

تأثیر پارابنزوکوائنون و هیدروکوائنون بر بیان ژن RUNX2 و تمایز استخوانی سلول‌های بنیادی مزانشیمی (MSC) مغز استخوان

فاطمه ذوالقدر^۱، مجید صادقی‌زاده^{۲*}، ناصر امیری‌زاده^{۳*}، مهرداد بهمنش^۴، سامان حسینخانی^۵، مریم امانی^۶

۱- دانشجوی دکتری تخصصی، گروه ژنتیک، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

۲- استاد، گروه ژنتیک، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

۳- دانشیار، مرکز تحقیقات سازمان انتقال خون ایران، تهران، ایران

۴- دانشیار، گروه ژنتیک، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

۵- دانشیار، گروه بیوشیمی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

۶- کارشناس ارشد، مرکز تحقیقات سازمان انتقال خون ایران، تهران، ایران

دریافت مقاله: ۹۰/۰۱/۲۸

پذیرش مقاله: ۹۰/۰۴/۰۶

چکیده

هدف: بررسی تأثیر پارابنزوکوائنون و هیدروکوائنون بر بیان ژن RUNX2 (ژنی کلیدی در مسیر تمایز استئوبلاستی) و تمایز استخوانی سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان

مواد و روش‌ها: با کشت دادن سلول‌های تک هسته‌ای مغز استخوان، سلول‌های بنیادی مزانشیمی تهیه شدند؛ پس از تیمار این سلول‌ها با غلظت ۱۰ میکرومولار هر یک از دو ترکیب پارابنزوکوائنون و هیدروکوائنون، بیان ژن RUNX2 توسط روش Real-Time RT PCR در ساعت‌های ۱، ۶، ۲۴ و ۴۸ پس از تیمار ارزیابی شد و تمایز استئوبلاستی این سلول‌ها نیز توسط روش‌های رنگ‌آمیزی آلیزارین قرمز و آلکالین فسفاتاز در روزهای ۷ و ۱۴ پس از القای تمایز با استفاده از محیط کشت القا کننده، بررسی شد.

نتایج: بیان ژن RUNX2 در سلول‌های تیمار شده نسبت به کنترل افزایش چشمگیر (تا حدود ۸ برابر) نشان داد ولی تغییر چشمگیری در روند تمایز استئوبلاستی مشاهده نشد.

نتیجه‌گیری: با توجه به منابع علمی، افزایش بیان ژن RUNX2 برای بروز تمایز استئوبلاستی ضروری بوده ولی به تنهایی کافی نیست؛ بنابراین افزایش مشاهده شده در بیان این ژن در پژوهش حاضر، معرف القا یا تسريع در روند تمایز استئوبلاستی نیست. این افزایش می‌تواند شاخص افزایش فعالیت مسیر انتقال نشانه Wnt اصلی بوده و به این ترتیب بیانگر دخالت این مسیر انتقال نشانه در بروز لوسمی میلویدی حاد ناشی از مجاورت با متابولیت‌های بنزن باشد. از سوی دیگر؛ این افزایش بیان مشاهده شده در سلول‌های بنیادی مزانشیمی در حضور ترکیبات مذکور می‌تواند نشان دهنده افزایش بیان RUNX2 در سلول‌های پیش‌ساز میلویدی به عنوان تأثیر مشابه مجاورت با بنزن و متابولیت‌های آن باشد و به این صورت در بروز لوسمی میلویدی حاد ناشی از مجاورت با بنزن نقش داشته باشد.

*نشانی مکاتبه: تهران، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم زیستی، گروه ژنتیک، کدپستی: ۱۴۱۱۷۱۳۱۱۶
Email:sadeghma@modares.ac.ir

**نشانی مکاتبه: تهران، مرکز تحقیقات سازمان انتقال خون ایران، کدپستی: ۱۴۴۹۶۱۳۱۱۱
Email:n.amirizadeh@ibto.ir

کلیدواژگان: سلول‌های بنیادی مزانشیمی (MSC) انسانی، ژن RNAX2، تمایز استئوبلاستی، پارابنزوکوانینون، هیدروکوانینون

۱- مقدمه

بنزن (Benzene) هیدروکربنی آروماتیک و فرار است که به‌عنوان یک میلوتوکسین (Myelotoxin) [۱] دارای خاصیت لوسمی‌زایی [۲] شناخته شده است. این ترکیب کاربرد گسترده‌ای در صنعت دارد و به این ترتیب مجاورت با غلظت بالای این ترکیب در محل کار کسانی که در چنین صنایعی شاغلند خطر شغلی قابل توجهی محسوب می‌شود [۳]. به‌علاوه دود سیگار [۴] و دود آگروز وسایل نقلیه موتوری [۵] نیز به خاطر در برداشتن بنزن از جمله منابع آلوده کننده محیط زیست با این ترکیب سرطان‌زا به‌شمار می‌رود. نقش مجاورت با غلظت بالای این ترکیب در دراز مدت در ایجاد لوسمی میلوییدی حاد (Acute Myeloid Leukemia: AML) به اثبات رسیده است [۶].

متابولیسم این ترکیب در بدن برای ایجاد آثار هماتوتوکسیک و لوسمی‌زایی بنزن، مرحله‌ای ضروریست [۷]. ابتدا این ترکیب در کبد توسط آنزیم‌های کبدی به‌صورت اولیه متابولیزه شده و متابولیت‌هایی نظیر فنل، کتکول (Catechol) و هیدروکوانینون (Hydroquinone: HQ) ایجاد می‌کند که در مرحله بعد این ترکیبات از طریق جریان خون به بافت مغز استخوان رسیده و وارد فرایند متابولیسم ثانویه می‌شود [۷]. کتکول و HQ دوام زیادی در این بافت دارند [۸]؛ HQ در مغز استخوان توسط آنزیم میلوپراکسیداز (Myeloperoxidase: MPO) که غلظت و فعالیت زیادی در این بافت دارد تبدیل به ترکیبی اکسید کننده و واکنش‌گری قدرتمند به نام پارابنزوکوانینون (p-Benzoquinone: BQ) می‌شود که علاوه بر ایجاد استرس اکسیداتیو و القای تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژن (Reactive Oxygen Species: ROS) [۸، ۹]، با DNA، چربی‌ها و پروتئین‌های سلولی وارد واکنش شده و صدمات جدی و برگشت‌ناپذیر در سلول‌های این بافت به‌ویژه سلول‌های

پیش‌ساز میلوپیدی (Myeloid Progenitor Cells: MPCs) ایجاد می‌کند [۱۰]. بروز مکرر این صدمات و استرس اکسیداتیو القا شده توسط این ترکیب در مغز استخوان در دراز مدت، نقش بسیار حایز اهمیتی در بروز لوسمی به‌خصوص از نوع AML ایفا می‌کند [۹]. بافت مغز استخوان به‌عنوان بافت هدف اصلی سمیت و سرطان‌زایی بنزن و متابولیت‌هایش علاوه بر سیستم خون‌سازی شامل انواع سلول‌های بنیادی خونی (Hematopoietic Stem Cells: HSCs) و سلول‌های پیش‌ساز خونی (Hematopoietic progenitor cells: HPCs)، در بردارنده سلول‌های بنیادی مزانشیمی (Mesenchymal Stem Cells: MSCs) نیز هست [۱۱، ۱۲]. سلول‌های MSC علاوه بر دارا بودن پتانسیل تبدیل به انواع سلول‌های بافت استخوانی نظیر استئوبلاست‌ها، استئوسیت‌ها، کندروسیت‌ها و آدیپوسیت‌ها و بدین ترتیب دخالت در نوسازی و بازسازی و ترمیم استخوان‌ها، در تنظیم و پشتیبانی از خون‌سازی به‌صورت طبیعی نیز عملکرد به‌سزایی دارند. در مغز استخوان، جمعیت‌های سلولی مختلفی با منشأ MSC نظیر سلول‌های استئوبلاستی، سلول‌های Nestin⁺ و سلول‌های CAR (CXC chemokine ligand (cxcl)12- abundant reticular cells) از طریق اتصال مستقیم لیگاند-گیرنده یا با ترشح انواع مولکول‌های سائتوکین (Cytokine) و کموکین (Chemokine) در حفظ و نگهداری سلول‌های HSC و تنظیم فعالیت سیستم خون‌سازی دارای نقش‌های پر اهمیتی هستند [۱۳، ۱۴]. با توجه به اهمیت MSCs مغز استخوان در بازسازی بافت استخوانی و حمایت از فرایند خون‌سازی و نیز با در نظر داشتن این نکته که بافت هدف اصلی سمیت حاصل از بنزن، بافت مغز استخوان است، مطالعه تأثیرات سمی بنزن و متابولیت‌های مؤثر آن در این سلول‌ها بسیار سودمند خواهد بود. از این‌رو در این مطالعه، تأثیر غلظت ۱۰ میکرومولار دو متابولیت مخرب و پایدار بنزن در مغز استخوان، BQ و HQ،

بر بیان ژن RNX2 که یک فاکتور رونویسی کلیدی برای القای سلول‌های MSC به سلول‌های استئوبلاستی است، توسط Real-Time RT PCR و نیز تغییرات احتمالی در روند تبدیل سلول‌های MSC به استئوبلاست‌ها در محیط تمایزی حاوی غلظت ۱۰ میکرومولار BQ یا HQ توسط روش‌های رنگ‌آمیزی آلیزارین قرمز (Alizarin Red) و آلکالین فسفاتاز (Alkaline phosphatase) ارزیابی شد.

۲- مواد و روش‌ها

۲-۱- مواد مورد نیاز

محیط DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium)، FBS (Fetal Bovine Serum)، PBS (Phosphate Buffered Saline)، تریپسین-EDTA (Trypsin-Ethylendiaminetetraacetic acid)، و آنتی‌بیوتیک‌های استرپتومایسین (Streptomycin) و پنی‌سیلین (Penicillin) از شرکت Gibco و کیت‌های رنگ‌آمیزی آلکالین فسفاتاز و آلیزارین قرمز و نیز فایکول هاپپاک (Ficoll-Hypaque) (چگالی = ۱/۰۷۷ گرم در هر میلی‌لیتر) از شرکت Sigma خریداری شد. FastStart SYBR Green Master premix (کیت Real Time PCR)، تریزول (Trysol) و DNase I از شرکت Roche خریداری شد. AccuPower® CycleScript RT PreMix (کیت سنتز cDNA) و آغازگرهای (Primers) ژن‌های RUNX2 و بتا-۲ میکروگلوبولین (β -2 Microglobulin: β 2M) از شرکت Bioneer تهیه شد. دگزامتازون (Dexamethasone)، اسید اسکوربیک و گلیسرول فسفات، از شرکت Chemicon تهیه و HQ و BQ نیز از شرکت Sigma خریداری شد.

۲-۲- جداسازی و کشت سلول‌های MSC مغز استخوان

در مطالعه حاضر ۱۰ میلی‌لیتر نمونه مغز استخوان از یک نفر اهدا کننده سالم (با سن ۲۲ سال) تهیه شد. به‌طور خلاصه نمونه مغز استخوان با PBS رقیق شد، سپس به آرامی روی

فایکول برده شد و توسط سانتیفریژ و در اثر شیب غلظت سلول‌های تک هسته‌ای (لایه سلولی حد فاصل پلاسما و فایکول) جدا شدند و پس از شستشو با PBS، در فلاسک کشت ۲۵ سانتی‌متر مربعی حاوی ۶ میلی‌لیتر محیط کشت Low Glucose DMEM و FBS ۱۰ درصد و آنتی‌بیوتیک‌های استرپتومایسین و پنی‌سیلین کشت داده شدند. ۴۸ ساعت پس از آغاز کشت، سلول‌های غیرچسبیده با تعویض محیط حذف شدند. به مدت ۱۴ روز، هر ۳ روز یک‌بار محیط کشت تعویض شد. بعد از این مدت سلول‌های مزانشیمی تکثیر یافته و ۷۵-۸۰ درصد کف فلاسک را پوشانیدند. در این زمان، سلول‌ها پاساژ داده شده و به فلاسک‌های جدید منتقل شدند (پاساژ اول). پس از تکثیر سلول‌ها به میزان مرحله قبل، دو مرتبه سلول‌ها پاساژ داده شدند (پاساژ دوم) و برای انجام آزمایش‌های در فلاسک‌های ۲۵ سانتی‌متر مربعی و پلیت‌های ۲۴ خانه کشت داده شدند.

۲-۳- تأیید هویت سلول‌های MSC

لازم به ذکر است که در این مرحله با به‌کارگیری روش فلوسایتومتری مشخص شد که درصد سلول‌هایی که نشانگرهای سطحی سلول‌های بنیادی مزانشیمی CD44، CD166، CD105 و CD90، را بیان می‌کنند به ترتیب ۹۹/۵ درصد، ۹۸/۸ درصد، ۹۳ درصد و ۹۶/۸ درصد و درصد سلول‌هایی که نشانگرهای سطحی مختص رده هماتوپوئیتیک CD34 و CD45 را بیان می‌کنند به ترتیب ۲/۸ درصد و ۳/۸ درصد است. همچنین قابلیت تمایز این سلول‌ها به رده استئوژنیک توسط روش رنگ‌آمیزی آلکالین فسفاتاز مورد تأیید قرار گرفت. به این ترتیب هویت سلول‌های پاساژ دوم به‌عنوان سلول‌های MSC تأیید شد.

۲-۴- استخراج RNA، سنتز cDNA و Real Time

RT-PCR

پس از تیمار سلول‌های MSC پاساژ دوم کشت داده شده

۲-۵- تمایز سلول‌های مزانشیمی به استئوبلاست (تمایز استخوانی)

۵۰۰۰۰ سلول مزانشیمی پاساژ دوم، به همراه ۱ میلی‌لیتر محیط کشت حاوی سرم در چاهک‌های پلیت ۲۴ کشت داده شد و پلیت در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و فشار CO₂ ۵ درصد قرار داده شد. هنگامی که سلول‌ها حدود ۸۰ درصد از کف هر چاهک را پر کردند، محیط کشت خالی شد و ۱ میلی‌لیتر محیط تمایزی شامل DMEM Low Glucose حاوی دگزانتازون ۱ میلی‌مولار، اسید اسکوریک دو فسفات ۰/۱ مولار و گلیسرول دو فسفات ۱ مولار به علاوه ۱۰ درصد سرم و غلظت ۱۰ میکرومولار HQ/BQ، به چاهک‌های آزمون افزوده شد. در ۳ سری چاهک‌های دیگر که به‌عنوان کنترل استفاده شد، (۱) محیط کشت غیرتمایزی حاوی ۱۰ میکرومولار HQ/BQ، (۲) محیط کشت تمایزی و (۳) محیط غیرتمایزی به سلول‌ها اضافه شد. به مدت ۷-۱۴ روز، محیط‌های مذکور هر ۳ روز یک‌بار تعویض شد. به‌منظور بررسی تمایز سلول‌ها، در تعدادی از چاهک‌ها پس از ۷ روز و در تعدادی دیگر بعد از ۱۴ روز رنگ‌آمیزی‌های اختصاصی آلیزارین قرمز و آلکالین فسفاتاز انجام گرفت.

۲-۶- رنگ‌آمیزی آلیزارین قرمز

سلول‌ها پس از خالی کردن محیط با PBS شسته شدند و به‌منظور تثبیت سلول‌ها، اتانول سرد ۷۰ درصد به آن‌ها اضافه شد. سلول‌ها یک ساعت در دمای اتاق انکوبه شدند. پس از خالی کردن محلول تثبیت‌کننده، ۲ تا ۳ مرتبه شستشو با آب مقطر انجام گرفت. سپس ۱ میلی‌لیتر محلول آلیزارین قرمز به سلول‌ها افزوده شد و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق انکوبه شدند. پس از خالی کردن محلول رنگ‌آمیزی و ۴ مرتبه شستشو با آب مقطر، به‌منظور جلوگیری از خشک شدن سلول‌ها ۱ میلی‌لیتر آب مقطر به آن‌ها افزوده شد و در نهایت سلول‌های رنگ‌آمیزی شده با میکروسکوپ نوری ارزیابی شدند.

در فلاسک‌های ۲۵ سانتی‌متر مربعی با غلظت ۱۰ میکرومولار BQ و HQ به‌صورت جداگانه و با دو تکرار، در ساعت‌های ۱، ۶، ۲۴ و ۴۸ پس از تیمار، استخراج RNA با استفاده از ۱ میلی‌لیتر ترایزول (Trisol) (Roche) به ازای هر فلاسک انجام گرفت. کیفیت و میزان RNA استخراج شده توسط الکتروفورز روی ژل آگارز ۱ درصد و نیز با استفاده از دستگاه نانودراپ (Thermo Fisher Scientific Inc.) ارزیابی شد. آلودگی احتمالی با DNA توسط هضم آنزیمی با آنزیم DNaseI (Roche) قبل از ساخت cDNA برطرف شد و سپس با استفاده از کیت ساخت cDNA (Bioneer) و براساس برنامه کیت، cDNA از ۱ میکروگرم RNA تام سلولی ساخته شد. با استفاده از آغازگرهای طراحی شده برای تکثیر ژن‌های RUNX2 و B2M به‌عنوان کنترل داخلی (جدول ۱) و کیت (Roche) FastStart SYBRGreenMaster premix، واکنش Real-Time PCR با الگوی cDNA در حجم‌های ۲۵ میکرولیتر و با تکرار دوتایی در دستگاه ترموسایکلر (Corbett) انجام گرفت. برنامه واکنش به این صورت تنظیم شد: ابتدا دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه و پس از آن ۴۰ چرخه شامل دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ ثانیه، دمای ۵۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ ثانیه و دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه؛ تجزیه و تحلیل منحنی ذوب و الکتروفورز روی ژل آگارز ۱ درصد تأیید‌کننده تکثیر قطعات به‌صورت کاملاً اختصاصی بود (داده‌های این بخش در مقاله آورده نشده است). پس از انجام واکنش‌های PCR؛ با استفاده از نرم‌افزار REST 2008 (Corbett life science) تغییرات بیان ژن RUNX2 مورد ارزیابی و تحلیل قرار گرفت.

جدول ۱ توالی آغازگرها

نام ژن	توالی آغازگرها
RUNX2	F5'-GAG ATTTGT GGG CCG GAG TG-3' R5'-TGG GTTCCCGAG GTCCATCTAC-3'
β2M	F5'-TCTTTCTGG CCT GGA GGC TAT C-3' R5'-CGG ATGGAT GAA ACCCAG ACA C-3'

۷-۲- رنگ‌آمیزی آلكالین فسفاتاز

در این مورد نیز پس از خالی کردن محیط، سلول‌ها با PBS شسته شدند و به‌منظور تثبیت آن‌ها، ۱ میلی‌لیتر محلول تثبیت کننده به سلول‌ها افزوده شد و به‌مدت ۳۰ ثانیه در دمای اتاق انکوبه شدند. پس از ۲ تا ۳ مرتبه شستشو با آب مقطر، محلول رنگ‌آمیزی به آن‌ها اضافه شد. سلول‌ها به‌مدت ۳۰ دقیقه در تاریکی و در دمای ۱۸-۲۶ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. پس از خالی کردن محلول رنگ‌آمیزی و ۲ تا ۳ مرتبه شستشو با آب مقطر، سلول‌ها به‌مدت ۱۰ دقیقه با هماتوکسیلین (Hematoxylin) رنگ‌آمیزی شدند. در نهایت پس از ۲ تا ۳ مرتبه شستشو با آب مقطر سلول‌های رنگ‌آمیزی شده با میکروسکوپ نوری مورد ارزیابی قرار گرفتند.

۸-۲- روش‌های تجزیه و تحلیل آماری

از آزمون‌های Students' t-test و Randomization برای تجزیه و تحلیل تغییر بیان ژن استفاده شد.

۳- نتایج

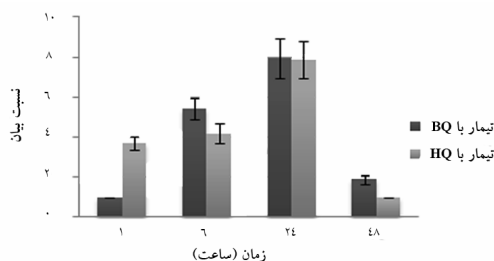
۳-۱- تغییر بیان ژن RNUX2 پس از تیمار سلول‌های

MSC با HQ و BQ

تیمار سلول‌های MSC در محیط کشت حاوی غلظت ۱۰ میکرومولار دو ترکیب HQ و BQ به‌صورت جداگانه به‌مدت ۱، ۶، ۲۴ و ۴۸ ساعت انجام گرفت. پس از استخراج RNA از سلول‌های تیمار شده و ساخت cDNA، واکنش Real-Time RT PCR توسط آغازگرهای ژن RNUX2 و آغازگرهای ژن $\beta 2M$ به‌عنوان کنترل داخلی صورت گرفت. سپس با استفاده از نرم‌افزار REST 2008، نتایج به‌دست آمده تجزیه و تحلیل شد. مقادیر نسبی بیان (نسبت بیان سلول‌های تیمار شده به سلول‌های کنترل تیمار نشده) ژن RUNX2 در سلول‌های MSC پس از تیمار با غلظت ۱۰ میکرومولار هر یک از دو ترکیب HQ و BQ در ساعت‌های ۱، ۶، ۲۴ و ۴۸

به‌ترتیب عبارت بودند از: ۱ ساعت: ۳/۷۱ برابر کنترل برای تیمار با HQ و بیان برابر با کنترل برای تیمار با BQ، ۶ ساعت: ۴/۱۸ برابر کنترل برای تیمار با HQ و ۵/۴۲ برابر کنترل برای تیمار با BQ، ۲۴ ساعت: ۷/۸۷ برابر کنترل برای تیمار با HQ و ۷/۹۳ برابر کنترل برای تیمار با BQ، ۴۸ ساعت: بیان برابر با کنترل برای تیمار با HQ و ۱/۸۸ برابر کنترل برای تیمار با BQ.

بدین ترتیب، نتیجه که به‌صورت نسبت بیان ژن RNUX2 در سلول‌های تیمار شده با غلظت ۱۰ میکرومولار BQ و HQ به بیان این ژن در سلول‌های کنترل تیمار نشده در نمودار ۱ آورده شده، نشان دهنده افزایش قابل توجه بیان ژن RNUX2 به‌ویژه در زمان‌های ۶ و ۲۴ ساعت پس از تیمار برای هر دو ترکیب است. بیان RUNX2، ۱ ساعت بعد از تیمار با BQ و ۴۸ ساعت پس از تیمار با HQ تفاوتی با سلول‌های کنترل نشان نداد. در بقیه موارد بیان در مقایسه با سلول‌های کنترل افزایش داشته و در ۲۴ ساعت پس از تیمار به حداکثر (تقریباً ۸ برابر بیشتر از بیان این ژن در سلول‌های کنترل) رسیده بود.



نمودار ۱ نسبت بیان ژن RNUX2 در سلول‌های تیمار شده با غلظت ۱۰ میکرومولار BQ و HQ به بیان این ژن در سلول‌های کنترل تیمار نشده؛ P-value محاسبه شده برای مقادیر نسبی بیان ژن‌ها پس تیمار، کمتر از ۰/۰۵ است.

۳-۲- تأثیر افزایش بیان مشاهده شده ژن RNUX2

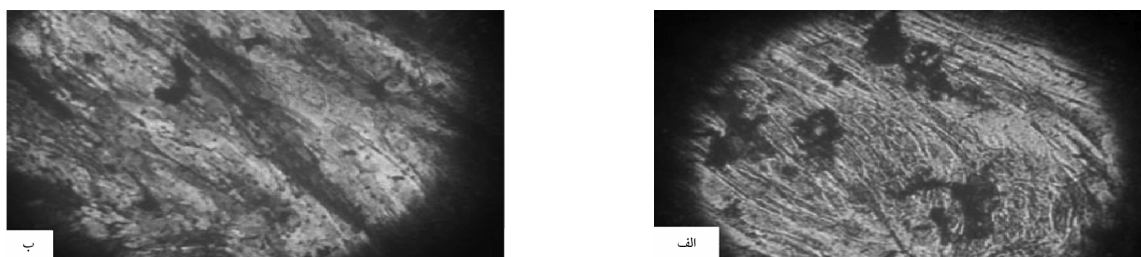
بر روند تمایز استخوانی سلول‌های MSC

به دنبال تأثیر چشمگیر غلظت ۱۰ میکرومولار دو ترکیب مذکور در افزایش بیان ژن RNUX2 و با توجه نقش به‌سزای محصول این ژن در القا و پیشبرد تمایز استخوانی

(شکل ۱ و ۲)، تفاوت مشهودی میان چاهک‌های حاوی محیط‌های تمایزی (به‌تنهایی و محیط تمایزی حاوی غلظت‌های ۱۰ میکرومولار BQ و HQ) و محیط‌های عادی (به‌تنهایی و محیط عادی حاوی غلظت‌های ۱۰ میکرومولار BQ و HQ) قابل تشخیص است ولی تفاوت چشمگیری بین چاهک‌های حاوی محیط تمایزی حاوی و فاقد BQ/HQ و نیز بین چاهک‌های حاوی محیط عادی حاوی و فاقد BQ/HQ مشاهده نمی‌شود. این نتیجه از سویی می‌تواند نشانگر فقدان تأثیر این ترکیبات بر روند تمایز استئوبلاستی بوده یا به دلیل عدم حساسیت کافی این روش رنگ‌آمیزی در آشکارسازی تفاوت حاصل از تأثیر احتمالی این ترکیبات به‌دست آمده باشد.



شکل ۱ رنگ‌آمیزی آلکالین فسفاتاز در روز هفتم؛ الف) در چاهک‌های ۱ و ۳ سلول‌ها در محیط کشت تمایزی و در چاهک‌های ۲ و ۴ سلول‌ها در محیط کشت عادی کشت داده شده‌اند. ب) در چاهک ۱ سلول‌ها در محیط کشت تمایزی حاوی غلظت ۱۰ میکرومولار BQ، در چاهک ۳ سلول‌ها در محیط کشت تمایزی حاوی غلظت ۱۰ میکرومولار HQ، در چاهک ۲ سلول‌ها در محیط کشت عادی حاوی غلظت ۱۰ میکرومولار BQ و در چاهک ۴ سلول‌ها در محیط کشت عادی حاوی غلظت ۱۰ میکرومولار HQ کشت داده شده‌اند. با این روش رنگ‌آمیزی در این مرحله، تفاوت آشکاری میان چاهک‌های عادی و تمایزی در هر دو گروه الف و ب مشاهده می‌شود ولی تفاوتی میان چاهک‌های حاوی محیط‌های کشت عادی در بین دو گروه قابل تشخیص نیست.



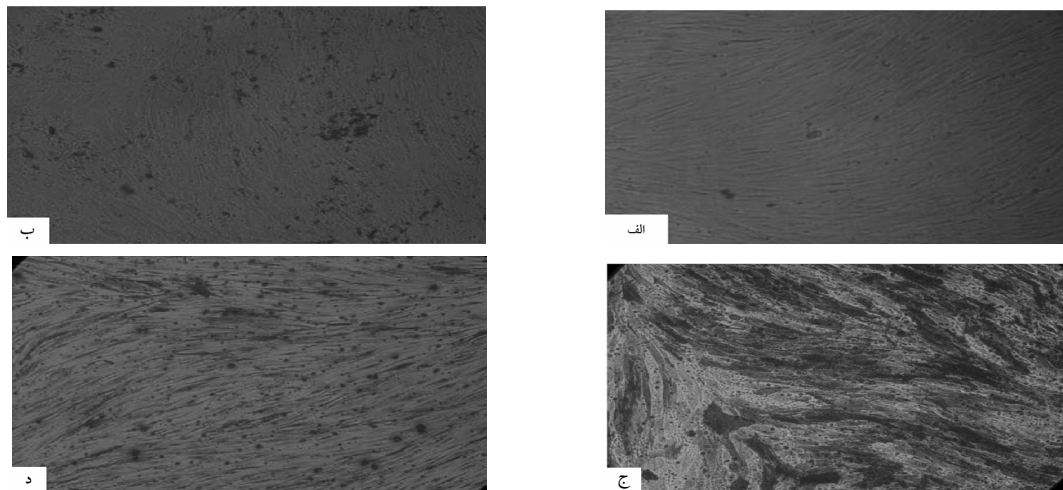
شکل ۲ تصویر میکروسکوپی سلول‌های رنگ‌آمیزی شده به روش آلکالین فسفاتاز (با بزرگنمایی $10\times$) در روز هفتم؛ الف) سلول‌های کشت شده در محیط‌های کشت عادی (حاوی و فاقد BQ یا HQ)، که آلکالین فسفاتاز در آن‌ها فعالیت اندکی نشان می‌دهد. ب) سلول‌های کشت شده در محیط‌های کشت تمایزی (حاوی و فاقد BQ یا HQ)، که فعالیت آلکالین فسفاتاز در آن‌ها به میزان قابل توجهی افزایش یافته است.

در محیط‌های تمایزی و عادی پیش از رنگ‌آمیزی و پس از آن آورده شده است. در این تصاویر سلول‌های کشت شده در

در روز چهاردهم نیز سلول‌ها به هر دو روش آلیزارین قرمز و آلکالین فسفاتاز، رنگ‌آمیزی شدند. در شکل ۳، تصویر سلول‌ها

محیط‌های عادی (به‌تنهایی و محیط عادی حاوی غلظت‌های ۱۰ میکرومولار BQ و HQ) ریخت‌شناسی مشابه و عادی (نظیر ریخت‌شناسی سلول‌های MSC) داشته و ریخت‌شناسی سلول‌های کشت شده در محیط‌های تمایزی (به‌تنهایی و محیط تمایزی حاوی غلظت‌های ۱۰ میکرومولار BQ و HQ) نیز مشابه و نظیر ریخت‌شناسی سلول‌های متراکم استئوبلاستی است. نتیجه رنگ‌آمیزی آلکالین فسفاتاز، همان‌طور که در تصویر (شکل ۴) مشاهده می‌شود، مشابه نتیجه رنگ‌آمیزی

آلکالین فسفاتاز انجام شده در روز هفتم بود. به این ترتیب که تفاوت میان چاهک‌های حاوی محیط‌های تمایزی (به‌تنهایی و محیط تمایزی حاوی غلظت‌های ۱۰ میکرومولار BQ و HQ) و محیط‌های عادی (به‌تنهایی و محیط عادی حاوی غلظت‌های ۱۰ میکرومولار BQ و HQ) قابل تشخیص بوده ولی تفاوت چندانی بین چاهک‌های حاوی محیط تمایزی حاوی و فاقد BQ/HQ و نیز بین چاهک‌های حاوی محیط عادی حاوی و فاقد BQ/HQ مشاهده نشد.



شکل ۳ تصویر میکروسکوپی سلول‌ها قبل (الف و ب) و بعد (ج و د) از رنگ‌آمیزی به روش آلکالین فسفاتاز (با بزرگمایی ۱۰×) در روز چهاردهم؛ (الف) سلول‌های کشت شده در محیط عادی (حاوی یا فاقد BQ یا HQ) که ریخت‌شناسی عادی سلول‌های MSC را دارا هستند. (ب) سلول‌های کشت شده در محیط‌های کشت تمایزی (حاوی و فاقد BQ یا HQ) که ریخت‌شناسی آن‌ها با ریخت‌شناسی عادی سلول‌های MSC تفاوت دارد؛ این سلول‌ها کوتاه‌تر از سلول‌های کشیده و دوکی شکل MSC به‌نظر می‌رسند. (ج) سلول‌های کشت شده در محیط‌های کشت تمایزی (حاوی و فاقد BQ یا HQ)، که فعالیت آلکالین فسفاتاز در آن‌ها به میزان قابل توجهی افزایش یافته است. (د) سلول‌های کشت شده در محیط عادی (حاوی و فاقد BQ یا HQ) که آلکالین فسفاتاز در آن‌ها فعالیت اندکی نشان می‌دهد.



شکل ۴ رنگ‌آمیزی آلکالین فسفاتاز در روز چهاردهم؛ (الف) در چاهک‌های ۱ و ۳ سلول‌ها در محیط کشت تمایزی و در چاهک‌های ۲ و ۴ سلول‌ها در محیط کشت عادی کشت داده شده‌اند. (ب) در چاهک ۱ سلول‌ها در محیط کشت تمایزی حاوی غلظت ۱۰ میکرومولار BQ، در چاهک ۳ سلول‌ها در محیط کشت تمایزی حاوی غلظت ۱۰ میکرومولار HQ، در چاهک ۲ سلول‌ها در محیط کشت عادی حاوی غلظت ۱۰ میکرومولار BQ و در چاهک ۴ سلول‌ها در محیط کشت عادی حاوی غلظت ۱۰ میکرومولار HQ کشت داده شده‌اند. با این روش رنگ‌آمیزی در این مرحله نیز همانند روز هفتم، تفاوت آشکاری میان چاهک‌های عادی و تمایزی در هر دو گروه الف و ب مشاهده می‌شود ولی تفاوتی میان چاهک‌های حاوی محیط‌های کشت عادی در بین دو گروه قابل تشخیص نیست.

۴- بحث

نتایج حاصل از این مطالعه نشان دهنده افزایش بیان قابل ملاحظه ژن RUNX2 در سلول‌های مغز استخوان در حضور غلظت ۱۰ میکرومولار متابولیت‌های به‌کار رفته بنزن (BQ و HQ) بود اما برخلاف آنچه انتظار می‌رفت، این افزایش بیان در روند تمایز استخوانی این سلول‌ها بی‌تأثیر بود. همان‌طور که پیش از این اشاره شد، بافت مغز استخوان بافت هدف اصلی در سمیت ایجاد شده توسط بنزن و متابولیت‌های آن نظیر HQ و BQ است [۱۱، ۱۲]. در این بافت سلول‌های سیستم خون‌سازی (سلول‌های بنیادی هماتوپوئیتیک و سلول‌های پیش‌ساز خونی) در مجاورت بسترهای حمایت‌کننده شامل سلول‌های MSC قرار گرفته‌اند. سلول‌های MSC علاوه بر دارا بودن نقش در حمایت و تنظیم فرایند خون‌سازی، مسئول بازسازی و نوسازی استخوان‌ها از طریق تمایز یافتن به انواع سلول‌های استئوبلاستی، کندروسیت‌ها (Chondrocytes) و آدیپوسیت‌ها (Adipocytes) هستند [۱۳، ۱۴]. ژن RUNX2 تولیدکننده یک پروتئین اصلی و کلیدی در مسیر تمایز استخوانی سلول‌های MSC با فعالیت دوگانه به‌صورت فعال‌کننده و بازدارنده رونویسی است که بیان آن ضمن مراحل اولیه تمایز استئوبلاستی افزایش چشمگیر پیدا می‌کند [۱۵، ۱۶]. این ژن یک فاکتور رونویسی را رمز می‌کند که سبب تحریک بیان ژن‌های متعددی از جمله Osterix (Ox) که فاکتور رونویسی مهم دیگری در پیشبرد تمایز استئوبلاستی است می‌شود [۱۷]. RUNX2 علاوه بر نقش داشتن در ایجاد جایگاه (Niche) استئوبلاستی سلول‌های HSC، از طریق فعال کردن رونویسی Opn (Osteopontin) که عملکرد آن در خاموش نگه داشتن HSC به اثبات رسیده نیز به‌طور غیر مستقیم در القای خاموشی در سلول‌های HSC مؤثر است [۱۶]. با توجه به نقش کلیدی این ژن در القای تمایز استئوبلاستی، تأثیر تیمارهای مذکور بر روند تمایز استئوبلاستی نیز در این مطالعه مورد ارزیابی قرار گرفت. همان‌طور که در بخش نتایج آمده است، حضور غلظت ۱۰ میکرومولار HQ یا BQ با وجود

افزایش قابل ملاحظه بیان ژن RUNX2، تأثیر قابل تشخیصی توسط روش‌های رنگ‌آمیزی ذکر شده (که از روش‌های بسیار معمول سنجش تمایز استئوبلاستی هستند) درالقا یا تسریع روند تمایز استئوبلاستی ایجاد نکردند. نتیجه مشاهده شده به این صورت قابل توجیه است که با وجود اهمیت و ضرورت فاکتور رونویسی RUNX2 در تمایز استئوبلاستی، تحریک بیان آن برای القای تمایز استئوبلاستی کافی نیست [۱۸، ۱۹] و فعالیت فاکتورهای رونویسی گوناگون دیگر برای به‌راه انداختن مسیرهای تمایز استئوبلاستی ضروری هستند [۲۰]. بنابراین افزایش بیان این ژن الزاماً همراه با القای تمایز استئوبلاستی نبوده و فقط می‌تواند به‌عنوان «شاخص» القای تمایز استئوبلاستی مورد بررسی قرار گیرد. در نتیجه در مورد مطالعه ارائه شده، پاسخ این سؤال که «آیا افزایش قابل ملاحظه بیان ژن RUNX2 در اثر حضور غلظت ۱۰ میکرومولار HQ یا BQ در محیط کشت سلول‌های MSC، معرف القا یا تسریع روند تمایز استئوبلاستی است؟» منفی است. به‌منظور تأیید نتیجه به‌دست آمده از مطالعه ارائه شده به‌صورت دقیق‌تر و با حساسیت بالاتر، می‌توان در سلول‌های MSC تیمار شده با غلظت ۱۰ میکرومولار HQ یا BQ، بیان ژن‌های استئوکلسین (Osteocalcin) و استئوپونتن (Osteopontin) را که طی تمایز استئوبلاستی افزایش پیدا می‌کنند، مورد ارزیابی قرار داده و همچنین از روش سنجش کمی فعالیت آلکالین فسفاتاز بهره گرفت.

از سوی دیگر؛ سلول‌های MSC به‌عنوان بخشی از جایگاه هماتوپوئیتیک (Hematopoietic Niche) با تولید لیگاندهای مسیر انتقال نشانه Wnt اصلی (Canonical Wnt Signaling) نقش مهمی در تنظیم فعالیت این مسیر انتقال نشانه در سلول‌های HSC و در نتیجه در کنترل فعالیت و خاموشی (Quiescence) این سلول‌ها ایفا می‌کنند [۲۱]. با توجه به نقش اثبات شده افزایش فعالیت این مسیر انتقال نشانه در القای بیان RUNX2 از طریق بتا-کنین (TCF1/Transmembrane Cell Factor 1/β-catenin) [۱۷، ۲۲]، افزایش شدید بیان RUNX2 می‌تواند معرف افزایش در فعالیت این مسیر انتقال نشانه باشد. همچنین فعالیت

دایمی مسیر انتقال نشانه Wnt کانونیکال در نمونه‌های به‌دست آمده از بیماران مبتلا به AML مشاهده شده است [۲۳]. بدین ترتیب این افزایش در بیان RUNX2، می‌تواند بیانگر دخالت این مسیر انتقال نشانه در بروز AML ناشی از مجاورت با بنزن و متابولیت‌های آن (HQ و BQ) باشد. درستی این ارتباط پیش‌بینی شده می‌تواند با بررسی میزان بیان TCF1، فعالیت بتا-کتنین یا سایر واسطه‌های این مسیر نظیر لیگاندها ارزیابی شود.

مطالعات ژنتیکی بیانگر دخالت RUNX2 به‌عنوان ژن القا کننده سرطان در ایجاد تومورهای سخت (Solid Tumors) در سرطان‌های سینه و پروستات است [۲۴]. همچنین افزایش بیان این ژن در انواعی از AML نظیر c-AML (Cutaneous Myelomonocytic Leukemia) مشاهده شده [۲۵] و نیز در بروز AML در موش‌های دارای جهش Cbfb-MYH11 نقش دارد [۲۶]. این جهش که در ۱۲ درصد نمونه‌های انسانی AML رخ می‌دهد، به‌صورت وارونگی کروموزومی [inv(16)(p13;q22)] بوده و در نتیجه آن پروتئینی الحاقی (CBFβ-SMMHC) شامل پروتئین‌های CBFβ و SMMHC (Smooth Muscle Myosin Heavy Chain) ایجاد می‌شود. لازم به ذکر است فاکتورهای رونویسی اعضای خانواده RUNX (CBFA/AML)، با ایجاد هتروداایمر با CBFβ، بیان ژن‌های هدف خود را تنظیم می‌کند [۲۷، ۲۸]. در مطالعه‌ای توسط کو (Kou) و همکاران [۲۹]، مشخص شد که RUNX2 در سلول‌های HSC و پیش‌سازهای ابتدایی میلوپیدی بیان بالایی دارد ولی این میزان طی تمایز میلوپیدی در حد چشمگیری کاهش می‌یابد. در این مطالعه نقش تداوم بیان بالای RUNX2 در پیش‌سازهای میلوپیدی به‌صورت ممانعت از بروز

تمایز میلوپیدی و بازدارندگی بیان ژن‌های *Mpo*، *Csf1R*، *Cebpd*، *Cdkn1a* (بازدارنده چرخه سلولی) و نشانگرهای میلوپیدی *Cebpa* و *Gfi1* به اثبات رسیده است. این مطالعه همچنین همکاری RUNX2 با جهش Cbfb-MYH11 را در ایجاد AML در موش‌های حامل این جهش ژنتیکی تأیید نموده است. بدین ترتیب تنظیم بیان RUNX2 در پیش‌سازهای میلوپیدی برای رویداد فرایند خون‌سازی به‌صورت طبیعی و جلوگیری از بروز بدخیمی میلوپیدی ضروری به‌نظر می‌رسد، چرا که تداوم بیان افزایش یافته این ژن می‌تواند سبب بروز اختلال در برنامه تمایز سلولی و باعث پیشبرد فرایند ترانسفورماسیون (Transformation) شود. در مطالعه حاضر، تأثیر ترکیبات BQ و HQ به‌صورت افزایش بیان این ژن در سلول‌های MSC مشخص شد. با توجه به مطالب فوق، این فرضیه که این ترکیبات تأثیری مشابه بر سلول‌های پیش‌ساز میلوپیدی داشته و با افزایش بیان این ژن در این سلول‌ها در بروز AML نقش ایفا می‌کند، منطقی به‌نظر می‌رسد. با بررسی بیان این ژن در پی تیمارهای مشابه در سلول‌های پیش‌ساز میلوپیدی می‌توان درستی این فرضیه را مورد ارزیابی قرار داد.

۵- تشکر و قدردانی

از معاونت پژوهشی دانشگاه تربیت مدرس و بخش تحقیقات سازمان انتقال خون ایران همچنین مرکز رشد ناجا بابت مساعدت علمی و مالی بی‌دریغ در انجام این پژوهش قدردانی می‌شود.

۶- منابع

- [1] Santesson C. About poisoning with coal tar, petrol, a virtual death trap. Arch Hyg Berl 1897; 31: 336-76. (Article in German)
- [2] Le Noire MM CH. A case of purpura attributed to the toxicity of benzene. Bull Mem Soc Med Hosp Paris 1897; 3: 1251. (Article in French)
- [3] Khalade A, Jaakkola MS, Pukkala E, Jaakkola JJ. Exposure to benzene at work and the risk of leukemia: a systematic review and meta-analysis. Environ Health 2010; 9: 31.

- [4] Wallace L. Cigarettes: point source for benzene exposure? *Environ Health Perspect* 1993; 101(1): 14-6.
- [5] Wallace LA. Major sources of benzene exposure. *Environ Health Perspect* 1989; 82: 165-9.
- [6] Aksoy M. Benzene carcinogenicity. In: *Benzene Carcinogenicity*. Aksoy M, (ed.). Boca Raton, FL: CRC Press, 1988; p: 51-113.
- [7] Cooper K. Benzene metabolism. In: *Benzene Carcinogenicity*. Aksoy M, (ed.). Boca Raton, FL: CRC Press. 1988; p: 33-58.
- [8] Snyder R, Hedli CC. An overview of benzene metabolism. *Environ Health Perspect* 1996; 104 (Suppl 6): 1165-71.
- [9] Atkinson TJ. A review of the role of benzene metabolites and mechanisms in malignant transformation: summative evidence for a lack of research in nonmyelogenous cancer types. *Int J Hyg Environ Health* 2009; 212(1): 1-10.
- [10] Ross D. The role of metabolism and specific metabolites in benzene-induced toxicity: evidence and issues. *J Toxicol Environ Health A* 2000; 61(5-6): 357-72.
- [11] Ross D, Siegel D, Schattenberg DG, Sun XM, Moran JL. Cell-specific activation and detoxification of benzene metabolites in mouse and human bone marrow: identification of target cells and a potential role for modulation of apoptosis in benzene toxicity. *Environ Health Perspect* 1996; 104(Suppl 6): 1177-82.
- [12] Zhou H, Kepa JK, Siegel D, Miura S, Hiraki Y, Ross D. Benzene metabolite hydroquinone up-regulates chondromodulin-I and inhibits tube formation in human bone marrow endothelial cells. *Mol Pharmacol* 2009; 76(3): 579-87.
- [13] Omatsu Y, Sugiyama T, Kohara H, Kondoh G, Fujii N, Kohno K, Nagasawa T. The essential functions of adipo-osteogenic progenitors as the hematopoietic stem and progenitor cell niche. *Immunity* 2010; 33(3): 387-99.
- [14] Méndez-Ferrer S, Michurina TV, Ferraro F, Mazloom AR, Macarthur BD, Lira SA, Scadden DT, Ma'ayan A, Enikolopov GN, Frenette PS. Mesenchymal and haematopoietic stem cells form a unique bone marrow niche. *Nature* 2010; 466(7308): 829-34.
- [15] Komori T. Requisite roles of Runx2 and Cbfb in skeletal development. *J Bone Miner Metab* 2003; 21(4): 193-7.
- [16] Wang CQ, Jacob B, Nah GS, Osato M. Runx family genes, niche, and stem cell quiescence. *Blood Cells Mol Dis* 2010; 44(4): 275-86.
- [17] Pinzone JJ, Hall BM, Thudi NK, Vonau M, Qiang YW, Rosol TJ, Shaughnessy JD Jr. The role of Dickkopf-1 in bone development, homeostasis, and disease. *Blood* 2009; 113(3): 517-25.
- [18] Miyazono K, Maeda S, Imamura T. Coordinate regulation of cell growth and differentiation by TGF-beta superfamily and Runx proteins. *Oncogene* 2004; 23(24): 4232-7.
- [19] Lee MH, Javed A, Kim HJ, Shin HI, Gutierrez S, Choi JY, Rosen V, Stein JL, van Wijnen AJ, Stein GS, Lian JB, Ryoo HM. Transient upregulation of CBFA1 in response to bone morphogenetic protein-2 and transforming growth factor beta1 in C2C12 myogenic cells coincides with suppression of the myogenic

- phenotype but is not sufficient for osteoblast differentiation. *J Cell Biochem* 1999; 73(1): 114-25.
- [20] Qi H, Aguiar DJ, Williams SM, La Pean A, Pan W, Verfaillie CM. Identification of genes responsible for osteoblast differentiation from human mesodermal progenitor cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100(6): 3305-10.
- [21] Suda T, Arai F. Wnt signaling in the niche. *Cell* 2008; 132(5): 729-30.
- [22] Gaur T, Lengner CJ, Hovhannisyan H, Bhat RA, Bodine PV, Komm BS, Javed A, van Wijnen AJ, Stein JL, Stein GS, Lian JB. Canonical WNT signaling promotes osteogenesis by directly stimulating Runx2 gene expression. *J Biol Chem* 2005; 280(39): 33132-40.
- [23] Nemeth MJ, Bodine DM. Regulation of hematopoiesis and the hematopoietic stem cell niche by Wnt signaling pathways. *Cell Res* 2007; 17(9): 746-58.
- [24] van der Deen M, Akech J, Wang T, FitzGerald TJ, Altieri DC, Languino LR, Lian JB, van Wijnen AJ, Stein JL, Stein GS. The cancer-related Runx2 protein enhances cell growth and responses to androgen and TGFbeta in prostate cancer cells. *J Cell Biochem* 2010; 109(4): 828-37.
- [25] Dijkman R, van Doorn R, Szuhai K, Willemze R, Vermeer MH, Tensen CP. Gene-expression profiling and array-based CGH classify CD4+CD56+ hematodermic neoplasm and cutaneous myelomonocytic leukemia as distinct disease entities. *Blood* 2007; 109(4): 1720-7.
- [26] Castilla LH, Perrat P, Martinez NJ, Landrette SF, Keys R, Oikemus S, Flanagan J, Heilman S, Garrett L, Dutra A, Anderson S, Pihan GA, Wolff L, Liu PP. Identification of genes that synergize with Cbfb-MYH11 in the pathogenesis of acute myeloid leukemia. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; 101(14): 4924-9.
- [27] Wang S, Wang Q, Crute BE, Melnikova IN, Keller SR, Speck NA. Cloning and characterization of subunits of the T-cell receptor and murine leukemia virus enhancer core-binding factor. *Mol Cell Biol* 1993; 13(6): 3324-39.
- [28] Ogawa E, Inuzuka M, Maruyama M, Satake M, Naito-Fujimoto M, Ito Y, Shigesada K. Molecular cloning and characterization of PEBP2 beta, the heterodimeric partner of a novel *Drosophila* runt-related DNA binding protein PEBP2 alpha. *Virology* 1993; 194(1): 314-31.
- [29] Kuo YH, Zaidi SK, Gornostaeva S, Komori T, Stein GS, Castilla LH. Runx2 induces acute myeloid leukemia in cooperation with Cbfbeta-SMMHC in mice. *Blood* 2009; 113(14): 3323-32.