Archive of SID

مقاله اصیل

الگوی بیان hsa-miR-133b طی روند تمایز سلول‌های پیش‌ساز قلبی و تأثیر مهاری آن بر بیان ژن عامل پاسخ سرم

سمانه اختراعی طوسی[1]، بهرام محمد سلطانی[2*]، مجید صادقی‌زاده[3]، سعید حسینی[4]، مسعود سلیمانی[5]

۱- دانشجوی دکتری تخصصی، گروه ژنتیک، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
۲- استادیار، گروه ژنتیک، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
۳- استاد، گروه ژنتیک، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
۴- دانشیار، مرکز تحقیقات دریچه قلب، بیمارستان شهید رجایی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران
۵- دانشیار، گروه هماتولوژی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

*آدرس نویسنده مسئول: ، ایران تهران، کدپستی ۱۴۱۱۷۱۳۱۱۶، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم زیستی، گروه ژنتیک
Email: soltanib@modares.ac.ir

دریافت مقاله: ۹۱/۱۱/۱۷ پذیرش مقاله: ۹۲/۰۲/۲۹

چکیده

هدف: تمایز سلول‌های بنیادی قلب با کمک میکروRNAها، دریچه جدیدی را برای ترمیم انفارکتوس قلبی گشوده است. miR-1-2/133a-1 و miR-206/133b دو خوشه مجزا از خانواده میکروRNAها هستند که به ترتیب در ماهیچه‌های قلبی و اسکلتی بیان می‌شود. چون miR-133b و miR-133a تنها در یک نوکلئوتید اختلاف دارند، احتمالاً مسیرها وmRNA های یکسانی را مورد هدف قرار می‌دهند. هدف تحقیق حاضر، بررسی بیان احتمالی miR-133b در سلول‌های در حال تمایز قلبی و نیز تأثیر احتمالی آن بر دو ژن هدف دخیل در تمایزسلول‌های قلبی است.

مواد و روش‌ها: سلول‌های بنیادی قلب انسان از بانک سلولی پژوهشکده رویان (RSCB) تهیه و ابتدا با عامل دمتیلاسیون (5- azacytidine) به مدت سه روز تیمار و سپس یک روز در میان با اسید آسکوربیک و دو بار در هفته با پروتئین TGF-β1 تیمار شدند. در نهایت در هفته چهارم، روش‌های ایمنوسیتوشیمی، فلوسیتومتری و Real-Time PCR برای برخی عوامل رونویسی قلبی، تمایز سلول‌های بنیادی به سلول‌های قلبی را تأیید نمود. سپس الگوی بیانی hsa-miR-133b و نیز دو ژن هدف عامل پاسخ سرم (SRF) و CCND2 (از ژن‌های کنترل کننده چرخه سلولی) طی مراحل تمایزی این سلول‌ها بررسی شد.

نتایج: سه هفته پس از شروع روند تمایز، سطح بیان hsa-miR-133b حدود پنج برابر سطح آن در هفته اول بود ($P<۰/۰۵$). برعکس و طبق انتظار، بیان ژن عامل پاسخ سرم به ترتیب افزایش و کاهش را در هفته اول و سوم نشان داد ($P<۰/۰۵$).

نتیجه‌گیری: با توجه به این‌که در هفته سوم روند تمایزی، سطح بیان hsa-miR-133b افزایش و سطح رونوشت ژن عامل پاسخ سرم کاهش یافته است، و از آن‌جا که عامل پاسخ سرم در تکثیر سلولی دخیل است، افزایش سطح miR-133b می‌تواند منجر به کنترل چرخه سلول‌های پیش‌ساز قلبی و تمایز ماهیچهٔ قلبی شود. در نهایت نتایج پیشنهاد می‌کند که hsa-miR-133b به همراه hsa-miR-133a می‌تواند در تمایز سلول‌های قلبی دخیل باشد.

کلیدواژگان: سلول‌های مولد قلبی، تمایز، سلول‌های ماهیچه قلبی، hsa-miR-133b

مجله علوم پزشکی مدرس: آسیب شناسی زیستی، دوره ۱۶، شماره ۱، بهار ۱۳۹۲، صفحات: ۱-۹

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

انفارکتوس حاد میوکاردیوم (Acute Myocardial Infarction: AMI)، عامل اصلی مرگ و بیماری در جهان است [۱]. تا چندی پیش تصور بر این بود که قلب یک اندام کاملاً تمایز یافته است و قابلیت تجدید درونی بسیار اندکی دارد. پیدا شدن سلول‌های مولد کاردیومیوسیت (Cardiomyocyte) در قلب، این باور را ایجاد کرده که احتمالاً قلب نیز تجدیدپذیر است [۲]. بنابراین گسترش و تمایز این سلول‌ها برای ایجاد روش‌های درمانی نوین در درمان بیماری‌های قلبی ضروری است [۳]. سلول مولد قلبی $c\text{-}kit^{+}$، اولین سلول بنیادی قلبی گزارش شده است که کاردیومیوسیت‌های تمایز یافته از آن در محیط درون بدنی (In vivo)، از لحاظ فنوتیپی با کاردیومیوسیت‌های موجود در قلب بالغ غیر قابل تفکیک است. این رده سلولی بنیادی، چندتوان بوده و توانایی تمایز به سلول‌های ماهیچه صاف و اندوتلیال قلبی را نیز دارد [٤]. زمانی که سلول‌های مولد قلبی به منطقهٔ حاشیه‌ای قلب مبتلا به انفارکتوس تزریق شدند، توانستند با تمایز به سه رده اصلی سلول‌های قلب (کاردیومیوسیت، اندوتلیوم و ماهیچه صاف عروق)، عملکرد قلب را بهبود بخشند [۱]. با وجود چنین گزارش‌هایی در مورد توانایی این رده سلولی مولد قلبی، بازسازی درونی قابل ملاحظه‌ای بعد از انفارکتوس میوکاردیال (Myocardial Infarction) به چشم نمی‌خورد. از این رو، احتمالاً سلول‌های بنیادی قلبی پاسخ‌گوی عوامل رشد منطقه‌ای نبوده یا در پاسخ به انفارکتوس، قادر به مهاجرت و تمایز نیستند [۵، ٦]. مطالعات اخیر نشان می‌دهد که میکروRNAها (MicroRNA: miRNA) می‌توانند بیان ژن‌های هدفشان را به صورت پس ترجمه‌ای (Post-Transcriptional) تنظیم نمایند که بسیاری از این ژن‌ها در تکوین قلب نقش ایفا می‌کند [۷]. در مورد نقش hsa-miR-133b در تکوین ماهیچه‌های اسکلتی گزارش‌هایی وجود دارد [۸، ۹]. در پژوهش حاضر برای نخستین بار، نقش و عملکرد hsa-miR-133b در مسیر تمایز سلول‌های مولد قلبی به کاردیومیوسیت بررسی شده است.

مواد و روش‌ها

کشت و تمایز سلول‌های مولد قلبی

ابتدا سلول‌های مولد قلبی انسان (Cardiac Progenitor Cells) از بانک سلول‌های بنیادی پژوهشکده رویان (RSCB) تهیه شد. سلول‌های مولد قلبی به منظور تمایز به کاردیومیوسیت، طبق روش ارایه شده در مجله Nature Protocols [۱۰] تحت تیمار تمایزی با 5-aza (۵ میلی‌مولار)، اسید آسکوربیک ($۱۰^{-٤}$ مولار) و TGF-ß1 (Transforming Growth Factor Beta) (۱ نانوگرم در میلی‌لیتر) قرار گرفتند. رده سلولی میوسیت قلبی انسان (Human Cardiac myocyte: HCM) به عنوان نمونه کنترل (میوسیت تمایز یافته) انتخاب شد. همچنین در حین تمایز، با استفاده از میکروسکوپ فاز کنتراست Olympus مجهز به دوربین عکس‌برداری، تصاویری از تغییر ظاهری سلول‌های در حال تمایز گرفته شد (شکل ۱).

ایمنوسیتوشیمی و فلوسیتومتری

به منظور تأیید تمایز قلبی، آزمون ایمنوسیتوشیمی (Immunocytochemistry: ICC) با استفاده از آنتی‌بادی اختصاصی علیه TrnI قلبی (یکی از اعضای ساختار سارکومریک در کاردیومیوسیت تمایز یافته) روی سلول‌های تحت تیمار تمایزی در هفته چهارم و همچنین روی سلول‌های مولد قلبی تمایز نیافته به عنوان شاهد انجام شد [۱۰]. برای این منظور در ابتدا این سلول‌ها با استفاده از پارافرم‌آلدهید ٤ درصد تثبیت شده و با استفاده از محلول تریتون X۱۰۰ (۰/٤ درصد) نفوذپذیر و سپس با آلبومین سرم گاوی ۲ درصد برای مدت ۱۵-۳۰ دقیقه تیمار شدند. سپس این سلول‌ها با آنتی‌بادی اولیه (TrnI، HyTest Ltd، فنلاند) به مدت یک شب در ٤ درجه سانتی‌گراد تحت تیمار قرار گرفتند. روز بعد سلول‌ها با آلبومین سرم گاو تیمار شده و سپس با محلول حاوی آنتی‌بادی ثانویه

www.SID.ir

Archive of SID

(Anti-mouse IgG، RAY Biotech، آمریکا) تهیه شده در میزبان بز و نشان دار شده با ماده FITC (Fluorescein Isothiocyanate) به مدت ۲ ساعت در تاریکی تحت تیمار قرار گرفتند. همچنین رنگ DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) به منظور رنگ‌آمیزی هسته استفاده شد. پس از رنگ‌آمیزی ایمنوسیتوشیمیایی سلول‌ها، با استفاده از میکروسکوپ فلورسنت (NikonEclipse TE2000-U) مجهز به دوربین عکس‌برداری (Nikondigital DXM 1200 camera) تصویربرداری انجام شد (شکل ۲). همچنین آنتی‌بادی IgG1 موشی (eBioscience، آمریکا) به عنوان آنتی‌بادی ایزوتایپ به‌کار برده شد. به علاوه؛ تیمار سلول‌ها با آنتی‌بادی ثانویه به تنهایی به عنوان کنترل منفی انجام شد.

به منظور تعیین کمی تمایز به کاردیومیوسیت، آزمون فلوسیتومتری (Flow-cytometry) انجام شد. برای آماده‌سازی سلول‌ها برای فلوسیتومتری، ابتدا سلول‌ها تریپسینه و سپس با محلول ٤ درصد پارافرمالدئید (Paraformaldehyde) به مدت ۱۵ دقیقه تثبیت شدند و با استفاده از محلول تریتون X۱۰۰ (۰/٤ درصد) نفوذ پذیر شدند. سلول‌ها با محلول PBS شستشو داده شده و با آنتی‌بادی اولیه اختصاصی TrnI به مدت ۱ ساعت در ٤ درجه سانتی‌گراد تیمار شدند. سپس سلول‌ها با محلول PBS شستشو شده و به مدت ٤۰ دقیقه با آنتی‌بادی ثانویه نشان‌دار شده با FITC تیمار شدند و در نهایت پیام‌های (Signals) فلورسنت توسط دستگاه فلوسیتومتر (BD Biosciences، آمریکا) تعیین کمی شد. به منظور تعیین تعداد سلول‌های بیان کننده TrnI قلبی، آنتی‌بادی IgG1 (eBioscience، آمریکا) به عنوان آنتی‌بادی ایزوتایپ برای تنظیم دروازه منفی (Negative Gate) انتخاب شد.

آزمون Real-Time PCR برای برخی از نشانگرهای قلبی و hsa-miR-133b

به منظور بررسی مراحل تمایز قلبی، RNA کل از سلول‌های در حال تمایز در هفته نخست، دوم و سوم پس از شروع تمایز با استفاده از محلول ترایزول (Trizol Reagent) (Invitrogen، آمریکا) استخراج شد. در این راستا سلول‌های تمایز نیافته مولد قلبی (human Cardiac Progenitor Cells: hCPCs، روز صفر) به عنوان نمونه مرجع Real Time-PCR (Real Time- Polymerase Chain Reaction) در نظر گرفته شد. همچنین سلول‌های میوسیت قلبی تهیه شده از بانک سلولی پاستور نیز به عنوان نمونه کنترل تمایز یافته قلبی برای استخراج RNA انتخاب شد. یک میکروگرم از هر نمونه RNA تیمار شده با DNase I (TAKARA، ژاپن) برای رونویسی معکوس با RevertAid™ (Fermentas، آمریکا) و آغازگر Oligo dT (Primer) استفاده شد. همچنین آغازگرهای اختصاصی برخی از ژن‌های نشانگر قلبی و دو ژن هدف SRF (Serum Response Factor) و CCND2 (انتخاب شده برای miR-133b) با استفاده از نرم‌افزار Primer 3.0 طراحی و با استفاده از نرم‌افزار IDT تجزیه و تحلیل شد (جدول ۱). تمامی واکنش‌های Real-Time PCR با استفاده از مخلوط اصلی واکنش PCR حاوی SYBR® Green (TAKARA) و دستگاه Applied Biosystems 7500 انجام گرفت. مراحل دمایی و زمانی واکنش به این شرح بود: ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه برای واسرشت اولیه که با ٤۰ چرخه تکثیری (۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ ثانیه، اتصال آغازگر در ۵۱ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ ثانیه و گسترش در ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه) دنبال می‌شد. تمامی واکنش‌های Real-Time PCR به همراه کنترل‌های فاقد الگو و کنترل رونویسی نشده برای بررسی‌های آماری چهار بار (دو تکرار زیستی و دو تکرار تکنیکی) تکرار شد. همچنین ژن HPRT1 (Hypoxanthine Phosphoribosyltransferase) به عنوان ژن کنترل داخلی برای همگن‌سازی داده‌ها انتخاب شد. کارآمدی واکنش‌های PCR برای هر جفت آغازگر با نرم‌افزار LinRegPCR (12.x) محاسبه شد و داده‌های خام به دست آمده از نرم‌افزار 7500 برای بررسی به نرم‌افزار DataAssist v3.0 وارد شد. به منظور بررسی الگوی بیانی hsa-miR-133b طی مراحل تمایز قلبی، ۲۰ نانوگرم از RNA کل تیمار شده با DNase I برای تهیه رونوشت توسط کیت سنتز cDNA شرکت Exiqon (دانمارک) استفاده

www.SID.ir

Archive of SID

شد. در این روش ابتدا یک دم پلی A به miRNA افزوده شده و سپس از روی این قطعه با کمک یک آغازگر که دارای بخش پلی T در سمت ′۳ و دنباله عمومی (Universal tag) در سمت ′۵ است، قطعه cDNA سنتز شد. برای انجام واکنش اختصاصی Real-Time PCR برای miRNA مورد بررسی، از آغازگرهای LNA (Locked Nucleic Acid) (Exiqon، دانمارک) استفاده شد. برای همگن‌سازی داده‌ها از ژن RNU48 استفاده شد [۷]. شرایط دمایی و زمانی Real-Time PCR برای hsa-miR-133b به این شرح بود: ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه برای واسرشت اولیه که با ٤٠ چرخه تکثیری (۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ ثانیه، اتصال آغازگر و گسترش در ٦٠ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه) دنبال می‌شد.

جدول ۱ توالی آغازگرهای مورد استفاده در واکنش Real-time PCR و مرتبه تغییر بیان این ژن‌ها در سلول‌های میوسیت قلبی انسان به عنوان نمونه کنترل تمایز یافته در قیاس با سلول‌های مولد قلبی

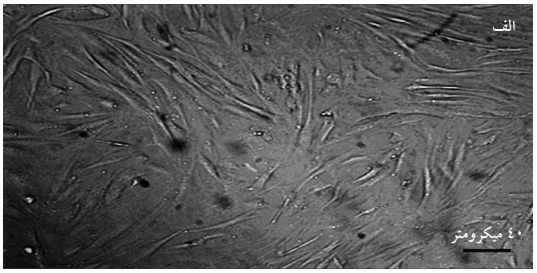
ژن	آغازگر جلویی (Forward)	آغازگر برگشتی (Reverse)	اندازه محصول واکنش (جفت باز)	مرتبه تغییر
Mef2c	5′-CTGGTGTAACACATCGACCTC -3′	5′-GATTGCCATACCCGTTCCCT-3′	۱۰۵	۲/٥٦ ± ۰/۱۷
GATA4	5′- CAGCAACTCCAGCAACG-3′	5′- ATCGCACTGACTGAGAACG-3′	۱۲٦	۰/۱۳ ± ۰/۰۷
Cnx43	5′-AGCTGCTGGACATGAATTAC-3′	5′-CTAGATCTCCAGGTCATCAG-3′	۱۰۹	۰/۲۲ ± ۰/۰۵
HPRT1	5′-CCTGGCGTCGTGATTAGTG-3′	5′-TCAGTCCTGTCCATAATTAGTCC-3′	۱۲۵	۱

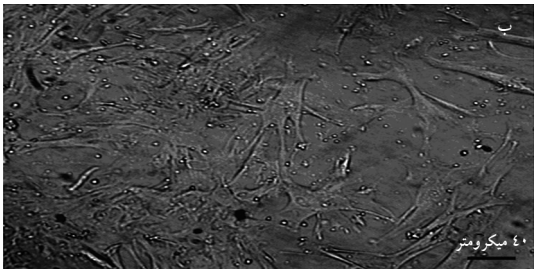
تحلیل بیوانفورماتیک و آماری داده‌ها

میانگین مرتبه تغییر (Fold Change) به دست آمده از بررسی سطح بیان ژن‌های قلبی، miR-133b و همچنین ژن‌های هدفش ±SDEV (Standard Deviation: انحراف معیار) از طریق آزمون آنالیز واریانس یک طرفه (One- way Analysis of Variance: ANOVA) در SPSS نسخه ١٦ مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفت. سطح معنی‌داری تفاوت‌ها کمتر از ۰/۰۵ تعریف شد.

نتایج

شواهد متعدد بیانگر موفقیت روند تمایز سلول‌های پیش‌ساز قلبی به سلول‌های تمایز یافته است؛ ۱) در حین مراحل تمایزی قلبی، سلول‌های مولد قلبی از ظاهر شبیه به فیبروبلاست (Fibroblast) (دوکی شکل) به ظاهری شبیه به سنسیتیوم (Syncytium) های چند شاخه کاردیومیوسیت تغییر شکل دادند (شکل ۱).

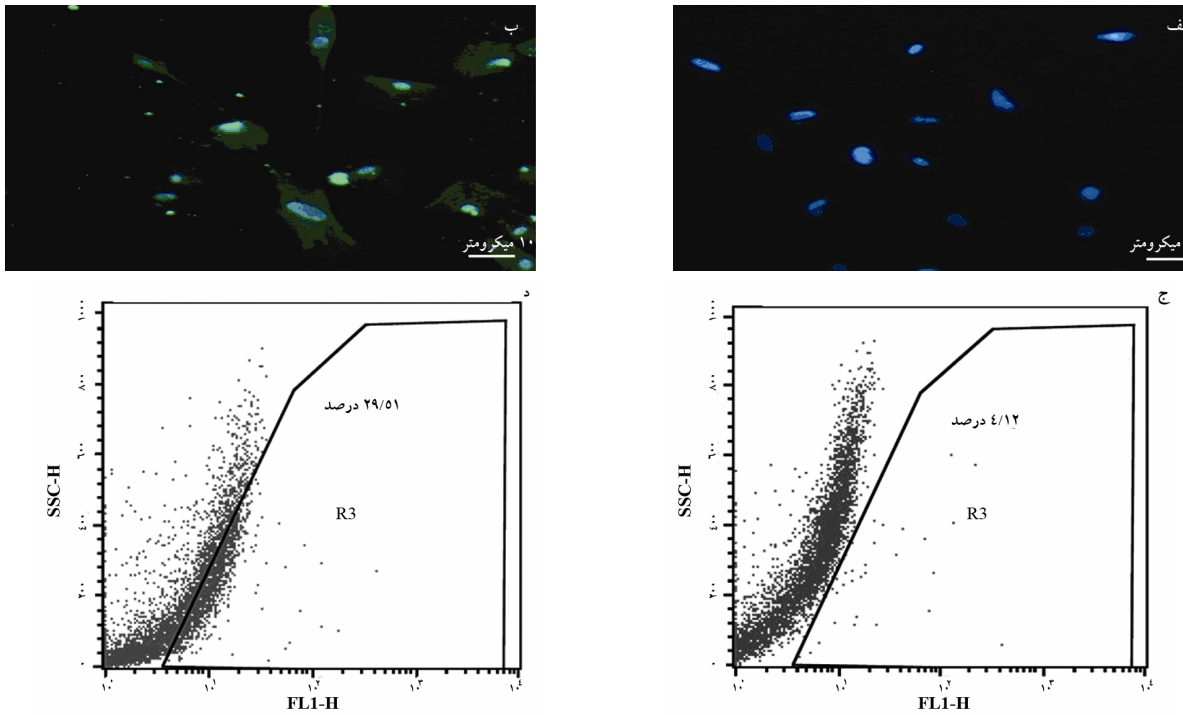




شکل ۱ (الف) سلول‌های تمایز نیافته مولد قلبی با ظاهری شبیه فیبروبلاست، (ب) سلول‌های تحت تیمار تمایزی در هفته چهارم با ظاهری شبیه سنسیتیوم‌های چند شاخه (بزرگنمایی: ۱۰۰×)

www.SID.ir

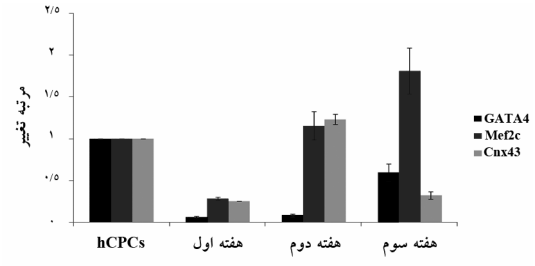
Archive of SID



شکل ۲ آزمون ICC و فلوسیتومتری برای TrnI قلبی در کاردیومیوسیت تمایز یافته، (الف) عدم مشاهده رنگ سبز در سیتوپلاسم سلول‌های مولد قلبی بدون تیمار تمایزی، نشان دهنده عدم بیان قابل توجه پروتئین TrnI قلبی در سلول‌های تمایز نیافته بود (ب) بیان پروتئین درون سلولی TrnI قلبی در سلول‌های تحت تیمار تمایزی در هفته چهارم. آنتی‌بادی اولیه مونوکلونال (Monoclonal) بوده و تهیه شده در میزبان موش (TrnI, Hy Test Ltd) و آنتی‌بادی ثانویه (Anti-mouse IgG, RAY Biotech) تهیه شده در میزبان بز و نشان‌دار شده با ماده FITC (سبز رنگ) بود. هسته‌ها با DAPI (آبی رنگ) رنگ‌آمیزی شد. (د) نتایج فلوسیتومتری با تفریق درصد سلول‌های عبور کرده از دروازه منفی که به آنتی‌بادی ایزوتایپ IgG1 متصل بودند از سلول‌های متصل به آنتی‌بادی TrnI، نشان داد که در حدود ۳۰ درصد سلول‌های تحت تیمار تمایزی برای TrnI مثبت بودند و به کاردیومیوسیت تمایز یافته‌اند. همچنین تنها در حدود ٤ درصد از سلول‌های بدون تیمار تمایزی نیز $TrnI^+$ بودند (ج).

۲) آزمون سیتوشیمیایی ICC حضور پروتئین TrnI را در سیتوپلاسم سلول‌های تحت تیمار تمایزی در هفته چهارم تمایز نشان داد (شکل ۲ ب). همچنین نتایج حاصل از فلوسیتومتری نشان داد که حدود ۳۰ درصد سلول‌های تحت تیمار تمایزی به کاردیومیوسیت تمایز یافتند (شکل ۲ د).

۳) برای تأیید مولکولی روند تمایز سلول‌های پیش‌ساز قلبی، بیان چند ژن که نشانگرهای شناخته شده سلول تمایز یافته قلبی هستند بررسی شد. طی روند تمایز سلول‌های پیش‌ساز به سلول مشابه قلبی، سطح بیان GATA4 ابتدا کاهش معنی‌دار و سپس در روز ۲۱ام تمایز، افزایش بیان را نشان داد (شکل ۳، P<۰/۰۵). همچنین افزایش بیان معنی‌داری درمورد Mef2C در روز ۲۱ام مشاهده شد (شکل ۳، P<۰/۰۵). در مورد ژن Cnx43، افزایش بیان در هفته دوم تیمار تمایزی مشاهده شد (شکل ۳، P<۰/۰۵). مقدار مرتبه تغییر برای ژن‌های مورد بررسی در هفته سوم تمایزی با مقادیر به دست آمده برای سلول‌های میوسیت قلبی (کنترل تمایزی) قابل مقایسه است (جدول ۱).

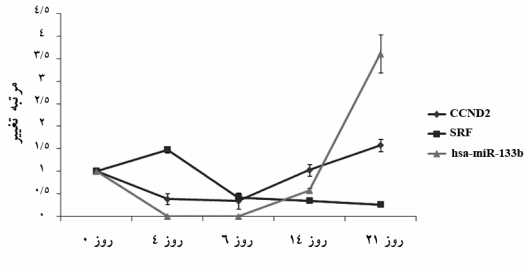


شکل ۳ پروفایل بیانی GATA4، Mef2C و Cnx43. سطح بیان GATA4 ابتدا کاهش معنی‌دار و سپس در هفته سوم تمایز، افزایش بیان را نشان داد (P<۰/۰۵). نتایج افزایش بیان معنی‌داری را در مورد Mef2C در هفته سوم و Cnx43 در هفته دوم نشان می‌دهد (P<۰/۰۵). hCSCs نمایانگر سلول‌های مولد قلبی بدون تیمار تمایزی است.

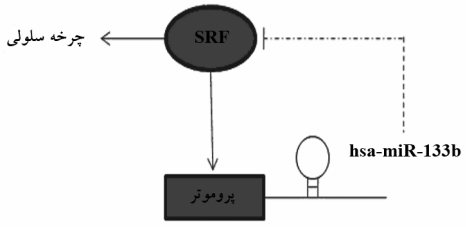
www.SID.ir

Archive of SID

سطح بیان hsa-miR-133b در هفته نخست و در هفته سوم پس از نخستین تیمار با 5-aza به ترتیب کاهش و افزایش یافت (P<۰/۰۵). از طرفی الگوی بیانی ژن SRF به عنوان یک ژن هدف شناخته شده برای hsa-miR-133a به ترتیب افزایش و کاهش بیان را در هفته نخست و هفته سوم نشان داد (شکل ٤، P<۰/۰۵) که این الگوی بیان با توجه به اختلاف تنها یک نوکلئوتید بین hsa-miR-133a و hsa-miR-133b قابل انتظار بود. بر خلاف ژن SRF سطح بیان ژن هدف CCND2 حداکثر افزایش را در هفته سوم نشان داد (شکل ٤، P<۰/۰۵).



شکل ٤ پروفایل بیانی hsa-miR-133b، SRF و CCND2. افزایش بیان miR-133b و کاهش بیان SRF (ژن مورد هدفش) در روز ۲۱ (P<۰/۰۵) اثر مهاری miR-133b را بر روی SRF محتمل می‌سازد. از طرفی افزایش اولیه SRF در روز چهارم، موجب پیش فرض اثر افزایشی SRF بر miR-133b می‌شود. روز صفر نمایانگر سلول‌های مولد قلبی بدون تیمار تمایزی است.



شکل ٥ مدل پیشنهادی ارایه شده به منظور نشان دادن بر همکنش ژن SRF و hsa-miR-133b. اثر افزایش SRF بر پروموتر miR-133b شناخته شده است [۱۷]. همچنین SRF ژن هدف miR-133a است که با آزمایش‌های تجربی تأیید شده است [۱۷]. از طرفی miR-133a و miR-133b تنها در یک نوکلئوتید در انتهای ′۳ تفاوت دارند. از این رو می‌توان متصور شد که SRF نیز ژن هدف miR-133b باشد. طبق این مدل miR-133b در یک چرخه بازخورد منفی می‌تواند اثر SRF را مهار نماید.

با توجه به نتایج حاصل از PCR در زمان واقعی و الگوی بیانی SRF و miR-133b می‌توان یک مدل پیشنهادی در مورد احتمال وجود یک چرخه بازخوردی منفی مابین SRF و miR-133b ارائه داد (شکل ٥).

بحث

با بررسی الگوی بیان نشانگرهای قلبی، افزایش بیان ژن Cnx43 (یکی از اعضای اتصالات سلولی: Gap Junctiom) در روز چهاردهم نشان داد که تمایز از حدود هفته دوم آغاز شده است. بیان این ژن در ایجاد سنستیوم‌های عملکردی قلب که یکی از ویژگی‌های بارز کاردیومیوسیت‌هاست، مؤثر می‌باشد [۱۸]. تغییر شکل سلول‌ها از ظاهری فیبروبلاستی به سلول‌های چند شاخه سنستیومی، افزایش بیان ژن Cnx43 و در نتیجه فرایند تمایز را تأیید می‌کند. همچنین حضور پروتئین TrnI قلبی که یکی از نشانگرهای تمایز قلب است، تمایز سلول‌های مولد قلبی را به کاردیومیوسیت تأیید نمود.

طبق گزارش‌های موجود بیان miR-133b منحصر به سلول‌های ماهیچهٔ اسکلتی است [۸، ۹]، ولی تغییرات معنی‌دار (P<۰/۰۵) این miRNA در حین مراحل تمایزی سلول‌های قلبی نشان می‌دهد که این miRNA احتمالاً در تمایز سلول‌های قلبی نیز دخالت دارد. رونویسی پیش‌سازهای miR-1/miR-133 به طور مستقیم توسط عامل پاسخ سرم (SRF) تنظیم می‌شود [۹، ۱۱، ۱۲]. عامل پاسخ به سرم (SRF) به پروموتر (Promoter) خوشه ژنی miR-1/miR-133 و ژن‌های مختص ماهیچه متصل و باعث افزایش بیان این ژن‌ها می‌شود که این امر باعث تمایز سلولی و توقف چرخه سلولی می‌شود [١٤، ١٥]. از طرفی گزارش شده است که عدم بیان miR-133a منجر به بیان غیر طبیعی ژن‌های ماهیچه صاف در قلب و تکثیر نابه‌جای کاردیومیوسیت می‌شود. این ناهنجاری‌های تکوینی ممکن است ناشی از افزایش بیان ژن‌های SRF (در یک حلقه بازخوردی منفی) و Cyclin D2 (یکی از ژن‌های کنترل کننده چرخه سلولی) باشد که هر دو مورد هدف miR-

www.SID.ir

Archive of SID

133a است [۱۳، ۱۶]. همچنین از طرفی miR-133b با miR-133a تنها در یک نوکلئوتید در انتهای ′۳ تفاوت دارد. تشابه توالی این miRNA ها این احتمال را به وجود می‌آورد که این دو miRNA دارای ژن‌های هدف مشترکی هستند. با این پیش فرض می‌توان، نقش‌های تنظیمی و عملکردی قلبی را برای miR-133b نیز همچون miR-133a متصور شد [۱۷]. افزایش بیان miR-133b و کاهش بیان SRF (ژن مورد هدفش) در روز ۲۱ ($P<۰/۰۵$) اثر مهاری miR-133b را روی SRF محتمل می‌سازد. از طرفی افزایش SRF در روز چهارم تمایز، اثر تنظیم کنندگی- افزایشی SRF را بر پروموتر miR-133b در سلول‌های ماهیچه قلبی محتمل می‌سازد. همچنین با افزایش سطح بیان miR-133b، احتمال کاهش بیان SRF (به عنوان ژن هدف) در یک حلقه بازخوردی منفی توسط این miRNA وجود دارد. در نهایت می‌توان گفت که SRF در ابتدای فرآیند تمایز، با اتصال به پروموتر miR-133b موجب افزایش رونویسی این miRNA می‌شود. همچنین با توجه به این‌که SRF ژن هدف پیش‌بینی شده miR-133b است، با افزایش بیان این miRNA در مراحل پایانی تمایز، در یک حلقه بازخورد منفی، بیانش در سطح پس رونویسی کاهش یافته و موجبات توقف چرخه سلولی را فراهم می‌آورد . در این راستا الگوی بیانی CCND2 در حین تمایز قلبی در مقایسه با الگوی بیانی miR-133b قابل انتظار نبوده و تنظیم غیر مستقیم این ژن را در سطح پروتئین محتمل می‌سازد. واضح است با افزایش یا کاهش بیان miR-133b در سلول‌های مورد بررسی و مطالعه تغییر بیان ژن‌های هدفش (هم در سطح رونوشت و هم در سطح پروتئین) می‌توان در راستای شناسایی عملکرد این miRNA در روند تمایز قلبی، اطلاعات بیشتری کسب نمود.

تشکر و قدردانی

تحقیق حاضر بخشی از رساله دکتری تخصصی رشته ژنتیک مولکولی مصوب دانشکده علوم زیستی دانشگاه تربیت مدرس است که با حمایت مالی آن دانشگاه انجام شده است.

منابع

[1] Oh H, Bradfute SB, Gallardo TD, Nakamura T, Gaussin V, Mishina Y, Pocius J, Michael LH, Behringer RR, Garry DJ, Entman ML, Schneider MD. Cardiac progenitor cells from adult myocardium: homing, differentiation, and fusion after infarction. Proc Natl Acad Sci U S A 2003; 100(21): 12313-8.

[2] Beltrami AP, Barlucchi L, Torella D, Baker M, Limana F, Chimenti S, Kasahara H, Rota M, Musso E, Urbanek K, Leri A, Kajstura J, Nadal-Ginard B, Anversa P. Adult cardiac stem cells are multipotent and support myocardial regeneration. Cell 2003; 114(6): 763-76.

[3] Messina E, De Angelis L, Frati G, Morrone S, Chimenti S, Fiordaliso F, Salio M, Battaglia M, Latronico MV, Coletta M, Vivarelli E, Frati L, Cossu G, Giacomello A. Isolation and expansion of adult cardiac stem cells from human and murine heart. Circ Res 2004; 95(9): 911-21.

[4] Hosoda T. C-kit-positive cardiac stem cells and myocardial regeneration. Am J Cardiovasc Dis 2012; 2(1): 58-67.

[5] Behfar A, Zingman LV, Hodgson DM, Rauzier JM, Kane GC, Terzic A, Pucéat M. Stem cell differentiation requires a paracrine pathway in the heart. FASEB J 2002; 16(12): 1558-66.

[6] Leri A, Kajstura J, Anversa P. Cardiac stem cells and mechanisms of myocardial regeneration.

www.SID.ir

Archive of SID

Physiol Rev 2005; 85(4): 1373-416.

[7] Wilson KD, Hu S, Venkatasubrahmanyam S, Fu JD, Sun N, Abilez OJ, Baugh JJ, Jia F, Ghosh Z, Li RA, Butte AJ, Wu JC. Dynamic microRNA expression programs during cardiac differentiation of human embryonic stem cells: role for miR-499. Circ Cardiovasc Genet 2010; 3(5): 426-35.

[8] Chen JF, Mandel EM, Thomson JM, Wu Q, Callis TE, Hammond SM, Conlon FL, Wang DZ. The role of microRNA-1 and microRNA-133 in skeletal muscle proliferation and differentiation. Nat Genet 2006; 38(2): 228-33.

[9] Rao PK, Kumar RM, Farkhondeh M, Baskerville S, Lodish HF. Myogenic factors that regulate expression of muscle-specific microRNAs. Proc Natl Acad Sci U S A 2006; 103(23): 8721-6.

[10] Smits AM, van Vliet P, Metz CH, Korfage T, Sluijter JP, Doevendans PA, Goumans MJ. Human cardiomyocyte progenitor cells differentiate into functional mature cardiomyocytes: an in vitro model for studying human cardiac physiology and pathophysiology. Nat Protoc 2009; 4(2): 232-43.

[11] Zhao Y, Samal E, Srivastava D. Serum response factor regulates a muscle-specific microRNA that targets Hand2 during cardiogenesis. Nature 2005; 436(7048): 214-20.

[12] Kwon C, Han Z, Olson EN, Srivastava D. MicroRNA1 influences cardiac differentiation in *Drosophila* and regulates Notch signaling. PNAS 2005; 102(52): 18986-91.

[13] Turrini P, Corrado D, Basso C, Nava A, Bauce B, Thiene G. Dispersion of ventricular depolarization-repolarization: a noninvasive marker for risk stratification in arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy. Circulation 2001; 103(25): 3075-80.

[14] Edmondson DG, Lyons GE, Martin JF, Olson EN. Mef2 gene expression marks the cardiac and skeletal muscle lineages during mouse embryogenesis. Development 1994; 120(5): 1251-63.

[15] Miano JM. Serum response factor: toggling between disparate programs of gene expression. J Mol Cell Cardiol 2003; 35(6): 577-93.

[16] Liu N, Bezprozvannaya S, Williams AH, Qi X, Richardson JA, Bassel-Duby R, Olson EN. microRNA-133a regulates cardiomyocyte proliferation and suppresses smooth muscle gene expression in the heart. Genes Dev 2008; 22(23): 3242-54.

[17] Cordes KR, Srivastava D. MicroRNA regulation of cardiovascular development. Circ Res 2009; 104(6): 724-32.

[18] Valiunas V, Doronin S, Valiuniene L, Potapoval I, Zuckerman J, Walcott B, Robinson RB, Rosen MR, Brink PR, Cohen IS. Human mesenchymal stem cells make cardiac cennexins and form functional gap junction. J Physiol 2004; 555 (3): 617-26.

www.SID.ir