مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد
دوره ۲۲، شماره ۴، مهر و آبان ۱۳۹۳
صفحه: ۱۴۱۸-۱۴۰۶

Journal of Shahid Sadoughi University of Medical Sciences
Vol. 22, No. 4, Sep-Oct 2014
Pages: 1406-1418

بررسی آزمایشگاهی اثر ویتامین E بر قدرت زیستی، تغییرات مورفولوژیک و القاء تمایز استئوژنیک در سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغزاستخوان رت بالغ

ملک سلیمانی مهرنجانی*[۱]، آتناسادات عظیمی[۲]

۱- دانشیار بافت و جنین شناسی، دانشگاه اراک، اراک، ایران
۲- کارشناس ارشد زیست شناسی/سلولی-تکوینی، دانشگاه اراک، اراک، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۱۲/۲۲ تاریخ پذیرش:۱۳۹۳/۳/۸

چکیده

مقدمه: ویتامین E به عنوان یک آنتی‌اکسیدانت قوی نقش مهمی در مهار رادیکال‌های آزاد ایفا می‌کند. هدف از این پژوهش، بررسی نقش ویتامین E بر توانایی زیستی، تغییرات مورفولوژیک و القاء تمایز استئوژنیک سلول‌های بنیادی مزانشیم مغز استخوان رت بالغ است.

روش بررسی: سلول‌های بنیادی مزانشیم مغز استخوان در شرایط استریل با روش فلشینگ، استخراج شدند. پس از پاساژ سوم سلول‌ها به گروه‌های کنترل و تیمار شده با ویتامین E (۵، ۱۰، ۱۵، ۲۵، ۵۰، ۱۰۰ و ۱۵۰ میکرومولار) برای مدت ۲۱ روز در محیط کشت استئوژنیک حاوی ۱۰٪ سرم تقسیم شدند. توانایی زیستی سلول‌ها، میزان معدنی شدن ماتریکس سلولی، میزان کلسیم خارج و داخل سلولی، فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز، میزان سنتز و بیان پروتئین‌های استئوپونتین و استئوکلسین و همچنین تغییرات مورفولوژیک سلول‌ها بررسی شد. داده‌ها با روش آماری آنالیز واریانس یک‌طرفه و T-test تجزیه و تحلیل شد.

نتایج: افزایش معنی‌داری در توانایی زیستی و میزان معدنی شدن ماتریکس سلول‌ها، فعالیت آنزیم آلکالین‌فسفاتاز، میزان رسوب کلسیم خارج و داخل سلولی و همچنین میزان بیان و سنتز پروتئین‌های استئوژنیک، در سلول‌های تیمار شده با ویتامین E در رفتاری وابسته به دوز مشاهده گردید. علاوه بر این گستردگی سیتوپلاسم نیز در نمونه‌های تیمار شده با ویتامین E دیده شد.

نتیجه‌گیری: از آنجایی که ویتامین E افزایش معنی‌داری در توانایی زیستی و تمایز استئوژنیک سلول‌های بنیادی مزانشیم ایجاد می‌کند، بنابراین می‌تواند جهت افزایش بقا و تمایز سلولی استفاده شود.

واژه‌های کلیدی: ویتامین E، سلول‌های بنیادی مزانشیم مغز استخوان، توانایی زیستی، تمایز استئوژنیک، آلکالین فسفاتاز

*(نویسنده مسئول)؛ تلفن: ۰۹۱۸۱۶۱۷۰۹۸، پست الکترونیکی: m-soleimani@araku.ac.ir

Archive of SID
www.SID.ir

مقدمه

پیش از این بسیاری از اطلاعات و یافته‌ها از انجام آزمون‌ها بر جانوران یا مطالعات در شرایط آزمایشگاهی و با استفاده از سلول‌های بسیار تمایز یافته حاصل می شد. اما امروزه سلول‌های بنیادی با توان خودنوزایی و تمایز بالا، مدل آزمایشگاهی مناسبی را در اختیار محققان قرار داده است(۱،۲) که از میان انواع سلول‌های بنیادی، سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان، سلول‌های پرتوانی بوده که به راحتی تخلیص و تکثیر شده و توانایی تمایز به انواعی از سلول‌ها نظیر سلول‌های استخوانی، غضروفی و چربی را دارا می‌باشند و می‌توان از آنها در پیوندهای اتولوگ استفاده کرد. این سلول‌ها علاوه بر مغز استخوان در بافت هایی نظیر بافت چربی، پرده سینویال و عضله اسکلتی نیز یافت می‌شوند(۲،۳) تمایز جهت‌دار سلول‌های بنیادی مزانشیم مغز استخوان به استئوبلاست برای استفاده از آنها در توسعه درمان‌های جدید بسیار حیاتی است(۴،۵) و نقش مهمی را در بازسازی بافت استخوان صدمه دیده ایفا می‌کند و از آن جایی که در استراتژی‌های سلول درمانی از سلول‌های کاملاً تمایز یافته استفاده می‌شود، بنابراین اولین قدم در استفاده از سلول‌های مزانشیمی به منظور بازسازی ضایعات استخوانی، تمایز آنها به استئوبلاست‌ها در شرایط آزمایشگاهی می‌باشد(۴) که این روند تمایزی ممکن است تحت تیمار برخی آنتی‌اکسیدانت‌ها کاهش یا افزایش یابد.

آنتی‌اکسیدانت‌ها ترکیباتی هستند که می‌توانند از آسیب‌های سلولی ناشی از استرس اکسیداتیو جلوگیری کنند و یا آنها را به تأخیر اندازند. ویتامین E یک آنتی‌اکسیدانت قوی فنولیک و محلول در چربی است که در غشاهای سلولی وجود دارد(۶). این آنتی‌اکسیدانت غیرآنزیمی در طبیعت به دو زیررده توکوفرول و توکوترینول تقسیم می‌شود و هرکدام دارای چهار ایزوفرم α، β، δ و λ می‌باشند و آلفاتوکوفرول مهم‌ترین ایزوفرم آن است(۷) و فعال‌ترین فرم آن در بدن محسوب می‌گردد که در حفظ سلامت جانوران نیز نقش موثری دارد(۸). ویتامین E از جنس اسیدهای چرب غیراشباع فسفولیپیدهای غشاهای زیستی است(۹). این آنتی‌اکسیدانت قوی در کلروپلاست گیاهان سنتز می‌گردد و در روغن‌های گیاهی از جمله آفتاب‌گردان، زیتون، سویا و همچنین خشکباری چون گردو و حبوبات نیز یافت می‌شود و از آنجا که محلول در چربی است، در بدن نیز در بافت چربی، کبد و عضلات ذخیره می‌گردد(۱۰).

لذا با توجه به کاربرد و تولید گسترده ویتامین E در محیط زیست و ورود آن به زنجیره غذایی و از طرف دیگر با توجه به پتانسیل بالای سلول‌های بنیادی مزانشیم مغز استخوان در تمایز و توان تکثیر برای مدت طولانی(۲) و همچنین نقش آنها در ترمیم و بازسازی استخوان، این مطالعه با هدف بررسی اثر آنتی‌اکسیدانتی ویتامین E بر توانایی حیات، تغییرات مورفولوژیک و القای تمایز استئوژنیک در سلول‌های بنیادی مزانشیم مغز استخوان رت بالغ به عنوان یک مدل آزمایشگاهی طراحی شد.

روش بررسی

در این مطالعه تجربی از رت نژاد ویستار با سن ۵۰ روز و وزن۲۰±۱۴۰ گرم استفاده شد. حیوان مورد استفاده در این پژوهش پس از خریداری از انستیتو پاستور در خانه حیوانات دانشگاه اراک در شرایط استاندارد دمایی ۳±۲۷ درجه سانتی‌گراد و با دسترسی آزاد به غذا و آب در قفس‌های پلی‌اتیلین نگهداری شد. پس از کسب مجوز از کمیته اخلاق دانشگاه اراک و رعایت اصول اخلاقی، رت‌ها به کمک دی‌اتیلن اتر بیهوش شده، استخوان‌های ران و ساق پای آنها جدا و سپس بافت‌های پیوندی اطراف استخوان‌ها به طور کامل پاک گردید. استخوان‌ها در محیط کشت DMEM: Dulbecco's Modified Eagles Medium، Germany-Gibco حاوی ۱۵٪ سرم FBS: Germany-Gibco ،Fetal Bovine Serum و پنی‌سیلین-استرپتومایسین (Germany-Gibco) در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد قرار گرفته، به زیر هود لامینار منتقل شدند. دو سر استخوان با قیچی استریل قطع و مغز استخوان با عمل فلاشینگ خارج و به داخل لوله فالکون حاوی محیط کشت کامل هدایت و سپس به مدت ۵ دقیقه در ۱۲۰۰ rpm سانترفیوژ شد. محیط رویی خارج و رسوب سلولی در یک

Archive of SID

www.SID.ir

میلی‌لیتر محیط کشت تازه معلق گردید و در فلاسک کشت T25 و در انکوباتور حاوی CO2 (دمای ۳۷ درجه سانتیگراد و ۵٪ CO2) انکوبه گردید. پس از ۲۴ ساعت محیط رویی که حاوی سلول‌های غیرچسبنده بود، خارج و شستشوی سلول‌ها با PBS انجام گردید، سپس به مدت دو هفته، هر سه روز یک بار محیط کشت سلول‌ها تعویض گردید زمانی که کف فلاسک به تراکم بالایی از سلول رسید، سلول‌ها با کمک Trypsin/EDTA (Sigma-Aldrich) از کف فلاسک جدا و به فلاسک‌های جدید منتقل شدند. برای به دست آوردن خلوص بالایی از این سلول‌ها سه مرحله پاساژ تکرار شد.

سلول‌های پاساژ سوم به تعداد۱۰۳×۵ سلول در هر خانه پلیت ۲۴ خانه‌ای به مدت ۲۴ ساعت کشت و پس از چسبیدن این سلول‌ها به کف در حضور گروه کنترل (محیط استئوژنیک: محیط DMEM حاوی ۱۰٪ سرم گاوی، ۱۰ میلی مولار بتاگلیسرول فسفات، ۱۰ نانومولار دگزامتازون و ۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر آسکوربیک ۳- فسفات) و دوزهای ۵، ۱۰، ۱۵، ۲۵، ۵۰، ۱۰۰ و ۱۵۰ میکرومولار ویتامین E (Sigma-Aldrich) در محیط استئوژنیک کشت شد(۱۱). پس از ۲۱ روز توان زیستی سلول‌ها ارزیابی گردید و بدین منظور، ۳۰ میکرولیتر محلول MTT به هر چاهک اضافه شد و به مدت ۴ ساعت انکوبه گردید. پس از اینکه کریستال‌های فورمازون تشکیل شد. این بلورها در حلال دی‌متیل‌سولفوکسید (DMSO) (Sigma-Aldrich) حل و میزان جذب محلول حاصل در طول موج ۴۵۰ نانومتر توسط دستگاه ELAISA-reader (SCO diagnostic, Germany) اندازه‌گیری شد و با استفاده از منحنی استاندارد MTT تعداد سلول‌های زنده در گروه‌های مختلف تعیین شد.

جهت اندازه‌گیری میزان معدنی شدن ماتریکس استخوانی، سلول‌های پاساژ سوم به تعداد۱۰۳×۵ سلول در هر خانه پلیت ۲۴ خانه‌ای در حضور گروه‌های کنترل و دوزهای ۵، ۱۰، ۱۵، ۲۵، ۵۰، ۱۰۰ و ۱۵۰ میکرومولار ویتامین E (Sigma-Aldrich) کشت شد. پس از ۲۱ روز میزان معدنی شدن ماتریکس استخوانی سلول‌ها با روش کمی و کیفی آلیزارین رد ارزیابی گردید. برای سنجش میزان معدنی شدن ماتریکس استخوانی در سلول‌های بنیادی مزانشیم از روش کمی آلیزارین‌رد استفاده شد. برای انجام این روش محیط کشت رویی برداشته و سلول‌ها با فرمالین ۱۰٪ فیکس شد و سپس با محلول رنگی آلیزارین رد(Sigma-USA) رنگ‌آمیزی شد. سلول‌ها با آب مقطر شستشو و سپس اسید استیک ۱۰٪ به سلول‌ها افزوده و بدین ترتیب رنگ قرمز آلیزارین رد از ماتریکس استخوانی استخراج شد. در پایان جذب محلول‌های قرمز رنگ حاصل در طول موج ۴۰۵ نانومتر ثبت شد(۱۱) و با جذب نوری غلظت‌های مشخص آلیزارین رد مقایسه گردید.

با توجه به نتایج به دست آمده از تست MTT و رنگ‌آمیزی آلیزارین‌رد، ۱۵ میکرمولار ویتامین E به عنوان دوز مؤثر انتخاب گردید و مطالعه با دو گروه کنترل و تیمار با ویتامین E (۱۵میکرومولار) ادامه یافت.

رنگ‌آمیزی وان کوزا با استفاده از نیترات نقره میزان رسوبات کلسیم ماتریکس خارج سلولی را نشان می‌دهد. جهت اندازه‌گیری میزان کلسیم موجود در ماتریکس خارج سلولی، سلول‌های بنیادی مزانشیم تمایز نیافته‌ی پاساژ سوم به تعداد ۱۰۴×۱ در هر ویال پلیت ۲۴ خانه، با کمک فرمالدئید۱۰٪ به مدت ۱۰ دقیقه فیکس شدند و پس از شستشو با PBS، ۵۰۰ میکرولیتر نیترات نقره (Sigma Chemical) ۰/۱٪ به سلول‌ها اضافه شد و در انتها، بررسی سلول‌ها با میکروسکوپ فلوروسنت (Olympus, IX70) انجام شد.

جهت اندازه‌گیری میزان کلسیم موجود در سلول‌ها پس از شستشوی آنها توسط محلول ایزوتونیک، اوزان مساوی سلولی از نمونه‌های استئوژنیک و غیراستئوژنیک را در یک لوله اپندورف ریخته و سپس یک میلی‌لیتر اسیدکلریدریک ۰/۶ نرمال به آنها اضافه شد. پس از ۲۴ ساعت در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد محتوای کلسیم داخل سلول‌ها استخراج و سپس نمونه‌ها در ۱۲۰۰۰rpm سانتریفیوژ شد. میزان کلسیم در محلول رویی توسط روش ارائه شده توسط کیت شرکت تجاری (ایران- درمان‌کاو) پس از قرائت در طول موج ۵۷۵ نانومتر به صورت میکروگرم در دسی‌لیتر مشخص گردید.

فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز با تجزیه پیروفسفات‌ها در

Archive of SID

www.SID.ir

شرایط In vitro قابل اندازه‌گیری است. سلول‌ها پس از تریپسینه شدن و شستشو در بافر لیزکننده (0.25 M Tris-HCl) Triton X-100, pH: 7/5(۲۸) قرار داده شده و سپس در ۱۲۰۰۰rpm به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ گردید. میزان پروتئین موجود در محلول رویی با کمک روش برادفورد(۱۲) و با استفاده از سرم آلبومین گاوی (BSA) به عنوان استاندارد اندازه‌گیری شد. فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز در نمونه سلولی لیزشده بر حسب غلظت مساوی از پروتئین در حضور نیتروفنیل فسفات به عنوان سوبسترا با استفاده از کیت اندازه‌گیری آلکالین فسفاتاز (ایران-درمان‌کاو) انجام شد. سپس با افزودن سود ۰/۰۲ نرمال واکنش آنزیم متوقف و میزان جذب در طول موج ۴۱۰ نانومتر اندازه‌گیری گردید. پس از رسم منحنی استاندارد با استفاده از فرمول Y=0.004X+0.002 با R2=0.999، فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز در نمونه‌های مجهول محاسبه گردید. در این فرمول Y بیانگر میزان جذب و X بیانگر میزان فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز برحسب U/L می‌باشد.

بررسی سنتز پروتئین‌های استئوکلسین و استئوپونتین به روش ایمونوسیتوشیمی، ابتدا به تعداد ۱×۱۰۴ سلول در هر خانه پلیت ۱۲ خانه ریخته و سپس به مدت ۲۱ روز سلول‌ها را در گروه‌های مذکور تیمار شدند. پس از ۲۱ روز سلول‌ها را در پارافرمالدهید فیکس کرده و پس از شستشو با PBS-، جهت افزایش نفوذپذیری، سلول‌ها را با Triton-x100 (T8532, Sigma)، ۰/۲۵٪ برای ۱۰ دقیقه انکوبه شد. سپس سلول‌ها با ۱٪ سرم آلبومین گاوی (BSA) در PBST (۰/۱ درصد PBS-Tween) به مدت ۳۰ دقیقه انکوبه می‌شوند و در ادامه آنتی‌بادی اولیه رقیق شده در BSA ۱٪ در PBST (آنتی‌بادی پلیکلونال استئوپونتین از شرکت ab8448,ABCAM با رقت ۱:۲۵۰ و آنتی‌بادی مونوکلونال موشی استئوکلسین از شرکت ab13418, ABCAM با رقت ۱:۱۰۰۰) که به مدت ۴ ساعت بر روی سلول‌ها قرار گرفته و پس از آن آنتی‌بادی ثانویه (هر دو نوع آنتی‌بادی Alexa Fluor® 555 و با رقت ۱:۵۰۰) و در ادامه رنگ‌آمیزی هوخست(0.1-1µg/µl) صورت گرفت(۱۳). و با میکروسکوپ فلورسانت عکس‌برداری شد.

جهت استخراج RNA و آنالیز RT-PCR، سلول‌ها به تعداد ۵×۱۰۲ در فلاسک‌های T شکل ۲۵cm2 کشت و به مدت ۲۱ روز با محیط استئوژنیک و دوزهای ۱۵ و ۲۵ میکرومولار ویتامین E کشت و تیمار شدند و سپس با کمک اسکالپر، سلول‌ها از کف فلاسک تراشیده و به اپندورف منتقل گردیدند. سلول‌ها در ازت مایع به فریزر ۸۰C- درجه سانتی‌گراد انتقال یافتند. جهت جداسازی RNA از این سلول‌ها از کیت RNeasy mini kit (Qiagen) و بر طبق دستورالعمل کارخانه سازنده استفاده شد و به منظور سنجش میزان RNA استخراج شده از دستگاه اسپکتروفتومتر استفاده گردید و پس از صفر کردن دستگاه توسط آب دیونیزه به عنوان blank، ۳ میکرولیتر از نمونه با ۹۷ میکرولیتر آب دیونیزه رقیق و پس از وارد کردن رقت، مقدار RNA استخراج شده و همچنین نسبت بین ۲۶۰ به ۲۸۰ ثبت گردید. تمامی مراحل در زیر هود لامینار صورت گرفت.

جهت سنتز C-DNA (reverse transcription reaction)، ۲ میکرولیتر از عصاره سلولی حاوی RNA (۰/۵ µg/µl) را برداشته و به هر کدام از اپندورف‌ها ۱ میکرولیتر random Hexamer primer (0.2µg/µl) و ۱ میکرولیتر sequence-Specific primer اضافه و حدود ۳-۵ ثانیه نمونه را ورتکس کرده، سپس نمونه‌ها را به مدت ۵ دقیقه در ۷۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده و پس از آن روی یخ نگه داشته شد. در ادامه ۴ میکرولیتر 5x reaction buffer، ۱ میکرولیتر ممانعت‌کننده RiboLock (20u/µl)، ۱ میکرولیتر از مخلوط dGTP, dCTP, Dttp و ۴ میکرولیتر 0.1mM dATP به نمونه‌ها اضافه و پس از یک ورتکس کوتاه، اپندورف‌ها به مدت ۵ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد و جهت متوقف کردن واکنش، ۱ میکرولیتر dATP و ۲ میکرولیتر آنزیم M-MuLV (20u/µl) به نمونه‌ها اضافه کرده و اپندورف‌ها در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

واکنش RT-PCR در حجم ۲۵ میکرولیتر و با دمای آنیلینگ برابر با ۵۸ درجه سانتی‌گراد در ۳۵ سیکل صورت گرفت و از ژن GAPDH به عنوان کنترل داخلی استفاده شد.

به دنبال تیمار سلول‌ها در یک محیط استئوژنیک برای ۲۱

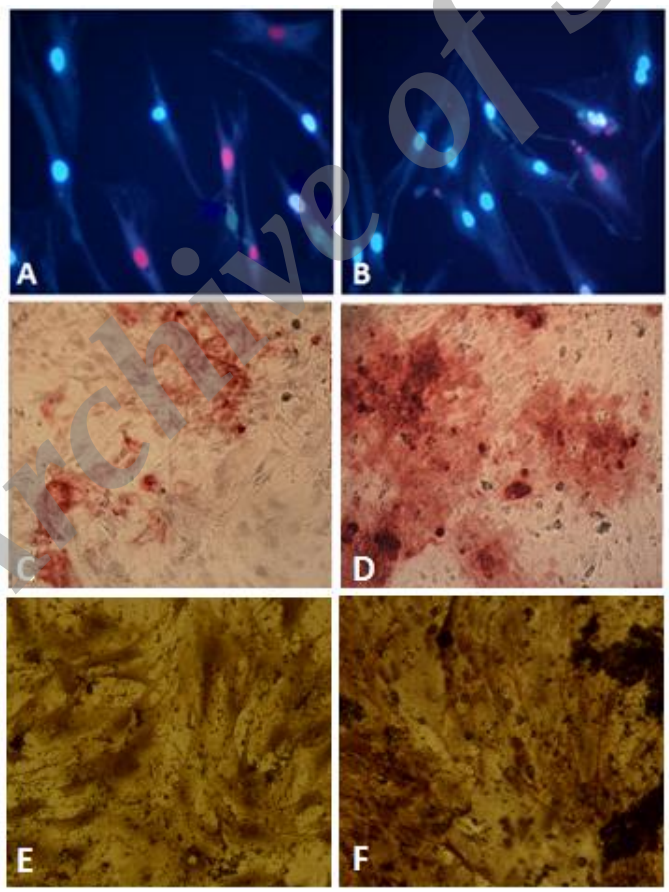
Archive of SID
www.SID.ir

روز، بررسی تغییرات مورفولوژیک هسته سلول‌ها با استفاده از رنگ Hoechst-3342 و پس از ۵ دقیقه انکوبه کردن در دمای اتاق انجام شد. همچنین قطر هسته سلول‌ها به وسیله نرم افزار تصویری موتیک (Micro optical company version 1.2) group اندازه گیری شد. Hoechst 3342 رنگ فلورسنتی است که از طریق غشای پلاسمایی در سلول نفوذ کرده، DNA را رنگ می‌کند که با استفاده از آن می‌توان تغییرات هسته از قبیل تراکم کروماتین و قطعه قطعه شدن آن را بررسی کرد. مورفولوژی سیتوپلاسم سلول‌ها به وسیله‌ی رنگ آکریدین اورنژ، بررسی شد، این رنگ هسته را سبز و ستوپلایم را نارنجی می‌کند. سلول‌ها بعد از رنگ‌آمیزی ۲ بار با PBS شسته شدند و بررسی انجام گردید و بلافاصله توسط میکروسکوپ فلورسنس (Olympus, IX70) عکس برداری شد(۱۴).

جهت بررسی پذیره نرمال بودن داده‌ها به تفکیک گروه‌ها از آزمون آماری کلموگروف- اسمیرنوف یک نمونه‌ای (One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test) استفاده شد. داده‌های به دست آمده با استفاده از آزمون آماری One-Way ANOVA، تست Tukey و همچنین T-test، تجزیه و تحلیل شد. سطح معنی‌داری کمتر از ۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

نتایج

از مقایسه تعداد سلول‌های زنده و میزان معدنی شدن ماتریکس استخوانی در سلول‌های بنیادی مزانشیم مغز استخوان تیمار شده با دوزهای مختلف ویتامین E و به صورت وابسته به دوز، نسبت به گروه کنترل، افزایش معنی‌داری مشاهده شد ($p<۰/۰۵$) (جدول۱ و شکل۱).



شکل ۱:. رنگ‌آمیزی سلول‌های بنیادی مزانشیم مغز استخوان رت با رنگ فلورسنت پروپیدیوم آیوداید
(A و B، بزرگنمایی 40x، هسته‌های صورتی رنگ، سلول‌های مرده را نشان می‌دهد). رنگ‌آمیزی آلیزارین‌رد (C و D، بزرگنمایی 10x، رنگ قرمز نشان‌دهنده میزان معدنی شدن ماتریکس استخوانی در سلول‌های تمایز یافته به استئوبلاست است). رنگ آمیزی وان‌کوزا (E و F، بزرگنمایی 20x، ندول‌های قهوه‌ای رنگ، نشان‌دهنده رسوبات فسفات کلسیم حاصل از معدنی شدن ماتریکس خارج سلولی در سلول‌های تمایزیافته می‌باشد).
A,C,E. گروه سلول‌های کنترل، B,D,F. گروه سلول‌های تیمار شده با ویتامین E (۱۵ میکرومولار).

Archive of SID

www.SID.ir

جدول ۱: مقایسه میانگین تعداد سلول‌های زنده (قابلیت حیات) و میزان معدنی شدن ماتریکس استخوانی سلول‌های بنیادی مزانشیم مغز استخوان رت پس از ۲۱ روز تیمار با دوزهای مختلف ویتامین E (میکرومولار).

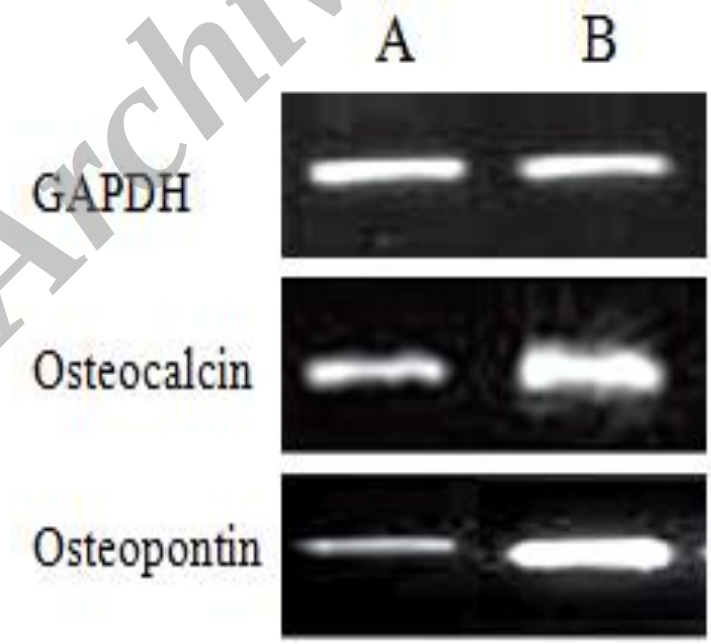
میزان معدنی شدن ماتریکس استخوانی برحسب غلظت آلیزارین‌رد (میلی‌مولار) (میانگین ± انحراف معیار)	تعداد سلول‌های زنده (×۱۰۰۰) (میانگین ± انحراف معیار)	تست دوز (میکرومولار)
۱۴/۲۲±۳۱۱/۶۷^{a}	۹۹۶/۷±۱۰۷۷۰/۸^{a}	۰
۳۲/۶۳±۴۲۳/۳۳^{b}	۳۸۱/۹±۱۳۷۹۱/۷^{b}	۵
۲۴/۶۶±۵۲۸/۳۳^{c}	۴۶۹/۱±۱۶۰۲۰/۸^{b}	۱۰
۸/۰۴±۶۱۸/۳۳^{d}	۶۴۱/۴±۱۸۷۲۹/۲^{c}	۱۵
۱۷/۵۶±۶۶۵/۸۳^{d}	۶۳۴/۳±۲۱۹۳۷/۵^{d}	۲۵
۲۵/۶۶±۷۷۳/۳۳^{e}	۱۰۳۱±۲۴۱۰۴/۲^{d}	۵۰
۳۱/۹۲±۸۶۵^{f}	۶۹۵/۹±۲۸۰۰۰^{e}	۱۰۰
۲۵/۰۴±۸۷۴/۱۷^{f}	۱۶۸۹±۳۸۷۲۹/۲^{f}	۱۵۰

میانگین‌های با حروف مختلف دارای تفاوت معنی‌دار هستند

با توجه به نتایج حاصل از بررسی توانایی زیستی و میزان معدنی شدن ماتریکس استخوانی سلول‌ها، دوز ۱۵ میکرومولار ویتامین E به عنوان دوز مؤثر انتخاب گردید و مطالعه با دو گروه کنترل و تیمار با ویتامین E (۱۵میکرومولار) ادامه یافت.

افزایش معنی‌داری در سطح کلسیم داخل سلولی و میزان فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز در سلول‌های تیمار شده با ویتامین E نسبت به گروه کنترل مشاهده شد($p<۰/۰۱$) (نمودار ۱ و ۲).

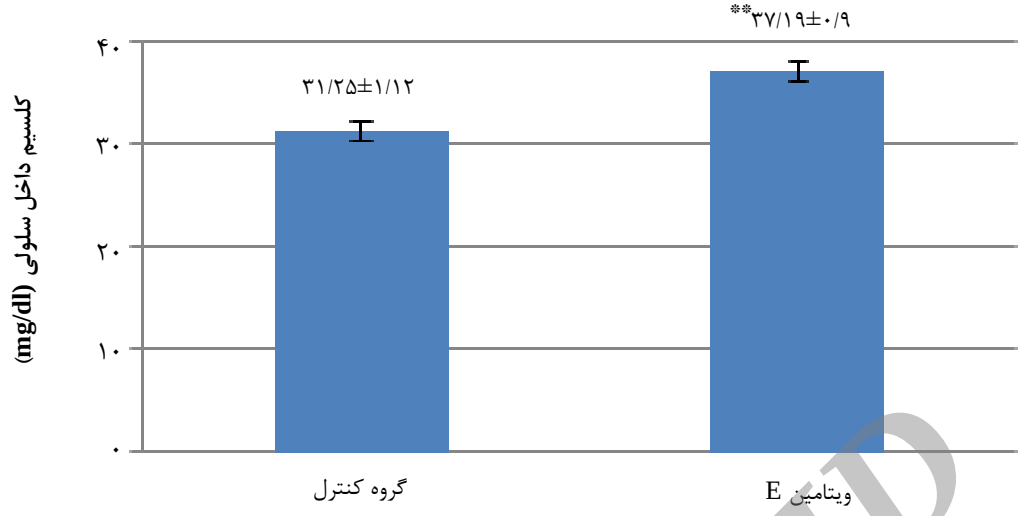
بررسی میزان سطح بیان ژن‌های استئوکلسین و استئوپونتین توسط آنالیز RT-PCR در گروه سلول‌های تیمار شده با ویتامین E نسبت به گروه کنترل، افزایش قابل توجهی را نشان داد (شکل۲).



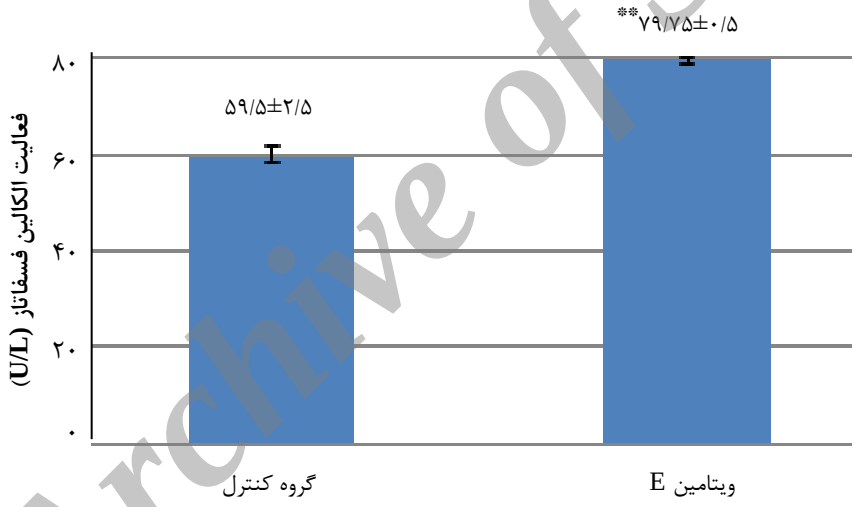
شکل۲: آنالیز کیفی سطح بیان ژن‌های استئوکلسین و استئوپونتین در سلول‌های بنیادی مزانشیم مغز استخوان رت، ۲۱ روز پس از تیمار با ویتامین E .
A) گروه کنترل. B) گروه سلول‌های تیمار شده با ویتامین E (۱۵ میکرومولار)، نشان‌دهنده افزایش قابل توجه سطح بیان ژن‌های مذکور نسبت به گروه کنترل می‌باشد. ژن GAPDH به عنوان کنترل داخلی در نظر گرفته شده است.

Archive of SID

www.SID.ir



نمودار ۱: مقایسه اثر ویتامین E بر میزان کلسیم داخل سلولی در سلول‌های بنیادی مزانشیم مغز استخوان رت با گروه کنترل، (T-Test ، ** p<0.01).



نمودار ۲: مقایسه اثر ویتامین E بر میزان فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز در سلول‌های بنیادی مزانشیم مغز استخوان رت با گروه کنترل، (T-Test، ** p<0.01)

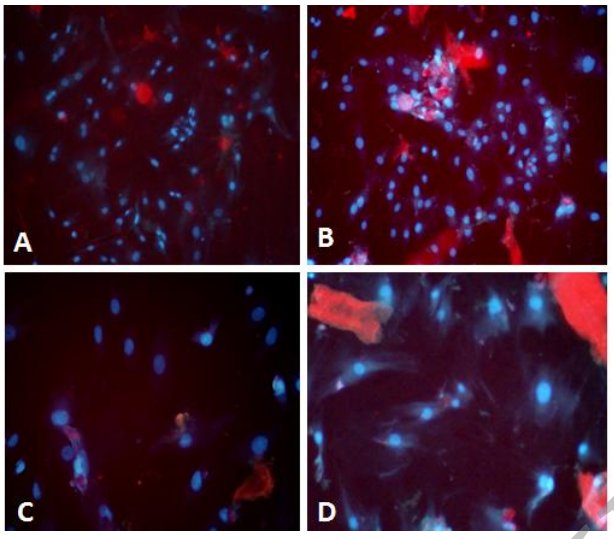
از مقایسه کیفی رنگ‌آمیزی ایمنوسیتوشیمی، افزایش قابل توجهی در میزان سنتز پروتئین‌های استئوکلسین و استئوپونتین در گروه سلول‌های تیمار شده با ویتامین E نسبت به گروه کنترل مشاهده شد (شکل۳).

قطر هسته سلول‌های بنیادی مزانشیم تیمار شده با ویتامین E نسبت به گروه کنترل، افزایش معنی‌داری (p<۰/۰۵) را نشان داد (شکل۴، A و B و نمودار ۳).

رنگ‌آمیزی سیتوپلاسم سلول‌ها با رنگ آکریدین‌اورنژ، سیتوپلاسم چندوجهی با زوائد قابل تشخیص را در سلول‌های گروه کنترل نشان داد و این در حالی بود که سیتوپلاسم سلول‌ها در گروه‌های تیمار شده با ویتامین E، گسترش بیشتری یافته و در برخی قسمت‌ها از حالت چندوجهی خارج و هسته نیز از موقعیت مرکزی خود منحرف و به حاشیه سیتوپلاسمی سلول کشیده شده بود (شکل۴، C و D).

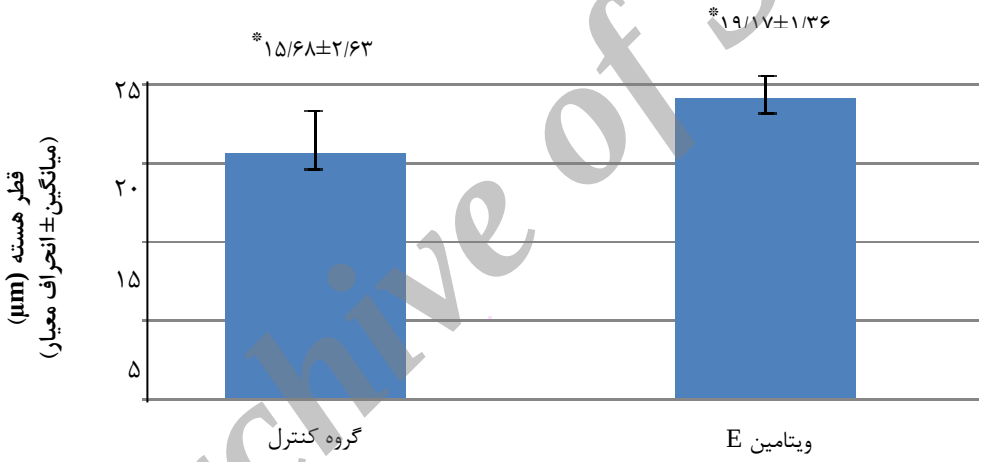
Archive of SID

www.SID.ir

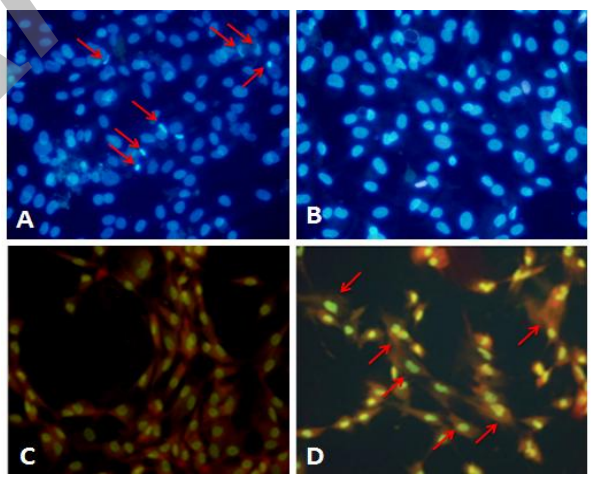


شکل۳: رنگ‌آمیزی ایمنوسیتوشیمی

[پروتئین‌های استئوکلسین A) گروه کنترل. B) گروه سلول‌های تیمار شده با ویتامین E، (بزرگنمایی 10x): استئوپونتین C) گروه کنترل. D) گروه سلول‌های تیمار شده با ویتامین E، (بزرگنمایی 40x)]



نمودار ۳: مقایسه اثر ویتامین E بر میانگین قطر هسته در سلول‌های بنیادی مزانشیم مغز استخوان رت با گروه کنترل. (T-Test،** $p<0.05$).



شکل۴. رنگ‌آمیزی هوخست

(A و B) (بزرگنمایی 40x) و آکریدین اورنژ (C و D) (بزرگنمایی 20x) در سلول‌های بنیادی مزانشیم تمایز یافته به استئوبلاست ۲۱ روز پس از تیمار با ویتامین E در محیط استئژنیک. A,C)گروه کنترل. B,D) سلول‌های تیمار شده با ۱۵ میکرومولار ویتامین E.

Archive of SID

www.SID.ir

بحث

در مطالعه حاضر، ویتامین E در رفتاری وابسته به دوز باعث افزایش توانایی زیستی در سلول‌های بنیادی مزانشیم مغز استخوان رت بالغ گردید، این یافته در راستای نتایج حاصل از مطالعه Gupta و همکاران بر روی سلول‌های هپاتوسیت موش صحرایی در سال ۲۰۱۱ میلادی می‌باشد(۱۵).

Sokolova و همکاران و همچنین Liu و همکاران نیز اثر ویتامین E را بر سلول‌های میوبلاست انسانی رده PCL2(۱۶) و سلول‌های اپی‌تلیال انسانی مورد بررسی قرار دادند و مشاهده کردند که ویتامین E در رفتاری وابسته به دوز و زمان باعث افزایش قدرت تکثیر و توانایی زیستی و همچنین کاهش سطح استرس اکسیداتیو و پراکسیداسیون لیپیدی در سلول‌ها می‌گردد(۱۷).

ویتامین E در ساختمان خود یک حلقه‌ی کرومانولی دارد که گروه هیدروکسیل قرار گرفته بر روی این حلقه باعث احیاء رادیکال‌های آزاد و غیرفعال‌سازی آنها می‌گردد. در حقیقت ویتامین E با اهدای هیدروژن فنولیک حلقه کرومانولی خود باعث شکستن زنجیره رادیکال‌های آزاد شده و پراکسیداسیون لیپیدهای سلول و فسفولیپیدهای غشا را به حداقل می‌رساند و بدین طریق توانایی حیات و بقای سلولی را افزایش می‌دهد(۶).

علاوه بر این ویتامین E با خاصیت آنتی‌اکسیدانتی خود و با برقراری تعادل در قابلیت نفوذپذیری انتخابی غشای سلول‌ها باعث ورود کلسیم و فعال شدن کانال‌های کلسیمی در سلول می‌شود و به برقراری و حفظ همئوستاز کلسیم و در نتیجه تعادل سلولی کمک می‌کند; چرا که کاهش یا فقدان کلسیم در سلول باعث مهار پمپ‌های سدیم-پتاسیمی وابسته به کلسیم می‌گیرد و سلول را در مسیر مرگ سلولی برنامه‌ریزی شده قرار می‌دهد. از سوی دیگر کلسیم برای تشکیل بلورهای هیدروکسی آپاتیت که بخش عمده ماتریکس معدنی شده‌ی سلول استخوانی را تشکیل می‌دهد، لازم و ضروری است، بنابراین ویتامین E با افزایش ورود کلسیم به سلول به معدنی شدن ماتریکس و القای تمایز استئوژنیک نیز کمک می‌کند(۶،۱۸) در مطالعه حاضر هم ویتامین E باعث افزایش سطح کلسیم داخل سلولی، رسوبات فسفات کلسیمی ماتریکس خارج سلولی و القای تمایز استئوژنیک در سلول‌های بنیادی مزانشیم مغز استخوان گردید. از دیگر یافته‌های این پژوهش افزایش میزان فعالیت آنزیم آلکالین‌فسفاتاز در سلول‌های تیمار شده با ویتامین E در مسیر القای تمایز استئوژنیک بود که در راستای نتایج تحقیقات Ahn و همکاران می‌باشد. ایشان اثر آلفاتوکوفرول را بر قدرت تکثیر و سطح بیان ژن آلکالین‌فسفاتاز در سلول‌های مزانشیم انسانی مورد بررسی قرار دادند و مشاهده کردند که دوز ۱۰۰ میکرومولار آلفاتوکوفرول پس از ۳ روز تیمار باعث افزایش معنی‌دار سطح بیان ژن مربوط به آنزیم آلکالین فسفاتاز می‌شود(۱۹).

در این پژوهش علاوه بر آلکالین‌فسفاتاز، سطح بیان ژن‌های استئوکلسین، استئوپونتین و همچنین میزان سنتز پروتئین‌های استئوکلسین و استئوپونتین که در تشکیل و حفظ شبکه استخوانی، افزایش معدنی شدن ماتریکس استخوانی و تمایز استئوژنیک نقش دارند و برای معدنی شدن بافت استخوان ضروری می‌باشند، نیز مورد بررسی قرار گرفت(۱۹،۲۰). این فاکتورهای پروتئینی، خود به واسطه پروتئین Runx-2 بیان می‌شوند(۱۹،۲۱) و طبق مطالعات صورت گرفته ویتامین E باعث افزایش سطح بیان ژن Runx-2 می‌گردد(۱۹) و از آنجا که سطح بیان و سنتز Runx-2 به مسیر سیگنالی wnt وابسته است، بنابراین احتمال می‌رود که تمایز استئوژنیک فرآیندی وابسته به مسیر سیگنال‌دهی wnt باشد که در حضور فاکتورهای بتا-کاتنین و Tcf/Lef باعث فعال‌سازی ژن‌های درگیر در تمایز مثل استئوپونتین، استئوکلسین و آلکالین فسفاتاز شود. در این مسیر سیگنالی پروتئین wnt باعث ترکیب بتاکاتنین و فاکتور رونویسی Tcf/Lef در سلول شده و کمپلکس Catenin β – Tcf/Lef ایجاد می‌شود که این کمپلکس خود در افزایش بیان برخی فاکتورهای موثر بر تمایز مثل آنزیم آلکالین فسفاتاز موثر است و از آنجا که آلکالین فسفاتاز نقش مهمی در میزان معدنی شدن ماتریکس استخوانی

Archive of SID

www.SID.ir

سلول‌ها و تشکیل استخوان دارد(۲۱)، بنابراین می‌توان سطح فعالیت آن و همچنین میزان رسوب کلسیم(۲۲) را یکی از مهم‌ترین شاخص‌های تمایز استئوژنیک دانست که ویتامین E با افزایش میزان فعالیت β–Catenin در سلول(۲۱) باعث جلوگیری از مهار مسیر سیگنالی wnt شده و در نتیجه باعث افزایش بیان ژن‌های استئوکلسین و استئوپونتین، افزایش سطح فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز و همچنین افزایش میزان رسوب کلسیم در ماتریکس خارج سلولی می‌شود(۱۹).

از طرف دیگر بر طبق نتایج مطالعه حاضر، ویتامین E در سلول‌های بنیادی مزانشیم مغز استخوان باعث ایجاد تغییرات مورفولوژیکی در راستای تمایز استئوژنیک گردد و از آنجا که ویتامین E باعث کاهش پراکسیداسیون لیپیدی و جلوگیری از تخریب پروتئین‌های سایتواسکلتون مثل اکتین می‌گردد، بنابراین می‌تواند باعث کاهش آسیب‌های مورفولوژیکی در سلول‌ها نیز شود(۲۳) و احتمال می‌رود که ویتامین E نیز از طریق افزایش میزان سنتز پروتئین اکتین، توانسته سبب گسترش سیتوپلاسم، کاهش زوائد چندوجهی سلول و خارج کردن هسته از موقعیت مرکزی خود گردد که به عنوان تغییرات مورفولوژیکی در راستای تمایز استئوژنیک در سلول‌های بنیادی مزانشیمی شناخته شده است، گردد(۲۴).

نتیجه‌گیری

ویتامین E، به عنوان یک آنتی‌اکسیدانت قوی و موثر، قادر است توانایی زیستی و میزان معدنی شدن ماتریکس استخوانی سلول‌های بنیادی مزانشیم مغز استخوان را افزایش دهد. بنابراین بر اساس نتایج حاصل از این مطالعه، پیشنهاد می‌شود که در زمینه ارتباط بین بیماری‌های استخوانی مثل استئوپروزیس و سطوح سرمی ویتامین E تحقیقات بیشتری در جوامع انسانی صورت گیرد. شاید ویتامین E بتواند ماده‌ای موثر در درمان و حتی پیشگیری از ابتلا به بیماری استئوپروزیس محسوب گردد.

Archive of SID

References:

1- Kim SK, Kim BK, Shim JH, Gil JE, Yoon YD, Kim JH. ***Nonylphenol and octylphenol-induced apoptosis in human embryonic stem cells is related to fas-fas ligand pathway.*** Toxicol Sci 2006; 94(2): 310-21.

2- Kermani SH, Karbalaie KH, Madani H, Jahangirnejad A, Nasresfahani MH, Baharvand H. ***Bone marrow-mesenchymal stem cells as a suitable model for assessment of environmental pollution.*** Arak Uni Med Sci 2008; 11(3): 117-25.

3- Eslaminejad MB, Rouhi L, Arabnajafi M, Baharvand H. ***Culture and expansion of rat mesenchymal stem cells using the serum prepared from rat's peripheral blood.*** Iran Anatomical Sci 2007; 4(17): 331- 44.

4- Baghban Islami Nejad MR, Nik Mahzar A, Piriaiee A. ***Study of the bone produced from canine mesenchymal stem cell differentiation.*** SJKU 2007; 12 (3): 8-22.

5- Baghban Islami Nejad MR, Jafarian M, Khojasteh A, Mashhadi AF, Dehghan MM, Hassanizadeh R. ***In vivo bone formation by canine mesenchymal stem cells loaded onto HA/TCP scaffolds: qualitative and quantitative analysi.*** Yakhteh Med J 2008; 10(3): 205-12.

6- Fang YZ, Yang S, Wu G. ***Free radicals, antioxidants, and nutrition.*** Nutrient 2002; 18(10): 872-79.

7- Traber MG, Atkinson J. ***Vitamin E, antioxidant and nothing more.*** Free Radic Biol Med 2007; 43(1): 15-4.

www.SID.ir

8- Shalaby MA, El zorba HY. ***Protective effect of celery oil, Vitamin E and their combination against testicular toxicity in male rats.*** Global Veterinaria 2010; 5(2): 122-8.

9- Kadoma Y, Inshishara M, Okada N, Fujisawa S. ***Free radical interaction between Vitamin E (alpha-, beta-,gamma- and deltatocopherol), ascorbate and flavonoids.*** In Vivo 2006; 20(68): 823-28.

10- Traber MG, Burton GW, Hughes L, Ingdd KU, Hideki H, Malloy M, et al. ***Discrimination between forms of vitamin E by humans with and without genetic abnormalities of Lipoprotein metabolism.*** J Lipid Res 1992; 33(8): 1171-82.

11- Soleimani Mehranjani M, Mosavi M. ***Cdmium chloride toxicity suppresses osteogenic potential of rat bone marrow mesenchymal stem cells through reducing cell viability and matrix mineralization.*** Indian Journal of Med Res 2011; 65(4): 157-67.

12- Bradford MM. ***Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, Anal.*** Biochem 1976; 72: 248-54.

13- Juhasova J, Juhas S, Klim J, Strnadel J, Holubova M, Motlik J. ***Osteogenic differentiation of miniature pig mesenchymal stem cells in 2D and 3D environment.*** Physiol Res 2011; 60(3): 559-71.

14- Abnosi MH, Soleimani Mehranjani M, Shariatzadeh MA, Dehdehi L. ***Para-Nonylphenol impairs osteogenic differentiation of rat bone marrow mesenchymal stem cells by influencing the osteoblasts mineralization.*** Iran J Basic Med Sci 2012; 15(6): 1131-39.

15- Gupta A, Singh S, Jamal F, Noth S, Mehrotra S, Sharma B. ***Synergistic Effects of Glutathione and Vitamin E on ROS Mediated Ethanol Toxicity in Isolated Rat Hepatocytes.*** J Bioch 2011; 6(4): 347-56.

16- Sokolova T, Rychkova MP, Zakharova IO, Voynova IV, Avrova NF. ***Alpha-tocopherol at nanomolar concentrations increases the viability of PC12 cells under oxidative stress conditions. The effects of modulation of signaling systems.*** Neuro Chem J 2011; 5(3):183-90.

17- Liu HY, Zhao K, Zhou MM, Wang C, Ye JA, Liu JX. ***Cytoprotection of vitamin E on hyperthermia-induced damage in bovine mammary epithelial cells***. Journal of Thermal Biolog 2010; 35: 250-53.

18- Almeida M, Han L, Millan MM, OBrien CA, Manolgas SC. ***Oxidative Stress Antagonizes Wnt Signaling in Osteoblast Precursors by Diverting Catenin from T Cell Factor to Forkhead Box O-mediated Transcription***. J Biol Chem 2007; 282(37)l: 27298-305.

19- Ahn KH, Jung HK, Jung SE, Yi KW, Park HT, Shin JH, et al. ***Microarray analysis of gene expression during differentiation of human mesenchymal stem cells treated with Vitamin E in vitro into osteoblasts***. Korean J Bone Metab 2011; 18(1): 23-32.

20- Tsai MT, Lin YS, Chen WC, Ho CH, Haung HL, Hsu JT. ***Runx2 and Osterix Gene Expression in Human Bone Marrow Stromal Cells Are Mediated by Far-Infrared Radiation.*** Proceedings of the World Congress on Engineering 2011; July 6-8; Londan; UK; 2011.

Archive of SID

www.SID.ir

21- Birmingham E, Niebur GL, McHugh PE, Shaw G, Barry FP, McNamara LM. ***Osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells is regulated by osteocyte and osteoblast cells in a simplified bone niche.*** Eur Cell Mater 2012; 23: 13-27.

22- Hwang JK, Min KH, Choi KH, Hwang YC, Jeong IK, Ahn KJ, et al. ***Bisphenol a reduces differentiation and stimulates apoptosis of osteoclasts and osteoblasts.*** Life Sci 2013; 93(9-11): 367-72.

23- Wyllie AH, Kerr JF, Currie AR. ***Cell death: the significance of apoptosis.*** Int Rev Cytol 1990; 68: 251-306.

24- Abnosi MH, Dehdehi L. ***Study of morphology and biochemistry of rat bone marrow mesenchymal stem cells before and after osteogenic differentiation: a comparative study.*** J Cell & Tissue (JCT) 2012; 3(2): 103-11.

Archive of SID

www.SID.ir

In Vitro Study of the Effect of Vitamin E on Viability, Morphological Changes and Induction of Osteogenic Differentiation in Adult Rat Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells

Soleimani Mehranjani(PhD)*[*1], Azimi A(MSc)[2]

[1,2]*Department of Biolog, Arak University, Arak, Iran*

Received: 13 Mar 2014 ***Accepted:*** 29 May 2014

Abstract

***Introduction*:** Vitamin E as a strong antioxidant plays an important role in inhibiting free radicals. Therefore, this study aimed to investigate the effect of vitamin E on the viability, morphology and osteogenic differentiation in bone marrow mesenchymal stem cells of an adult rat.

Methods: The bone marrow mesenchymal stem cells were extracted using the flashing-out method. At the end of the third passage, cells were divided into groups of control and experimental. Experimental cells were treated withVitamin E (5,10,15,25,50,100,150µM) for a period of 21 days in the osteogenic media containing 10% of fetal bovine serum. The cell viability, bone matrix mineralization, intercellular and extracellular calcium deposition, alkaline phosphatase activity, expression of genes and synthesis of proteins of osteopontin and osteocalcin as well as morphological changes of the cells were investigated. The study data was analyzed using one-way ANOVA and T-Test setting the significant P value at $P<0.05$.

Results: Within vitamin- E treated cells, the mean viability, mean bone matrix mineralization, calcium deposition, alkaline phosphatase activity, expression and synthesis of osteopontin and osteocalcin of the mesenchymal stem cells treated with vitamin E significantly increased in a dose dependent manner. Also cytoplasm extensions were observed in the cells treated with vitamin E.

Conclusion: Since vitamin E caused a significant increase in cell viability and osteogenic differentiation in the mesenchymal stem cells, therefore it can be utilized in order to increase cell differentiation and cell survival.

Keywords: Alkaline phosphatase; Bone marrow mesenchymal stems cells; Cell viability; Osteogenic differentiation; Vitamin E

This paper should be cited as:
Soleimani Mehranjani, Azimi A. ***In vitro study of the effect of vitamin E on viability, morphological changes and induction of osteogenic differentiation in adult rat bone marrow mesenchymal stem cells***. J Shahid Sadoughi Univ Med Sci 2014; 22(4): 1406-18.

Corresponding author: Tel: +98 9181617098, Email: m-soleimani@araku.ac.ir

Archive of SID

www.SID.ir