

Studying the Effect of Alpha-Tocopherol on Cell Proliferation and Apoptosis in Rat Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells

Malek Soleimani Mehranjani^{1*}, Majid Mahdiyeh¹, Atena Sadat Azimi¹

1- Department of Biology, Arak University Arak, Iran

Received: 2 March 2015, Accepted: 20 May 2015

Abstract

Background: Alpha-tocopherol, as a strong antioxidant, plays an important role in restraining free radicals. The aim of this study was to investigate the effect of Alpha-tocopherol on cell proliferation and restraining apoptosis in rat bone marrow mesenchymal stem cells.

Materials and Methods: In this research study, the rat bone marrow mesenchymal stem cells were extracted under sterile conditions using flashing-out method. At the end of the third passage, cells were divided into groups of control and Alpha-tocopherol with doses of 15 and 25 μM and were treated in the osteogenic media cell medium containing 10% fetal bovine serum, 10 mM β -glycerol phosphate, 10 nM dexamethasone and 50 $\mu\text{g/ml}$ ascorbic 3-phosphate] for a period of 21 days. Then, cell proliferation, DNA damage, expression of Bcl-2 and Bax genes and the morphologic changes of the cells were investigated during the procedure of osteogenesis. Data were analyzed using one-way ANOVA and means difference was considered significant at $p < 0.05$.

Results: Cell proliferation, the size of nuclei diameter and expression of anti-apoptotic Bcl-2 gene showed a significant increase in mesenchymal stem cells treated with Alpha-tocopherol ($p < 0.05$) in a dose dependent manner compared to the control cells. Also, cytoplasm extension was seen in the cells treated with Alpha-tocopherol, compared to the control group. Since Alpha-tocopherol causes a significant decrease in DNA damage and the expression of apoptotic Bax gene, compared to the control group, therefore it can suppress apoptosis in bone marrow mesenchymal stem cells, in a dose dependent manner.

Keywords: Alpha-tocopherol, Apoptosis, Cell proliferation, Mesenchymal stem cells

*Corresponding Author:

Address: Department of Biology, Arak University, Arak, Iran.
Email: m-soleimani@araku.ac.ir

مطالعه اثر آلفاتوکوفرول بر تکثیر سلولی و آپوپتوزیس در سلول‌های بنیادی مزانشیم مغز استخوان رت

ملک سلیمانی مهرنجانی^۱، مجید مهدیه^۲، آتنا سادات عظیمی^۳

۱- دانشیار، دکترای بافت و جنین‌شناسی، گروه زیست‌شناسی، دانشگاه اراک، اراک، ایران

۲- استادیار، دکترای فیزیولوژی گیاهی، گروه زیست‌شناسی، دانشگاه اراک، اراک، ایران

۳- کارشناس ارشد زیست‌شناسی جانوری، گروه زیست‌شناسی، دانشگاه اراک، ایران

تاریخ دریافت: ۹۳/۱۲/۱۲ تاریخ پذیرش: ۹۴/۲/۳۰

چکیده

زمینه و هدف: آلفاتوکوفرول به عنوان یک آنتی‌اکسیدانت قوی نقش مهمی را در مهار رادیکال‌های آزاد ایفا می‌کند. هدف از این پژوهش، بررسی نقش آلفاتوکوفرول بر تکثیر سلولی و مهار آپوپتوزیس در سلول‌های بنیادی مزانشیم مغز استخوان رت بالغ است.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه پژوهشی، سلول‌های بنیادی مزانشیم مغز استخوان با روش فلشینگ تحت شرایط استریل استخراج و پس از پاساژ سوم به گروه‌های کنترل و دوزهای ۱۵ و ۲۵ میکرومولار آلفاتوکوفرول تقسیم شدند و به مدت ۲۱ روز در محیط استئوژنیک شدند (محیط کشت سلولی حاوی ۱۰ درصد سرم جنین گاوی، ۱۰ میلی‌مولار بتاگلیسرول فسفات، ۱۰ نانومولار دگزامتازون و ۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر آسکوربیک ۳ فسفات) تیمار شدند. سپس میزان تکثیر سلولی، آسیب DNA، سطح بیان ژن‌های Bax و Bcl-2 و هم‌چنین تغییرات موفولوژیک سلول‌ها، طی روند تمایز استئوژنیک مورد بررسی قرار گرفتند و داده‌ها با روش آماری تحلیل واریانس یک‌طرفه، تجزیه و تحلیل گردیدند و تفاوت میانگین‌ها در سطح $p < 0.05$ معنی‌دار در نظر گرفته شد.

نتیجه‌گیری: تکثیر سلولی، میزان قطر هسته و بیان ژن آنتی‌آپوپتوتیک Bcl-2 در سلول‌های بنیادی مزانشیم تیمار شده با آلفاتوکوفرول، در رفتاری وابسته به دوز و در مقایسه با سلول‌های گروه کنترل از افزایش معنی‌داری برخوردار بودند ($p < 0.05$). گسترش سیتوپلاسم نیز در سلول‌های تیمار شده با آلفاتوکوفرول در مقایسه با سلول‌های گروه کنترل مشاهده شد. از آنجایی که آلفاتوکوفرول، کاهش معنی‌داری در آسیب DNA و بیان ژن آپوپتوتیک Bax در مقایسه با گروه کنترل ایجاد می‌کند، بنابراین می‌تواند آپوپتوزیس را در سلول‌های بنیادی مزانشیم مغز استخوان، در رفتاری وابسته به دوز مهار کند.

واژگان کلیدی: آلفاتوکوفرول، آپوپتوزیس، تکثیر سلولی، سلول‌های بنیادی مزانشیم

* نویسنده مسئول: اراک، دانشگاه اراک، گروه زیست‌شناسی

Email: m-soleimani@araku.ac.ir

مقدمه

مغز استخوان رت بالغ طی روند تمایز به استئوبلاست مورد مطالعه و بررسی قرار دهیم.

آنتی اکسیدانت ها ترکیباتی هستند که از تشکیل رادیکال های آزاد در سلول ها جلوگیری می کنند و نقش مهمی در محافظت از سلول در مقابل پراکسیداسیون لیپیدی و آسیب های سلولی ناشی از استرس اکسیداتیو ایفا می کنند (۱).

ویتامین E یک آنتی اکسیدانت قوی فنولیک و محلول در چربی است (۲). این آنتی اکسیدانت غیر آنزیمی در طبیعت، به دو زیررده توکوفرول و توکوترینول تقسیم می شود که هر کدام دارای چهار ایزوform α ، β ، δ و λ می باشند و آلفاتو کوفرول مهم ترین و فعال ترین ایزوform آن در بدن محسوب می شود (۲، ۳). آلفاتو کوفرول، از جنس اسیدهای چرب غیر اشباع فسفولیپیدهای غشای زیستی است (۴) که در لایه چربی دیواره و غشاء سلول قرار می گیرد و از تخریب دیواره و غشاهای زیستی جلوگیری می کند و از آن جا که محلول در چربی است، در بافت چربی، کبد و عضلات بدن انسان و دیگر جانوران نیز ذخیره می گردد (۵).

سلول های بنیادی مزانشیم مغز استخوان، سلول های پرتوانی هستند که توانایی تمایز به انواع رده های سلولی نظیر سلول های استخوانی، غضروف و چربی را دارا می باشند. این سلول ها را می توان به راحتی استخراج، تخلیص و هم چنین تکثیر کرد و از آن ها در پیوندهای اتولوگ جهت ترمیم ضایعات سلولی و بافتی استفاده نمود (۸-۶). طبق مطالعات صورت گرفته توسط اهن و همکاران در سال ۲۰۱۱، آلفاتو کوفرول می تواند باعث تغییر در الگوی بیان ژن ها و هم چنین القای تمایز استوژنیک در سلول های بنیادی مزانشیم گردد (۹).

بنابراین با توجه به پتانسیل بالای این سلول ها در تمایز به استخوان و کاربرد گسترده آن ها در ترمیم ضایعات استخوانی (۱۰) و از آن جایی که در روند تمایز آن ها به استئوبلاست با پدیده آپوپتوزیس مواجه هستیم (۱۱)، بر آن شدیم تا اثر آلفاتو کوفرول را به عنوان یک آنتی اکسیدانت و یک آنتی آپوپتوتیک قوی (۱۲) بر سلول های بنیادی مزانشیم

مواد و روش ها

جداسازی و کشت سلول های مغز استخوان

در این پژوهش کلیه اصول اخلاقی کار با حیوانات آزمایشگاهی رعایت شد و بدین منظور از رت های نژاد ویستار با سن ۵۰ روز و وزن 20 ± 140 گرم استفاده گردید. حیوان مورد استفاده در این پژوهش پس از خریداری از انستیتو پاستور در خانه حیوانات دانشگاه اراک در شرایط استاندارد دمایی 3 ± 27 درجه سانتی گراد و با دسترسی آزاد به غذا و آب در قفس های پلی اتیلین نگهداری شد. پس از کسب مجوز از کمیته اخلاق دانشگاه اراک و رعایت اصول اخلاقی، رت ها به کمک دی اتیلن اتر بیهوش شدند، استخوان های ران و ساق پای آن ها جدا شدند و سپس بافت های پیوندی اطراف استخوان ها به طور کامل پاک گردیدند. استخوان ها در محیط کشت DMEM (Dulbecco's Modified Eagles Medium، شرکت گیبکو، آلمان) حاوی ۱۵ درصد سرم FBS (سرم جنین گاوی، شرکت گیبکو، آلمان) و پنی سیلین - استرپتومایسین (ساخت شرکت گیبکو، آلمان) در دمای ۴ درجه سانتی گراد قرار گرفتند و به زیر هود لامینار منتقل شدند. دو سر استخوان با قیچی استریل قطع شد و مغز استخوان با عمل فلاشینگ خارج گردید و به داخل لوله فالكون حاوی محیط کشت کامل هدایت شد و سپس به مدت ۵ دقیقه با دور ۱۲۰۰ بر دقیقه سانترفیوژ شد. محیط رویی خارج و رسوب سلولی در یک میلی لیتر محیط کشت تازه معلق گردید و در فلاسک کشت T25 و در انکوباتور CO₂ دار (دمای ۳۷ درجه سانتی گراد و ۵ درصد CO₂) انکوبه گردید. پس از ۲۴ ساعت، محیط رویی که حاوی سلول های غیر چسبیده بود خارج شد و شستشوی سلول ها با بافر فسفات سالین انجام گردید. سپس به مدت دو هفته، هر سه روز یک بار محیط کشت سلول ها تعویض گردید. زمانی که کف فلاسک به تراکم بالایی از سلول رسید، سلول ها با کمک 1x

آزمون کامت

تست کامت روش بسیار حساسی با عنوان "Single-cell alkaline gel electrophoresis" یا "Comet assay" می‌باشد که از آن برای بررسی سلامت DNA هسته سلول‌های تیمار شده با آلفاتوکوفرول در مقایسه با گروه کنترل استفاده شد. این تست بر اساس حرکت DNA در میدان الکتریکی انجام می‌شود. اگر DNA در اثر عوامل محیطی مختلف دچار شکست شده باشد، به دلیل اختلاف سرعت حرکت قطعات DNA با طول مختلف در میدان الکتریکی، هاله یا دنباله‌ای در اطراف هسته سلول‌ها دیده می‌شود و هرچه این تخریب شدیدتر باشد، هاله بزرگ‌تر و کشیده‌تری حول هسته تشکیل خواهد شد. برای انجام این تست ابتدا مخلوط سوسپانسیون سلولی گروه کنترل و تیمار با تراکم 2×10^5 در هر میلی‌لیتر محلول ۱ درصد آگارز با دمای ذوب پایین تهیه شد. این سوسپانسیون بر روی اسلایدهای میکروسکوپی مفروش شده با ۱ درصد آگارز ۵ نرمال گذاشته شد و پس از لامل‌گذاری، اسلایدها به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد آنکوبه شدند. سپس لامل به آرامی از روی اسلایدها برداشته شد و اسلاید میکروسکوپی به مدت ۶۰ دقیقه با $\text{pH} = 10$ در بافر لیز حاوی ۰/۱ میلی‌مولار EDTA، ۲/۵ میلی‌مولار NaCl، ۱ درصد NaSLs، ۱۰ میلی‌مولار Tris-base قرار داده شد. پس از آن اسلایدها به مدت ۲۰ دقیقه با $\text{pH} = 13$ و جریان ۳۰۰ آمپر در بافر الکتروفورز حاوی ۱ میلی‌مولار EDTA و ۳۰۰ میلی‌مولار NaOH الکتروفورز گردید. در نهایت نمونه در بافر خنثی کننده حاوی ۰/۴ مولار Tris base که با Hcl به $\text{pH} = 7/5$ رسیده بود، شستشو داده شده و پس از رنگ‌آمیزی با اتیدیوم بروماید به کمک میکروسکوپ الیمپوس مشاهده و عکس‌برداری گردید (۱۳).

استخراج RNA و آنالیز RT-PCR

کشت سلولی و جداسازی RNA: در این مرحله سلول‌ها به تعداد 5×10^2 در فلاسک‌های T25 کشت داده شدند و به مدت ۲۱ روز با محیط استئوژنیک و دوزهای ۱۵ و ۲۵ میکرومولار آلفاتوکوفرول کشت و تیمار شدند.

Trypsin/EDTA ۰/۲۵ درصد (تهیه شده از شرکت سیگما-آلد ریچ) از کف فلاسک جدا گردیدند و به فلاسک‌های جدید منتقل شدند. برای به دست آوردن خلوص بالایی از این سلول‌ها سه مرحله پاساژ تکرار شد.

کشت سلول‌ها در دوزهای مختلف آلفاتوکوفرول و بررسی قدرت تکثیر آن‌ها

سلول‌های پاساژ سوم به تعداد 5×10^3 سلول در هر خانه‌ی پلیت ۲۴ خانه‌ای به مدت ۲۴ ساعت کشت داده شدند و پس از چسبیدن این سلول‌ها به کف در حضور گروه کنترل (محیط استئوژنیک: محیط DMEM حاوی ۱۰ درصد سرم گاوی، ۱۰ میلی‌مولار بتاگلیسرول فسفات، ۱۰ نانومولار دگزمتازون و ۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر آسکوربیک-۳-فسفات) و دوزهای ۵، ۱۰، ۱۵، ۲۵، ۵۰، ۱۰۰ و ۱۵۰ میکرومولار آلفاتوکوفرول (ساخت شرکت آلد ریچ) در محیط استئوژنیک کشت شدند. پس از ۲۱ روز قدرت تکثیر سلول‌ها ارزیابی گردید و بدین منظور، ۳۰ میکرولیتر محلول ۰/۰۱ مولار متیل تیازول تترازولیم (MTT) به هر چاهک اضافه شد و به مدت ۴ ساعت آنکوبه گردید. پس از این که کریستال‌های فورمازون تشکیل شدند، این بلورها در حلال دی‌متیل سولفوکسید (DMSO) (ساخت شرکت سیگما-آلد ریچ) حل شدند و میزان جذب محلول حاصل در طول موج ۴۵۰ نانومتر از طریق دستگاه ELAISA-reader (شرکت SCO diagnostic، آلمان) اندازه‌گیری شد و MTT تعداد سلول‌های زنده در گروه‌های مختلف با استفاده از منحنی استاندارد تعیین شد (۱۳).

انتخاب دوز موثر و بررسی‌های بیشتر

با توجه به نتایج به دست آمده از تست MTT، ۱۵ و ۲۵ میکرومولار آلفاتوکوفرول به عنوان دوزهای موثر انتخاب گردید و مطالعه با سه گروه کنترل، تیمار با ۱۵ میکرومولار آلفاتوکوفرول و ۲۵ میکرومولار آلفاتوکوفرول ادامه یافت.

بررسی تغییرات مورفولوژیکی سلول‌ها

به دنبال تیمار سلول‌ها در یک محیط استئوژنیک برای ۲۱ روز، تغییرات مورفولوژیکی سلول‌ها پس از ۵ دقیقه انکوبه کردن در دمای اتاق با استفاده از رنگ‌های هوخست-۳۳۳۴۲، پروپیدیوم آیوداید و آکریدین اورنژ بررسی شد. هم‌چنین قطر هسته سلول‌ها به وسیله نرم افزار تصویری موتیک (شرکت گروه میکرو اپتیکال، نسخه ۱/۲) اندازه‌گیری شد. هوخست-۳۳۳۴۲، رنگ فلورسنتی است که از طریق غشای پلاسمایی در سلول نفوذ کرده و DNA را رنگ می‌کند که با استفاده از آن می‌توان تغییرات هسته از قبیل تراکم کروماتین و قطعه قطعه شدن آن را بررسی کرد. پروپیدیوم آیوداید نیز برای رنگ‌آمیزی هسته سلول‌های مرده کاربرد دارد. مورفولوژی سیتوپلاسم سلول‌ها هم به وسیله رنگ آکریدین اورنژ، بررسی شد؛ این رنگ هسته را سبز و سیتوپلاسم را نارنجی می‌کند. سلول‌ها بعد از رنگ‌آمیزی ۲ بار با بافر فسفات سالین شسته شدند و بررسی صورت گرفت و عکس‌برداری بلافاصله از طریق میکروسکوپ فلورسنس (الیمپوس، IX70) انجام شد (۱۴).

تحلیل آماری داده‌ها

داده‌های به دست آمده با استفاده از آزمون آماری آنوای یک طرفه و تست توکی تجزیه و تحلیل شدند و تفاوت میانگین‌ها در سطح $p < 0.05$ معنی‌دار در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

بررسی میزان تکثیر سلولی و انتخاب دوز موثر

با توجه به مقایسه تعداد سلول‌های زنده در سلول‌های بنیادی مزانشیم مغز استخوان تیمار شده با دوزهای مختلف آلفاتو کوفرول و به صورت وابسته به دوز، افزایش معنی‌داری نسبت به گروه کنترل مشاهده شد ($p < 0.05$) (نمودار ۱ و شکل ۱).

سپس سلول‌ها با کمک اسکالپر از کف فلاسک تراشیده و به اپندورف منتقل گردیدند. سلول‌ها در ازت مایع به فریزر ۸۰- درجه سانتی‌گراد انتقال یافتند. جداسازی RNA این سلول‌ها با استفاده از کیت RNeasy mini kit (کیازن) و برطبق دستورالعمل کارخانه سازنده صورت گرفت و از دستگاه اسپکتروفتومتر به منظور سنجش میزان RNA استخراج شده استفاده گردید. پس از صفر کردن دستگاه از طریق آب دیونیزه به عنوان blank، ۳ میکرولیتر از نمونه با ۹۷ میکرولیتر آب دیونیزه رقیق شد و پس از وارد کردن رقت، مقدار RNA استخراج گشت و هم‌چنین نسبت بین ۲۶۰ تا ۲۸۰ ثبت گردید. تمامی مراحل در زیر هود لامینار صورت گرفت.

ستنز C-DNA (واکنش رونویسی معکوس):

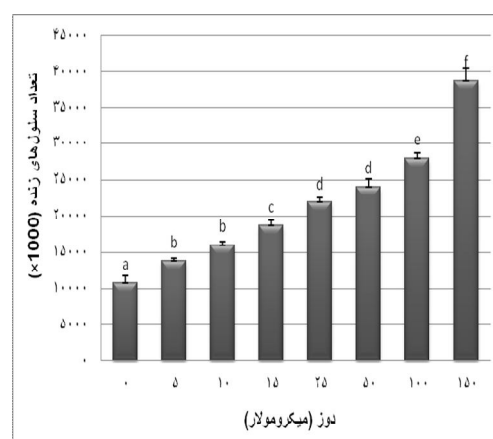
۲ میکرولیتر از عصاره سلولی حاوی RNA (۰/۵ میکروگرم بر میکرو لیتر) را برداشته و به هر کدام از اپندورف‌ها ۱ میکرولیتر پرایمر هگزامر تصادفی (۰/۲ میکروگرم بر میکرولیتر) و ۱ میکرولیتر پرایمر اختصاصی توالی اضافه نموده و نمونه را حدود ۳ تا ۵ ثانیه ورتکس می‌نمایم، سپس نمونه‌ها را به مدت ۵ دقیقه در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده و بعد آن‌ها را روی یخ می‌گذاریم. در ادامه ۴ میکرولیتر بافر واکنش 5X، ۱ میکرولیتر ممانعت کننده RiboLock (۲۰ واحد بر میکرولیتر)، ۱ میکرولیتر مخلوط Dttp، dCTP و dGTP و ۴ میکرولیتر dATP (۰/۱ میلی‌مولار) را به نمونه‌ها اضافه کرده و پس از یک ورتکس کوتاه، اپندورف‌ها را به مدت ۵ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار می‌دهیم و جهت متوقف کردن واکنش، ۱ میکرولیتر dATP و ۲ میکرولیتر آنزیم M-MuLV (۲۰ واحد بر میکرولیتر) را به نمونه‌ها افزوده و اپندورف‌ها را در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری می‌کنیم.

واکنش زنجیره پلی‌مراز (PCR): واکنش

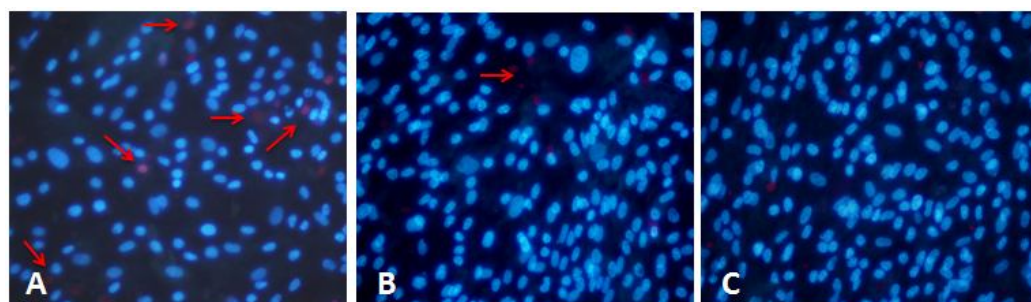
RT-PCR در حجم ۲۵ میکرولیتر و تحت دمای آیلینگ ۵۸ درجه سانتی‌گراد، در ۳۵ سیکل صورت گرفت و از ژن بتا اکتین به عنوان کنترل داخلی استفاده شد.

دوزهای مختلف آلفاتوکوفرول (میکرومولار). میانگین‌های با کد حرف‌های مختلف دارای تفاوت معنی‌دار هستند (تست آنوای یک طرفه، تست توکی، $p < 0.05$).

با توجه به نتایج حاصل از تست MTT و رنگ‌آمیزی سلول‌ها با پروپیدیوم آیویدید، ۱۵ و ۲۵ میکرومولار آلفاتوکوفرول به عنوان دوزهای موثر انتخاب گردیدند و مطالعه با سه گروه کنترل و تیمار با دوزهای ۱۵ و ۲۵ میکرومولار آلفاتوکوفرول ادامه یافت.



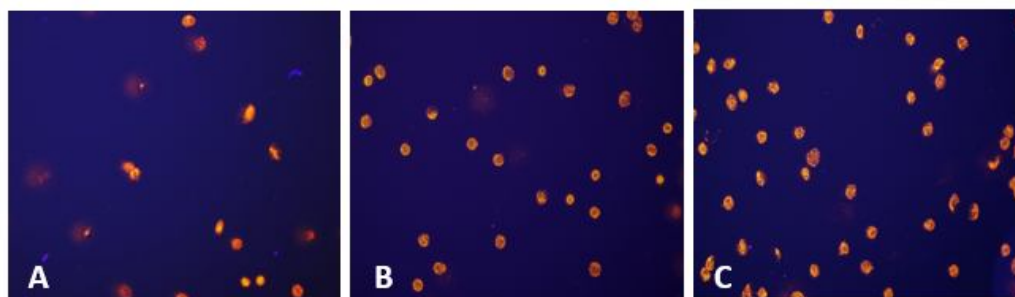
نمودار ۱. مقایسه میانگین تعداد سلول‌های زنده در سلول‌های بنیادی مزانشیم مغز استخوان رت بالغ پس از ۲۱ روز تیمار



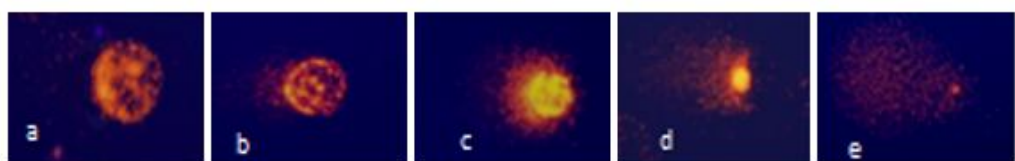
شکل ۱. رنگ‌آمیزی سلول‌های بنیادی مزانشیم مغز استخوان رت با رنگ فلورسنت پروپیدیوم آیویدید (بزرگ‌نمایی 20x). (A) گروه سلول‌های کنترل. (B) سلول‌های تیمار شده با ۱۵ میکرومولار آلفاتوکوفرول. (C) سلول‌های تیمار شده با ۲۵ میکرومولار آلفاتوکوفرول. (در رنگ‌آمیزی سلول‌ها با رنگ پروپیدیوم آیویدید، هسته‌های صورتی رنگ سلول‌های مرده را نشان می‌دهند).

و مطالعات کمی نتایج حاصل از آزمون کامت، درجات مختلفی از طول دنباله‌ی کامت در تصاویر مشاهده گردید که براساس طول دنباله کامت (میکرومتر)، آن‌ها را به پنج درجه متفاوت تقسیم کردیم (شکل ۳). به طور کلی، داده‌های حاصل حاکی از کاهش معنی‌دار میزان آسیب DNA ($p < 0.001$) و هم‌چنین میانگین طول دنباله کامت ($p < 0.01$) و در نتیجه کاهش میزان حرکت قطعات شکسته شده DNA در میدان الکتریکی در سلول‌های بنیادی مزانشیم تیمار شده با آلفاتوکوفرول، در مقایسه با سلول‌های گروه کنترل بود (نمودار ۲).

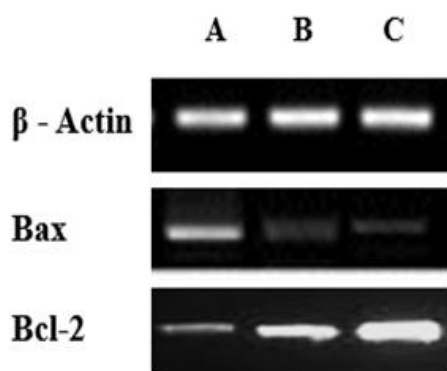
تست کامت: در بررسی اثر آلفاتوکوفرول بر سلامت هسته سلول‌های بنیادی مزانشیم از طریق تکنیک کامت مشخص شد که در گروه‌های تیمار شده با آلفاتوکوفرول، هسته سلول‌ها به صورت یکنواخت با اتیدیوم برماید رنگ‌آمیزی شده و بدون هاله بود که این امر بیان‌گر سلامت DNA می‌باشد. درحالی که در گروه کنترل، DNA شکسته شده در برخی از سلول‌ها تحت تاثیر میدان الکتریکی به صورت دنباله یا کامت به همراه باقی مانده هسته‌ها دیده شد و این نشانه تخریب DNA و مرگ سلولی بود (شکل ۲). هم‌چنین طبق بررسی‌های صورت گرفته



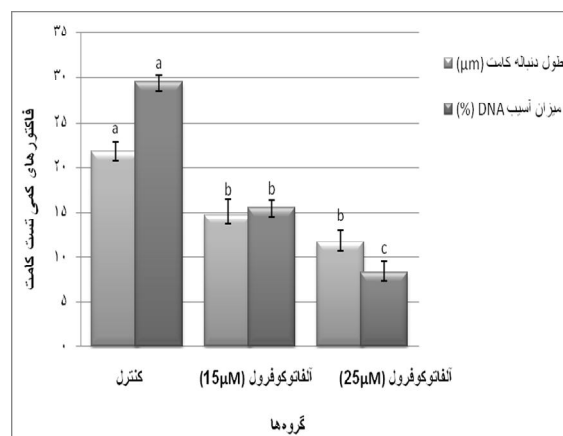
شکل ۲. تست کامت در سلول‌های بنیادی مزانشیم تمایز یافته به استئوبلاست، ۲۱ روز پس از تیمار با آلفاتوکوفرول (بزرگ‌نمایی ۲۰X). (A) گروه کنترل. (B) گروه سلول‌های تیمار شده با ۱۵ میکرومولارد آلفاتوکوفرول. (C) گروه سلول‌های تیمار شده با ۲۵ میکرومولار آلفاتوکوفرول.



شکل ۳. درجه بندی سلول‌ها بر اساس طول و اندازه کامت. A. درجه صفر (بدون کامت). B. درجه یک. C. درجه دو. D. درجه سه. E. درجه چهار.



شکل ۴. تحلیل کیفی سطح بیان ژن‌های Bcl-2 و Bax در سلول‌های بنیادی مزانشیم مغز استخوان رت، ۲۱ روز پس از تیمار با آلفاتوکوفرول. (A) گروه کنترل. (B) گروه سلول‌های تیمار شده با ۱۵ میکرومولار آلفاتوکوفرول. (C) گروه سلول‌های تیمار شده با ۲۵ میکرومولار آلفاتوکوفرول. ژن بتا - اکتین به عنوان کنترل داخلی در نظر گرفته شده است.



نمودار ۲. مقایسه اثر آلفاتوکوفرول بر میانگین طول دنباله کامت (میکرومتر) و میزان آسیب DNA (درصد) در سلول‌های بنیادی مزانشیم مغز استخوان رت با گروه کنترل، ۲۱ روز پس از تیمار با دوزهای ۱۵ و ۲۵ میکرومولار آلفاتوکوفرول. میانگین‌های با کد حرف‌های مختلف دارای تفاوت معنی‌دار هستند. (تست آنوای یک طرفه، تست توکی، $p < 0.05$)

بررسی تغییرات مورفولوژیک سلول‌ها

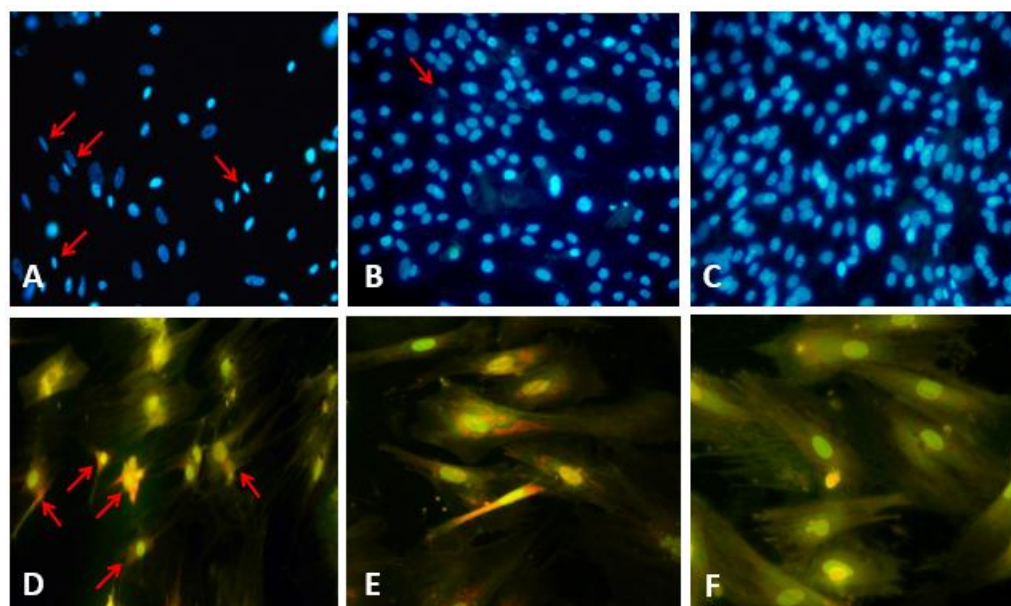
قطر هسته سلول‌های بنیادی مزانشیم تیمار شده با آلفاتوکوفرول نسبت به گروه کنترل، افزایش معنی‌داری ($p < 0.05$) را نشان داد (شکل ۵، A-C و نمودار ۳).

تحلیل کیفی سطح بیان ژن‌های Bcl-2 و Bax

بررسی میزان سطح بیان ژن آپوپتوتیک Bax و ژن آنتی آپوپتوتیک Bcl-2 از طریق آنالیز RT-PCR در گروه سلول‌های تیمار شده با آلفاتوکوفرول به ترتیب کاهش و افزایش قابل توجهی را در میزان بیان ژن‌های مذکور در مقایسه با گروه کنترل نشان داد (شکل ۴).

گروه تیمار شده با ۲۵ میکرومولار آلفاتوکوفرول، نسبت به سلول‌های تیمار شده با ۱۵ میکرومولار آلفاتوکوفرول و سلول‌های گروه کنترل، بیشتر گسترش یافته بود (شکل ۵، D-F).

رنگ آمیزی سیتوپلاسم سلول‌ها با رنگ آکریدین اورنژ نیز سیتوپلاسم چندوجهی با زوائد قابل تشخیص را در سلول‌های بنیادی مزانشیم تیمار شده با دوزهای ۱۵ و ۲۵ میکرومولار آلفاتوکوفرول نسبت به گروه کنترل نشان داد که البته سیتوپلاسم سلول‌ها در

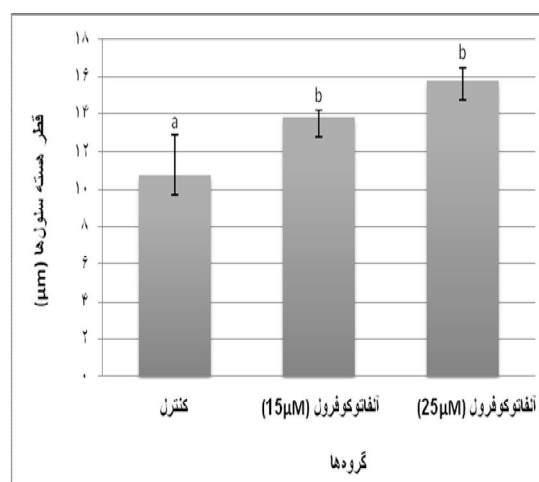


شکل ۵. رنگ آمیزی هوخست (A-C) (بزرگنمایی 20x) و آکریدین اورنژ (D-F) (بزرگنمایی 40x) در سلول‌های بنیادی مزانشیم تمایز یافته به استئوبلاست، ۲۱ روز پس از تیمار با آلفاتوکوفرول در محیط استنوزنیک (A, D, گروه کنترل. B, E) سلول‌های تیمار شده با ۱۵ میکرومولار آلفاتوکوفرول (C, F) سلول‌های تیمار شده با ۲۵ میکرومولار آلفاتوکوفرول. (بیگان‌ها در شکل A و B، فشردگی کروماتین را در هسته سلول‌ها و در شکل D، انقباض و فشردگی سیتوپلاسم را نشان می‌دهند).

بحث

بر طبق نتایج حاصل از این پژوهش، آلفاتوکوفرول در رفتاری وابسته به دوز، باعث کاهش سطح بیان ژن آپوپتوتیک Bax و میزان آسیب و شکستگی DNA و در مقابل افزایش معنی‌دار تعداد سلول‌های زنده و میانگین قطر هسته در سلول‌های بنیادی مزانشیم مغز استخوان رت بالغ گردید ($p < 0.05$). هم‌چنین این آنتی‌اکسیدانت قوی موجب افزایش قابل توجهی در سطح بیان ژن آنتی‌آپوپتوتیک Bcl-2 و میزان گسترده سیتوپلاسم در این سلول‌ها شد که این یافته‌ها در راستای نتایج حاصل از مطالعه وانگ و همکاران بر روی سلول‌های PC12 در سال ۲۰۱۲ می‌باشد (۱۵).

گوپتا و همکاران، سوکولوا و هم‌چنین لیو و همکاران نیز به ترتیب در سال‌های ۲۰۱۱، ۲۰۱۱ و ۲۰۱۰،



نمودار ۳. مقایسه اثر آلفاتوکوفرول بر میانگین قطر هسته در سلول‌های بنیادی مزانشیم مغز استخوان رت با سلول‌های گروه کنترل، ۲۱ روز پس از تیمار با دوزهای ۱۵ و ۲۵ میکرومولار آلفاتوکوفرول. میانگین‌های با کد حرف‌های مختلف دارای تفاوت معنی‌دار هستند. (تست آنوای یک طرفه، تست توکی، $p < 0.05$)

اثر آلفاتوکوفرول را بر سلول‌های هیپاتوسیت موش صحرایی (۱۶)، سلول‌های میوبلاست انسانی رده‌ی PCL₂ (۱۷) و سلول‌های اپی‌تلیال انسانی (۱۸) مورد بررسی قرار دادند و مشاهده کردند که آلفاتوکوفرول در رفتاری وابسته به دوز و زمان می‌تواند باعث مهار گونه اکسیژن واکنش‌گر (ROS)، کاهش پراکسیداسیون لیپیدی و متعاقب آن کاهش میزان تولید مالون‌دی‌آلدئید، افزایش سطح گلوکوتایون احیاء (GSH)، میزان فعالیت سوپراکسیددسموتاز (SOD)، گلوکوتایون پراکسیداز (GPx) و کاتالاز در رده‌های مختلف سلولی گردد و در نتیجه بدین طریق سبب افزایش قدرت تکثیر سلولی و توانایی زیستی و همچنین کاهش سطح استرس اکسیداتیو در سلول‌ها شود.

آلفا توکوفرول به عنوان یک آنتی‌اکسیدانت قوی نقش موثری در حذف رادیکال‌های آزاد دارد و از آنجا که رادیکال‌های آزاد در سلول موجب تخریب DNA و توقف چرخه سلولی می‌شوند، آلفاتوکوفرول می‌تواند با مهار آن‌ها موجب افزایش قدرت تکثیر، توانایی زیستی سلول‌ها و کاهش آسیب و شکستگی‌های DNA گردد (۱۹).

در حقیقت آلفاتوکوفرول، در ساختمان خود یک حلقه‌ی قطبی کرومانول دارد که گروه هیدروکسیل قرار گرفته بر روی این حلقه قطبی، باعث احیاء رادیکال‌های آزاد و غیرفعال‌سازی آن‌ها می‌گردد. بنابراین آلفاتوکوفرول با اهدای هیدروژن فنولیک حلقه‌ی کرومانولی خود، باعث شکستن زنجیره رادیکال‌های آزاد شده و پراکسیداسیون لیپیدهای داخل سلول و فسفولیپیدهای غشا را به حداقل می‌رساند و بدین طریق امکان بقای سلول را افزایش می‌دهد و باعث افزایش قدرت تکثیر سلول‌ها می‌گردد (۱، ۲۰).

از دیگر یافته‌های این پژوهش، کاهش میزان آسیب و شکستگی DNA در سلول‌های تیمار شده با آلفاتوکوفرول است.

شکسته شدن DNA از طریق آنزیم نوکلئازی (DNase) فعال شونده با کاسپاز CAD صورت می‌گیرد که طی دو مرحله عمل می‌کند و رشته طویل DNA را به قطعات ۲۰۰ تا ۵۰۰ جفت بازی شکسته و

تخریب می‌کند. میزان فعالیت آنزیم CAD، از طریق فاکتور مهار کننده DNase فعال شونده با کاسپاز (ICAD) تنظیم و کنترل می‌شود. ICAD، چپرونی است که به CAD متصل شده و با آن کمپلکسی را تشکیل می‌دهد که باعث مهار فعالیت CAD و در نتیجه توقف روند قطعه قطعه شدن DNA و مهار آپوپتوزیس می‌گردد (۲۱، ۲۲). بر طبق پژوهش‌های صورت گرفته، آلفاتوکوفرول با کاهش میزان فعالیت کاسپاز ۳ که مهم‌ترین آنزیم مخرب فاکتور ICAD است، تخریب ICAD را مهار و احتمال تشکیل کمپلکس ICAD /CAD را افزایش می‌دهد (۲۳). بنابراین آلفاتوکوفرول با مهار فعالیت کاسپاز ۳، میزان آسیب و شکستگی‌های DNA را به طور غیرمستقیم کاهش می‌دهد و بدین طریق آپوپتوزیس را در سلول‌های بنیادی مزانشیم مغز استخوان مهار می‌کند.

در این مطالعه جهت اطمینان بیشتر در تشخیص نوع مرگ سلولی، علاوه بر بررسی میزان آسیب و شکستگی DNA، سطح بیان ژن‌های Bax و Bcl-2 نیز مورد ارزیابی و سنجش قرار گرفت و مشاهده شد که آلفاتوکوفرول به طور قابل توجهی باعث کاهش سطح بیان ژن آنتی آپوپتوتیک Bcl-2 و افزایش سطح بیان ژن آپوپتوتیک Bax در سلول‌های بنیادی مزانشیم مغز استخوان، در مقایسه با گروه کنترل می‌گردد. آلفاتوکوفرول از طریق جلوگیری از کاهش پتانسیل غشای میتوکندری و مهار فعالیت کاسپاز ۳، باعث کاهش بیان ژن آپوپتوتیک Bax و افزایش بیان ژن آنتی آپوپتوتیک Bcl-2 در سلول‌های بنیادی مزانشیم مغز استخوان رت بالغ می‌گردد (۱۵) و از آنجا که فعال شدن ژن Bax و افزایش فعالیت کاسپاز ۳ سبب فعال شدن آبشار ژنی القای آپوپتوزیس در سلول‌ها می‌شود، در نتیجه آلفاتوکوفرول با خاصیت آنتی‌اکسیدانتی خود باعث تغییر در الگوی بیان برخی ژن‌ها و مهار آبشار ژنی آپوپتوتیک در سلول می‌گردد.

در مطالعه‌ی حاضر، تغییرات مورفولوژیکی نیز یکی دیگر از تغییرات مشاهده شده در اثر تیمار با آلفاتوکوفرول در سلول‌های بنیادی مزانشیم مغز استخوان

موثر سلول‌های بنیادی مزانشیم مغز استخوان در فن‌آوری‌های پیشرفته سلول درمانی و مهندسی بافت، پیشنهاد می‌شود که تحقیقات بیشتری در زمینه ارتباط بین بیماری‌ها و سطوح سرمی آلفاتو کوفرول در جوامع انسانی صورت گیرد. شاید این آنتی‌اکسیدانت قوی بتواند ماده‌ای موثر در درمان و حتی پیش‌گیری از ابتلا به برخی بیماری‌های انسانی باشد.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله محققان از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه اراک و حمایت مالی آن معاونت در انجام این پروژه تحقیقاتی تشکر و سپاس‌گزاری می‌نمایند.

منابع

1. Fang Y-Z, Yang S, Wu G. Free radicals, antioxidants, and nutrition. *Nutrition*. 2002;18(10):872-9.
2. Traber MG, Atkinson J. Vitamin E, antioxidant and nothing more. *Free Radical Biology and Medicine*. 2007;43(1):4-15.
3. Shalaby M, Elzorba H. Protective effect of celery oil, vitamin e and their combination against testicular toxicity in male rats. *Global Veterinaria*. 2010;5(2):122-8.
4. Kadoma Y, Ishihara M, Okada N, Fujisawa S. Free radical interaction between vitamin E (alpha-, beta-, gamma-and delta-tocopherol), ascorbate and flavonoids. *in vivo*. 2006;20(6B):823-7.
5. Traber MG, Burton G, Hughes L, Ingold K, Hidaka H, Malloy M, et al. Discrimination between forms of vitamin E by humans with and without genetic abnormalities of lipoprotein metabolism. *Journal of lipid research*. 1992;33(8):1171-82.
6. Abnosi MH, Soleimani Mehranjani M, Shariatzadeh SMA, Mahdiyeh Najafabadi M, Leila D. The effect of long term treatment of lowest effective dose of para-nonylphenol on viability, morphology and proliferation of rat bone marrow mesenchymal stem cells. *Physiology and Pharmacology*. 2011; 15(3): 308-17.
7. Eslaminejad MB. Mesenchymal stem cell: Isolation and biology. *Journal of Iranian Anatomical Science*. 2007; 5: 61-73.[Persian]

است. این تغییرات شامل افزایش معنی‌دار قطر هسته و گسترش قابل توجه سیتوپلاسم در سلول‌های تیمار شده با آلفاتو کوفرول، در مقایسه با سلول‌های گروه کنترل بود. در حالی که در برخی سلول‌های گروه کنترل فشردگی و انقباض سیتوپلاسم و در بعضی قسمت‌ها خارج شدن سلول از حالت چندوجهی دیده شد و این تغییرات مورفولوژیکی ذکر شده منطبق با تغییراتی است که ممکن است در مرگ سلولی از نوع آپوپتوزیس رخ دهد (۲۴، ۲۵). مکانیسم اصلی در کنترل شکل سلول و گسترش سیتوپلاسم، پلیمریزاسیون پروتئین‌های اسکلت سلولی است که از مهم‌ترین این گروه پروتئین‌ها می‌توان به اکتین اشاره کرد. آلفاتو کوفرول با افزایش سطح گلوکوتائون احیاء که پیشتر مطرح شد، باعث افزایش پلیمریزاسیون اکتین و فشردگی میکروفیلانته‌ها می‌گردد، چرا که گلوکوتائون مهم‌ترین گروه تیول غیرپروتئینی است که برای سنتز اکتین و دیگر پروتئین‌های اسکلت سلولی ضروری می‌باشد (۲۶، ۲۷) بنابراین تغییرات مورفولوژیکی مشاهده شده در مطالعه حاضر می‌تواند به دلیل افزایش سطح گلوکوتائون ناشی از تیمار با آلفاتو کوفرول در سلول‌های بنیادی مزانشیم مغز استخوان رت بالغ باشد که گسترش سیتوپلاسم و مهار آپوپتوزیس را در این سلول‌ها موجب شده است.

بنابراین نتایج حاصل از این مطالعه نشان می‌دهد که آلفاتو کوفرول، باعث تغییر در الگوی بیان ژن‌ها، افزایش سطح بیان ژن‌های آنتی‌آپوتوتیک، کاهش سطح بیان ژن‌های آپوتوتیک، افزایش بقای سلولی و قدرت تکثیر، کاهش میزان آسیب و شکستگی DNA و در نتیجه مهار مرگ سلولی از نوع آپوپتوزیس در سلول‌های بنیادی مزانشیم مغز استخوان رت بالغ می‌گردد.

نتیجه‌گیری

با توجه به نتایج حاصل از این پژوهش مشخص شد که آلفا تو کوفرول ضمن افزایش قدرت تکثیر سلول‌های بنیادی مزانشیم مغز استخوان، موجب مهار آپوپتوزیس در سلول‌های بنیادی مزانشیم مغز استخوان رت بالغ در محیط استئوژنیک نیز می‌گردد. بنابراین با توجه به اهمیت و نقش

8. Eslaminejad M, Rouhi L, Arabnajafi M, Baharvand H. Culture and Expansion of Rat Mesenchymal Stem Cells Using the Serum Prepared from Rat s Peripheral Blood. *Journal of Iranian Anatomical Sciences*. 2007;4(17):331-44.
9. Ahn KH, Jung HK, Jung SE, Yi KW, Park HT, Shin JH, et al. Microarray analysis of gene expression during differentiation of human mesenchymal stem cells treated with vitamin E in vitro into osteoblasts. *Korean Journal of Bone Metabolism*. 2011;18(1):23-32.
10. Birmingham E, Niebur G, McHugh P. Osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells is regulated by osteocyte and osteoblast cells in a simplified bone niche. 2012; 23: 13-27.
11. Duque G, Vidal C, Rivas D. Protein isoprenylation regulates osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells: effect of alendronate, and farnesyl and geranylgeranyl transferase inhibitors. *British journal of pharmacology*. 2011;162(5):1109-18.
12. Bayunova L, Sokolova T, Avrova N. Antiapoptotic effect of alpha-tocopherol at micro-and nanomolar concentrations on cells of neuronal line PC12 according to data of flow cytometry. *Journal of Evolutionary Biochemistry and Physiology*. 2011;47(3):242-50.
13. Mehranjani MS, Mosavi M. Cadmium chloride toxicity suppresses osteogenic potential of rat bone marrow mesenchymal stem cells through reducing cell viability and bone matrix mineralization. *Indian journal of medical sciences*. 2011;65(4):157-67.
14. Abnosi MH, Soleimani Mehranjani M, Momeni H, Mahdiyeh Najafabadi M, Barati M, Shojafar E. The effect of para-nonylphenol on the viability and morphology of rat bone marrow mesenchymal stem cells. *Arak Medical University Journal*. 2011;14(1):1-11.[Persian]
15. Wang J, Sun P, Bao Y, Dou B, Song D, Li Y. Vitamin E renders protection to PC12 cells against oxidative damage and apoptosis induced by single-walled carbon nanotubes. *Toxicology in Vitro*. 2012;26(1):32-41.
16. Gupta A, Singh S, Jamal F, Nath S, Mehrotra S, Sharma B. Synergistic effects of glutathione and vitamin E on ROS mediated ethanol toxicity in isolated rat hepatocytes. *Asian J Biochem*. 2011;6:347-56.
17. Sokolova T, Rychkova M, Zakharova I, Voynova I, Avrova N. Alpha-tocopherol at nanomolar concentrations increases the viability of PC12 cells under oxidative stress conditions. The effects of modulation of signaling systems. *Neurochemical Journal*. 2011;5(3):183-90.
18. Liu H-Y, Zhao K, Zhou M-M, Wang C, Ye J-A, Liu J-X. Cytoprotection of vitamin E on hyperthermia-induced damage in bovine mammary epithelial cells. *Journal of Thermal Biology*. 2010;35(5):250-3.
19. Warren S, Patel S, Kapron CM. The effect of vitamin E exposure on cadmium toxicity in mouse embryo cells in vitro. *Toxicology*. 1999;142(2):119-26.
20. Abbasi AL, Ranaian N, Aboei F, Sonnewald U. Reduced Tocopherol Content in Arabidopsis thaliana by HPT:RNAi. *Crop Biotechnology*. 2013; 3(4): 43-52.
21. Lechardeur D, Drzymala L, Sharma M, Zylka D, Kinach R, Pacia J, et al. Determinants of the nuclear localization of the heterodimeric DNA fragmentation factor (ICAD/CAD). *The Journal of cell biology*. 2000;150(2):321-34.
22. Pollard TD, Earnshaw WC, Lippincott-Schwartz J. *Cell biology: Elsevier Health Sciences*; 2007.
23. Mohan M, Taneja TK, Sahdev S, Mohareer K, Begum R, Athar M, et al. Antioxidants prevent UV-induced apoptosis by inhibiting mitochondrial cytochrome c release and caspase activation in *Spodoptera frugiperda* (Sf9) cells. *Cell biology international*. 2003;27(6):483-90.
24. Clarke PG. Developmental cell death: morphological diversity and multiple mechanisms. *Anatomy and embryology*. 1990;181(3):195-213.
25. Willie A. Cell death: the significance of apoptosis. *Int Rev Cytol*. 1980;68:251-306.
26. Hinshaw DB, Burger JM, Beals TF, Armstrong BC, Hyslop PA. Actin polymerization in cellular oxidant injury. *Archives of biochemistry and biophysics*. 1991;288(2):311-6.
27. Kuo J-H, Chen H-W, Chou R-GR, Lii C-K. Vitamin E protection of cell morphology under oxidative stress is related to cytoskeletal proteins in rat hepatocytes. *Archives of toxicology*. 1997;71(4):231-7.