

The Effects of Glycogen Syntase Kinase-3 β Inhibitor on the Ostogenic Differentiation of Unrestricted Somatic Stem Cells (USSC)

Safarpour A., M.Sc., Zeynali B., Ph.D. *, Soleimani M., Ph.D., Parvaneh A.P., Ph.D.

**School of Biology, Sciences Faculty, Tehran University, Tehran, Iran*

Received: July 2011 Accepted: Aug 2011

Abstract

Purpose: Bone defects caused by injuries, trauma, cancer, surgical operation or joint dislocation have great impacts on general health. Considering that Wnt signalling is one of the important regulators of the stem cell control, we sought to examine if Wnt activation affects the osteogenic differentiation of the USSCs.

Materials and Methods: In this study, we have treated USSCs cultured in osteo genic media with a specific GSK3 β inhibitor, BIO, at days 4, 7, 14 and 21 in culture. They were then assayed for MTT, bone formation matrix and RT-PCR.

Result: Our results showed that up to it day 14, BIO increases the gene expression of alkaline phosphatase and Runx2; however decreases their expression as of day 14 on. The result of bone matrix assay showed that BIO decreases the synthesis of bone matrix as well that of the viability of the differentiating USSCs.

Conclusion: In general these results indicate that BIO as a GSK-3 β inhibitor, and therefore Wnt pathway activator, decreases the osteogenic differentiation of USSCs.

Key Words: Stem cells, Osteogenic differentiation, Wnt, BIO, GSK-3 β

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

عاطفه صفرپور ^{*}، بهمن زینلی ^{Ph.D.}، مسعود سلیمانی ^{Ph.D.}، آرتیپروانه 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 مهمی از 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 روش‌ها: در پژوهش حاضر اثر BIO به عنوان مهارکننده اختصاصی گلیکوژن سنتتاز کیناز-۳ بتا ($GSK-3\beta$) و بنابراین فعال کننده مسیر اصلی Wnt، بر سلول‌های USSC در حال تمایز به استخوان در روزهای ۴ و ۷ و ۱۴ 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 ۱۴ روز پس از کشت بیان ژنهای اختصاصی تمایز استخوانی (Alkaline phosphatase, Runx2) را افزایش و پس از ۲۱ آنها را کاهش می‌دهد. 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 می‌دهد که BIO به عنوان مهار کننده $GSK-3\beta$ و فعال کننده مسیر Wnt، بطور کلی باعث کاهش تمایز USSC ها به سلولهای استخوانی می‌شود.

کلید واژه‌ها: سلول‌های بنیادی، تمایز استخوانی، Wnt، BIO، $GSK-3\beta$

مقدمه

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

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

می شود [۵].

پروتئین گلیکوژن سنتاز کیناز- β (GSK-3 β)، یک سرین-ترئونین کیناز است که برای اولین بار در اواخر دهه هفتاد به عنوان آنزیمی که سنتز گلیکوژن را تنظیم می کند، شناسایی شد. امروزه مشخص شده است که مهار این آنزیم باعث فعال سازی مسیر پیام رسانی اصلی Wnt می شود؛ به این صورت که پس از قرار گرفتن لیگاند Wnt روی کمک گیرنده LRP5/6، این آنزیم با فسفریله کردن انت های سیتوپلاسمی LRP5/6 و در نتیجه افزایش تمایل Axin برای اتصال به این ناحیه، باعث جدا شدن از کمپلکس تخریبی می شود و بدین ترتیب نقش مثبتی در فعال سازی مسیر Wnt بازی می کند [۶]. از آن جا که مسیر Wnt از جمله اصلی ترین مسیرهای تنظیم کننده در سلول های بنیادی چند توان است، فعال سازی Wnt می تواند موجب ایجاد پاسخ های مختلف سلولی شود [۷]. تحقیقات روی سلول های بنیادی مزانشیمی نشان داده است که فعال شدن مسیر Wnt در متعهد کردن اجداد مزانشیمی برای تمایز به رده های استئوبلاستی نقش مهمی را بازی می کند و علاوه بر این Wnt با مهار بیان ژن اختصاصی تمایز چربی، PPAR γ ، تمایز استخوان را افزایش می دهد [۵]. مطالعات روی سلول های بنیادی مزانشیمی مشتق از بافت چربی نشان داده است که فعال شدن مسیر سیگنال دهی اصلی Wnt در این سلول ها از تمایز آن ها به چربی جلوگیری کرده است و سرنوشت آن ها را از تمایز به سلول چربی به سمت تبدیل شدن به سلول استخوانی تغییر داده است [۸]. همچنین مطالعات روی سلول های بنیادی مزانشیمی انسانی نشان داده است که در حضور لیتیم یا Wnt3a نوترکیب، تمایز به استخوان در این سلول ها مهار می شود [۹]. مطالعات در شرایط *in vivo* نیز تایید می کند که مسیر سیگنال دهی اصلی Wnt با افزایش بیان RUNX2 در شکل گیری سلول های استخوانی نقش مثبت دارد [۱۰].

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

سلول های بنیادی و پیش ساز نابالغ بسیاری است که می تواند منبع جایگزین خوبی برای مغز استخوان در بحث دست یابی به سلول های بنیادی باشد. سلول های بنیادی سوماتیکی نامحدود (USSCs) که از خون بند ناف مشتق می شوند، منبع سلولی خوبی را برای کاربردهای سلول درمانی فراهم می کنند [۳ و ۲]. این سلول ها به عنوان یک سلول استرومایی مزانشیمی با منشاء خون بند ناف می توانند به سلول های هر سه لایه جنینی (اندودرمی، مزودرمی و اکتودرمی) تمایز یابند. از یافته های مهم در مورد این سلول ها عدم وجود خاصیت تومورزایی است، به طوری که با پیوند این سلول ها به مدل های مختلف، تاکنون هیچ موردی از ایجاد تومورهای میکروسکوپی یا ماکروسکوپی گزارش نشده است [۴]. استئوبلاست های تشکیل دهنده استخوان از سلول بنیادی مزانشیمی منشا می گیرند. در روند تمایز بیان نشانگرهای عمده استخوانی یعنی فاکتورهای نسخه برداری Runx2 و استریکس باعث تولید سلول های استخوانی می شود. Runx2 عضوی از خانواده فاکتورهای نسخه برداری دارای زیر واحد runt است و نقش حیاتی در تکوین استئوبلاست ها بازی می کند. حذف Runx2 در موش منجر به ایجاد حیواناتی می شود که در آن ها اسکلت تن ها متشکل از سلول های غضروفی و مفاصل است و نشانه ای از استخوان در آن دیده نمی شود [۳]. Runx2 به عنوان یک فاکتور نسخه برداری اولین نشانگر تمایزی استئوبلاست است که تا کنون شناخته شده است و بیان آن طی تکوین و بعد از تولد در استئوبلاست ها بسیار بالاست. این فاکتور نسخه برداری به طور مستقیم بر بیان ژن های آکالاین فسفاتاز و استئوکلسین اثر مثبت می گذارد.

از مهمترین ژن های دخیل در مسیر تمایز به استخوان می توان استئونکتین (ON osteonectin)، آکالاین فسفاتاز (ALP alkaline phosphatase)، سیالوپروتئین استخوانی (Bone sialo protein) و استئوکلسین (osteocalcin) را نام برد که اغلب در فاصله ۲۱ روزه تمایز به استئوبلاست ها در سلول بیان

۵ میلیگرم در میلیلیتر در بافر (Phosphate Buffer Saline) (PBS) حل شد و سپس به وسیله 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.

رنگ آمیزی سلول های استخوانی

به منظور رنگ آمیزی سلول های استخوانی از رنگ آلیزارین رد (Alizarin red) (Sigma) استفاده شد. این رنگ به رسوب های کلسیم سلول های استخوانی متصل می شود و در حضور یون های دوظرفیتی کلسیم به رنگ قرمز در می آید. به این منظور لایه سلولی در کف ظرف با محلول PBS شسته شد. سپس سلول ها به مدت ۱۰ دقیقه با متانول (Merck) در دمای اتاق تثبیت شدند. برای رنگ آمیزی، سلول ها با رنگ آلیزارین رد به مدت ۲ دقیقه انکوبه شدند و سپس رنگ های اضافی به وسیله شستشوی سلول ها با آب مقطر خارج شد. به منظور سنجش ماتریکس استخوانی ابتدا محیط روی سلول ها پس از طی زمان انکوباسیون برداشته شد و سپس سلول ها با PBS شستشو شدند. سلول ها 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) ۱۰ درصد به هر چاهک اضافه و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه شد. سپس لایه سلولی به آرامی توسط نوک سمپلر جدا و به همراه مایع رویی به میکروتیوب ۱/۵ منتقل شد. میکروتیوب های ۱/۵ برای جلوگیری از تبخیر با پارافیلیم پوشانده و ۱۰ دقیقه در دمای ۸۵ درجه سانتی گراد حرارت داده شد. میکروتیوب ها بلافاصله به مدت ۵ دقیقه در یخ قرار گرفته و سپس به مدت ۱۵ دقیقه در ۲۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ شد. ۴۰۰ میکرولیتر از محیط رویی برداشته و به میکروتیوب ۱/۵ جدید وارد شد. ۱۵۰ میکرولیتر هیدروکسید

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

مواد و روش ها

سلول های USSC جدا شده از خون بند ناف از شرکت فن آوری بن یاخته تهیه شد. نشانگرهای سطحی این سلول ها قبلاً به کمک روش فلوسایتومتری بررسی شده و نتایج نشان داده بود که این سلول ها نشانگر سطحی CD105 را به میزان ۸۰ درصد بیان کرده ولی برای نشانگرهای CD49، CD146، CD29 و CD14 منفی بودند [۱۱]. این سلول ها به منظور رشد و تکثیر به کف پتری دیش می چسبند. محیط مناسب برای تکثیر این سلول ها DMEM (L-Glucose) (Gibco) است که حاوی ۱۰ درصد سرم جنینی گاو است. سلول های USSC سرعت تکثیر به نسبت خوبی دارند به این شکل که در شرایط کشت استاندارد و در یک فلاسک ۲۵ میلی متری به طور متوسط هر روز یک بار باید پاساژ داده شوند. برای تمایز سلول های USSC به سلول های استخوانی به مدت ۲۱ روز از محیط کشت DMEM(L-Glucose) حاوی ۱۰ میلی مولار بتا 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

میکرولیتر به دست آمد.

به منظور 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 میلی لیتری 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 سانتی گراد در دستگاه ترموسایکلر ساخت شرکت Corbett قرار گرفت. سپس به میکروتیوب موارد زیر اضافه شد: ۴ میکرولیتر بافر واکنش دهنده (۵X)، پروتئین مهار کننده ریبو نوکلئاز (۲۰ unit/μl) ۰/۵ میکرولیتر، دی نوکلئوتید تری فسفات (۱۰ mM) ۱ میکرولیتر، آنزیم ترانس کریپتاز معکوس (۲۰۰ unit/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.

به منظور انجام واکنش زنجیره پلی مرازی (PCR) در این پژوهش از آنزیم تک پلی مرز دی نوکلئوتید تری فسفات شرکت سیناژن استفاده شد.

برای انجام واکنش زنجیره پلی مرازی این مراحل انجام گرفت: ابتدا مواد زیر داخل یک میکروتیوب ۰/۲ با یکدیگر مخلوط شد: ۲ میکرولیتر بافر ۱۰X PCR (سولفات آمونیم)، ۱ میکرولیتر مخلوط ۴ دی نوکلئوتید تری فسفات (۰/۲ میلی مولار از هر کدام) (سیناژن)، ۱ میکرولیتر کلرید منیزیم ۵۰ میلی مولار (سیناژن)، ۳/۲ میکرولیتر cDNA، ۰/۹ میکرولیتر پرایمر Forward که در جدول ۱ آمده است، ۰/۹ میکرولیتر پرایمر Reverse که در جدول ۱ آمده است ۰/۵ میکرومولار از هر کدام از پرایمرها، ۰/۲ میکرولیتر آنزیم DNA Tag پلی مرز (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

آمونیم (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 ۴۰۵ نانومتر به وسیله دستگاه Elisa reader خوانده شد.

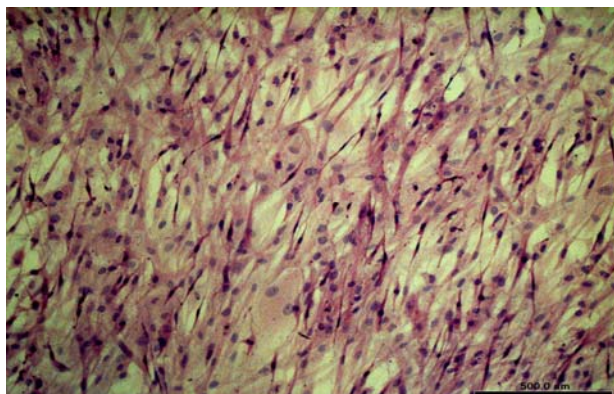
بررسی بیان ژن های تمایزی با استفاده از

روش semi-quantitative RT-PCR

برای استخراج RNA از محلول RNX-Plus محصول شرکت سیناژن استفاده شد. به منظور استخراج RNA، سلول ها در فلاسک ۲۵ میلی متری کشت داده شدند. پس از طی زمان انکوباسیون مورد نظر محیط کشت سلول ها خارج و ۱ میلی لیتر از محلول RNX-Plus روی سلول ها ریخته شد. پس از ۶-۷ دقیقه در دمای اتاق سلول ها به طور کامل از کف فلاسک جدا شدند. محلول حاوی سلول ها پیتاژ و همگن شد و سپس به درون میکروتیوب ۱/۵ تمیز انتقال داده یافتند. ۲۰۰ میکرولیتر کلروفورم (Merck) به محلول اضافه و ۱۵ ثانیه و رتکس شد تا محلول درون آن کدر شود. سپس میکروتیوب ۱۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی گراد 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 سانتی گراد نگهداری شد و پس از آن میکروتیوب ۱۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی گراد در ۱۳۰۰۰ دور در دقیقه (rpm) سانتریفوژ شد تا RNA در کف میکروتیوب رسوب کند. محلول روی رسوب دور ریخته شد. سپس برای شستشوی رسوب، ۱ میلی لیتر اتانول ۷۵ درصد اضافه و تخلیه شد. پس از آن حدود ۱۵ دقیقه رسوب RNA در دمای اتاق رها شد تا خشک و بی رنگ شود. رسوب در ۵۰-۳۰ میکرولیتر آب فاقد RNase حل شد و در یخ قرار گرفت. به منظور تعیین غلظت، ۲ میکرولیتر از محلول RNA برداشته شد و با دستگاه Thermo Nano drop (Thermo) میزان RNA آن بر حسب میکروگرم بر

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). سلول‌های USSC، سلول‌هایی دوکی شکل با هسته درشت و مشخص هستند (شکل ۱).



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

اثر BIO به عنوان مهار کننده GSK-3 β در

تمایز سلول‌های USSC 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-3 β ، نقش مسیر پیام‌رسانی 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

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، ۱ دقیقه 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.

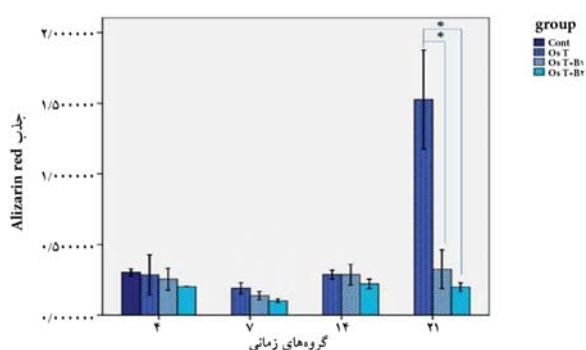
بررسی آماری

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

ماتریکس نسبت به نمونه تیمار بسیار کم شده است.

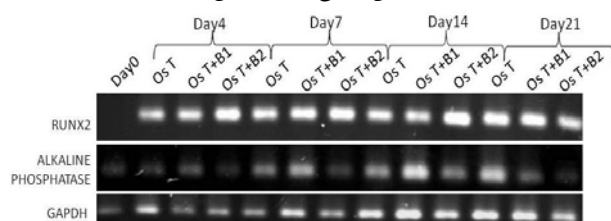


شکل ۴. نمودار مربوط به سنجش میزان رنگ Alizarin red سلول‌های کشت یافته در حضور تیمار استخوانی و BIO. همان‌طور که مشاهده می‌شود در روزهای ۴، ۷ و ۱۴ تفاوت معنی‌داری در میزان جذب رنگ Alizarin red گروه‌های مختلف وجود ندارد، اما در روز ۲۱ گروه‌هایی که با محیط تمایزی و هر دو غلظت BIO. تیمار شده‌اند، کاهش معنی‌دار 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

به منظور بررسی بیان ژن‌های اختصاصی تمایز استخوانی در سطح نسخه‌برداری بیان ژن‌های Alkaline phosphatase و RUNX2 در روزهای ۴، ۷، ۱۴ 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 ۴، ۷ و ۱۴ 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 (day 0)، تیمار استخوانی (Os T)، غلظت ۱ میکرومولار BIO به همراه تیمار استخوانی (OsT+B1)، غلظت ۲ میکرومولار BIO به همراه تیمار استخوانی (OsT+B2) در ۴، ۷، ۱۴ و ۲۱ روز (day 4-21) پس از کشت. همان‌طور که مشاهده می‌شود BIO سبب کاهش بیان هر ۲ ژن تمایزی در روز ۲۱ شده است. از ژن GAPDH به

همان‌طور که مشاهده می‌شود ۴ روز پس از کشت تعداد

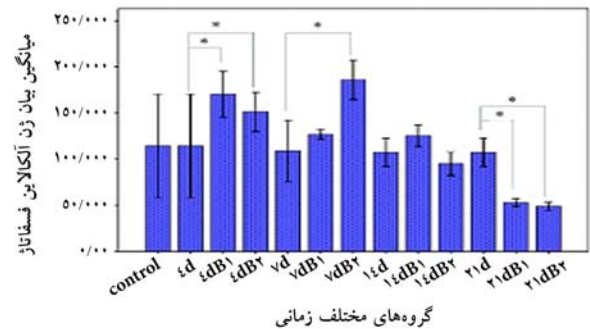
سلول‌ها در محیط تمایزی (C) نسبت به سلول‌های کنترل (A) افزایش یافته است ولی ماتریکس قرمز رنگ که نشان‌دهنده تمایز استخوانی است مشاهده نمی‌شود. ۷ روز پس از کشت تعداد سلول‌ها در محیط تمایزی (F) نسبت به سلول‌های کنترل و تیمار ۴ روز افزایش یافته است ولی همچنان ماتریکس قرمز رنگ دیده نمی‌شود. ۱۴ روز پس از کشت تعداد سلول‌ها در محیط تمایزی (I) نسبت به سایر گروه‌ها افزایش یافته است و همچنین ماتریکس قرمز رنگ محدودی دیده می‌شود. ۲۱ روز 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 ۴ بازه زمانی ۴، ۷، ۱۴ 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).

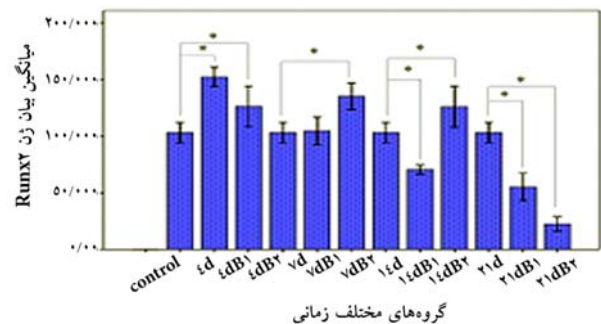
همان‌طور که در شکل ۴ مشاهده می‌شود در روزهای ۴، ۷ و

۱۴ 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 هر دو 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

عنوان ژن مرجع استفاده شده است.



شکل ۶. نمودار میانگین میزان بیان ژن آلکالاین فسفاتاز در گروه کنترل (روز صفر) و گروه های تیمار استخوانی (4d-21d) و تیمار استخوانی و غلظت ۲ میکرومولار BIO (4-21dB1, 4-21dB2) در ۴، ۷، ۱۴، ۲۱ روز پس از کشت. همانطور که مشاهده می شود میزان بیان ژن آلکالاین فسفاتاز در روز ۲۱ به میزان معنی داری در گروه های BIO نسبت به گروه تیماری کم شده است. البته در روز های ۴ و ۷ نمونه هایی که BIO دریافت کرده اند، افزایش معنی دار بیان این ژن را نسبت به گروه تیماری نشان می دهند. میزان بیان ژن آلکالاین فسفاتاز در روز صفر مساوی میزان بیان این ژن در روز ۴ پس از تیمار استخوانی بود. (نتایج RT-PCR به وسیله نرم افزار Total Lab کمی شده اند و نسبت به ژن کنترل داخلی یکسان سازی صورت گرفته است). ($P < 0.05$).



شکل ۷. نمودار میانگین میزان بیان ژن RUNX2 در گروه کنترل (روز صفر) و گروه های تیمار استخوانی (4d-21d) و تیمار استخوانی و غلظت ۲ میکرومولار BIO (4-21dB1, 4-21dB2) در ۴، ۷، ۱۴، ۲۱ روز پس از کشت. همانطور که مشاهده می شود میزان بیان ژن RUNX2 در روز ۲۱ به میزان معنی داری در گروه های BIO نسبت به گروه تیماری کم شده است. البته BIO در روز های ۴ و ۷ با هر دو غلظت و با غلظت ۲ میکرومولار در روز ۱۴، سبب افزایش معنی دار میزان بیان این ژن نسبت به نمونه تیمار همان روز می شود. (نتایج RT-PCR به وسیله نرم افزار Total Lab کمی شده اند و نسبت به ژن کنترل داخلی یکسان سازی صورت گرفته است). ($P < 0.05$).

کاهش بقای سلولی در حضور BIO پس از ۲۱ روز

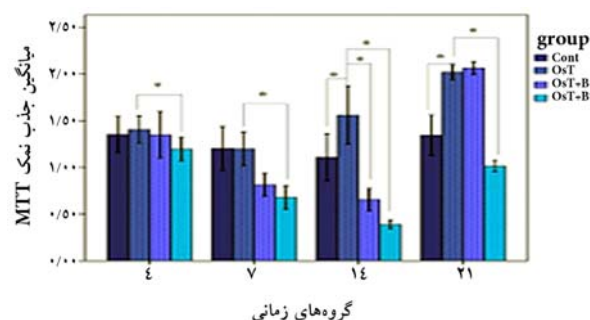
نتایج قبلی محققان حاضر نشان داد که BIO علاوه بر اثر کاهشی در شاخص های استخوانی، تعداد سلول های در حال تمایز را نیز کاهش می دهد. به منظور بررسی دقیق تر سلول های USSC با همان گروه بندی ذکر شده در جدول ۲، به مدت ۲۱ روز تیمار شدند و میزان بقای سلولی در روزهای ۴، ۷، ۱۴ و ۲۱ با استفاده از روش MTT بررسی شد. همانطور که در شکل ۸ مشاهده می شود، در روزهای ۴ و ۷ میزان بقای سلولی در سلول هایی که تنها محیط تمایزی استخوانی (گروه تیمار) را دریافت کرده اند، تفاوت معنی داری با سلول های گروه کنترل نشان نمی دهد، ولی در روزهای ۱۴ و ۲۱ بقای سلول های گروه تیمار افزایش معنی داری را نسبت به گروه کنترل نشان می دهد. این نتایج نشان می دهد که نه تنها محیط تمایز استخوانی بقای سلولی را کاهش نمی دهد بلکه باعث افزایش تعداد سلول ها نیز می شود. در مورد سلول هایی که علاوه بر محیط تمایزی، BIO نیز دریافت کرده بودند، نتایج نشان داد که ۴ و ۷ روز پس از کشت سلول ها، میزان بقای سلول ها در سلول هایی که غلظت ۲ میکرومولار BIO را دریافت کرده اند، نسبت به سلول های گروه تیمار کاهش معنی داری را نشان می دهد. این در حالی بود که میزان بقا در سلول های گروه ۱ میکرومولار BIO تغییری را نسبت به گروه تیمار نشان نداد. در روز ۱۴ میزان بقای سلول های هر دو گروه BIO کاهش معنی داری را نسبت به گروه تیمار نشان داد و در روز ۲۱ میزان بقا تنها در گروه ۲ میکرومولار BIO نسبت به گروه تیمار کاهش یافته بود. به این ترتیب می توان نتیجه گرفت که غلظت ۲ میکرومولار BIO سبب کاهش توانایی زیستی سلول ها در مقایسه با گروه های تیمار استخوانی شده است. البته این میزان کاهش هرگز به ۵۰ درصد سلول های گروه تیمار نرسید که به عنوان دوز سمی محسوب شود.

سلول‌ها را تأیید می‌کند [۱۵]. غلظت ۱ میکرومولار BIO تنها در روز ۱۴ 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 به نظر می‌رسد که BIO به‌عنوان مهارکننده GSK-3 β 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 [۱۶].

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 حضور BIO، 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-3 β 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 به‌عنوان مهارکننده GSK3- β و همچنین در حضور مولکول Wnt3a (الفاکتند مسیر اصلی سیگنال‌دهی Wnt)، تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی انسانی به سلول‌های استخوانی مهار می‌شود.



شکل ۸. نتایج مربوط به آزمون MTT گروه‌هایی که تحت تیمار استخوانی قرار گرفته بودند. همان‌طور که مشاهده می‌شود در روز ۴، ۷ و ۲۱ اختلاف معنی‌داری بین گروه تیمار استخوانی و گروه ۲ میکرومولار BIO دیده می‌شود. در روز ۱۴ این اختلاف بین گروه تیمار استخوانی و هر دو غلظت BIO مشاهده می‌شود (*: $p < 0.05$).

بحث

با توجه به کمبود اطلاعات و گزارش‌های ضد و نقیض در خصوص نقش مسیر اصلی سیگنال‌دهی Wnt در تمایز سلول‌های بنیادی به سلول‌های استخوانی، در پژوهش حاضر با استفاده از BIO به‌عنوان مهارکننده GSK3- β و در نتیجه 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

از آنجایی که BIO مهارکننده GSK3- β و در واقع فعال کننده مسیر اصلی Wnt است، بنابراین نتایج این پژوهش پیشنهاد می کند که مسیر اصلی Wnt می تواند نقش دوگانه در تمایز سلول های USSC به سلول های استخوانی داشته باشد. با توجه به موارد یاد شده می توان نتیجه گیری کرد که BIO به طور کلی نقش کاهنده بر میزان بقای سلول های USSC و همچنین تمایز آنها به سلول های استخوانی دارد و همان طور که گفته شد این نتایج مطالعات قبلی در این زمینه را تأیید می کند [۱۵]. البته برای تأیید بیشتر نتایج به دست آمده در این پژوهش می توان در مطالعات آینده از روش های مولکولی دقیق تری مانند Real-time PCR استفاده کرد و همچنین با اثر پروتئین های نو ترکیب Wnt نقش مسیر سیگنال دهی اصلی Wnt در تمایز سلول های USSC به سلول های استخوانی و چربی را به طور دقیق تر بررسی نمود.

در حالی که BIO اثر قابل ملاحظه ای در ترشح ماتریکس سلول های USSC در روزهای ۴، ۷ و ۱۴ پس از کشت نداشت ولی بررسی نتایج RT-PCR نشان داد که بیان ژن های اختصاصی استخوانی توسط BIO افزایش یافته است. این نتایج نشان می دهد که BIO اثر دوگانه ای (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 می شود. گزارش های متعددی مبنی بر اثر دوگانه مسیر Wnt بر تمایز سلول های بنیادی به استخوان وجود دارد به این ترتیب که فعال شدن این مسیر ابتدا نقش افزایش دهنده و سپس نقش کاهنده بر تمایز استخوانی دارد [۱۷]. به صورت دقیق تر تا حدود روز ۱۴ نقش Wnt بر تمایز سلول های استخوانی افزایش دهنده و پس از آن کاهنده است.

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 Trypan 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 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.