Archive of SID

مقاله تحقیقی

مهار عملکردی ژن نوکلئوستمین – یک کنترل‌کنندهٔ توانائی خودبازسازی – در سلول‌های بنیادین مزانشیمی مغز استخوان با واسطهٔ استراتژی RNAi

سید مهدی جعفرنژاد .M.Sc*، ✍ سید جواد مولی .Ph.D*، مریم مقدم متین .Ph.D**

* دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم پایه، گروه ژنتیک

** دانشگاه فردوسی، دانشکدهٔ علوم، گروه زیست‌شناسی، موسسهٔ تحقیقات بیوتکنولوژی

وصول: مردادماه ۸۵، پذیرش: مهرماه ۸۵

چکیده

هدف: مهار بیان ژن نوکلئوستمین به عنوان فاکتوری موثر در توانائی خودبازسازی سلولهای بنیادین و انواعی از رده‌های سلول سرطانی در سلولهای بنیادین مزانشیمی مغز استخوان به‌وسیلهٔ استراتژی RNAi برای بررسی اثرات عدم حضور است.

مواد و روشها: siRNA دورشتهای اختصاصی نوکلئوستمین و کنترل، طراحی و از طریق لیپوفکشن وارد سلولهای مزانشیمی مغز استخوان موش صحرایی شدند. تغییرات در بیان ژنها پس از مهار نوکلئوستمین با کمک RT-PCR، ایمنوسیتوشیمی و وسترن بلات بررسی گردیدند. همچنین تغییرات در نرخ تکثیر سلولی و نیز توزیع سلولها در فازهای چرخهٔ سلولی مطالعه شدند.

یافته‌ها: سلولهای استخراج شده مورفولوژی فیبروبلاستی داشته و قادر به تمایز به سلولهای شبه عصبی بوده و ژنهای اختصاصی سلولهای بنیادین و ردهٔ مزانشیمی را بیان می‌نمایند. بیان نوکلئوستمین پس از ترانسفکشن با siRNA اختصاصی کاهش قابل توجهی می‌یابد که همراه با کاهش تکثیر سلولی، ورود سلولها به فاز خفتگی و کاهش بیان ژنهای survivin و cyclin D1 می‌باشد.

نتیجه‌گیری: بررسی نشان داد که ورود الیگوهای siRNA اختصاصی نوکلئوستمین به سلولهای کشت داده شده، موفقیت‌آمیز بوده و سبب کاهش بیان نوکلئوستمین شده است. تغییرات در نرخ تکثیر سلولی، نمایهٔ فازهای چرخهٔ سلولی و بیان برخی ژن‌های موثر در فرایند خودبازسازی نشان‌دهندهٔ نقش بالادستی نوکلئوستمین در کنترل خودبازسازی در سلول‌های مزانشیمی مغز استخوان است.

کلید واژه‌ها: نوکلئوستمین، سلول بنیادین، RNAi، خودبازسازی

مقدمه

پروتئین‌های متصل شونده به GTP (Guanosine-Tri-Phosphate) از فاکتورهای تنظیمی پراهمیتی هستند که در مکانیسمهای متفاوت سیگنال‌رسانی و نیز در مسیرهایی که نیاز به کنترل کامل و قطع و وصل در زمان‌های دقیق دارند، نقشی فعال ایفاء می‌نمایند [۱]. نوکلئوستمین یکی از جدیدترین اعضاء خانوادهٔ پروتئین‌های متصل شونده به GTP است. این پروتئین

✍**ادرس مکاتبه:تهران**، دانشگاه تربیت مدرس دانشکدهٔ علوم پایه ،گروه ژنتیک
E-mail: sjmowla@yahoo.com

www.SID.ir

Archive of SID

تک زیرواحدی که به صورت عمده در داخل هستک و به صورت کم‌رنگی در شیرهٔ هسته حضور دارد با کمک مکانیسم اتصال به مولکول GTP و هیدرولیز آن، بین هستک و نوکلئوپلاسم مهاجرت می‌نماید [۲]. بیان ژن نوکلئوستمین تاکنون در سلول‌های بنیادین جنینی و انواع متعددی از سلولهای بنیادین بالغ گزارش گردیده است [۵-۲]. علاوه بر آن بیش‌بیان این ژن در بافت‌های سرطانی مختلف و نیز انواع متعددی از رده‌های سلولی سرطانی گزارش شده است [۸-٦]. همچنین مشاهده شده است که بیان آن در طی باززایی اندامهای قطع شدهٔ موجوداتی همانند سمندر افزایش قابل توجهی می‌یابد [۹]. با این حال تاکنون گزارش درخور توجهی از بیان آن در سلول‌های تمایز یافتهٔ غیر ترانسفورم شده ارایه نشده است. با توجه به این مشاهدات و نیز این واقعیت که بیان نوکلئوستمین در حین تمایز سلول‌های بنیادین، در مرحلهٔ سلولهای پیش‌ساز و پیش از خاموشی ژن-های دخیل در پیش‌برد تکثیر سلولی نظیر PCNA، متوقف می‌شود، از این ژن به عنوان یک مارکر سلولهای بنیادین نام برده می‌شود [۲].

نوکلئوستمین بیان به نسبت بالایی در سلولهای بنیادین مزانشیمی مغز استخوان دارد. اما به فاصلهٔ چند ساعت پس از القای تمایز عصبی در این سلول‌ها بیان آن خاموش می‌شود [۳]. با این حال این حقیقت روشن نیست که آیا توقف بیان نوکلئوستمین در حین فرایند تمایز، یک عامل خروج سلولهای فوق از چرخهٔ سلولی است و یا خود به عنوان یک اثر ثانویه و جانبی حاصل از فرایند تمایز و توقف چرخهٔ سلولی است؟ هدف از تحقیق حاضر آن است تا پس از استخراج و کشت سلولهای مزانشیمی مغز استخوان موش صحرایی، بیان ژن نوکلئوستمین در این سلول‌ها از طریق ترانسفکشن با الیگونوکلئوتیدهای سنتزی siRNA مورد اخلال قرار گرفته و تاثیرات این تیمار در وحلهٔ اول بر میزان رشد و تکثیر این سلول‌ها سنجیده شود. سپس با به‌کارگیری تکنیک فلوسیتومتری نتایج مهار بیان ژن نوکلئوستمین بر روی توزیع سلولهای موجود در جمعیت در فازهای مختلف چرخهٔ سلولی بررسی خواهد شد. علاوه بر آن تغییرات در بیان برخی از ژنهای مهم و شناخته شده در کنترل فرایندهای تکثیر و تقسیم سلولی نیز مورد بررسی قرار خواهد گرفت.

مواد و روشها

جداسازی و کشت سلول‌های بنیادین مزانشیمی مغز استخوان موش صحرائی

موشهای صحرایی جوان (۳-۱ ماه) از موسسهٔ تحقیقاتی رازی (کرج، ایران) تهیه شدند. برای استخراج سلول مطابق گزارشهای قبلی [۱۰] پس از کشتن موش، اندامهای تحتانی تشریح، استخوانهای ران و ساق پا خارج و بقایای ماهیچه‌ها و سایر متعلقات از آن جدا شدند. سپس استخوانهای تمیز شده در پتری دیش حاوی PBS (Phosphate Buffer Saline) سرد قرار داده شده و سریعاً به زیر هود کشت سلول انتقال داده شدند. پس از آن دو انتهای استخوان‌ها با کمک قیچی استخوان‌بر قطع و از طریق فروبردن سرسرنگ در یکی از دو انتهای استخوان و تزریق همراه با فشار محیط کشت به داخل استخوان محتوای آن در فلاسک کشت سلول تخلیه شد. سپس سرم تا غلظت ۲۰ درصد به محیط کشت افزوده شده و فلاسک به انکوباتور کشت سلول با دمای ۳۷ درجهٔ سانتیگراد و هوای مرطوب حاوی ۵ درصد CO2 منتقل شد. محیط کشت سلولها در روز بعد تخلیه و پس از شستشو باPBS (Phosphate Bffer Saline) محیط کشت جدید به آن افزوده شد.

محیط کشت سلولها در هر ۳-۲ روز با محیط جدید حاوی سرم ۲۰درصد تعویض و پس از پر شدن فلاسک، سلولها به نسبت ۱:۳ پاساژ داده شدند.

RNA interference

برای طراحی الیگوهای siRNA از نرم‌افزار siRNA design موجود در پایگاه اینترنتی موسسهٔ Whitehead دانشگاه MIT

www.SID.ir

Archive of SID

استفاده شد. ترادفهای پیشنهادی برای siRNA اختصاصی نوکلئوستمین (NS) به‌وسیله نرم‌افزار BLAST در برابر پایگاه اطلاعاتی ژنوم موش صحرایی جهت جستجوی ترادفات غیراختصاصی احتمالی استفاده شد. پس از بررسی مشخص شد که در هیچ‌کدام از توالی‌های گزارش شده مرتبط با موش صحرایی (به استثناء mRNA ژن نوکلئوستمین) مشابهتی بیش از ۱۵ نوکلئوتید از مجموع ۲۱ نوکلئوتید وجود ندارد. علاوه بر این یک siRNA نامرتبط (IR) نیز با همین مشخصات طراحی شد که طی BLAST مشخص شد که دارای هیچ‌گونه توالی بیش از ۱۵ نوکلئوتید مکمل در ژنوم موش صحرایی نیست. توالی siRNA های طراحی شده به شرح زیر است:

NS:

GAACUAAAACAGCAGCAGAdTdT Sense:

UCUGCUGCUGUUUUAGUUCdTdT Antisense:

IR:

Sense: CUGAUGCAGGUAAUCGCGUdTdT

Antisense: ACGCGAUUACCUGCAUCAGdTdT

سنتز الیگوها توسط شرکت Qiagen انجام پذیرفت.

برای انجام ترانسفکشن سلولها به تعداد ۴۰۰۰۰ سلول به ازاء هر چاهک پلیت ۶-خانه به همراه ۳ میلی‌لیتر از محیط کشت حاوی سرم و فاقد آنتی‌بیوتیک کشت داده شدند. در روز بعد محیط کشت سلولها تخلیه و با PBS شستشو داده شدند. سپس الیگوهای siRNA در غلظت ۲۰μM به میزان ۱۰ میکرولیتر (NS و یا IR) به ۱۷۵ میکرولیتر Opti-MEM اضافه شد. در یک تیوپ جداگانه ۴ میکرولیتر از الیگوفکتامین (Invitrogen) و ۱۱ میکرولیتر از Opti-MEM به ازای هر چاهک با یکدیگر مخلوط و پس از پیپتاژ کامل در مکان ثابت به مدت ۵ دقیقه انکوبه شدند. آنگاه این محلولها با یکدیگر مخلوط و سوسپانسیون حاصله به مدت ۲۰ دقیقه در دمای اتاق به صورت ثابت نگهداری شد. در پی آن کل سوسپانسیون به همراه ۸۰۰ میکرولیتر از محیط α-MEM[1] بدون سرم و آنتی‌بیوتیک به هر چاهک حاوی سلول‌های آماده شده برای ترانسفکشن منتقل گردید. پس از گذشت ۴ ساعت ، ۰/۵ میلی‌لیتر محیط کشت حاوی ۶۰ درصد سرم به هر چاهک اضافه و در هر روز محیط کشت سلولها با محیط تازه تعویض شد.

استخراج RNA تام سلولی و RT-PCR

RNA تام سلولی ۲۴ ساعت پس از انجام ترانسفکشن، با کمک کیت RNX plus (سیناژن، تهران) از دو گروه سلول‌های تراسفکت شده با siRNA اختصاصی نوکلئوستمین (NS) و siRNA کنترل (IR) استخراج شد. برای ساخت cDNA از μl ۰/۱ RNA تام در حجم واکنش ۲۰ μl با کمک هگزامر تصادفی و آنزیم RevertAidTM M-MuLV (Fermenras) و بر اساس پروتکل ارائه شده توسط کمپانی استفاده شد.

پس از انجام واکنش رونویسی معکوس، به منظور تکثیر قطعهٔ مورد نظر واکنش PCR با استفاده از ۲ μl از cDNA تهیه شده به همراه ۱ واحد آنزیم Taq (Fermentas) و MgCl2 به غلظت 1.5mM ، dNTPs به غلظت ۲/۵،۲۰۰ uM میکرولیتر از بافر آنزیم، ۱۰pm از هر پرایمر و آب در حجم ۲۵μl انجام گرفت. ترادف پرایمرهای به‌کار رفته به شرح زیر است:

NS (NM-175580):

Forward: TCCGAAGTCCAGCAAGTATTG

Reverse: AATGAGGCACCTGTCCACTC

Cyclin D1 (NM-171992):

Forward: ATGTTCGTGGCCTCTAAGATG

Reverse: TGCGGATGATCTGCTTGTTC

Survivin (NM-022274):

Forward: TCTACACCTTCAAGAACTGGC

Reverse: CTGGAAAGCTGGGACAAGTG

Beta 2 microglobulin (NM-012512):

Forward: CCGTGATCTTTCTGGTGCTT

www.SID.ir

Archive of SID

Reverse: TTTTGGGCTCCTTCAGAGTG

1. α- Minimum Essential Medium

www.SID.ir

Archive of SID

مـیـزان بیـان ژن Beta 2 microglobulin بـه عنـوان کنتـرل داخلی استفاده و محصولات PCR روی ژل آگارز ۱/۵ درصد جداسازی و پس از رنگ با اتیدیوم بروماید عکسبرداری شدند.

ایمنوسیتوشیمی

برای انجـام ایمنوسیتوشـیمی ابتـدا سـلولها بـر روی لاملهـای پوشـانده شـده بـا کـلاژن کـشت داده شـده و پـس از انجـام تیمارهای مورد نظر، ۲٤ ساعت پس از ترانسفکشن با محلـول پارافرمالدهید ٤درصد به مدت ۲۰ دقیقه تثبیت شدند. پـس از طی مراحل نفوذپذیرسازی، غیـر فعـال کـردن پراکـسیدازهای داخلی و مهار اتصالات غیراختصاصی با کمکBSA [1]، با آنتی-بادی منوکلونـال اختـصاصی نوکلئوسـتمین (R&D system) و سپس با آنتی بادی ثانویه متصل به HRP (Abcam) انکوبه و در نهایت سیگنال‌ها با استفاده از DAB شناسایی شدند.

وسترن بلات

پروتئین تـام سـلولی بـا اسـتفاده از بـافر RIPA (-mM Tris ۵۰HC، ۱۵۰ mM NaCl، EDTA۱ mM ، DOC ۱% ، SDS % ۰/۱، ۱ mM PMS) استخراج و با کمـک SDS-PAGE بـر روی ژل ۱۲/۵٪ جداسـازی شـدند. سـپس انتقـال بـه روی غـشای PVDF (Amersham) انجام و مهار واکنش‌های غیر اختـصاصی با کمک ترکیب مهاری کیـت ECL (Amersham) بـه مـدت ۲ ساعت انجام گرفت. در مرحلهٔ بعد بلات ابتـدا بـا آنتـی‌بـادی منوکلونال اختصاصی نوکلئوستمین (R&D system) و سپس با آنتی‌بادی ثانویهٔ متصل به HRP [2] انکوبه و در نهایت سـیگنالها با کمک کیت ECL (Amersham) مشخص شدند.

آنالیز رشد سلولی

۲٤ و ٤۸ ساعت پس از انجام ترانسفکشن، سلولها بـا کمـک تریپسین جداسازی و با استفاده از لام هموسـیتومتر شـمارش شدند.

بررسی چرخهٔ سلولی

سلولها ۲٤ ساعت پـس از ترانسفکـشن تریپـسینه شـده و بـا اتانول ۷۰ درصد تثبیـت شـدند. سـپس در محلـول ٦۰mg/ml آیودیـد پروپیـودیم (Sigma) حـاوی 20 mg/ml RNase A(Fermentas) به مـدت ۳۰ دقیقـه رنـگ آمیـزی و بـا کمـک دستگاه فلوسیتومتر (Becton Dickinson) آنالیز و نتایج حاصـل با نرم‌افزار WinMDI (ویرایش ۲/۸) تفسیر شدند.

یافته‌ها

سـلولهای مزانـشیمی مغـز اسـتخوان در شـرایط سـترون از استخوانهای ران و ساق پای موش صحرایی جوان استخراج و در فلاسکهای T75 وارد شدند. در روز بعـد بـدنبال تعـویض محیط کشت سلولها (αMEM همراه با ۲۰٪ سرم جنینی گـاو) همراه با شستشو با PBS سلولهای گرد متعلق به ردهٔ خونـساز خارج و تعداد معدودی سلول با مورفولوژی فیبروبلاسـتی در محیط باقی می‌مانند. به تدریج در روزهـای بعـد ایـن سـلولها تکثیر شده و کلونیهای پراکنـده‌ای در اطـراف خـود تـشکیل می‌دهند. رشد این سلولها فزاینده بوده و در عـرض چنـد روز سطح فلاسک را می‌پوشانند. سلولهای استخراج شده تعـدادی از ژنهای مارکر ردهٔ مزانشیمی همانند کلاژن نوع Iα و ویمنتین را در کنار برخـی از مارکرهـای سـلول‌هـای بنیـادین هماننـد نوکلئوستمین بیان می‌نمایند، اما بیان ژن‌هـای OCT4 و Nanog که از مارکرهای سلول‌های بنیادین جنینی هستند در آنها قابـل تشخیص نیست [۳].

اخـتلال در بیـان نوکلئوسـتمین بـا واسـطهٔ استراتژی RNAi

در آزمـایش RNAi از siRNA طراحـی شـدهٔ اختـصاصی ژن نوکلئوستمین (NS) و نیز یک siRNA نـامرتبط (IR/Irrelevant)

1. Bovin Serume Albumin
2. Horse Radish Peroxidase

www.SID.ir

Archive of SID

برای نرمالیزه کردن آثار غیراختصاصی احتمالی فرایند RNAi استفاده شد. در همهٔ موارد آنالیز بر روی نمونه‌های ترانسفکت شده با NS-siRNA همراه با نمونه‌های ترانسفکت شده با IR-siRNA در شرایط مشابه صورت گرفت تا از مداخلهٔ اثرهای غیراختصاصی RNAi در تفسیر نتایج جلوگیری به عمل آید.

آنالیز RT-PCR نیمه‌کمی بیان ژن نوکلئوستمین پس از ترانسفکشن نشان داد که میزان بیان در ساعت ۲٤ در گروه NS به میزان ۸۵-۷۰ کمتر از گروه IR است (شکل ۱-A).

به منظور مطالعهٔ اثر تغییرات کاهش در بیان mRNA سلولی ژن نوکلئوستمین بر میزان بیان پروتئین نوکلئوستمین نیز از تکنیک وسترن بلات بهره گرفته شد. بدین منظور پروتئینها ابتدا توسط الکتروفورز ژل پلی‌اکریل‌آمید ۱۲/۵درصد از یکدیگر جدا شده و پس از انتقال به غشاء توسط آنتی‌بادی پلی‌کلونال اختصاصی پروتئین نوکلئوستمین ردیابی شدند. در این مورد نیز برای حصول اطمینان از هم‌اندازه بودن میزان پروتئین تام وارد شده در هر چاهک، از میزان بیان پروتئین β actin به عنوان کنترل داخلی استفاده شد. نتیجهٔ نهایی بیانگر کاهش میزان بیان این پروتئین در اثر تیمار با siRNA اختصاصی نوکلئوستمین است. این در حالی است که تفاوت قابل ملاحظه‌ای در شدت باند β actin در دو نمونه مشاهده نمی‌شود که نمایانگر از تساوی در میزان بارگیری پروتئینها در دو چاهک می‌باشد (شکل ۱-B).

به منظور آزمون اختصاصیت آنتی‌بادی پلی‌کلونال به‌کار برده شده در آزمایش وسترن بلات - با توجه به جایگاه مشخصهٔ هستکی پروتئین نوکلئوستمین - و نیز چگونگی توزیع سلولهایی که دارای بیان کاهش یافته از پروتئین نوکلئوستمین در اثر ترانسفکشن با siRNA اختصاصی هستند از روش ایمنوسیتوشیمی استفاده شد. نتایج بررسی ایمنوسیتوشیمی نشان داد که سیگنالهای قوی هستکی (مطابق انتظار) به تعداد مختلف در عمده سلولهای گروه IR قابل مشاهدهاند. در حالی‌که در گروه NS تعداد کمی از سلولها، دارای سیگنال مشابه بودند. این موضوع می‌تواند نشانگر آن باشد که در سلولهای ترانسفکت شده با NS-siRNA بیان پروتئین نوکلئوستمین به شدت کاهش یافته است اما سلولهایی که به هر دلیلی ترانسفکت نشدهاند، هنوز بقایای این پروتئین را دارا هستند (شکل ۱-C).

کاهش نرخ تکثیر سلولی در پی مهار بیان نوکلئوستمین

شمارش سلولهای دو گروه NS و IR با کمک لام هموسیتومتر در زمان‌های ۲٤ و ٤۸ ساعت پس از انجام ترانسفکشن انجام گرفت. مقایسهٔ کلی نشان می‌دهد که در حالی که تعداد مساوی ٤۰۰۰۰ سلول در هرکدام از چاهک‌ها وارد شدند اما پس از گذشت زمان تعداد سلولها در دستهٔ IR از گروه NS پیشی می‌گیرد. به‌طوری‌که پس از گذشت ٤۸ ساعت از زمان ترانسفکشن، تعداد سلولها در گروه IR (12.4 ± 0.4 x104) به میزان ۱۵ درصد بیش از گروه NS (10.6 ± 0.5 x104) است (نمودار ۱).

مطالعهٔ تغییرات در چرخهٔ سلولی در پی مهار بیان نوکلئوستمین

نتایج آنالیز چرخهٔ سلولی با دستگاه فلوسیتومتری نشان‌دهندهٔ آن است که اختلال در بیان ژن نوکلئوستمین سبب تغییر در نسبت توزیع سلولها در فازهای مختلف چرخه می‌شود. بر این اساس مشخص شد که در ساعت ۲٤ پس از مهار، میزان سلولهای موجود در فاز S، ۳/٦۹ درصد است که نسبت به گروه IR (۹/۵۲ درصد) کاهشی در حدود ٦/۱۷ درصد نشان می‌دهد.

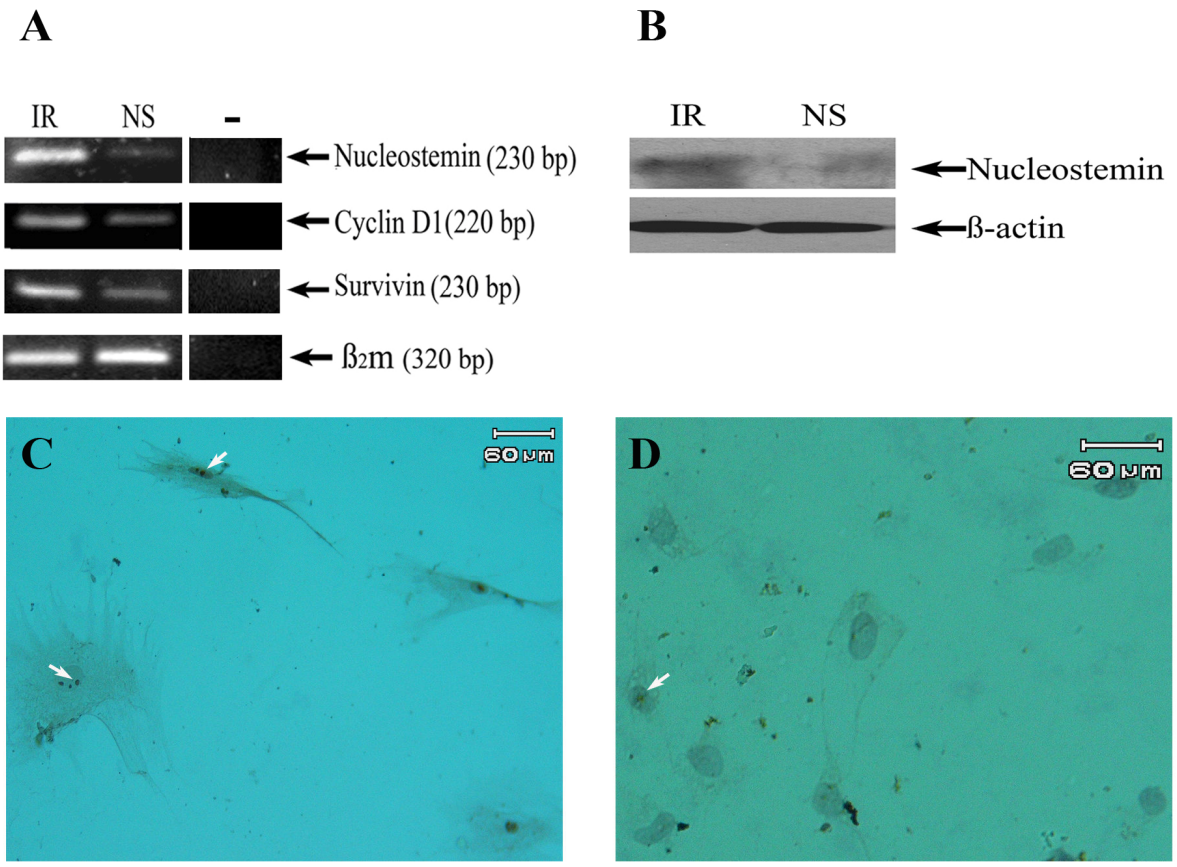
این کاهش در میزان سلولهای موجود در فاز G2/M نیز صادق بود. به‌طوری‌که این درصد در گروه NS (۱۲/۱۳ درصد) به میزان ۳/۹۹ درصد کمتر از گروه IR (۱٦/۵۲درصد) است

www.SID.ir

Archive of SID

www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۱. A) آنالیز RT-PCR ژنهای نوکلئوستمین، cyclin D1 و survivin. سطح بیان ژن β2m به عنوان کنترل داخلی استفاده شده است.

B) آنالیز وسترن بلات بیان پروتئین نوکلئوستمین در گروههای NS و IR. میزان بیان پروتئین ß-actin به عنوان کنترل داخلی استفاده شده است.

C) رنگ‌آمیزی ایمنوهیستوشیمی سلولهای گروه IR با استفاده از آنتی‌بادی ضد نوکلئوستمین. پیکان‌ها نشان دهندهٔ سیگنالهای مربوط به نوکلئوستمین هستند.

D) رنگ‌آمیزی ایمنوهیستوشیمی سلولهای گروه NS با استفاده از آنتی‌بادی ضد نوکلئوستمین.

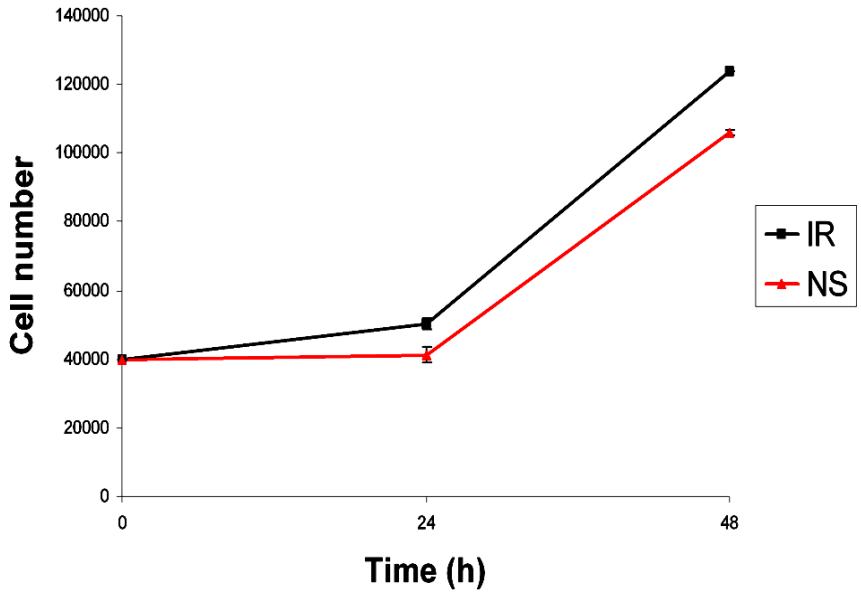
. اما این اختلافات در مورد فاز G0/1 جهت متفاوتی دارد. بدین ترتیب که درصد سلولهای موجود در فاز G0/1 در گروه NS (۸٤/۲۹ درصد) در حدود ۱۰/۱۲ درصد بیش از گروه IR (۷٤/۱۷ درصد) است (نمودار ۲). شمای کلی نشان‌دهندهٔ کاهش در میزان سلولهای موجود در فاز S و G2/M و افزایش در میزان سلولهای موجود در فاز G0/1، در اثر کاهش بیان نوکلئوستمین است.

تغییرات بیان ژنهای cyclin D1 و surviving در پی مهار نوکلئوستمین

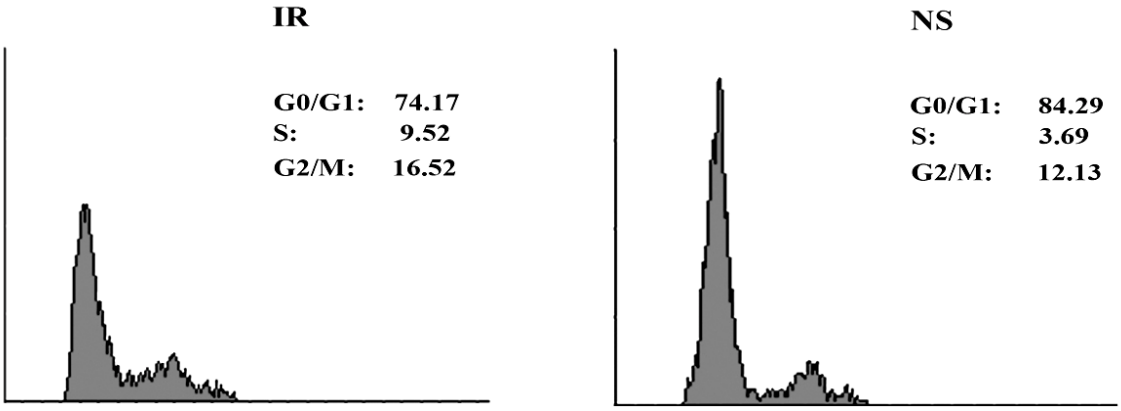
آنالیز RT-PCR نشان دهندهٔ کاهش ۵۰-٤۰ درصدی در میزان بیان mRNA کد شده توسط ژن cyclin D1 در گروه NS در مقایسه با گروه IR در اثر مهار بیان ژن نوکلئوستمین است (شکل ۱-A). نتیجهٔ مشابهی نیز از آنالیز RT-PCR ژن survivin به دست آمد (شکل ۱-A).

www.SID.ir

Archive of SID



نمودار ۱. نمایهٔ رشد سلولی در دو گروه NS و IR در ساعات ۲٤ و ٤٨ پس از ترانسفکشن



نمودار ۲. آنالیز چرخهٔ سلولی. توزیع و درصد سلولها در فازهای G1/0، S و G2/M در قسمت مربوطه مشخص شده است

بحث

از آنجا که در مطالعات یعقوبی و همکاران مشاهده شد که در حین تمایز عصبی سلولهای بنیادین مزانشیمی مغز استخوان و خروج این سلولها از چرخهٔ سلولی، بیان ژن نوکلئوستمین به سرعت کاهش یافته و در نهایت متوقف می‌شود [۳]، این موضوع مورد سوال واقع شد که نقش نوکلئوستمین در بروز این پدیده در چه سطحی است؟ و اینکه عدم بیان یا اختلال در بیان این ژن چه تاثیری بر قابلیت تکثیر سلول‌های فوق خواهد داشت؟

شمارش سلولی در پی مهار بیان ژن نوکلئوستمین نشان داد که

www.SID.ir

Archive of SID

مهار نوکلئوستمین سبب القای کاهش در نرخ تکثیر سلولها می‌شود و این کاهش تا حدود ۱۵ درصد از کل جمعیت سلولها را شامل می‌شود. نکتهٔ جالب توجه در این زمینه، عدم هم‌خوانی نتایج شمارش سلولی در این مطالعه با یافته‌های یک تحقیق مشابه توسط کافینه (Kafieneh) و همکاران است [۵]. در پژوهش انجام شده توسط گروه فوق مشخص شد که مهار بیان نوکلئوستمین با کمک استراتژی RNAi تاثیری بر میزان تکثیر سلول‌های بنیادین مزانشیمی انسانی ندارد، در حالی که در مطالعهٔ حاضر تیمار فوق سبب کاهش ۱۵ درصدی در شمارگان سلولی شد. علت تفاوت مشاهده شده می‌تواند اختلاف احتمالی در بیولوژی سلول‌های بنیادین مزانشیمی مغز استخوان موش صحرایی و انسان یا تفاوت در روشهای به‌کار برده شده در حین انجام آزمایشهای باشد. از تفاوت روشهای انجام این دو مطالعه، میزان بسیار پایین‌تر درصد سرم مورد استفاده در محیط کشت (۲درصد) در مطالعهٔ کافینه (Kafieneh) در مقایسه با مطالعهٔ حاضر (۲۰ درصد) است که می‌تواند دلیلی برای رفتار متفاوت سلولها باشد.

کاهش مشاهده شده در نرخ تکثیر در اثر مهار نوکلئوستمین می‌تواند به دو علت افزایش زمان تکمیل چرخهٔ سلولی توسط سلولها یا ایجاد وقفه در سیر سلولها در هر کدام از مراحل چرخه باشد. به منظور دست‌یابی به علت واقعی این پدیده از آنالیز چرخهٔ سلولی با کمک تکنیک فلوسیتومتری استفاده شد. این روش می‌تواند سلولها را بر اساس محتوای DNA درون سلولی، در سه گروه G1/0، S و G2/M دسته‌بندی نماید. در مطالعهٔ حاضر مشخص شد که مهار بیان نوکلئوستمین سبب افزایش قابل توجه در نسبت سلولهای واقع در فاز G1/0 به همراه کاهشی متناسب با آن در میزان سلولهای واقع در فازهای S و G2/M می‌شود. این موضوع نشانگر القای توقف چرخهٔ سلولی و نه افزایش زمان تکمیل چرخه در اثر مهار نوکلئوستمین است. علاوه بر این، نسبت محاسبه شده از سلول‌هایی که چرخه را ترک می‌نمایند، تقریباً هم‌اندازه با میزان کاهش در نرخ تکثیر سلولی اندازه‌گیری شده در آزمایش تعیین شمارگان سلولی است. بنابراین، این مشاهده می‌تواند به عنوان تائیدی فراتر بر صحت نتایج بدست آمده از آزمایش شمارش سلولی باشد.

در کنار این بر اساس منطق ژنتیکی قابل انتظار است که کاهش القاء شده در میزان تکثیر سلولها در اثر مهار نوکلئوستمین همراه با تغییر در بیان حداقل تعدادی از ژنهای درگیر در پیش‌برد چرخهٔ سلولی باشد. به همین دلیل تغییرات در بیان دو ژن cyclin D1 و survivin در دو گروه NS و IR با کمک روشی RT-PCR نیمه‌کمی بررسی شدند.

بیان cyclin D1 پس از پایان مرحلهٔ میتوز آغاز شده و پروتئین محصول، مسئول گذر از فاز G1 است. همچنین برخی از پژوهشگران معتقدند که این پروتئین مسئول اصلی بازگشت سلول‌ها از فاز خفتگی (G0) به چرخه است [۱۱و ۱۲]. بر این اساس قابل انتظار است که خروج سلولها از چرخهٔ سلولی و ورود به فاز خفتگی همراه با قطع و یا کاهش بیان این ژن باشد. در مطالعهٔ حاضر نیز مشاهده شد که با اختلال در بیان نوکلئوستمین و خروج برخی از سلولها از چرخهٔ سلولی میزان بیان mRNA کد شده توسط ژن cyclin D1 نیز کاهش قابل توجهی می‌یابد.

survivin در ابتدا به عنوان یک فاکتور مهار کنندهٔ آپاپتوز شناسایی شد [۱۳]. در کنار نقش ضد آپاپتوزی survivin، اخیراً نقشهای پراهمیتی برای این ژن در کنترل چرخهٔ سلولی و فرایند میتوز نیز شناسایئی گردیده‌اند [۱۳]. سطح بیان survivin تابعی از وضعیت چرخهٔ سلولی بوده و با آغاز G2/M افزایش یافته و با آغاز G1 کاهش می‌یابد [۱٤]. بر این اساس قابل انتظار است که با کاهش نسبت سلولهای با چرخهٔ سلولی فعال در یک جمعیت میزان بیان این ژن نیز کاهش یابد. در این مطالعه و در پی مهار نوکلئوستمین، مشاهده شد که از بیان survivin نیز به میزان قابل توجهی کاسته می‌شود.

این دو مشاهده ضمن تائید سایر نتایج به‌دست آمده در این تحقیق، بیانگر وجود نوعی ارتباط در بین سطح بیان نوکلئوستمین و ژنهای survivin و cyclin D1 است. البته این

www.SID.ir

Archive of SID

موضوع مشخص نیست که ماهیت این ارتباط از چه نوعی بوده و آیا اختلال در بیان cyclin D1 و یا survivin نیز آثار مشابهی بر بیان نوکلئوستمین خواهد داشت یا خیر؟ همچنین این مشاهدات نشان می‌دهند که مهار نوکلئوستمین سبب بروز تغییرات قابل توجهی در میزان رونویسی حداقل تعدادی از ژن‌های دخیل در مکانیسمهای تکثیر سلولی می‌شود. و این نکته از آن نظر حایز اهمیت می‌نماید که نوکلئوستمین جزء فاکتورهای رونویسی و یا متصل شونده به DNA نبوده و بنابراین محتمل است که اثر افزایندهٔ آن بر بیان این ژنها توسط عوامل حدواسطی که تاکنون ناشناخته ماندهاند، انجام گیرد. بدین دلیل شناخت مکانیسم دقیق اثر نوکلئوستمین بر بیان این دسته از ژن‌ها، می‌تواند زوایای مهمی از نحوهٔ عملکرد آن را روشن نماید.

به‌طور خلاصه، نتایج مطالعهٔ حاضر نشان دادند که نوکلئوستمین نوعی فعالیت بالادستی در کنترل مکانیسمهای تکثیر سلولی در سلولهای بنیادین مزانشیمی مغز استخوان موش صحرایی داشته و خاموش شدن بیان آن در حین تمایز عصبی این سلولها در محیط in vitro می‌تواند به عنوان عاملی برای خروج سلول‌های شبه‌عصبی حاصل از چرخهٔ سلولی و ورود به فاز خفتگی محسوب گردد. علاوه بر آن مشاهده گردید که کاهش بیان نوکلئوستمین سبب القای کاهش در بیان ژنهای دخیل در مکانیسمهای تکثیر سلولی، همانند cyclin D1 و survivin می‌شود.

تقدیر و تشکر

نویسندگان مقاله لازم می‌دانند که از راهنماییهای دکتر احمدرضا بهرامی و همکاریهای خانم پروانه نیک‌پور و آقای محمد مرندی تشکر نمایند. کلیهٔ هزینه‌های مصرفی این تحقیق از محل بودجهٔ تحقیقاتی شبکهٔ سلولهای بنیادین تامین شده است.

References

1. **Shirai H, Autieri M, Eguchi S**. Small GTP-binding proteins and mitogen-activated protein kinases as promising therapeutic targets of vascular remodeling. Curr Opin Nephrol Hypertens 2007; 16: 111-115.
2. **Tsai RY, McKay RD**. A nucleolar mechanism controlling cell proliferation in stem cells and cancer cells. Genes Dev 2002; 16: 2991-3003.
3. **Yaghoobi MM, Mowla SJ, Tiraihi T**. Nucleostemin, a coordinator of self-renewal, is expressed in rat marrow stromal cells and turns off after induction of neural differentiation. Neurosci Lett 2005; 390: 81-6.
4. **Lacina L, Smetana K, Jr, Dvorankova B, Stork J, Plzakova Z, et al**. Immunocyto- and histochemical profiling of nucleostemin expression: marker of epidermal stem cells? J Dermatol Sci 2006; 44: 73-80.
5. **Kafienah W, Mistry S, Williams C, Hollander AP**. Nucleostemin is a marker of proliferating stromal stem cells in adult human bone marrow. Stem Cells 2006; 24: 1113-20.
6. **Sijin L, Ziwei C, Yajun L, Meiyu D, Hongwei Z, Guofa H, et al**. The effect of knocking-down nucleostemin gene expression on the in vitro proliferation and in vivo tumorigenesis of HeLa cells. J Exp Clin Cancer Res 2004; 23: 529-38.
7. **Liu SJ, Cai ZW, Liu YJ, Dong MY, Sun LQ, Hu GF, et al**. Role of nucleostemin in growth regulation of gastric cancer, liver

www.SID.ir

Archive of SID

cancer and other malignancies. World J Gastroenterol 2004; 10: 1246-9

8. **Fan Y, Liu Z, Zhao S, Lou F, Nilsson S, Ekman P, et al**. Nucleostemin mRNA is expressed in both normal and malignant renal tissues. Br J Cancer 2006; 94: 1658-62.
9. **Maki N, Takechi K, Sano S, Tarui H, Sasai Y, Agata K**. Rapid accumulation of nucleostemin in nucleolus during newt regeneration. Dev Dyn 2007; 236: spc1.
10. **Yaghoobi MM, Mowla SJ**. Differential gene expression pattern of neurotrophins and their receptors during neuronal differentiation of rat bone marrow stromal cells. Neurosci Lett 2006; 397: 149-54.
11. **Bloom J, Cross FR**. Multiple levels of cyclin specificity in cell-cycle control. Nat Rev Mol Cell Biol 2007; 8: 149-60.
12. **Hinds PW, Dowdy SF, Eaton EN, Arnold A, Weinberg RA**. Function of a human cyclin gene as an oncogene. Proc Natl Acad Sci U S A 1994; 91: 709-713.
13. **Tamm I, Wang Y, Sausville E, Scudiero DA, Vigna N, Oltersdorf T, et al**. IAP-family protein survivin inhibits caspase activity and apoptosis induced by Fas (CD95), Bax, caspases, and anticancer drugs. Cancer Res 1998; 58: 5315-20.
14. **Kobayashi K, Hatano M, Otaki M, Ogasawara T, Tokuhisa T**. Expression of a murine homologue of the inhibitor of apoptosis protein is related to cell proliferation. Proc Natl Acad Sci U S A 1999; 96: 1457-62.

www.SID.ir