

بررسی میزان بیان ژن Cbfa1 طی تمایز استئوژنیک سلول‌های بنیادی مشتق از بافت چربی

عبدالرضا دارائی^۱، علی اصغر غفاری زاده^۲، دکتر بتول هاشمی بنی^۳، دکتر رسول صالحی^۴، محمد صالحی^۵، وحید بهرام‌بیگی^۶

مقاله پژوهشی

چکیده

مقدمه: بافت استخوان توانایی رشد و ترمیم را دارا می‌باشد، اما این توانایی با افزایش وسعت صدمات استخوان محدود می‌شود. تاکنون، روش‌های جایگزینی موجود هر یک دارای معایبی بوده است. به تازگی، سلول‌های بنیادی مزانشیمی به خاطر کاربرد در مهندسی بافت استخوان از اهمیت بالایی برخوردار شده‌اند. این سلول‌ها توانایی تمایز به استئوبلاست سلول‌های اصلی استخوان را دارا می‌باشند. ژن Cbfa1 (Core binding factor alpha 1) یکی از اصلی‌ترین ژن‌های دخیل در استخوان‌زایی است. در این مطالعه، به بررسی روند بیان ژن Cbfa1 طی دوره‌ی تمایز استئوژنیک پرداختیم تا اثر تغییرات آن را روی تمایز این سلول‌ها تعیین کنیم.

روش‌ها: پس از نمونه‌گیری و جداسازی سلول‌های بنیادی مزانشیمی از بافت چربی، کشت این سلول‌ها انجام شد. پس از پاساژ سوم، تمایز استئوژنیک این سلول‌ها به انجام رسید و سلول‌ها به مدت ۷، ۱۴، ۲۱ و ۲۸ روز در محیط تمایزی کشت داده شدند. تصدیق تمایز با استفاده از رنگ آمیزی von Kossa صورت پذیرفت. پس از به دست آوردن سلول‌ها، تخلیص RNA تام سلولی و ساخت cDNA، با استفاده از روش Real-time PCR، میزان بیان ژن Cbfa1 در استئوبلاست‌های حاصل از تمایز استئوژنیک مشخص گردید.

یافته‌ها: افزایش قابل توجهی در بیان ژن Cbfa1 در طی دوره‌ی تمایزی از روز ۷ تا روز ۲۸ در استئوبلاست‌های تمایز یافته از سلول‌های بنیادی مزانشیمی دیده شد.

نتیجه‌گیری: به نظر می‌رسد، با بیشتر قرار گرفتن سلول‌های بنیادی مزانشیمی در محیط استئوژنیک، این سلول‌ها شباهت بیشتری به سلول‌های استئوبلاست طبیعی از نظر بیان ژن Cbfa1 پیدا خواهند کرد؛ هر چند، این میزان بیان کمتر از بیان ژن Cbfa1 در استئوبلاست‌های طبیعی می‌باشد.

واژگان کلیدی: سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از چربی، استئوبلاست، ژن Cbfa1

ارجاع: دارائی عبدالرضا، غفاری زاده علی اصغر، هاشمی بنی بتول، صالحی رسول، صالحی محمد، بهرام‌بیگی وحید. **بررسی میزان بیان ژن**

Cbfa1 طی تمایز استئوژنیک سلول‌های بنیادی مشتق از بافت چربی. مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۳۹۲؛ ۳۱ (۲۳۶): ۶۴۸-۶۴۰

* این مقاله حاصل پایان‌نامه‌ی دوره‌ی کارشناسی ارشد به شماره‌ی ۳۸۹۳۱۵ در دانشگاه علوم پزشکی اصفهان است.

۱- دانشجوی دکتری، گروه ژنتیک پزشکی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران

۲- عضو هیأت علمی، جهاد دانشگاهی استان مرکزی، اراک، ایران

۳- استادیار، گروه آناتومی و بیولوژی ملکولی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

۴- دانشیار، گروه آناتومی و بیولوژی ملکولی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

۵- دانشجوی دکتری، گروه آمار زیستی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شیراز، شیراز، ایران

۶- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه آناتومی و بیولوژی ملکولی، دانشکده‌ی پزشکی و کمیته‌ی تحقیقات دانشجویی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

Email: v_bahrambeigi@resident.mui.ac.ir

نویسنده‌ی مسؤول: وحید بهرام بیگی

مقدمه

بافت استخوان دارای توانایی رشد و ترمیم می‌باشد؛ به طوری که، اکثر شکستگی‌های استخوان با درمان‌های ارتوپدی و حمایتی بهبود می‌یابند؛ اما این توانایی با افزایش وسعت صدمات استخوان محدود می‌شود (۱).

در شرایطی که نقص شدید در کارکرد استخوان به علت بیماری، ترومای ناشی از تصادفات رانندگی، قطع بافت استخوانی به منظور برش تومور، نقایص استخوانی حاصل از کیست‌ها و تومورهای استخوانی، نفوذ اجسام خارجی و شکستگی‌های توأم با خردشدگی وجود داشته باشد، بخش بزرگی از بافت استخوانی از دست می‌رود و بیماران دچار مشکلاتی از قبیل کوتاهی عضو، از بین رفتن زیبایی ظاهری در نواحی سر و صورت و مشکلات روحی و روانی ناشی از آن می‌شوند؛ در این موارد، همواره نیاز به ترمیم و جایگزین کردن استخوان از دست رفته وجود دارد (۲-۳).

در چند سال اخیر، جایگزین‌های صناعی زیادی با پایه‌ی مواد معدنی استخوان معرفی شده است، اما هر یک دارای معایبی می‌باشند که کاربرد آن‌ها را محدود می‌سازد. همچنین، انواع پیوندهای فلزی و آلوگراف نیز به علت وجود معایب، کاربرد محدودی پیدا کرده است (۳-۹). با این وجود، مطالعات اخیر بیشتر بر روی استفاده از استخوان اتوگراف و تکنیک‌های مهندسی بافت تمرکز دارند؛ این روش‌ها مستلزم استفاده از بافت مناسب و دارای سلول‌هایی با پتانسیل استخوان‌سازی می‌باشد (۱۰).

به تازگی، سلول‌های بنیادی مزانشیمی به خاطر کاربرد در مهندسی بافت از اهمیت بالایی برخوردار شده است (۱۱). این سلول‌ها توانایی تمایز به

استئوبلاست را دارا می‌باشد و می‌توان آن‌ها را از مغز استخوان، بافت چربی و برخی بافت‌های دیگر به دست آورد (۱۲). در بین این منابع، بافت چربی به خاطر فراوانی و دسترسی آسان به آن، از اهمیت خاصی برخوردار است (۱۳-۱۴).

ژن‌های مختلفی در تمایز استئوبلاستی و استخوان‌زایی دخیل هستند که یکی از مهمترین آن‌ها Cbfa1 (Core binding factor alpha 1) می‌باشد. این ژن در انسان زیرواحد آلفا-۱ فاکتور متصل شونده به هسته را کد می‌کند که به عنوان فاکتور رونویسی ۲ مرتبط با کوتولگی (RUNX2) نیز شناخته می‌شود (۱۵).

Cbfa1 فاکتور رونویسی کلیدی مرتبط با افتراق استئوبلاست است. این پروتئین، که عضوی از خانواده‌ی عوامل رونویسی RUNX است، دارای یک Domain متصل شونده به DNA می‌باشد (۱۵). این پروتئین برای تمایز و مورفوژن استخوانی ضروری است و به عنوان یک داربست برای اسیدهای نوکلئیک و عوامل تنظیمی درگیر در بیان ژن اسکلتی عمل می‌کند. همچنین می‌تواند، هم به صورت یک منومر و هم با تمایل بیشتر، به صورت یک زیرواحد از مجموعه‌ی هترودیمی، به DNA متصل شود (۱۵).

تعاملات اتصال شونده‌ی Cbfa1 هنگام ورود سلول‌ها به میتوز تغییر می‌کند؛ به این صورت که، مادامی که کروموزوم‌ها متراکم می‌شوند، میل اتصالی افزایش و پس از آن، در دوره‌های بعدی فاز میتوز کاهش می‌یابد. این فاکتور رونویسی در تنظیم تمایز استئوبلاستی و بیان ژن‌های مختص استئوبلاست در سنتز ماتریکس استخوان دخیل می‌باشد (۱۶-۱۵).

تاکنون مطالعه‌ای در زمینه‌ی بررسی بیان ژن Cbfa1

طی تمایز استئوژنیک سلول‌های بنیادی مشتق از چربی صورت پذیرفته است. بنابراین، ما در این مطالعه به بررسی الگوی بیان ژن Cbfa1 طی تمایز استئوژنیک سلول‌های بنیادی مشتق از بافت چربی پرداختیم.

روش‌ها

جداسازی و کشت سلول‌های بنیادی مزانشیمی از

بافت چربی

۳ نمونه‌ی بافت چربی زیرجلدی، به صورت تصادفی از بین بیماران زن مراجعه کننده به بیمارستان الزهراء اصفهان، در جریان عمل جراحی لیپوساکشن جمع‌آوری شد.

بافت چربی پس از شستشو با PBS (Phosphate buffered saline) توسط اسکالپل به قطعات کوچک چند میلی‌متری برش داده شد و بافت همبند و عروق خونی از آن جدا گردید. سپس، بافت ریز شده با آنزیم کلاژناز نوع ۱ با غلظت ۰/۰۷۵ درصد، به مدت ۴۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد انکوبه و هر ۱۰ دقیقه یک‌بار Shake شد.

پس از اطمینان از تجزیه‌ی کامل بافت، هم‌حجم با مقدار آنزیم کلاژناز به کار رفته، محیط کشت DMEM (Dulbecco's modified eagle medium) حاوی FCS (Fetal calf serum) ۱۰ درصد و پنی‌سیلین/استرپتومایسین ۱ درصد، جهت خنثی کردن فعالیت آنزیم کلاژناز، به سوسپانسیون سلولی اضافه گردید. در ادامه، سوسپانسیون به مدت ۱۰ دقیقه با دور ۱۴۰۰ rpm سانتریفیوژ شد؛ در نهایت، رسوبات سلولی فلاسک‌های حاوی محیط کشت DMEM، سرم گاوی ۱۰ درصد و پنی‌سیلین/استرپتومایسین ۱ درصد منتقل و در انکوباتور ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد

با CO₂ ۵ درصد و رطوبت نسبی کشت داده شد. پس از گذشت چند ساعت، سلول‌های تک هسته‌ای شروع به چسبیدن به کف فلاسک کردند. با تعویض Medium بعد از ۲۴ ساعت، سلول‌های اضافی تخلیه شد. بدین ترتیب، کشت اولیه‌ی سلول‌های جدا شده آغاز گردید. پس از ۱۰ الی ۱۲ روز، سلول‌ها تکثیر یافت و سطح فلاسک را اشغال نمود. فلاسک‌ها پاساژ داده شد و سلول‌های پاساژ سوم، به منظور تمایز استئوژنیک، مورد استفاده قرار گرفت.

تمایز استئوژنیک

پس از پاساژ سوم سلول‌های بنیادی مزانشیمی و به دست آمدن جمعیت هموژن از این سلول‌ها، حدود ۲۵۰۰۰۰ از سلول‌های بنیادی درون پتری دیش‌های ۱ میلی‌لیتری کاشته شد و تحت تأثیر محیط کشت استئوژنیک حاوی بتا گلیسرول فسفات ۱۰ nM، دگزامتازون ۱۰^{-۷} مولار، آسکوربات دوفسفات ۵۰ μg/ml، FBS ۱۰ درصد قرار گرفت. محیط سلول‌ها هر ۲ الی ۳ روز تعویض شد.

حدود ۲۵۰۰۰۰ از سلول‌های بنیادی مزانشیمی در روزهای ۷، ۱۴ و ۲۱ از تمایز به منظور تیمار بیشتر در محیط تمایزی درون پتری دیش‌های ۱ میلی‌لیتری کاشته شد. همچنین، به منظور استخراج RNA تعداد ۱۰^۶ × ۳ سلول در روزهای ۷، ۱۴، ۲۱ و ۲۸ مورد استفاده قرار گرفت (هر گروه ۳ نمونه).

رنگ‌آمیزی von Kossa

هدف از انجام این رنگ‌آمیزی، رنگ کردن ماتریکس معدنی می‌باشد. پس از دو مرتبه شستشوی سلول‌ها با PBS، فرمالدئید ۳ درصد در فسفات بافر، به عنوان Fixative، به مدت ۱۰ دقیقه اضافه شد. سپس، فسفات بافر فرمالدئید خارج و نیتترات نقره‌ی

در مقالات مختلف به کار رفته بود (۱۷). تصدیق این پرایمرها با استفاده از نرم‌افزارهای Primer 3 و NCBI Primer Blast به انجام رسید. همچنین، پرایمرها از نظر وجود یا عدم وجود پرایمر دایمر و ایجاد ساختارهای ثانویه با استفاده از نرم‌افزار Gene Runner بررسی شد. توالی پرایمرها برای ژن Cbfa1 به شرح زیر بود:

پرایمر Forward 5-
GGTTCTTGCTATATTGCC-3

پرایمر Reverse 5-
GCTGGGAAAGACATAGAAGA-3

پرایمرهای بتا اکتین به عنوان کنترل داخلی از شرکت کیاژن خریداری شد.

Real-time PCR

واکنش Real-time PCR در دستگاه واکنش 6000 Rotor-Gene (Corbet) به انجام رسید. واکنش با حجم نهایی هر واکنش ۲۰ میکرولیتر انجام شد. از ۱۲/۵ میکرولیتر مسترمیکس SYBR Green PCR، ۲ میکرولیتر cDNA، ۱ میکرولیتر از هر پرایمر (۰/۰۱ میلی مولار) و ۳/۵ میکرولیتر برای هر واکنش استفاده شد. واکنش Real-time PCR برای ژن بتا اکتین به صورت ۲ مرحله‌ای (دمای Annealing و Extension یکسان برابر ۶۰ درجه‌ی سانتی‌گراد) و برای ژن Cbfa1 به صورت ۳ مرحله‌ای (دمای Annealing برابر ۶۴ و Extension برابر ۷۲ درجه‌ی سانتی‌گراد) به انجام رسید.

تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها

جهت بررسی آماری داده‌ها و محاسبه‌ی میزان بیان نسبی هر یک از ژن‌ها، از نرم‌افزارهای SPSS نسخه‌ی ۱۶ (version 16, SPSS Inc., Chicago, IL) و Excel 2007 استفاده شد. بررسی روند بیان ژن طی دوره‌ی تمایز با آزمون Friedman انجام شد. برای

۳ درصد به مدت ۳۰ دقیقه اضافه شد. پس از خارج کردن نیترا نقره و شستشو با آب مقطر، محلول Pyrogallol ۱ درصد به مدت ۳ دقیقه اضافه گردید. سپس محلول Nuclear fast red، جهت رنگ کردن هسته‌ها به مدت ۵ دقیقه اضافه شد. پس از این رنگ‌آمیزی، محل‌های ماتریکس معدنی، سیاه رنگ و هسته‌ها قرمز شدند.

استخراج RNA سلولی

۱۰^۶ × ۳ سلول پس از شستشو با PBS (۲ مرتبه) و ترپسینه شدن و سپس خنثی سازی، رسوب داده شد. محیط رویی برداشته شد تا رسوب سلولی به همراه ۱ میلی‌لیتر از محیط باقی بماند. این رسوب در محیط باقی‌مانده حل و سلول‌ها به میکروتیوب ۱/۵ منتقل شد. استخراج RNA تام سلولی با استفاده از کیت استخراج RNA کیاژن (RNeasy Plus Mini Kit) و بر اساس دستورالعمل شرکت سازنده به انجام رسید.

واکنش نسخه برداری معکوس (RT)

از حجم معادل ۶ میکروگرم از RNA تام سلولی استخراج شده به منظور سنتز cDNA استفاده شد. این عمل با استفاده از کیت RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis Kit از محصولات شرکت فرمنتاز انجام گرفت. برای هر نمونه، ۱ میکرولیتر از پرایمر اولیگو dT، ۴ میکرولیتر از بافر تکثیر ۵x، ۱ میکرولیتر از بازدارنده‌ی RiboLock™ Rnase، ۲ میکرولیتر از مخلوط dNTP و ۱ میکرولیتر از آنزیم MMLV-RT استفاده شد (حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر). مراحل واکنش بر اساس دستورالعمل شرکت سازنده به انجام رسید.

پرایمرها

در این مطالعه از جفت پرایمری استفاده شد که پیشتر

۵ cdNA برابر نمونه‌ی استئوبلاست طبیعی استفاده شد (شکل ۲a). بررسی منحنی‌های ذوب، نشان دهنده‌ی تکثیر نمایی قطعه‌ی مورد نظر با منحنی ذوب یکتا بود (شکل ۲b). شرایط واکنش Real-time PCR به صورتی بهینه شد تا کارایی واکنش PCR نزدیک به ۱۰۰ درصد باشد (شکل ۲c).

آزمون آماری Dante نشان داد که میانگین بیان ژن Cbfa1 در استئوبلاست‌های طبیعی بالاتر از استئوبلاست‌های حاصل از تمایز استئوژنیک می‌باشد ($P < 0/05$).

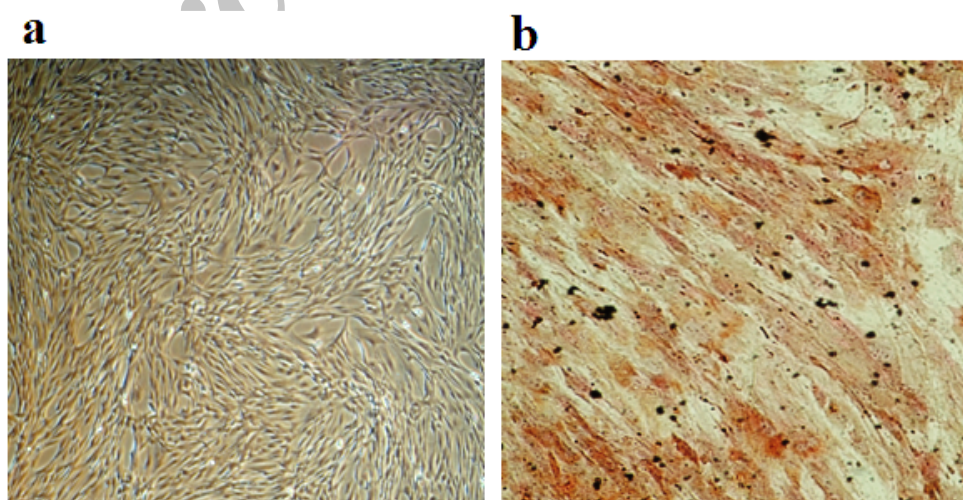
آزمون آماری Friedman نیز نشان داد که اختلاف معنی‌داری در میانگین بیان ژن Cbfa1 در استئوبلاست‌های حاصل از تمایز طی ۴ دوره‌ی تمایزی دیده می‌شود. همان طور که در شکل ۳ دیده می‌شود، این آزمون نشان داد که اختلاف معنی‌داری بین هر ۴ گروه تمایزی وجود دارد؛ به طوری که، بیان ژن Cbfa1 از روز ۷ تا ۲۸ به طور پیوسته افزایش پیدا کرد و بیان در گروه تمایزی ۷ روزه، پایین‌تر از دیگر گروه‌های تمایزی بود ($P < 0/05$).

تمام محاسبات آماری انجام شده، مقادیر P کمتر از ۰/۰۵ به عنوان اختلاف معنی‌دار در نظر گرفته شد.

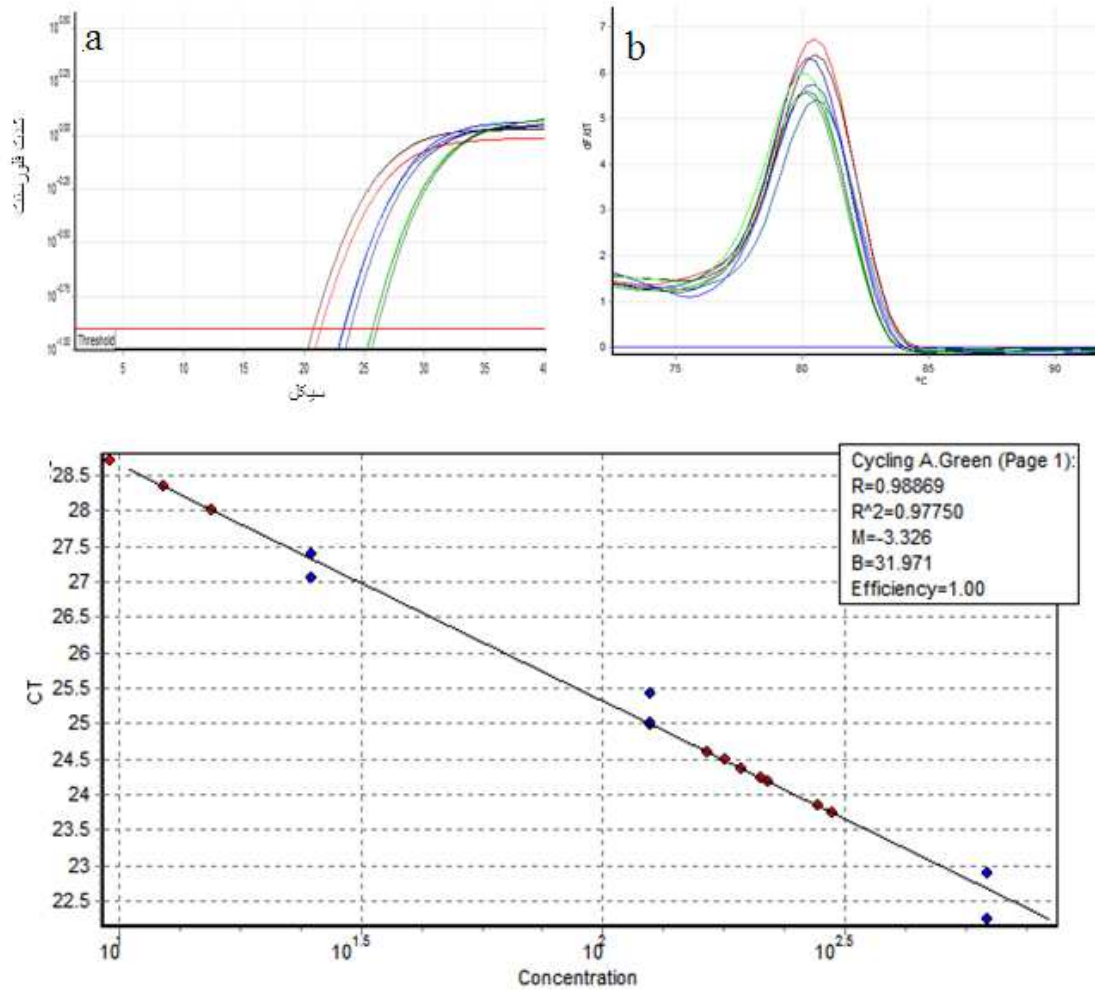
یافته‌ها

پس از جدا سازی سلول‌های بنیادی مزانشیمی از بافت چربی (شکل ۱a)، رنگ‌آمیزی von Kossa در روز ۱۴ از تمایز استئوژنیک سلول‌های بنیادی مزانشیمی به انجام رسید. پس از رنگ‌آمیزی، رسوبات حاصل از ترشح مواد معدنی توسط سلول‌های استئوبلاست حاصل از تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از بافت چربی به صورت اجسام کروی سیاه رنگ دیده شد (شکل ۱b).

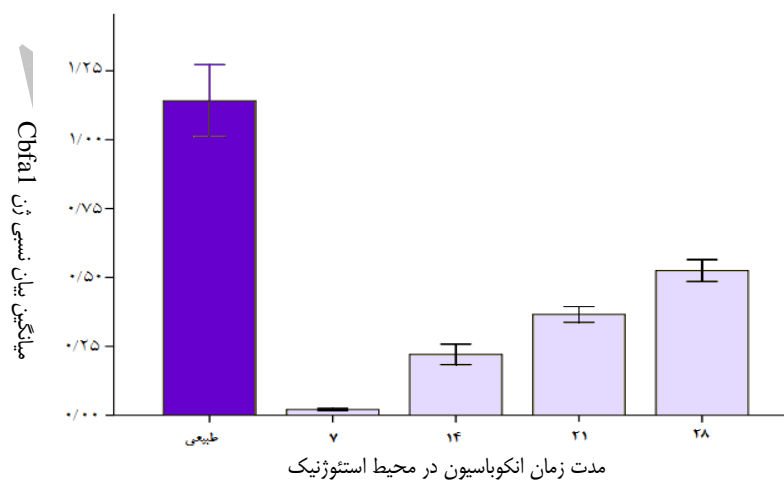
بررسی میانگین بیان نسبی ژن Cbfa1 (نرمال شده نسبت به بیان ژن به عنوان کنترل داخلی) در نمونه‌های استئوبلاست طبیعی و نمونه‌های استئوبلاست حاصل از تمایز استئوژنیک، طی ۴ دوره‌ی تمایزی با استفاده از روش Real-time PCR صورت پذیرفت. برای ترسیم منحنی استاندارد، به منظور کمی نمودن بیان ژن، از رقت‌های سریالی



شکل ۱. a: سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از بافت چربی در پاساژ سوم؛ b: رنگ‌آمیزی von Kossa در روز ۱۴ از تمایز استئوژنیک سلول‌های بنیادی مزانشیمی



شکل ۲. بهینه سازی شرایط تکثیر ژن فاکتور متصل شونده به هسته ی آلفا ۱ با استفاده از Real-time PCR
 a: منحنی استاندارد؛ b: منحنی ذوب؛ c: تعیین کارآمدی واکنش Real-time PCR



شکل ۳. مقایسه ی میانگین بیان نسبی ژن Cbfa1 در ۴ روز مختلف از تمایز استئوژنیک و مقایسه ی آن‌ها با میانگین بیان Cbfa1 در استئوبلاست‌های طبیعی

بحث

Cbfa1 یک فاکتور نسخه برداری و عضوی از خانواده CBF α 1 می باشد که دارای Domain متصل شونده به DNA رانت است (۱۴). جهش در ژن Cbfa1 منجر به یک نوع بیماری استخوان به نام بدشکلی Cleidocranial می شود که به صورت نقایص اسکلتی متعدد تظاهر پیدا می کند (۱۶). مشخص شده است که موش های با فقدان عملکرد ژن Cbfa1 در هنگام تولد می میرند و این موش ها هیچ گونه اسکلت معدنی شده ای ندارند (۱۵). نتایج مطالعات مختلف نشان داده است که Cbfa1 علاوه بر بافت استخوان، در بافت هایی مانند بیضه، تیموس و اپیتلیوم پستان نیز بیان می شود (۱۶-۱۵).

سلول های پیش ساز استئوبلاست و استئوبلاست های بالغ ژن Cbfa1 را بیان می کنند؛ با این وجود، بیان Cbfa1 برای تمایز استئوبلاستی کافی نیست. تا کنون در مطالعات به انجام رسیده، الگوی بیان ژن Cbfa1 طی تمایز استئوژنیک سلول های بنیادی مشتق از مغز استخوان بررسی شده ولی مطالعه ای در زمینه ی بررسی بیان ژن Cbfa1 طی تمایز استئوژنیک سلول های بنیادی مشتق از چربی صورت نپذیرفته است.

از آن جایی که سلول های بنیادی مزانشیمی مشتق از بافت های گوناگون دارای پتانسیل های تمایزی و تکثیری متفاوتی می باشند، الگوی بیان ژن های مختلف نیز در آن ها یکسان نیست. به عنوان مثال، Sila-Asna و همکاران نشان دادند که سلول های بنیادی مزانشیمی مشتق از مغز استخوان، ژن Cbfa1 را در روز ۱۴ از قرار گرفتن این سلول ها در محیط تمایزی بیان می کنند (۱۸).

با این وجود، در مطالعات دیگر نشان داده شده است که تغییرات افزایشی قابل توجهی در میزان بیان ژن Cbfa1 طی تمایز استئوژنیک اتفاق می افتد. Banerjee و همکاران با بررسی بیان ژن Cbfa1 در استئوبلاست های حاصل از تمایز سلول های بنیادی مزانشیمی مشتق از مغز استخوان رت در پاسخ به BMP-2، دریافتند که بیان این ژن به طور پیوسته افزایش پیدا می کند (۱۹).

Shui و همکاران افزایش قابل توجهی را در میزان بیان Cbfa1 طی تمایز استئوژنیک سلول های بنیادی مزانشیمی مشتق از مغز استخوان مشاهده نکردند (۱۳). ایشان با بررسی بیان این ژن در استئوبلاست های حاصل از تمایز سلول های بنیادی مزانشیمی مشتق از مغز استخوان انسان در روزهای ۰، ۳، ۷ و ۱۴ از تمایز استئوژنیک دریافتند که با وجود این که بیان Cbfa1 طی تمایز استئوژنیک افزایش چندانی ندارد ولی، فعالیت و میزان ترجمه ی پروتئین Cbfa1 طی تمایز استئوژنیک افزایش پیدا می کند.

در این مطالعه، ما به بررسی بیان ژن Cbfa1 طی تمایز استئوژنیک سلول های بنیادی مشتق از بافت چربی پرداختیم و با بررسی بیان ژن Cbfa1 در گروه های تمایز یافته در روزهای ۷، ۱۴، ۲۱ و ۲۸ دریافتیم که بیان ژن Cbfa1 طی تمایز استئوژنیک به طور پیوسته ای افزایش پیدا می کند.

Cbfa1 یک فاکتور رونویسی است که در تنظیم تمایز استئوبلاستی، بیان ژن های مختص استئوبلاست و سنتز ماتریکس استخوان دخیل می باشد. بنابراین انتظار می رود، با افزایش بیان این ژن و اتصال آن به عناصر سیس ژن های دخیل در استخوان سازی، بیان این ژن ها نیز افزایش یابد و سلول از نظر بیان ژن های

سلول‌های بنیادی مزانشیمی در محیط استئوژنیک، این سلول‌ها شباهت بیشتری به سلول‌های استئوبلاست طبیعی از نظر بیان ژن Cbfa1 پیدا خواهند کرد.

مختص استخوان به سلول‌های استئوبلاست طبیعی شباهت بیشتری داشته باشد.

نتیجه‌گیری

این مطالعه در جهت ارزیابی سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از بافت چربی به عنوان منبعی برای سلول درمانی نقایص استخوانی به انجام رسید. نتایج این مطالعه نشان داد که با بیشتر قرار گرفتن

تشکر و قدردانی

از معاونت محترم تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، بابت تأمین هزینه‌ی طرح پژوهشی که این مقاله حاصل از آن می‌باشد، قدردانی می‌نماییم.

References

- Dallari D, Fini M, Stagni C, Torricelli P, Nicoli AN, Giavaresi G, et al. In vivo study on the healing of bone defects treated with bone marrow stromal cells, platelet-rich plasma, and freeze-dried bone allografts, alone and in combination. *J Orthop Res* 2006; 24(5): 877-88.
- Kim WS, Vacanti CA, Upton J, Vacanti JP. Bone defect repair with tissue-engineered cartilage. *Plast Reconstr Surg* 1994; 94(5): 580-4.
- Rodan GA. Introduction to bone biology. *Bone* 1992; 13(Suppl 1): S3-S6.
- Alsberg E, Anderson KW, Albeiruti A, Franceschi RT, Mooney DJ. Cell-interactive alginate hydrogels for bone tissue engineering. *J Dent Res* 2001; 80(11): 2025-9.
- de Boer HH. The history of bone grafts. *Clin Orthop Relat Res* 1988; (226): 292-8.
- Gazdag AR, Lane JM, Glaser D, Forster RA. alternatives to autogenous bone graft: efficacy and indications. *J Am Acad Orthop Surg* 1995; 3(1): 1-8.
- Green SA, Jackson JM, Wall DM, Marinow H, Ishkanian J. Management of segmental defects by the Ilizarov intercalary bone transport method. *Clin Orthop Relat Res* 1992; (280): 136-42.
- Ikada Y. Challenges in tissue engineering. *J R Soc Interface* 2006; 3(10): 589-601.
- Kaigler D, Mooney D. Tissue engineering's impact on dentistry. *J Dent Educ* 2001; 65(5): 456-62.
- Langer R, Vacanti JP. Tissue engineering. *Science* 1993; 260(5110): 920-6.
- Bruder SP, Fink DJ, Caplan AI. Mesenchymal stem cells in bone development, bone repair, and skeletal regeneration therapy. *J Cell Biochem* 1994; 56(3): 283-94.
- Aubin JE. Bone stem cells. *J Cell Biochem Suppl* 1998; 30-31: 73-82.
- Shui C, Spelsberg TC, Riggs BL, Khosla S. Changes in Runx2/Cbfa1 expression and activity during osteoblastic differentiation of human bone marrow stromal cells. *J Bone Miner Res* 2003; 18(2): 213-21.
- Zuk PA, Zhu M, Ashjian P, De Ugarte DA, Huang JI, Mizuno H, et al. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Mol Biol Cell* 2002; 13(12): 4279-95.
- Kirkham GR, Cartmell SH. Genes and proteins involved in the regulation of osteogenesis. In: Ashammakhi N, Ferretti P, editors. *Topics in tissue engineering*. 1st. Oulu, Finland: University of Oulu; 2003.
- Ducy P, Zhang R, Geoffroy V, Ridall AL, Karsenty G. *Osf2/Cbfa1*: a transcriptional activator of osteoblast differentiation. *Cell* 1997; 89(5): 747-54.
- Araki S, Mezawa M, Sasaki Y, Yang L, Li Z, Takai H, et al. Parathyroid hormone regulation of the human bone sialoprotein gene transcription is mediated through two cAMP response elements. *J Cell Biochem* 2009; 106(4): 618-25.
- Sila-Asna M, Bunyaratvej A, Maeda S, Kitaguchi H, Bunyaratvej N. Osteoblast differentiation and bone formation gene expression in strontium-inducing bone marrow mesenchymal stem cell. *Kobe J Med Sci* 2007; 53(1-2): 25-35.
- Banerjee C, Javed A, Choi JY, Green J, Rosen V, van Wijnen AJ, et al. Differential regulation of the two principal Runx2/Cbfa1 n-terminal isoforms in response to bone morphogenetic protein-2 during development of the osteoblast phenotype. *Endocrinology* 2001; 142(9): 4026-39.

Transcriptomic Evaluation of *Cbfa1* Gene during Osteogenic Differentiation of Adipose Derived Mesenchymal Stem Cells

Abdolreza Daraei MSc¹, Ali Asghar Ghafarizadeh MSc², Batoul Hashemibeni PhD³, Rasoul Salehi PhD⁴, Mohammad Salehi⁵, Vahid Bahrambeigi⁶

Original Article

Abstract

Background: Bone is a tissue with high repair capacity; but, this ability dramatically is limited during irrecoverable bone and skeletal defects. Stem cell therapy is a promising approach for construction of bone tissue. Mesenchymal stem cells (MSCs) have been introduced as basic tools for bone tissue generation in tissue engineering. Core binding factor alpha 1 (*Cbfa1*) is one of the main genes involved in osteogenesis. Since relative expression of *Cbfa1* in differentiated osteoblasts from adipose derived stem cells is unknown, this study aimed to evaluate the gene expression pattern of *Cbfa1* in adipose derived differentiated osteoblasts in 4 different time intervals.

Methods: Real-time PCR was used for studying the gene expression of *Cbfa1* in human normal osteoblasts and adipose derived osteogenic osteoblasts at the days 7, 14, 21 and 28.

Findings: There was a progressive increase in *Cbfa1* expression over the differentiation period of adipose derived mesenchymal stem cells (ADSCs) from day 7 to day 28. Differentiated osteoblasts expressed *Cbfa1* lower than native osteoblasts ($P < 0.05$).

Conclusion: ADSCs are an attractive source for engineering a new bone tissue. According to our results, adipose derived differentiated osteoblasts express candidate gene at least on day 7 of culture. Our study indicates that longer treatment of ADSCs in osteogenic medium confer better osteoblastic properties to these cells.

Keywords: Adipose derived mesenchymal stem cell, Core binding factor alpha 1 (Cbfa1), Osteoblast

Citation: Daraei A, Ghafarizadeh AA, Hashemibeni B, Salehi R, Salehi M, Bahrambeigi V. Transcriptomic Evaluation of *Cbfa1* Gene during Osteogenic Differentiation of Adipose Derived Mesenchymal Stem Cells. J Isfahan Med Sch 2013; 31(236): 640-8

* This paper is derived from a MSc thesis No. 389315 in Isfahan University of Medical Sciences.

1- PhD Student, Department of Medical Genetics, School of Medicine, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

2- Faculty Member, Iranian Academic Center for Education Culture and Research, Markazi Branch, Arak, Iran

3- Assistant Professor, Department of Anatomy and Molecular Biology, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran

4- Associate Professor, Department of Anatomy and Molecular Biology, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran

5- PhD Student, Department of Biostatistics, School of Medicine, Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, Iran

6- MSc Student, Department of Anatomy and Molecular Biology, School of Medicine AND Student Research Committee, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran

Corresponding Author: Vahid Bahrambeigi, Email: V_bahrambeigi@resident.mui.ac.ir