



اثر مهار شیمیایی آنزیم G9a بر کاهش پتانسیل تکثیری و افزایش پتانسیل آدیپوژنیک سلول‌های بنیادی مزانشیمی

هدیه خانبان^۱، اسماعیل فتاحی^{۱*}، محمود تلخابی^۲

۱- گروه زیست‌شناسی، واحد آیت‌الله‌آملی، دانشگاه آزاد اسلامی، آمل، ایران

۲- گروه علوم و زیست‌فناوری جانوری، دانشکده علوم و فناوری زیستی، دانشگاه شهید بهشتی، تهران، ایران

*مسئول مکاتبات: esmail_fattahy@yahoo.com

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۱۲/۲۵

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۰۶/۰۴

چکیده

سلول‌های بنیادی مزانشیمی (MSCs)، ویژگی‌های منحصر به فردی از قبیل تعدیل سیستم ایمنی، ترشح فاکتورهای کنترل بقاء سلولی و نیز پتانسیل تمایز به استخوان، غضروف و چربی را دارند. تمام فرایندهای سلولی از قبیل تمایز، تکثیر، پیری و مرگ بطور مستقیم و یا غیرمستقیم توسط مکانیزم‌های اپی‌ژنتیکی از قبیل متیلاسیون هیستونی تنظیم شده و آنزیم هیستون متیل ترانسفراز G9a یکی از آنزیم‌های مهم در این زمینه است. سلول‌های بنیادی مزانشیمی در مغز استخوان رت (BM-MSCs) در محیط آزمایشگاهی استخراج شده و کشت شدند. سپس در کشت اولیه، پاساژ اول، دوم و سوم تحت تاثیر غلظت‌های مختلف A366 (یک مهارکننده اختصاصی آنزیم G9a) قرار گرفتند. سپس با استفاده از فلوسایتومتری، محاسبه زمان دوبرابر شدن جمعیت سلولی و بررسی پروفایل چرخه سلولی، وضعیت تکثیری BM-MSCs مورد ارزیابی قرار گرفت. میزان تمایز به چربی BM-MSCs تیمار شده با A366، با استفاده از رنگ آمیزی اوایل رد و بیان ژن‌های ویژه چربی مورد بررسی قرار گرفت. بررسی زمان دو برابر شدن جمعیت BM-MSCs و بررسی چرخه سلولی نشان داد که مهار آنزیم G9a با غلظت‌های پایین A366 تاثیر معنی‌داری بر پتانسیل تکثیری BM-MSCs ندارد. اگرچه غلظت‌های بالای A366، مدت زمان دوبرابر شدن جمعیت سلولی را افزایش داده و توقف چرخه سلولی را القاء می‌کند. همچنین تیمار BM-MSCs با A366 موجب افزایش پتانسیل تمایز سلول‌ها به سمت چربی می‌شود. تنظیم‌کنندگان اپی‌ژنتیکی از قبیل A366 که برای کنترل سرطان پیشنهاد شده اند، رفتارهای تکثیری و تمایزی BM-MSCs را تحت تاثیر قرار می‌دهند. همچنین این تنظیم‌کننده‌ها می‌توانند به عنوان یک رویکرد مناسب جهت تکثیر و تمایز بهتر MSCs به کار گرفته شوند، تا این سلول‌ها با کارایی بالاتری در سلول درمانی، مهندسی بافت و نیز ترمیم و هومئوستازی بافتی نقش ایفا کنند.

کلمات کلیدی: سلول‌های بنیادی مزانشیمی، اپی ژنتیک، A366، آنزیم G9a، آدیپوژنز.

مقدمه

آمنیوتیک، اندومتريوم، پالپ دندان، بند ناف و ژله وارتون جداسازی کنند (۲). انجمن بین‌المللی سلول درمانی پیشنهاد کرده است که MSCs مشتق از منابع

سلول‌های بنیادی مزانشیمی (MSCs) زیرمجموعه‌ی هتروژنی از سلول‌های بنیادی استرومایی می‌باشند که از بافت‌های مختلفی مانند بافت چربی، مایع



متاستاز ضروری است، بطوری که مهار آن با استفاده از کوچک مولکول‌های اختصاصی، باعث توقف رشد سلول‌های سرطانی شده و متاستاز آنها را مهار می‌کند (۸). لذا اخیراً به عنوان یک هدف درمانی مورد توجه قرار گرفته است (۸). G9a در تکوین طبیعی نیز نقش بازی می‌کند، بطوری که جنین‌هایی که دارای جهش نقص عملکرد در این آنزیم هستند در مراحل ابتدایی جنینی از بین می‌روند (۵).

مطالعات نشان داده است که G9a با همکاری Runx2 تمایز استوژنیک و کندروژنیک را القاء می‌کند (۱۳)، همچنین اخیراً مشخص شده است که مهار آنزیم G9a باعث افزایش بقاء MSCs مشتق از مغز استخوان در شرایط آزمایشگاهی شده و از پیری سلول‌ها جلوگیری می‌کند (۱).

بر اساس مطالعات انجام شده، به نظر می‌رسد که مهار آنزیم G9a می‌تواند نقش مهمی در کنترل رفتارهای MSCs داشته باشد. همچنین باید توجه داشت که مهار این آنزیم به عنوان یک رویکرد درمانی برای بسیاری از سرطان‌ها مورد توجه قرار گرفته است، لذا بسیار ضروری به نظر می‌رسد که تاثیر مهار این آنزیم بر سایر سلول‌های بدن از جمله BM-MSCs نیز مطالعه شود. در این مطالعه برای اولین بار از یک مولکول کوچک اختصاصی جدید به نام A366 برای مهار عملکرد آنزیم G9a در BM-MSCs استفاده شده و سپس رفتارهای تکثیری و تمایزی این سلول‌ها مورد مطالعه قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

جداسازی و کشت BM-MSCs: رت‌ها با سن دو الی سه‌ماهه از پژوهشگاه رویان تهیه شد و به اتاق تشریح منتقل و با کلروفورم بیهوش شدند. سپس سلول‌های مغز استخوان، یک طبق پروتوکل استاندارد جداسازی شده و سپس سلول‌ها به همراه محیط

مختلف با توجه به سه معیار اصلی مشخص شوند: ۱- MSCs، سلول‌های استرومایی مغز استخوان هستند که براساس ویژگی چسبندگی به پلاستیک جداسازی می‌شوند، ۲- MSCs مارکرهای CD105، CD90 و CD73 بیان کرده و برای CD11-b، CD14، CD34، CD45 و CD31 منفی می‌باشند، ۳- MSCs ظرفیت تمایز به استئوسیت، کندروسیت و آدیپوسیت را در محیط آزمایشگاه دارند (۱۴). این سلول‌ها همچنین توانایی ویژه‌ای برای تعدیل سیستم ایمنی داشته و سیتوکین‌ها و فاکتورهای ترشحی بسیاری را ترشح می‌کنند که در بقاء، تکثیر و تمایز سلول‌های بافت‌های دیگر موثر بوده و هومئوستازی بافتی را تنظیم می‌کنند (۱۴).

مطالعات اخیر نشان داده‌اند که بسیاری از رفتارهای سلول‌های بدن انسان و سایر جانوران تحت تاثیر عوامل اپی‌ژنتیکی می‌باشد. از آنجایی که تمام مکانیزم‌های اپی‌ژنتیکی در تنظیم بیان ژن دخالت می‌کنند، در نتیجه بصورت مستقیم یا غیرمستقیم می‌توانند تمام رفتارهای سلولی از قبیل تمایز و تکثیر، ترشح، مهاجرت و مرگ برنامه‌ریزی شده را تحت تاثیر قرار دهند (۴).

مکانیزم‌های اصلی اپی‌ژنتیک شامل متیلاسیون DNA، تغییرات هیستونی و میکروRNA است. متیلاسیون هیستون‌ها یکی از تغییرات هیستونی مهم است و توسط آنزیم‌های هیستون متیل ترانسفراز و دمتیلاز کنترل می‌شود (۷).

در پستانداران شش آنزیم متیل ترانسفراز اختصاصی لیزین ۹ (H3-K9) به نام‌های G9، G9p، Eset، Suv39h1، Suv39h2 و Prdm2 وجود دارد (۱۱). G9a تقریباً در اکثر بافت‌های بدن بیان می‌شود ولی بیان آن در بافت‌های مختلف متفاوت می‌باشد. بطور جالبی این آنزیم در بسیاری از سرطان‌های انسانی از جمله پرستات و شش نیز بیان شده و برای انجام



در شروع کشت، N تعداد سلول در پایان کشت، و CT مدت زمان دوره کشت است.

$$PDT = \frac{CT}{\log \frac{N}{N_0} \times 3.31}$$

بررسی پروفایل چرخه سلولی: BM-MSCs در پاساژ اول تا سوم بوسیله غلظت‌های مختلف A366 به مدت ۴۸ ساعت تیمار شدند و سپس سلول‌ها توسط Trypsin/EDTA جمع‌آوری شده بعد از سانتریفیوژ، با PBS سرد شستشو شده و توسط اتانول ۷۰ درصد تثبیت گردیدند. این سلول‌ها تا زمان تجزیه و تحلیل در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. در زمان آنالیز، سلول‌ها به مدت ۳۰ دقیقه با ۲۰ میلی‌گرم PI و ۲۰ میلی‌گرم RNase حل شده در ۱ میلی‌لیتر PBS، تیمار شده و توسط دستگاه فلوسایتمتری (BD FACSCalibur (BD Biosciences) بررسی شده و داده‌های به دست آمده با استفاده از نرم‌افزار BD FACSDiva (BD Biosciences) آنالیز گردید و درصد جمعیت سلولی در مراحل G1، S و M/G2 مشخص شد.

تمایز BM-MSCs به سلول‌های چربی: BM-MSCs در پاساژ سوم به تعداد ۱۰۰ هزار سلول به ازای هر چاهک ظروف کشت ۶ چاهکی کشت شدند. بعد از اینکه سلول‌ها تقریباً ۸۰ درصد از مساحت کف چاهک‌ها را اشغال کردند، محیط سلول‌ها با محیط کامل حاوی غلظت‌های ۱، ۳ و ۵ میکرومولار کوچک مولکول A366 تعویض شده و به مدت دو روز در این محیط کشت شدند. سپس محیط سلول‌ها با محیط ویژه تمایز به چربی جایگزین شد.

محیط تمایز به چربی شامل محیط کشت کامل BM-MSCs به همراه یک میکرومولار دگزمتازون، ۵۰۰ میکرومولار ایزوبوتیل زانتین، ۵ میکرومولار انسولین، ۲۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر اسکورییک ۲-فسفات و ۲۰۰ میکرومولار ایندومتاسین بود. سلول‌ها به مدت ۳

کشت کامل (DMEM+15%FBS+Pen/Strep) به یک پلیت ۶ چاهکی منتقل شدند (۱۲). سپس ظروف مورد نظر به درون انکوباتور CO₂ دار (۳۷ °C، ۵٪ O₂ و ۹۵٪ CO₂) منتقل گردیدند. سلول‌های چسبیده‌ای که مورفولوژی فیبروبلاستی داشتند سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از مغز استخوان (BM-MSCs) در نظر گرفته شدند. بعد از دو روز محیط رویی خارج شده و یکبار شستشوی سلول‌ها با محیط کامل انجام شده و محیط کامل تازه به سلول‌ها اضافه شد. تعویض محیط هر سه روز یکبار انجام شد و بعد از رسیدن سلول‌ها به تراکم مناسب، سپس سلول‌ها با استفاده از Trypsin/EDTA پاساژ داده شدند.

محاسبه زمان دو برابرشدگی جمعیتی: برای بررسی تاثیر مهار آنزیم G9a بر سرعت دوبرابر شدن جمعیت سلولی (Population Doubling Time یا PDT)، BM-MSCs در شرایط کشت استاندارد کشت شدند. برای بررسی PDT در هر پاساژ، ابتدا BM-MSCs شمارش شده و به تعداد ۱۰۰ هزار سلول به هر چاهک ظروف کشت ۶ چاهکی منتقل شدند. این سلول‌ها در شرایط کشت استاندارد به مدت ۱۲ ساعت کشت شدند تا سلول‌ها به کف ظرف چسبیده و مورفولوژی و عملکرد طبیعی پیدا کنند. سپس محیط رویی سلول‌ها خارج شده و محیط جدید حاوی کوچک مولکول A366 با غلظت‌های ۱، ۳، ۵ و ۱۰ میکرومولار به سلول‌ها اضافه شد. به گروه کنترل DMSO (حلال کوچک مولکول A366) اضافه شد. بعد از ۴۸ ساعت محیط سلول‌ها با محیط تازه فاقد کوچک مولکول و DMSO تعویض شده و بعد از ۴ تا ۶ روز سلول‌ها با استفاده از Trypsin/EDTA کنده شده و بعد از شمارش توسط لام نئوبار، PDT برای سلول‌های تیمار شده با غلظت‌های مختلف، طبق فرمول زیر محاسبه شد. در این رابطه، N₀ تعداد سلول



synthesis استفاده شد. سپس میزان بیان ژن‌ها با استفاده از دستگاه RotorGene6000 (Corbet) و با استفاده از Power SYBR Green PCR Master Mix (محصول Takara) انجام شد. مخلوط واکنش برای هر نمونه شامل ۱۰ μL از مخلوط آماده حاوی پلیمراز، مقدار ۵ pmol از پرایمرهای Forward و Reverse (جدول ۱)، ۶ μL آب تزریقی و ۲۵ ng از cDNA می‌باشد. حجم نهایی هر واکنش ۲۰ μL بوده و هر واکنش به صورت دوتایی انجام گرفت. از GAPDH به عنوان کنترل داخلی استفاده شد و میزان بیان ژن‌های ویژه چربی 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 گرفته شد و معنی‌داری داده‌ها در سطح ۰/۰۵ تعیین شد. همه داده‌ها به صورت میانگین ± انحراف معیار (mean ± SD) برای حداقل سه تکرار جداگانه ارائه شده‌اند.

هفته در محیط تمایزی فوق کشت و نگهداری شدند. در طول این مدت هر سه روز یکبار تعویض محیط انجام شد. در پایان هفته سوم میزان تمایز چربی با استفاده رنگ‌آمیزی اوایل و نیز Real Time-PCR مورد ارزیابی قرار گرفت. رنگ‌آمیزی اوایل رد بر اساس پروتوکل استاندارد ویژه این رنگ‌آمیزی انجام شد و سلول‌ها با استفاده از میکروسکوپ اینورت مجهز به دوربین بررسی شدند (۹).

بررسی بیان ژن‌های ویژه سلول‌های چربی: سلول‌های چربی که از BM-MSCs تیمار شده با غلظت ۳ میکرومولار A366 حاصل شده بودند برای بررسی بیان ژن‌های ویژه چربی 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 کل RNA، مورد سنجش کیفی و کمی قرار گرفتند. سپس مقدار ۲ میکروگرم از RNA کل برداشته شد و برای سنتز cDNA استفاده شد. در اینجا از هگزامرهای تصادفی به عنوان پرایمر و کیت RevertAidTM H Minus M-Mulv RT cDNA

جدول ۱- پرایمرها و شرایط واکنش برای Real Time-PCR

ژن	پرایمر Forward	پرایمر Reverse
PPARY2	ATGCTGTTATGGGTGAAACT	GATGTCAAAGGAATGGGAGTG
C/EBPa	CAAGAAGTCGGTGGATAAGAAC	TCATTGTCACTGGTCAACTCC
LPL	CAAAACAACCAGGCCTTCGA	AGCAATTCCCCGATGTCCA
GAPDH	TGCTGAGTATGTCGTGGAGT	CGGAGATGATGACCCTTTTG

نتایج

و ۳ میکرومولار تاثیر مشخصی بر تکثیر و مورفولوژی BM-MSCs ندارند (شکل ۱). در غلظت ۵ میکرومولار تکثیر سلول‌ها اندکی کاهش یافته و سلول‌ها اندکی از حالت دوکی و ستاره‌ای شکل خارج شده و مورفولوژی پهن‌تر و بزرگتری نشان دادند

برای بررسی تاثیر کوچک مولکول A366 بر BM-MSCs، غلظت‌های مختلف این ماده (۰/۱ تا ۱ میکرومولار) بر این سلول‌ها (در پاساژ سوم) تاثیر داده شد. بررسی روزانه این سلول‌ها با استفاده از میکروسکوپ اینورت نشان داد که غلظت‌های ۰/۱، ۱



ترتیب تقریباً ۲۰ درصد و ۴۰ درصد سلول‌های در فاز subG1/G0 بودند که نسبت به گروه کنترل و سایر گروه‌ها (۱/۰، ۱ و ۳ میکرومولار) بطور معنی‌داری بالاتر بود (شکل ۳). همچنین درصد سلول‌های فاز G1، S و G2/M نسبت به کنترل و سایر گروه‌ها کاهش یافته بود. که این کاهش در گروه ۱۰ میکرومولار کاملاً مشخص و معنی‌دار بود (شکل ۳). این نشان می‌دهد که کوچک مولکول A366 باعث

خروج BM-MSCs از چرخه تقسیم سلولی می‌شود. به منظور بررسی اثرات A366 بر پتانسیل آدیپوژنیک BM-MSCs، این سلول‌ها به مدت ۴۸ ساعت با غلظت‌های مختلف (۱، ۳ و ۵ میکرومولار) این کوچک مولکول تیمار شده و سپس به سمت تمایز چربی القاء شدند. رنگ آمیزی سلول‌های تمایز یافته با اویل رد نشان داد که در گروه کنترل تعداد اندکی از سلول‌ها حاوی قطرات چربی می‌باشند (شکل ۴).

در گروه تیمار شده با غلظت ۱ میکرومولار A366، تعداد سلول‌های چربی (رنگ گرفته) افزایش داشتند. اما در گروه ۳ میکرومولار تعداد سلول‌های رنگ گرفته حاوی قطرات چربی به طور قابل تشخیصی افزایش تعداد نسبت به سایر گروه‌ها را نشان دادند (شکل ۴). هر چند در گروه ۵ میکرومولار A366، کاهش تمایز چربی مشاهده شد بطوریکه هم تعداد سلول‌های چربی و هم اندازه‌ی قطرات چربی درون سلول‌ها کاهش نشان می‌دادند (شکل ۴).

همچنین برای اثبات ماهیت آدیپوسیتی سلول‌های تمایز یافته از BM-MSCs تیمار شده با غلظت ۳ میکرومولار A366 و نیز گروه کنترل، بیان ژن‌های اختصاصی چربی (LPL، C/EBP α و PPAR2) با استفاده از Real time-PCR بررسی شد.

نتایج نشان داد که بیان این ژن‌ها در سلول‌های چربی تمایز یافته از BM-MSCs تیمار شده با A366،

(شکل ۱). کشت BM-MSCs در غلظت ۱۰ میکرومولار A366 باعث کاهش شدید تکثیر این سلول‌ها شد و مورفولوژی سلول‌ها بطور قابل توجهی دچار تغییر شد. هر چند تکثیر سلول‌ها با افزایش غلظت A366 به شدت کاهش یافت اما هیچ‌گونه افزایشی در تعداد سلول‌های مرده‌ی شناور در محیط سلول‌های تیمار شده با غلظت‌های بالا (۵ و ۱۰ میکرومولار) مشاهده نشد (شکل ۱).

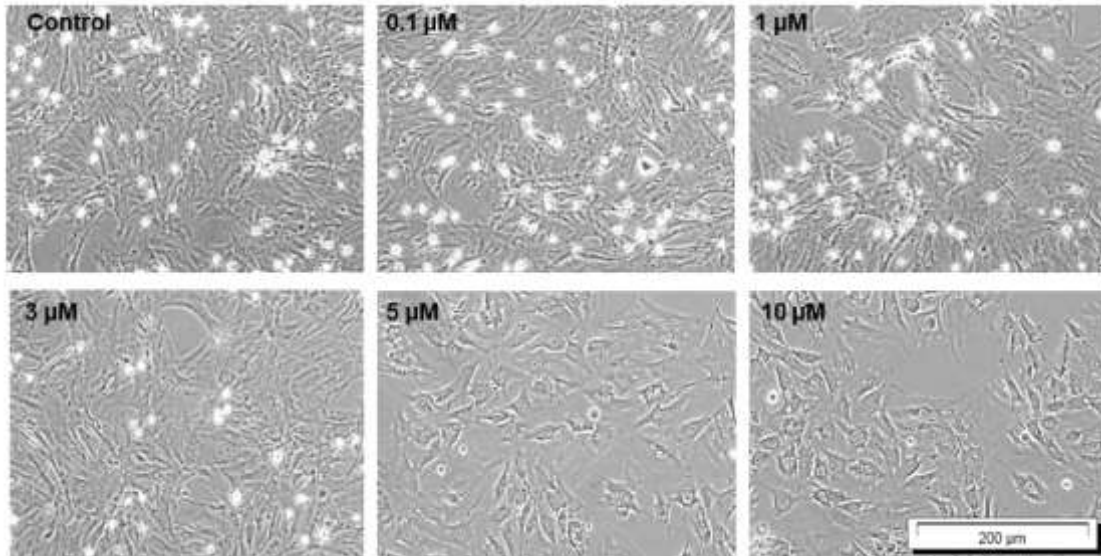
محاسبه PDT به عنوان یک پارامتر مرتبط با تکثیر BM-MSCs، نشان داد که با افزایش غلظت کوچک-مولکول A366، سرعت تکثیر کاهش یافته و زمان زیادی طول می‌کشد تا جمعیت سلولی کشت شده دو برابر شود (شکل ۲). بطوری که در گروه کنترل (فاقد کوچک مولکول A366) و همچنین در گروه‌های تیمار شده با غلظت ۱/۰، ۱ و ۳ میکرومولار A366، هر ۴۰ تا ۵۰ ساعت یکبار جمعیت BM-MSCs کشت شده، دو برابر می‌شد. همچنین جمعیت BM-MSCs تیمار شده با غلظت ۵ میکرومولار A366 هر ۷۵-۸۰ ساعت دو برابر می‌شدند (شکل ۱).

در حالی که افزایش غلظت به ۱۰ میکرومولار حتی سرعت تکثیر را بیشتر کاهش داده و مدت زمان لازم برای دوبرابر شدن جمعیت سلولی را به ۸۵ تا ۹۰ ساعت افزایش داد (شکل ۲).

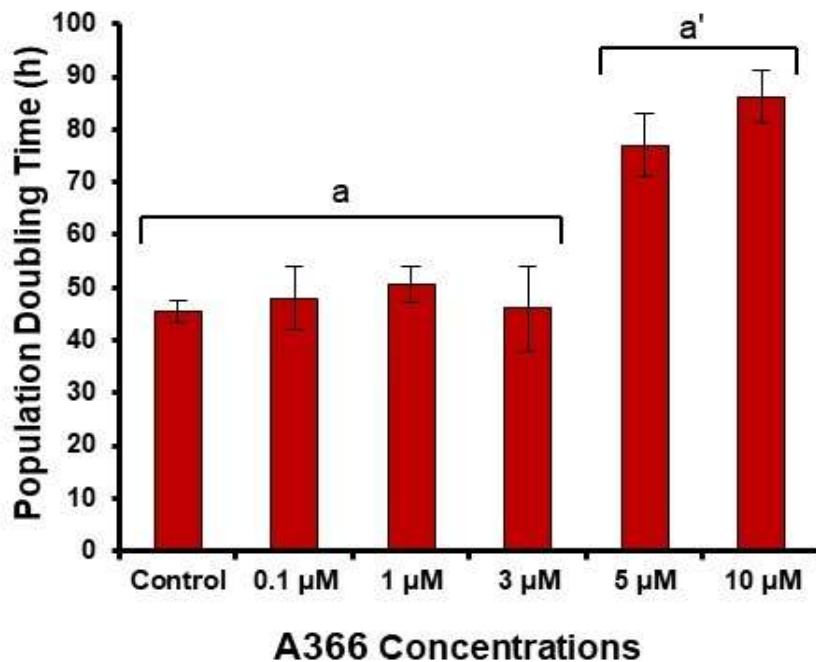
بررسی پروفایل چرخه سلولی به عنوان یکی دیگر از پارامترهای مرتبط با تکثیر سلولی نشان داد که در گروه کنترل تقریباً ۷۰ درصد سلول‌ها در فاز رشد سلولی G1 بوده و به ترتیب حدود ۲۰ درصد و ۱۰ درصد در فاز S و G2/M قرار داشتند (شکل ۳). با تیمار سلول‌ها با غلظت‌های ۱/۰، ۱ و ۳ میکرومولار A366 پروفایل چرخه سلولی اندکی در تمام فازهای چرخه دچار تغییر شد. البته این تغییرات بسیار اندک بوده و اختلاف آنها با گروه کنترل معنی-دار نبود. در غلظت‌های ۵ و ۱۰ میکرومولار A366 به



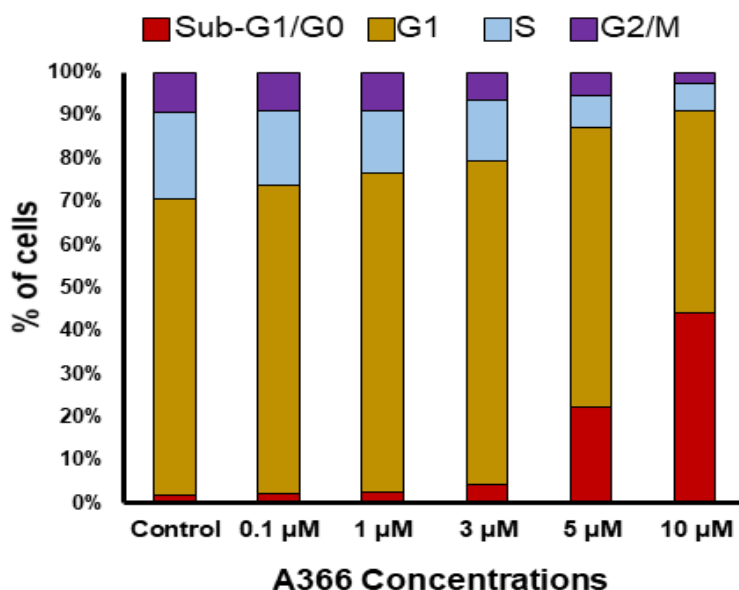
بصورت معنی‌داری نسبت به گروه کنترل بالاتر است (شکل ۵).



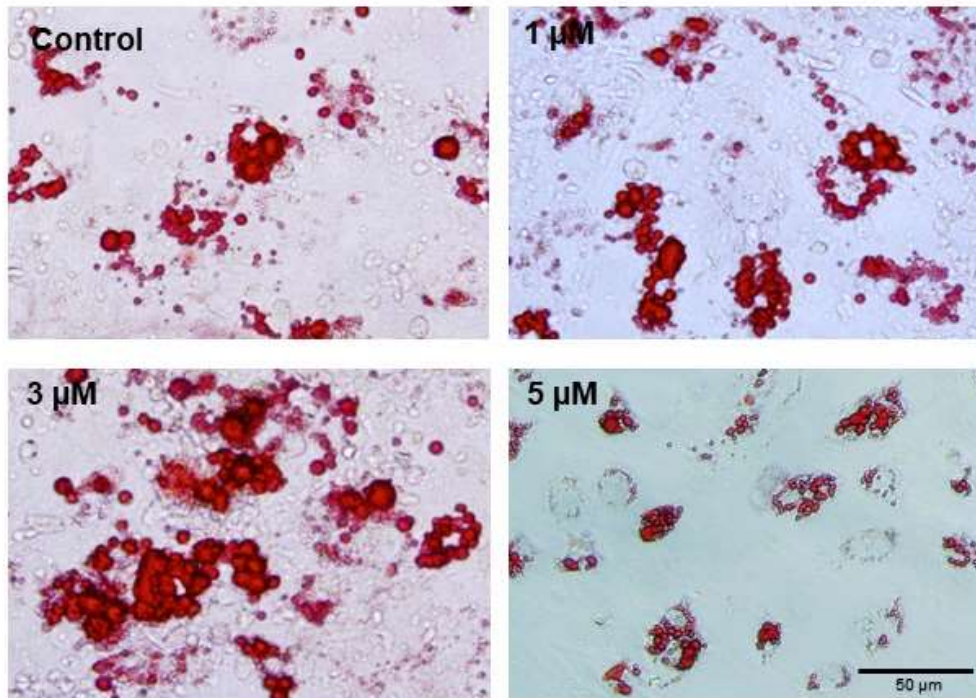
شکل ۱- کاهش پرامترهای تکثیری BM-MSCs بعد از تیمار با کوچک مولکول A366. در غلظت‌های پایین سلول‌ها مورفولوژی کاملاً طبیعی داشته و کاملاً دوکی شکل یا ستاره‌ای شکل هستند. با افزایش غلظت از ۵ میکرومولار به بالا، کاهش تعداد سلول‌ها درون چاهک‌ها، افزایش فاصله بین سلول‌ها و افزایش اندازه و پهن شدن سلول‌ها مشاهده می‌شود.



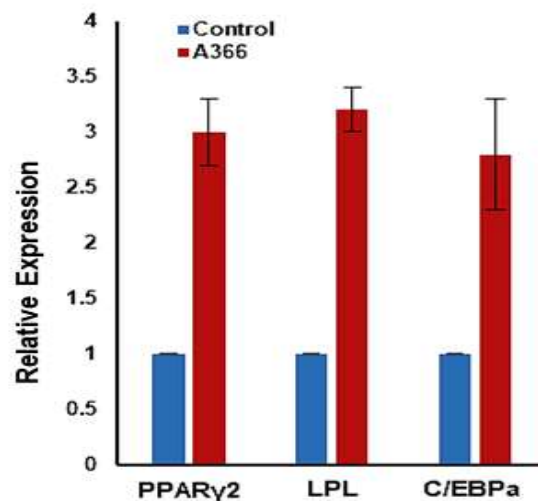
شکل ۲- کاهش پرامترهای تکثیری BM-MSCs بعد از تیمار با کوچک مولکول A366. A366 مدت زمان لازم برای دوبرابر شدن جمعیت سلولی را به شدت تحت تاثیر قرار داد، به طوری که در گروه کنترل هر ۴۵ ساعت یکبار جمعیت BM-MSCs دو برابر شده و با افزایش غلظت A366 افزایش معنی‌داری در مدت زمان لازم برای دو برابر شدن جمعیت BM-MSCs مشاهده شد. 'a' نسبت به 'a' بطور معنی‌داری طولانی‌تر است، $p < 0.05$ ، داده‌ها بصورت میانگین \pm انحراف معیار ارائه شده‌اند.



شکل ۳- کاهش پارامترهای تکثیری BM-MSCs بعد از تیمار با کوچک مولکول A366. در گروه کنترل و غلظت‌های پایین A366 (۰/۱ تا ۳ میکرومولار) پروفایل چرخه سلولی تقریباً مشابه بوده و درصد کمی از سلول‌ها (کمتر از ۵ درصد) در فاز subG1/G0 قرار دارند و بیشتر سلول‌ها در فاز G1، S، و G2/M قرار دارند. در غلظت‌های بالاتر A366 (۵ و ۱۰ میکرومولار) نسبت بسیار بالایی از سلول‌ها از چرخه تقسیم خارج شده و وارد مرحله subG1/G0 می‌شوند که نشان دهنده توقف چرخه تکثیر و تقسیم سلولی می‌باشد.



شکل ۴- تمایز آدیپوژنیک BM-MSCs تیمار شده با کوچک مولکول A366. (A) تعداد سلول‌های چربی رنگ گرفته با رنگ آمیزی اختصاصی اوایل رد در گروه ۳ میکرومولار A366 از سایر گروه‌ها بالاتر است. تعداد سلول‌های چربی رنگ گرفته با اوایل رد و نیز اندازه قطرات چربی درون سلول‌ها با افزایش غلظت A366 کاهش نشان می‌دهند.



شکل ۵- تمایز آدیپوژنیک BM-MSCs تیمار شده با کوچک مولکول A366. بیان ژن‌های ویژه چربی (LPL, C/EBPa و PPAR2) در سلول‌های چربی تمایز یافته از BM-MSCs تیمار شده با غلظت ۳ میکرومولار A366 بصورت معنی‌داری نسبت به کنترل بالاتر است ($p < 0.05$).

بحث

در غلظت‌های پایین سرعت دوبرابر شدن جمعیت سلول‌ها همانند گروه کنترل بوده و تقریباً هر ۴۵-۵۰ ساعت یکبار جمعیت سلول‌ها دو برابر شدند. این زمان برای BM-MSCs تیمار شده با غلظت‌های بالاتر (۵ و ۱۰ میکرومولار A366) تقریباً ۸۰-۹۰ ساعت بوده که در مقایسه با سایر گروه‌ها و گروه کنترل بطور معنی‌داری بیشتر بود. این بررسی نیز نشان داد که در غلظت‌های پایین A366 تکثیر BM-MSCs دچار کاهش تکثیر شدیدی نشده و این غلظت‌ها برای سلول‌ها سمیت نیز ایجاد نمی‌کنند. با توجه با اینکه رابطه‌ای مستقیم بین مدت زمان لازم برای دوبرابر شدن جمعیت سلول و پروفایل چرخه تقسیم سلولی وجود دارد، این ارزیابی نیز صورت گرفت.

نتایج بررسی چرخه سلولی نیز با دو بررسی فوق مطابقت داشته و درصد سلول‌هایی که در فازهای مختلف چرخه بودند (G1, G0/subG1, S و G2/M) در سلول‌های تیمار شده با غلظت‌های پایین مشابه

آنزیم هیستون متیل ترانسفراز G9a یکی از فاکتورهای اپی‌ژنتیک است که با انتقال گروه‌های متیل به هیستون-های خاص می‌تواند رفتارهای سلولی MSCs را تحت تاثیر قرار دهد. در این مطالعه به بررسی نقش G9a در BM-MSCs در شرایط *in vitro* پرداخته شد.

بررسی‌های میکروسکوپی نشان داد که BM-MSCs تیمار شده با غلظت‌های پایین A366 (۰/۱، ۱ و ۳ میکرومولار) تاثیر زیادی بر مورفولوژی سلول‌ها نداشته ولی در غلظت‌های بالاتر (۵ و ۱۰ میکرومولار A366) سلول‌ها به شدت تحت تاثیر قرار گرفته و رشد آنها کندتر شده و در محیط کشت پهن‌تر شدند که پیشنهاد می‌کند که غلظت‌های بالا به شدت تکثیر سلول‌ها را مهار می‌کنند. هر چند در غلظت‌های بالاتر نیز تعداد سلول‌های مرده در ظروف کشت مشاهده نشدند که پیشنهاد می‌کند غلظت‌های مورد بررسی برای سلول‌ها سمیت ایجاد نکرده و باعث مرگ و میر شدید نشده است.



نتیجه‌گیری

پس به طور کلی نتایج مطالعه حاضر نشان داد که مهار آنزیم G9a با استفاده از کوچک مولکول A366 باعث کاهش پتانسیل تکثیری شده و پتانسیل آدیپوژنیک این سلول‌ها را افزایش می‌دهد. پس قبل از استفاده از A366 به عنوان دارو (بویژه برای کنترل و درمان سرطان)، باید تاثیر آن بر MSCs مطالعه و بررسی شود. همچنین این بررسی نشان می‌دهد که برای اهداف درمانی از طریق مهندسی بافت یا سلول درمانی باید وجود مهارکننده‌ها و فعال‌کننده‌های G9a در محیط سلول‌ها بررسی شود تا نتیجه بهتری از MSCs حاصل شود.

منابع

1. Ahn M.J., Jeong S.G., CHO G.W. 2016. Antisenescence activity of G9a inhibitor BIX01294 on human bone marrow mesenchymal stromal cells. *Turkish Journal of Biology*, 40(2): 443-451.
2. Ding, D. C., Shyu W.C., Lin S.Z., 2011. Mesenchymal stem cells. *Cell Transplantation*, 20(1): 5-14.
3. Dominici M., Blanc K., Mueller I. 2006. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*, 8(4): 315-317.
4. Duncan E.J., Gluckman P.D., Dearden P.K. 2014. Epigenetics, plasticity, and evolution: How do we link epigenetic change to phenotype? *Journal of Experimental Zoology Part B: Molecular and Developmental Evolution*, 322(4): 208-220.
5. Eisenberg C.A., Eisenberg L.M. 2019. G9a and G9a-Like Histone Methyl transferases and Their Effect on Cell Phenotype, Embryonic Development, and Human Disease, in *The DNA, RNA, and Histone Methylomes*. Springer, 23: 399-433.

گروه کنترل بوده، هرچند اندک اختلافاتی مشاهده شد. ولی در سلول‌های تیمار شده با غلظت‌های بالاتر (۵ و ۱۰ میکرومولار A366)، سلول‌هایی که از چرخه خارج شده بودند (G0/SubG1) افزایش یافته و سلول‌های قرار گرفته در مرحله تکثیر (G1، S و G2/M) کاهش را نشان دادند. در یک مطالعه پامپانو و همکاران نشان دادند که A366 در مقایسه با سایر مهارکننده، سمیت کمتری دارد (۱۲).

در نتیجه برای کاربردهای درمانی مناسبتر می‌باشد. این دانشمندان نشان دادند که تیمار سلول‌های سرطان خون با کوچک مولکول A366، باعث مهار رشد و تکثیر سلول‌ها می‌شود و در غلظت‌های بالا باعث تغییر پروفایل چرخه سلول می‌شود. نتایج این مطالعه با نتایج بدست آمده در مطالعه حاضر همخوانی دارد. نتایج مطالعه حاضر پیشنهاد می‌کنند که برای استفاده A366 به عنوان داروی ضد سرطان، باید رفتار و بقا و عملکرد سایر سلول‌ها را نیز بررسی کرد. زیرا ممکن است همراه با از بین بردن سلول‌های سرطانی باعث کاهش پتانسیل تکثیری و تمایزی BM-MSCs نیز شود.

بررسی میزان تمایز چربی در BM-MSCs تیمار شده با غلظت‌های مختلف A366، نشان داد که در تمام غلظت‌های A366، میزان تمایز آدیپوژنیک افزایش یافته و نسبت به کنترل بصورت کیفی بالاتر می‌باشد، که نشان می‌دهد مهار G9a باعث افزایش پتانسیل آدیپوژنیک BM-MSCs می‌شود. به عبارتی نشان می‌دهد که G9a در حالت طبیعی مهارکننده آدیپوژن می‌باشد و مهار آن، آدیپوژن را افزایش می‌دهد. مطالعات اخیر نیز نقش G9a را در فرایند آدیپوژن نشان داده بودند. برای مثال ونگ و همکاران نشان دادند که بیان G9a در سلول‌های پیش‌آدیپوسیتی بالا است اما همزمان با تمایز و شکل‌گیری سلول‌های آدیپوسیت بالغ، بیان آن کاهش پیدا می‌کند.



11. Nicetto D., Zaret K.S. 2019. Role of H3K9me3 heterochromatin in cell identity establishment and maintenance. *Current Opinion in Genetics and Development*, 55: 1-10.
12. Pappano W.N., Guo J., He Y., Ferguson D. 2015. The histone methyltransferase inhibitor A-366 uncovers a role for G9a/GLP in the epigenetics of leukemia. *PLoS One*, 10(7): 12: 34-49.
13. Purcell D.J., 2012. Recruitment of coregulator G9a by Runx2 for selective enhancement or suppression of transcription. *Journal of Cellular Biochemistry*, 113(7): 2406-2414.
14. Wang M., Yuan Q., Xie L. 2018. Mesenchymal stem cell-based immunomodulation: properties and clinical application. *Stem cells International*, 2(5): 67-78.
6. Eslaminejad B.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.
7. Fabrizio P., Garvis S., F. Palladino F., 2019. Histone methylation and memory of environmental stress. *Cells*, 8(4): 339-346.
8. Husmann D., Gozani O., 2019. Histone lysine methyltransferases in biology and disease. *Nature Structural and Molecular Biology*, 26(10): 880-889.
9. 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: 300-308.
10. Liu N., 2015. Recognition of H3K9 methylation by GLP is required for efficient establishment of H3K9 methylation, rapid target gene repression, and mouse viability. *Genes and Development*, 29(4): 393-379.