مجله دانشکده پیراپزشکی دانشگاه علوم پزشکی تهران (پیاورد سلامت) دوره ۵ شماره ۱ بهار ۱۳۹۰، ۷۹- ۶۹

تاثیر داروی زولدرونیک اسید در بیان و متیلاسیون ژن BSP در طول تمایز استئوبلاستیک سلولهای بنیادی مزانشیمی

مجیدفرش دوستی حق [۱]، دکتر مهرداد نوروزی نیا [۲]، دکتر یوسف مرتضوی [۳]، دکتر مسعود سلیمانی [۴]، دکتر سعید کاویانی [۴]، مریم محمودی نیا میمند [۵]

چکیده

زمینه و هدف: سیالو پروتئین استخوانی(BSP) شاخص اختصاصی تمایز استئوبلاستیک می‌باشد. در این تحقیق تاثیر زولدرونیک اسید بر بیان BSP مورد ارزیابی قرار گرفته و همچنین به منظور درک مکانیسم های کنترلی بیان ژن، وضعیت متیلاسیون پروموتر BSP مورد بررسی قرار گرفت.

روش بررسی: در این مطالعه تجربی جداسازی سلول‌های بنیادی مزانشیمی(MSCs) از مغز استخوان انسانی صورت گرفت. MSCs پس از تکثیر، تحت تیمار با زولدرونیک اسید قرار گرفتند و سپس به مدت ۳ هفته در محیط تمایزی کشت داده شدند. استخراج DNA و RNA از MSCs و سلول‌های تمایز یافته استئوبلاستی صورت گرفت. بیان BSP با استفاده از RT-PCR مورد ارزیابی قرار گرفت. وضعیت متیلاسیون پروموتر ژن BSP، پس از تیمار DNA با سدیم بی سولفیت(SBS)، با استفاده از پرایمرهای متیله(M) و غیرمتیله(U) در آزمون MSP مشخص شد.

یافته‌ها: بیان BSP در سلول های تمایز یافته استئوبلاستی بواسطه تیمار با زولدرونیک اسید قابل مشاهده بود ولی در سلول‌های بنیادی مزانشیمی قابل مشاهده نبود. بررسی با روش MSP نشان داد که ژن BSP در طول تمایز در وضعیت دمتیلاسیون کامل قرار داشت.

نتیجه گیری: بیان BSP از هفته اول تمایز به خوبی قابل ارزیابی بوده و این نشان دهنده تسریع تمایز استئوبلاستی بواسطه تیمار با زولدرونیک اسید می باشد. وضعیت دمتیلاسیون BSP نشان دهنده عدم تاثیر زولدرونیک اسید بر وضعیت متیلاسیون این ژن می‌باشد. سایر مکانیسم های ژنتیکی و یا اپی ژنتیکی بیان BSP را در طول تمایز استئوبلاستی سلول‌های بنیادی مزانشیمی تیمار شده با داروی زولدرونیک اسید تحت کنترل دارند.

واژه های کلیدی: سلول‌های بنیادی مزانشیمی، زولدرونیک اسید، تمایز استئوبلاستی، BSP، متیلاسیون DNA

* نویسنده مسئول :
دکتر یوسف مرتضوی ؛
دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی زنجان
Email : Youmort@yahoo.com

- دریافت مقاله : بهمن ۸۹ - پذیرش مقاله : اردیبهشت ۹۰

مقدمه

پروتئین‌های ماتریکس غیر کلاژنی بافت استخوانی نقش مهمی را در ارگانیزاسیون ماتریکس کلاژنی، تشکیل و رشد کریستال‌های هیدروکسی آپاتیت ایفا می‌کنند.

عمده‌ترین پروتئین‌های ماتریکس غیرکلاژنی شامل گلیکوپروتئین‌های کندوریتین سولفات دکورین(Decorin) و بای گلیکان(Biglycan)، سیالو پروتئین‌های استئوپونتین و سیالوپروتئین استخوانی (BSP)، استئوکلسین و استئونکتین می‌باشند(۱). BSP برای اولین بار از استخوان کورتیکال گاوی در سال ۱۹۷۲ توسط Kent و Herring جداسازی شد که یک گلیکوپروتئین ۲۳KDa با محتوای بالای اسید سیالیک است.

[۱] کارشناسی ارشد هماتولوژی و بانک خون گروه هماتولوژی دانشکده علوم پزشکی دانشگاه تربیت مدرس
[۲] استادیار گروه ژنتیک پزشکی دانشکده علوم پزشکی دانشگاه تربیت مدرس
[۳] دانشیارگروه هماتولوژی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی زنجان
[۴] استادیار گروه هماتولوژی دانشکده علوم پزشکی دانشگاه تربیت مدرس
[۵] کارشناسی ارشد زیست سلولی مولکولی مرکز تحقیقات سلولی ملکولی و سلولهای بنیادی بیمارستان صارم

Archive of SID
www.SID.ir

BSP به میزان بالایی در بافت‌های استخوانی تازه تشکیل شده بیان می شود و به عنوان هسته تشکیل دهنده هیدروکسی آپاتیت و مارکر اختصاصی تمایز استئوبلاست‌ها مطرح می‌باشد. در عین حال ویژگی‌های اتصال سلولی و سیگنال دهی سلولی BSP، نقش‌های متعددی را برای این پروتئین در تغییر ساختار(Remodeling) استخوان و همچنین در پاتولوژی بیماری‌های مختلف ایجاد می‌کند.

حضور BSP در ماتریکس کلاژنی یک فاکتور میتوژنیک برای پری استئوبلاست‌ها بوده و تمایز آنها را به استئوبلاست تسریع کرده و در نتیجه کلسیفیکاسیون استخوان را تحریک می‌کند(۲). بیان BSP اختصاصی بافت‌های مینرالیزه مانند استخوان، غضروف‌های مینرالیزه، عاج دندان و سمنتوم است(۳). بیان محدود ژن BSP به این مطلب اشاره دارد که نسخه برداری ژن در حالت نرمال مهار شده می‌باشد. این مهار می‌تواند به علت اتصال نوکلئوزم، متیلاسیون نوکلئوتیدها، نیاز به فاکتورهای نسخه برداری اختصاصی جهت القا بیان یا ترکیبی از این مکانیسم‌ها باشد. یکی از مکانیسم‌های کنترل بیان ژن، فرایندهای اپی ژنتیکی می‌باشد که شامل متیلاسیون DNA، عمدتاً در نواحی پروموتور ژن‌ها و مدیفیکاسیون‌های هیستونی اعم از استیلاسیون، داستیلاسیون، متیلاسیون، فسفوریلاسیون و غیره می‌باشد. متیلاسیون DNA به واسطه افزودن گروه متیل بر روی سیتوزین در جزایر CpG اعمال می‌شود. تحقیقات نشان داده‌اند که وضعیت هیپومتیلاسیون با افزایش بیان و وضعیت هیپرمتیلاسیون با کاهش یا خاموشی بیان ژن همراه است(٤). گروه تحقیقاتی ما نشان دادند که وضعیت متیلاسیون ژن ROR2 در طول تمایز استئوبلاستی تغییر پیدا می‌کند(۵). تغییرات اپی ژنتیکی بعلت قابلیت تغییر در مقایسه با تغییرات ژنتیکی هدف‌های مناسب‌تری در ایجاد درمان‌های جدید می‌باشند.

با توجه به اهمیت متیلاسیون اختصاصی ژن‌ها (Gene Specific Methylation) در بیان ژن‌ها، تعیین وضعیت متیلاسیون ژن‌های اختصاصی استئوبلاستیک همانند BSP حائز اهمیت خواهد بود.

زولدرونیک اسید جزو دسته دارویی بی فسفانات‌ها بوده و برای پیشگیری از شکستگی‌های استخوان در سرطان و همچنین در استئوپورزیس کاربرد دارد(٦). در سال ۲۰۰۷، اداره غذا و داروی آمریکا(FDA) مجوز استفاده از این دارو جهت درمان استئوپورز در زنان یائسه را صادر کرد. تحقیقات نشان داده است که مصرف زولدرونیک اسید میزان شکستگی مهره‌ها را به شدت کاهش می‌دهد و دانسیته استخوان‌ها را بهبود می‌بخشد(۷).

مکانیسم اثر این دارو مهار استئوکلاست‌ها و القا تمایز استئوبلاست‌ها می‌باشد(۸). فعالیت اخیر این دارو در القا تمایز استئوبلاستیک سلولهای بنیادی مزانشیمی و مکانیسم تاثیر آن بر روی بیان ژن های اختصاصی استئوبلاستی مشخص نمی‌باشد. تحقیقات نشان داده است که بیان BSP در طول تمایز استئوبلاستی سلولهای بنیادی مزانشیمی رت افزایش می‌یابد(۹). همچنین تیمار سلول‌های شبه استئوبلاستی Saos-2 با داروی زولدرونیک اسید که در درمان استئوپورز کاربرد دارد، منجر به افزایش بیان BSP در این سلولها می‌گردد(۱۰). همچنین تحقیقات نشان داده‌اند که BSP یک مارکر بیوشیمیایی اختصاصی برای متابولیسم استخوان در زنان یائسه می‌باشد(۱۱).

هدف از تحقیق حاضر ارزیابی تاثیر داروی زولدرونیک اسید در بیان ژن سیالوپروتئین استخوانی(BSP) در سلول‌های بنیادی مزانشیمی انسانی تیمار شده با این دارو است. همچنین به منظور شناخت بیشتر مکانیسم‌های اپی ژنتیک احتمالی موثر در القا بیان BSP در سلول‌های بنیادی مزانشیمی تیمار شده با داروی زولدرونیک اسید، وضعیت متیلاسیون

Archive of SID

www.SID.ir

ژن BSP در طول تمایز استئوبلاستیک سلول‌های بنیادی مزانشیمی تیمار شده با داروی زولدرونیک اسید با استفاده از روش MSP مورد ارزیابی قرار می‌گیرد.

روش بررسی

جداسازی و تکثیر سلول‌های بنیادی مزانشیمی انسانی

پس از کسب رضایت از یک اهدا کننده سالم حدود ۱۰ ml از مغز استخوان انسانی در یک لوله هپارینه در بخش پیوند مغز استخوان بیمارستان شریعتی تهیه گردید. سلول های تک هسته‌ای با استفاده از فایکول و سانتریفوژ شیب غلظتی جداسازی شدند. سلول‌های تک هسته‌ای با بافر HBSS شستشو شده و در فلاسک کشت سلول T۷۵ به همراه ۲۰ ml محیط کشت DMEM-low glucose (Gibco) و ۱۰٪ FBS و ۱۰۰ U/ml پنیسیلین و ۱۰۰ µg/ml استرپتومایسین در انکوباتور ۳۷°C با CO_2 ۵٪ به مدت یک شب کشت داده شدند(۱۲). قبل از انجام کشت، سلول‌های تک هسته‌ای شمارش شده و درصد زنده بودن(Viability) آن‌ها تعیین شد. برای انجام شمارش سلولی ۱۰ µl از سوسپانسیون سلولی با ۱۰ µl تریپان بلو مخلوط شده و با لام نئوبار شمارش شدند. روز بعد فلاسک از محیط کشت خالی شده و سلول های چسبنده به سطح فلاسک سه بار با ۲۰ ml بافر PBSA شستشو داده شدند. سلول‌ها تعویض محیط شده و حدود یک هفته کشت داده شدند تا به Confluency ۷۰٪-۶۰٪ رسیده و سپس با تریپسین جدا شده و پاساژ داده شدند. در پاساژ ۳-۲ تمایز استئوبلاستیک سلول‌های بنیادی مزانشیمی انجام شد. محیط تمایزی استئوبلاستی حاوی محیط کشت عمومی DMEM، L-گلوتامین و ۱۰٪ FBS بوده که به آن فاکتورهای تمایزی دگزامتازون با غلظت نهایی ۱۰ nM، بتا گلیسرول فسفات با غلظت نهایی ۵ mM و آسکوربات -۲- فسفات با غلظت نهایی ۵۰ µg/ml اضافه گردید. برای تایید ماهیت سلول‌های بنیادی مزانشیمی مارکرهای شاخص این سلول‌ها با استفاده از فلوسیتومتری مورد ارزیابی قرار گرفتند(۱۳).

تیمار سلول‌های بنیادی مزانشیمی با داروی زولدرونیک اسید

زولدرونیک اسید به صورت ویال حاوی ٤mg پودر لیوفیلیزه از شرکت دارویی Novartis تهیه گردید. این دارو در آب محلول بوده و نیز قابلیت انحلال در محیط کشت را دارد. از غلظت نهایی ۵ µM در محیط کشت برای تیمار ضربانی(Pulse Treatment) سلول‌های بنیادی مزانشیمی استفاده شد. القاء تمایز استئوبلاستی hMSC در فلاسک‌های T۷۵ انجام شد. تیمار MSCs با داروی زولدرونیک اسید در Confluency ٤٠٪-۳۰٪ سلول‌ها صورت گرفت و MSCs تحت تیمار ضربانی با ۵ µM داروی زولدرونیک اسید به مدت ۳ ساعت قرار گرفتند(١٤). بعد از تیمار به مدت ۳ ساعت، محیط کشت تخلیه شده و با PBS شستشو داده شد. سپس محیط تمایزی بر روی آنها اضافه شد و به مدت ۲۱ روز کشت داده شدند. سلول‌های بنیادی مزانشیمی بدون تیمار به عنوان کنترل کشت داده شدند.

رنگ آمیزی آلیزارین رد

تایید تمایز استئوبلاستی با استفاده از رنگ آمیزی آلیزارین صورت گرفت. برای انجام این رنگ آمیزی سلول‌های بنیادی مزانشیمی در پلیت‌های ٦ خانه ای کشت داده شدند.

بخشی از سلولها با زولدرونیک اسید تیمار شدند و گروهی هم به عنوان کنترل بدون تیمار کشت داده شدند. رنگ آمیزی آلیزارین رد در روز ۲۱ کشت انجام گرفت. برای انجام رنگ آمیزی محیط کشت تخلیه شده و سلولها با PBS شستشو شدند. سپس

Archive of SID

www.SID.ir

سلولها با فرمالدهید ٤٠٪ فیکس شده و مجدد با PBS شستشو شدند. رنگ آلیزارین رد ١٪ اضافه شده و به مدت ٣٠ دقیقه انکوبه شدند. نهایتاً با آب مقطر شستشو شده و در زیر میکروسکوپ از نظر وجود رسوب‌های قرمز رنگ کلسیم مورد ارزیابی قرار گرفتند.

استخراج DNA و RNA

استخراج DNA از سلول‌های بنیادی مزانشیمی و تمایز یافته استئوبلاستی در هفته اول، دوم و سوم با استفاده از کیت استخراج DNA شرکت Roche بر اساس پروتکل پیشنهادی کیت انجام گرفت.

بر اساس این پروتکل و به طور خلاصه، سلولها تریپسینه شده و پس از شستشو در ٢٠٠ µl، PBS سوسپانسیون شدند. حدود $٣-٤\times١٠^{٦}$ سلول از هر فلاسک T٧٥ استحصال شد. سپس ٢٠٠ µl بافر Binding و ٤٠ µl پروتئیناز K افزوده شده و ١٠ دقیقه در دمای ٧٠°C انکوبه شدند. ١٠٠µl ایزوپروپانول اضافه شده و به فیلتر تیوب منتقل شده و سانتریفوژ شدند. فیلتر تیوب یک مرحله با بافر Inhibitor و ٢ مرحله با بافر شستشو، شستشو داده شد.

نهایتاً ٥٠ µl بافر Elusion اضافه شده و سانتریفوژ می‌گردد و بدین ترتیب DNA استخراج می‌گردد. DNA استخراج شده به منظور ارزیابی کیفیت بر روی ژل آگارز بررسی شد. مقدار DNA استخراج شده بواسطه جذب در طول موج ٢٦٠nm اندازه گیری شد. خلوص DNA استخراج شده با نسبت جذب در طول موج ٢٦٠nm به ٢٨٠ nm سنجیده شد.

RNA سلول‌های بنیادی مزانشیمی و MSC های تیمار شده با داروی زولدرونیک اسید در هفته اول، دوم و سوم با استفاده از RNeasy plus Mini Kit شرکت Qiagen بر اساس پروتکل پیشنهادی کیت استخراج شدند. به طور خلاصه، سلولها لیز و هموژنیزه شده و بر روی ستون gDNA Eliminator منتقل شدند. پس از سانتریفوژ و حذف DNA ژنومی، اتانول اضافه شده بر روی ستون استخراج RNA منتقل شدند.

پس از چندین مرحله شستشو، با افزودن RNase-free water به ستون و سانتریفوژ RNA استخراج شد. قبل از سنتز cDNA تمامیت(Integrity) RNA با الکتروفورز بر روی ژل آگارز سنجیده شد.

تیمار DNA با SBS و آنزیم Sss1

قبل از انجام MSP، DNA استخراج شده با SBS تیمار شد. برای این منظور ١٠µl DNA (حدود ١µg) به ٤٠µl آب مقطر دیونیزه اضافه شد و ٥/٥ میکرولیتر ٢NaOH مولار با آن افزوده و ٢٠ دقیقه در ٣٧°C انکوبه شد. به ترتیب ٣٠µl هیدروکینون ١٠mM تازه تهیه شده و ٥٢٠µl سدیم بی سولفاید ٣M تازه تهیه شده به تیوب اضافه شد و نهایتاً به کمک روغن معدنی سطح محلول پوشانده شد. سپس ١٦ ساعت در دمای ٥٠°C انکوبه شد. DNA با استفاده از کیت Roche از محلول استخراج شد.

در این مرحله دسولفوناسیون(Desulfonation) بر روی DNA انجام می‌گیرد. برای این منظور ٢٢ µl از NaOH ٣ مولار به آن اضافه شده و به مدت ٥ دقیقه در دمای اتاق انکوبه شد. سپس DNA به روش اتانول استات آمونیوم رسوب کرده و در ٣٠µl آب مقطر دو بار تقطیر حل می‌شود. برای تهیه DNA متیله به عنوان کنترل مثبت از آنزیم Sss1 شرکت New England Biolabs بر اساس پروتکل پیشنهادی کیت استفاده شد(١٥). بدین منظور ٦ µl DNA خون محیطی به همراه ١٠µl بافر 10X، ٠/٥µl S- آدنوزیل متیونین ٣٢mM، ٢µl آنزیم Sss1 با آب مقطر به حجم ١٠٠µl رسید. مخلوط متیلاسیون به مدت ١/٥ ساعت در دمای ٣٧°C انکوبه شد. سپس DNA متیله با استفاده از کیت، استخراج شد. DNA متیله حاصل به عنوان کنترل مثبت در MSP با پرایمر متیله(M) مورد استفاده قرار گرفت.

Archive of SID

www.SID.ir

سنتز cDNA و انجام RT-PCR

سنتز cDNA با استفاده از ٤µl RNA استخراج شده از سلولهای بنیادی مزانشیمی و سلولهای تمایز یافته استئوبلاستی انجام گرفت.

مخلوط واکنش برای سنتز cDNA شامل ۲۰pmol پرایمر راندوم هگزامر، ٤µl بافر ٥X(محتوی ۲۵۰mM Tris-HCl، ۲۵۰mM KCl، ۲۰mM $MgCl_2$، ۵۰mM DTT)، مخلوط dNTP(۱۰mM)، آنزیم ترانس کریپتاز M-MuLV (Fermentase) که به حجم نهایی ۲۵µl رسید. برنامه دمایی برای واکنش نسخه برداری معکوس ٤۲°C به مدت ٦۰ دقیقه بود. غیر فعالسازی آنزیم بواسطه حرارت ۷۰°C به مدت ۱۰ دقیقه صورت گرفت.

برای انجام RT-PCR از پرایمرهای اختصاصی استفاده شد که توالی آنها در جدول ۱ آمده است. حجم نهایی واکنش برای انجام RT-PCR ۲۵µl بود. مخلوط واکنش محتوی ۱۰ pmol پرایمر، ۲/۵ mM $MgCl_2$، آنزیم DNA پلیمراز Taq ۰/۵µl، cDNA ۰/۵µl، dNTP۲/۵mM و بافر ۱۰X PCR بود. برنامه دمایی دستگاه ترمال سایکلر شامل یک سیکل ۹۵°C به مدت ۵ دقیقه، ۳۰ سیکل ۹۵°C به مدت ۳۰ ثانیه، ٦۲°C به مدت ۳۰ ثانیه، ۷۲°C به مدت ۳۰ ثانیه و نهایتاً یک سیکل ۷۲°C به مدت ۵ دقیقه می باشد. قطعه تکثیر شده با الکتروفورز بر روی ژل آگارز بررسی شد. RT-PCR برای هر یک از نمونه‌ها حداقل سه بار تکرار شد.

MSP

با استفاده از پرایمرهای اختصاصی متیله(M) و غیر متیله(U) که قادر به تشخیص DNA متیله و غیر متیله هستند PCR اختصاصی متیلاسیون(MSP) انجام شد. پرایمرها با استفاده از نرم افزار آنلاین Methprimer طراحی شدند(۱٦).

پرایمرهای مورد استفاده برای تشخیص متیلاسیون در جدول ۱ آورده شده است. واکنش PCR شامل مخلوط بافر ۱۰X، مخلوط dNTP(هر کدام ۱/۲۵mM)، پرایمرها(۰/۵ µM)، ۲۵ mM $MgCl_2$، DMSO ٤٪-۱٪، ۱/۲۵ واحد آنزیم Taq DNA Polymerase(Fermentase) و DNA تیمار شده با SBS(۵۰ng) در حجم نهایی ۲۵µl تهیه شد. MSP برای هر یک از نمونه‌ها حداقل سه بار تکرار شد.

جدول ۱: توالی پرایمرهای M و U وRT ژن BSP

نام پرایمر	توالی پرایمر	اندازه باند(bp)
BSPMF	CGATTCGTAGCGGTAGATGTAC	۱۰۷
BSPMR	ACGAAACGCAAAAAAAATACG	
BSPUF	GTGATTTGTAGTGGTAGATGTATGA	۱۱۰
BSPUR	AAACAAAACACAAAAAAAATACAAA	
BSP(RT)F	TGCCTTGAGCCTGCTTCCT	۷۹
BSP(RT)R	CTGAGCAAAATTAAAGCAGTCTTCA	

یافته‌ها

تایید تمایز استئوبلاستیک با رنگ آمیزی آلیزارین رد

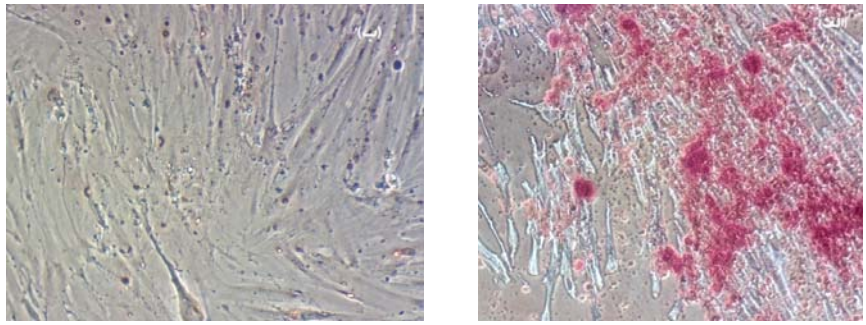
توده‌های کلیسمی در این رنگ آمیزی به رنگ قرمز دیده می‌شوند که نشان دهنده تمایز استئوبلاستیک سلول‌های بنیادی مزانشیمی می‌باشد.

رنگ آمیزی آلیزارین رد در سلول‌های تمایز یافته استئوبلاستی تیمار شده با زولدرونیک اسید(روز ۲۱ تمایز) رسوب قرمز رنگ توده‌های کلسیمی را نشان می‌دهد(تصویر ۱.الف).

Archive of SID

www.SID.ir

سلول‌های بنیادی مزانشیمی برای این رنگ آمیزی منفی بودند و هیچ گونه رسوب کلسیم در آنها مشاهده نشد(تصویر ۱.ب).



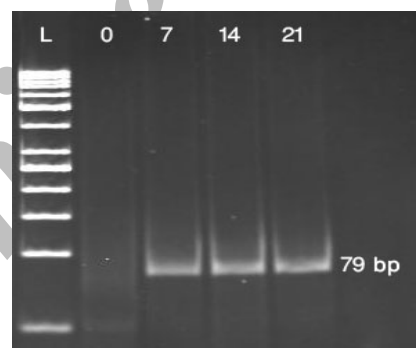
تصویر۱: رنگ آمیزی آلیزارین رد

الف: سلول های تمایز یافته استئوبلاستی تیمار شده با زولدرونیک اسید در روز ۲۱ تمایز

ب: سلول های بنیادی مزانشیمی

وضعیت بیان BSP در تمایز استئوبلاستیک MSCs تیمار شده با زولدرونیک اسید

به منظور درک بهتر تاثیر داروی زولدرونیک اسید بر روی بیان BSP و همچنین به منظور بررسی ارتباط بین وضعیت متیلاسیون ژن BSP و بیان آن، mRNA ژن BSP با استفاده از روش RT-PCR مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج RT-PCR برای سلول‌های بنیادی مزانشیمی منفی بوده، درحالیکه برای سلول‌های استئوبلاستی در هفته اول، دوم و سوم تمایز مثبت می‌باشند(تصویر۲). بر این اساس BSP در سلولهای بنیادی مزانشیمی بیان نمی‌شود ولی با القاء تمایز، بیان BSP از هفته اول تمایز به بعد قابل مشاهده است.



تصویر ۲: نتایج RT-PCR ژن BSP اندازه باند ۷۹bp

(۰): cDNA سلول های بنیادی مزانشیمی تمایز نیافته

(۲۱و۱٤و۷): cDNA سلولهای تمایز یافته استئوبلاستی به ترتیب روزهای ۷و۱٤و۲۱ تمایز

(L): ۱۰۰bp ladder

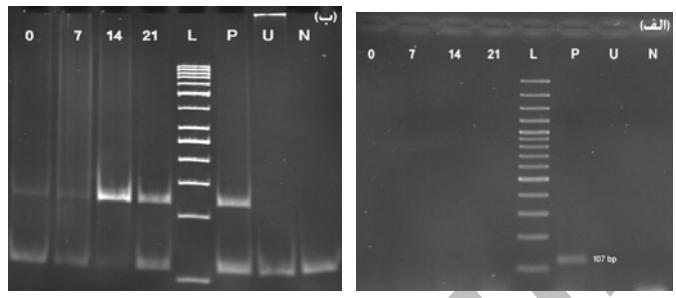
وضعیت متیلاسیون BSP در تمایز استئوبلاستیک MSCs تیمار شده با زولدرونیک اسید

مکانیسم‌های اپی ژنتیک همانند تغییر متیلاسیون ژنوم، مدیفیکاسیون‌های هیستونی و غیره جزو مکانیسم‌های اصلی کنترل بیان ژن در فرایندهای مختلف سلولی می‌باشند. در این تحقیق تاثیر داروی زولدرونیک اسید بر روی متیلاسیون پروموتر BSP مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج MSP با پرایمر U برای ژن BSP در سلول‌های استئوبلاستی تمایز یافته و سلول‌های بنیادی مزانشیمی مثبت بود. در حالیکه نتایج MSP با پرایمر

Archive of SID

www.SID.ir

M برای ژن BSP هم در سلول‌های بنیادی مزانشیمی و هم در سلول‌های استئوبلاستی تمایز یافته منفی بود. این نتایج وضعیت دمتیلاسیون کامل ژن BSP را نشان می‌دهد. در عین حال الگوی متیلاسیون ژن BSP در طول تمایز استئوبلاستیک سلول‌های بنیادی مزانشیمی تیمار شده با داروی زولدرونیک اسید در سلول‌های استئوبلاستی و سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشابه می‌باشد و تمایز استئوبلاستی با تغییر متیلاسیون این ژن همراه نیست(تصویر۳).



تصویر ۳: نتایج MSP با پرایمرهای M(متیله) و U(غیرمتیله) بر روی ژن BSP

الف: MSP با پرایمر M برای ژن BSP با اندازه باند ۱۰۷bp (۰): سلولهای بنیادی مزانشیمی تمایز نیافته.
(۲۱و۱٤و۷): سلول های تمایز یافته استئوبلاستی به ترتیب روزهای ۷و۱٤و۲۱ تمایز (L): ۱۰۰bp ladder
(P): کنترل مثبت(DNA خون محیطی تیمار شده با Sss1 و SBS) (U): DNA بدون تیمار SBS (N): بدون DNA

ب: MSP با پرایمر U برای ژن BSP با اندازه باند ۱۱۰bp (۰): سلولهای بنیادی مزانشیمی تمایز نیافته
(۲۱و۱٤و۷): سلولهای تمایز یافته استئوبلاستی به ترتیب روزهای ۷و۱٤و۲۱ تمایز (L): ۱۰۰bp ladder
(P): کنترل مثبت(DNA خون محیطی تیمار شده با SBS) (U): DNA بدون تیمار SBS (N): بدون DNA

بحث

استئوپورز شایعترین بیماری استخوان در جهان می‌باشد که با کاهش توده استخوانی و افزایش شکنندگی استخوان ها همراه است. ۵۰ درصد زنان و ۲۰ درصد مردان بالای ۵۰ سال در معرض ابتلا به استئوپورز قرار دارند(۱۷). این عارضه سالانه هزینه‌های درمانی بسیار بالایی را بخود اختصاص می‌دهد. درمان‌های رایج استئوپورز عمدتاً بر اساس مهار بازجذب استخوان از طریق مهار عملکرد استئوکلاست‌ها می‌باشد(۱۸).

داروهایی که استئوکلاست‌ها را مهار می‌کنند تنها بازجذب استخوان را مهار کرده و نمی‌توانند منابع استخوانی از دست رفته را احیا کند. در مقابل، داروهای جدیدی توسعه پیدا کرده‌اند که مکانیسم اثر آنها مهار استئوکلاستها به همراه القاء تمایز استئوبلاستها می‌باشد. زولدرونیک اسید به عنوان یک بی فسفونات نسل سوم جزو این دسته از داروها بوده که برای پیشگیری از شکستگی‌های اسکلتی در بیماران مختلف مورد استفاده قرار می‌گیرد(۱۹). در سال ۲۰۰۷، FDA مجوز استفاده از این دارو جهت درمان استئوپورز در زنان یائسه را صادر کرد. تحقیقات نشان داده‌اند که مصرف زولدرونیک اسید در زنان یائسه میزان شکستگی مهره‌ها را به شدت کاهش می‌دهد و دانسیته استخوان‌ها را بهبود می‌بخشد(۷). زولدرونیک اسید فعالیت مهار بازجذب

Archive of SID

www.SID.ir

استخوان را بواسطه مهار بلوغ استئوکلاست‌ها، مهار فراخوانی استئوکلاست‌ها به موضع باز جذب استخوان، مهار عملکرد استئوکلاست‌های بالغ، کاهش تولید سیتوکین‌ها همانند IL-1، فعالیت آنتی توموری مستقیم(سیتواستاتیک و سیتولیتیک)، مهار انتشار، تهاجم و چسبندگی به ماتریکس استخوانی سلول‌های توموری اعمال می‌کند(۲۴-۲۰). زولدرونیک اسید علاوه بر استئوکلاست‌ها، منجر به القاء تمایز استئوبلاستی می‌شود ولی مکانیسم اثر این دارو در القاء تمایز استئوبلاستی به خوبی شناخته نشده است. تاثیر ضربانی زولدرونیک اسید به مدت ۳ تا ٦ ساعت در غلظت ۵μM و سپس کشت به مدت ۲ هفته تحت شرایط استئوژنیک منجر به القاء تمایز استئوژنیک در hMSC می‌شود(۱٤). همچنین تحقیقات نشان دادند که بیان ژن‌های شاخص استئوژنیک همانند استئوکلسین و استئوپونتین به دوز داروی زولدرنیک اسید بستگی دارد بطوریکه با کاهش دوز داروی زولدرونیک اسید بیان استئوکلسین و استئوپونتین در طول تمایز استئوبلاستیک کاهش پیدا می‌کند(۲۵). بر این اساس شناخت تاثیر زولدرونیک اسید بر روی بیان ژن‌های شاخص استئوبلاستی همانند سیالوپروتئین استخوانی و مکانیسم اثر آن حایز اهمیت خواهد بود.

سیالوپروتئین استخوانی(BSP) حدود ۱۲-۸٪ از پروتئین‌های غیر کلاژنی در استخوان را تشکیل می‌دهد. BSP یک مولکول شدیداً گلیکوزیله می‌باشد که حدود ۵۰٪ وزن مولکولی آنرا کربوهیدرات‌ها تشکیل می‌دهند که کربوهیدرات‌های عمده آن شامل اسید سیالیک، گلوکز آمین و گالاکتوز آمین می‌باشد(۲٦). سیالوپروتئین استخوانی دارای ۳۲۷ اسید آمینه بوده که ناحیه N ترمینال آن در اتصال به هیدروکسی آپاتیت نقش دارد. همچنین این پروتئین دارای توالی RGD در انتهای کربوکسی می باشد که در چسبندگی سلولی نقش دارد. جایگاه ژنی BSP انسانی(IBSP) بر روی بازوی بلند کروموزوم شماره ٤ قرار گرفته است(۲۷). قابل توجه اینکه جایگاه ژنی اغلب پروتئین‌های ماتریکس استخوانی در همین ناحیه واقع است(۲۸).

ژن‌های BSP، استئوپونتین(OPN)، پروتئین ماتریکس عاج دندان(DMP1) و سیالوفسفوپروتئین عاج دندان(DSPP) در یک ناحیه ژنی به طول ٦۰۰Kb بر روی بازوی بلند کروموزوم شماره ٤ واقع هستند که پروتئین‌هایی را تولید می‌کنند که از نظر عملکردی و ساختاری مشابه هم هستند و در تنظیم مینرالیزاسیون و چسبندگی سلولی دارای نقش می‌باشند.

بیان BSP عمدتاً در ماتریکس مینرالیزه استخوان دیده می‌شود. میزان بیان mRNA، BSP در پری استئوبلاست‌ها خیلی اندک بوده و ردیابی آن مشکل می‌باشد، در حالیکه بیان آن در استئوبلاست ها و استئوسیت‌ها افزایش یافته و به خوبی قابل ارزیابی است(۲۹). این مطلب مؤید یافته های ما می‌باشد که نشان می‌دهد بیان BSP از هفته اول تمایز استئوبلاستی یعنی مرحله پری استئوبلاستی آغاز می‌شود و در هفته های دوم و سوم تمایز استئوبلاستی که سلولهای بالغ استئوبلاست و استئوسیت تشکیل می‌شوند بیان BSP به خوبی قابل ردیابی است. در عین حال یافته‌های قبلی نشان می‌دهند که بیان در مرحله پری استئوبلاستی خیلی اندک است ولی یافته‌های ما نشان می‌دهد که بیان BSP در هفته اول تمایز به خوبی قابل ارزیابی بوده و این نشان دهنده تسریع تمایز استئوبلاستی بواسطه تیمار با داروی زولدرونیک اسید می‌باشد. بر این اساس و همچنین یافته‌های قبلی داروی زولدرونیک اسید بیان BSP را در تمایز استئوبلاستی سلول‌های بنیادی مزانشیمی افزایش می‌دهد(۱٤).

Archive of SID

www.SID.ir

اما بیان محدود بافتی BSP نشان دهنده این مطلب است که نسخه برداری این ژن در حالت نرمال خاموش می‌باشد. این مهار می‌تواند به علت اتصال نوکلئوزوم، متیلاسیون نوکلئوتیدها، نیاز به فاکتورهای نسخه برداری اختصاصی جهت القاء بیان یا ترکیبی از این مکانسیم‌ها باشد. تحقیقات برای نشان دادن اتصال نوکلئوزوم به ناحیه پروموتر BSP، با استفاده از حساسیت به DNase-1، هیچگونه تفاوتی را بین سلول‌های بیان کننده BSP و سلول‌هایی که BSP را بیان نمی‌کردند، نشان نداد(۳۰). بیان BSP تحت تاثیر داروی زولدرونیک اسید در طول تمایز استئوبلاستیک سلول‌های بنیادی مزانشیمی می‌تواند متاثر از سایر مکانیسم‌های اپی ژنتیک باشد.

در این تحقیق وضعیت متیلاسیون ژن BSP در طول تمایز استئوبلاستیک سلول‌های بنیادی مزانشیمی تیمار شده با زولدرونیک اسید مورد ارزیابی قرار گرفت و نشان داده شد که ناحیه پروموتر ژن BSP در سلول‌های بنیادی مزانشیمی و سلول‌های استئوبلاستی تمایز یافته در وضعیت دمتیلاسیون کامل قرار دارد.

بر این اساس تمایز استئوبلاستی تاثیری بر روی وضعیت متیلاسیون این ژن ندارد و بیان این ژن متاثر از تغییر متیلاسیون نمی‌باشد.

احتمالاً سایر مکانیسم‌های ژنتیکی و یا اپی ژنتیکی بیان BSP را در طول تمایزاستئوبلاستی سلول‌های بنیادی مزانشیمی تیمار شده با داروی زولدرونیک اسید تحت کنترل دارند.

نتیجه گیری

در این تحقیق مشخص شد که داروی زولدرونیک اسید بیان BSP را افزایش می‌دهد ولی تغییری در الگوی متیلاسیون پروموتر این ژن ایجاد نمی‌کند. این مطلب نشان می‌دهد که داروی زولدرونیک اسید با استفاده از مکانیسم‌های سلولی دیگری به غیر از متیلاسیون پروموتر BSP، منجر به افزایش بیان این ژن می‌شود. بر این اساس پیشنهاد می شود که به منظور درک بهتر القاء تمایز استئوبلاستی به واسطه داروی زولدرونیک اسید، سایر مکانیسم های ژنتیکی و یا اپی ژنتیکی مورد بررسی قرار گیرند.

تشکر و قدردانی

این تحقیق مستخرج از پایان نامه دکترای رشته خون شناسی آزمایشگاهی و بانک خون و با حمایت مالی دانشکده علوم پزشکی دانشگاه تربیت مدرس انجام شده است.

از نمایندگی شرکت نوارتیس و آقای دکتر جعفری بدلیل تامین داروی زولدرونیک اسید و مرکز تحقیقات سلولی ملکولی و سلول‌های بنیادی صارم بدلیل در اختیار گذاشتن آزمایشگاه و بعضی از مواد، نهایت تشکر و قدردانی را داریم.

منابع

1. Camozzi V, Vescini F, Luisetto G, Moro L. Bone organic matrix components: their roles in skeletal physiology. J Endocrinol Invest 2010 Nov; 33(7): 13-5.

2. Zhou HY, Takita H, Fujisawa R, Mizuno M, Kuboki Y. Stimulation by bone sialoprotein of calcification in osteoblast-like MC3T3-E1 cells. Calcif Tissue Int 1995 May; 56(5): 403-7.

3. Mac Neil RL, Berry J, Strayhorn C, Somerman MJ. Expression of bone sialoprotein mRNA by cells lining the mouse tooth root during cementogenesis. Arch Oral Biol 1996 Aug-Sep; 41(8-9): 827-35.

Archive of SID

www.SID.ir

4. Tost J. DNA Methylation: an introduction to the biology and the disease-associated changes of a promising biomarker. Methods Mol Biol 2009 Nov; 507(1): 3-20.

5. Tarfiei GA, Noruzinia M, Soleimani M, Kaviani S, Mahmoodinia Maymand M, Farshdousti Hagh M , et al. ROR2 promoter methylation change in osteoblastic differentiation of mesenchymal stem cells. CJY 2011; 13(1): 11-8[Article in Persian].

6. Devogelaer JP, Brown JP, Burckhardt P, Meunier PJ, Goemaere S, Lippuner K, et al. Zoledronic acid efficacy and safety over five years in postmenopausal osteoporosis. Osteoporos Int 2007 Sep; 18(9): 1211-8.

7. Black DM, Delmas PD, Eastell R ,Reid IR, Boonen S, Cauley JA, et al. Once-yearly zoledronic acid for treatment of postmenopausal osteoporosis. N Engl J Med 2007 May 3; 356(18): 1809-22.

8. Green JR. Bisphosphonates: preclinical review. Oncologist 2004 Oct; 9(4): 3-13.

9. Chen J, Shapiro HS, Sodek J. Development expression of bone sialoprotein mRNA in rat mineralized connective tissues. J Bone Miner Res 1992 Aug; 7(8): 987-97.

10. Chaplet M, Detry C, Deroanne C, Fisher LW, Castronovo V, Bellahcene A. Zoledronic acid up-regulates bone sialoprotein expression in osteoblastic cells through Rho GTPase inhibition. Biochem J 2004 Dec 15; 384(3): 591-8.

11. Stork S, Stork C, Angerer P, Kothny W, Schmitt P, Wehr U, et al. Bone sialoprotein is a specific biochemical marker of bone metabolism in postmenopausal women: a randomized 1-year study. Osteoporos Int 2000 Jan; 11(9): 790-6.

12. Freshney RI, Stacey GN, Auerbach JM. Culture of human stem cells. 6th ed. USA: John Wiley & Sons; 2007: 207-33.

13. Kazemnejad S, Allameh A, Soleimani M, Gharehbaghian A, Mohammadi Y, Amirizadeh N, et al. Biochemical and molecular characterization of hepatocyte-like cells derived from human bone marrow mesenchymal stem cells on a novel three-dimensional biocompatible nanofibrous scaffold. J Gastroenterol Hepatol 2009 Feb; 24(2): 278-87[Article in Persian].

14. Ebert R, Zeck S, Krug R, Meissner-Weigl J, Schneider D, Seefried L, et al. Pulse treatment with zoledronic acid causes sustained commitment of bone marrow derived mesenchymal stem cells for osteogenic differentiation. Bone 2009 May; 44(5): 858-64.

15. Anonymous. Msterial Safety Data Sheet. Available at: http://www.neb.com/nebecomm /products /product M0226.asp. Jun, 2003.

16. Anonymous. MethPrimer - Design Primers for Methylation PCRs. Available at: http://www.urogene. org/methprimer/index1.html. Nov, 2002.

17. Cheung CL, Xiao SM, Kung AW. Genetic epidemiology of age-related osteoporosis and its clinical applications. Nat Rev Rheumatol 2010 Sep; 6(9): 507-17.

18. Vyskocil V. Current options for the treatment of osteoporosis. Vnitr Lek 2010 Jul; 56(7): 749-58.

19. Leszczynski P. Zoledronic acid reduces risk of any new clinical fracture and risk of death after surgical repair of a low-trauma hip fracture. Chir Narzadow Ruchu Ortop Pol 2010 May-Jun; 75(3): 168-71.

20. Evans CE, Braidman IP. Effects of two novel bisphosphonates on bone cells in vitro. Bone Miner 1994 Aug; 26(2): 95-107.

Archive of SID

www.SID.ir

21. Aparicio A, Gardner A, Tu Y, Savage A, Berenson J, Lichtenstein A. In vitro cytoreductive effects on multiple myeloma cells induced by bisphosphonates. Leukemia 1998 Feb; 12(2): 220-9.

22. Senaratne SG, Pirianov G, Mansi JL, Arnett TR, Colston KW. Bisphosphonates induce apoptosis in human breast cancer cell lines. Br J Cancer 2000 Apr; 82(8): 1459-68.

23. Fromigue O, Lagneaux L, Body JJ. Bisphosphonates induce breast cancer cell death in vitro. J Bone Miner Res 2000 Nov; 15(11): 2211-21.

24. Boissier S, Ferreras M, Peyruchaud O, Magnetto S, Ebetino FH, Colombel M, et al. Bisphosphonates inhibit breast and prostate carcinoma cell invasion, an early event in the formation of bone metastases. Cancer Res 2000 Jun 1; 60(11): 2949-54.

25. Malaval L, Liu F, Roche P, Aubin JE. Kinetics of osteoprogenitor proliferation and osteoblast differentiation in vitro. J Cell Biochem 1999 Sep 15; 74(4): 616-27.

26. Young MF, Kerr JM, Ibaraki K, Heegaard AM, Robey PG. Structure, expression, and regulation of the major noncollagenous matrix proteins of bone. Clin Orthop Relat Res 1992 Aug; 1(281): 275-94.

27. Kerr JM, Fisher LW ,Termine JD, Wang MG, McBride OW, Young MF. The human bone sialoprotein gene(IBSP): genomic localization and characterization. Genomics 1993 Aug; 17(2): 408-15.

28. Mac Dougall M. Refined mapping of the human dentin sialophosphoprotein(DSPP) gene within the critical dentinogenesis imperfecta type II and dentin dysplasia type II loci. Eur J Oral Sci 1998 Jan; 106(1): 227-33.

29. Arai N, Ohya K, Kasugai S, Shimokawa H, Ohida S, Ogura H, et al. Expression of bone sialoprotein mRNA during bone formation and resorption induced by colchicine in rat tibial bone marrow cavity. J Bone Miner Res 1995 Aug; 10(8): 1209-17.

30. Finta C, Kiss A. Footprint analysis of the bsp RI DNA methyltransferase-DNA interaction. Nucleic Acids Res 1997 Jul 15; 25(14): 2841-6.

Archive of SID

www.SID.ir