

## اثر محیط هیپوکسی روی بیان mir-21 و mir-130a در سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق شده از بافت چربی موش در دو مرحله‌ی Primary و Immortality

شقایق حق جوی جوانمرد<sup>۱</sup>، نجمیه پاکبازی<sup>۲</sup>، لاله رفیعی<sup>۳</sup>

### مقاله پژوهشی

### چکیده

**مقدمه:** خصوصیات منحصر به فرد سلول‌های بنیادی مزانشیمی، آن‌ها را تبدیل به ابزار قدرتمند در زمینه‌ی سلول‌درمانی و مهندسی ژنتیک کرده است. در مقایسه با سلول‌های بنیادی انسانی، سلول‌های بنیادی موشی دارای خصوصیات متفاوتی مانند هتروژن بودن و سرعت پایین رشد هستند. نشان داده شده است که microRNAها در بسیاری از فرایندهای تنظیمی سلول مانند هیپوکسی نقش دارند. در این مطالعه، اثر کمبود اکسیژن بر بیان microRNAهای مرتبط با هیپوکسی در سلول‌های بنیادی مزانشیمی جدا شده از بافت چربی موش (Adipose-derived mesenchymal stem cells یا AD-MSC) مورد بررسی قرار گرفت.

**روش‌ها:** سلول‌ها در شرایط هیپوکسی و طبیعی کشت داده شدند و با استفاده از تکنیک Real-time PCR (Real-time polymerase chain reaction)، میزان بیان mir-21 و mir-130a در دو مرحله‌ی Primary و Immortality مورد بررسی قرار گرفت. همچنین بیان نشانگرهای سطحی MSCها با تکنیک فلوسیتومتری مورد ارزیابی قرار گرفت.

**یافته‌ها:** میزان بیان mir-21 و mir-130a در شرایط هیپوکسی افزایش یافت. میزان بیان این microRNAها در مرحله‌ی Primary بالاتر از مرحله‌ی Immortality بود و بیشتر تحت تأثیر شرایط هیپوکسی قرار داشت. همچنین، میزان بیان نشانگرهای سطحی در سطح AD-MSC در دو فاز متفاوت بود.

**نتیجه‌گیری:** در نهایت با توجه به این که سلول‌های بنیادی به غلظت اکسیژن حساس هستند و با در نظر گرفتن این که در شرایط In vivo سلول‌های بنیادی در شرایط کمبود اکسیژن قرار دارند، القای بیان mir-21 و mir-130a در این شرایط به بقا و حفاظت این سلول‌ها در مقابل آپوپتوز کمک می‌کند.

**واژگان کلیدی:** هیپوکسی، mir-21، mir-130a، Adipose-derived mesenchymal stem cells

**ارجاع:** حق جوی جوانمرد شقایق، پاکبازی نجمیه، رفیعی لاله. اثر محیط هیپوکسی روی بیان mir-21 و mir-130a در سلول‌های بنیادی مزانشیمی

مشتق شده از بافت چربی موش در دو مرحله‌ی Primary و Immortality. مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۳۹۵؛ ۳۴ (۳۶۹): ۲۸-۳۴

برای MSCs می‌باشد؛ چرا که می‌توان حجم زیادی چربی را بدون درد و با روش غیر تهاجمی جراحی لیپوساکشن به دست آورد (۱۰-۱۲). MSCs استخراج شده از بافت چربی همانند سلول‌های استخراج شده از مغز استخوان نیز به همان اندازه توانایی تکثیر و خودنوآرایی دارند. علاوه بر این، این سلول‌ها میل زیادی به بافت‌های دچار هیپوکسی دارند و می‌توانند منبع ایده‌آلی برای سلول‌درمانی در برخی بیماری‌ها از قبیل سرطان و مشکلات قلبی باشند. به تازگی، مثال‌های جالبی از کاربرد درمانی Adipose-derived mesenchymal stem cells (AD-MSCs) گزارش شده است (۱۳-۱۵).

### مقدمه

سلول‌های بنیادی مزانشیمی (MSCs یا Mesenchymal stem cells)، به عنوان سلول‌های چندگانه‌ی استرومایی تعریف شده‌اند و قابلیت تکثیر گسترده و خودنوآرایی دارند (۱). خواص درمانی MSCs به خاطر توانایی متعادل کردن سیستم ایمنی، خود بازآرایی وسیع، تمایز یابی چندگانه و تروپیسیم (Tropism) اختصاصی آن‌ها می‌باشد (۲-۵). MSCs را می‌توان از بافت‌های مختلفی از قبیل ماهیچه، مغز استخوان و بافت آدیپوز (چربی) استخراج کرد (۶-۹). مغز استخوان تا کنون منبع اصلی MSCs بوده است، اما بافت چربی (آدیپوز)، یک منبع مهم دیگر

۱- دانشیار، مرکز تحقیقات فیزیولوژی کاربردی و گروه فیزیولوژی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

۲- کارشناس ارشد، گروه زیست‌شناسی، دانشکده‌ی علوم، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد ارسنجان، ارسنجان، ایران

۳- دانشجوی دکتری تخصصی پژوهشی، مرکز تحقیقات فیزیولوژی کاربردی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

Email: rafiee.laleh@gmail.com

نویسنده‌ی مسؤو: لاله رفیعی

سلول‌های بنیادی جدا شده از آدیپوز موش مقایسه گردید. برای این منظور، شرایط هیپوکسی در هر دو مرحله اعمال شد و بیان miRNA های mir-21 و mir-130a ارزیابی گردید.

### روش‌ها

#### جداسازی و کشت سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از چربی

##### موش

بافت چربی (آدیپوز) از یک پد C57BL6 موش ۱۲-۸ هفته جدا شد و دوبار با Phosphate-buffered saline (PBS) شسته شد. سپس، توسط کلاژناز (سیگما) ۰/۰۷۵ درصد تیمار شد و هر ۱۰ دقیقه در ۳۷ درجه سانتی‌گراد تکان داده شد. بعد از ۴۰ دقیقه، به منظور جلوگیری از فرایند هضم، حجم مساوی از ماده‌ی (DMEM) Dulbecco's modified eagle medium (شرکت Gibco) و ۱۰ درصد سرم جنین گوساله (FBS یا Fetal bovine serum) اضافه شد. بعد از سانتریفیوژ با شتاب ۱۴۰۰ دور در دقیقه، سلول‌ها در محیط شامل DMEM با گلوکز کم، ۱۰ درصد FBS (شرکت Gibco) و ۱۰۰ mg/ml پنی‌سیلین-استرپتوماسین (شرکت Gibco) کشت داده شدند. هر سه روز یک بار، محیط کشت تعویض و سلول‌ها پس از رسیدن به ازدحام ۸۵ درصد پاساژ داده شدند.

##### آزمایش‌های تمایزیابی

ADSCs از پاساژ هشتم به آدیپوسیت، استئوبلاست و کندروسیت تمایز داده شدند. به منظور تمایز یافتن به آدیپوسیت و استئوبلاست، حدود ۲۵۰۰۰ سلول ADSC در پتری دیش کشت داده شد. بعد از گذشت ۴ ساعت، محیط کشت جدید جایگزین شد.

برای تمایز آدیپوژنیک، ADSCs با محیط رشد کامل همراه با (ITS) Insuline-Transferin-Selenite (شرکت Sigma) تیمار شدند. ۲۱ روز بعد، سلول‌های تمایز یافته با پارافمالدئید ۴ درصد و Oil red ۰/۵ درصد برای ۱۰ دقیقه در دمای اتاق ثابت شدند. برای تولید استئوبلاست، ADSC در محیط کشت شامل بتا گلیسرول-فسفات (۱۰ nM)، ۵۰ μg/ml اسید اسکوربیک ۲ فسفات و دگزامتازون (۱۰۰ nM) برای سه هفته کشت داده شدند. سپس سلول‌ها با پارافمالدئید ۴ درصد ثابت و با Alzarin Reds برای ۲۰ دقیقه در دمای اتاق رنگ‌آمیزی شدند.

به منظور تمایز غضروف، ۲۵۰۰۰ سلول ADSC با شتاب ۵۰ rpm سانتریفیوژ شدند و در محیط کشتی شامل ۵۰ μg/ml اسید اسکوربیک ۲-فسفات، ۱۰ ng/mk عامل رشد β (TGF-β) یا Transforming growth factor beta (شرکت Sigma) و ۱۰۰ nM دگزامتازون به مدت سه هفته نگه‌داری شدند. سپس

شرایط هیپوکسی می‌تواند بر روی خصوصیات تکثیر و تمایزیابی MSCs از طریق تنظیم کننده‌های اپی‌ژنتیک مانند microRNA (miRNA) ها تأثیر داشته باشد. miRNA ها، RNA های غیر کد کننده‌ی کوچکی شامل ۲۴-۱۸ نوکلئوتید هستند که از یک پیش‌ساز نوکلئوتیدی مشتق شده‌اند (۱۶). miRNA ها به عنوان تنظیم کننده‌هایی شناخته شده‌اند که بیان ژن را با مهار ترجمه و یا تحریک شکسته شدن Messenger RNA (mRNA) هدف، تنظیم می‌کنند. آن‌ها قدرت هدف‌گیری صدها mRNA مختلف را دارند و نقش اصلی در خودنوآرایی و تمایزیابی سلول‌های بنیادی ایفا می‌کنند (۱۸-۱۷).

بنا بر این، miRNA می‌تواند بر عملکرد و رفتار MSCs اثر بگذارد. توالی mir-21 روی کروموزوم شماره‌ی ۱۷ قرار دارد. این توالی با توالی (VMP1) Vacuole membrane protein 1 هم‌پوشانی دارد. بر اساس ژن‌های هدف mir-21 به عنوان یک miRNA انکوژنی مهم که در رشد تومور و متاستاز نقش دارد، در نظر گرفته می‌شود. علاوه بر این، نشان دادند که mir-21 نقش مهمی در فرایندهای انتقال پیام مربوط به Epithelial-mesenchymal transition (EMT) و خصوصیات سلول‌های بنیادی سرطان Cancer stem cells (CSC) دارد (۲۰-۱۹).

همچنین، نشان دادند که mir-21 در تمایز سلول‌های مشتق شده از MSCs نیز نقش دارد، اما مطالعات در این زمینه محدود می‌باشند (۲۱). توالی mir-130 روی کروموزوم ۲۲ قرار گرفته است و نقش انکوژنی در سرطان معده، کبد و اندومتریال دارد (۲۳-۲۲). از طرف دیگر، نشان داده شده است که mir-130 در بازآرایی سلول‌های بنیادی گلیوبلاستوما نقش دارد (۲۴). مطالعات مربوط به این miRNA ها در زمینه‌ی نقش آن‌ها در سلول‌های بنیادی بسیار محدود می‌باشند.

MSCs جدا شده از موش دارای سه مرحله‌ی مختلف Dormant, Primary, و Immortality هستند. در مرحله‌ی Primary که پس از جدا کردن MSCs شروع می‌شود، سلول‌های یکسان مشاهده می‌شوند و همان خصوصیات MSCs بافت‌های دیگر را نشان می‌دهند. MSCs در خلال وارد شدن به مرحله‌ی Dormant به تدریج بزرگ‌تر می‌شوند و بعد از چند روز، تعدادی هسته در سلول‌ها ظاهر می‌شود و تعدادی سلول‌های تک هسته‌ای که سلول‌های دختر نامیده می‌شوند، از هر سلول چند هسته‌ای ایجاد می‌شود. MSCs موش از مرحله‌ی Dormant می‌گذرند و مرحله‌ی Immortality شروع می‌شود. این مرحله، دوباره با تکثیر سلول‌های کوچک دختر آغاز می‌شود و میزان آن به آرامی تا هنگام رسیدن به حالت تعادل افزایش می‌یابد.

در این مطالعه، بیان نشانگرهای سطحی و برخی miRNA های مربوط به شرایط هیپوکسی در مراحل Primary و Immortality

Polymerase chain reaction (PCR) شامل ۳  $\mu$ l محصول Reverse transcriptase، ۱۰  $\mu$ l، مستر میکس IX Eva Green، ۱  $\mu$ l پرایمرهای اختصاصی و ۱  $\mu$ l پرایمرهای یونیورسال معکوس miRNA بود. مخلوط واکنش در دمای ۹۵ °C برای ۱۰ دقیقه انکوبه شد. آن گاه، ۴۰ چرخه در دمای ۹۵ °C به مدت ۱۵ ثانیه و در دمای ۶۰ °C به مدت ۱ دقیقه انجام شد. واکنش‌های PCR با استفاده از دستگاه Real time PCR (شرکت Corbett، آلمان) انجام شد. سپس نرم‌افزار Rotor-Gene 6000 برای آنالیز استفاده گردید. RNA هسته‌ای کوچک U6 به عنوان شاهد داخلی به منظور طبیعی کردن میزان RNA استفاده شد. برای دستیابی به میزان تغییرات در بیان ژن‌های مورد نظر، از روش  $\Delta\Delta CT$  Relative quantification استفاده شد. برای مقایسه و تفسیر داده‌های به دست آمده از RT-PCR، از آزمون t استفاده شد. تحلیل‌های آماری مورد نظر نیز در نرم‌افزار SPSS (SPSS Inc., Chicago, IL) انجام و  $P \leq 0.05$  به عنوان سطح معنی‌داری در نظر گرفته شد.

### یافته‌ها

سلول‌های باقی مانده و شناور، یک روز بعد از جدا کردن بافت آدیپوز با دو بار شستشو توسط PBS از فلاسک کشت حذف شدند. سلول‌های به هم چسبیده با مورفولوژی متفاوت (بیشتر گرد) قابل مشاهده شدند. سلول‌های یکسان و مارپیچی، بعد از دو پاساژ ظاهر شدند و به سرعت گسترش یافتند. سلول‌های ADSC موش تا پاساژ ۱۳ به تقسیم شدن ادامه دادند در این مرحله کاهش قابل ملاحظه‌ای در رشد و سپس توقف کامل مشاهده شد. در این زمان، بعضی سلول‌های ADSC موش مرحله Dormant را شروع کردند و به شکل مسطح و بزرگ ظاهر شدند. سلول‌های ADSC در مرحله Dormant رشد و تقسیم نداشتند و محیط آن‌ها هر سه روز یک بار تعویض شد. بعد از ۱۶ روز، تغییر شکل در مورفولوژی ADSCs مسطح مشاهده شد و چندین سلول کوچک با شکل یکسان از سلول‌های مسطح شروع به رشد کردند و وارد مرحله Immortality شدند. در مرحله Immortality سلول‌های کوچک به سرعت و به صورت نامحدود تکثیر یافتند و با گذشت زمان جمعیت نامتجانس به لحاظ مورفولوژی که تعدادی از آن‌ها مورفولوژی نوروئ را پیدا کردند، ایجاد شدند (شکل ۱).

### بیان نشانگرهای سطحی سلول‌های ADSC موش

ADSCs پاساژ ۶ در مراحل Primary و Immortality برای ایمونوفلورسنتینگ به کار گرفته شد. نتایج FACS بیان قابل ملاحظه‌ای

سلول‌ها با پارافرمالید ۴ درصد ثابت شدند و به منظور قابل مشاهده شدن تمایزیابی، رنگ‌آمیزی سلول‌ها با Toluidine blue و Alcian blue انجام شد.

### سلول‌ها و آماده‌سازی محیط کشت‌های هیپوکسی شونده

سلول‌های ADSC به ترتیب پیش‌گفته آماده شدند و در محیط شامل DMEM کم گلوکز، ۱۰ درصد FBS و ۱۰۰ mg/ml پنی‌سیلین-استرپتوماسین کشت داده شدند. سلول‌ها در شرایط هیپوکسی شامل ۹۲ درصد  $N_2$ ، ۵ درصد  $CO_2$  و ۳ درصد  $O_2$  رشد داده شدند. یک انکوباتور با ۲ حسگر هوایی، یکی برای  $CO_2$  و دیگری برای  $O_2$  به منظور پایداری مخلوط گازی هیپوکسی استفاده شد. غلظتی از  $O_2$  با تحویل گاز نیتروژن تولید شده از تانک نیتروژن مایع به دست آمد و پایدار ماند. اگر درصد  $O_2$  بالاتر از مقدار مطلوب شود، گاز  $N_2$  به طور اتوماتیک به سیستم تزریق می‌شود تا جایگزین  $O_2$  بیش از حد شود.

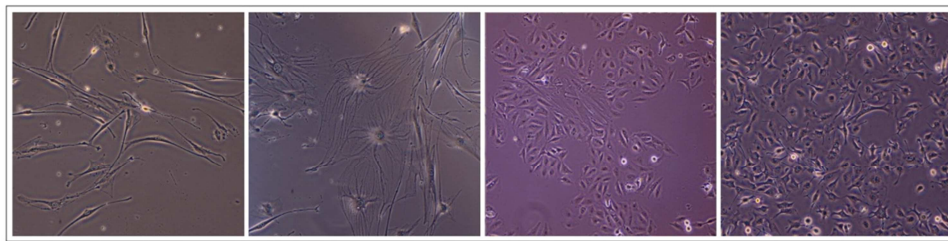
### ایمونوفلورسنتینگ

فلوسیتومتری با Fluorescence-activated cell sorting calibur (FACSCalibur) انجام شد. ۱۰<sup>۵</sup>-۱۰<sup>۶</sup> سلول برای هر آنتی‌بادی استفاده گردید. سلول‌ها دو بار با استفاده از PBS شسته شدند و در ۱۰۰ ml سرم گاوی ۳ درصد در دمای ۴°C با آنتی‌بادی‌های CD11b-FITC، CD24-PE، CD73-PE، CD34-FITC، CD90-PE، CD105-PE، CD146-PE، CXCR4-PE، CD45-FITC و ایزوتایپ کنترل‌های IgG2ak-PE رت و IgG1-FITC موشی (شرکت Ebioscience) انکوبه شدند. بعد از ۴۰ دقیقه انکوباسیون، سلول‌ها شسته و با BD Cell Fix ثابت شدند. آنالیز اطلاعات FACS با استفاده از نرم‌افزار BD cell Quest pro انجام شد.

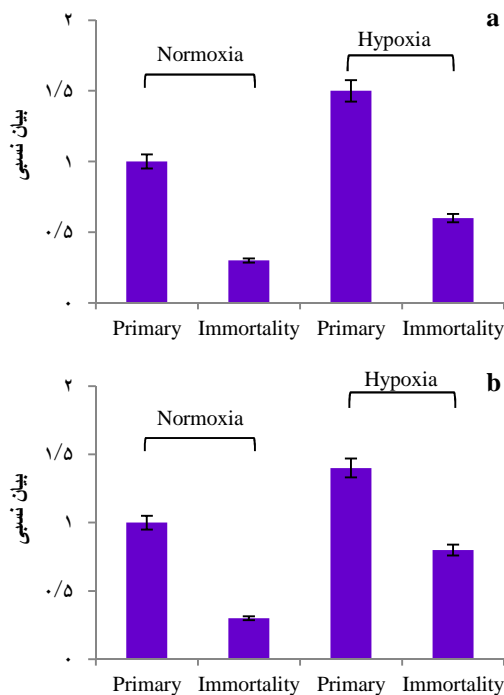
### آنالیز بیان miRNA با روش‌های Reverse transcriptase PCR

#### و Real time PCR

کل RNA از سلول‌های ADSC با استفاده از کیت miRNeasy (شرکت کیژن، المان) مطابق دستورالعمل سازنده جدا شد. complementary DNA (cDNA) در مرحله‌ی نسخه‌برداری معکوس (Reverse transcriptase یا RT) از کل نمونه‌های RNA با استفاده از پرایمرهای اختصاصی و معرف‌ها از کیت سنتز cDNA miRNA Easy Script™ (شرکت Qiagen، آلمان) ساخته شد. miRNA الگو، بایستی حاوی انتهای پلی A برای جفت شدن آدپتور الیگو (dT یا deoxythymine) باشد. بنا بر این، کیت واکنش پلی A به منظور به دست آوردن نمونه‌ی miRNA با پلی A افزودن حداقل ۱۵۰ نوکلئوتید به انتهای miRNA 3' استفاده شد (شرکت Ambion). ۲۰  $\mu$ l مخلوط واکنش



شکل ۱. به ترتیب از چپ به راست، پاساژ ۲- پاساژ ۱۶-۱۲ روز بعد از پاساژ ۱۲- مرحله‌ی Immortality



شکل ۲. میزان بیان mir-130a (a) و mir-21 (b) در

در (ADSCs) Adipose-derived mesenchymal stem cells دو مرحله‌ی Primary و Immortality در دو شرایط هیپوکسی و طبیعی (مرحله‌ی Primary در شرایط هیپوکسی به عنوان شاهد در نظر گرفته شده است).

### بحث

در این مطالعه، بیان miRNAهای مرتبط با شرایط هیپوکسی در سلول‌های بنیادی جدا شده از بافت چربی موش، مورد بررسی قرار گرفت. بیان miRNAها در دو مرحله‌ی Primary و Immortality در شرایط هیپوکسی و طبیعی، اندازه‌گیری و مقایسه شد. نتایج نشان داد که بیان mir-130a و mir-21 در مرحله‌ی Primary بیشتر بود و در شرایط هیپوکسی، به طور معنی‌داری افزایش پیدا کرد. شرایط آزمایشگاهی معمولی برای کشت سلول‌های بنیادی با غلظت اکسیژن ۲۰ درصد بود، در صورتی که غلظت اکسیژن در

برای CD73، CD90 و CD105 و بیان کم و ضعیف برای CD24، CXCR4 و CD146 در فاز Primary را نشان داد. نتایج FACS نشان داد که ADSCs موش در مرحله‌ی Immortality مقادیر متفاوتی از نشانگرهای سطحی را بیان کردند. این سلول‌ها CD90 و CD105 را بیان نکردند. همچنین، بیان CD73 بسیار کاهش یافت، در حالی که بیان CXCR4 افزایش یافت. (جدول ۱).

جدول ۱. داده‌های مربوط به ایمونوفلوئورسین سلول‌های بنیادی مزانشیمی جدا شده از بافت چربی موش در دو مرحله‌ی Primary و Immortality

مرحله‌ی Primary (درصد)	مرحله‌ی Immortality (درصد)	نشانگرها
۶/۱۲	۲/۸۶	CD11
۲۷/۳۴	۲۴/۵۷	CD24
۱۴/۶۷	۱/۹۶	CD34
۲/۱۲	۱/۹۰	CD45
۶۸/۴۴	۲۱/۸۳	CD73
۷۳/۵۷	۰	CD90
۸۱/۸۱	۰	CD105
۱۶/۸۲	۲/۳۵	CD146
۷/۵۲	۲۳/۱۵	CXCR4

بررسی بیان mir-130a و mir-21 در دو مرحله‌ی Primary و

### Immortality در شرایط هیپوکسی

بیان miRNAهای موجود ADSCs پاساژ ششم در دو مرحله‌ی Primary و Immortality در شرایط هیپوکسی و طبیعی به روش Real-time PCR مقایسه و بررسی شد. بیان mir-21 در مرحله‌ی Primary حدود دو برابر مرحله‌ی Immortality بود و همچنین، بیان این miRNA در شرایط هیپوکسی در هر دو مرحله افزایش یافت ( $P < 0/050$ ). بیان mir-130a نیز در مرحله‌ی Primary در شرایط هیپوکسی در مقایسه با شرایط طبیعی افزایش قابل ملاحظه‌ای را نشان داد ( $P < 0/001$ ) (شکل ۲).

کمبرد اکسیژن می‌باشد. در حقیقت، افزایش بیان mir-21 سلول‌ها را در مقابل آپوپتوز محافظت می‌کند (۳۱).

در این مطالعه، علاوه بر بررسی بیان mir-21 و mir-130a در شرایط هیپوکسی و طبیعی، برای اولین بار، میزان بیان آن‌ها در دو مرحله Primary و Immortality نیز اندازه‌گیری شد. در این مطالعه، نشان داده شد که بیان mir-21 و mir-130a در مرحله Primary بیشتر از مرحله Immortality می‌باشد و در این مرحله، بیشتر تحت تأثیر شرایط هیپوکسی بوده است. بر اساس مطالعه‌ی احمدیگی و همکاران، سلول‌های بنیادی در این مرحله، بیشتر دچار اختلالات کروموزومی می‌شوند و طبق مطالعات *in vivo* و *in vitro* مشخص شد که این سلول‌ها تومورزا نیستند (۳۲). این نتایج تا حدودی می‌تواند با نتایج مطالعه‌ی حاضر مبنی بر این که بیان این miRNAها در بقای سلول در شرایط هیپوکسی نقش دارند همسو باشد. در ضمن، در این مطالعه بیان نشانگرهای سطحی در دو مرحله مورد ارزیابی قرار گرفت و همانند نتایج مطالعه احمدیگی و همکاران مشخص شد که بیان این نشانگرها در دو مرحله Primary و Immortality متفاوت است.

در نهایت با توجه به مطالعه‌ی انجام شده، از آن جایی که اکسیژن نقش مهمی در تمایز و تکثیر این سلول‌ها دارد و با در نظر گرفتن این قضیه که در شرایط *In vivo* سلول‌های بنیادی در شرایط کمبود اکسیژن قرار دارند، القای بیان mir-21 و mir-130a در این شرایط به بقا و حفاظت این سلول‌ها در مقابل آپوپتوز کمک می‌کند.

### تشکر و قدردانی

این طرح به شماره‌ی ۲۹۰۰۸۲ در مرکز تحقیقات فیزیولوژی کاربردی معاونت تحقیقات و فن‌آوری دانشگاه علوم پزشکی اصفهان تصویب گردید.

محیطی که سلول‌های بنیادی استقرار دارند، در حدود ۹-۲ درصد است. قابل توجه است که اکسیژن نقش مهمی در سرنوشت سلول بنیادی از نظر تکثیر و تمایز دارد و این کار را با تنظیم بیان ژن‌های مختلفی که تحت تأثیر عامل Hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1) قرار دارند، اعمال می‌کند (۲۵).

گزارش‌های مختلفی در مورد نقش هیپوکسی در سلول‌های بنیادی وجود دارد و از جنبه‌های مختلفی مورد بررسی قرار گرفته است (۲۶-۲۷). چندین مطالعه نیز در رابطه با نقش miRNAها به عنوان عوامل تنظیمی هیپوکسی در سلول‌های بنیادی انجام شده است. افزایش یا کاهش بیان این miRNAها، به پایداری سلول در شرایط هیپوکسی کمک می‌کند. به عنوان مثال، در مطالعه‌ی Xing و همکاران، بیان miRNA-378 در شرایط هیپوکسی در سلول‌های بنیادی القا می‌شود و میزان بقا و رگ‌زایی را افزایش می‌دهد (۲۸). مطالعه دیگری نشان داد که در شرایط هیپوکسی، علاوه بر فعالیت HIF1، مسیرهای انتقال پیام دیگری هم برای سازگاری بافت توموری فعالیت می‌کنند، به عنوان مثال، کمبود اکسیژن باعث القای mir-21 از طریق مسیر وابسته به V-Akt murine thymoma viral oncogene homolog 2 (AKT2) می‌شود (۲۹).

مطالعه‌ی دیگری بر روی mir-130a نشان داد که میزان این miRNA همانند مطالعه‌ی حاضر در سلول‌های توموری هنگام هیپوکسی افزایش می‌یابد و همچنین mir-130a در شرایط هیپوکسی باعث افزایش بیان HIF-1a می‌شود (۳۰).

مطالعه‌ی مشابه دیگری، با بررسی میزان بیان چندین miRNA در شرایط هیپوکسی در سلول‌های بنیادی، نشان داد که میزان بیان mir-21 در شرایط هیپوکسی افزایش می‌یابد. همچنین، افزایش بیان mir-21 در جهت افزایش بقا و پایداری سلول‌های بنیادی در شرایط

### References

- van Damme A, Vanden Driessche T, Collen D, Chuah MK. Bone marrow stromal cells as targets for gene therapy. *Curr Gene Ther* 2002; 2(2): 195-209.
- Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, Jakoniuk I, Anderson SM, Li B, et al. Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium. *Nature* 2001; 410(6829): 701-5.
- Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 1999; 284(5411): 143-7.
- Studeny M, Marini FC, Dembinski JL, Zompetta C, Cabreira-Hansen M, Bekele BN, et al. Mesenchymal stem cells: potential precursors for tumor stroma and targeted-delivery vehicles for anticancer agents. *J Natl Cancer Inst* 2004; 96(21): 1593-603.
- le Blanc K, Rasmusson I, Sundberg B, Gotherstrom C, Hassan M, Uzunel M, et al. Treatment of severe acute graft-versus-host disease with third party haploidentical mesenchymal stem cells. *Lancet* 2004; 363(9419): 1439-41.
- Young HE, Steele TA, Bray RA, Hudson J, Floyd JA, Hawkins K, et al. Human reserve pluripotent mesenchymal stem cells are present in the connective tissues of skeletal muscle and dermis derived from fetal, adult, and geriatric donors. *Anat Rec* 2001; 264(1): 51-62.
- Ferrari G, Cusella-De AG, Coletta M, Paolucci E, Stornaiuolo A, Cossu G, et al. Muscle regeneration by bone marrow-derived myogenic progenitors. *Science* 1998; 279(5356): 1528-30.
- Jones EA, Kinsey SE, English A, Jones RA,

- Straszynski L, Meredith DM, et al. Isolation and characterization of bone marrow multipotential mesenchymal progenitor cells. *Arthritis Rheum* 2002; 46(12): 3349-60.
9. de Bari C, Dell'Accio F, Vandenabeele F, Vermeesch J, Raymackers J, Luyten FP. Skeletal muscle repair by adult human mesenchymal stem cells from synovial membrane. *J Cell Biol* 2003; 160(6): 909-18.
  10. Lin G, Garcia M, Ning H, Banie L, Guo YL, Lue TF, et al. Defining stem and progenitor cells within adipose tissue. *Stem Cells Dev* 2008; 17(6): 1053-63.
  11. Locke M, Feisst V, Dunbar PR. Concise review: human adipose-derived stem cells: separating promise from clinical need. *Stem Cells* 2011; 29(3): 404-11.
  12. Rebelatto CK, Aguiar AM, Moretao MP, Senegaglia AC, Hansen P, Barchiki F, et al. Dissimilar differentiation of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, and adipose tissue. *Exp Biol Med* (Maywood) 2008; 233(7): 901-13.
  13. Li K, Han Q, Yan X, Liao L, Zhao RC. Not a process of simple vicariousness, the differentiation of human adipose-derived mesenchymal stem cells to renal tubular epithelial cells plays an important role in acute kidney injury repairing. *Stem Cells Dev* 2010; 19(8): 1267-75.
  14. Banas A, Teratani T, Yamamoto Y, Tokuhara M, Takeshita F, Osaki M, et al. Rapid hepatic fate specification of adipose-derived stem cells and their therapeutic potential for liver failure. *J Gastroenterol Hepatol* 2009; 24(1): 70-7.
  15. Schenke-Layland K, Strem B, Jordan M, de Emedio M, Hedrick M, Roos K, et al. Adipose tissue-derived cells improve cardiac function following myocardial infarction. *J Surg Res* 2009; 153(2): 217-23.
  16. Chen CZ, Li L, Lodish HF, Bartel DP. MicroRNAs modulate hematopoietic lineage differentiation. *Science* 2004; 303(5654): 83-6.
  17. Guo L, Zhao RCH, Wu Y. The role of microRNAs in self-renewal and differentiation of mesenchymal stem cells. *Exp. Hematol* 2011; 39(6): 608-16.
  18. Krol J, Loedige I, Filipowicz W. The widespread regulation of microRNA biogenesis, function and decay. *Nat Rev Genet* 2010; 11(9): 597-610.
  19. Bao B, Ali S, Kong D, Sarkar SH, Wang Z, Banerjee S, et al. Anti-tumor activity of a novel compound-CDF is mediated by regulating miR-21, miR-200, and PTEN in pancreatic cancer. *PLoS One* 2011; 6(3): e17850.
  20. Trohatou O, Zagoura D, Bitsika V, Pappa KI, Antsaklis A, Anagnou NP, et al. Sox2 suppression by miR-21 governs human mesenchymal stem cell properties. *Stem Cells Transl Med* 2014; 3(1): 54-68.
  21. Han M, Liu M, Wang Y, Chen X, Xu J, Sun Y, et al. Antagonism of miR-21 reverses epithelial-mesenchymal transition and cancer stem cell phenotype through AKT/ERK1/2 inactivation by targeting PTEN. *PLoS One* 2012; 7(6): e39520.
  22. Burmistrova OA, Goltsov AY, Abramova LI, Kaleda VG, Orlova VA, Rogaev EI. MicroRNA in schizophrenia: genetic and expression analysis of miR-130b (22q11). *Biochemistry (Mosc)* 2007; 72(5): 578-82.
  23. Lai KW, Koh KX, Loh M, Tada K, Subramaniam MM, Lim XY, et al. MicroRNA-130b regulates the tumour suppressor RUNX3 in gastric cancer. *Eur J Cancer* 2010; 46(8): 1456-63.
  24. Zhu G, Wang Y, Mijiti M, Wang Z, Wu PF, Jiafu D. Upregulation of miR-130b enhances stem cell-like phenotype in glioblastoma by inactivating the Hippo signaling pathway. *Biochem Biophys Res Commun* 2015; 465(2): 194-9.
  25. Das R, Jahr H, van Osch GJ, Farrell E. The role of hypoxia in bone marrow-derived mesenchymal stem cells: considerations for regenerative medicine approaches. *Tissue Eng Part B Rev* 2010; 16(2): 159-68.
  26. Ivanovic Z. Hypoxia or in situ normoxia: The stem cell paradigm. *J Cell Physiol* 2009; 219(2): 271-5.
  27. Yoshida Y, Takahashi K, Okita K, Ichisaka T, Yamanaka S. Hypoxia enhances the generation of induced pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell* 2009; 5(3): 237-41.
  28. Xing Y, Hou J, Guo T, Zheng S, Zhou C, Huang H, et al. microRNA-378 promotes mesenchymal stem cell survival and vascularization under hypoxic-ischemic conditions in vitro. *Stem Cell Res Ther* 2014; 5(6): 130.
  29. Polytaichou C, Iliopoulos D, Hatzia Apostolou M, Kottakis F, Maroulakou I, Struhl K, et al. Akt2 regulates all Akt isoforms and promotes resistance to hypoxia through induction of miR-21 upon oxygen deprivation. *Cancer Res* 2011; 71(13): 4720-31.
  30. Saito K, Kondo E, Matsushita M. MicroRNA 130 family regulates the hypoxia response signal through the P-body protein DDX6. *Nucleic Acids Res* 2011; 39(14): 6086-99.
  31. Nie Y, Han B, Liu X, Yang JJ, Wang F, Cong XF, et al. Identification of microRNAs involved in hypoxia- and serum deprivation-induced apoptosis in mesenchymal stem cells. *Int J Biol Sci* 2011; 7(6): 762-8.
  32. Ahmadbeigi N, Soleimani M, Gheisari Y, Vasei M, Amanpour S, Bagherizadeh I, et al. Dormant phase and multinuclear cells: two key phenomena in early culture of murine bone marrow mesenchymal stem cells. *Stem Cells Dev* 2011; 20(8): 1337-47.

## Effect of Hypoxia on mir-21 and mir-130a Expression in Murine Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells in Primary and Immortality Phases

Shaghayegh Haghjooy-Javanmard<sup>1</sup>, Najmiyeh Pakyari<sup>2</sup>, Laleh Rafiee<sup>3</sup>

### Original Article

#### Abstract

**Background:** The unique properties of mesenchymal stem cells (MSCs) have made them powerful tools in cell therapy and genetic engineering and Murine Mesenchymal stem cells are a suitable model for study in this field. Compared with human mesenchymal stem cells, murine mesenchymal stem cells have different features such as heterogeneity and slow growth rate. Several reports have shown that microRNAs are involved in many cell regulatory processes such as hypoxia. In this study, the effect of hypoxia was investigated on the expression of hypoxia related microRNA in murine mesenchymal stem cells isolated from adipose tissue (AD-MSC).

**Methods:** AD-MSCs were cultured in two hypoxic and normoxic conditions. The expressions of mir-21 and mir-130a in the primary and immortality phase of AD-MSC were evaluated by using Real-time PCR technique. Also, the expression of MSCs surface markers were investigated by flow cytometry in the two mentioned phases.

**Findings:** Our study showed the expression of mir-21 and mir-130a was increased in hypoxic conditions compared to normoxia. Also expressions of surface markers were different in primary and immortality phase.

**Conclusion:** Considering that stem cells are sensitive to environmental oxygen levels, over-expression of mir-21 and mir-130a could promote the survival of MSCs exposed to hypoxia.

**Keywords:** Hypoxia, Murine mesenchymal stem cells isolated from adipose tissue (AD-MSC), mir-21, mir-130a

**Citation:** Haghjooy-Javanmard Sh, Pakyari N, Rafiee L. **Effect of Hypoxia on mir-21 and mir-130a Expression in Murine Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells in Primary and Immortality Phases.** J Isfahan Med Sch 2016; 34(369): 28-34

1- Associate Professor, Applied Physiology Research Center AND Department of Physiology, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran

2- Department of Biology, School of Sciences, Islamic Azad University, Arsanjan Branch, Arsanjan, Iran

3- PhD student, Applied Physiology Research center, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran

**Corresponding Author:** Laleh Rafiee, Email: rafiee.laleh@gmail.com