

بیان ژن PPAR γ در سلول‌های چربی تمایز یافته از سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان انسانی

شادی اسمعیلی^۱، دکتر سعید کاویانی^۲، دکتر مهرداد نوروزی نیا^۳، دکتر امیر آتشی^۴
دکتر مسعود سلیمانی^۲، دکتر سعید آبرون^۲، سید رسول رضوی بابا حیدری^۵
دکتر زهرا ذنوبی^۶، فخرالدین صبا^۱

چکیده

زمینه و هدف: اخیراً، چاقی به عنوان عامل خطر تهدید کننده برای بیماری‌های شناخته شده‌ای از جمله بیماری‌های قلبی - عروقی، دیابت غیر وابسته به انسولین و سرطان‌های شایع به حساب می‌آید. بنابراین درک فرایندهای تمایز ادیپوسیت و بیان ژن‌های دخیل در این روند حیاتی است.

روش بررسی: در این مطالعه، سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان انسانی (H-MSCs) به وسیله شیب غلظتی فایکول جدا شده، مارکرهای سطحی این سلول‌ها به وسیله فلوسیتومتری تایید گردیده و تمایز به چربی و استخوان به وسیله دستورالعمل دگزامتازون انجام گرفت و به وسیله رنگ آمیزی تایید شد. سپس بیان کمی و کیفی ژن PPAR γ به عنوان مهمترین عامل نسخه برداری در تمایز چربی قبل و بعد از تمایز به ادیپوسیت به وسیله RT-PCR و qPCR بررسی و تحلیل آماری به وسیله paired t test و با کمک نرم افزارهای Pfaffle و graph pad انجام شد.

یافته‌ها: بیان این ژن بعد از تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان انسانی به سلول چربی افزایش قابل ملاحظه‌ای را نشان داد ($p < 0.05$).

نتیجه‌گیری: ژن PPAR γ به عنوان یکی از عوامل با اهمیت در تمایز سلول‌های MSCs به ادیپوسیت عمل می‌کند و مهار بیان این ژن برای جلوگیری از چاقی به عنوان یک ایده برای درمان در آینده پیشنهاد می‌شود.

واژه‌های کلیدی: سلول‌های بنیادی مزانشیمی، تمایز، سلول‌های چربی، ژن PPAR gamma

* نویسنده مسئول :

دکتر سعید کاویانی :

دانشکده علوم پزشکی دانشگاه تربیت

مدرس

Email :

Kavianis@modares.ac.ir

- دریافت مقاله : آذر ۱۳۹۳ پذیرش مقاله : اسفند ۱۳۹۳

مقدمه

این سلول‌ها قادر به تمایز به سمت سلول‌های استخوان ساز (استئوبلاست‌ها)، سلول‌های چربی (ادیپوسیت‌ها)، سلول‌های کندروسیتی و حتی میوسیت‌ها تحت شرایط و محیط تعریف شده‌اند (۳). علی‌رغم شناسایی MSCs در بسیاری از بافت‌های بدن مثل بافت چربی، ماهیچه‌ای و پولپ‌های دندان، مکان اصلی این سلول‌ها مغز استخوان است و امروزه از سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان (BM-MSCs یا Bone Marrow - Mesenchymal Stem Cells)

سلول‌های بنیادی مزانشیمی (MSCs) یا Mesenchymal Stem Cells طی یک دهه‌ی اخیر به خاطر توانایی بالایی که برای تمایز و ترمیم بافتی دارند، به طور شایان توجه مورد مطالعه قرار گرفته‌اند (۱ و ۲).

^۱ کارشناس ارشد هماتولوژی و بانک خون، گروه هماتولوژی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

^۲ استادیار گروه هماتولوژی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

^۳ استادیار گروه ژنتیک پزشکی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

^۴ دانشیار گروه هماتولوژی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

^۵ کارشناس ارشد هماتولوژی و بانک خون، سازمان انتقال خون ایران، تهران، ایران

^۶ استادیار گروه زنان و زایمان، دانشکده پزشکی، دانشگاه شهید بهشتی، تهران، ایران

تمايز، بيان ژن PPAR- γ هنوز بررسی نشده است. هدف این پژوهش، معرفی نحوه بیان ژن PPAR- γ جهت تمايز BM-MSCs به سلول‌های ادیپوسیت برای اولین بار است.

روش بررسی

۱) جداسازی و کشت MSCs از مغز استخوان:

آسپیره مغز استخوان بعد از گرفتن رضایت نامه از افراد سالم در بیمارستان طالقانی تهران تهیه شد. سلول‌های تک هسته‌ای از طریق شیب غلظتی با استفاده از محلول فایکول جدا گردید. بدین منظور بعد از رقیق کردن محلول آسپیره به نسبت ۱ : ۱ با PBS، به مدت ۲۰ دقیقه با دور ۴۵۰ سانتریفیوژ شد. سلول‌های تک هسته‌ای دارای چگالی کمتری نسبت به فایکول هستند، لذا بر روی آن قرار گرفتند و گلبول‌های قرمز باقی مانده دارای وزن مولکولی بیشتری نسبت به فایکول بودند و در ته لوله رسوب کردند. سپس مایع رویی را که حاوی سلول‌های تک هسته‌ای بود برداشته و با دور ۳۰۰ G به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شد. در نهایت 1×10^6 از سلول‌های تک هسته‌ای بر سانتیمتر مکعب به فلاسک‌های T75 انتقال داده شد. فلاسک‌ها در شرایط دمایی ۳۷ درجه و ۵٪ CO₂ نگه داری شده و هفته‌ای سه بار تعویض محیط انجام گرفت. جهت تکثیر سلول‌ها از محیط DMEM با ۱۰٪ FBS استفاده شد.

۲) فلوسیتومتری سلول‌های بنیادی مزانشیمی

استخراج شده از مغز استخوان انسانی:

بررسی سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان پاساژ ۳ به روش فلوسیتومتری انجام شد و مارکرهای CD105 و CD90 و CD34 و CD31 مورد بررسی قرار گرفتند.

به عنوان سلول استاندارد مزانشیمی یاد می‌کنند (۳ و ۴). بررسی‌های آزمایشگاهی MSCs از نظر تمايز، اطلاعات مفیدی را در اختیار پژوهشگران قرار داده است و امروزه از عوامل رشد و محیط‌های کشت شناخته شده جهت تمايز این سلول‌های بنیادی به انواعی از سلول‌ها استفاده می‌کنند (۴).

ادیپوژنز، فرایندی تحت کنترل است که در طی آن MSCs به سلول‌های چربی عملکردی و بالغ تبدیل می‌شوند (۵ و ۶). تحت شرایط مناسب، سلول‌های مزانشیمی می‌توانند واریانت‌های مورفولوژی و ژن‌های اختصاصی درگیر در بلوغ ادیپوسیت‌ها را بیان کنند (۷). باید در نظر داشت که فرایند تمايز، یک فرایند چند مرحله‌ای و هماهنگ شده‌ای است که شامل MSCs، پیش ادیپوسیت‌ها و ادیپوسیت‌های بالغ نهایی است (۸). ارتباط بین سلول‌ها میان خود و محیط اطراف، جهت فرایند ادیپوژنز ضروری است (۹ و ۸). چنین ارتباطی به واسطه عوامل رشد و سیگنال‌های مولکولی و فاکتورهای رونویسی انجام می‌شود (۹ و ۸). یکی از عوامل رونویسی دخیل، PPAR- γ (گیرنده‌های فعال کننده تکثیر پراکسیزوم‌ها) است. PPAR- γ متعلق به خانواده‌ای از عوامل فعال شونده توسط لیگاند است (۱۰). مطالعات پیشین نشان داده است که ژن PPAR- γ جهت تمايز سلول‌های بنیادی مزانشیمی به سمت سلول‌های چربی بالغ، عاملی اساسی به حساب می‌آید (۱۱ و ۱۰). PPAR- γ دارای دو نوع ایزوفرم است که هر دو ایزوفرم توسط سلول‌های ادیپوسیت بیان می‌شود (۱۱). آنالیز نواحی تنظیمی PPAR- γ نشان می‌دهد که این عامل رونویسی، بیان اکثر ژن‌های درگیر در تمايز ادیپوسیت را دربر می‌گیرد (۱۳ و ۱۲). BM-MSCs، الگوی بیان ژنی مشابهی با پیش ادیپوسیت‌هایی دارند که می‌توانند به ادیپوسیت‌های بالغ تمايز پیدا کنند (۱۴). با وجود این، طی فرایند

۳) تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی به استئوبلاست:

سلول‌ها در غلظت 3×10^3 بر سانتیمتر مکعب در ۳ فلاسک T25 کشت داده شد و بعد از رسیدن به هم شماری، ۸۰-۷۰٪ محیط تکثیری DMEM با محیط تمایزی استوژنتیک تعویض شد. بعد از ۲۱ روز، تمایز به سمت استخوان با استفاده از رنگ آمیزی الیزارین قرمز مورد تایید قرار گرفت.

۴) رنگ آمیزی الیزارین قرمز:

برای این منظور، محیط کشت تخلیه شد و سلول‌ها با PBS شستشو شده و با فرمالین ۱۰ درصد به مدت ۳۰ دقیقه تثبیت شدند. سپس با آب مقطر شستشو داده شده و نهایتاً رنگ الیزارین قرمز ۱ درصد اضافه شده و به مدت ۴۵ دقیقه به دور از نور و در دمای اتاق انکوبه شدند. سپس مجدداً با آب مقطر شستشو شده و در زیر میکروسکوپ از نظر وجود رسوب‌های قرمز رنگ کلسیم مورد ارزیابی قرار گرفتند.

۵) تمایز سلول‌های مزانشیمی به ادیپوسیت:

برای القای تمایز به ادیپوسیت، سلول‌های مزانشیمی در غلظت 3×10^3 بر سانتیمتر مکعب در فلاسک‌های T25 وارد شده و بعد از رسیدن به هم‌شماری ۷۰٪، از محیط تمایزی ادیپوسیت به جای DMEM استفاده گردید. فلاسک‌ها به مدت ۱۴ روز در انکوباتور ۳۷ درجه و ۵٪ CO_2 نگه داری شدند. سلول‌های کنترل منفی، فاقد محیط تمایزی بوده و تنها از DMEM+10%FBS تغذیه می‌کردند. جهت بررسی تمایز از رنگ آمیزی Oil Red O استفاده شد.

۶) رنگ آمیزی OIL-RED-O:

برای این منظور، محیط کشت تخلیه شده و سلول‌ها با PBS شستشو داده شدند و سپس، با فرمالین ۱۰ درصد به مدت ۳۰ دقیقه تثبیت شده و در

ادامه، سپس با آب مقطر شستشو داده شدند. سپس ۱ سی سی ایزوپروپانول ۶۰٪ به آن اضافه شد و به مدت ۵ دقیقه در دمای اتاق قرار گرفت. همچنین ایزوپروپانول خارج و رنگ به آن اضافه شده و به مدت ۱۵ دقیقه در دمای اتاق انکوبه شدند و در نهایت با آب مقطر شستشو شده و در زیر میکروسکوپ از نظر وجود وزیکول‌های چربی مورد ارزیابی قرار گرفتند.

۷) جداسازی RNA:

جهت استخراج RNA، سلول‌های بنیادی مزانشیمی تمایز نیافته (روز صفر) و سلول‌های مزانشیمی تمایز داده شده به چربی (روز ۱۴) از روش دستی و بر پایه استخراج به وسیله فنل و کلروفرم استفاده شد.

۸) سنتز cDNA:

سنتز cDNA با استفاده از ۳ میکرولیتر RNA استخراج شده از سلول‌های بنیادی مزانشیمی و سلول‌های تمایز یافته ادیپوسیتی انجام گرفت. مخلوط واکنش برای سنتز cDNA شامل ۱ میکرولیتر پرایمر Oligo-dT، ۲ میکرولیتر بافر $10 \times$ (محتوی، Tris-HCl 10mM، 50 mM، 75 mM KCl، 3mM MgCl₂، 1mM DTT)، ۲ میکرولیتر مخلوط dNTP (۱۰ mM)، ۱ میکرولیتر آنزیم ترانس کریپتاز معکوس، که به حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر رسید. دمای anealing برای واکنش نسخه برداری معکوس ۴۲ درجه سانتیگراد به مدت ۶۰ دقیقه بود. غیرفعال‌سازی آنزیم بواسطه حرارت ۷۰ درجه سانتیگراد به مدت ۱۰ دقیقه صورت گرفت. cDNA حاصل به طور مستقیم در واکنش‌های RT-PCR و Real time PCR مورد استفاده قرار گرفت.

۹) انجام RT-PCR جهت بررسی بیان کیفی ژن

PPAR- γ :

مشخص گشت. برای انجام PCR از دستگاه ترمال سایکلر Eppendorf استفاده شد. توالی پرایمرهای مورد استفاده در PCR برای ژن PPAR- γ در جدول ۱ آورده شده است.

بیان کیفی mRNA ژن PPAR- γ حاصل از نمونه‌های RNA استخراج شده از سلول‌های بنیادی مزانشیمی تمایز نیافته (روز صفر)، سلول‌های آدیپوسیتی تمایز داده شده (روز ۱۴)، پس از القای تمایز با استفاده از کیت RT-PCR شرکت سیناژن

جدول ۱: توالی پرایمرهای مورد استفاده برای ژن PPAR- γ و بتا اکتین (کنترل داخلی)

نام ژن	توالی	Tm	طول محصول (bp)
PPAR- γ -F	CCCTTCACTACTGTTGACTTC	۶۲	۱۶۴
PPAR- γ -R	TCAGAATAATAAGGTTGGAGATGC	۶۲	۱۶۴
β -Actin-F	TGAAGATCAAGATCATTGCTCCTC	۶۲	۱۶۸
β -Actin-R	AGTCATAGTCCGCCTAGAAGC	۶۲	۱۶۸

منظور کمی سازی نسبی، از روش C_t مقایسه‌ای استفاده شد. در این روش مقدار هدف نرمال شده نسبت به یک کنترل درونی و نسبت به یک کالیبراتور با استفاده از فرمول $2^{-\Delta\Delta Ct}$ محاسبه شد و سپس با استفاده از نرم افزارهای graphpad و pfaffl نمودارهای مربوطه رسم گردید.

یافته‌ها

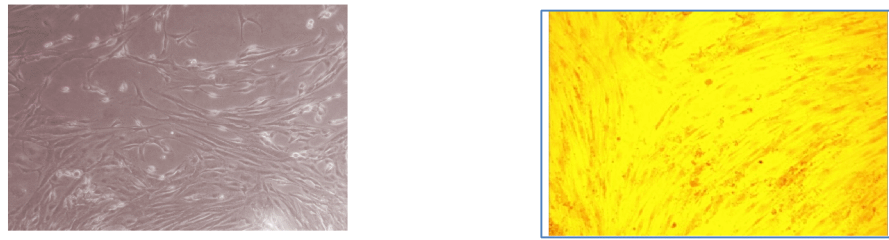
(۱) یافته‌های حاصل از تمایز MSCs به سمت استئوبلاست همانطور که در شکل ۱ مشاهده می‌کنید سلول‌های بنیادی جدا شده، قدرت تمایز به سمت سلول‌های استخوانی استئوبلاستی را داشته‌اند.

(۱۰) Real Time PCR :

بیان کمی mRNA ژن PPAR- γ حاصل از نمونه‌های RNA استخراج شده از سلول‌های بنیادی مزانشیمی تمایز نیافته (روز صفر)، سلول‌های مزانشیمی تمایز داده شده (روزهای ۱۴ پس از القای تمایز)، پس از تیمار با استفاده از کیت Amplicon مشخص گردید. برای انجام quantitative Real Time PCR از دستگاه ترمال سایکلر Step one استفاده شد. توالی پرایمرهای مورد استفاده در quantitative Real Time PCR برای ژن PPAR- γ همان توالی مورد استفاده در RT-PCR است.

(۱۱) تحلیل داده‌ها:

C_t های مربوط به واکنش‌ها توسط نرم افزار دستگاه Real-time PCR استخراج و ثبت گردید. به

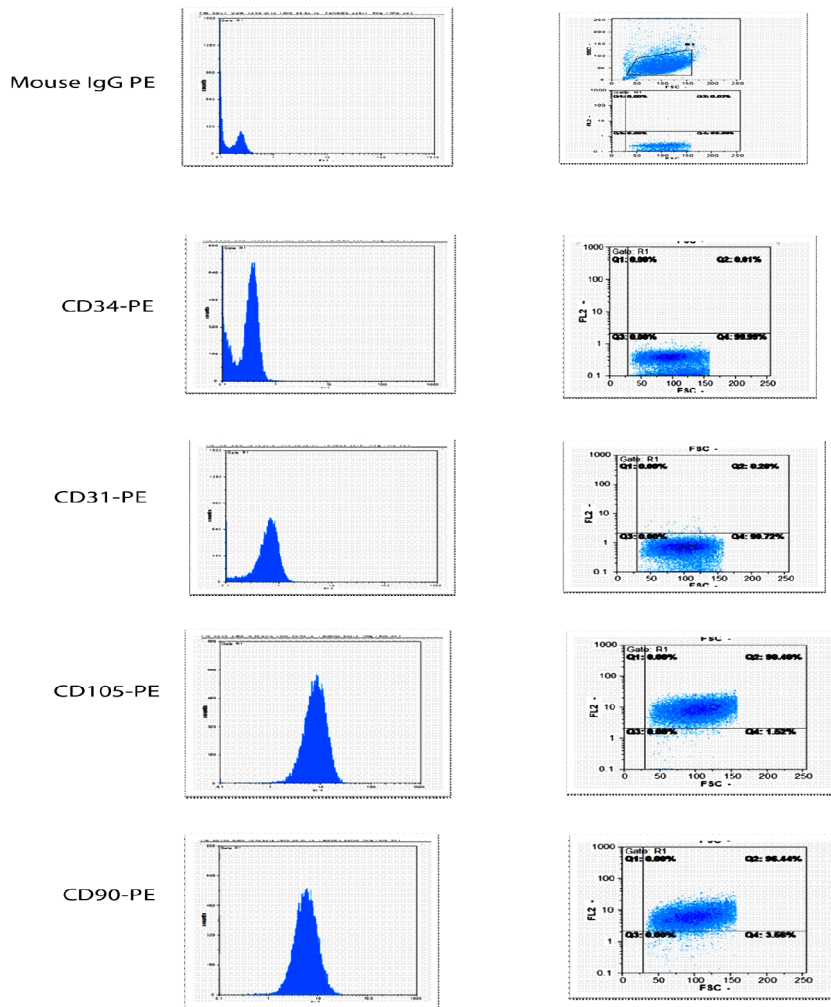


شکل ۱: رنگ آمیزی آلیزارین (د.پپ به است): سلول‌های بنیادی مزانشیمی - سلول‌های تمایز یافته به استخوان بعد از ۲۱ روز. بزرگنمایی 100X

۲) نتایج فلوسیتومتری

و CD34 و CD31 انجام گرفت که نتایج آن در شکل ۲ مشخص است.

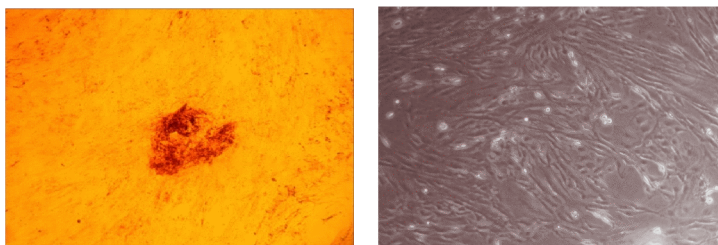
جهت تایید مزانشیم بودن سلول‌ها، فلوسیتومتری برای مارکرهاى CD105 و CD90



شکل ۲: نتایج فلوسیتومتری سلول‌های بنیادی مزانشیمی

همان‌طور که در شکل ۲ نشان داده شده است، سلول‌ها در این آنالیز $CD90^+$ می‌باشند. $CD105^+$ $CD31^-$ $CD34^-$

۳) رنگ آمیزی BM-MSCs ضمن تمایز به آدیپوسیت‌ها



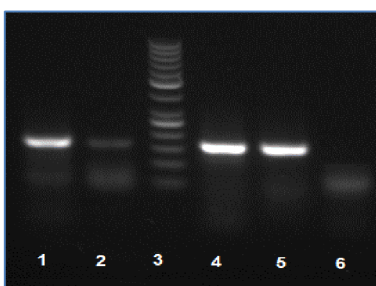
شکل ۳: رنگ آمیزی Oil Red O (پپ به است) : سلول بنیادی مزانشیمی -

سلول تمایز یافته به آدیپوسیت پس از ۱۴ روز با بزرگنمایی 100X

حاوی تجمع لیپیدها را در داخل سلول‌های آدیپوسیت نشان می‌دهد.

همان‌طور که در شکل ۳ مشخص است MSCs بعد از تمایز مورفولوژی سلول‌های آدیپوسیت را به خود گرفته و رنگ آمیزی Oil Red O دانه‌های قرمز

۴) نتایج حاصل از بیان کیفی ژن PPAR- γ



شکل ۴: نمای ژل الکتروفورز بعد از بارگذاری ممتصل PCR (۱: beta actin بیان ژن قبل از تمایز،

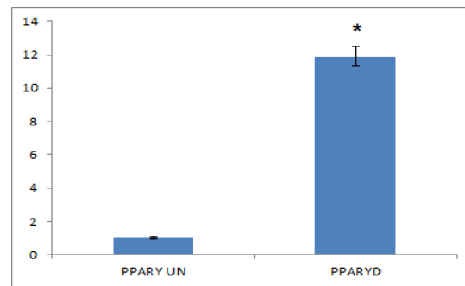
۲) PPAR- γ قبل از تمایز (۳) سایز مارکر (۵۰ bp) beta actin بعد از تمایز

(۵) PPAR- γ بعد از تمایز (۶) NTC

کم بود. با این حال، بعد از تمایز، ژن PPAR- γ بیان شده و بیان آن کاملاً مشهود است.

در شکل ۴ نمایی از بیان کیفی ژن PPAR- γ قبل و بعد از تمایز BM-MSCs آورده شده است. همان‌طور که مشاهده می‌شود، بیان این ژن قبل از تمایز بسیار

۵) افزایش بیان ژن PPAR- γ در ضمن تمایز به سمت آدیپوسیت ها



نمودار ۱: نتایج RT-PCR q ژن PPAR- γ قبل (UN) و بعد از تمایز (D) MSCs به سلول‌های آدیپوسیت ($P < 0.05$)

آدیپوسیتی جلوگیری می‌کند، اما اشاره‌ای بر روی بیان ژن PPAR- γ نشده است (۲۰).

آدیپوژنز، فرایندی پیچیده است که همکاری بین عوامل مختلف بخصوص PPAR- γ و C/EBPs را می‌طلبد (۲۱). مطالعه‌ی حاضر نیز نشان داد که PPAR- γ در آدیپوسیت‌های القا شده از MSCs بیان با اهمیتی داشته است؛ به عبارت دیگر، می‌توان گفت PPAR- γ یک عامل لازم برای تمایز MSCs به سمت تمایز به طرف آدیپوسیت است. PPAR- γ می‌تواند به طیف وسیعی از ژن‌های درگیر در تمایز آدیپوسیتی متصل شده و باعث القای بیان آنها شود (۷). با این حال، مطالعات بیشتری نیاز است تا از نقش غالب PPAR- γ در تمایز BM-MSCs به سلول‌های آدیپوسیتی مطمئن شد.

تمایز BM-MSCs به سلول‌های آدیپوسیتی بسیار با اهمیت است. استئوپوروز و افزایش خطر شکستگی استخوان به دنبال افزایش سن، نه تنها با کاهش استئوبلاست‌ها در ارتباط است، بلکه افزایش آدیپوسیت‌ها در مغز استخوان نیز می‌تواند اثرگذار باشد (۲۲). بنابراین، علاوه بر تحریک استخوان سازی، نیاز به مهار آدیپوژنز نیز وجود دارد (۲۴ و ۲۳). از این رو مهار تمایز BM-MSC به آدیپوسیت با واسطه سرکوب

همان‌طور که در نمودار ۱ مشاهده می‌کنید، آنالیز کمی ژن PPAR- γ به وسیله quantitative RT-PCR و با استفاده از دستگاه ABI Step1 انجام گردید و نمودار مربوطه با استفاده از نرم افزارهای Pfaffle و graph pad ترسیم شد. با توجه به نمودار، بیان ژن، PPAR- γ پس از تمایز MSC به سلول چربی، افزایش بیان چشمگیری را نشان می‌دهد.

بحث

در این مطالعه نشان داده شد که MSCs، دارای بیان افزایش یافته‌ای از PPAR- γ طی تمایز به آدیپوسیت هستند. همان‌طور که در نتایج آمده است افزایش بیان PPAR- γ معنی دار است. نتایج ما هم راستا با مطالعات قبلی است که افزایش بیان ژن PPAR- γ در سلول‌های بنیادی آدیپوسیتی جدا شده از بافت چربی را نشان می‌دهد (۱۵ و ۱۶). مطالعات زیادی در زمینه ی تمایز سلول‌ها و رده‌های سلولی مختلف از جمله BMS2، UAMS33، 2T3 به سمت آدیپوسیت‌ها و همچنین مطالعاتی نیز بر روی تمایز BM-MSCs انسانی انجام شده است (۱۷-۱۹). به عنوان مثال، در سال ۲۰۱۳ نشان داده شد که هیپوکسی از تمایز سلول‌های BM-MSCs به سمت سلول‌های

ادیپوسیت‌های تمایز یافته از سلول‌های بنیادی بافت چربی است و می‌توان گفت که مکانیسم مولکولی و مقدار بیان ژن‌ها در این دو جمعیت سلولی متفاوت است. از این رو پیشنهاد می‌شود که بیان ژن‌هایی همچون PPAR- γ در ادیپوزنز حاصل از تمایز BM-MSC با سلول‌های بنیادی مشتق از بافت چربی مقایسه شود (۲۹).

نتیجه‌گیری

با توجه به مطالب پیشگفت می‌توان نتیجه گرفت که PPAR- γ به عنوان یکی از عوامل با اهمیت در تمایز سلول‌های MSCs به ادیپوسیت عمل می‌کند و می‌توان با مهار بیان آن در درمان بیماری‌های مختلف از جمله چاقی مفرط، آنمی آپلاستیک و استئوپروزیس از آن استفاده کرد.

تشکر و قدردانی

این تحقیق مستخرج از پایان نامه کارشناسی ارشد رشته هماتولوژی دانشکده علوم پزشکی دانشگاه تربیت مدرس به شماره ثبت ۵۲/۴۶۵۰/د می‌باشد. لازم است تا از کلیه همکاران و دانشجویان دانشکده پزشکی دانشگاه تربیت مدرس، و سایر افرادی که نویسندگان را به نحوی در انجام این پژوهش یاری نمودند، تشکر نمایم.

بیان PPAR- γ می‌تواند مفید باشد. چاقی یکی از مشکلات تهدید آمیز در زندگی جدید امروزی است. علی‌رغم فنوتیپ متفاوت MSCs مغز استخوان و بافت چربی، این سلول‌ها دارای ظرفیت تمایزی یکسانی هستند (۲۵). همچنین، یکی از عوارض کم‌خونی آپلاستیک افزایش سلول‌های ادیپوسیت در مغز استخوان است که منجر به اختلال در حمایت داربست مغز استخوان از سلول‌های بنیادی خون‌ساز می‌شود. چنین اختلالی می‌تواند ناشی از تمایز بیش از حد BM-MSCs به سمت سلول‌های ادیپوسیتی باشد. مطالعات اخیر نشان داده‌اند که مهار ادیپوزنز در بیماران آپلاستیک می‌تواند نیاز به پیوند مغز استخوان را به صورت معنی‌داری کاهش دهد (۲۶ و ۲۷). اخیراً نشان داده‌اند که BM-MSCs جدا شده از بیماران لوسمی حاد میلوئیدی (AML) دارای قدرت تمایزی بیشتری به سمت سلول‌های ادیپوسیتی هستند و همچنین تعداد این سلول‌ها در مغز استخوان این بیماران که دارای اختلال در تولید مناسب سلول‌های خونی هستند، بیشتر است (۲۸). بنابراین، مشاهدات ما در این مطالعه، می‌تواند به عنوان یکی از فرآیندهای درمانی برای این بیماران در نظر گرفته شود و با مهار تمایز MSCs، می‌توان بهبود شرایط بیماری را انتظار داشت. مطالعاتی که بر روی پیوند چربی انجام شد، به این نتیجه رسید که سلول‌های ادیپوسیتی مشتق از BM-MSCs سلول‌های بسیار مناسبتری از

منابع

1. Kim DS, Lee MW, Yoo KH, Lee TH, Kim HJ, Jang IK, et al. Gene expression profiles of human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells are modified by cell culture density. *PLOS One* 2014; 9(1): 83363.
2. Neuss S, Becher E, Woltje M, Tietze L & Jahnen-Dechent W. Functional expression of HGF and HGF receptor/c-met in adult human mesenchymal stem cells suggests a role in cell mobilization, tissue repair, and wound healing. *Stem Cells* 2004; 22(3): 405-14.

3. Deans RJ & Moseley AB. Mesenchymalstem cells: Biology and potential clinical uses. *Experimental Hematology* 2000; 28(8): 875-84.
4. De Ugarte DA, Alfonso Z, Zuk PA, Elbarbary A, Zhu M, Ashjian P, et al. Differential expression of stem cell mobilization-associated molecules on multi-lineage cells from adipose tissue and bone marrow. *Immunology Letters* 2003; 89(2-3): 267-70.
5. Penkov DN, Egorov A, Mozgovaya MN & Tkachuk VA. Insulin resistance and adipogenesis: Role of transcription and secreted factors. *Biochemistry* 2013; 78(1): 8-18.
6. Zhang Y, Khan D, Delling J & Tobiasch E. Mechanisms underlying the osteo-and adipo-differentiation of human mesenchymal stem cells. *The Scientific World Journal* 2012; 1(2012): 793823.
7. Ling H, Li X, Yao CH, Hu B, Liao D, Feng S, et al. The physiological and pathophysiological roles of adipocyte miRNAs. *Biochemistry and Cell Biology* 2013; 91(4): 195-202.
8. Modica S & Wolfrum C. Bone morphogenic proteins signaling in adipogenesis and energy homeostasis. *Biochimica et Biophysica Acta* 2013; 1831(5): 915-23.
9. Sarjeant K & Stephens JM. Adipogenesis. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 2012; 4(9): 8417.
10. Lehrke M & Lazar MA. The many faces of PPAR γ . *Cell* 2005; 123(6): 993-9.
11. Tontonoz P & Spiegelman BM. Fat and beyond: The diverse biology of PPAR γ . *Annual Review of Biochemistry* 2008; 77(1): 289-312.
12. Perera RJ, Marcusson EG, Koo S, Kang X, Kim Y, White N, et al. Identification of novel PPAR γ target genes in primary human adipocytes. *Gene* 2006; 369(1): 90-9.
13. Nakachi Y, Yagi K, Nikaido I, Bono H, Tonouchi M, Schonbach C, et al. Identification of novel PPAR γ target genes by integrated analysis of ChIP-on-chip and microarray expression data during adipocyte differentiation. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2008; 372(2): 362-6.
14. Kang S, Bennett CN, Gerin I, Rapp LA, Hankenson KD & Macdougald OA. Wnt signaling stimulates osteoblastogenesis of mesenchymal precursors by suppressing CCAAT/enhancer-binding protein alpha and peroxisome proliferator-activated receptor gamma. *The Journal of Biological Chemistry* 2007; 282(19): 14515-24.
15. Astapova O & Leff T. Adiponectin and PPAR γ : Cooperative and interdependent actions of two key regulators of metabolism. *Vitamins and Hormones* 2012; 90(1): 143-62.
16. Sekiya I, Larson BL, Vuoristo JT, Cui JG & Prockop DJ. Adipogenic differentiation of human adult stem cells from bone marrow stroma (MSCs). *Journal of Bone and Mineral Research* 2004; 19(2): 256-64.
17. Lecka-Czernik B, Gubrij I, Moerman EJ, Kajkenova O, Lipschitz DA, Manolagas SC, et al. Inhibition of Osf2/Cbfa1 expression and terminal osteoblast differentiation by PPAR γ 2. *Journal of Cellular Biochemistry* 1999; 74(3): 357-71.
18. Ghosh-Choudhury N, Windle JJ, Koop BA, Harris MA, Guerrero DL, Wozney JM, et al. Immortalized murine osteoblasts derived from BMP 2-T-antigen expressing transgenic mice. *Endocrinology* 1996; 137(1): 331-9.
19. Thompson DL, Lum KD, Nygaard SC, Kuestner RE, Kelly KA, Gimble JM, et al. The derivation and characterization of stromal cell lines from the bone marrow of p53 $^{-/-}$ mice: New insights into osteoblast and adipocyte differentiation. *Journal of Bone and Mineral Research* 1998; 13(2): 195-204.

20. Cicione C, Muinos - Lopez E, Hermida - Gomez T, Fuentes - Boquete I, Diaz-Prado S & Blanco FJ. Effects of severe hypoxia on bone marrow mesenchymal stem cells differentiation potential. *Stem Cells International* 2013; 1(2013): 232896.
21. Rosen ED, Hsu C-H, Wang X, Sakai S, Freeman MW, Gonzalez FJ, et al. C/EBP α induces adipogenesis through PPAR γ : A unified pathway. *Genes & Development* 2002; 16(1): 22-6.
22. Takada I. Switching of osteoblastogenesis versus adipogenesis. *Clinical Calcium* 2012; 22(5): 629-36.
23. Cao JJ. Effects of obesity on bone metabolism. *Journal of Orthopaedic Surgery and Research* 2011; 6(1): 30.
24. Rozman C, Feliu E, Berga L, Reverter JC, Climent C & Ferran MJ. Age-related variations of fat tissue fraction in normal human bone marrow depend both on size and number of adipocytes: A stereological study. *Experimental Hematology* 1989; 17(1): 34-7.
25. Bae KH, Kim WK & Lee SC. Involvement of protein tyrosine phosphatases in adipogenesis: New anti-obesity targets? *BMB Reports* 2012; 45(12): 700-6.
26. Young NS & Maciejewski J. The pathophysiology of acquired aplastic anemia. *The New England Journal of Medicine* 1997; 336(19): 1365-72.
27. Juneja HS & Gardner FH. Functionally abnormal marrow stromal cells in aplastic anemia. *Experimental Hematology* 1985; 13(3): 194-9.
28. Chen Q, Yuan Y & Chen T. Morphology, differentiation and adhesion molecule expression changes of bone marrow mesenchymal stem cells from acute myeloid leukemia patients. *Molecular Medicine Reports* 2014; 9(1): 293-8.
29. Zhao J, Yi C, Zheng Y, Li L, Qiu X, Xia W, et al. Enhancement of fat graft survival by bone marrow-derived mesenchymal stem cell therapy. *Plastic and Reconstructive Surgery* 2013; 132(5): 1149-57.

PPAR- γ Gene Expression In Differentiated Adipocytes Derived From Mesenchymal Stem Cells Of Human Bone Marrow

Esmaili Shadi¹ (MSc.) - Kaviani Saeid² (Ph.D) - Norouzinia Mehrdad³ (Ph.D)
Atashi Amir⁴ (Ph.D) - Soleimani Masoud² (Ph.D) - Abroun Saeid² (Ph.D)
Razavi Babaheidari Seied Rasoul⁵ (MSc.) - Zonoubi Zahra⁶ (M.D)
Saba Fakhreddin¹ (MSc.)

1 Master of Sciences in Hematology & Blood Bank, Hematology Department, School of Medical Sciences, Tarbiyat Modares University, Tehran, Iran
2 Assistant Professor, Hematology Department, School of Medical Sciences, Tarbiyat Modares University, Tehran, Iran
3 Assistant Professor, Medical Genetics Department, School of Medical Sciences, Tarbiyat Modares University, Tehran, Iran
4 Associate Professor, Hematology Department, School of Medical Sciences, Tarbiyat Modares University, Tehran, Iran
5 Master of Sciences in Hematology & Blood Bank, Iranian Blood Transfusion Organization, Tehran, Iran
6 Assistant Professor, Obstetrics and Gynaecology Department, School of Medicine, Shahid Beheshti University, Tehran, Iran

Abstract

Received : Nov 2014
Accepted : Mar 2015

Background and Aim: Obesity is now considered as one of the main risk factors of certain known diseases such as cardio-vascular diseases, non- insulin-dependent diabetes, and common cancers. Moreover, the increase of white fat tissue is known as a main factor in the obesity process, in terms of physiology and pathology. Therefore, the understanding of adipocytes differentiation processes is crucial.

Materials and Methods: In this study, mesenchymal stem cells (MSCs) were isolated from human bone marrow by ficol-gradient, and then, their surface markers were confirmed by flow cytometry. Osteoblastic and adipocytes differentiation were done by dexamethasone protocol and confirmed by staining. Then qualitative and quantitative expressions of PPARgamma (PPAR- γ) gene as an important transcription factor in the differentiation of fat were studied by RT-PCR and REAL TIME PCR before and after differentiation into adipocytes. For statistical analysis, paired t-test was performed, using pfaffl and graph pad software.

Results: PPAR-gamma gene expression showed a significant increase after differentiation of human bone marrow mesenchymal stem cells into adipocytes ($p < 0/05$).

Conclusion: According to the results, the PPAR- γ gene acts as one of the important factors in the differentiation of MSCs into adipocytes. In brief, the inhibition of this gene's expression to prevent obesity is suggested as an idea for treatment in the future.

Key words: Msenchymal Stem Cells, Differentiation, Adipocyte Cells, PPAR-gamma

* Corresponding Author:
Kaviani S;
E-mail:
Kavianis@modares.ac.ir