوان کنترل داخلی استفاده و محصولات PCR روی ژل آگارز ۱/۵ درصد جداسازی و پس از رنگ با اتیدیوم بروماید عکسبرداری شدند.

ایمنوسیتوشیمی

برای انجام ایمنوسیتوشیمی ابتدا سلولها بر روی لاملهای پوشانده شده با کلاژن کشت داده شده و پس از انجام تیمارهای مورد نظر، ۲۴ ساعت پس از ترانسفکشن با محلول پارافرمالدهید ۴ درصد به مدت ۲۰ دقیقه تثبیت شدند. پس از طی مراحل نفوذپذیرسازی، غیر فعال کردن پراکسیدازهای داخلی و مهار اتصالات غیراختصاصی با کمک BSA^۱، با آنتی-بادی منوکلونال اختصاصی نوکلئوستیمین (R&D system) و سپس با آنتی بادی ثانویه متصل به HRP (Abcam) انکوبه و در نهایت سیگنالها با استفاده از DAB شناسایی شدند.

وسترن بلات

پروتئین تام سلولی با استفاده از بافر RIPA (-Tris mM ۵۰، ۱۵۰ mM NaCl، ۱ mM EDTA، ۱٪ DOC، ۱٪ SDS، ۰/۱ mM PMS) استخراج و با کمک SDS-PAGE بر روی ژل ۱۲/۵٪ جداسازی شدند. سپس انتقال به روی غشای PVDF (Amersham) انجام و مهار واکنشهای غیر اختصاصی با کمک ترکیب مهاری کیت ECL (Amersham) به مدت ۲ ساعت انجام گرفت. در مرحله بعد بلات ابتدا با آنتی-بادی منوکلونال اختصاصی نوکلئوستیمین (R&D system) و سپس با آنتی بادی ثانویه متصل به HRP^۲ انکوبه و در نهایت سیگنالها با کمک کیت ECL (Amersham) مشخص شدند.

آنالیز رشد سلولی

۲۴ و ۴۸ ساعت پس از انجام ترانسفکشن، سلولها با کمک

1. Bovin Serum Albumin

2. Horse Radish Peroxidase

سلولهای ترانسفکت شده با NS-siRNA بیان پروتئین نوکلئوستمین به شدت کاهش یافته است اما سلولهایی که به هر دلیلی ترانسفکت نشده‌اند، هنوز بقایای این پروتئین را دارا هستند (شکل ۱-۱C).

کاهش نرخ تکثیر سلولی در پی مهار بیان نوکلئوستمین

شمارش سلولهای دو گروه NS و IR با کمک لام هموسیتومتر در زمان‌های ۲۴ و ۴۸ ساعت پس از انجام ترانسفکشن انجام گرفت. مقایسه کلی نشان می‌دهد که در حالی که تعداد مساوی ۴۰۰۰۰ سلول در هر کدام از چاهک‌ها وارد شدند اما پس از گذشت زمان تعداد سلولها در دسته IR از گروه NS پیشی می‌گیرد. به طوری که پس از گذشت ۴۸ ساعت از زمان ترانسفکشن، تعداد سلولها در گروه IR ($12.4 \pm 0.4 \times 10^4$) به میزان ۱۵ درصد بیش از گروه NS ($10.6 \pm 0.5 \times 10^4$) است (نمودار ۱).

مطالعه تغییرات در چرخه سلولی در پی مهار بیان نوکلئوستمین

نتایج آنالیز چرخه سلولی با دستگاه فلوسیتومتری نشان‌دهنده آن است که اختلال در بیان ژن نوکلئوستمین سبب تغییر در نسبت توزیع سلولها در فازهای مختلف چرخه می‌شود. بر این اساس مشخص شد که در ساعت ۲۴ پس از مهار، میزان سلولهای موجود در فاز S، ۳/۶۹ درصد است که نسبت به گروه IR (۹/۵۲ درصد) کاهشی در حدود ۶/۱۷ درصد نشان می‌دهد.

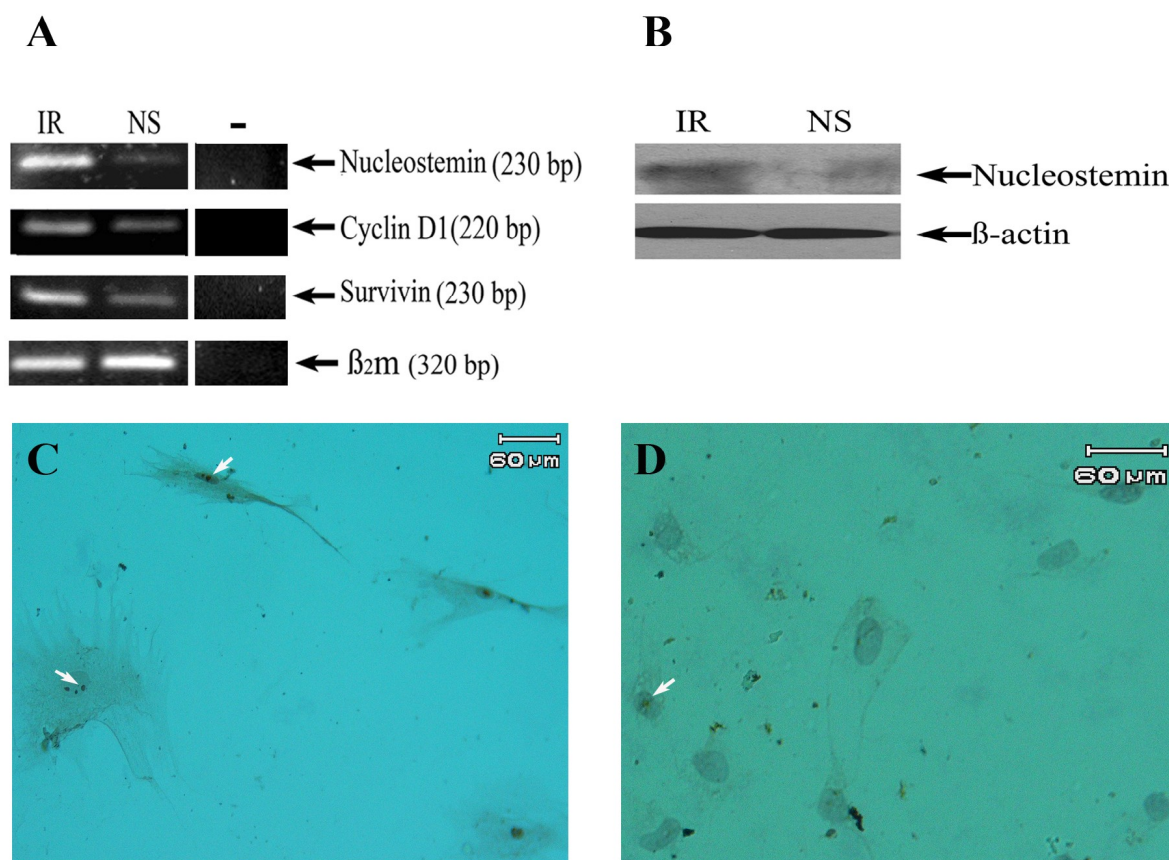
این کاهش در میزان سلولهای موجود در فاز G2/M نیز صادق بود. به طوری که این درصد در گروه NS (۱۲/۱۳ درصد) به میزان ۳/۹۹ درصد کمتر از گروه IR (۱۶/۵۲ درصد) است

برای نرمالیزه کردن آثار غیراختصاصی احتمالی فرایند RNAi استفاده شد. در همه موارد آنالیز بر روی نمونه‌های ترانسفکت شده با NS-siRNA همراه با نمونه‌های ترانسفکت شده با IR-siRNA در شرایط مشابه صورت گرفت تا از مداخله اثرهای غیراختصاصی RNAi در تفسیر نتایج جلوگیری به عمل آید.

آنالیز RT-PCR نیمه کمی بیان ژن نوکلئوستمین پس از ترانسفکشن نشان داد که میزان بیان در ساعت ۲۴ در گروه NS به میزان ۷۰-۸۵ کمتر از گروه IR است (شکل ۱-۱A).

به منظور مطالعه اثر تغییرات کاهش در بیان mRNA سلولی ژن نوکلئوستمین بر میزان بیان پروتئین نوکلئوستمین نیز از تکنیک وسترن بلات بهره گرفته شد. بدین منظور پروتئینها ابتدا توسط الکتروفورز ژل پلی اکریل آمید ۱۲/۵ درصد از یکدیگر جدا شده و پس از انتقال به غشاء توسط آنتی بادی پلی کلونال اختصاصی پروتئین نوکلئوستمین ردیابی شدند. در این مورد نیز برای حصول اطمینان از هم اندازه بودن میزان پروتئین تام وارد شده در هر چاهک، از میزان بیان پروتئین β actin به عنوان کنترل داخلی استفاده شد. نتیجه نهایی بیانگر کاهش میزان بیان این پروتئین در اثر تیمار با siRNA اختصاصی نوکلئوستمین است. این در حالی است که تفاوت قابل ملاحظه‌ای در شدت باند β actin در دو نمونه مشاهده نمی‌شود که نمایانگر از تساوی در میزان بارگیری پروتئینها در دو چاهک می‌باشد (شکل ۱-۱B).

به منظور آزمون اختصاصیت آنتی بادی پلی کلونال به کار برده شده در آزمایش وسترن بلات - با توجه به جایگاه مشخصه هستکی پروتئین نوکلئوستمین - و نیز چگونگی توزیع سلولهایی که دارای بیان کاهش یافته از پروتئین نوکلئوستمین در اثر ترانسفکشن با siRNA اختصاصی هستند از روش ایمنوسیتوشیمی استفاده شد. نتایج بررسی ایمنوسیتوشیمی نشان داد که سیگنالهای قوی هستکی (مطابق انتظار) به تعداد مختلف در عمده سلولهای گروه IR قابل مشاهده‌اند. در حالی که در گروه NS تعداد کمی از سلولها، دارای سیگنال مشابه بودند. این موضوع می‌تواند نشانگر آن باشد که در

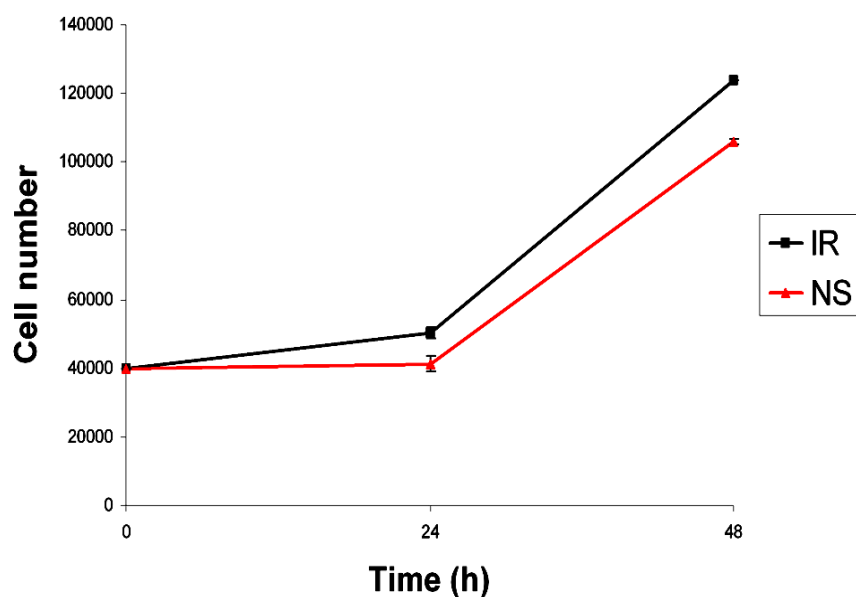


شکل ۱. (A) آنالیز RT-PCR ژنهای نوکلئوستمین، cyclin D1 و survivin. سطح بیان ژن $\beta 2m$ به عنوان کنترل داخلی استفاده شده است. (B) آنالیز وسترن بلات بیان پروتئین نوکلئوستمین در گروه‌های IR و NS. میزان بیان پروتئین β -actin به عنوان کنترل داخلی استفاده شده است. (C) رنگ‌آمیزی ایمنوهیستوشیمی سلولهای گروه IR با استفاده از آنتی‌بادی ضد نوکلئوستمین. پیکان‌ها نشان دهنده سیگنالهای مربوط به نوکلئوستمین هستند. (D) رنگ‌آمیزی ایمنوهیستوشیمی سلولهای گروه NS با استفاده از آنتی‌بادی ضد نوکلئوستمین.

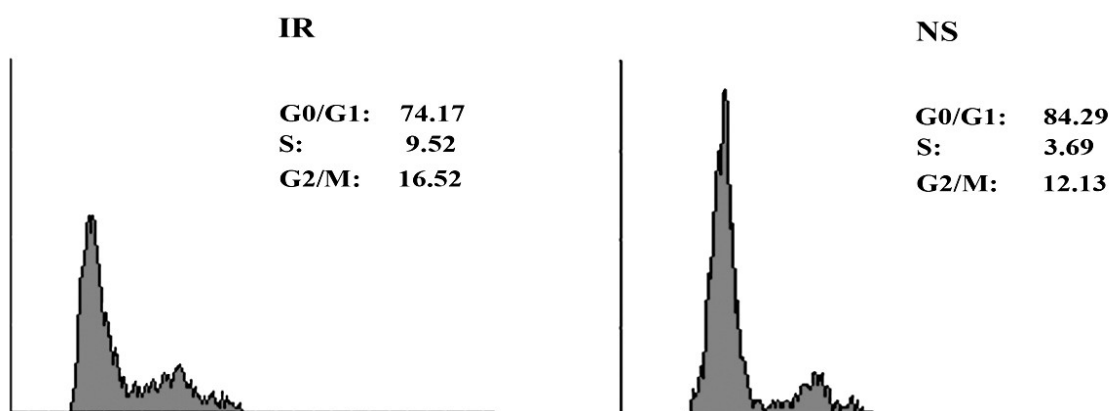
تغییرات بیان ژنهای cyclin D1 و surviving در پی مهار نوکلئوستمین

آنالیز RT-PCR نشان دهنده کاهش ۵۰-۴۰ درصدی در میزان بیان mRNA کد شده توسط ژن cyclin D1 در گروه NS در مقایسه با گروه IR در اثر مهار بیان ژن نوکلئوستمین است (شکل ۱-۲). نتیجه مشابهی نیز از آنالیز RT-PCR ژن survivin به دست آمد (شکل ۱-۳).

اما این اختلافات در مورد فاز G0/1 جهت متفاوتی دارد. بدین ترتیب که درصد سلولهای موجود در فاز G0/1 در گروه NS (۸۴/۲۹ درصد) در حدود ۱۰/۱۲ درصد بیش از گروه IR (۷۴/۱۷ درصد) است (نمودار ۲). شمای کلی نشان‌دهنده کاهش در میزان سلولهای موجود در فاز S و G2/M و افزایش در میزان سلولهای موجود در فاز G0/1، در اثر کاهش بیان نوکلئوستمین است.



نمودار ۱. نمایه رشد سلولی در دو گروه NS و IR در ساعات ۲۴ و ۴۸ پس از ترانسفکشن



نمودار ۲. آنالیز چرخه سلولی. توزیع و درصد سلولها در فازهای G1/0, S و G2/M در قسمت مربوطه مشخص شده است

بحث

موضوع مورد سوال واقع شد که نقش نوکلئوستمین در بروز این پدیده در چه سطحی است؟ و اینکه عدم بیان یا اختلال در بیان این ژن چه تاثیری بر قابلیت تکثیر سلول‌های فوق خواهد داشت؟ شمارش سلولی در پی مهار بیان ژن نوکلئوستمین نشان داد که

از آنجا که در مطالعات یعقوبی و همکاران مشاهده شد که در حین تمایز عصبی سلولهای بنیادین مزانشیمی مغز استخوان و خروج این سلولها از چرخه سلولی، بیان ژن نوکلئوستمین به سرعت کاهش یافته و در نهایت متوقف می‌شود [۳]، این

مهار نوکلئوستمین سبب القای کاهش در نرخ تکثیر سلولها می شود و این کاهش تا حدود ۱۵ درصد از کل جمعیت سلولها را شامل می شود. نکته جالب توجه در این زمینه، عدم همخوانی نتایج شمارش سلولی در این مطالعه با یافته های یک تحقیق مشابه توسط کافینه (Kafieneh) و همکاران است [۵]. در پژوهش انجام شده توسط گروه فوق مشخص شد که مهار بیان نوکلئوستمین با کمک استراتژی RNAi تاثیری بر میزان تکثیر سلولهای بنیادین مزانشیمی انسانی ندارد، در حالی که در مطالعه حاضر تیمار فوق سبب کاهش ۱۵ درصدی در شمارگان سلولی شد. علت تفاوت مشاهده شده می تواند اختلاف احتمالی در بیولوژی سلولهای بنیادین مزانشیمی مغز استخوان موش صحرایی و انسان یا تفاوت در روشهای به کار برده شده در حین انجام آزمایشهای باشد. از تفاوت روشهای انجام این دو مطالعه، میزان بسیار پایین تر درصد سرم مورد استفاده در محیط کشت (۲ درصد) در مطالعه کافینه (Kafieneh) در مقایسه با مطالعه حاضر (۲۰ درصد) است که می تواند دلیلی برای رفتار متفاوت سلولها باشد.

کاهش مشاهده شده در نرخ تکثیر در اثر مهار نوکلئوستمین می تواند به دو علت افزایش زمان تکمیل چرخه سلولی توسط سلولها یا ایجاد وقفه در سیر سلولها در هر کدام از مراحل چرخه باشد. به منظور دستیابی به علت واقعی این پدیده از آنالیز چرخه سلولی با کمک تکنیک فلوسیتومتری استفاده شد. این روش می تواند سلولها را بر اساس محتوای DNA درون سلولی، در سه گروه G1/0، S و G2/M دسته بندی نماید. در مطالعه حاضر مشخص شد که مهار بیان نوکلئوستمین سبب افزایش قابل توجه در نسبت سلولهای واقع در فاز G1/0 به همراه کاهش متناسب با آن در میزان سلولهای واقع در فازهای S و G2/M می شود. این موضوع نشانگر القای توقف چرخه سلولی و نه افزایش زمان تکمیل چرخه در اثر مهار نوکلئوستمین است. علاوه بر این، نسبت محاسبه شده از سلولهایی که چرخه را ترک می نمایند، تقریباً هم اندازه با میزان کاهش در نرخ تکثیر سلولی اندازه گیری شده در

آزمایش تعیین شمارگان سلولی است. بنابراین، این مشاهده می تواند به عنوان تائیدی فراتر بر صحت نتایج بدست آمده از آزمایش شمارش سلولی باشد.

در کنار این بر اساس منطق ژنتیکی قابل انتظار است که کاهش القاء شده در میزان تکثیر سلولها در اثر مهار نوکلئوستمین همراه با تغییر در بیان حداقل تعدادی از ژنهای درگیر در پیش برد چرخه سلولی باشد. به همین دلیل تغییرات در بیان دو ژن cyclin D1 و survivin در دو گروه NS و IR با کمک روشی RT-PCR نیمه کمی بررسی شدند.

بیان cyclin D1 پس از پایان مرحله میتوز آغاز شده و پروتئین محصول، مسئول گذر از فاز G1 است. همچنین برخی از پژوهشگران معتقدند که این پروتئین مسئول اصلی بازگشت سلولها از فاز خفتگی (G0) به چرخه است [۱۱ و ۱۲]. بر این اساس قابل انتظار است که خروج سلولها از چرخه سلولی و ورود به فاز خفتگی همراه با قطع و یا کاهش بیان این ژن باشد. در مطالعه حاضر نیز مشاهده شد که با اختلال در بیان نوکلئوستمین و خروج برخی از سلولها از چرخه سلولی میزان بیان mRNA کد شده توسط ژن cyclin D1 نیز کاهش قابل توجهی می یابد.

survivin در ابتدا به عنوان یک فاکتور مهار کننده آپاپتوز شناسایی شد [۱۳]. در کنار نقش ضد آپاپتوزی survivin، اخیراً نقشهای پراهمیتی برای این ژن در کنترل چرخه سلولی و فرایند میتوز نیز شناسایی گردیده اند [۱۳]. سطح بیان survivin تابعی از وضعیت چرخه سلولی بوده و با آغاز G2/M افزایش یافته و با آغاز G1 کاهش می یابد [۱۴]. بر این اساس قابل انتظار است که با کاهش نسبت سلولهای با چرخه سلولی فعال در یک جمعیت میزان بیان این ژن نیز کاهش یابد. در این مطالعه و در پی مهار نوکلئوستمین، مشاهده شد که از بیان survivin نیز به میزان قابل توجهی کاسته می شود.

این دو مشاهده ضمن تائید سایر نتایج به دست آمده در این تحقیق، بیانگر وجود نوعی ارتباط در بین سطح بیان نوکلئوستمین و ژنهای survivin و cyclin D1 است. البته این

تکثیر سلولی در سلول‌های بنیادین مزانشیمی مغز استخوان موش صحرایی داشته و خاموش شدن بیان آن در حین تمایز عصبی این سلول‌ها در محیط *in vitro* می‌تواند به عنوان عاملی برای خروج سلول‌های شبه‌عصبی حاصل از چرخه سلولی و ورود به فاز خفتگی محسوب گردد. علاوه بر آن مشاهده گردید که کاهش بیان نوکلئوستمین سبب القای کاهش در بیان ژنهای دخیل در مکانیسمهای تکثیر سلولی، همانند cyclin D1 و survivin می‌شود.

تقدیر و تشکر

نویسندگان مقاله لازم می‌دانند که از راهنمایی‌های دکتر احمدرضا بهرامی و همکاری‌های خانم پروانه نیک‌پور و آقای محمد مرنندی تشکر نمایند. کلیه هزینه‌های مصرفی این تحقیق از محل بودجه تحقیقاتی شبکه سلول‌های بنیادین تامین شده است.

موضوع مشخص نیست که ماهیت این ارتباط از چه نوعی بوده و آیا اختلال در بیان cyclin D1 و یا survivin نیز آثار مشابهی بر بیان نوکلئوستمین خواهد داشت یا خیر؟ همچنین این مشاهدات نشان می‌دهند که مهار نوکلئوستمین سبب بروز تغییرات قابل توجهی در میزان رونویسی حداقل تعدادی از ژن‌های دخیل در مکانیسمهای تکثیر سلولی می‌شود. و این نکته از آن نظر حایز اهمیت می‌نماید که نوکلئوستمین جزء فاکتورهای رونویسی و یا متصل شونده به DNA نبوده و بنابراین محتمل است که اثر افزایش آن بر بیان این ژنها توسط عوامل حدواسطی که تاکنون ناشناخته مانده‌اند، انجام گیرد. بدین دلیل شناخت مکانیسم دقیق اثر نوکلئوستمین بر بیان این دسته از ژنها، می‌تواند زوایای مهمی از نحوه عملکرد آن را روشن نماید. به‌طور خلاصه، نتایج مطالعه حاضر نشان دادند که نوکلئوستمین نوعی فعالیت بالادستی در کنترل مکانیسمهای

References

1. Shirai H, Autieri M, Eguchi S. Small GTP-binding proteins and mitogen-activated protein kinases as promising therapeutic targets of vascular remodeling. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2007; 16: 111-115.
2. Tsai RY, McKay RD. A nucleolar mechanism controlling cell proliferation in stem cells and cancer cells. *Genes Dev* 2002; 16: 2991-3003.
3. Yaghoobi MM, Mowla SJ, Tiraihi T. Nucleostemin, a coordinator of self-renewal, is expressed in rat marrow stromal cells and turns off after induction of neural differentiation. *Neurosci Lett* 2005; 390: 81-6.
4. Lacina L, Smetana K, Jr, Dvorankova B, Stork J, Plzakova Z, et al. Immunocyto- and histochemical profiling of nucleostemin expression: marker of epidermal stem cells? *J Dermatol Sci* 2006; 44: 73-80.
5. Kafienah W, Mistry S, Williams C, Hollander AP. Nucleostemin is a marker of proliferating stromal stem cells in adult human bone marrow. *Stem Cells* 2006; 24: 1113-20.
6. Sijin L, Ziwei C, Yajun L, Meiyu D, Hongwei Z, Guofa H, et al. The effect of knocking-down nucleostemin gene expression on the *in vitro* proliferation and *in vivo* tumorigenesis of HeLa cells. *J Exp Clin Cancer Res* 2004; 23: 529-38.
7. Liu SJ, Cai ZW, Liu YJ, Dong MY, Sun LQ, Hu GF, et al. Role of nucleostemin in growth regulation of gastric cancer, liver