

The let-7f microRNA Functions as a Negative Regulator of HNF4a Expression in Human Adipose Tissue-derived Stem Cells

Nahid Davoodian¹, Abbas Sahebghadam Lotfi^{2*}, Masoud Soleimani³,
Seyed Javad Mola⁴

1- Ph.D. Candidate, Department of Clinical Biochemistry, Faculty of Medical Science, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

2- Professor, Department of Clinical Biochemistry, Faculty of Medical Science, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

3- Associated Professor, Department of Hematology, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

4- Associated Professor, Department of Genetics, Faculty of Biological Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

**Corresponding Address: P.O.Code: 1411713116, Department of Clinical Biochemistry, Faculty of Medical Science, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran
Email: lotfi_ab@modares.ac.ir*

Received: 22/Jan/2014, Accepted: 17/Mar/2014

Abstract

Objective: microRNAs (miRNAs) are noncoding RNAs that function as key regulators of diverse biological activities such as cellular metabolism, cell proliferation and cell cycle regulation. Recent studies have indicated the high potential of these small molecules to control stem cell differentiation into desired cells. The aim of present study is to investigate the possible effect of let-7f on expression of hepatic nuclear factor 4 alpha (HNF4a) and some hepatic specific factors such as albumin (ALB), alpha fetoprotein (AFP), cytokeratin18 (CK18) and cytokeratin19 (CK19) in human adipose tissue derived stem cells (hADSCs).

Methods: ADSCs were isolated from human adipose tissue using collagenase type I and were transduced by recombinant lentiviruses that contained human inhibitor let-7f and Scramble (negative control). Afterward, the expressions of HNF4a, ALB, AFP, CK18 and CK19 were evaluated by Real-time PCR at different time points.

Results: Transduction efficiency of lentiviral vectors into ADSCs was more than 80% as judged by the expression of the GFP reporter gene. Real-time PCR analysis revealed that inhibition of let-7f in hADSCs resulted in significant up regulation of hepatic specific genes compared with the negative control. The expression level of HNF4a also increased in experimental cells at day 14, which supported the suppression of HNF4a expression by let-7f.

Conclusion: The results of this study identified let-7f as a negative regulator of HNF4a expression in hADSCs and increased the expression of hepatocyte specific factors through silencing of let-7f. Therefore, suppression of let-7f could be a considerable tool for hepatic differentiation of hADSCs.

Keywords: microRNA, Lentivirus, Adipose tissue-derived stem cells, Hepatic nuclear factor 4 alpha

ترانسداکشن لنتی ویروسی میکرو RNAlet-7f منجر به افزایش بیان ژن HNF4a در سلول‌های بنیادی جدا شده از بافت چربی انسانی می‌شود

ناهید داودی^۱، عباس صاحب‌قدم لطفی^{۲*}، مسعود سلیمانی^۳، سید جواد مولی^۴

۱- دانشجوی دکتری تخصصی، گروه بیوشیمی بالینی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

۲- استاد، گروه بیوشیمی بالینی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

۳- دانشیار، گروه هماتولوژی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

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

*آدرس نویسنده مسئول: ایران، تهران، کدپستی: ۱۴۱۷۱۳۱۱۶، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم پزشکی، گروه بیوشیمی بالینی

Email: lotfi_ab@modares.ac.ir

پذیرش مقاله: ۹۲/۱۲/۲۴

دریافت مقاله: ۹۲/۱۰/۲۲

چکیده

هدف: میکرو RNA ها، RNA های غیر کد کننده‌ای است که به‌عنوان تنظیم کننده چندین فعالیت زیستی مثل متابولیسم، تکثیر و تنظیم سلولی عمل می‌کند. مطالعات اخیر نشان دهنده پتانسیل بالای این مولکول‌های کوچک در تمایز سلول‌های بنیادی به سلول‌های مشخص است. هدف از مطالعه حاضر ارزیابی اثر let-7f بر بیان ژن عامل هسته‌ای کبد (HNF4a) و عوامل خاص کبدی از جمله آلبومین، آلفا فیتوپروتئین، سیتوکراتین ۱۸ و سیتوکراتین ۱۹ در سلول‌های بنیادی جدا شده از بافت چربی انسانی است.

مواد و روش‌ها: سلول‌های بنیادی جدا شده از بافت چربی تحت تأثیر آنزیم کلاژناز نوع I از بافت چربی انسانی استخراج شده و سپس با استفاده از لنتی ویروس‌های حاوی مهار کننده let-7f و Scramble (کنترل منفی) ترانسداکت شدند. سپس تغییر در سطح بیان ژن‌های HNF4a، آلبومین، آلفا فیتوپروتئین، سیتوکراتین ۱۸ و سیتوکراتین ۱۹ در زمان‌های متفاوت با استفاده از روش Real-time PCR بررسی شد.

نتایج: کارآیی ترانسداکشن ناقل‌های لنتی ویروسی در سلول‌های بنیادی جدا شده از بافت چربی انسانی بیش از ۸۰ درصد بود که با بررسی بیان پروتئین فلورسانت سبز ارزیابی شد. نتایج Real-time PCR نشان داد که مهار let-7f در سلول‌های بنیادی جدا شده از بافت چربی انسانی منجر به افزایش معنی‌دار در بیان ژن‌های خاص کبدی در مقایسه با کنترل منفی می‌شود. همچنین بیان ژن HNF4a روز چهاردهم بعد از ترانسداکشن افزایش داشت که تأیید کننده سرکوب ژن HNF4a توسط let-7f است.

نتیجه‌گیری: نتایج این تحقیق نشان داد که let-7f به‌عنوان یک تنظیم کننده منفی در بیان ژن HNF4a عمل می‌کند و مهار let-7f منجر به افزایش بیان نشانگرهای ویژه کبدی می‌شود. بنابراین مهار let-7f می‌تواند ابزار مؤثری در به راه‌اندازی تمایز سلول‌های بنیادی جدا شده از بافت چربی انسانی به سمت رده هپاتوسیتی باشد.

کلیدواژگان: میکرو RNA، لنتی ویروس، سلول‌های بنیادی جدا شده از بافت چربی، عامل هسته‌ای کبد (HNF4a)

مجله علوم پزشکی مدرس: آسیب شناسی زیستی، دوره ۱۷، شماره ۱، بهار ۱۳۹۳، صفحات: ۴۹-۳۹

مقدمه

سلول‌های بنیادی مزانشیمی (Mesenchymal Stem Cells: MSCs) سلول‌های بنیادی بزرگسالی هستند که علاوه بر تکثیر سریع و گسترده، توانایی تمایز به رده‌های متنوع سلولی از جمله چربی، استخوان، کبد و غیره را دارند [۱، ۲]. MSC ها از منابع مختلفی مثل مغز استخوان [۳]، خون بند ناف [۴]، مایع آمنیوتیک [۵] و بافت چربی [۶] جداسازی می‌شود.

مشخص شده است که بافت چربی منبعی غنی از سلول‌های بنیادی مزانشیمی بوده که بسیار مشابه سلول‌های مزانشیمی جدا شده از مغز استخوان است [۷]. سلول‌های بنیادی جدا شده از بافت چربی (Adipose Tissue Derived Stem Cells: ADSCs) می‌توانند به انواع متنوعی از رده‌های سلولی مثل رده استخوانی، چربی [۸]، عصبی [۹]، عضلانی [۱۰] و کبدی [۱۱] تمایز یابند. به‌علاوه ADSC ها پتانسیل تکثیر بیشتری نسبت به MSC های جدا شده از سایر بافت‌ها دارند [۱۲].

مطالعات اخیر نشان دهنده نقش ویژه میکرو RNA ها (miRNA) در تنظیم خصوصیات سلول‌های بنیادی در گیاهان و جانوران است [۱۳]. miRNA ها دسته‌ای از RNA های غیر کدکننده است که از طریق مهار ترجمه RNA به پروتئین یا تخریب mRNA، بیان ژن را تنظیم می‌کند. براساس نتایج آماری و محاسباتی تخمین زده می‌شود که هر miRNA جانوری صدها RNA متفاوت را تنظیم کرده و بر همین اساس به‌نظر می‌رسد که حدود ۵۰ درصد از کل ژنوم انسانی توسط miRNA ها کنترل می‌شود [۱۴].

علاوه بر این؛ miRNA ها در فعالیت‌های متنوع زیستی مثل متابولیسم سلولی، تکثیر سلول، تنظیم چرخه سلولی و مرگ سلولی برنامه‌ریزی شده (Apoptosis) نقش کلیدی ایفا می‌کند [۱۵، ۱۶]. همچنین miRNA های خاصی در تمایز سلولی و ارگانونژنز (Organogenesis)، به‌ویژه در کنترل تکامل عصبی، هماتوپوزیز (Hematopoiesis)، تکامل قلب و عروق و آنژیوژنز (Angiogenesis) دخالت دارد [۱۷، ۱۸].

مشخص شده است که سلول‌های بنیادی مجموعه متمایزی از miRNA ها را داشته که نشان دهنده نقش ویژه آن‌ها در تنظیم عملکرد سلول‌های بنیادی است [۱۹، ۲۰]. miRNA ها تقسیم و تمایز سلول‌های بنیادی را کنترل می‌کند [۲۱-۲۳] و اخیراً مشخص شده است که الگوهای متنوعی از miRNA ها نیز در تمایز MSC ها به انواع خاصی از سلول‌ها نقش دارد [۲۴]. برای مثال miR-124 و miR-9 در تمایز عصبی MSC ها دخالت داشته [۲۵] در حالی که miR-196a [۲۶] و miR-210 [۲۷] نقش مهمی در تمایز MSC ها به استئوسیت (Osteocytes) دارد.

در این راستا تحقیقاتی نیز در ارتباط با miRNA های موجود در کبد و در تمایز سلول‌های بنیادی به سلول‌های هپاتوسیت صورت گرفته است. مطالعات انجام شده نشان دهنده نقش کلیدی miRNA ها در ترمیم و تمایز سلول‌های بنیادی به هپاتوسیت‌ها است [۲۸]. نقش مهم و ویژه miR-122 (میکرو RNA خاص کبدی) در تمایز کبدی سلول‌های بنیادی جنینی [۲۹] و سلول‌های بنیادی جنینی پیش‌ساز کبدی (Fetal Liver-Derived Stem/Progenitor Cells) [۳۰] اخیراً گزارش شده است. با این وجود شواهد کمی مبنی بر نقش miRNA ها در تمایز کبدی MSC ها وجود دارد. کوه (Koh) و همکاران با استفاده از روش‌های آماری بیان کردند که خانواده let-7 از میکرو RNA ها به‌عنوان یک تنظیم کننده منفی برای عامل هسته‌ای کبدی (HepG2 Nuclear Factor 4 alpha) عمل می‌کند. همچنین آن‌ها با استفاده از روش Real-time PCR سطح بیان خانواده let-7 را در سلول‌های MSC و HepG2 (یک رده سلولی کبد که سطح بالایی از HNF4a را بیان می‌کند) مقایسه کردند که نتایج نشان داد که سطح بیان خانواده let-7 در سلول‌های HepG2 بسیار پایین بوده و این نتیجه بیان کننده نقش خانواده let-7 در تنظیم بیان HNF4a است [۳۱].

HNF4a یک عامل مهم رونویسی است که عملکرد بسیار مهمی در تمایز ریخت‌شناسی (Morphological Differentiation) و عملکردی کبد ایفا می‌کند و همچنین به‌عنوان عامل برجسته در

دمای ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه شد. محیط کشت سلول‌ها هر دو روز یک بار تعویض شد و پس از این که سلول‌ها به ۸۰-۹۰ درصد تراکم رسیدند، سلول‌ها منجمد و در نیتروژن مایع نگهداری شدند.

تمایز سلول‌های hADSC به سلول‌های چربی و استخوان

تعداد 5×10^3 سلول hADSC در هر چاهک از پلیت ۴ خانه کشت داده شد و سپس به مدت ۲ هفته تحت تأثیر محیط تمایزی استخوان (ایده زیست، ایران) قرار گرفت و طی این مدت سلول‌ها در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد و هوای حاوی ۵ درصد CO_2 انکوبه شدند. تعویض محیط کشت هر سه روز یک بار انجام گرفت. در نهایت اثبات تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی به سلول‌های استخوانی توسط رنگ‌آمیزی آلیزارین رد (Sigma، آمریکا) صورت گرفت. به صورت مشابه سلول‌های hADSC تحت تأثیر محیط تمایزی چربی (ایده زیست، ایران) قرار گرفت و پس از ۱۴ روز سلول‌ها با استفاده از Oil Red O (Sigma، آمریکا) رنگ‌آمیزی شدند.

تولید لنتی ویروس حاوی مهارکننده let-7f و کنترل منفی

به منظور تولید لنتی ویروس‌های لازم، دو ناقل لنتی ویروسی let-7f inhibitor و کنترل منفی از شرکت Applied Biological Material Inc (آمریکا) تهیه شد. ناقل Scramble حاوی توالی است که با هیچ mRNA برهمکنش نمی‌دهد و تأثیری بر پارامترهای مورد مطالعه نخواهد گذاشت، بنابراین در این تحقیق به عنوان کنترل منفی استفاده شد. لنتی ویروس‌های حاوی مهارکننده let-7f و Scramble طبق دستورالعمل توصیف شده توسط زافری (Zufferey) و همکاران تولید شد [۳۴]. به طور خلاصه ترانسفکشن

تمایز هپاتوبلاست‌ها (Hepatoblasts) به حالت بالغ عمل می‌کند [۳۲]. همچنین اخیراً مشخص شده است که HNF4a یک تنظیم کننده بیان miR-122 بوده و افزایش بیان این عامل طی تکامل کبدی جنین موش هم جهت با افزایش بیان miR-122 است [۳۳]. این مطالعات نشان دهنده نقش برجسته HNF4a در تکامل کبدی است. بنابراین با توجه به اهمیت میکرو RNA ها طی فرایند تمایز و همچنین مشخص شدن نقش ویژه آن‌ها در تمایز هپاتوسیتی بعضی از انواع سلول‌های بنیادی [۲۹، ۳۰] در این مطالعه میکرو RNA let-7f (یکی از اعضای خانواده let-7) با استفاده از لنتی ویروس‌های حاوی مهارکننده let-7f مهار شده و سپس اثر خاموشی این میکرو RNA بر بیان ژن HNF4a و تمایز کبدی hADSCs (human ADSCs) بررسی شد.

مواد و روش‌ها

جداسازی سلول‌های بنیادی مزانشیمی از بافت

چربی انسانی

ADSCs بر اساس روش شرح داده شده توسط زوک (Zuk) و همکاران از بافت چربی انسانی جداسازی شد [۶]. به طور خلاصه بعد از شست و شوی بافت چربی با بافر فسفات، بافت به قطعات بسیار ریز خرد شده و در این مرحله با استفاده از آنزیم کلاژناز نوع I (Sigma، آمریکا) به مدت یک ساعت و در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد تیمار شد. پس از این مدت زمان، آنزیم با محیط DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) حاوی ۱۰ درصد سرم جنین گاوی (Fetal Bovine Serum: FBS) خنثی شده و در دور ۱۲۰۰ rpm و به مدت ۵ دقیقه سانتریفوژ شد و رسوب سلولی در محیط کامل حاوی DMEM، ۱۰ درصد FBS، پنی سیلین (Penicillin) (۱۰۰ واحد/ میلی لیتر) / استرپتومایسین (Streptomycin) (۱۰۰ میلی گرم/ میلی لیتر) حل شد و در فلاسک کشت سلول تحت هوای حاوی ۵ درصد CO_2 و در

اثر منفی let-7f بر بیان HNF4a

(Sigma، آمریکا) استخراج شد و سپس cDNA مربوط توسط کیت سنتز cDNA (Exiqon، آمریکا) مطابق دستورالعمل شرکت سازنده ساخته شد. کیت سایبرگرین (SYBR Green Master Mix) و همچنین آغازگر let-7f (Primer) تهیه شده از شرکت Exiqon (آمریکا) به منظور انجام آزمون Real-time PCR استفاده شد. همچنین U6 SnRNA (آمریکا) به عنوان کنترل داخلی استفاده شد و تجزیه و تحلیل داده ها توسط روش $\Delta\Delta C_t$ (CT Method) و فرمول $2^{-\Delta\Delta C_t}$ انجام شد.

استخراج RNA و ارزیابی بیان ژن های خاص هپاتوسیته در سلول های hADSC ترانسداکت شده با مهارکننده let-7f

به منظور ارزیابی تغییرات سطح بیان ژن های HNF4a، ALB، AFP، CK18 و CK19، آزمون Real-time PCR انجام شد (لیست آغازگرها در جدول موجود است). RNA در زمان های ۰، ۷ و ۱۴ روز بعد از ترانسداکشن از سلول ها استخراج شد (RNeasy mini kit) (Qiagen، آمریکا) و سپس cDNA مربوط با استفاده از کیت سنتز cDNA (Intron Biotechnology، کره) ساخته شد.

(Transfection) همزمان ناقل لتی ویروسی (مهار کننده let-7f یا Scramble)، psPAX2 (کد کننده پروتئین های ساختاری gag و pol) و pMD2 (کد کننده پروتئین های پوششی) با استفاده از کلسیم کلراید در سلول های T293 صورت گرفت. بعد از ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت از زمان ترانسفکشن، سوپرناتانت حاوی ویروس جمع آوری و توسط اولتراسانتریفوژ در ۷۶۰۰۰g و به مدت ۹۰ دقیقه تغلیظ شد. ذرات ویروسی تغلیظ شده برای آزمایش بعدی استفاده شد.

ترانسداکشن سلول های hADSC با استفاده از لتی ویروس های تهیه شده

تعداد 1×10^4 سلول hADSC در هر چاهک از پلیت ۲۴ خانه کشت داده شد و روز بعد سلول ها با استفاده از لتی ویروس های تولید شده [MOI=30 (Multiplicity of Infection)] ترانسداکت (Transduction) شده و پس از ۱۲ ساعت محیط کشت سلول ها تعویض شد.

بررسی بیان let-7f در سلول های ترانسداکت شده با استفاده از روش Real-timePCR

RNA تام با استفاده از معرف TRI (Trisol reagent) استفاده شد.

جدول ۱ آغازگرهای استفاده شده برای تکنیک Real-time PCR ژن های ALB انسانی، AFP انسانی، CK18، CK19 و HNF4a؛ ژن بتا-اکتین به عنوان کنترل داخلی استفاده شد.

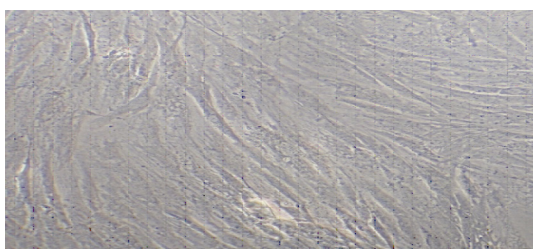
نام ژن	توالی	دمای اتصال (Annealing)	اندازه محصول (جفت باز)	عدد دستیابی NCBI
ALB انسانی	F 5'-GAGACCAGAGGTTGATGTGATG-3' R 5'-AGGCAGGCAGCTTTATCAGCA-3'	۵۸	۱۸۶	NM-00047
AFP انسانی	F 5'-CATGAGCACTGTTGCAGAGGAGA-3' R 5'-CGTGGTCAGTTGCAGCATTCTG-3'	۵۸	۱۱۳	NM_001134
CK18 انسانی	F 5'-TTGATGACACCAATATCACACGA-3' R 5'-TATTGGGCCCCGGATGTCTG-3'	۵۸	۲۰۲	NM_000224
CK19 انسانی	F 5'-GCGGCCAACGGCGAGCTA-3' R 5'-GCAGGACAATCCTGGAGTTCTC-3'	۵۸	۱۵۴	NM-002276
HNF4a انسانی	F 5'-CTTCTTTGACCCAGATGCCAAG-3' R 5'-GAGTCATACTGGCGGTCGTTG-3'	۵۸	۷۸	NM_000457
بتا-اکتین انسانی	F 5'-CTGGAACGGTGAAGGTGACA-3' R 5'-AAGGGACTTCTGTAAACAATGCA-3'	۵۸	۱۱۴	NM_002046

دستورالعمل مربوط انجام شد. ژن بتا-اکتین (β -actin) به عنوان کنترل داخلی استفاده شد و تجزیه و تحلیل داده ها

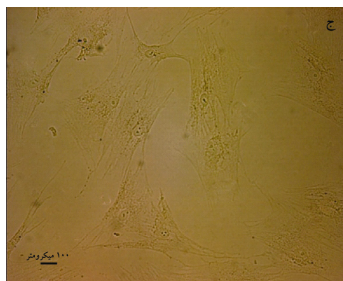
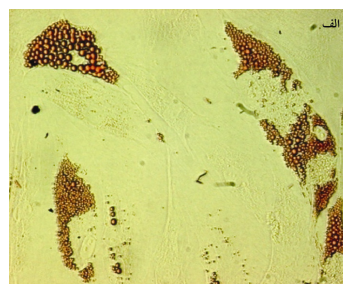
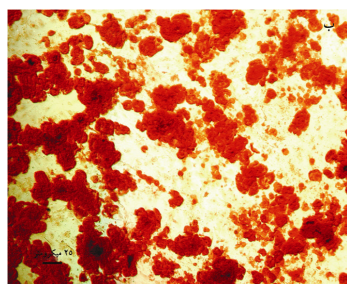
واکنش Real-time PCR با استفاده از کیت سایبرگرین شرکت Takara (ژاپن) و در واکنش های ۲۰ میکرولیتر طبق

توسط روش $\Delta\Delta Ct$ و فرمول $2^{-\Delta\Delta Ct}$ انجام شد.

عوامل القایی خاص صورت گرفت. همان‌طور که در شکل ۲ مشاهده می‌شود رنگ‌آمیزی اختصاصی آلیزارین رد (Alizarin Red)، رسوب کلسیم را در سلول‌های تمایز یافته به استئوبلاست نشان نمی‌دهد. تجمع کلسیم از ویژگی‌های اختصاصی سلول‌های استئوسیت (Osteocyte) است (شکل ۲ الف). همچنین رنگ‌آمیزی اختصاصی Oil Red، حضور واکوئل‌های چربی را در سلول‌های تمایز یافته به آدیپوسیت (Adipocyte) نشان داد (شکل ۲ ب). حضور قطرات چربی تأیید کننده تمایز به سلول‌های آدیپوسیت (Adipocyte) است.



شکل ۱ ریخت‌شناسی سلول‌های hADSC. سلول‌های hADSC کاملاً حالت کشیده و دوکی شکل داشته و ریخت‌شناسی سلول‌های مزانشیمی را نشان می‌دهند. (بزرگنمایی ۲۰ میکرومتر)



شکل ۲ تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی استخراج شده از بافت چربی به رده‌های استخوانی و چربی؛ سلول‌های hADSC به مدت ۱۴ روز تحت تأثیر محیط تمایزی استخوان و چربی قرار گرفتند و سپس به ترتیب با استفاده از رنگ آلیزارین رد و OilRed رنگ‌آمیزی شدند. سلول‌های تمایز داده شده به سمت استئوبلاست و آدیپوسیت نسبت به رنگ‌آمیزی آلیزارین رد (الف) و OilRed (ب) مثبت بودند؛ در حالی که سلول‌های تمایز داده نشده نسبت به هر دو رنگ‌آمیزی منفی بودند (ج، د). (بزرگنمایی همه تصاویر ۵۰ میکرومتر است.)

تجزیه و تحلیل آماری

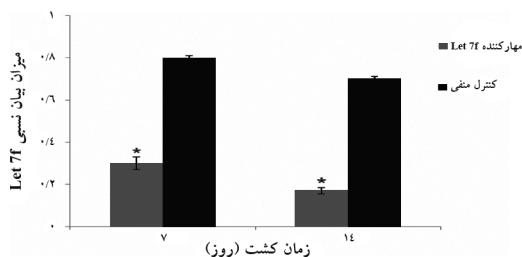
تجزیه و تحلیل آماری با استفاده از آزمون Student's t test انجام شده و داده‌ها به صورت میانگین $\pm$ SEM (خطای استاندارد میانگین) بیان و $P \leq 0.05$ از نظر آماری معنی‌دار در نظر گرفته شد.

نتایج

کشت و ارزیابی توانایی تمایز سلول‌های hADSC

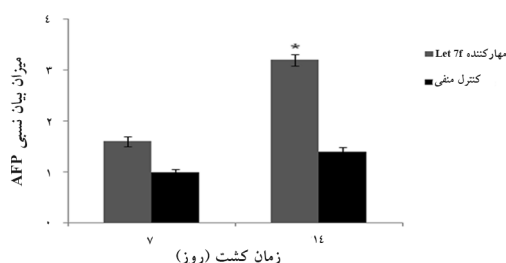
به استئوبلاست و آدیپوسیت

سلول‌های hADSC از طریق هضم آنزیمی با استفاده از آنزیم کلاژناز نوع I از بافت چربی انسانی جدا شد و در محیط کشت سلولی کنترل، کشت شد. سلول‌های کشت داده شده کاملاً حالت کشیده و دوکی شکل داشته و خصوصیات ریخت‌شناسی سلول‌های بنیادی مزانشیمی را نشان دادند (شکل ۱). به منظور بررسی پتانسیل تمایزی مزانشیمی در سلول‌های hADSC، تمایز به رده سلولی استخوان و چربی با استفاده از



شکل ۴ میزان بیان نسبی let-7f در گروه‌های تیمار و کنترل منفی (Scramble). افزایش معنی‌دار بیان let-7f در سلول‌های گروه تیمار نسبت به گروه کنترل در روز ۱۴ کاملاً مشهود است. U6SnRNA به‌عنوان کنترل داخلی استفاده شد.

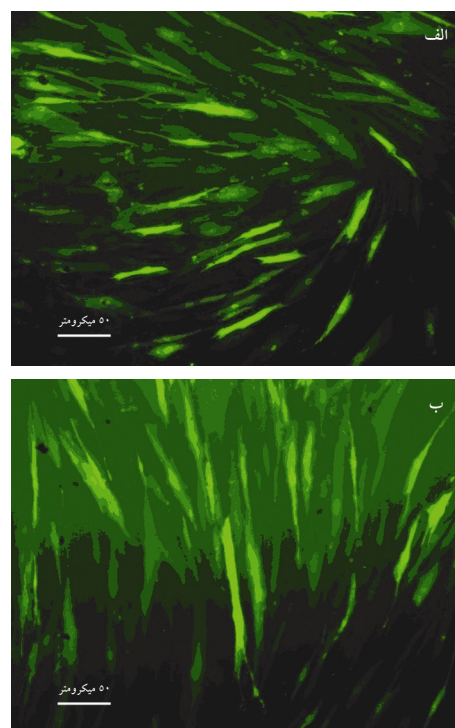
کاهش سطح بیان let-7f در سلول‌های hADSC منجر به افزایش بیان ژن‌های خاص کبدی شد به‌منظور ارزیابی اثر کاهش بیان let-7f بر سلول‌های hADSC. سطح بیان ژن‌های CK18، AFP، ALB، HNF4a و CK19 در زمان‌های ۰، ۷ و ۱۴ روز، در تمامی گروه‌ها با استفاده از روش Real-time PCR بررسی شد. در مقایسه با گروه کنترل منفی، افزایش معنی‌داری در بیان ژن‌های AFP (شکل ۵)، ALB (شکل ۶) و در روز ۱۴ مشاهده شد ($P \leq 0.05$) همین‌طور نتایج مشابهی برای ژن‌های CK18 (شکل ۷) و CK19 (شکل ۸) به‌دست آمد که نشان‌دهنده افزایش بیان این ژن‌ها در روز چهاردهم بود ($P \leq 0.05$). قابل ذکر است که بیان ژن HNF4a نیز در روز چهاردهم در مقایسه با گروه کنترل منفی افزایش معنی‌داری داشت که نشان‌دهنده اثر مهارت let-7f بر بیان HNF4a است (شکل ۹).



شکل ۵ تجزیه و تحلیل Real-time PCR برای ژن AFP؛ نتایج به‌دست آمده با ژن بتا-اکتین نرمالیز (Normalize) شده و در مقایسه با نتایج به‌دست آمده از hADSC بدون تیمار بیان شده است.

کاهش سطح بیان let-7f در سلول‌های hADSC ترانسداکت شده

در این مطالعه سلول‌های hADSC به سه گروه تقسیم‌بندی شدند: گروه کنترل (سلول‌های hADSC بدون تیمار)، گروه تیمار و گروه کنترل منفی که به‌ترتیب با لنتی ویروس‌های مهار کننده let-7f و Scramble ترانسداکت شدند. بازده ترانسداکشن (Transduction Efficiency) مربوط به هر دو ناقل لنتی ویروسی (کد کننده مهار کننده let-7f و کنترل منفی) در سلول‌های hADSC توسط میکروسکوپ فلورسانس بررسی شد که بیان پروتئین فلورسانت سبز (Green Fluorescent Protein: GFP) در هر دو گروه بیش از ۸۰ درصد ارزیابی شد (شکل ۳). به‌علاوه نتایج Real-time PCR نشان داد که سطح بیان let-7f به‌طور محسوسی در گروه تیمار نسبت به گروه کنترل منفی کاهش یافته است (شکل ۴).



شکل ۳ تصویر میکروسکوپ فلورسانس برای بیان پروتئین گزارشگر GFP در سلول‌های ترانسداکت شده با لنتی ویروس حاوی مهار کننده let-7f (الف) و Scramble (ب)؛ بیان پروتئین گزارشگر GFP در هر دو گروه بیش از ۸۰ درصد ارزیابی شد.

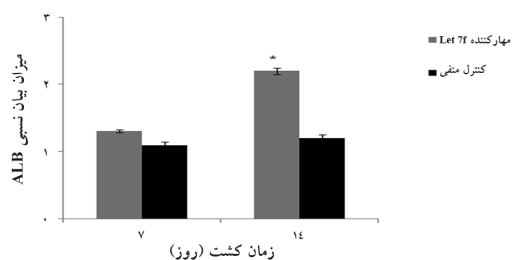
بحث

سلول‌های hADSC گروهی از سلول‌های چند توانی (Multipotent) هستند که خصوصیات مشابه سلول‌های مزانشیمی جدا شده از مغز استخوان را دارند [۶] و مشخص شده است که این سلول‌ها پتانسیل تکثیری بیشتری نسبت به سلول‌های مزانشیمی جدا شده از بقیه منابع دارند [۱۲].

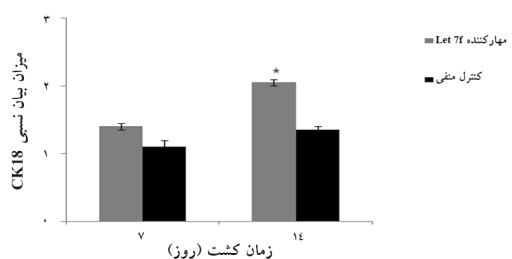
از طرف دیگر miRNA ها تنظیم کننده‌های ژن هستند و نقش مهمی در تنظیم سلول‌های بنیادی دارد [۱۳]. همین‌طور نقش برجسته آن‌ها در تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی به رده خاصی از سلول‌ها در چندین مطالعه مشخص شده است [۳۵، ۳۶]. برای مثال miR-138 به صورت یک مهار کننده در مسیر تمایز سلول‌های MSC به رده سلولی استخوانی عمل می‌کند [۳۷] همچنین miR-122 در مسیر تمایز سلول‌های بنیادی جنینی و سلول‌های بنیادی جنینی پیش‌ساز کبدی به سلول‌های هپاتوسیت عملکرد مهمی دارد [۳۰].

HNF4a یک عامل تمایزی مهم در تکامل کبد و تمایز ریخت‌شناسی هپاتوسیت‌ها است [۳۸] که بیان آن توسط چندین miRNA تنظیم می‌شود [۳۹] اخیراً تنظیم بیان HNF4a توسط خانواده let-7 با استفاده از روش‌های آماری گزارش شده است که بیان کننده نقش احتمالی خانواده میکرو RNA های let-7 در تمایز کبدی سلول‌های MSC است. به علاوه بیان سطح بالای خانواده let-7 در سلول‌های MSC نسبت به سلول‌های HepG2 نیز عنوان شده است [۱۳]. با توجه به این نتایج، در این مطالعه امکان اثر مهار let-7f بر بیان HNF4a و بعضی از نشانگرهای کبدی در سلول‌های hADSC ارزیابی شد.

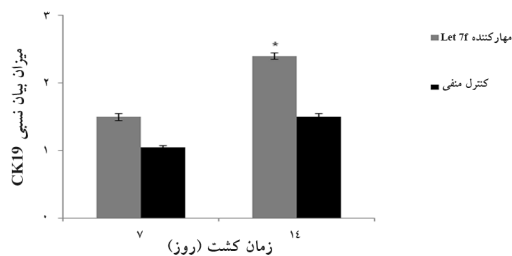
به منظور مهار let-7f در سلول‌های hADSC از سیستم لنتی ویروسی استفاده شد. همچنین گروهی از سلول‌های hADSC توسط لنتی ویروس‌های کد کننده Scramble ترانسداکت شدند که به عنوان کنترل منفی استفاده شد و مشخص می‌کند که ترانسداکت لنتی ویروسی به تنهایی اثری بر بیان ژن‌های مورد مطالعه نداشته است. سلول‌های ترانسداکت



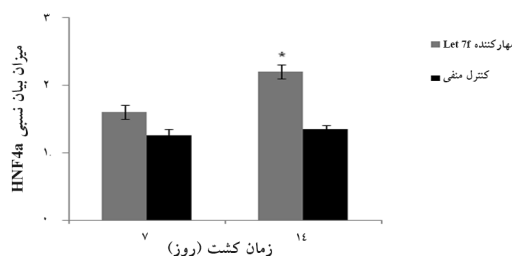
شکل ۶ تجزیه و تحلیل Real-time PCR برای ژن ALB؛ نتایج به دست آمده با ژن بتا-اکتین نرمالیز شده و در مقایسه با نتایج به دست آمده از hADSC بدون تیمار بیان شده است.



شکل ۷ آنالیز Real-time PCR برای ژن CK18. نتایج به دست آمده با ژن بتا-اکتین نرمالیز شده و به در مقایسه با نتایج به دست آمده از hADSC بدون تیمار بیان شده است.



شکل ۸ آنالیز Real-time PCR برای ژن CK19؛ نتایج به دست آمده با ژن بتا-اکتین نرمالیز شده و به در مقایسه با نتایج به دست آمده از hADSC بدون تیمار بیان شده است.



شکل ۹ آنالیز Real-time PCR برای ژن HNF4a؛ نتایج به دست آمده با ژن بتا-اکتین نرمالیز شده و به در مقایسه با نتایج به دست آمده از hADSC بدون تیمار بیان شده است.

به‌طور کلی نتایج این تحقیق نشان داد که let-7f به‌عنوان یک تنظیم‌کننده منفی در بیان ژن HNF4a و در نتیجه در مسیر تمایز هپاتوسیتی سلول‌های مزانشیمی عمل می‌کند؛ همان‌طور که عملکرد منفی بعضی از میکروRNA ها در مسیر تمایزی رده‌های سلولی دیگر نیز به اثبات رسیده است [۳۷]. بنابراین مهار یا افزایش بیان miRNA ها می‌تواند به‌عنوان ابزار مؤثری در به راه‌اندازی مسیر تمایز به سمت رده‌های سلولی مشخصی استفاده شود.

تشکر و قدردانی

مطالعه حاضر با پشتیبانی مالی دانشگاه تربیت مدرس و صندوق حمایت از پژوهشگران انجام شده است.

شده، کارآیی ترانسداکت بیش از ۸۰ درصد را نشان داده و نتایج Real-time PCR نشان دهنده کاهش بیان let-7f در سلول‌های تیمار نسبت به سلول‌های کنترل منفی است. به‌طور مشابه، اثر مهاری let-7f بر بیان ژن‌های HNF4a، AFP، ALB، CK18 و CK19 نیز با استفاده از روش Real-time PCR بررسی شد. نتایج نشان داد که سطح بیان HNF4a در نتیجه کاهش بیان let-7f در سلول‌های ADSC افزایش یافت که نشان دهنده و تأیید‌کننده نقش let-7f در تنظیم بیان این ژن است. همین‌طور افزایش بیان ژن‌های خاص کبدی مثل AFP، ALB، CK18 و CK19 همزمان با مهار let-7f در سلول‌ها hADSC در گروه تیمار نشان دهنده اهمیت let-7f در تمایز هپاتوسیتی است.

منابع

- [1] Petersen BE, Bowen WC, Patrene KD, Mars WM, Sullivan AK, Murase N, Boggs SS, Greenberger JS, Goff JP. Bone marrow as a potential source of hepatic oval cells. *Science* 1999; 284(5417): 1168-70.
- [2] Caplan AI. Why are MSCs therapeutic? New data: new insight. *J Pathol* 2009; 217(2): 318-24.
- [3] Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S, Marshak DR. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 1999; 284(5411): 143-7.
- [4] Bieback K, Kern S, Klüter H, Eichler H. Critical parameters for the isolation of mesenchymal stem cells from umbilical cord blood. *Stem Cells* 2004; 22(4): 625-34.
- [5] De Coppi P, Bartsch G Jr, Siddiqui MM, Xu T, Santos CC, Perin L, Mostoslavsky G, Serre AC, Snyder EY, Yoo JJ, Furth ME, Soker S, Atala A. Isolation of amniotic stem cell lines with potential for therapy. *Nat Biotechnol* 2007; 25(1): 100-6.
- [6] Zuk PA, Zhu M, Mizuno H, Huang J, Futrell JW, Katz AJ, Benhaim P, Lorenz HP, Hedrick MH. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Eng* 2001; 7(2): 211-28.
- [7] De Ugarte DA, Morizono K, Elbarbary A, Alfonso Z, Zuk PA, Zhu M, Drago J, Ashjian P, Thomas B, Benhaim P, Chen I, Fraser J, Hedrick MH. Comparison of multi-lineage cells from human adipose tissue and bone marrow. *Cells Tissues Organs* 2003; 174(3): 101-9.
- [8] Zuk PA, Zhu M, Ashjian P, De Ugarte DA, Huang JI, Mizuno H, Alfonso ZC, Fraser JK, Benhaim P, Hedrick MH. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Mol Biol Cell* 2002; 13(12): 4279-95.
- [9] Safford KM, Hicok KC, Safford SD, Halvorsen

- YD, Wilkison WO, Gimble JM, Rice HE. Neurogenic differentiation of murine and human adipose-derived stromal cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2002; 294(2): 371-9.
- [10] Miranville A, Heeschen C, Sengenès C, Curat CA, Busse R, Bouloumié A. Improvement of postnatal neovascularization by human adipose tissue-derived stem cells. *Circulation* 2004; 110(3): 349-55.
- [11] Banas A, Teratani T, Yamamoto Y, Tokuhara M, Takeshita F, Osaki M, Kato T, Okochi H, Ochiya T. Rapid hepatic fate specification of adipose-derived stem cells and their therapeutic potential for liver failure. *J Gastroenterol Hepatol* 2009; 24(1): 70-7.
- [12] Kern S, Eichler H, Stoeve J, Klüter H, Bieback K. Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, or adipose tissue. *Stem Cells* 2006; 24(5): 1294-301.
- [13] Shcherbata HR, Hatfield S, Ward EJ, Reynolds S, Fischer KA, Ruohola-Baker H. The MicroRNA pathway plays a regulatory role in stem cell division. *Cell Cycle* 2006; 5(2): 172-5.
- [14] Huntzinger E, Izaurralde E. Gene silencing by microRNAs: contributions of translational repression and mRNA decay. *Nat Rev Genet* 2011; 12(2): 99-110.
- [15] Ambros V. The functions of animal microRNAs. *Nature* 2004; 431(7006): 350-5.
- [16] Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* 2004; 116(2): 281-97.
- [17] Gangaraju VK, Lin H. MicroRNAs: key regulators of stem cells. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2009; 10(2): 116-25.
- [18] Zhang C. MicroRNAs: role in cardiovascular biology and disease. *Clin Sci (Lond)* 2008; 114(12): 699-706.
- [19] Houbaviy HB, Murray MF, Sharp PA. Embryonic stem cell-specific MicroRNAs. *Dev Cell* 2003; 5(2): 351-8.
- [20] Suh MR, Lee Y, Kim JY, Kim SK, Moon SH, Lee JY, Cha KY, Chung HM, Yoon HS, Moon SY, Kim VN, Kim KS. Human embryonic stem cells express a unique set of microRNAs. *Dev Biol* 2004; 270(2): 488-98.
- [21] Hatfield SD, Shcherbata HR, Fischer KA, Nakahara K, Carthew RW, Ruohola-Baker H. Stem cell division is regulated by the microRNA pathway. *Nature* 2005; 435(7044): 974-8.
- [22] Kanellopoulou C, Muljo SA, Kung AL, Ganesan S, Drapkin R, Jenuwein T, Livingston DM, Rajewsky K. Dicer-deficient mouse embryonic stem cells are defective in differentiation and centromeric silencing. *Genes Dev* 2005; 19(4): 489-501.
- [23] Murchison EP, Partridge JF, Tam OH, Cheloufi S, Hannon GJ. Characterization of Dicer-deficient murine embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005; 102(34): 12135-40.
- [24] Guo L, Zhao RC, Wu Y. The role of microRNAs in self-renewal and differentiation of mesenchymal stem cells. *Exp Hematol* 2011; 39(6): 608-16.
- [25] Lim PK, Patel SA, Gregory LA, Rameshwar P. Neurogenesis: role for microRNAs and mesenchymal stem cells in pathological states. *Curr Med Chem* 2010; 17(20): 2159-67.
- [26] Kim YJ, Bae SW, Yu SS, Bae YC, Jung JS. miR-196a regulates proliferation and osteogenic differentiation in mesenchymal stem cells

- derived from human adipose tissue. *J Bone Miner Res* 2009; 24(5): 816-25.
- [27] Mizuno Y, Tokuzawa Y, Ninomiya Y, Yagi K, Yatsuka-Kanesaki Y, Suda T, Fukuda T, Katagiri T, Kondoh Y, Amemiya T, Tashiro H, Okazaki Y. miR-210 promotes osteoblastic differentiation through inhibition of AcvR1b. *FEBS Lett* 2009; 583(13): 2263-8.
- [28] Song G, Sharma AD, Roll GR, Ng R, Lee AY, Blelloch RH, Frandsen NM, Willenbring H. MicroRNAs control hepatocyte proliferation during liver regeneration. *Hepatology* 2010; 51(5): 1735-43.
- [29] Chen Y, Zhou H, Sarver AL, Zeng Y, Roy-Chowdhury J, Steer CJ, Sahin MB. Hepatic differentiation of liver-derived progenitor cells and their characterization by microRNA analysis. *Liver Transpl* 2010; 16(9): 1086-97.
- [30] Doddapaneni R, Chawla YK, Das A, Kalra JK, Ghosh S, Chakraborti A. Overexpression of microRNA-122 enhances in vitro hepatic differentiation of fetal liver-derived stem/progenitor cells. *J Cell Biochem* 2013; 114(7): 1575-83.
- [31] Koh W, Sheng CT, Tan B, Lee QY, Kuznetsov V, Kiang LS, Tanavde V. Analysis of deep sequencing microRNA expression profile from human embryonic stem cells derived mesenchymal stem cells reveals possible role of let-7 microRNA family in downstream targeting of hepatic nuclear factor 4 alpha. *BMC Genomics* 2010; 11 Suppl 1: S6.
- [32] Watt AJ, Garrison WD, Duncan SA. HNF4: a central regulator of hepatocyte differentiation and function. *Hepatology* 2003; 37(6): 1249-53.
- [33] Xu H, He JH, Xiao ZD, Zhang QQ, Chen YQ, Zhou H, Qu LH. Liver-enriched transcription factors regulate microRNA-122 that targets CUTL1 during liver development. *Hepatology* 2010; 52(4): 1431-42.
- [34] Zufferey R, Trono, D. Production of High-Titer Lentiviral Vectors. *Current Protocols in Neuroscience* . 2001; 4: 4.21.
- [35] Esau C, Kang X, Peralta E, Hanson E, Marcusson EG, Ravichandran LV, Sun Y, Koo S, Perera RJ, Jain R, Dean NM, Freier SM, Bennett CF, Lollo B, Griffey R. MicroRNA-143 regulates adipocyte differentiation. *J Biol Chem* 2004; 279(50): 52361-5.
- [36] Han J, Yang T, Gao J, Wu J, Qiu X, Fan Q, Ma B. Specific microRNA expression during chondrogenesis of human mesenchymal stem cells. *Int J Mol Med* 2010; 25(3): 377-84.
- [37] Eskildsen T, Taipaleenmäki H, Stenvang J, Abdallah BM, Ditzel N, Nossent AY, Bak M, Kauppinen S, Kassem M. MicroRNA-138 regulates osteogenic differentiation of human stromal (mesenchymal) stem cells in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011; 108(15): 6139-44.
- [38] Späth GF, Weiss MC. Hepatocyte nuclear factor 4 provokes expression of epithelial marker genes, acting as a morphogen in dedifferentiated hepatoma cells. *J Cell Biol* 1998; 140(4): 935-46.
- [39] Ramamoorthy A, Li L, Gaedigk A, Bradford LD, Benson EA, Flockhart DA, Skaar TC. In silico and in vitro identification of microRNAs that regulate hepatic nuclear factor 4 α expression. *Drug Metab Dispos* 2012; 40(4): 726-33.