مجله دانشکده پزشکی اصفهان
سال سی و چهارم/شماره‌ی ۳۶۹/هفته‌ی اول فروردین ماه ۱۳۹۵

تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۸/۳۰
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۴/۱۱/۲۰

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 حق‌جوی جوانمرد[۱]، نجمیه پاکیاری[۲]، لاله رفیعی[۳]

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: حق‌جوی جوانمرد شقایق، پاکیاری 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): ۳۴-۲۸

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، تمایزیابی چندگانه و تروپیسم (Tropism) اختصاصی آن‌ها می‌باشد (۵-۲). MSCs را می‌توان از بافت‌های مختلفی از قبیل ماهیچه، مغز استخوان و بافت آدیپوز (چربی) استخراج کرد (۹-۶). مغز استخوان تا کنون منبع اصلی MSCs بوده است، اما بافت چربی (آدیپوز)، یک منبع مهم دیگر برای MSCs می‌باشد؛ چرا که می‌توان حجم زیادی چربی را بدون درد و با روش غیر تهاجمی جراحی لیپوساکشن به دست آورد (۱۲-۱۰). 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 (۱۵-۱۳).

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
نویسنده‌ی مسؤول: لاله رفیعی
Email: rafiee.laleh@gmail.com

شرایط هیپوکسی می‌تواند بر روی خصوصیات تکثیر و تمایزیابی MSCs از طریق تنظیم کننده‌های اپی‌ژنتیک مانند microRNA (miRNA)ها تأثیر داشته باشد. miRNAها، RNAهای غیر کد کننده‌ی کوچکی شامل ۲۴–۱۸ نوکلئوتید هستند که از یک پیش‌ساز نوکلئوتیدی مشتق شده‌اند (۱۶). miRNAها به عنوان تنظیم کننده‌هایی شناخته شده‌اند که بیان ژن را با مهار ترجمه و یا تخریب 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 Vacuole membrane protein 1 (VMP1) 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 می شود. 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 می‌باشد (۲۱). توالی mir-130 روی کروموزم 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 miRها در زمینه‌ی نقش آن‌ها در سلول‌های بنیادی بسیار محدود می‌باشد.

MSCs جدا شده از موش دارای سه مرحله‌ی مختلف Primary، Dormant 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 miRNAهای مربوط به شرایط هیپوکسی در مراحل Primary و Immortality سلول‌های بنیادی جدا شده از آدیپوز موش مقایسه گردید. برای این منظور، شرایط هیپوکسی در هر دو مرحله اعمال شد و بیان miRNAهای 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 درجه‌ی 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 ۲۵۰۰۰۰ 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 Insuline-Transferin-Selenite (ITS) (شرکت Sigma) تیمار شدند. ۲۱ روز بعد، سلول‌های تمایز یافته با پارافرمالدئید 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 (۱۰۰nM) برای سه هفته کشت داده شدند. سپس، سلول‌ها با پارافرمالدئید ۴ درصد ثابت و با Alzarin Reds برای ۲۰ دقیقه در دمای اتاق رنگ‌آمیزی شدند.

به منظور تمایز غضروف، ۲۵۰۰۰۰ سلول ADSC با شتاب ۱۴۰۰ rpm سانتریفیوژ شدند و در محیط کشتی شامل ۵۰ µg/ml اسید اسکوریک 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 سلول‌ها با پارافرمالدئید 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، FBS ۱۰ درصد 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.

ایمونوفنوتایپینگ

فلوسیتومتری با Fluorescence-activated cell sorting calibur (FACSCalibur) انجام شد. 10^{5}-10^{6} سلول برای هر آنتی‌بادی استفاده گردید. سلول‌ها دو بار با استفاده از PBS شسته شدند و در ml ۱۰۰ سرم گاوی ۳ درصد در دمای $4^{o}C$ با آنتی‌بادی‌های CD73-PE، CD24-PE، CD11b-FITC، CXCR4-PE، CD146-PE، CD105-PE، CD90-PE، CD34-FITC و 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 کیاژن، المان) مطابق دستورالعمل سازنده جدا شد. complementary DNA (cDNA) در مرحله‌ی نسخه‌برداری معکوس (RT یا Reverse transcriptase) از کل نمونه‌های RNA با استفاده از پرایمرهای miRNA اختصاصی و معرف‌ها از کیت سنتز cDNA miRNA Easy ScriptTM (شرکت Qiagene، آلمان) ساخته شد. miRNA الگو، بایستی حاوی انتهای پلی A برای جفت شدن آداپتور الیگو (dT یا deoxythymine) باشد. بنا بر این، کیت واکنش پلی‌A به منظور به دست آوردن نمونه‌ی miRNA با پلی‌A با افزودن حداقل ۱۵۰ نوکلئوتید به انتهای 3’ miRNA استفاده شد (شرکت Ambion). ۲۰ µl مخلوط واکنش Polymerase chain reaction (PCR) شامل ۳ µl محصول Reverse transcriptase، ۱۰ µl مستر میکس 1X Eva Green، ۱ µl پرایمرهای اختصاصی و ۱ µl پرایمرهای یونیورسال معکوس miRNA بود. مخلوط واکنش در دمای $95\ ^{o}C$ برای ۱۰ دقیقه انکوبه شد. آن گاه، ۴۰ چرخه در دمای $95\ ^{o}C$ به مدت ۱۵ ثانیه و در دمای $60\ ^{o}C$ به مدت ۱دقیقه 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 Relative quantification ΔΔCT 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 $P \leq ۰/۰۵۰$ به عنوان سطح معنی‌داری در نظر گرفته شد.

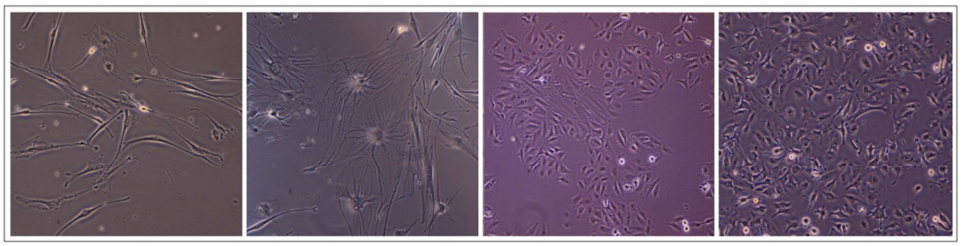
یافته‌ها

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 مرحله‌ی Dormant را شروع کردند و به شکل مسطح و بزرگ ظاهر شدند.

سلول‌های ADSC در مرحله‌ی 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 مرحله‌ی Immortality شدند. در مرحله‌ی 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 نورون را پیدا کردند، ایجاد شدند (شکل ۱).

بیان نشانگرهای سطحی سلول‌های ADSC موش

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



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

برای CD73، CD90 و CD105 و بیان کم و ضعیف برای CD24، CXCR4 و CD146 در فاز Primary را نشان داد.

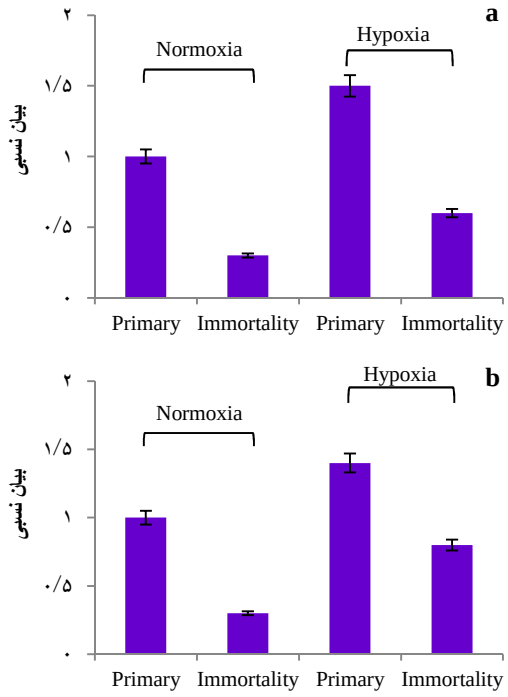
نتایج FACS نشان داد که ADSCs موش در مرحله‌ی Immortality مقادیر متفاوتی از نشانگرهای سطحی را بیان کردند. این سلول‌ها CD90 و CD105 را بیان نکردند. همچنین، بیان CD73 بسیار کاهش یافت، در حالی که بیان CXCR4 افزایش یافت. (جدول ۱).

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

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

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 ($P < ۰/۰۵۰$). بیان mir-130a نیز در مرحله‌ی Primary در شرایط هیپوکسی در مقایسه با شرایط طبیعی افزایش قابل ملاحظه‌ای را نشان داد ($P < ۰/۰۰۱$) (شکل ۲).



شکل ۲. میزان بیان mir-130a (a) و mir-21 (b) در Adipose-derived mesenchymal stem cells (ADSCs) در 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 و 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

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 (۲۷-۲۶). 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 کمبود 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 مرحله‌ی Primary و Immortality نیز اندازه گیری شد. در این مطالعه، نشان داده شد که بیان mir-21 و mir-130a در مرحله‌ی Primary بیشتر از مرحله‌ی Immortality می‌باشد و در این مرحله، بیشتر تحت تأثیر شرایط هیپوکسی بوده است. بر اساس مطالعه‌ی احمدبیگی 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 احمدبیگی و همکاران مشخص شد که بیان این نشانگرها در دو مرحله‌ی 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.

References

1. 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.
2. 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.
3. 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.
4. 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.
5. 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.
6. 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.
7. 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.
8. 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. Polytarchou C, Iliopoulos D, Hatziapostolou 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.

Journal of Isfahan Medical School

Vol. 34, No. 369, 1st Week, April 2016

Received: 21.11.2015

Accepted: 09.02.2016

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[1], Najmiyeh Pakyari[2], Laleh Rafiee[3]

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 S, 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