تاثیر هیپوکسی حاد ۱٪ بر بیان ژن‌های Connexin 43 و CXCR4 در سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از مغز استخوان انسان

مهدی کدیور [۱*] (Ph.D)، فرزانه معصومی گنجگاه [۲] (M.Sc)،

۱- *انستیتو پاستور ایران، بخش بیوشیمی*

۲- *دانشگاه آزاد اسلامی تهران، واحد علوم و تحقیقات*

چکیده

سابقه و هدف: افزایش فشار اکسیژن در کشت سلولی نسبت به حالت In vivo، منجر به تغییراتی در بیان برخی از ژن‌ها و متعاقب آن اختلال در عمل‌کرد طبیعی سلول‌ها می‌گردد. هدف از این مطالعه بررسی اثر هیپوکسی حاد ۱٪ بر بیان ژن‌های Connexin 43 و CXCR4 در سلول‌های بنیادی مزانشیمی انسان در شرایط In vitro بوده است.

مواد و روش‌ها: پس از کشت، گروهی از سلول‌های بنیادی تحت تیمار هیپوکسی ۱٪ به مدت ۴، ۸، ۱۶، ۲۴ و ۴۸ ساعت قرار گرفتند. در گروهی دیگر، پس از اعمال شرایط هیپوکسی، سلول‌ها به مدت ۸ ساعت در شرایط نورموکسی قرار داده شدند. در هر مورد پس از استخراج RNA و سنتز cDNA، به کمک تکنیک Real-time PCR، میزان بیان ژن‌های مورد مطالعه اندازه‌گیری و با گروه نورموکسی مقایسه شد.

یافته‌ها: بیان ژن Connexin 43 در ساعات ۴، ۸ و ۱۶ هیپوکسی به میزان قابل توجهی افزایش یافت. این افزایش بیان در مورد CXCR4 فقط در ساعت ۱۶ هیپوکسی مشاهده شد. در گروه Hypoxia/Re-oxygenation هر چند بیان ژن در مورد Connexin 43 در ساعت‌های ۴ و ۸ به شدت افزایش یافت اما در مورد CXCR4 تغییر معناداری نسبت به گروه هیپوکسی دیده نشد.

نتیجه‌گیری: با توجه به این یافته‌ها، غلظت اکسیژن و مدت اعمال آن نقش اساسی در بیان ژن‌های CXCR4 و Connexin 43 در سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از مغز استخوان انسان دارد. بنابراین بهینه‌سازی غلظت اکسیژن به منظور دست‌یابی به حداکثر بیان در مورد هر ژن در این سلول‌ها ضروری به نظر می‌رسد.

واژه‌های کلیدی: سلول‌های بنیادی مزانشیمی، هیپوکسی، Connexin 43، CXCR4

مقدمه

مغز استخوان منبع مهمی برای سلول‌های بنیادی مزانشیمی (Mesenchymal stem cells: MSCs) است [۳-۱]. برای تعیین هویت سلول‌های بنیادی مزانشیمی از معیارهایی مانند وجود مارکرهای سطحی ویژه و نیز فقدان مارکرهای سطحی سلول‌های هماتوپوئیتیک و سلول‌های اندوتلیال استفاده می‌شود. هم‌چنین توان تمایزی و توانایی اتصال به سطح پلاستیک کشت سلول در آن‌ها ارزیابی می‌گردد [۴]. MSC ها به واسطه توان خود نوزایی (Self-renewal) و تمایز به چندین دودمان سلولی امیدهای زیادی را برای سلول درمانی و ژن درمانی به‌وجود آورده‌اند [۶،۵].

اکسیژن یک مولکول تنظیم‌کننده مهم ژن‌ها در طول رشد و نمو موجود زنده بوده و از مهم‌ترین عوامل تاثیرگذار بر عمل‌کرد سلول‌های بنیادی می‌باشد [۸،۷]. سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان در شرایط طبیعی بدن با فشار کم

*نویسنده مسئول، تلفن: ۶۶۹۶۹۲۹۸-۰۲۱ نمابر: ۶۶۴۰۲۷۷۰-۰۲۱

Email: kadivar@pasteur.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۳۸۹/۶/۲۶ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۰/۱۰/۱۸

Archive of SID
www.SID.ir

اکسیژن سازگار شده‌اند در حالی‌که فشار اکسیژن در شرایط آزمایشگاهی کشت سلولی معادل فشار جو (۲۱٪) می‌باشد. عکس‌العمل این سلول‌ها در انتقال از In vivo به In vitro و یا بر عکس، بر میزان کارآیی آن‌ها اثر می‌گذارد [۹]. وقتی سلول‌های بنیادی مزانشیمی به محیط کشت منتقل می‌شوند، به دلیل تفاوت فاکتورهای مختلف از جمله فشار اکسیژن در In vitro نسبت به In vivo بیان بعضی از ژن‌ها دچار تغییر می‌شود [۱۰]. مهم‌ترین عامل تاثیرگذار بر روی تنظیم ژن‌ها در اثر هیپوکسی فاکتور قابل القا توسط هیپوکسی (Hypoxia inducible factor, HIF) است. این فاکتور رونویسی در پاسخ به هیپوکسی در بسیاری از سلول‌ها نقش مهمی دارد [۱۵-۱۱].

تحت شرایط نرمال در یک جان‌دار پر سلولی ارتباط از طریق اتصالات سلولی نقش مهمی را در عمل‌کرد فیزیولوژیک ایفا می‌کند [۱۷،۱۶]. Connexin 43 یکی از مهم‌ترین پروتئین‌های شرکت‌کننده در ساختار اتصالات سلولی است و در غشاء سلول‌های مختلف یافت می‌شود. هر کانال از اتصال دو همو کانال تشکیل شده است که به مولکول‌های هیدروفیلیک کم‌تر از ۱/۲ کیلو دالتون اجازه عبور از یک سلول به سلول مجاور را می‌دهند [۲۰-۱۸]. اخیراً دخالت کانکسین ۴۳ در تکثیر سلولی و نیز تنظیم آپوپتوز گزارش شده است [۲۲،۲۱]. ژن دیگری که در این مطالعه بررسی شد، رسپتور CXCR4 بود که گیرنده فاکتور SDF-1 و یک عامل مهم برای لانه گزینی سلول‌های اجدادی در بافت‌های ایسکمیک می‌باشد [۲۸-۲۳]. استفاده درمانی از MSC ها بر ظرفیت این سلول‌ها جهت لانه‌گزینی (Homing) و پیوند طولانی مدت به بافت‌های هدف تکیه دارد [۲۹]. گزارش شده است که که بیان CXCR4 توانایی MSC ها را در پاسخ به کموتاکسی القا شده توسط SDF-1، افزایش می‌دهد [۳۱،۳۰]. هم‌چنین مشخص شده است که MSC هایی که در In vivo گیرنده CXCR4 را بیش‌تر بیان می‌کنند، از نظر لانه‌گزینی برتری دارند [۳۶-۳۲].

نظر به کاربرد روز افزون سلول‌های بنیادی مزانشیمی در زمینه‌های پزشکی مختلف و نیز اهمیت نقش اکسیژن به عنوان یکی از مهم‌ترین عوامل محیطی تاثیرگذار بر عمل‌کرد سلول‌های یاد شده و هم‌چنین با توجه به اهمیت دو ژن Connexin 43 و نیز گیرنده CXCR4 در فیزیولوژی این سلول‌ها، در مطالعه حاضر به بررسی تاثیر هیپوکسی ۱٪ بر میزان بیان این ژن‌ها در سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از مغز استخوان انسان پرداخته‌ایم.

مواد و روش‌ها

ذوب و کشت سلول‌ها: سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از مغز استخوان انسان از بانک سلولی پژوهشگاه رویان به صورت منجمد تهیه شد. جهت کشت سلول‌ها، از محیط (DMEM, Gibco) Dulbecco's Modified Eagle Medium غنی شده با FBS ۱۰٪ و نیز ۱۰۰ واحد در میلی‌لیتر پنی‌سیلین (Sigma) و ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر استرپتومایسین (Sigma) استفاده شد. یک ویال از سلول‌های بنیادی منجمد را برداشته و بلافاصله پس از ذوب شدن در انکوباتور ۳۷ درجه، محتویات آن داخل فالکون حاوی ۱۰ میلی‌لیتر محیط کشت ریخته می‌شود. سپس سلول‌ها با دور g ۳۰۰ و به مدت ۵ دقیقه سانتریفوژ می‌شود تا اثرات سمی DMSO موجود در محیط انجماد حذف شود. پس از سانتریوفوژ، مایع رویی دور ریخته شده و رسوب سلولی با ۱ میلی‌لیتر محیط کشت مخلوط شد. در این مرحله میزان زنده بودن سلول‌ها با تریپان بلو سنجیده شد که بالای ۹۵٪ بود. نهایتاً سلول‌ها به داخل فلاسک کشت سلولی $25\ cm^2$ حاوی ۶ میلی‌لیتر محیط کشت منتقل و درون انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و فشار CO_2 ۵٪ قرار گرفت. پس از رشد و تکثیر سلول‌ها به تعداد کافی، جهت اعمال شرایط هیپوکسی سلول‌ها از فلاسک به پلیت‌های ۶ خانه‌ای منتقل شدند. هنگامی که تراکم سلول‌ها به حدود ۸۰٪ تا ۹۰٪ برسد، برای اعمال شرایط هیپوکسی مناسب می‌باشند.

Archive of SID

www.SID.ir

یجاد شرایط هیپوکسی: برای ایجاد شرایط هیپوکسی حاد ۱٪ از اتاقک (Chamber) ساخت شرکت Billups-Rothenberg استفاده شد. این اتاقک دارای یک شیر ورودی و یک شیر خروجی همراه با یک فلومتر است. پس از قرار دادن پلیت سلولی به داخل اتاقک، شیر ورودی فلومتر به کپسول گاز حاوی مخلوطی از گازها (۹۵٪ گاز نیتروژن، ۵٪ گاز دی‌اکسیدکربن و ۱٪ گاز اکسیژن) و شیر خروجی آن به اتاقک متصل گردید. جهت تامین رطوبت مورد نیاز سلول‌ها، قبلاً ظرفی حاوی مقداری آب مقطر استریل در اتاقک قرار داده شد. سپس با باز کردن شیر ورودی اجازه داده می‌شود مخلوط گازها با فشار ۱۵ لیتر در دقیقه و به مدت پنج دقیقه وارد اتاقک شود. پس از این مدت، هم‌زمان با بستن شیر گاز، دو شیر ورودی و خروجی اتاقک به کمک گیره‌های موجود، مسدود می‌شود. سپس اتاقک درون انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار می‌گیرد. در آزمایشات هیپوکسی پس از گذشت مدت زمان‌های مشخص در هر آزمایش (۴، ۸، ۱۶، ۲۴ و ۴۸ ساعت)، پلیت از اتاقک خارج شده و بلافاصله Total RNA سلول‌های آن استخراج می‌گردد. در آزمایشات Hypoxia/Re-oxygenation، پس از گذشت زمان‌های یاد شده، پلیت از اتاقک خارج شده و به مدت ۸ ساعت درون انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و فشار CO_2 ۵٪ در شرایط نورموکسی قرار می‌گرفت و پس از آن Total RNA سلول‌ها استخراج می‌گردید.

استخراج RNA: جهت استخراج RNA Total از کیت سینا ژن و مطابق دستورالعمل این کیت عمل شد. به طور خلاصه، ابتدا ۱ میلی‌لیتر $RNX^{(Plus)}$ به رسوب سلولی اضافه می‌شود. پس از ۵ دقیقه مخلوط حاصل به ویال ۱/۵ سی‌سی منتقل شده و ۲۰۰ میکرولیتر کلروفرم به آن اضافه می‌شود. پس از مخلوط کردن، ویال در دمای اتاق به مدت ۵ دقیقه انکوبه می‌شود. سپس محتویات ویال در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد با دور rpm ۱۲۰۰۰به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفوژ می‌شود. فاز رویی به یک تیوب جدید منتقل شده و به آن معادل هم حجم آن ایزوپروپانول افزوده می‌شود. سپس به مدت ۱۵ دقیقه در یخ انکوبه شده و مجدداً به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد و دور rpm ۱۲۰۰۰ سانتریفوژ می‌گردد. مایع شفاف رویی دور ریخته شده و ۱ میلی‌لیتر اتانول ۷۵٪ به رسوب اضافه می‌شود و به مدت ۸ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد با دور rpm ۷۵۰۰ سانتریفوژ می‌شود. مایع رویی دور ریخته شده و رسوب در دمای اتاق به مدت ۱۰-۵ دقیقه انکوبه می‌شود. سپس ۵۰-۳۰ میکرولیتر آب DEPC به تیوب اضافه شد. نمونه حاصل پس از تعیین غلظت توسط دستگاه نانودراپ جهت سنتز cDNA مورد استفاده قرار می‌گیرد.

سنتز cDNA: جهت سنتز cDNA از کیت AccuPower CycleScript RT PreMix استفاده و مطابق دستورالعمل این کیت عمل شد. تیوب‌های واکنش در این کیت از پیش آماده است و هر تیوب حاوی آنزیم مقاوم به حرارت CycleScript Reverse Transcriptas، dNTPها، پرایمر (هگزامرهای تصادفی و الیگومرهای داکسی‌تیمین)، بافر و پایدارکننده می‌باشد. پس از اضافه کردن یک میکروگرم RNA و رساندن حجم نهایی به ۲۰ میکرولیتر، مخلوط حاصل برای سنتز cDNA وارد چرخه دما- زمان در دستگاه ترموسایکلر می‌شود. برنامه دمایی دستگاه به این شرح است: ۱، ۲۵، ۱۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، ۲، ۴۲،۴۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴ دقیقه، ۳، ۵۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه. این سه مرحله ۱۲ بار تکرار می‌شوند. در آخر تیوب برای ۵ دقیقه در ۹۵ درجه سانتی‌گراد انکوبه می‌شود. پس از سنتز cDNA غلظت آن توسط نانو دراپ سنجیده می‌شود.

طراحی پرایمرها: توالی ژن‌های Connexin 43 و CXCR4 به عنوان ژن‌های هدف و توالی ژن RNA polII به‌عنوان ژن رفرنس از سایت اینترنتی http://www.ncbi-nlm.nih.gov اخذ و پرایمرهای مستقیم و معکوس برای هر ژن توسط نرم‌افزارهای Gene Runner طراحی شدند (جدول۱).

Real time PCR: ۱۰میکرولیتر Master Mix، ۲ ماکرولیتر پرایمر مستقیم و معکوس، ۴ میکرولیتر cDNA و ۴ میکرولیتر آب دیونیزه را با هم مخلوط کرده تا حجم نهایی

Archive of SID
www.SID.ir

مخلوط به ۲۰ میکرولیتر برسد. مخلوط حاصل در دستگاه Real Time PCR مدل Corbett 6000 با برنامه دمایی مشخص قرار داده شد (جدول ۲). پس از واکنش تفاوت Ct ژن هدف به ژن رفرنس به صورت CtΔ برای هر نمونه محاسبه شد. سپس برای هر مورد $^{-\Delta\Delta}$۲ به‌دست آمد و نسبت اعداد حاصل به نرمال، بر اساس درصد محاسبه شد. به کمک نرم‌افزار آماری SPSS، نتایج داده‌ها به صورت Mean±SEM گزارش شده و اختلاف میانگین گروه‌ها با آزمون آماری ANOVAیک طرفه به دست آمد. در مورد مقایسه دو گروه با هم از تست Post Hoc توکی استفاده گردید. در همه موارد مقدار p کم‌تر از ۰/۰۵ (P<0.05) به عنوان سطح معنی‌داری در نظر گرفته شد.

جدول ۱. توالی‌ها و خصوصیات پرایمرهای طراحی شده و به کار رفته جهت Real Time PCR

ژن	جهت پرایمر	توالی پرایمر	درصدGC	طول	Tm
CXCR4	F	5`ACTGAGAAGCATGACGGACAAGTAC 3`	۴۸	۲۵	۵۹,۷
	R	5` GCATAGGAAGTTCCCAAAGTACCAG '3	۴۸	۲۵	۶۰,۲
Connexin 43	F	5` TGGCGTGACTTCACTACTTTTAAGC 3`	۴۴	۲۵	۵۹,۸
	R	5` CCTTCCCTCCAGCAGTTGAGTAG 3`	۵۷	۲۳	۶۰,۲۶
RNA pol II	F	5`GCTGGTTTTGGTGACGACTTG 3`	۵۲	۲۱	۵۹,۲
	R	5`TCTTCCTCCTCTTGCATCTTGTTC 3`	۴۶	۲۴	۵۹,۸

جدول ۲. برنامه دمایی- زمانی به کار رفته در Real Time PCR

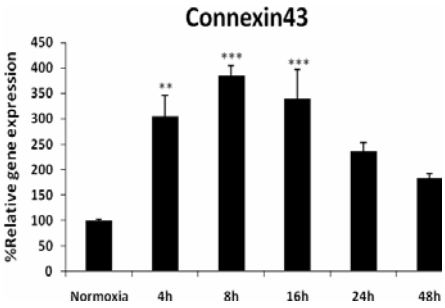
مرحله	شرایط دما- زمان	تعداد تکرار	توضیحات
واسرشتگی اولیه	۹۵Ċ، ۱۵ ثانیه	۱	HotStart فعال شدن آنزیم
واسرشتگی	۹۵Ċ، ۵ ثانیه	۴۰	سیکل های تکثیر
اتصال/ بسط پرایمر	۶۰Ċ، ۲۵ ثانیه		
تشکیل منحنی ذوب (تفکیک)	۹۵Ċ، ۱۵ ثانیه ۶۰Ċ، ۳۰ ثانیه ۹۵Ċ، ۱۵ ثانیه	۱	تشخیص پرایمر دایمر تشخیص تکثیر قطعه هدف (مطلوب)

نتایج

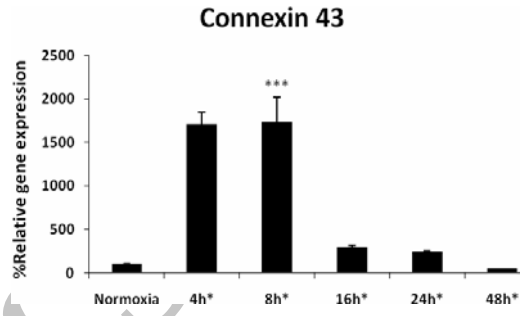
چنان‌چه در شکل ۱ مشاهده می‌شود، بیان ژن Connexin 43 در شرایط هیپوکسی حاد ۱٪ در ساعات ۴ (P<۰/۰۱)، ۸ و ۱۶ (P<۰/۰۰۱) نسبت به حالت نرمال (نورموکسی)، افزایش یافت. هم‌چنین بیان این ژن در حالت Hypoxia/Re-oxygenation در ساعات ۴ و ۸ (P<۰/۰۰۱) نسبت به شرایط نرمال افزایش نشان می‌دهد (شکل ۲). در مقایسه دو حالت هیپوکسی و Hypoxia/Re-oxygenation بیان ژن Connexin43 درشرایط Hypoxia/Re-oxygenation نسبت به حالت هیپوکسی در ساعات۴ و ۸ (P<۰/۰۰۱) افزایش یافته است (شکل ۳). ژن CXCR4 درساعت ۱۶ هیپوکسی نسبت به حالت نرمال افزایش بیان و در ساعت ۴۸ کاهش بیان نشان داده است (P<۰/۰۵) (شکل ۴). بیان همین ژن در حالت Hypoxia/Re-oxygenation در ساعت ۱۶ هیپوکسی (P<۰/۰۰۱) افزایش و در ساعات ۴، ۸ و ۴۸ نسبت به حالت نرمال کاهش دارد (P<۰/۰۰۱) (شکل ۵). در مقایسه دو حالت هیپوکسی و Hypoxia/Re-oxygenation در مورد ژن CXCR4 تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد (شکل ۶).

Archive of SID

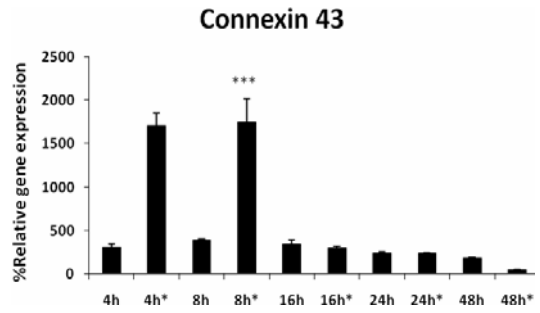
www.SID.ir



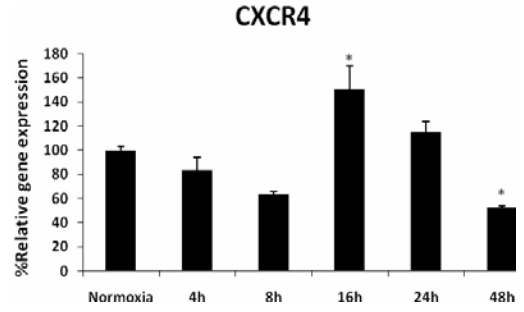
شکل ۱. آنالیز بیان ژن Connexin 43 در گروه‌های آزمایشی ۴، ۸ ،۱۶،۲۴ و ۴۸ ساعت هیپوکسی نسبت به گروه نورموکسی به کمک آزمون آماری ANOVA یک طرفه



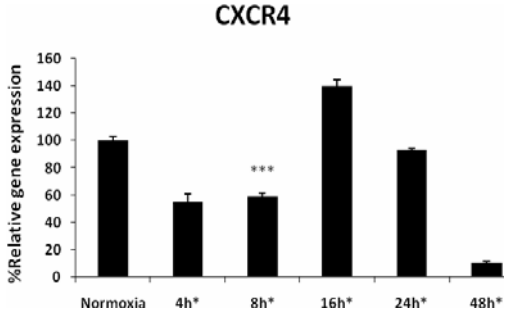
شکل ۲. آنالیز بیان ژن Connexin 43 در گروه‌های آزمایشی ۴، ۸ ،۱۶،۲۴ و ۴۸ ساعت Hypoxia/Re-oxygenation و مقایسه آن با گروه نورموکسی به کمک آزمون آماری ANOVA یک طرفه



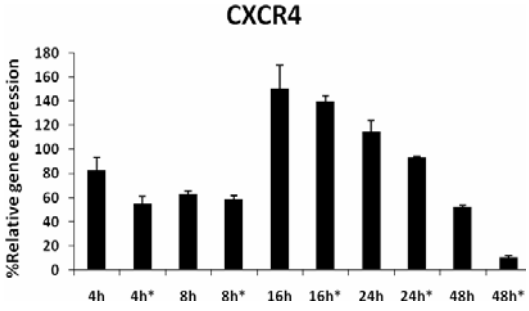
شکل ۳. مقایسه بیان ژن Connexin 43 درگروه‌های هیپوکسی با گروه‌های Hypoxia/Re-oxygenation به کمک آزمون آماری ANOVA یک طرفه



شکل ۴. آنالیز بیان ژن CXCR4 در گروه‌های آزمایشی۴، ۸ ،۱۶،۲۴ و ۴۸ ساعت هیپوکسی نسبت به گروه نورموکسی به کمک آزمون آماری ANOVA یک طرفه



شکل ۵. آنالیز بیان ژن CXCR4 در گروه‌های آزمایشی ۴، ۸ ،۱۶،۲۴ و ۴۸ ساعت Hypoxia/Re-oxygenation و مقایسه آن با گروه نورموکسی به کمک آزمون آماری ANOVA یک طرفه



شکل ۶. مقایسه بیان ژن CXCR4 در گروه‌های هیپوکسی با گروه‌های Hypoxia/Re-oxygenation به کمک آزمون آماری ANOVA یک طرفه (علامت* بالای h نشان دهنده Hypoxia/Re-oxygenation است).

بحث و نتیجه‌گیری

بر طبق یافته‌های مطالعه حاضر، در شرایط هیپوکسی ۱٪، بیان ژن Connexin 43 در ساعات اولیه افزایش معناداری را نسبت به شرایط نورموکسی نشان داد. در مورد ژن CXCR4، پس از گذشت ۱۶ ساعت از هیپوکسی افزایش خفیفی در بیان مشاهده شد. تحت شرایط Hypoxia/Re-oxygenation میزان بیان ژن Connexin 43 نسبت به شرایط نورموکسی در ۴ و ۸ ساعت به طور قابل توجهی افزایش یافت و حتی این افزایش بیان از افزایش بیان ایجاد شده در شرایط هیپوکسی نیز بسیار بیش‌تر بود (شکل ۵). از طرفی تحت این شرایط میزان بیان ژن CXCR4، در ساعات ۴ و ۸ و ۴۸ کاهش و در ساعت ۱۶ افزایش نشان داد.

Archive of SID
www.SID.ir

در شرایط In vivo فشار اکسیژن به میزان رگ‌زایی و نوع ریز محیط (Microenvironment) و نیز نوع اندام بستگی دارد. سطح اکسیژن در مغز استخوان در اطراف سینوس‌ها حدود ۵٪ و در سطح درونی قسمت قشری استخوان در حدود ۱٪ است بنابراین سلول‌های ساکن در مغز استخوان از جمله سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان تحت شرایط هیپوکسی قرار دارند. در شرایط In vitro سلول‌ها به ناچار در معرض فشار اکسیژنی بالاتر از حد طبیعی بدن و معادل ۲۱٪ قرار می‌گیرند [۳۶]. به همین دلیل معمولاً بیان ژن‌ها در انتقال از In vivo به In vitro و یا برعکس تغییر می‌کند.

یافته‌های ما در مورد ژن Connexin 43، در تطابق با مطالعه‌ای است که نشان داده بود بیان ژن Connexin 43 در شرایط هیپوکسی مزمن به‌طور چشم‌گیری بالا می‌رود [۳۷]. در مطالعه‌ای دیگر، میزان بیان این ژن در سلول‌های ماهیچه صاف عروق تحت شرایط هیپوکسی حاد بررسی شده است. شرایط هیپوکسی در این بررسی ۱۵میلی‌متر جیوه و نورموکسی ۱۵۰ میلی‌متر جیوه در نظر گرفته شده است. مشخص شد که در ساعات ۱، ۲، ۲۴ و ۴۸ هیپوکسی بیان بالای این ژن نسبت به شرایط نورموکسی افزایش یافت. هم‌چنین تعدادی از سلول‌ها پس از هیپوکسی ۲۴ ساعته در معرض نورموکسی، به مدت ۴، ۸ و ۲۴ ساعت قرار گرفتند که میزان بیان در این شرایط در ساعت ۴ Hypoxia/Re-oxygenation افزایش یافته اما در ساعت ۸ آن دوباره به سطح پایه بازگشت [۳۸]. تفاوت در سلول‌های مورد بررسی در این دو تحقیق می‌تواند علت برخی از تفاوت‌ها در نتایج حاصله باشد. در مطالعه‌ای دیگر ارتباط ATP رها شده در شرایط هیپوکسی با میزان بیان Connexin 43 و فسفوریلاسیون این همی کانال مورد بررسی قرار گرفته است. در این بررسی سلول‌ها به مدت متغییر در هیپوکسی حاد ۲٪ قرار گرفتند. از جمله نتایج حاصله کاهش میزان بیان Connexin 43 در هیپوکسی ۲۴ ساعته و کاهش در ATP رها شده از سلول در ۴۸ ساعت بود. علت کاهش در میزان رها شدن ATP کاهش بیان Connexin 43 و فسفوریلاسیون این همی کانال ذکر شد [۳۹]. این در حالی که در مطالعه‌ای مشابه ATP رها شده از اندوتلیال ریه در شرایط هیپوکسی افزایش نشان داد [۴۰]. به طور کلی در بررسی نتایج تاثیر اعمال هیپوکسی بر سلول‌ها باید عوامل مختلف درگیر در این شرایط را از جمله نوع سلول، میزان و شدت و نیز نوع هیپوکسی به کار رفته (مزمن یا حاد) مورد بررسی قرار داد. نهایتاً به نظر می‌رسد تاثیر هیپوکسی بر بیان ژن به نوع سلول، شرایط محیط کشت، و مدت زمان کشت بسیار وابسته است. به طوری که تغییر در هر یک از این شرایط می‌تواند باعث تفاوت‌های محسوس در نتایج حاصله شود. از سوی دیگر ژن‌های مختلف نیز می‌توانند بر بیان یک ژن تاثیر داشته باشند. که تفسیر یافته‌ها را پیچیده‌تر می‌کند [۴۱].

دومین ژنی که بیان آن در تحقیق حاضر تحت شرایط هیپوکسی ۱٪ حاد مورد بررسی قرار گرفت ژن CXCR4 بود. به نظر می‌رسد به طور کلی Hypoxia/Re-oxygenation نسبت به حالت هیپوکسی تاثیر خاصی بر بیان این ژن ندارد به طوری که تفاوت معنی‌داری در بیان CXCR4 تحت شرایط هیپوکسی و Hypoxia/Re-oxygenation مشاهده نشد. مشخص شده است که سلول‌های بنیادی مزانشیمی می‌توانند خود را با شرایط هیپوکسی سازگار کنند. به‌عنوان مثال در جهت سازگاری با شرایط هیپوکسی مصرف گلوکز افزایش می‌یابد و بنابراین توان بقای آن‌ها تا حدودی به گلیکولیز وابسته می‌شود [۳۶]. هیپوکسی از طریق القا بیان فاکتور ۱ مشتق از سلول‌های استرومایی (SDF-1) و متعاقباً گیرنده‌اش (CXCR4) نقش مهمی را در تحرک و لانه‌گزینی سلول‌های بنیادی مزانشیمی ایفا می‌کند [۳۸]. از جمله فاکتورهای دیگری که بر بیان ژن گیرنده CXCR4 در شرایط هیپوکسی می‌تواند اثرگذار باشد، فاکتور HIF-1 است. این فاکتور در طول هیپوکسی به میزان زیادی بیان شده و به عناصر پاسخ‌دهنده به هیپوکسی در پروموتور ژن‌ها (HERS) اتصال می‌یابد [۴۱]. HIF-1 علاوه بر CXCR4 بر روی SDF-1 هم اثر تنظیمی دارد [۴۴-۴۲]. از طرفی خود SDF-1 بر بیان CXCR4 نیز تاثیر می‌گذارد به نحوی که در سلول‌هایی بنیادی مزانشیمی که

Archive of SID

www.SID.ir

در شرایط سه بعدی کشت داده شده بودند رابطه عکسی میان بیان SDF-1 و CXCR4 مشاهده شده است [۳۵]. با توجه به این که سلول‌های مختلف از نظر مدت زمان بیان SDF-1 با هم تفاوت دارند [۴۵]، می‌توان گفت در شرایط هیپوکسی نتایج مربوط به بیان ژن SDF-1 و نهایتاً CXCR4 تا حد زیادی تحت تاثیر نوع سلول، نوع هیپوکسی به کار رفته (حاد یا مزمن) و نیز میزان و شدت هیپوکسی قرار می‌گیرد. در کل، یافته‌های حاضر حاکی از آن است که ایجاد شرایط هیپوکسی حاد ۱٪ و نیز ایجاد شرایط Hypoxia/Re-oxygenation می‌تواند اثر افزاینده‌ای بر بیان ژن Connexin 43 داشته باشد و بنابراین در مطالعاتی که هدف نیل به بیان هر چه بیش‌تر این ژن در سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از مغز استخوان می‌باشد، ایجاد این شرایط پیشنهاد می‌گردد. با این وجود در مورد ژن CXCR4 ایجاد شرایط هیپوکسی ۱٪ حاد و یا به دنبال آن Hypoxia/Re-oxygenation تاثیر چندانی بر افزایش بیان این ژن نداشته باشد.

هر چند مطالعه حاضر فقط به بیان ژن در سطح mRNA محدود بوده و سطح پروتئین ژن‌های مورد مطالعه را بررسی نمی‌کند اما از مجموع یافته‌های حاضر می‌توان چنین نتیجه‌گیری کرد که با توجه به نقش اساسی اکسیژن در بیان ژن‌ها، بهینه‌سازی غلظت اکسیژن به منظور دست‌یابی به حداکثر بیان در مورد ژن‌های CXCR4 و Connexin 43 در سلول‌های بنیادی مزانشیمی انسانی و قبل از انجام هر گونه به کارگیری آن‌ها در کلینیک، ضروری است.

تشکر و قدردانی

این مطالعه در بخش بیوشیمی انستیتو پاستور ایران و به موجب طرح تحقیقاتی شماره ۵۱۰ انجام شد. نویسندگان لازم می‌دانند از همکاری اعضای محترم گروه بیوشیمی تشکر و قدردانی نمایند.

منابع

[1] Dvorkova J, Hruba A, Velebny V, Kubala L. Isolation and characterization of mesenchymal stem cell population entrapped in bone marrow collection sets. Cell Biol Int 2008; 32: 1116-1125.

[2] Ding DC, Shyu WC, Lin SZ. Mesenchymal stem cells. Cell Transplant 2011; 20: 5-14.

[3] Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, et al. Multi lineage potential of adult human mesenchymal stem cells. Science 1999; 284: 143-147.

[4] Vemuri MC, Chase LG, Rao MS. Mesenchymal stem cell assays and applications. Methods Mol Biol 2011; 698: 3-8.

[5] Zhu W, Xu W, Jiang R, Qian H, Chen M, Hu J, et al. Mesenchymal stem cells derived from bone marrow favor tumor cell growth in vivo. Exp Mol Pathol 2006; 80: 267-274.

[6] Trounson A, Thakar RG, Lomax G, Gibbons D. Clinical trials for stem cell therapies. BMC Med 2011; 9: 52.

[7] Grayson WL, Zhao F, Izadpanh R, Bunnell B, Ma T. Effects of hypoxia on human mesenchymal stem cell expression and plasticity in 3D constructs. J Cell Physiol 2006; 207: 331-339.

[8] Mohyeldin A, Garzon-Muvdi T, Quinones-Hinojosa A. Oxygen in stem cell biology: a critical component of the stem cell niche. Cell Stem Cell 2010; 7: 150-161.

[9] Das R, Jahr H, Van Osch GJ, Farrell E. The role of hypoxia in bone marrow- derived mesemchymal stem cells: considerations for regenerative medicine approaches. Tissue Eng Part B Rev 2010; 16: 159-168.

[10] Abdollahi H, Harris LJ, Zhang P, McIlhenny S, Srinivas V, Tulenko T, DiMuzioPJ. The role of hypoxia in stem cell differentiation and therapeutics. J Surg Res 2011; 165: 112-117.

[11] Kim H, Peng G, Hicks JM, Weiss HL, Vanmeir EG, Brenner MK, Yotnda P. Engineering Human Tumor- specific cytotoxic T cells to function in a Hypoxic environment. Mol Ther 2008; 163: 599-606.

[12] Shweiki D, Itin A, Soffer D, Keshet E. Vascular endothelial growth factor induced by hypoxia may mediate hypoxia-initiated angiogenesis. Nature 1992; 359: 843-845.

[13] Glodberg MA, Glass GA, Cunningham JM, Bunn HF. The regulated expression of erythropoietin by two human hepatoma cell lines. Proc Natl Acad Sci U S A 1987; 84: 7972-1976.

[14] Semenza Gl, Wang Gl. A nuclear factor induced by hypoxia via de novo protein synthesis binds to the human erythropoietin gene enhancer at a site required for transcriptional activation. Mol Cell Biol 1992; 12: 5447-5454.

[15] Kawanami D, Mahebeleshwar Gh, Lin Z, Atkins GB, Hami KA, Haldar SM, et al. Kuppel-like factor 2 inhibits hypoxia-inducible factor 1& expression and function in the endothelium. J Biol Chem 2009; 284: 20522-20530.

[16] Kandouz M, Batist G. Gap junctions and connexins as therapeutic targets in cancer. Expert Opin Ther Targets 2010; 14: 681-692.

[17] Miura T, Miki T, Yano T. Role of the gap junction in ischemic preconditioning in the heart. Am J Physiol Heart Circ Physiol 2010; 298: 1115-1125.

[18] Segretaion D, Flak MM. Regulation of connexin biosynthesis, assembly, gap junction formation, and removal. Biochem Biophys Acta 2004; 1662: 3-21.

[19] Girdia SF, Mikami M, Goubaeva F, Yang J. Connexin43 confers resistance to hydrogen peroxide- mediated apoptosis. Biochem Biophys Res commun 2007; 362: 747-752.

[20] Saex JC, Berthoud VM, Branes EC, Martinez AD, Beyer EC. Plasma membrane channels formed by connexins: their regulation and functions. Physiol Rev 2003; 83: 1359-1400.

[21] Wang D, Shen W, Zhang F, Chen M, Chen H, Cao K. Connexin 43 promotes survival of mesenchymal stem cells in ischemic heart. Cell Bio Int 2010; 34: 415-423.

[22] Bhattacharjee R, Kaneda M, Nakahama K, Morita I. The steady-state expression of connexin 43 is maintained by the pl3k/Akt in osteoblasts. Biochem Biophys Res Commun 2009; 382: 440-444.

[23] Bleu CC, Farzan M, Choe H, Parolin C, Clark-Lewis I, Sodroski J, Springer TA. The lymphocyte chemoattractant SDF-1 is a ligand for Lester/fusin and blocks HIV-1 entry. Nature 1996; 382: 829-833.

[24] Abrantes J, Esteves PJ, Carmo CR, Muller A, Thompson G, Van der Loo W. Genetic Characterization of the chemokine receptor CxCR4 gene in lagomorphs: comparison between the families Ochotonidae and Leporidae. Int J Immunogenet 2008; 35: 111-117.

Archive of SID

www.SID.ir

[25] Kryczek I, Wei SH, Keller E, Liu R, Zou W. Stroma-derived factor (SDF-1/CXCL12) and human tumor pathogenesis. Am J Physiol Cell Physiol 2007; 292: 987-995.

[26] Cheng Z, Ou L, Zhou X, Li F, Jia X, Zhang Y, et al. Targeted migration of mesenchymal steam cells modified with CXCR-4 gene to infarcted myocardium improves cardiac performances. Mol Ther 2008; 16: 571-579.

[27] Doranz BJ, Orsini MJ, Turner JD, Hoffman TL, Berson JF, Hoxie JA, et al. Identification of CXCR-4 domains that support corrector and chemokine receptor functions. J Virol 1999; 73: 2752-2761.

[28] Wegner SA, Ehrenberg PK, Chang G, Dayhoff DE, Sleeker Al, Michael NL. Genomic organization and functional characterization of the chemokine receptor CXCR-4, a major entry co-receptor for human immunodeficiency virus typ 1. J Biol Chem 1998; 273: 4754-4760.

[29] Shi M, Li J, Liao L, Chen B, Li B, Chen L, et al. Regulation of CXCR-4 experession in human mesenchymal stem cells by cytokine treatment: role in ho homing efficiency in NOD/SCID Mice. Hematologica 2007; 92: 897-904.

[30] Sharma M, Afrin F, Satija N, Tripathi RP, Gangenahalli GU. Stromal-derived factor-1/CXCR4 signaling: indispensable role in homing and engraftment of hematopoietic stem cells in bone marrow. Stem Cells Dev 2011; 20: 933-946.

[31] Moll NM, Ransohoff RM. CXCL12 and CXCR4 in bone marrow physiology. Expert Rev Hematol 2010; 3: 315-322.

[32] Kyriakou C, Rabin N, Pizzey A, Nathwani A, Yong K. Factors that influence short-term homing of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells in a xenogeneic animal model. Hematologica 2008; 93: 1457-1465.

[33] Yu L, Hales CA. Effect of chemokine receptor CXCR-4 on hypoxia- induced pulmonary hypertension and vascular remodeling in rats. Respir Res 2011; 12: 21.

[34] Sehgal A, Ricks S, Boynton AL, Warrick J, Murphy GP. Molecular characterization of CXCR-4: A potential brain tumor-associated gene. J Surg Oncol 1998; 69: 239- 248.

[35] Potapova IA, Brink PR, Cohen IS, Doronin SV. Culturing of human mesenchymal stem cells as three-dimensional aggregates induces functional expression of CXCR-4 that regulates adhesion to endothelial cells. J Biol Chem 2008; 283: 13100-13107.

[36] Fehrer C, Brunauer R, Laschober G, Unterluggauer H, Reitinger S, Kloss F, et al. Reduced oxygen tension attenuates differentiation capacity of human mesenchymal stem cells and prolongs their lifespan. Aging Cell 2007; 6: 745-757.

[37] Grayson WL, Zhao F, Bunnell B, Ma T. Hypoxia enhances proliferation and tissue formation of human mesenchymal stem cells. Biochem Biophys Res Commun 2007; 358: 948-953.

[38] Cowan DB, Jones M. Garcia LM, Noria S, del Nido PJ, McGowanir FX. Hypoxia and stretch regulate intercellular communication in vascular smooth muscle cells through reactive oxygen species formation. Arterioscler Thromb Vasc Biol 2003; 23: 1754-1760.

[39] Faigle M, Seessle J, Zug S, El Kasmi KC, Eltzsching HK. ATP release from vascular endothelia occurs ocross CX43 hemi channels and is attenuated during hypoxia. PLoS One 2008; 3: 2801.

[40] Gerasimovskaya EV, Ahmad S, White CW, Jones PL, Carpenter TC, Stenmark KR. Extra cellular ATP is an auto crenel paracrine regulator of hypoxia induced adventitial fibroblast growth signaling through extra cellular signal regulated kinase- ½ and the EGr-1 transcription factor. J Bio Chem 2002; 227: 44638-44650.

[41] Semenza GL. HIF-1: mediatior of physiological and pathophysiological responses to hypoxia. I APPl Physiol 2000; 88: 1474-1480.

[42] Ratajczak MZ, Zuba-Surma E, Kucia M, Reca R, Wojakowski W, Ratajczak J. The pleiotropic effects of the SDF-1-CXCR4 axis in organogenesis, regeneration and tumor genesis. Leukemia 2006; 20: 1915-1924.

[43] Liu H, Xue W, Ge G, Luo X, Li Y, Xiang H, et al. Hypoxia preconditioning advances CXR-4 and CXR-7 expression by activating HIF-1α in MSCS. Biochem Biophys Res Commun 2010; 401: 509-515.

[44] Page RL, Ambody S, Holmes WF, Vilner L, Kole D, Kashpur O, et al. Induction of stem cell gene expression in adult human fibroblast without transgenes. Cloning Stem Cells 2009; 11: 417-426.

[45] Stumm Rk, Rummel J, Juker V, Culmsee C, Pfeiffer M, Krieglstein J, et al. A dual role for the SDF-1/ CXCR-4 chemokine receptor system in adult brain: isoform-selective regulation of SDF-1 expression modulates CXCR-4 dependent neuronal plasticity and cerebral Leukocyte recruitment after focal ischemia. J Neurosci 2002; 22: 5865-5878.

Archive of SID

www.SID.ir