DOI: 10.22122/jims.v36i465.9095 Published by Vesnu Publications

مجله دانشکده پزشکی اصفهان سال سی و ششم/شماره‌ی ۴۶۵/هفته‌ی اول فروردین ۱۳۹۷

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۸/۸ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۹/۱۴ تاریخ چاپ: ۱۳۹۷/۱/۱

اثر آدیپوران بر فعالیت کاسپاز ۳، ماتریکس متالوپروتئینازهای ۲، ۹ و آنژیوژنز در سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از مغز استخوان موش صحرایی

سارا ملیح[۱]، مسعود سعیدی جم[۲]، سارا سلیمانی اصل[۳]، رضوان نجفی[۴]

مقاله پژوهشی

چکیده

مقدمه: امروزه استفاده از سلول‌های بنیادی یک گزینه‌ی مناسب جهت درمان بسیاری از بیماری‌ها می‌باشد، اما بقای پایین و تعداد کم سلول‌های بنیادی پیوند شده، مهم‌ترین مانع در سلول‌درمانی می‌باشند. در سال‌های اخیر، پیش تیمار سلول‌های بنیادی با ترکیبات شیمیایی و دارویی، کارایی این سلول‌ها در درمان را افزایش داده است. در این مطالعه، اثر آدیپوران (AdipoRon)، آگونیست گیرنده‌ی آدیپونکتین، بر فعالیت کاسپاز ۳، آنزیم‌های ماتریکس متالوپروتئیناز-۲ (Matrix metalloproteinases-2 یا MMP-2)، MMP-9 و آنژیوژنز در Mesenchymal stem cells (MSCs) مشتق از مغز استخوان موش صحرایی بررسی گردید.

روش‌ها: MSCs با غلظت‌های مختلف آدیپوران به مدت ۲۴ ساعت تیمار گردیدند. بیان ژن‌های عامل رشد اندوتلیال عروقی (Vascular endothelial growth factor یا VEGF)، آنژیوپویتین-۲ (Angiopoietin-2 یا Ang-2) و Ang-4 با استفاده از Real-time polymerase chain reaction (Real-time PCR) اندازه‌گیری گردید. فعالیت آنزیم‌های MMP-2 و MMP-9 با روش زایموگرافی بررسی شد. اندازه‌گیری فعالیت کاسپاز ۳ از طریق آزمون آنزیمی ارزیابی شد.

یافته‌ها: نتایج Real-time PCR نشان داد که آدیپوران بیان VEGF را به طور قابل ملاحظه‌ای نسبت به گروه شاهد افزایش داد، اما تأثیری بر بیان ژن‌های Ang-2 و Ang-4 نداشت. فعالیت MMP-2 و MMP-9 در نمونه‌های تیمار شده با آدیپوران نسبت به نمونه‌ی شاهد افزایش داشت. فعالیت کاسپاز ۳ در سلول‌های تیمار شده با آدیپوران در مقایسه با گروه شاهد کاهش یافت.

نتیجه‌گیری: بر اساس یافته‌های این مطالعه، احتمال می‌رود پیش تیمار MSCs با آدیپوران قبل از پیوند، بتواند بقا و مهاجرت این سلول‌ها را از طریق افزایش بیان VEGF، افزایش فعالیت MMP-2 و MMP-9 و مهار فعالیت آنزیمی کاسپاز ۳ بهبود دهد.

واژگان کلیدی: آدیپوران، سلول‌های بنیادی مزانشیمی، کاسپاز ۳، ماتریکس متالوپروتئینازهای ۲ و ۹، عامل رشد اندوتلیوم عروقی

ارجاع: ملیح سارا، سعیدی جم مسعود، سلیمانی اصل سارا، نجفی رضوان. **اثر آدیپوران بر فعالیت کاسپاز ۳، ماتریکس متالوپروتئینازهای ۲، ۹ و آنژیوژنز در سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از مغز استخوان موش صحرایی.** مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۳۹۷؛ ۳۶ (۴۶۵): ۷-۱

مقدمه

سلول‌های بنیادی، قابلیت خود بازسازی و تمایز به بافت‌های متعدد را دارا می‌باشند. سلول‌های بنیادی مشتق از مزانشیم (Mesenchymal stem cells یا MSCs) را می‌توان به راحتی از مغز استخوان، خون بند ناف، بافت چربی و خون محیطی جدا نمود و تحت شرایط مناسب به رده‌های سلولی مختلفی تمایز داد. به همین دلیل، این سلول‌ها برای ترمیم بافت‌های آسیب دیده مناسب می‌باشند (۱).

پیوند ضعیف و محدود MSCs در بافت‌های آسیب دیده، مهم‌ترین دلیل پایین بودن کارایی این سلول‌ها در درمان می‌باشد (۲). این محدودیت در پیوند، اغلب به دلیل مرگ سلولی ناشی از پاسخ‌های التهابی، کاهش عوامل بقای سلولی، حضور گونه‌های اکسیژن فعال، فعالیت آبشارهای آپوپتوزی، عدم خون‌رسانی و فقدان

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد، مرکز تحقیقات پزشکی مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی همدان، همدان، ایران
۲- استاد، مرکز تحقیقات پزشکی مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی همدان، همدان، ایران
۳- دانشیار، گروه آناتومی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی همدان، همدان، ایران
۴- استادیار، مرکز تحقیقات پزشکی مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی همدان، همدان، ایران
نویسنده‌ی مسؤول: رضوان نجفی
Email: najafi2535@gmail.com

عامل مغذی در بافت آسیب دیده می‌باشد. از این رو، پیش تیمار MSCs با برخی عوامل، می‌تواند بقا و اثربخشی این سلول‌ها در درمان را افزایش دهد (۵-۳). زمانی که سلول‌های بنیادی به داخل بدن انسان و یا حیوان تزریق می‌گردند، به سمت بافت آسیب دیده و ملتهب حرکت می‌کنند. در این جهت‌یابی و حرکت، عوامل متعددی نقش دارند که عبارت از کموکاین‌ها، مولکول‌های چسبندگی، ماتریکس متالوپروتئینازها (Matrix metalloproteinases-2 یا MMP-2) و عوامل مؤثر در رگ زایی می‌باشند (۷-۶).

سلول‌های بنیادی آنزیم‌هایی را ترشح می‌نمایند که برای مهاجرت و رسیدن این سلول‌ها به بافت هدف ضروری می‌باشند که از این دسته، می‌توان به خانواده‌ی MMPs اشاره نمود. این پروتئازها، موجب تجزیه‌ی ماتریکس خارج سلولی می‌شوند و مهاجرت سلول‌ها از بین ماتریکس خارج سلولی را تسهیل می‌کنند. از طرف دیگر، MMP-2 و MMP-9 با تخریب ژلاتین و کلاژن موجود در غشای پایه‌ی عروق و بافت بینابینی، نقش مهمی در فرایند رگ‌زایی دارند (۸).

سلول‌های بنیادی، همچنین از طریق ترشح Vascular endothelial growth factor (VEGF) و آنژیوپویتین رگ‌زایی در بافت هدف را افزایش می‌دهند. VEGF، یک تنظیم کننده‌ی کلیدی رگ‌زایی فیزیولوژیک می‌باشد (۹). مکانیسم عمل آنژیوپویتین ۲ و ۴ (Angiotensin 2/4 یا Ang-2/4) وابسته به حضور VEGF می‌باشد. در حضور VEGF، این دو آنژیوپویتین از طرفی باعث پایداری عروق موجود می‌شوند و از طرف دیگر، موجب حساسیت این عروق به عوامل رگ‌زایی می‌گردند (۱۰).

آدیپوران، یک ریز مولکول صناعی آگونیست گیرنده‌های آدیپونکتین می‌باشد. آدیپوران با تمایل بالایی به هر دو گیرنده‌ی آدیپونکتین (Adiponectin receptor 1 یا Adipo-R1 و Adipo-R2) متصل می‌شود (۱۱).

Adipo-R1 و Adipo-R2، هفت دومین ترانس‌ممبران دارند که قسمت N- ترمینال آن‌ها در داخل سلول و ناحیه‌ی C- ترمینال در خارج از سلول قرار گرفته است. ساختار و عملکرد این دو گیرنده، به طور کامل متفاوت از گیرنده‌های جفت شونده با پروتئین G (GPCR یا G protein–coupled receptors) می‌باشند. اتصال آدیپونکتین به این دو گیرنده، موجب فعال شدن پروتئین کیناز وابسته به AMP (AMPK یا 5' AMP-activated protein kinase)، گیرنده‌های فعال کننده‌ی تکثیر پروکسیزوم‌ها (PPARa یا Peroxisome proliferator-activated receptor)، اکسیداسیون اسیدهای چرب و برداشت گلوکز می‌شود (۱۲).

هدف از انجام این مطالعه، بررسی اثر آدیپوران بر فعالیت آنزیمی کاسپاز ۳، MMP-2، MMP-9 و آنژیوژنزدر سلول‌های بنیادی در شرایط In vitro می‌باشد.

روش‌ها

تیمار دارویی: آدیپوران (Cayman, USA) در Dimethyl sulfoxide (DMSO) حل گردید. با توجه به مطالعه‌ی قبلی (۱۳)، سلول‌ها با غلظت‌های ۵، ۱۵ و ۲۵ میکرومولار آدیپوران به مدت ۲۴ ساعت تیمار گردیدند.

جداسازی MSCs از مغز استخوان موش صحرایی و تعیین نشانگرهای سطحی MSCs: در این مطالعه، مغز استخوان از استخوان درشت نی موش‌های صحرایی نر نژاد Wistar جدا گردید. بعد از سانتریفیوژ کردن سوسپانسیون سلولی، رسوب سلولی در داخل فلاسک ۲۵ سانتی‌متر مربع که حاوی ۵ میلی‌لیتر محیط کشت (Dulbecco's Modified Eagle Medium یا DMEM)، ۱۵ درصد سرم جنین گاوی (Fetal bovine serum یا FBS) و ۱ درصد پنی‌سیلین- استرپتومایسین منتقل گردید و سپس، فلاسک در داخل انکوباتور ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد حاوی CO_2 ۵ درصد قرار گرفت. بعد از گذشت ۴۸ ساعت، سلول‌هایی که به کف فلاسک نچسبیده بودند، از فلاسک خارج گردید و محیط کشت نیز هر ۳-۲ روز یک بار تعویض گردید. همه‌ی آزمایش‌ها، بر روی سلول‌هایی با پاساژ ۵-۳ انجام شد. سپس، MSCs از نظر وجود CD34، CD44، CD45، CD73 و CD90 با استفاده از دستگاه فلوسایتومتری بررسی گردیدند. داده‌های حاصل، با استفاده از نرم‌افزار CellQuest آنالیز گردید.

Real-time PCR (Real-time polymerase chain reaction):

RNA تام MSCs تیمار شده با آدیپوران و گروه شاهد تیمار نشده، با استفاده از محلول RNX-Plus استخراج گردید. بعد از اطمینان از سالم بودن RNA، با استفاده از کیت فرمنتاز از RNA استخراج شده complementary DNA (cDNA) تهیه شد. میزان بیان با استفاده از Master mix سایبر گرین بررسی گردید. پرایمرهای اختصاصی هر ژن به کمک نرم‌افزار Allele ID7.6 طراحی گردید و در نهایت، در پایگاه National Center for Biotechnology Information (NCBI) پرایمر بلاست صورت گرفت (جدول ۱). برای تأیید نهایی محصولات PCR از روش الکتروفورز بر روی ژل آگارز استفاده شد و از صحت قطعه‌ی تکثیر شده اطمینان نسبی حاصل شد. زمان و دماهای واکنش Real-time PCR به صورت دناتوراسیون (Denaturation) اولیه ۳۰ ثانیه در ۹۵ درجه‌ی سانتی‌گراد و سپس، ۴۰ چرخه‌ی دناتوراسیون به مدت ۱۵ ثانیه در دمای ۹۵ درجه‌ی سانتی‌گراد، اتصال ۳۰ ثانیه در دمای ۶۰ درجه‌ی سانتی‌گراد و طویل‌سازی ۳۰ ثانیه در دمای ۷۲ درجه‌ی سانتی‌گراد انجام گرفت. طبیعی‌سازی داده‌ها با استفاده از ژن رفرنس 18S ribosomal RNA (18srRNA) انجام شد.

جدول ۱. مشخصات پرایمرهای مورد استفاده در واکنش Real-time polymerase chain reaction (Real-time PCR)

ژن	رشته‌ی رمز (Sense strand)	رشته‌ی پادرمز (Antisense strand)	کد دسترسی (Accession number)	اندازه‌ی محصول
Ang-2	CAGTTCGTTCCGTCTTGTG	CCGTATAGTAATAGTGTCCAGCCATT	NM_134454	102bp
Ang-4	TCCATCCAGTATGAGAAC	GCAGTTATCATTGTCCAT	NM_001106526	150bp
VEGF	GTGTGTGTGTGTATGAAATCTGTG	GCAGAGCTGAGTGTTAGCAA	NM_001287107	107bp
18srRNA	GTAACCCGTTGAACCCCATT	CCATCCAATCGGTAGTAGCG	NR-046237	151bp

در انتها، از روش Relative quantification برای آنالیز داده‌ها استفاده شد. میزان بیان ژن‌ها در گروه‌های مورد مطالعه به صورت Fold change و از رابطه‌ی $2^{-\Delta\Delta CT}$ به دست آمد.

اندازه‌گیری میزان فعالیت آنزیم‌های MMP-2 و MMP-9 به وسیله‌ی زایموگرافی: پس از تیمار سلول‌ها با آدیپوران، محلول رویی سلول‌ها جمع‌آوری گردید. مقادیر مساوی از پروتئین‌ها بر روی ژل پلی‌اکریلامید ۱۰ درصد حاوی ۱ میلی‌گرم/میلی‌لیتر ژلاتین Load گردید و به مدت ۳-۲ ساعت با ولتاژ ۱۲۰ ولت Run شد. سپس، ژل به مدت ۲ ساعت در بافر تریتون X-۱۰۰ ۲/۵ درصد Renature گردید و سپس، به مدت ۷۲ ساعت در داخل بافر زایموگرافی قرار گرفت. در مرحله‌ی آخر، ژل با استفاده از Coomassie Blue رنگ‌آمیزی و سپس، رنگ‌بری شد. تراکم باندها با استفاده از نرم‌افزار NIH Image J تحلیل گردید.

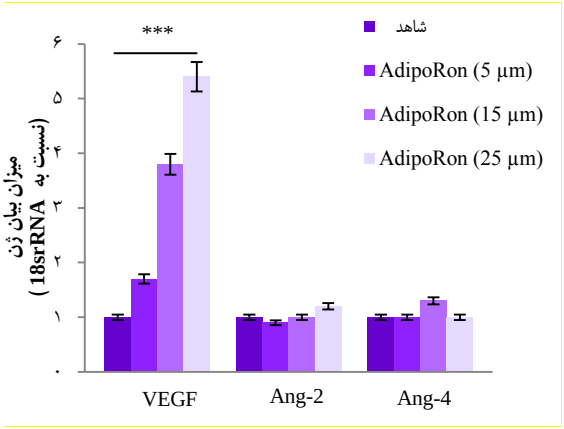
بررسی فعالیت کاسپاز ۳: جهت بررسی فعالیت کاسپاز ۳ از کیت شرکت Abcam استفاده گردید. سلول‌های لیز شده با بافر واکنش ۲X حاوی Dithiothreitol (DTT) ۱۰ میلی‌مولار و ۵ میکرولیتر از سوبسترای ۴ میلی‌مولار کاسپاز ۳، به مدت ۲-۱ ساعت در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد انکوبه گردیدند. جذب نوری Peptide nucleic acid (pNA) در طول موج ۴۰۰ نانومتر خوانده شد.

واکاوی آماری: اطلاعات با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه‌ی ۱۶ (version 16, SPSS Inc., Chicago, IL) مورد بررسی قرار گرفت. متغیرهای کمی به صورت میانگین ± انحراف میانگین بیان شده‌اند. کلیه‌ی تفاوت‌ها بین دو گروه با استفاده از آزمون‌های t و One-way ANOVA و با در نظر گرفتن P < ۰/۰۵۰ به عنوان سطح معنی‌داری مورد مقایسه قرار گرفتند.

یافته‌ها

بررسی نشانگرهای سطحی MSCs: نشانگرهای سطحی MSCs به وسیله‌ی فلوسایتومتری بررسی گردید. نتایج نشان دادند که CD44، CD73 و CD90 بر سطح MSCs بیان شدند، اما این سلول‌ها قادر به بیان CD34 و CD45 نبودند.

تأثیر آدیپوران بر بیان ژن‌های VEGF، Ang-2 و Ang-4: بیان ژن VEGF در سلول‌های تیمار شده با آدیپوران، به طور قابل ملاحظه‌ای نسبت به گروه شاهد افزایش داشت؛ در حالی که آدیپوران بر بیان ژن‌های Ang-2 و Ang-4 تأثیری نداشت (شکل ۱).



شکل ۱. اندازه‌گیری بیان Messenger RNA (mRNA) مربوط به ژن‌های Vascular endothelial growth factor (VEGF)، آنژیوپویتین-۲ و ۴ (Ang-2 و Ang-4) با استفاده از Real-time polymerase chain reaction (Real-time PCR)

تیمار Mesenchymal stem cells (MSCs) به مدت ۲۴ ساعت با غلظت‌های مختلف آدیپوران تأثیری بر بیان ژن‌های Ang-2 و Ang-4 نداشت.

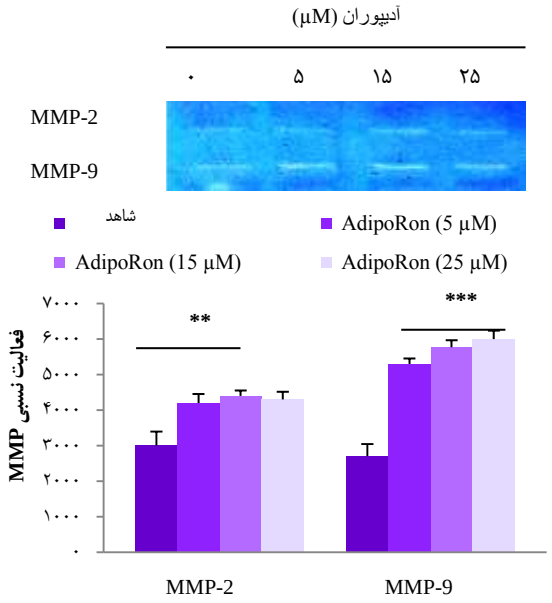
$P^{***} < ۰/۰۰۱$ در مقایسه با گروه شاهد (n = ۲).

تأثیر آدیپوران بر فعالیت آنزیم‌های MMP-2 و MMP-9: بررسی دانسیتومتریک مربوط به نواحی هیدرولیز شده، افزایش قابل ملاحظه‌ای در فعالیت زایموگرافیک MMP-2/9 در MSCs تیمار شده با آدیپوران در مقایسه با گروه شاهد نشان داد (شکل ۲).

تأثیر آدیپوران بر فعالیت کاسپاز ۳: تیمار MSCs با غلظت‌های ۱۵ و ۲۵ میکرومولار آدیپوران، میزان فعالیت کاسپاز ۳ را نسبت به گروه شاهد کاهش می‌دهد (شکل ۳).

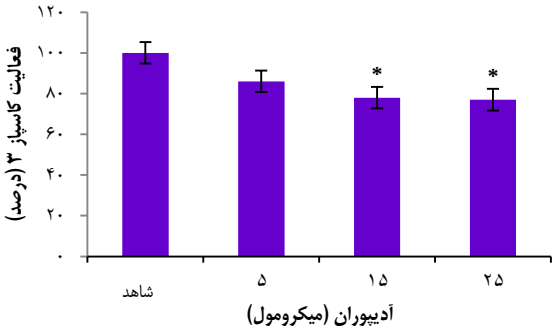
بحث

پیش درمان‌های دارویی، یک روش مفید و کارآمد برای بهبود عملکرد بافت و سلول‌ها به ویژه سلول‌های بنیادی می‌باشد. سلول‌های پیش یمار شده، بقای بهتر، تأثیر پاراکرینی کارآمدتر، تمایز و مهاجرت بیشتری از خود بروز می‌دهند (۵).



شکل ۲. بررسی فعالیت Matrix metalloproteinases-2 (MMP-2) و MMP-9 به روش زایموگرافی
تیمار Mesenchymal stem cells (MSCs) با غلظت‌های مختلف آدیپوران منجر به افزایش معنی‌دار فعالیت پروتئولیتیکی MMP-2/9 در غلظت‌های ۵، ۱۵ و ۲۵ میکرومولار در مقایسه با گروه شاهد گردید. $P^{***} < ۰/۰۰۱$، $P^{**} < ۰/۰۱۰$ در مقایسه با گروه شاهد

مطالعه‌ی قبلی پژوهشگران نشان داد که پیش تیمار MSCs با آدیپوران با واسطه‌ی القای Cyclooxygenase-2 (COX-2)، Prostaglandin E2 (PGE2) و تثبیت Hypoxia-inducible factor 1-alpha (HIF-1α)، موجب افزایش بقا، تکثیر و مهاجرت MSCs می‌گردد (۱۳).



شکل ۳. اندازه‌گیری فعالیت کاسپاز ۳ در Mesenchymal stem cells (MSCs) تیمار شده با آدیپوران
آدیپوران در غلظت‌های ۱۵ و ۲۵ میکرومول فعالیت آنزیم کاسپاز ۳ را در سلول کاهش داد. غلظت ۵ میکرومول از آدیپوران، تأثیری بر فعالیت کاسپاز ۳ نداشت. $P^{*} < ۰/۰۵۰$ در مقایسه با گروه شاهد (n = ۳).

از این رو، در مطالعه‌ی فعلی به منظور ارایه‌ی اطلاعات بیشتر در تقویت یافته‌های مطالعه‌ی پیش‌گفته، ابتدا MSCs با دزهای متفاوت آدیپوران تیمار شدند و بعد از گذشت ۲۴ ساعت، میزان بیان عوامل آنژیوژنیک (VEGF، Ang-4 و Ang-2) و فعالیت آنزیم‌های ژلاتیناز (MMP-9 و MMP-2) بررسی گردید. همچنین، در این مطالعه فعالیت آنزیم کاسپاز ۳ مورد بررسی قرار گرفت.

در این مطالعه، آدیپوران فعالیت MMP-2 و MMP-9 را افزایش داد. افزایش فعالیت پروتئولیتیکی آنزیم‌هایی مانند MMP-2 و MMP-9 برای مهاجرت و لانه‌گزینی سلول ضروری می‌باشد؛ چرا که این آنزیم‌ها از طریق تجزیه‌ی ماتریکس خارج سلولی موجب تسهیل عبور سلول‌ها از ماتریکس و رسیدن آن‌ها به بافت هدف می‌گردند. یافته‌های اخیر، نشان داد که HIF-1α مهاجرت Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells (BM-MSCs) را از طریق فعالیت افزایش یافته‌ی MMP، به خصوص MMP-2 تنظیم می‌کند (۱۵-۱۴). علاوه بر این، نشان داده شد که آدیپونکتین می‌تواند مهاجرت سلولی را از طریق فعال‌سازی محور سیگنالینگ APPL1-AMPK افزایش دهد که تا حدودی به Membrane type 1 metalloprotease (MT1-MMP) و MMP2 وابسته است (۱۶). آدیپونکتین کروی (Globular adiponectin یا gAd) به طور قابل توجهی سبب افزایش فعالیت MMP-2 و MMP-9 در سلول‌های Human microvascular endothelial cell (HMEC-1) (سلول‌های اندوتلیال مویرگی انسان) می‌گردد. این اثرات gAd از طریق پیش تیمار سلول‌های HMEC-1 با آنتی‌بادی AdipoR1 و یا AdipoR2 مهار شد (۱۷). ترانسفکشن (Transfection) با آدیپونکتین، سطح بیان MMP-1, 2, 9 و 14 را در سلول‌های A549 (سلول سرطان ریه‌ی انسانی) افزایش می‌دهد (۱۸).

بررسی مکانیسم‌های درگیر در رگ‌زایی، نشان داد که آدیپوران باعث افزایش بیان ژن VEGF می‌شود، اما Ang-2 و Ang-4 افزایش معنی‌داری را در MSCs تیمار شده در مقایسه با گروه شاهد نشان ندادند.

رگ‌زایی نقش مهمی را در رخدادهای فیزیولوژیک و پاتولوژیک بر عهده دارد. VEGF به عنوان کلید اصلی رگ‌زایی، می‌تواند باعث تکثیر، تمایز و مهاجرت سلولی گردد. gAd به طور چشم‌گیری میزان بیان VEGF mRNA را در سلول‌های HMEC-1 افزایش داد. همچنین، رگ‌زایی اندوتلیال القا شده توسط gAd شامل مسیر AMPK نیز می‌باشد (۱۷). در مطالعه‌ی Lee و همکاران، آدیپونکتین بیان VEGF-A را ازس طریق مکانیسم‌های متعدد در سلول‌های کندرو سارکومای انسانی افزایش می‌دهد (۱۹). آدیپونکتین، سبب تحریک تمایز Human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) به ساختارهای مویرگ مانند در شرایط آزمایشگاهی می‌شود

و به عنوان یک جاذب شیمیایی در مهاجرت عمل می‌کند (۲۰).

آنژیوپویتین‌ها، لیگاند گیرنده‌ی تیروزین کیناز Tie2 می‌باشند و تأثیر Ang-2 در آنژیوژنز به حضور VEGF بستگی دارد (۲۱). در حضور Ang-2، VEGF قادر به حفظ رگ‌های موجود و واکنش‌پذیرتر کردن آن‌ها به محرک‌های آنژیوژنیک می‌شود. Ang-4، مهاجرت و رگزایی سلول‌های اندوتلیال را تحریک می‌کند (۱۰).

در حضور VEGF، Ang-2 عروق موجود را ناپایدار می‌کند و در نتیجه، باعث می‌شود تا بیشتر به محرک‌های رگزایی پاسخگو باشد و در واقع، در ارتباط با نورگزایی است که با افزایش طول رگ مشخص می‌شود. بنابراین، هنگامی که با VEGF همراه شوند، هر دو Ang-1 و Ang-2 قادر به افزایش رگزایی هستند (۲۲). Ang-4، مشابه با Ang-1، به عنوان آگونیست به Tie-2 متصل می‌شود (۴). Ang-4 مهاجرت سلول‌های اندوتلیال و Tube formation را تحریک می‌کند (۲۳).

بر اساس مطالعه‌ی قبلی، آدیپوران تکثیر MSCs را افزایش داد. در مطالعه‌ی حاضر، آدیپوران موجب کاهش چشم‌گیر فعالیت کاسپاز ۳ در MSCs گردید. فعال‌سازی کاسپاز ۳، به عنوان یک نشانگر مشترک آپوپتوز شناخته شده است. آدیپونکتین فیبروبلاست قلبی را از طریق یک مکانیسم وابسته به AMPK از آپوپتوز محافظت می‌کند. تحریک آدیپونکتین، آپوپتوز سلول‌های اندوتلیال را از طریق یک مکانیسم وابسته به AMPK مهار می‌کند (۲۴). به تازگی، نشان داده شده است که آدیپوران آپوپتوز پس از ایسکمی میوکارد را از طریق هر دو مسیر وابسته به AMPK و مستقل AMPK کاهش می‌دهد و مانع از فعال‌سازی کاسپاز ۳ در سلول‌های قلبی می‌شود که همسو با یافته‌های مطالعه‌ی حاضر می‌باشد (۲۵).

نتیجه‌گیری نهایی این که تیمار سلول‌های بنیادی با آدیپوران منجر به افزایش بیان VEGF، افزایش فعالیت هیدرولیتیکی آنزیم‌های ماتریکس متالوپروتئیناز‌های MMP-2 و MMP-9 و کاهش فعالیت کاسپاز ۳ می‌گردد. بنابراین، انجام مطالعات تکمیلی به منظور بررسی اثر آدیپوران بر مهاجرت و رگزایی سلول‌های بنیادی در شرایط In vivo توصیه می‌گردد.

تشکر و قدردانی

این مقاله از نتایج طرح تحقیقاتی مصوب شورای پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی همدان با شماره‌ی ۹۳۰۹۱۸۴۵۳۵ استخراج شده است. بدین وسیله از تمامی افرادی که در اجرای این مطالعه همکاری داشتند، سپاسگزاری می‌گردد.

References

1. Pourjafar M, Saidijam M, Mansouri K, Ghasemibasir H, Karimi DF, Najafi R. All-trans retinoic acid preconditioning enhances proliferation, angiogenesis and migration of mesenchymal stem cell in vitro and enhances wound repair in vivo. Cell Prolif 2017; 50(1).
2. Najafi R, Sharifi AM. Deferoxamine preconditioning potentiates mesenchymal stem cell homing in vitro and in streptozotocin-diabetic rats. Expert Opin Biol Ther 2013; 13(7): 959-72.
3. Esfahani M, Karimi F, Afshar S, Niknazar S, Sohrabi S, Najafi R. Prolyl hydroxylase inhibitors act as agents to enhance the efficiency of cell therapy. Expert Opin Biol Ther 2015; 15(12): 1739-55.
4. Herberts CA, Kwa MS, Hermsen HP. Risk factors in the development of stem cell therapy. J Transl Med 2011; 9: 29.
5. Srijaya TC, Ramasamy TS, Kasim NH. Advancing stem cell therapy from bench to bedside: lessons from drug therapies. J Transl Med 2014; 12: 243.
6. Ren G, Chen X, Dong F, Li W, Ren X, Zhang Y, et al. Concise review: Mesenchymal stem cells and translational medicine: emerging issues. Stem Cells Transl Med 2012; 1(1): 51-8.
7. Bruno S, Collino F, Tetta C, Camussi G. Dissecting paracrine effectors for mesenchymal stem cells. Adv Biochem Eng Biotechnol 2013; 129: 137-52.
8. Rundhaug JE. Matrix metalloproteinases and angiogenesis. J Cell Mol Med 2005; 9(2): 267-85.
9. Leeper NJ, Hunter AL, Cooke JP. Stem cell therapy for vascular regeneration: adult, embryonic, and induced pluripotent stem cells. Circulation 2010; 122(5): 517-26.
10. Yamakawa M, Liu LX, Belanger AJ, Date T, Kuriyama T, Goldberg MA, et al. Expression of angiopoietins in renal epithelial and clear cell carcinoma cells: regulation by hypoxia and participation in angiogenesis. Am J Physiol Renal Physiol 2004; 287(4): F649-F657.
11. Okada-Iwabu M, Yamauchi T, Iwabu M, Honma T, Hamagami K, Matsuda K, et al. A small-molecule AdipoR agonist for type 2 diabetes and short life in obesity. Nature 2013; 503(7477): 493-9.
12. Guillod-Maximin E, Roy AF, Vacher CM, Aubourg A, Bailleux V, Lorsignol A, et al. Adiponectin receptors are expressed in hypothalamus and colocalized with proopiomelanocortin and neuropeptide Y in rodent arcuate neurons. J Endocrinol 2009; 200(1): 93-105.
13. Malih S, Saidijam M, Mansouri K, Pourjafar M, Tafakh MS, Talebzadeh F, et al. Promigratory and proangiogenic effects of AdipoRon on bone marrow-derived mesenchymal stem cells: An in vitro study. Biotechnol Lett 2017; 39(1): 39-44.
14. Wislet-Gendebien S, Laudet E, Neirinckx V, Rogister B. Adult bone marrow: which stem cells for cellular therapy protocols in neurodegenerative disorders? J Biomed Biotechnol 2012; 2012: 601560.

15. Barry FP, Murphy JM. Mesenchymal stem cells: clinical applications and biological characterization. Int J Biochem Cell Biol 2004; 36(4): 568-84.
16. Dadson K, Chasiotis H, Wannaiampikul S, Tungtrongchitr R, Xu A, Sweeney G. Adiponectin mediated APPL1-AMPK signaling induces cell migration, MMP activation, and collagen remodeling in cardiac fibroblasts. J Cell Biochem 2014; 115(4): 785-93.
17. Adya R, Tan BK, Chen J, Randeva HS. Protective actions of globular and full-length adiponectin on human endothelial cells: Novel insights into adiponectin-induced angiogenesis. J Vasc Res 2012; 49(6): 534-43.
18. Tsai JR, Liu PL, Chen YH, Chou SH, Cheng YJ, Hwang JJ, et al. Curcumin Inhibits Non-Small Cell Lung Cancer Cells Metastasis through the Adiponectin/NF-kappab/MMPs Signaling Pathway. PLoS One 2015; 10(12): e0144462.
19. Lee HP, Lin CY, Shih JS, Fong YC, Wang SW, Li TM, et al. Adiponectin promotes VEGF-A-dependent angiogenesis in human chondrosarcoma through PI3K, Akt, mTOR, and HIF-alpha pathway. Oncotarget 2015; 6(34): 36746-61.
20. Ouchi N, Kobayashi H, Kihara S, Kumada M, Sato K, Inoue T, et al. Adiponectin stimulates angiogenesis by promoting cross-talk between AMP-activated protein kinase and Akt signaling in endothelial cells. J Biol Chem 2004; 279(2): 1304-9.
21. Jones N, Iljin K, Dumont DJ, Alitalo K. Tie receptors: new modulators of angiogenic and lymphangiogenic responses. Nat Rev Mol Cell Biol 2001; 2(4): 257-67.
22. Marina Garcia J, Goldenthal MJ, Moe GW. Aging and the heart: A post-genomic view. New York, NY: Springer; 2007.
23. Karp JM, Leng Teo GS. Mesenchymal stem cell homing: the devil is in the details. Cell Stem Cell 2009; 4(3): 206-16.
24. Shibata R, Sato K, Pimentel DR, Takemura Y, Kihara S, Ohashi K, et al. Adiponectin protects against myocardial ischemia-reperfusion injury through AMPK- and COX-2-dependent mechanisms. Nat Med 2005; 11(10): 1096-103.
25. Zhang Y, Zhao J, Li R, Lau WB, Yuan YX, Liang B, et al. AdipoRon, the first orally active adiponectin receptor activator, attenuates postischemic myocardial apoptosis through both AMPK-mediated and AMPK-independent signalings. Am J Physiol Endocrinol Metab 2015; 309(3): E275-E282.

DOI: 10.22122/jims.v36i465.9095 Published by Vesnu Publications

Journal of Isfahan Medical School **Vol. 36, No. 465, 1st Week, April 2018**

Received: 30.10.2017 Accepted: 05.12.2017 Published: 21.03.2018

The Effect of AdipoRon on the Activity of Caspase 3, Matrix Metalloproteinases 2 and 9, and Angiogenesis in Rat Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cell

Sara Malih[1], Massoud Saidijam[2], Sara Soleimaniasl[3], Rezvan Najafi[4]

Original Article

Abstract

Background: Today, the use of mesenchymal stem cells (MSCs) is an appropriate option for the treatment of many diseases. But, poor viability, and low number of transplanted stem cells are the main obstacles in cell therapy. Recently, stem cell preconditioning with chemical and pharmacological agents has been shown to increase therapeutic efficacy. Herein, we investigated the effect of AdipoRon, adiponectin receptor agonist, on activity of caspase 3, matrix metalloproteinases 2 and 9 (MMP-2 and MMP-9), and angiogenesis in rat bone marrow-derived mesenchymal stem cells.

Methods: Mesenchymal stem cells were treated with different concentrations of AdipoRon for 24 hours. The expression level of vascular endothelial growth factor (VEGF), and angiopoietin 2 and 4 (Ang-2 and Ang-4) were assessed using real-time polymerase chain reaction (real-time PCR). Gelatin zymography assay was applied to investigate the protease activity of matrix metalloproteinase 2 and 9. Measurement of caspase-3 activity was carried out via an enzymatic assay.

Findings: The real-time polymerase chain reaction results indicated that the expression of vascular endothelial growth factor was higher in AdipoRon-treated mesenchymal stem cells compared to control groups when angiopoietin 2 and 4 did not show any significant change. The enzymatic activity of metalloproteinase 2 and 9 was increased in treated samples with AdipoRon compared to control group. The caspase-3 activity was attenuated in AdipoRon-pretreated cells compared to the control group.

Conclusion: Based on these results, it is likely that preconditioning of mesenchymal stem cells with AdipoRon prior to transplantation can enhance the viability and migration via overexpression of vascular endothelial growth factor, activation of metalloproteinase 2 and 9 enzymes, and inhibit the activation of caspase-3.

Keywords: AdipoRon, Mesenchymal stem cell, Caspase 3, Matrix metalloproteinases 2, 9, Vascular endothelial growth factor

Citation: Malih S, Saidijam M, Soleimaniasl S, Najafi R. **The Effect of AdipoRon on the Activity of Caspase 3, Matrix Metalloproteinases 2 and 9, and Angiogenesis in Rat Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cell.** J Isfahan Med Sch 2018; 36(465): 1-7.

1- MSc Student, Research Center for Molecular Medicine, Hamadan University of Medical Sciences, Hamadan, Iran
2- Professor, Research Center for Molecular Medicine, Hamadan University of Medical Sciences, Hamadan, Iran
3- Associate Professor, Department of Anatomy, School of Medicine, Hamadan University of Medical Sciences, Hamadan, Iran
4- Assistant Professor, Research Center for Molecular Medicine, Hamadan University of Medical Sciences, Hamadan, Iran
Corresponding Author: Rezvan Najafi, Email: najafi2535@gmail.com