

Study of the Effect of A366 (A G9a Methyltransferase Inhibitor) on Osteogenic Potential of Rat Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells

Mahmood Talkhabi^{1*}, Hedieh Khanban²

1. Assistant Professor, in Cell and Developmental Biology, Department of Animal Sciences and Biotechnology, Faculty of Life Sciences and Biotechnology, Shahid Beheshti University, Tehran, Iran
2. Ph.D. in Cell and Developmental Biology, Department of Biology, Ayatollah Amoli Branch, Islamic Azad University, Amol, Iran
(Received: Nov. 25, 2019 - Accepted: May 5, 2020)

Abstract

Mesenchymal stem cells (MSCs) are multipotent stem cells that have potential to differentiate into connective tissue lineages. They also have special properties such as immunomodulation and secretion of growth factors. Histone methyltransferase G9a is one of the factors that control stem cells behaviors and features. Hence, it is important to study the role of G9a in MSCs biological behaviors and potentials. MSCs were isolated from rat bone marrow and cultured in vitro. Then, the expression of positive markers (CD90 and CD 73) and negative markers (CD45) were analyzed using flowcytometry. BM-MSCs were treated with different doses of A366, and then were differentiated to osteocyte. Osteogenesis were analyzed using oil red staining and real time-PCR. BM-MSCs were expanded as adherent cells with fibroblastic morphology. More than 85% of cells were positive for CD73 and CD90, and negative for CD45. The treatment of BM-MSCs with A366 reduced osteogenesis as evaluated by oil red staining and gene expression analysis. A366, as an epigenetic regulator decreases the osteogenic potential of BM-MSCs. Use of these regulators for cancer therapy, might influence tissue regeneration and homeostasis.

Keywords: A366, Epigenetics, G9a, Mesenchymal stem cell, Osteogenesis.

بررسی تأثیر A366 (مهارکننده آنزیم G9a) بر پتانسیل استئوژنیک سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان رت

محمود تلخایی^۱، هدیه خانبان^۲

۱. استادیار زیست‌شناسی سلولی تکوینی، گروه علوم جانوری و زیست‌شناسی دریا، دانشکده علوم و فناوری زیستی، دانشگاه شهید بهشتی، تهران، ایران
۲. دکتری زیست‌شناسی سلولی تکوینی، گروه زیست‌شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی، آمل، ایران
(تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۹/۴ - تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۲/۱۶)

چکیده

سلول‌های بنیادی مزانشیمی (MSCs)، سلول‌های بنیادی چندتوانی هستند که پتانسیل تمایز به دودمان‌های بافت همبند را داشته و ویژگی‌های منحصربه‌فردی از قبیل تعدیل سیستم ایمنی و ترشح فاکتورهای رشد را دارند. آنزیم هیستون متیل ترانسفراز G9a یکی از فاکتورهای دخیل در کنترل رفتار و ویژگی بسیاری از سلول‌های بنیادی می‌باشد. از این‌رو، بررسی نقش G9a در کنترل رفتار و پتانسیل MSCs دارای اهمیت می‌باشد. MSCs از مغز استخوان رت استخراج شده و در محیط آزمایشگاهی کشت شدند. سپس با استفاده از فلوسایتومتری بیان مارکرهای CD90 و CD73 و عدم بیان مارکر CD45 در سلول‌های استخراج‌شده بررسی شد. سپس MSCs مشتق از مغز استخوان (BM-MSCs) در پاساژ سوم با استفاده از غلظت‌های مختلف A366 (یک مهارکننده اختصاصی آنزیم G9a) تیمار شدند. میزان تمایز به استخوان BM-MSCs تیمار شده با A366، با استفاده از بررسی فعالیت آلکالین فسفاتاز و رنگ‌آمیزی الیزارین رد و نیز بیان ژن‌های استخوانی تعیین شد. BM-MSCs به‌صورت چسبنده رشد کرده و مورفولوژی فیروبلاستی/ستاره‌ای داشتند. همچنین بیش از ۸۵ درصد سلول‌ها برای دو مارکر CD90 و CD73 مثبت بوده و مارکر CD45 را بیان نمی‌کردند. همچنین تیمار BM-MSCs با غلظت ۱، ۳ و ۵ میکرومولار از A366 موجب کاهش پتانسیل تمایز سلول‌ها به سمت سلول‌های استخوانی شد. A366 به‌عنوان یکی از تنظیم‌کنندگان اپی‌ژنتیکی، پتانسیل تمایز به استخوان را کاهش می‌دهد. استفاده از این تنظیم‌کننده‌ها برای درمان سرطان، ممکن است ترمیم و هومئوستازی بافتی را تحت تأثیر قرار دهد.

واژه‌های کلیدی: آنزیم G9a، اپی‌ژنتیک، استئوژن، سلول‌های بنیادی مزانشیمی، A366.

مقدمه

بیش از ۴۰ سال است که الکساندر فریدنشتاین سلول‌های بنیادی مزانشیمی (MSCs) را کشف کرد (Afanasyev *et al.*, 2009). آن‌ها ابتدا در مغز استخوان شناخته شدند و مشخص شد که سلول‌های بنیادی چندتوانی هستند و انعطاف‌پذیری بالایی دارند. بعد از کشف MSCs در مغز استخوان، این سلول‌ها از بافت‌های دیگر از جمله خون محیطی، خون بند ناف، ماهیچه اسکلتی، قلب و بافت چربی جداسازی شدند (Freitag *et al.*, 2016). حضور آن‌ها در بافت‌های مختلف بدن حاکی از نقش ذاتی آن‌ها در ترمیم بافت‌ها و بازسازی آنهاست، هرچند بهترین منبع MSC بزرگسالان هنوز ناشناخته است (Caplan, 2009). با وجود اختلافات اندکی که MSCs مشتق از بافت‌های مختلف در محیط کشت اختصاصی، مارکرهای سطحی و پتانسیل تمایزی دارند، اما براساس ملاک‌های انجمن سلول درمانی تمام MSCs باید حداقل در سه ویژگی مشترک باشند: (۱) توانایی چسبیدن به ظروف کشت و تکثیر به صورت سلول‌های چسبنده، (۲) بیان مارکرهایی سطحی چون CD90، CD73، CD105 و عدم بیان مارکرهای خونساز و عروقی قبیل CD34، CD45 و CD11b و (۳) توانایی تمایز به سلول‌های استخوانی، سلول‌های غضروفی و سلول‌های چربی (Dominici *et al.*, 2006).

همچنین مشخص شده است که MSCs تکثیر سلول‌های T را سرکوب کرده و از بلوغ سلول‌های دندریتیک میلوئیدی جلوگیری می‌کنند که منجر به تنظیم سیستم ایمنی شده و به‌عنوان یک عامل ضد التهابی عمل می‌کنند (Djouad *et al.*, 2009). علاوه بر تنظیم‌کنندگی سیستم ایمنی بدن و پتانسیل تمایز به دودمان‌های مختلف، MSCs فاکتورهایی چون TGF β ، VEGF و EGF را ترشح کرده و باعث تحریک ترمیم بافت شده، رگ‌زایی را تحریک کرده و بقای سایر سلول‌ها در نواحی آسیب‌دیده را افزایش

می‌دهند (Gazit *et al.*, 2019). مشخص شده است که بسیاری از این ویژگی‌های منحصربه‌فرد MSCs توسط مکانیزم‌های اپی‌ژنتیکی کنترل می‌شود (Teven *et al.*, 2011; Yin *et al.*, 2019). اپی‌ژنتیک معمولاً به یک تنظیم ژن قابل وراثت و طولانی‌مدت گفته می‌شود که بدون تأثیر بر توالی DNA، باعث تغییر در بیان ژن‌ها می‌شود. مشخص شده است که بسیاری از ویژگی‌های بیولوژیکی مانند تمایز سلول، تکثیر، مهاجرت، و بازسازی بافت توسط مکانیزم‌های اپی‌ژنتیکی انجام می‌شود. متیلاسیون هیستون‌ها یکی از تغییرات اپی‌ژنتیکی مهم است که توسط آنزیم‌های متیل ترانسفراز و دمتیلاز کنترل می‌شود (Fabrizio *et al.*, 2019). G9a یکی از اصلی‌ترین متیل ترانسفرازها در پستانداران است که به‌صورت اختصاصی لیزین ۹ (H3-K9) را متیله می‌کند (Nicetto *et al.*, 2019). G9a در تکوین نرمال و نیز در شرایط پاتولوژیک (مثل سرطان‌ها) بیان می‌شود. مشخص شده است که جنین‌هایی که دارای جهش نقص عملکرد در آنزیم G9a هستند در مراحل ابتدایی جنینی از بین می‌روند (Eisenberg & Eisenberg, 2019). در سال‌های اخیر یک مکانیسم اپی‌ژنتیک مهم شامل متیلاسیون و دمتیلاسیون لیزین شماره ۲۷ هیستون H3، شناسایی شده است که توسط متیل ترانسفراز EZH2 و دمتیلاز KDM6A انجام شده و تمایز MSCs به سلول‌های استخوانی را پیش می‌برد، به‌طوری‌که بیان بیش از اندازه KDM6 باعث ایجاد تمایز پوکی می‌شود (Hemming *et al.*, 2014). همچنین مطالعات نشان داده است که G9a با همکاری Runx2 تمایز استخوانی و کندروژنیک را القا می‌کند (Purcell *et al.*, 2012; Liu *et al.*, 2015). علاوه بر آن، آنزیم G9a در بسیاری از سرطان‌های انسانی از جمله پرستات و شش نیز بیان می‌شود و برای شروع متاستاز در این سرطان‌ها ضروری است (Gozani & Husmann, 2019).

با توجه با این که استفاده MSCs در مهندسی بافت

محیط سلول‌ها هر سه روز یکبار انجام شد و بعد از رسیدن سلول‌ها به تراکم مناسب، سلول‌ها با استفاده از Trypsin/EDTA پاساژ داده شدند.

بررسی مارکرهای سطحی BM-MSCs

از آنجایی که BM-MSCs فاقد مارکر اختصاصی هستند لذا براساس بیان و عدم بیان مارکرهای ویژه‌ای تشخیص داده می‌شوند. در این مطالعه برای اثبات ماهیت سلول‌ها، مارکرهای سطحی CD90، CD73 و CD45 مورد بررسی قرار گرفتند. به این صورت که BM-MSCs مشتق در پاساژ سه تریپسینه شده و مورد شمارش سلولی قرار گرفتند. سپس ۱۰۰ μlit محلول PBS/EDTA حاوی ۲۵۰ هزار سلول در لوله‌های مخصوص فلوسایتومتری قرار داده شدند. پنج میکرولیتر از هر کدام از آنتی‌بادی‌ها (CD90، CD73 و CD45 (همه از شرکت Bioscience BD) به هر لوله به صورت جداگانه افزوده شد و لوله‌ها به مدت ۳۰ دقیقه در ۴ درجه و در تاریکی انکوبه شدند. در ادامه ۱۰۰ μlit EDTA/PBS به لوله افزوده شده و به مدت ۵ دقیقه 1200 RPM سانتریفیوژ شده و محلول رویی از روی رسوب سلولی جدا شد و ۱۰۰ μlit PBS/EDTA به رسوب افزوده شده و کاملاً رسوب در PBS/EDTA حل و هموژن شد. محلول سلولی آماده شده با استفاده از فلوسایتومتری (FACSCalibur; BD Biosciences) بررسی شد و داده‌های فلوسایتومتری با استفاده از نرم‌افزار flowing software (BD Biosciences) آنالیز شدند.

تمایز BM-MSCs به غضروف

تمایز به غضروف با استفاده از روش کشت کوچک توده (micromass culture) استفاده شد. برای این منظور به تعداد ۲۰۰/۰۰۰ سلول به یک لوله ۱۵ میلی‌لیتری منتقل شد. سلول‌ها با ۱۲۰۰ دور در دقیقه به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ شدند. سپس محیط رویی

استخوان و غضروف و نیز سلول درمانی در حال افزایش است و کارآزمایی‌های بالینی متعددی با استفاده از این سلول‌ها برای درمان بیماری‌های استخوانی و شکستگی‌ها انجام شده است، لذا شناخت مکانیزم‌های درگیر در کنترل پتانسیل تمایزی MSCs ضروری است. G9a به‌عنوان یک فاکتور کلیدی در کنترل رفتار MSCs و نیز به‌عنوان یک رویکرد درمانی برای کنترل سرطان، مورد توجه بسیاری از پژوهش‌گران می‌باشد. بررسی عملکرد این آنزیم در کنترل استئوژن MSCs می‌تواند منجر به استفاده بهتر این سلول‌ها در کاربردهای درمانی، صنعتی و تحقیقاتی شده و کارایی این سلول‌ها را در ترمیم بافت‌ها و شکستگی‌ها را بهبود ببخشد. همچنین مهار این آنزیم برای کنترل متاستاز، می‌تواند عملکرد و رفتار MSCs را تحت تأثیر قرار دهد، لذا بسیار ضروری به نظر می‌رسد که تأثیر مهار این آنزیم بر MSCs و نیز سایر سلول‌های بدن مطالعه شود. در این مطالعه عملکرد آنزیم G9a در MSCs مشتق از مغز استخوان رت (BM-MSCs) با استفاده از یک کوچک مولکول اختصاصی به نام A366 مهار شده و میزان پتانسیل استئوژنیک سلول‌ها مورد ارزیابی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

جداسازی و کشت BM-MSCs

رت‌ها با سن دو تا سه ماهه از پژوهشگاه رویان تهیه شده و به اتاق تشریح منتقل شده و با کلروفرم بی‌هوش شدند. سپس سلول‌های مغز استخوان، طبق یک پروتوکول استاندارد جداسازی شده و سپس سلول‌ها به همراه محیط کشت کامل (DMEM+ 15% FBS+Pen/Strep) به یک پلیت شش چاهکی منتقل شدند (Baghaban Eslaminejad *et al.*, 2008). سپس ظروف موردنظر به درون انکوباتور CO₂ دار (۳۷ °C، ۵٪ O₂، ۹۵٪ CO₂) منتقل گردید. سلول‌های چسبنده‌ای که مورفولوژی فیبروبلاستی داشتند سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از مغز استخوان (BM-MSCs) در نظر گرفته شدند. تعویض

دگزامتازون، ۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر اسکوربیک ۲- فسفات و ۱۰ میلی‌مولار بتا گلیسرول فسفات بود. سلول‌ها به مدت ۳ هفته در این محیط تمایز استخوان کشت و نگهداری شدند. در طول این مدت هر سه روز یکبار تعویض محیط انجام شد. در پایان هفته سوم میزان تمایز استخوانی توسط رنگ‌آمیزی آلیزاین رد، بررسی میزان فعالیت آلکالین فسفاتاز (ALP)، میزان رسوب ماتریکس معدنی و نیز Real Time-PCR مورد ارزیابی قرار گرفت.

ارزیابی میزان تمایز به استخوان

در پایان مدت تمایز به استخوان (هفته سوم)، محیط رویی سلول‌ها خارج شده و سلول‌ها با PBS شستشو داده شدند. سپس سلول‌ها با استفاده از پروتکل استاندارد رنگ‌آمیزی آلیزاین رد رنگ‌آمیزی شدند و با استفاده از میکروسکوپ اینورت مجهز به دوربین مورد بررسی قرار گرفتند (Baghaban *et al.*, 2008). برای کمی‌سازی رنگ آلیزاین رد درون هر چاهک، محلول chloride cetylpyridinium (CPC) به چاهک‌ها اضافه شده و به مدت دو ساعت در ۳۷ درجه قرار گرفتند. سپس مقداری از محلول رنگی هر چاهک به چاهک‌های ظروف ۹۶ چاهکی منتقل شده و جذب نمونه‌ها توسط دستگاه micro ELISA Reader در ۴۰۵ قرائت شد.

در این مطالعه میزان فعالیت ALP در سلول‌های استخوانی با استفاده از کیت اختصاصی (ab83369) و طبق دستورالعمل شرکت سازنده مورد بررسی قرار گرفت. در این کیت p-nitrophenyl phosphate (pNPP) به عنوان یک سوپسترا قرار گرفته و به دنبال دفسفریله شدن توسط ALP، تولید رنگ زرد می‌کند که مقدار آن توسط پلیت ریدر و در ۴۰۵ نانومتر قابل اندازه‌گیری است.

بررسی بیان ژن‌های ویژه سلول‌های استخوانی

تخلیه شده و محیط کندروژنیک (شامل محیط DMEM حاوی، ۵۰ میلی‌گرم ITS+premix، ۱۰ نانوگرم BMP-6، ۱۰ نانوگرم فاکتور رشد TGF-B3، ۱/۲۵ میلی‌گرم آلبومین سرم گاو و ۱ درصد FBS) به پلت‌های سلولی رسوب داده در ته لوله اضافه شد. محیط تمایز غضروف هر ۳-۴ روز یکبار به مدت سه هفته تعویض شد. سپس بعد از انجام مراحل بافتی و برش‌گیری، نمونه‌ها با استفاده از رنگ‌آمیزی اختصاصی تولوئیدین بلو مورد ارزیابی قرار گرفتند.

تمایز BM-MSCs به سلول‌های چربی

BM-MSCs در پاساژ سوم به تعداد ۱۰۰ هزار سلول به‌ازای هر چاهک ظروف کشت شش چاهکی کشت شدند. بعد از این که سلول‌ها تقریباً ۸۰ درصد از مساحت کف چاهک‌ها را اشغال کردند، محیط سلول‌ها با محیط ویژه تمایز به چربی (محیط کشت BM-MSCs به همراه یک میکرومولار دگزامتازون، ۵۰۰ میکرومولار ایزوبوتیل زانتین، ۵ میکرومولار انسولین، ۲۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر اسکوربیک ۲- فسفات و ۲۰۰ میکرومولار ایندومتاسین) جایگزین شد. سلول‌ها به مدت سه هفته در محیط تمایزی فوق کشت و نگهداری شدند. در پایان هفته سوم میزان تمایز چربی با استفاده از رنگ‌آمیزی اوایل مورد ارزیابی قرار گرفت.

تمایز BM-MSCs به سلول‌های استخوانی

BM-MSCs در پاساژ سوم به تعداد ۱۰۰ هزار سلول به‌ازای هر چاهک ظروف کشت شش چاهکی کشت شدند. بعد از این که تقریباً ۸۰ درصد از مساحت کف چاهک‌ها توسط BM-MSCs پوشیده شد، محیط سلول‌ها با محیط کامل حاوی غلظت‌های ۱ μM، ۳ μM و ۵ μM کوچک مولکول A366 تعویض شده و به مدت دو روز در این محیط کشت شدند. سپس محیط سلول‌ها با محیط ویژه تمایز به استخوان جایگزین شد. محیط تمایز به استخوان شامل محیط کشت کامل BM-MSCs به همراه ۱۰ میکرومولار

گرفته شد و معنی‌داری داده‌ها در سطح ۰/۰۵ تعیین شد. همه داده‌ها به صورت میانگین \pm انحراف معیار (mean \pm SD) برای حداقل سه تکرار جداگانه ارائه شده‌اند.

نتایج

تأیید ماهیت سلول‌های بنیادی مزانشیمی استخراج‌شده از مغز استخوان (BM-MSCs)
سلول‌های مشتق از مغز استخوان رت در محیط اختصاصی BM-MSCs کشت و تکثیر شدند و در پاساژ سوم، ماهیت بنیادی مزانشیمی بودن سلول‌ها مورد بررسی قرار گرفت (شکل ۱). بررسی میکروسکوپی سلول‌ها در پاساژهای مختلف نشان داد که BM-MSCs به صورت چسبیده رشد کرده و مورفولوژی فیروبلاستی داشتند (شکل ۱-A). همچنین سلول‌ها در پاساژ سوم با استفاده از محیط‌های اختصاصی تیمار شدند و بعد از تمایز با استفاده از رنگ‌های اختصاصی رنگ آمیزی شده و مشخص شد که سلول‌ها با بازده بالا به سمت این سه رده مزانشیمی تمایز پیدا می‌کنند. (شکل ۱-A). همچنین بررسی BM-MSCs در پاساژ سوم نشان داد نشان داد که بیش از ۸۵ درصد سلول‌ها برای دو مارکر CD73 و CD90 مثبت بوده و مارکر CD45 را بیان نمی‌کردند (شکل ۱-B) بررسی‌های سه گانه و استاندارد فوق (مورفولوژی و کشت، پتانسیل تمایزی و مارکر سطحی) نشان دادند که سلول‌های استخراج‌شده از مغز استخوان رت هر سه ویژگی کلیدی سلول‌های بنیادی مزانشیمی را داشتند (BM-MSCs).

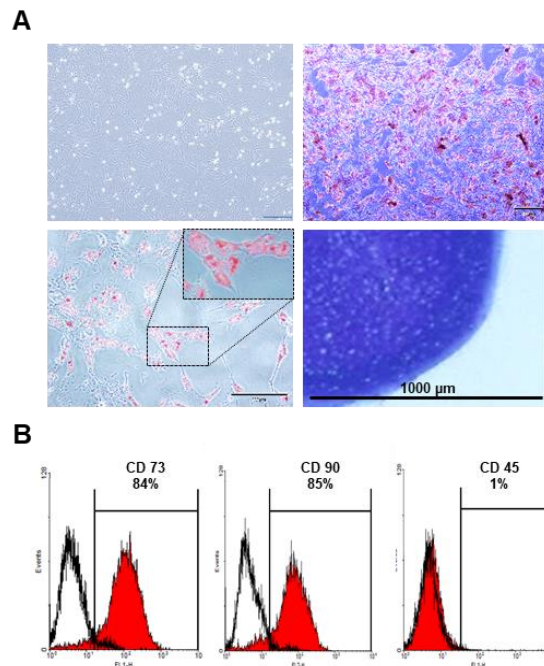
سلول‌های استخوانی که از BM-MSCs تیمار شده با غلظت سه میکرومولار A366 حاصل شده بودند برای بررسی بیان ژن‌های ویژه استخوان شامل آلکالین فسفاتاز (ALP)، استئوکالین (OCN)، فاکتور نسخه‌برداری نوع ۲ مرتبط با Runt (RUNX2) و آستریکس (OSX) و فاکتور نسخه‌برداری نوع ۹ SRY (Sox9) استفاده شدند. استخراج RNA با استفاده از کیت RNAeasy (Qiagen) انجام شد. برای استفاده از کیت از دستورالعمل شرکت سازنده تبعیت شد. پس از استخراج RNA، سنجش کیفی و کمی RNA استخراج‌شده، انجام شده و سپس مقدار ۲ میکروگرم از RNA کل برداشته شده و برای سنتز cDNA استفاده شد. در اینجا از هگزامرهای تصادفی به‌عنوان پرایمر و کیت RevertAidTM H Minus M-Mulv RT cDNA synthesis استفاده شد. سپس میزان بیان ژن‌ها با استفاده از دستگاه Power RotorGene6000 (Corbet) و با استفاده از SYBR Green PCR Master Mix (محصول Takara) انجام شد. از GAPDH به‌عنوان کنترل داخلی استفاده شد و میزان بیان ژن‌های ویژه استخوان نسبت به گروه کنترل ارزیابی شد.

آنالیزهای آماری

تمام آزمایش‌ها در سه تکرار مستقل بیولوژیکی انجام شد، مگر این‌که در مورد آزمایشی قید شده باشد. تعیین معنی‌دار بودن آماری داده‌ها از one-way ANOVA با استفاده از نرم‌افزار SPSS/PC + statistics 16.0 بهره

جدول ۱. پرایمرهای مورد استفاده برای Real Time-PCR

Gene	Forward primer	Reverse primer
ALP	AACCTGACTGACCCCTCCCTCT	TCAATCCTGCCTCCTTCCACTA
OSX	GATGGCGTCTCTCTGCTT	TATGGCTTCTTTGTGCCTCC
OCN	GAGGGCAGTAAGGTGGTGAA	GTCCGCTAGCTCGTCACAAT
OPN	GAGGAGAAGGCGCATTACAG	GTCATCGTCGTCGTCATCAT
Col1a1	CAGGTCTCGTTCATGGTACCT	GTCGAGGGCCAAGACGAA
RUNX2	GGACGAGGCAAGAGTTTCAC	GAGGCGGTTCAGAGAACAAC
GAPDH	TGCTGAGTATGTCGTGGAGT	CGGAGATGATGACCCTTTTG



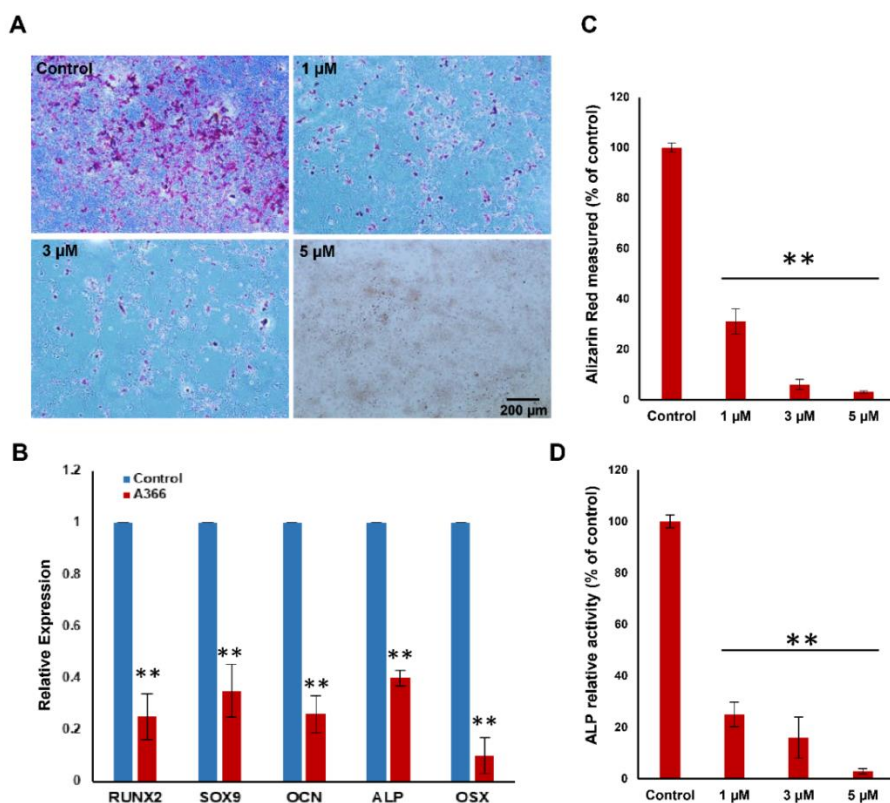
شکل ۱. ارزیابی ماهیت BM-MSCs بعد از کشت به مدت ۳ پاساژ در شرایط استاندارد سلول‌های بنیادی مزانشیمی. (A) سلول‌های مستخرج از مغز استخوان در محیط کشت به صورت سلول‌های چسبنده و فیروبلاستی شکل رشد کرده و پتانسیل تمایز به چربی، استخوان و غضروف را داشتند؛ (B) این سلول‌ها مارکرهای CD73 و CD90 را بیان کرده و CD45 را بیان نمی‌کردند.

استخوان (کلاژن ۱، نوع ۱ (Col1a1) a1، آلکالین فسفاتاز (ALP)، استئوکالین (OCN)، فاکتور نسخه‌برداری نوع ۲ مرتبط با Runt (RUNx2)، آستریکس (OSX)) با استفاده از Real Time-PCR مورد بررسی قرار گرفت (شکل ۲-B). نتایج نشان داد که بیان تمام ژن‌های مورد بررسی پایین‌تر از گروه کنترل می‌باشد (شکل ۲-B).

همچنین مقدار رنگ آلیزارین رد بعد از انجام رنگ آمیزی سلول‌های سلول‌های استخوانی مشتق شده از BM-MSCs تیمار شده با غلظت‌های مختلف A366 و گروه کنترل به صورت کمی ارزیابی شد (شکل ۲-C). همان‌طور که در نمودار قابل مشاهده است مقدار رنگ در گروه‌های ۱، ۳ و ۵ میکرومولار به ترتیب حدود ۳۰، ۵ و ۳ درصد گروه کنترل می‌باشد که نشان می‌دهد با افزایش غلظت A366 میزان رسوب ماتریکس معدنی (که نشان‌دهنده تمایز استخوانی است) کاهش می‌یابد که این کاهش در تمام گروه‌ها نسبت به گروه کنترل به صورت معنی‌دار بود ($P\text{-value} < 0.05$) (شکل ۲-C).

کاهش پتانسیل استئوژنیک BM-MSCs تیمار شده با کوچک مولکول A366

اثرات غلظت‌های ۱، ۳ و ۵ میکرومولار A366 بر فرایند تمایز استخوانی BM-MSCs در پاساژ سوم بررسی شد. بررسی رسوب ماتریکس معدنی توسط سلول‌های تمایز یافته استخوان حاصل از تمایز BM-MSCs با استفاده از رنگ‌آمیزی اختصاصی آلیزارین رد ارزیابی شد (شکل ۲-A). در گروه کنترل تمایز استخوان به خوبی انجام شده بود و بخش عمده‌ای از سلول‌های کف چاهک‌ها با استفاده از رنگ‌آمیزی آلیزارین رد به رنگ قرمز قابل تشخیص بودند (شکل ۲-A). در گروه‌های تیمار، با افزایش غلظت A366، میزان تمایز استئوژنیک به طور قابل توجهی کاهش یافت، به طوری که در غلظت ۵ میکرومولار تنها تعدادی اندکی سلول و ماتریکس اطراف آن‌ها با استفاده از رنگ‌آمیزی آلیزارین رد رنگ گرفتند (شکل ۲-A). همچنین برای اثبات ماهیت سلول‌های استخوانی تمایز یافته از BM-MSCs تیمار شده با غلظت ۳ میکرومولار A366، بیان ژن‌های اختصاصی



شکل ۲. کاهش پتانسیل تمایز به استخوان بعد از تیمار BM-MSCs با کوچک مولکول A366.

(A) رنگ آمیزی آلیزارین رد برای رنگ آمیزی ماتریکس معدنی سلول‌های استخوانی تمایز یافته از BM-MSCs تیمار شده با A366. با افزایش غلظت A366 مقدار بخش‌های رنگ گرفته کاهش یافته است؛ (B) بیان ژن‌های ویژه استخوانی در سلول‌های استخوانی مشتق از BM-MSCs تیمار شده با غلظت ۳ میکرومولار A366، تقریباً نصف بیان ژن‌ها در گروه کنترل می‌باشد. (C) مقدار رنگ آلیزارین رد جذب شده به ماتریکس معدنی سلول‌های استخوانی تمایز یافته از BM-MSCs، در تمام گروه‌های تیمار شده نسبت به کنترل به طور معنی‌دار کاهش نشان می‌دهد. (D) عملکرد آنزیم ALP در تمام گروه‌ها نسبت به گروه کنترل کاهش معنی‌دار را نشان می‌دهد ($P < 0.05$). ** داده‌ها به صورت میانگین \pm انحراف معیار ارائه شده‌اند.

اپی ژنتیک است که با انتقال گروه‌های متیل به هیستون‌های خاص می‌تواند رفتارهای سلولی MSCs را تحت تأثیر قرار دهد. در این مطالعه به بررسی نقش G9a در BM-MSCs در شرایط *in vitro* پرداخته شد. از آنجایی که در این مطالعه هدف بررسی تأثیر مهار G9a بر پتانسیل استئوژنیک BM-MSCs بود، لذا ابتدا باید هویت سلول‌های استخراج شده اثبات می‌شد. به این منظور سه ویژگی کلیدی MSCs مورد ارزیابی قرار گرفت شامل: (۱) مورفولوژی و ویژگی تکثیر به صورت چسبنده به ظروف کشت، (۲) پتانسیل تمایز به استخوان، چربی و غضروف و (۳) بیان مارکرهای مخصوص سلول‌های مزانشیمی و عدم بیان مارکرهای خونی. به

همچنین با افزایش غلظت A366، میزان عملکرد ALP کاهش نشان داد (شکل ۲-D). به طوری که در گروه‌های تیمار شده با غلظت‌های ۱، ۳ و ۵ میکرومولار A366، فعالیت آنزیم به ترتیب در حدود ۲۵، ۱۸ و ۵ درصد گروه کنترل بود که این کاهش در تمام گروه‌ها نسبت به گروه کنترل معنی‌دار بود ($P\text{-value} < 0.05$). این بررسی نشان می‌دهد که تیمار BM-MSCs با کوچک مولکول A366 موجب کاهش مشخصی در پتانسیل تمایز استئوژنیک سلول‌ها می‌شود.

بحث و نتیجه گیری

آنزیم هیستون متیل ترانسفراز G9a یکی از فاکتورهای

نیز نقش G9a را در فرایندهای استخوان‌سازی و غضروف‌سازی بررسی کرده بودند. Purcell *et al.* (2012) نشان دادند که G9a تمایز استئوژنیک و کندروژنیک را القا می‌کند. آن‌ها نشان دادند که G9a با فاکتور نسخه‌برداری Runx2 (یکی از اصلی‌ترین فاکتورها در شروع تمایز غضروف و استخوان) همکاری نزدیکی دارد. همچنین در سال‌های اخیر مشخص شده است که اگر چنانچه G9a با استفاده از تکنیک‌های مهندسی ژنتیک در موش‌ها حذف شود، سلول‌های نورال کرسٹ نمی‌توانند استخوان‌سازی انجام دهند و لذا نوزدان موش بعد از تولد فاقد بسیاری از بخش‌ها از قبیل آرواره‌ها بود و بعد از تولد از بین می‌روند. نتایج مشابه نیز در تیمار موش‌های مادر با استفاده از BIX01294 (یک مهارکننده G9a) به دست آمد که نوزادان آن‌ها استخوان‌سازی کافی نداشته و بسیاری از نوزدان بعد از تولد از بین می‌روند (Higashihori *et al.*, 2017). ما اخیراً نشان دادیم که تیمار درون صفاقی رت‌ها با A366 موجب کاهش پتانسیل استئوژنیک و افزایش پتانسیل آدیپوژنیک BM-MSCs می‌شود (Khanban *et al.*, 2019). پس به‌طور کلی، نتایج مطالعه حاضر نشان داد که مهار آنزیم G9a با استفاده از کوچک مولکول A366 باعث کاهش پتانسیل تکثیری و پتانسیل استئوژنیک BM-MSCs شده و پتانسیل آدیپوژنیک این سلول‌ها را افزایش می‌دهد. پس قبل از استفاده از A366 به‌عنوان دارو (به‌ویژه برای کنترل و درمان سرطان)، باید تأثیر آن بر MSCs مطالعه و بررسی شود. همچنین این بررسی نشان می‌دهد که برای تمایز استئوژنیک بهتر و کارآمدتر برای اهداف درمانی (از طریق مهندسی بافت یا سلول‌درمانی) باید وجود مهارکننده‌ها و فعال‌کننده‌های G9a در محیط سلول‌ها بررسی شود تا نتیجه بهتری از MSCs حاصل شود.

این صورت که سلول‌های استخراج شده از مغز استخوان، در محیط کشت اختصاصی MSCs (DMEM به‌همراه ۱۵ درصد سرم) کشت شدند. ارزیابی ویژگی‌های فوق نشان داد که سلول‌های استخراج شده ماهیت سلول‌های بنیادی مزانشیمی داشتند و در این مطالعه به‌صورت BM-MSCs نامگذاری شدند.

از آنجایی که تقریباً تا غلظت ۳ میکرومولار A366 رفتار تکثیری سلول‌ها تغییر خاصی نمی‌کند و از غلظت ۵ به بالا است که اثرات مهاری آشکار می‌شود (داده‌ها چاپ نشده‌اند)، لذا در این مطالعه برای بررسی نقش مهار آنزیم G9a بر پتانسیل استئوژنیک BM-MSCs، تنها سه غلظت از A366 بررسی شد. بررسی فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز، رنگ‌آمیزی آلیزارین رد، و بررسی بیان ژنی نشان داد که BM-MSCs تیمار شده با غلظت‌های مختلف A366 کاهش پتانسیل استئوژنیک را نشان می‌دهند که حتی غلظت‌های پایین A366 نیز می‌تواند بر پتانسیل استئوژنیک BM-MSCs تأثیر مهاری داشته باشد. در این مطالعه بیان پنج ژن ویژه استخوانی شامل ALP، OCN، RUNx2، OSX و SOX9 مورد بررسی قرار گرفت. بیان بالای ژن‌های فوق نشان‌دهنده تمایز استئوژنیک سلول‌های مورد بررسی را تأیید می‌کند. لذا بیان بالای ژن‌های ویژه استخوان در گروه کنترل، به‌همراه رسوب ماتریکس معدنی و فعالیت بالای آنزیم آلکالین فسفاتاز در گروه کنترل نشان می‌دهد که مهار آنزیم G9a با استفاده از A366 موجب کاهش پتانسیل تمایزی BM-MSCs می‌شود. به‌طور جالبی غلظت‌های پایین A366 تأثیر چندانی بر پتانسیل تکثیری BM-MSCs نداشتند. این مشاهدات پیشنهاد می‌کنند که داروهای مؤثر بر اپی‌ژنتیک می‌توانند در دوزهای مختلف اثرات متفاوتی بر سلول‌ها داشته و رفتار سلول‌ها را به گونه‌های مختلف تحت تأثیر قرار دهند. مطالعات قبلی

REFERENCES

Afanasyev, B.V.; Elstner, E.E.; Zander, A.R.; Friedenstein, A.J. (2009). Founder of the mesenchymal stem cell

concept. *Cell Ther Transplant*; 1(3): 35-38.

Baghaban Eslaminejad, M.; Talkhabi, M.;

- Zeynali, B. (2008). Effect of Lithium chloride on proliferation and bone differentiation of rat marrow-derived mesenchymal stem cells in culture. *Iranian journal of basic medical sciences*; 11(3): 143-151.
- Caplan, A. (2009). Why are MSCs therapeutic? New data: new insight. *The Journal of Pathology: A Journal of the Pathological Society of Great Britain and Ireland*; 217(2): 318-324.
- Djouad, F.; et al. (2009). Mesenchymal stem cells: innovative therapeutic tools for rheumatic diseases. *Nature Reviews Rheumatology*; 5(7): 392.
- Dominici, M.; et al. (2006). Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*; 8(4): 315-317.
- Eisenberg, C.A.; Eisenberg, L.M. (2019). G9a and G9a-Like Histone Methyltransferases and Their Effect on Cell Phenotype, Embryonic Development, and Human Disease, in *The DNA, RNA, and Histone Methylomes*. Springer. p. 399-433.
- Fabrizio, P.; Garvis, S.; Palladino, F. (2019). Histone methylation and memory of environmental stress. *Cells*; 8(4): 339.
- Freitag, J.; et al. (2016). Mesenchymal stem cell therapy in the treatment of osteoarthritis: reparative pathways, safety and efficacy-a review. *BMC musculoskeletal disorders*; 17(1): 230.
- Gazit, Z.; et al. (2019). Mesenchymal stem cells, in *Principles of regenerative medicine*. Elsevier. p. 205-218.
- Hemming, S.; et al. (2014). EZH2 and KDM6A act as an epigenetic switch to regulate mesenchymal stem cell lineage specification. *Stem cells*; 32(3): 802-815.
- Higashihori, N.; et al. (2017). Methyltransferase G9A Regulates Osteogenesis via Twist Gene Repression. *Journal of dental research*; 96(10): 1136-1144.
- Husmann, D.; Gozani, O. (2019). Histone lysine methyltransferases in biology and disease. *Nature structural & molecular biology*; 26(10): 880-889.
- Khanban, H.; Fattahi, E.; Talkhabi, M. (2019). In vivo administration of G9a inhibitor A366 decreases osteogenic potential of bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *EXCLI journal*; 18: 300.
- Liu, N.; et al. (2015). Recognition of H3K9 methylation by GLP is required for efficient establishment of H3K9 methylation, rapid target gene repression, and mouse viability. *Genes & development*; 29(4): 379-393.
- Nicetto, D.; Zaret, K.S. (2019). Role of H3K9me3 heterochromatin in cell identity establishment and maintenance. *Current opinion in genetics & development*; 55: 1-10.
- Purcell, D.J.; et al. (2012). Recruitment of coregulator G9a by Runx2 for selective enhancement or suppression of transcription. *Journal of cellular biochemistry*; 113(7): 2406-2414.
- Teven, C.M.; et al. (2011). Epigenetic regulation of mesenchymal stem cells: a focus on osteogenic and adipogenic differentiation. *Stem cells international*.
- Yin, B.; et al. (2019). Epigenetic Control of Mesenchymal Stem Cell Fate Decision via Histone Methyltransferase Ash1l. *Stem Cells*; 37(1): 115-127.