مجلـــه‌ی علمـی، پژوهشـی دانشـــگاه علـــوم پزشـــکی زنجـــان
دوره‌ی ۲۳، شماره‌ی ۹۸، مرداد و شهریور ۱۳۹٤، صفحات ۱ تا ۱٦

بررسی اثر ایزوپرترنول (آگونیست بتا آدرنرژیک) بر تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان انسان به استئوبلاست در شرایط آزمایشگاهی

فاطمه محمدعلی[۱]، دکترسعید آبرون[۲]، دکتر مسعود سلیمانی[۲]، دکتر امیر آتشی[۳]، دکتر سعید کاویانی[۲]

نویسنده‌ی مسوول: تهران، دانشگاه تربیت مدرس Abroun @modares.ac.ir

دریافت: ۹۳/۳/۳ پذیرش: ۹۳/۱۱/۲۰

چکیده

زمینه و هدف: *تاکنون در مطالعات مختلفی به بررسی پتانسیل استئوژنیک سلولهای بنیادی مزانشیمی و اهمیت سیگنالهای بتا آدرنرژیک در تشکیل و بازجذب استخوان پرداخته شده است. با این وجود اطلاعات کمی درباره نقش سیگنال های بتا آدرنرژیک در تمـایز استئوبلاسـتی سـلول‌هـای بنیادی مزانشیمی که از اهمیت بالایی در فیزیولوژی و فارماکولوژی استخوان برخوردار است، وجود دارد. در این تحقیق، میزان بیان کمی ژن‌های RUNX2 و استئوکلسین در طول تمایز سلول های بنیـادی مزانـشیمی بـه استئوبلاسـت بـا اسـتفاده از محـیط تمـایزی استئوبلاسـتی و داروی ایزوپرترنول (آگونیست بتا آدرنرژیک) مورد ارزیابی قرار گرفت.*

روش بررسی: *در این مطالعه تجربی، سلول های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان انسان تحـت تیمـار بـا محـیط تمـایزی استئوبلاسـتی و داروی ایزوپرترنول قرار گرفتند. استخراج RNA در روزهای ۴ و ۲۱ تمایز استئوبلاستی و از سلول‌های بنیادی مزانشیمی تمایز نیافته صورت گرفت بیان کمی ژن‌های RUNX2 و استئوکلسین با روش quantitative Real Time-PCR سنجیده شد.*

یافته ها: *بیان ژن‌های RUNX2 و استئوکلسین در روزهای۴ و ۲۱ تمایز استئوبلاستی تحت تیمار با داروی ایزوپرترنول کاهش یافت که در روز ۲۱ تمایز این اختلاف از نظر آماری معنی‌دار بود (P<۰/۰۵).*

نتیجه گیری: *داروی ایزوپرترنول به طور منفی بر تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی به استئوبلاست تاثیر دارد (به خصوص بر مراحل انتهایی تمایز استئوبلاستی). این یافته‌ها نشان می‌دهد که سلول‌های بنیادی مزانشیمی انسانی نیز مورد هدف تنظیم سیستم بتا آدرنرژیک قرار دارند و مـی‌توانـد گزینه درمانی مناسبی در بیماریهای استخوانی باشد .*

واژگان کلیدی: ***سلول های بنیادی مزانشیمی، محیط تمایز استئوبلاستی، بتا آدرنرژیک، ایزوپرترنول، RUNX2 ، استئوکلسین***

مقدمه

بافت استخوان یک نـوع بافـت همبنـد اختـصاصی و بـه شدت سازمان یافته است که به‌طور مداوم توسـط چهـار نـوع سلول استئوسیت، استئوکلاست، استئوبلاسـت و سـلول‌هـای پوششی تجدید و نوسازی می‌شود. مطالعات مختلـف نـشان داده‌اند که اسـتخوان فیبرهـای عـصبی سـمپاتیک فراوانـی را دریافت می‌کند (۱). به نظر می‌رسد که شکل‌گیری اسـتخوان

۱- دانشجوی دکترای تخصصی هماتولوژی، دانشگاه تربیت مدرس
۲-دکترای تخصصی هماتولوژی، دانشیار دانشگاه تربیت مدرس
۳- دکترای تخصصی هماتولوژی، استادیار دانشگاه تربیت مدرس

تحت تنظیم اعصاب باشد که مطالعات مختلف حضور نورون‌های سمپاتیک در سطح سلول‌های استخوانی را نشان داده‌اند (۲). اثر نورون‌های سمپاتیک بر سلول‌های استخوان به‌طور عمده توسط گیرنده‌های بتا آدرنرژیک میانجی‌گری می‌شود. در مطالعات مختلف حضور گیرنده‌های بتا آدرنرژیک در سطح استئوبلاست‌های موشی و رده‌های سلولی استئوبلاستی به اثبات رسیده است. در میان گیرنده‌های بتا آدرنرژیک بر سطح سلول‌های استئوبلاستی، فراوان‌ترین آن‌ها بتا -۲ آدرنرژیک است (۳). گیرنده‌های بتا آدرنرژیک به خانواده‌ی بزرگ پروتئین‌های با دومین هفت بار گذر از غشا تعلق دارند که از طریق پروتئین‌های متصل شونده به نوکلئوتید گوانین (G-Protein) انتقال سیگنال انجام می‌دهند. مسیر احتمالی سیگنال‌دهی گیرنده‌ی بتا-۲ آدرنرژیک شامل جفت شدن GSα و آدنیلات سیکلاز و تولید cAMP (Cyclic Adenosine Monophosphate) و نهایتا فعال شدن پروتئین کیناز A (PKA) می‌باشد که PKA فعال شده به نوبه‌ی خود باعث فسفریله شدن پروتئین‌های هدف مختلفی از جمله فاکتورهای رونویسی، کینازهای مختلف و گیرنده‌های سطح سلول از جمله خود گیرنده‌ی بتا -۲ آدرنرژیک می‌شود (۴).

افزایش فعالیت سیستم عصبی سمپاتیک با اثرات مهاری مستقیم بر استئوبلاست‌ها باعث از دست دادن استخوان می‌شود. در حین بازسازی استخوان، نور اپی نفرین از نورون‌های سمپاتیک آزاد شده و با تاثیر بر استخوان باعث افزایش بازجذب استخوان (۶و ۵) و مهار تشکیل استخوان (۷و ۳) می‌شود. از آنجا که تشکیل استخوان جدید نقش اصلی استئوبلاست‌ها می‌باشد بنابراین عواملی که باعث افزایش پرولیفراسیون رده‌ی استئوبلاستی و یا القای تمایز استئوبلاستی شوند، باعث افزایش تشکیل استخوان می‌شوند. بیان گیرنده‌ی بتا-۲ آدرنرژیک در استئوبلاست‌ها و اثر آگونیست و آنتاگونیست‌های گیرنده‌ی بتا آدرنرژیک در تشکیل استخوان به صورت In Vivo مطرح کننده این نکته است که سیگنالینگ سمپاتیک، گیرنده‌ی بتا آدرنرژیک را در سطح استئوبلاست‌ها مورد هدف قرار می‌دهد (۸). در حمایت از این نتایج، دستکاری ژنتیکی ژن گیرنده‌ی بتا-۲ آدرنرژیک و همچنین کمبود آدنیلیل سیکلاز ۵، (یک مدیاتور پایین دست سیگنالینگ گیرنده‌ی بتا-۲ آدرنرژیک) هر دو منجر به فنوتیپ توده‌ی استخوانی حجیم می‌شوند (۹). این نتایج نشان می‌دهد که سیگنالینگ سمپاتیک از طریق گیرنده‌ی بتا-۲-آدرنرژیک در استئوبلاست‌ها مانع ازتشکیل استخوان می‌شود، بنابراین مهار فارماکولوژیک گیرنده‌های بتا -۲ آدرنرژیک باعث افزایش توده‌ی استخوانی می‌شود (۱۰و۷). با وجود مطالعات متعدد در زمینه‌ی تاثیر سیستم بتا آدرنرژیک بر تشکیل و تحلیل استخوان، مطالعات کمی به بررسی نقش سیگنالینگ بتا آدرنرژیک در تمایز استئوبلاستی سلول‌های بنیادی مزانشیمی پرداخته‌اند که نقش حیاتی در فیزیولوژی و فارماکولوژی استخوان دارد. هدف از این مطالعه بررسی اثر ایزوپرترنول (آگونیست بتا آدرنرژیک) برتمایز سلول‌های استئوبلاستی در شرایط In Vitro با استفاده از بررسی بیان ژن‌های RUNX2 و استئوکلسین است. RUNX2 مهم‌ترین فاکتور نسخه‌برداری در رده‌ی استئوبلاستی است و استئوکلسین که به نام BGLAP (Bone Gamma-Carboxyglutamate (gla) Protein) نیز نامیده می‌شود، یک جزء پروتئینی غیر کلاژنی عمده‌ی ماتریکس خارج سلولی استخوان است که منحصرا توسط سلول‌های استئوبلاستی و در مراحل آخر بلوغ سنتز و ترشح می‌شود که نشان دهنده‌ی تمایز استئوبلاستی است (۱۲و۱۱). در این تحقیق با استناد به بررسی‌های انجام شده بر کنترل تمایز استئوبلاست‌ها تحت تاثیر آگونیست‌های بتا آدرنرژیک، قصد داریم تاثیر این دارو را بر روند تمایز استئوبلاستی سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان انسان مورد مطالعه قرار دهیم.

روش بررسی

تهیه و کشت سلول‌های بنیادی مزانشیمی انسان: در این مطالعه‌ی تجربی، سلول‌های بنیادی مزانشیمی استخراج شده از مغز استخوان انسان از مرکز تحقیقات فناوری بن یاخته اخذ شدند و از نظر بیان مارکرهای اختصاصی سلول‌های بنیادی مزانشیمی (CD44،CD105،CD13 ، CD166) مثبت بودند که این تایید کننده‌ی کیفیت جداسازی سلول‌های MSCs (Mesenchymal Stem Cells) بود (۱۳). همچنین قابلیت تمایز این سلول‌ها به سلول‌های رده‌ی مزانشیمی شامل استئوبلاست، کندروسیت و آدیپوسیت توسط مرکز تحقیقات فناوری بن یاخته انجام گرفته و تایید شد. سلول‌های بنیادی مزانشیمی پس از دفریز کردن، در فلاسک کشت سلول T75 به همراه ۲۰ میلی لیتر محیط کشت DMEM-Low Glucose (Gibco)، FBS (Fetal Bovine Serum) ۱۰ درصد، ۱۰ واحد بر میلی‌لیتر پنی‌سیلین و ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر استرپتومایسین در انکوباتور ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد با دی‌اکسیدکربن ۵ درصد کشت داده شدند. سلول‌های بنیادی مزانشیمی از نظر مورفولوژی در زیر میکروسکوپ معکوس به شکل سلول‌های شفاف، منعکس کننده‌ی نور و دوکی شکل بوده و هر روز نسبت به روز قبلی بر همشاری (Confluency) سلول‌ها افزوده می‌شد. تعویض محیط کشت هر دو روز یک بار صورت می‌گرفت و وقتی سلول‌های بنیادی مزانشیمی به همشاری ۷۰ درصد رسیدند، سلول‌ها تریپسینه شده و در فلاسک‌های جدید جهت القا تمایز استئوبلاستی با محیط تمایزی و تیمار با دارو کشت داده شدند.

القاتمایز استئوبلاستی در سلول‌های بنیادی مزانشیمی با محیط تمایزی: برای تهیه‌ی محیط تمایزی استئوبلاستی از محیط کشت عمومی DMEM، L- گلوتامین و FBS ۱۰ درصد استفاده شد که به این محیط کشت فاکتورهای دگزامتازون با غلظت نهایی ۱۰ نانومولار، بتا- گلیسرول فسفات با غلظت نهایی ۵ میلی مولار و آسکوربات -۲-فسفات با غلظت نهایی ۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر اضافه گردید. سلول‌های بنیادی مزانشیمی حاصل از پاساژ سوم تریپسینه و در پلیت شش خانه‌ای کشت داده شدند. (بنابراین سلول‌ها در پاساژ چهارم بودند). سپس به رسوب سلولی، در حدود یک میلی لیتر محیط کشت DMEM حاوی FBS ۱۰ درصد اضافه شد. سلول‌ها هر روز مورد بررسی قرار گرفتند و وضعیت سلول‌ها رضایت بخش بود. در روز سوم که سلول‌ها به همشاری ۵۰ تا ۶۰ درصد رسیدند، تمایز سلول‌ها شروع گردید. به این صورت که محیط کشت DMEM را از پلیت‌ها خارج کرده و سپس محیط تمایزی استئوبلاستی به آن‌ها اضافه شد. نمونه برداری از سلول‌های بنیادی مزانشیمی تمایز نیافته در روز صفر و سلول‌های بنیادی مزانشیمی تمایز داده شده در روزهای ٤ (ابتدای تمایز) و ۲۱ (انتهای تمایز)صورت گرفت. ضمنا تمایز استئوبلاستی در یک پلیت ٦ خانه‌ای نیز انجام گرفت تا جهت رنگ‌آمیزی آلیزارین رد از آن استفاده گردد.

تیمار سلول‌های بنیادی مزانشیمی با ایزوپرترنول: داروی ایزوپرترنول در ویال حاوی ۱۰۰ میلی‌گرم پودر ایزوپرترنول هیدروکلراید از شرکت دارویی سیگما تهیه گردید. این دارو محلول در آب بوده و همچنین قابلیت انحلال در محیط کشت را نیز دارد و پس از تهیه در دمای ۲۰ درجه‌ی سانتی‌گراد نگهداری شد. برای تیمار پیوسته (Continuous) از غلظت نهایی ۱۰ میکرومولار (١٤) داروی ایزوپرترنول در محیط کشت استفاده شد. برای القای تمایز استئوبلاستی، سلول‌های بنیادی مزانشیمی انسان در پلیت‌های شش خانه ای کشت داده شدند. بعد از اینکه سلول‌ها به همشاری ۵۰ تا ۶۰ درصد رسیدند تحت تیمار پیوسته با ۱۰ میکرومول داروی ایزو پرترنول قرار گرفتند. به این ترتیب که هر دو روز یک بار همراه با تعویض محیط کشت، این دارو نیز به پلیت اضافه شد. هم زمان با این سلول‌ها، پلیت حاوی محیط تمایزی بدون دارو به‌عنوان کنترل استفاده شد. نهایتا گروهی از

سلول‌ها تا روز ٤ و گروهی تا روز ۲۱ کشت داده شدند. علاوه بر سلول‌های تیمار شده، سلول‌های بنیادی مزانشیمی بدون تیمار به‌عنوان کنترل کشت داده شدند.

رنگ آمیزی آلیزارین رد: برای تایید تمایز استئوبلاستی از رنگ آمیزی آلیزارین رد استفاده گردید. برای این منظور سلول‌های بنیادی مزانشیمی در پلیت‌های ۶ خانه‌ای کشت داده شدند. گروهی از سلول‌ها با ایزوپرترنول تیمار شدند و گروهی هم به‌عنوان کنترل بدون تیمار کشت داده شدند. رنگ آمیزی آلیزارین رد در روز ۴ و ۲۱ کشت انجام گرفت. برای این منظور محیط کشت تخلیه شده و سلول‌ها با PBS شستشو شدند و با فرمالین ۱۰ درصد به مدت ۳۰ دقیقه تثبیت شدند، سپس با آب مقطر شستشو داده شد و نهایتا رنگ آلیزارین رد ۱ درصد اضافه شده و به مدت ۴۵ دقیقه به دور از نور و در دمای اتاق انکوبه شدند. سپس با آب مقطر شستشو داده شد و در زیر میکروسکوپ از نظر وجود رسوب‌های قرمز رنگ کلسیم مورد ارزیابی قرار گرفتند.

استخراج RNA: RNA سلول‌های بنیادی مزانشیمی تمایز نیافته (روز ۰)، سلول‌های مزانشیمی تمایز داده شده (روز ۴ و روز ۲۱) و سلول‌های بنیادی مزانشیمی تیمار شده با داروی ایزوپرترنول در روزهای ۴ و ۲۱ با روش دستی به‌ترتیب زیر استخراج گردید. [۴] ۱۰ سلول را از طریق تریپسینه کردن از فلاسک‌ها جدا کرده، سپس ۲۰۰ میکرولیتر از بافر لیز کننده‌ی تریزول به رسوب سلولی حاصل از هر چاهک پلیت اضافه کرده و بعد از چند بار پیپتاژ کردن، مخلوط به یک میکروتیوپ ۱/۵ میلی‌لیتری منتقل شد. به مخلوط سلولی ۲۰۰ میکرولیتر کلروفرم اضافه کرده، به مدت ۱ دقیقه به شدت تکان داده، سپس به مدت ۵ دقیقه در دمای اتاق انکوبه گردید. مخلوط حاصل در دمای ۴ درجه‌ی سانتی‌گراد با دور rpm ۱۲۰۰۰ به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفیوژ شد. مایع بی‌رنگ رویی را تا فاصله‌ی چند میلی‌متری از بالای فاز میانی که حاوی DNA است به میکروتیوب منتقل شد. هم حجم محلول رویی، به آن ایزوپروپانول سرد افزوده و پیپتاژ شد. محلول برای یک شب در ۲۰- درجه‌ی سانتی‌گراد نگهداری شد. بعد از گذشت این زمان، محلول فوق به مدت ۴۵ دقیقه در دمای۴ درجه‌ی سانتی‌گراد با دور rpm ۱۲۰۰۰ سانتریفیوژ شد سپس مایع رویی دور ریخته شد و به رسوب شفاف انتهای میکروتیوب، ۱میلی‌لیتر اتانول ۷۰ درصد سرد اضافه گردید و به خوبی ورتکس شد تا رسوب از ته میکروتیوب جدا گردد. محلول مورد نظر مجددا در دمای ۴ درجه‌ی سانتی‌گراد با دور rpm ۱۲۰۰۰ این بار به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ شد. در نهایت اتانول روی رسوب دور ریخته شد و رسوب در دمای اتاق قرار داده شد تا در حد امکان خشک شود. درمرحله‌ی آخر، رسوب در ۳۰ میکرولیتر آب بدون RNase کاملا حل شد و نهایتا محلول حاصل، جهت نگهداری، به فریزر ۷۰- درجه‌ی سانتی‌گراد منتقل گردید تا سپس از آن cDNA ساخته و Real-Time PCR انجام شود. .قبل از سنتز cDNA تمامیت RNA(Integrity) با الکتروفورز بر روی ژل آگارز سنجیده شد. مقدار RNA استخراج شده به واسطه‌ی جذب در طول موج ۲۶۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. خلوص RNA استخراج شده از طریق نسبت جذب در طول موج ۲۶۰ نانومتر به ۲۸۰ نانومتر سنجیده شد.

سنتز cDNA: سنتز cDNA با استفاده از ۱۳/۵ میکرولیتر RNA استخراج شده از سلول‌های بنیادی مزانشیمی و سلول‌های تمایز یافته‌ی استئوبلاستی انجام گرفت. مخلوط واکنش برای سنتز cDNA شامل ۱ میکرولیتر پرایمر Oligo-dT، ۲ میکرولیتر بافر X ۱۰ (محتوی ۵۰ میلی‌مول Tris-Hcl، ۷۵ میلی مول KCL، ۳ میلی‌مول Mgcl2 و ۱۰ میلی‌مول DDT)، ۲ میکرولیتر مخلوط dNTP ۱۰ میلی‌مولار، ۱ میکرولیتر آنزیم ترانس کریپتاز M-MuLV که به حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر رسید. برنامه دمایی برای واکنش نسخه برداری معکوس نیز ۴۲ درجه‌ی سانتی‌گراد به‌مدت

۶۰ دقیقه بود. غیر فعال سازی آنـزیم بـه واسـطه ی حـرارت ۷۰ درجه‌ی سانتی‌گراد به مـدت ۱۰ دقیقـه صـورت گرفـت. cDNA حاصل یا به‌طور مستقیم در واکنش Real Time PCR مـورد اسـتفاده قـرار گرفـت و یـا در فریـزر ۲۰ – درجـه‌ی سانتی‌گراد جهت استفاده‌های بعدی ذخیره گردید

Quantitative Real Time-PCR: بیـان کمـی mRNA ژن‌هـای RUNX2 و استئوکلـسین حاصـل از نمونـه‌هـای RNA استخراج شده از سلول‌های بنیـادی مزانـشیمی تمـایز نیافته (روز ۰)، سلول‌های مزانشیمی تمایز داده شده (روزهای ۴ و ۲۱ پس از القای تمایز) و سلول‌هـای بنیـادی مزانـشیمی تمایز داده شده و تیمار شده با ایزوپرترنول (روزهای ۴ و ۲۱) پس از تیمار با استفاده از کیـت Quantifast SYBR Green Amplicon PCR و با دسـتگاه ترمـال سـایکلر Real Time PCR (Step One) بررسـی شـد. تـوالی پرایمرهـای مـورد استفاده در Quantitative Real Time PCR بـرای ژن‌هـای RUNX2 و استئوکلسین در جدول ۱ آورده شده است.

جدول ۱: توالی پرایمرهای مورد استفاده برای ژن‌های RUNX2 ، استئوکلسین و بتا اکتین (کنترل داخلی)

نام ژن	توالی	Tm	طول
RUNX2-F	GCC TTC AAG GTG GTA GCC C	62	66
RUNX2-R	CGT TAC CCG CCA TGA CAG TA	60	
Osteocalcin-F	CCA AAG GTG CAG CCT TTG TG	60	80
Osteocalcin-R	GGC TCC CAG CCA TTG ATA CAG	63	
β-Actin -F	CTG GAA CGG TGA AGG TGA CA	57.2	144
β-Actin -R	AAG GGA CTT CCT GTA ACA ATG CA	56.6	

حجم نهایی واکنش ۱۰ میکرولیتر بود. مخلوط واکنش شـامل ۰/۳ میکرولیتـر از هـر پرایمـر reverse و Forward، ۲ میکرولیتر cDNA، ۵ میکرولیتر SYBR Green PCR Master Mix و ۲/۷ میکرولیتر آب مقطر دوبار تقطیر بـود. برنامه‌ی دمایی شامل یک سیکل ۹۵ درجه‌ی سـانتی‌گـراد بـه مدت ۱۵ دقیقه، ۴۰ سیکل ۹۵ درجه‌ی سانتی‌گراد بـه مـدت ۲۰ ثانیه، و ٤٠ سیکل ۶۰ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه بود.

2X QuantiFast SYBR Green PCR Master Mix محتـوی DNA پلیمـراز، بـافر QuantiFast SYBR Green PCR، مخلوط dNTPs (شامل dCTP، dGTP، dTTP و dATP) و رنگ رفرانس غیرفعال ROX می‌باشد. تمـام مراحـل گفتـه شده بـه صـورت تریپلیکیـت و بـا پرایمرهـای Forward و Reverse و ژن بتا اکتین به عنوان کنترل داخلی(جهت تست حـضور cDNA) انجـام شـد. بتـا اکتـین جـزو ژن‌هـای Housekeeping می‌باشد کـه بیـان آن در سـلول‌هـا ثابـت می‌باشد. یک نمونه کنترل منفی با عنوان NTC نیز تهیـه شـد که شامل تمامی مواد فوق به غیر از cDNA می‌باشد. به‌منظور کمی سازی نسبی، از روش C_t مقایسه‌ای استفاده شد. در ایـن روش مقدار هدف نرمال شده نسبت به یک کنتـرل درونـی و نسبت به یک کالیبراتور با اسـتفاده از فرمـول $۲^{-\Delta\Delta ct}$ محاسـبه می‌شود.

$\Delta C_t = C_t$ (ژن هدف) - C_t (مرجع)

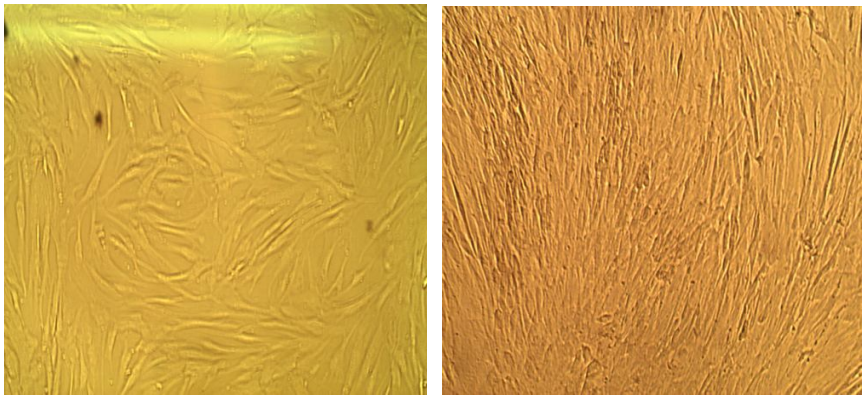
$\Delta\Delta C_t = \Delta C_t$(نمونه‌ی مورد آزمایش) - ΔC_t(نمونه‌ی نرمال)

میزان تغییرات بیان $= ۲^{-\Delta\Delta Ct}$

محاسبات و تنظیمات در یـک صـفحه از برنامـه Excel وارد شد. در نهایت اختلاف بیـان mRNA هـا نـسبت بـه نمونـه کنترل، توسـط نـرم‌افـزار GraphPad Parism 5 بـا روش آماری Paired T test مورد محاسبه قرار گرفت.

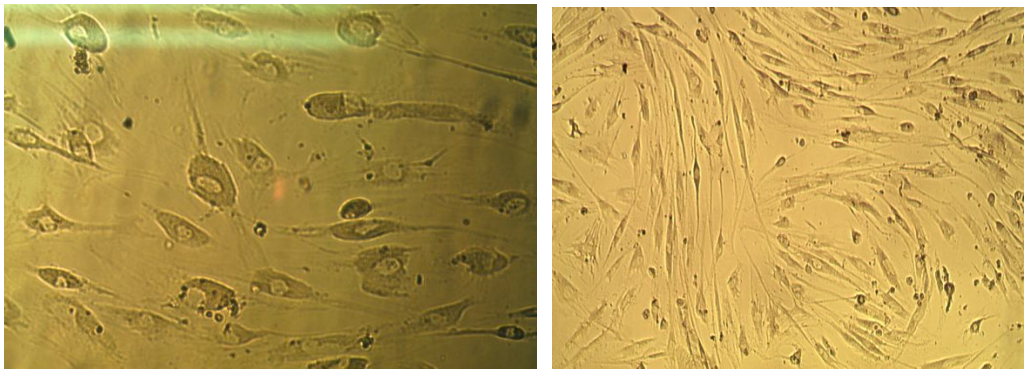
یافته‌ها

مشاهدات میکروسکوپی: نتایج مشاهدات مورفولوژیک سلول‌های بنیادی مزانشیمی با میکروسکوپ معکوس، مورفولوژی مشابه سلول‌های فیبروبلاستی را نشان داد (شکل ۱). این سلول‌ها قبلا در مرکز تحقیقاتی بن یاخته مورد ارزیابی فلوسایتومتری قرار گرفته و از نظر بیان مارکرهای اختصاصی سلول‌های بنیادی مزانشیمی (CD44، CD13،CD105، CD166) مثبت بودند که تایید کننده‌ی کیفیت جداسازی سلول‌های بنیادی مزانشیمی بود.



شکل ۱: مورفولوژی فیبروبلاستی سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان انسان

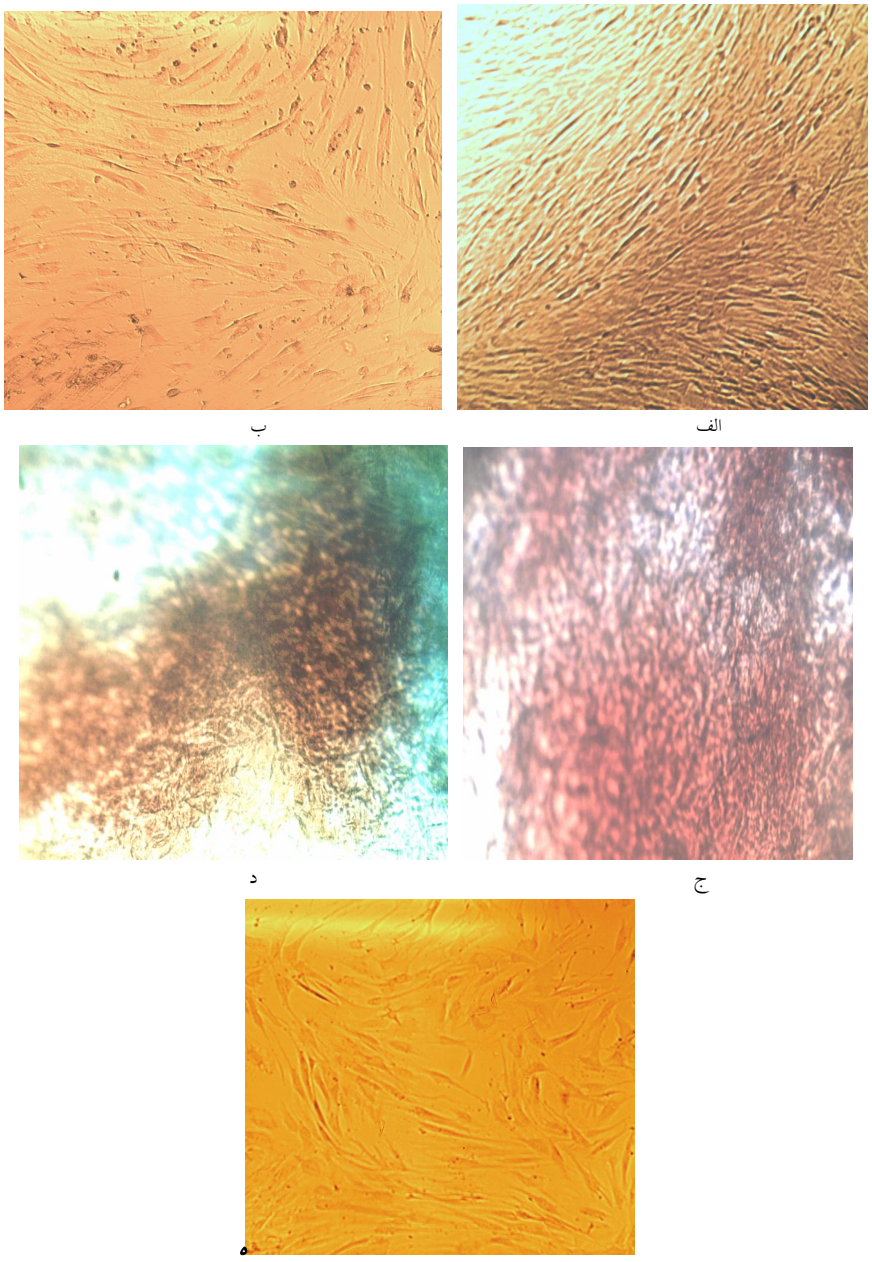
با به کار بردن محیط تمایزی استئوبلاستی سلول‌های بنیادی مزانشیمی به سلول‌های استئوبلاستی تمایز داده شد و در روزهای ۴و ۲۱ مشاهدات میکروسکوپی به عمل آمد و همان طور که در شکل ۲ مشاهده می‌گردد، تغییرات مورفولوژیک قابل ملاحظه بود.



شکل ۲: سلول‌های بنیادی مزانشیمی در روزهای مختلف تمایز (از راست به چپ به ترتیب) روز ۴ و ۲۱ تمایز را نشان می‌دهد

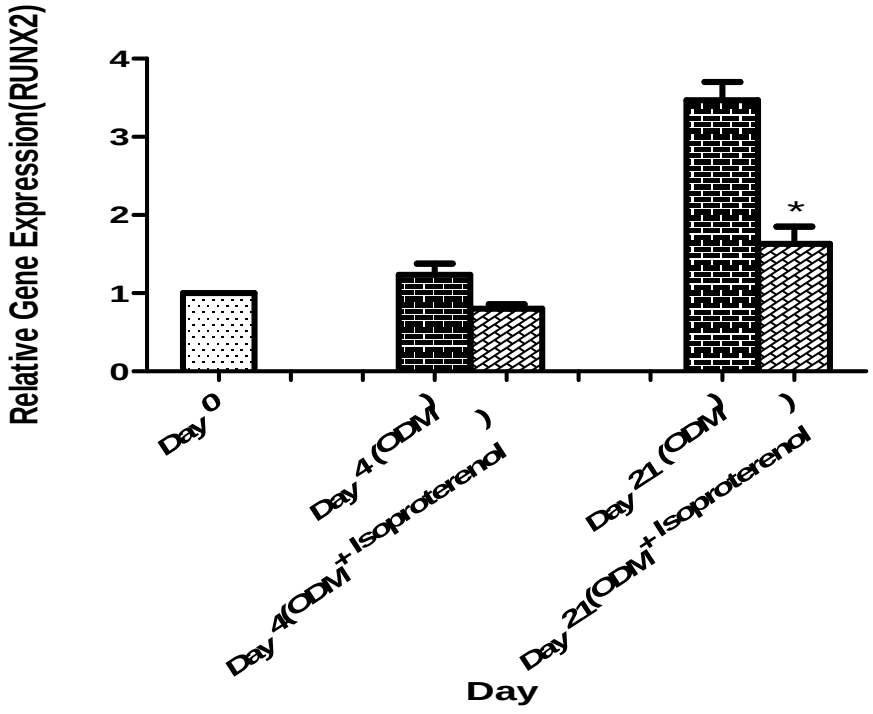
تایید تمایز استئوبلاستیک با رنگ آمیزی آلیزارین رد: با به کار بردن محیط تمایزی استئوبلاستی و همچنین تیمار با داروی ایزوپرترنول، سلول‌های بنیادی مزانشیمی به سلول‌های استئوبلاستی تمایز داده شدند و برای تایید تمایز استئوبلاستی از رنگ‌آمیزی آلیزارین رد استفاده شد. توده‌های کلسیمی در رنگ آمیزی آلیزارین رد به رنگ قرمز دیده می‌شوند که نشان دهنده‌ی تمایز استئوبلاستیک سلول‌های بنیادی مزانشیمی می‌باشد. رنگ‌آمیزی آلیزارین رد در سلول‌های بنیادی مزانشیمی درحضور محیط تمایزی درروز ۴ و ۲۱ تمایز (شکل۳ الف و ج) و سلول‌های بنیادی مزانشیمی تیمار شده با

داروی ایزوپرترنـول در روز ۴ و ۲۱ تمـایز (شـکل ۳ ب ود) انجام شد. رسوب قرمز رنگ تـوده‌هـای کلـسیمی کـه نـشان دهنده‌ی تایید تمایز استئوبلاستیک سلول‌های بنیادی مزانشیمی می‌باشد در روز ۲۱ مشاهده شد. سلول‌های بنیادی مزانـشیمی تیمار نشده و سلول‌های بنیادی مزانشیمی تیمار شده در روز ۴ تمایز برای این رنگ آمیزی منفی بودند و هیچ گونـه رسـوب کلسیم در آنها مشاهده نشد (شکل ۳ ه).



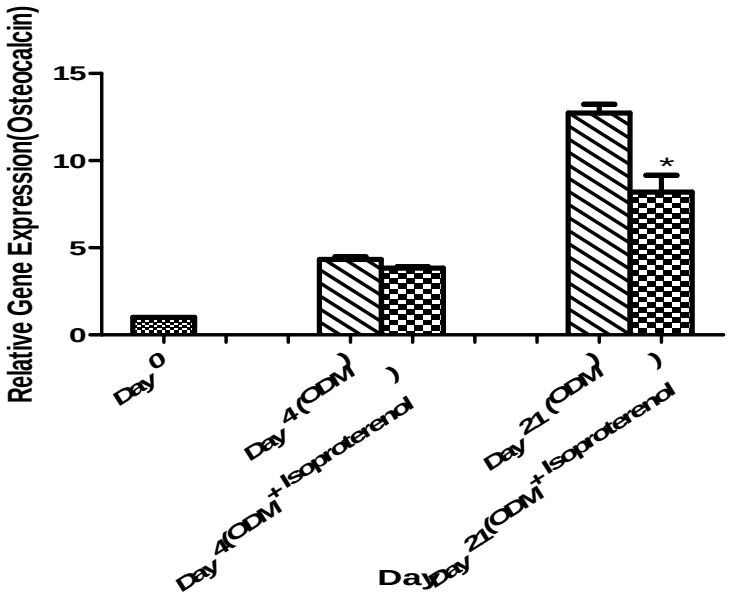
شکل ۳. رنگ آمیزی آلیزارین رد. (الف) سلول های تمایز داده شده با محیط تمایزی در روز ۴ تمایز. (ب) سلول‌های تمایز داده شده با محیط تمایزی در روز ۴ تمایز تیمار شده با ایزوپرترنول. (ج) سلول‌های تمایز یافته استئوبلاستی تیمار شده با محیط تمایزی در روز ۲۱ تمایز. (د) سلول‌های تمایز یافته استئوبلاستی تیمار شده با ایزوپرترنول در روز ۲۱ تمایز (و) سلول‌های بنیادی مزانشیمی تمایز نیافته

نتایج Quantitative Real Time PCR ژن RUNX2 درطول تمایز استئوبلاستی با محیط تمایزی و داروی ایزوپرترنول، آنالیز بیان ژن نشان داد که بیان mRNA ژن RUNX2 در طول تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی به استئوبلاست تحت تاثیر محیط تمایزی افزایش پیدا می‌کند. بیان ژن RUNX2 در طول تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی به استئوبلاست تحت تاثیر محیط تمایزی در روز ۴ و ۲۱ در مقایسه با سلول‌های بنیادی مزانشیمی تمایز نیافته، به‌ترتیب ۱/۲۳±۰/۱۴ برابر و ۳/۴۷±۰/۲۳ برابر بود (نمودار ۱) بیان mRNA ژن RUNX2 در طول تمایز استئوبلاستی با داروی ایزوپرترنول کاهش پیدا کرد. بیان ژن RUNX2 در طول تیمار سلول‌های بنیادی مزانشیمی با داروی ایزوپرترنول در روز ۴ و ۲۱ در مقایسه با سلول‌های بنیادی مزانشیمی تمایز نیافته، به‌ترتیب ۰/۸±۰/۰۵ برابر و ۱/۶ ±۰/۰۵ برابر بود (نمودار ۱).



نمودار ۱. نتایج Quantitative Real Time PCR ژن RUNX2 در طول تمایز استئوبلاستی با محیط تمایزی و ایزوپرترنول
(ODM: Osteoblastic Differentiation Medium)

مقایسه‌ی میزان کاهش بیان ژن RUNX2 در روز ۴ تمایز با محیط تمایزی و داروی ایزوپرترنول اختلاف معنی‌دار از نظر آماری را نشان نداد (P>۰/۰۵)در حالی که در روز ۲۱ اختلاف معنی‌داری از نظر آماری مشاهده شد (P<۰/۰۵).



نمودار ۲: نتایج quantitative Real Time PCR ژن استئوکلسین در طول تمایز استئوبلاستی با محیط تمایزی و ایزوپرترنول

نتایج quantitative Real Time PCR ژن استئوکلسین درطول تمایز استئوبلاستی با محیط تمایزی و داروهای ایزوپرترنول آنالیز بیان ژن نشان داد که بیان mRNA ژن استئوکلسین در طول تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی به استئوبلاست تحت تاثیر محیط تمایزی افزایش پیدا می‌کند. بیان ژن استئوکلسین در طول تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی به استئوبلاست تحت تاثیر محیط تمایزی در روز ۴ و ۲۱ در مقایسه با سلول‌های بنیادی مزانشیمی تمایز نیافته، به‌ترتیب ۴/۳±۰/۱۴ برابر و ۱۲/۷۳±۰/۴۹ برابر بود (نمودار ۲).

بیان mRNA ژن استئوکلسین در طول تمایز استئوبلاستی با داروی ایزوپرترنول کاهش پیدا کرد. بیان ژن استئوکلسین در طول تیمار سلول‌های بنیادی مزانشیمی با داروی ایزوپرترنول در روز ۴ و ۲۱ در مقایسه با سلول‌های بنیادی مزانشیمی تمایز نیافته، به‌ترتیب ۳/۸۳±۰/۰۸ برابر و۸/۲±۰/۹۶ برابر بود (نمودار ۲). مقایسه میزان کاهش بیان ژن استئوکلسین در روز ۴ تمایز با محیط تمایزی و داروی ایزوپرترنول اختلاف معنی‌دار از نظر آماری را نشان نداد (P>۰/۰۵) در حالی که در روز ۲۱ اختلاف معنی‌داری از نظر آماری مشاهده شد (P<۰/۰۵)

بحث

به‌منظور نشان دادن نقش سیستم بتا آدرنرژیک در استئوژنز سلول‌های بنیادی مزانشیمی، در این تحقیق سلول‌های بنیادی مزانشیمی با آگونیست بتا آدرنرژیک (ایزوپرترنول) تیمار شد. سپس سطوح mRNA دو ژن اختصاصی استئوبلاستی یعنی RUNX2 و استئوکلسین توسط Real Time PCR در روز ۴ (ابتدای تمایز استئوبلاستی) و روز ۲۱ (انتهای تمایز استئوبلاستی) بررسی شد. دلیل انتخاب این روزها این بود که مطالعات قبلی (۱۵) تغییرات چشمگیر در بیان ژن‌های استئوبلاستی را تا هفته‌ی اول گزارش کرده‌اند در حالی که در هفته‌ی دوم و سوم تغییرات یکسان بوده بنابراین روز چهارم که تغییرات بیان ژن‌ها متفاوت است و هفته‌ی سوم که سلول‌ها مورفولوژی شبه استئوبلاستی پیدا

کرده‌اند انتخاب گردید. نتایج این مطالعه نشان داد که ایزوپرترنول باعث مهار بیان ژن‌های RUNX2 و استئوکلسین شد. به‌طوری که بیان ژن RUNX2 تحت تاثیر ایزوپرترنول در روزهای ۴ و ۲۱ تمایز به ترتیب ۰/۸ و ۱/۶ برابر بود. تغییرات بیان ژن RUNX2 در روز ۴ تحت تاثیر ایزوپرترنول کاهش داشت اما این تفاوت چشمگیر از نظر آماری نبود در حالی که در روز ۲۱ تمایز ایزوپرترنول تاثیر چشمگیری بر بیان ژن RUNX2 داشت و بنابراین به نظر می‌رسد که ایزوپرترنول بر مراحل انتهایی تمایز استئوبلاستی تاثیر بیشتری دارد. همچنین بیان ژن استئوکلسین تحت تاثیر ایزوپرترنول در روزهای ۴ و ۲۱ تمایز به‌ترتیب ۳/۸۳ و ۸/۲ برابر بود. این تغییرات در مقایسه با روند طبیعی افزایش بیان ژن استئوکلسین در طول تمایز استئوبلاستی، کاهش بیان این ژن را در طول تمایز استئوبلاستی نشان می‌دهد. تغییرات بیان ژن استئوکلسین در روز ۴ تحت تاثیر ایزوپرترنول کاهش داشت اما این تفاوت از نظر آماری چشمگیر نبود در حالی که در روز ۲۱ تمایز، ایزوپرترنول تاثیر چشمگیری بر بیان ژن استئوکلسین داشت. بنابراین تاکیدی بیشتر بر این مطلب است که ایزوپرترنول بر مراحل انتهایی تمایز استئوبلاستی تاثیر بیشتری دارد. بنابراین نتیجه‌ی این تحقیق نشان داد که آگونیست بتاآدرنرژیک به‌طور منفی برروند استئوژنز سلول‌های بنیادی مزانشیمی (به‌خصوص در مراحل انتهایی تمایز) تاثیر می‌گذارد. در مطالعه‌ای که توسط لی و همکارانش (۱۶) انجام شد افزایش mRNA و پروتئین گیرنده‌ی بتا ۲ آدرنرژیک را در طی تمایز استئوبلاستی نشان دادند که می‌توان با توجه به افزایش بیان این گیرنده‌ها در انتهای تمایز استئوبلاستی افزایش اثر آگونیست بتا آدرنرژیک بر انتهای تمایز را توجیه کرد. در مطالعه‌ی لی که بر سلول‌های بنیادی مزانشیمی جدا شده از مغز استخوان موش انجام شده بود، مهار تراکم ندول استخوانی وکاهش بیان ژن های اختصاصی تمایز استئوبلاستی متعاقب تیمار با ایزوپرترنول نشان داده شد. در مطالعه‌ی ایتکن و همکارانش (۱۴)، که بر استئوبلاست‌های جداشده با کلاژناز از استخوان جمجمه‌ی موش انجام شده بود تا غلظت ۳ میکرو مولار ایزوپرترنول تاثیر چشمگیری بر تشکیل ندول استخوانی مشاهده نشد اما بیان ژن‌های مختص استئوکلاست افزایش پیدا کرده بود و پیشنهاد داده شد که اثرات ایزوپرترنول بر استئوکلاستوژنز می‌تواند اثرات غیر مستقیمی بر رده‌ی استئوبلاستی نیز داشته باشد. این‌گونه می‌توان استدلال کرد که بیان ژن الزاما با تشکیل ندول ماکروسکوپی همراه نیست و گاهی تغییر بیان ژن مستقل از بیان پروتئین و حتی محتوای کلسیم محیط می‌باشد. در مطالعه‌ای که در سال ۲۰۱۳ انجام شد (۱۷) حضور ژن‌های مرتبط با انتقال و کاتابولیسم نور اپی‌نفرین را در سطح استئوبلاست‌ها نشان دادند. این ژن‌ها شامل ترانسپورتر نور اپی‌نفرین و مونوآمین اکسیداز و کاتکول-O- متیل ترانسفراز بود و بیان mRNA و پروتئین ترانسپورتر نوراپی نفرین در طول تمایز استئوبلاستی افزایش یافت که نشان می‌دهد استئوبلاست‌های تمایز یافته در کلیرانس نوراپی نفرین نقش دارند. در مطالعه‌ای دیگر کاهش سنتز اکسی توسین توسط استئوبلاست‌ها متعاقب تیمار با آگونیست‌های بتا آدرنرژیک مشاهده شد. اکسی توسین با القای تمایز استئوبلاست به استئوبلاست‌های بالغ توده‌ی استخوانی را تنظیم می‌کند و مشخص شد که اثرات منفی تحریک آدرنرژیک بر تشکیل استخوان تاحدودی به علت کاهش سنتز اکسی توسین می‌باشد (۳). در مطالعه‌ای که بر رده‌ی سلولی استئوبلاستی انجام شد، ایزوپرترنول باعث افزایش فاکتور رونویسی Nfil3 و بیان mRNA ژن پروستاگلندین- اندوپراکسید سنتاز-۲ می‌شود که باعث تنظیم ژن‌های تمایز استئوبلاستی می‌شود (۱۸). در مطالعه‌ای دیگر نشان داده شد که حذف گیرنده‌های بتا ۱ و ۲ آدرنرژیک منجر به فنوتیپ‌های استخوانی متفاوتی می‌شود. سیگنالینگ بتا ۱ آدرنرژیک به‌واسطه‌ی IGF-1 دارای اثرات آنابولیک بر استخوان است درحالی که سیگنالینگ

بتا ۲ آدرنرژیک به واسطه‌ی بیان RANKL در سطح استئوبلاست‌ها باعث افزایش تحلیل استخوان می‌شود (۱۹). مطالعات مختلفی نیز به بررسی آگونیست‌های بتا آدرنرژیک در مدل‌های موشی پرداخته‌اند. پی یروز کاهش تشکیل استخوان و تعداد استئوبلاست را در موش تحت درمان با ایزوپرترنول گزارش کرد (۲۰) که در ترکیب با یافته‌های این تحقیق کاهش تشکیل استخوان نه تنها به علت کاهش میزان رشد استخوان است (۲۱و ۵) بلکه کاهش پتانسیل استئوژنیک سلول‌های بنیادی مزانشیمی ممکن است در این کاهش نقش داشته باشد. نتایج مشابهی با استفاده از تعدادی از آگونیست‌های بتا آدرنرژیک، یعنی سلنبوترولو سالبوتامول نیز گزارش شده است (۲۳و۲۲). در مقابل، موش‌های دارای نقص در هر دو گیرنده‌ی بتا ۱ و بتا ۲-آدرنرژیک، (*Adr,B1-2R-/-*) مهار مشخص شاخص‌های تشکیل استخوان، به خصوص در سطوح ضریح استخوان را نشان می‌دهند (۲۰).

مطالعات بیشتر در موش افزایش چشمگیردر مارکرهای بازجذب استخوانی را پس از استفاده از آگونیست‌های بتاآدرنرژیک نشان می‌دهد (۲۲). علاوه بر این، آگونیست آدرنرژیک به‌طور قابل توجهی باعث کاهش میزان لپتین می‌شود، که احتمالا ثانویه به کاهش توده‌ی چربی است، و این کاهش در ارتباط با پارامترهای بازجذب استخوان است (۲٤). کاهش میزان لپتین درپاسخ به آگونیست‌های آدرنرژیک می‌تواند کمک به مهار تشکیل استخوان‌های قشری کند (۲۵). این مطالعات نشان دادند که تحریک آدرنرژیک باعث افزایش تعداد و فعالیت استئوکلاست‌ها و در نتیجه بازجذب استخوان نیز می‌شود. چندین مطالعه‌ی بالینی در انسان وجود دارد که در آن تحریک بیش از حد سیستم آدرنرژیک با کاهش توده‌ی استخوانی و یا افزایش شکنندگی استخوان همراه است و استفاده کنندگان آگونیست بتا-۲ به‌عنوان گشاد کننده‌ی برونش (به‌عنوان مثال در بیماری آسم) با ریسک دو برابری شکستگی استخوان ران/ لگن همراه بودند. این خطر بسته به شدت بیماری به‌طور قابل توجهی بالاتر بود، و با استفاده همزمان آن با گلوکوکورتیکوئیدها افزایش می‌یافت (۲٦). در دیستروفی سمپاتیک رفلکسی (۲۷) و (که با فعالیت بیش از حد مسیر آدرنرژیک شناخته می‌شود)، کاهش توده‌ی استخوانی ناشی از افزایش بازجذب استخوان مشاهده می‌شود. ورزشکارانی که با آگونیست بتا ۲ آدرنرژیک دوپینگ می‌کنند (به خاطر اثرات آنابولیک آن بر عضله و اثرات کاتابولیک آن بر توده چربی) منجر به از دست دادن استخوان و افزایش خطر شکستگی می‌شود. از این رو، کلمپ و همکارانش (۲۸) کاهش ٤ درصدی محتوای مواد معدنی استخوان در ستون فقرات کمری در مردان کم تحرک و ورزشکاری که ۱۲ میلی‌گرم سالبوتامول خوراکی در روز در طول ۳ هفته دریافت می‌کردند را گزارش کردند. همچنین بیماران مبتلا به فئوکروموسایتوما و دیگر بیماری‌های افزایش سطح کاتکول آمین با افزایش تحلیل استخوان همراه بودند و برداشتن غده آدرنال باعث نرمال شدن پارامترهای خونی تحلیل استخوان می‌شد (۲۹) در این مطالعه بیان فاکتور نسخه‌برداری RUNX2 در طول تمایز استئوبلاستی سلول‌های بنیادی مزانشیمی افزایش پیدا کرد. این افزایش بیان در روزهای ۴ و ۲۱ تمایز نسبت به سلول‌های بنیادی مزانشیمی تمایز نیافته، به‌ترتیب ۱/۲۳ و ۳/۴۷ برابر بود. سایر تحقیق‌ها نیز افزایش بیان RUNX2 در طول تمایز استئوبلاستی سلول‌های بنیادی مزانشیمی را تایید کرده‌اند. شویی و همکارانش (۳۰) در سال ۲۰۰۳ نشان دادند که بیان و فعالیت فاکتور نسخه‌برداری RUNX2 در طول تمایز استئوبلاستی سلول‌های بنیادی مزانشیمی افزایش می‌یابد. همچنین لیو و همکارانش (۳۱) در سال ۲۰۰۸ نشان دادند که بیان RUNX2 در طول تمایز استئوبلاستی سلول‌های بنیادی مزانشیمی در هفته‌ی دوم تمایز تا بیش از ۲ برابر افزایش می‌یابد. همچنان که گفته شد بیان RUNX2 در طول تمایز استئوبلاستی با محیط تمایزی

(حاوی دگزامتازون از دسته گلوکو کورتیکوئیدهای سنتتیک) افزایش می‌یابد. گلوکوکورتیکوئیدها شناخته شده‌ترین القاکننده‌های تمایز استئوبلاستی و تشکیل استخوان در In Vitro هستند که تاثیرشان به واسطه‌ی فعالسازی نسخه‌برداری RUNX2 است (۳۲). همکاری دگزامتازون و فاکتورهای نسخه‌برداری استئوژنیک همانند RUNX2 اثر هم‌افزایی در القای بیان استئوکلسین و سیالوپروتئین استخوانی، افزایش فعالیت آلکالن فسفاتاز و مینرالیزاسیون بیولوژیک دارد (۳۳). دگزامتازون یکی از مواد اصلی تشکیل دهنده‌ی محیط تمایزی استئوبلاستی مورد استفاده در این تحقیق است که بر اساس یافته‌های این تحقیق استفاده از محیط تمایزی با افزایش بیان RUNX2 در طول تمایز استئوبلاستی همراه بوده است. باتوجه به نقش دگزامتازون در تنظیم فعالیت و بیان RUNX2، نتایج این تحقیق می‌تواند تاییدی بر یافته‌های قبلی باشد. در این تحقیق بیان استئوکلسین در طول تمایز استئوبلاستی سلول‌های بنیادی مزانشیمی افزایش پیدا کرد. استئوکلسین به‌عنوان مارکر انتهایی تمایز استئوبلاستی شناخته می‌شود (۳۴) که با مینرالیزاسیون ماتریکس ظاهر می‌شود و بیشترین بیان را در روز ۲۱ تمایز دارد. این افزایش بیان در روزهای ۴ و ۲۱ تمایز نسبت به سلول‌های بنیادی مزانشیمی تمایز نیافته، به‌ترتیب ۴/۳ و ۱۲/۷۳ برابر بود. در این تحقیق استئوکلسین در روز ۴ تمایز بیان چشمگیری داشت در حالی که مینرالیزاسیون تا روز ۴ مشاهده نمی‌شود. کولترر و همکارانش (۳۵) نیز این افزایش چشمگیر در بیان استئوکلسین را در روز ۴ تمایز نشان دادند در حالی که در روز ۷ تمایز و روند روبه کاهشی را نشان می‌داد و مجددا بیان افزایشی تا روز ۲۱ تمایز داشت که حداکثر بیان ژن استئوکلسین در روز ۲۱ مشاهده شده بود.

نتیجه گیری

ژن‌های شاخص استئوبلاستی مانند استئوکلسین، از اهداف فاکتورهای نسخه‌برداری اختصاصی استئوبلاستی همانند RUNX2 می‌باشند. بر این اساس، تغییرات بیان RUNX2 با تغییر در بیان اهداف ژنی آن‌ها همراه خواهد بود که نتایج تحقیق حاضر نیز آن را نشان داد. نتایج این تحقیق نشان داد که داروی ایزوپرترنول به‌طور منفی بر تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی به استئوبلاست (به‌خصوص بر مراحل انتهایی تمایز استئوبلاستی)، تاثیر دارد. این یافته‌ها نشان می‌دهند که سلول‌های بنیادی مزانشیمی انسان نیز هدف تنظیم بتا آدرنرژیک قرار می‌گیرند و سیگنالینگ بتا آدرنرژیک در استئوژنز سلول‌های بنیادی مزانشیمی انسان نیز نقش دارد. پس از چندین اختلاف مشاهده شده در استئوبلاست‌های مشتق شده از نمونه انسانی در مقایسه با استئوبلاست‌های گونه‌های دیگر در این تحقیق تنها از سلول‌های با منشا انسانی استفاده شد که در پایان منجر به استفاده از نتایج شرایط آزمایشگاهی در In Vivo شود. روی هم رفته این روش‌ها منجر به افزایش دانش ما درباره بیولوژی استخوان می‌شود، که می‌تواند ما را به سمت توسعه‌ی درمان‌های جدید که باعث تحریک تشکیل استخوان می‌شوند هدایت کند.

بازدارنده‌های بازجذب استخوانی تنها از تحلیل استخوان در بیمار جلوگیری می‌کنند، اما قادر به بازگرداندن توده‌ی استخوانی از دست رفته نمی‌باشند. بنابراین درمان‌هایی که منجر به تشکیل استخوان می‌شوند می‌توانند به عنوان درمان کمکی در بیمارانی که مهار کننده‌های بازجذب استخوانی دریافت می‌کنند بسیار کمک کننده باشد. مسلما عوامل جانبی پایین دست سیستم آدرنرژیک و نورومدیاتورهای استخوانی می‌توانند مداخلات درمانی مناسبی باشند

تشکر و قدردانی

این تحقیق با حمایت مالی دانشکده‌ی علوم پزشکی دانشگاه تربیت مدرس انجام شده است که برگرفته از پایان نامه‌ی کارشناسی ارشد در رشته‌ی خون شناسی آزمایشگاهی و بانک خون می‌باشد.

References

1- Serre CM, Farlay D, Delmas PD, Chenu C. Evidence for a dense and intimate innervation of the bone tissue, including glutamate-containing fibers. *Bone*. 1999; 25: 623-9.

2- Togari A, Mogi M, Arai M, Yamamoto S, Koshihara Y. Expression of mRNA for axon guidance molecules,such as semaphorin-III,netrins and neurotrophins,in human osteoblasts and osteoclasts. *Brain Res*. 2000; 29; 878: 204-9.

3- Cuscito C, Colaianni G, Tamma R, et al. Adrenergic stimulation decreases osteoblast oxytocin synthesis. *Ann N Y Acad Sci*. 2011; 1237: 53-7.

4- Bonnet N, Pierroz D, Ferrari L. Adrenergic control of bone remodeling and its implications for the treatment of osteoporosis. *J Musculoskelet Neuronal Interact*. 2008; 8: 94-104

5- Takeda S, Elefteriou F, Levasseur R, et al. Leptin regulates bone formation via the sympathetic nervous system. *Cell*. 2002; 111: 305-317.

6- Kondo H, Takeuchi S, Togari A. Beta-adrenergic signaling stimulates osteoclastogenesis via reactive oxygen species. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2013; 304: E507-15.

7- Qin W, Bauman WA, Cardozo CP. Evolving concepts in neurogenic osteoporosis. *Curr Osteoporos Rep*. 2010; 8: 212-8.

8- Rejnmark L, Vestergaard P, Mosekilde L. Treatment with beta-blockers, ACE inhibitors,and calciumchannel blockers is associated with a reduced fracture risk: a nationwide case-control study. *J Hypertens*. 2006; 24: 581-9.

9- Yan L, Vatner DE, O'Connor JP, et al. Type 5 adenylyl cyclase disruption increases longevity and protects against stress. *Cell*. 2007; 130: 247-58.

10- Patricia Ducy, Thorsten Schinke, Gerard Karsenty. The osteoblast: A sophisticated fibroblast under central surveillance. *Science*. 2000; 289: 1501-4.

11- Stein G, Lian J, Stein J, Wijnen A, Montecino M. Transcriptional control of osteoblast growth and differentiation. *Physiol Rev*. 1996; 76: 593-629.

12- Celeste A, Rosen V, Buecker J, Kriz R, Wang E, Wozney A. Isolation of the human gene for bone gla protein utilizing mouse and rat cDNA clones . *J M EMBO J* .1986; 5: 1885-90.

13- Lee TC, Lee TH, Huang YH, Chang NK, Lin YJ. Comparison of surface markers between human and rabbit mesenchymal stem cells. *PLoS ONE*. 2014; 9: e111390

14- Aitken SJ, Landao-Bassonga E, Ralston SH, Idris AI. Beta 2-adrenoreceptor ligands regulate osteoclast differentiation in vitro by direct and indirect mechanisms. *Arch of Biochem and Biophysics*. 2009; 482: 96-103.

15- Farshdousti Hagh M, Noruzinia M, Mortazavi Y, et al. Comparison of quantitative expression of runx2 in mesenchymal stem cells (mscs) differentiated by osteoblastic differentiation medium and zoledronic acid. *J Rafsanjan Univ Med Scie*. 2012; 11: 377-90.

16- Haifang Li, Chichun Fong, Yao Chen, Guoping Cai, Mengsu Yang. Beta 2 and Beta 3 but not Beta 1 adrenergic receptors are involved in osteogenesis of mouse mesenchymal stem cells via cAMP/PKA signaling. *Arch of Biochem and Biophysics*. 2010; 496: 77-83.

17- Ma Y, Krueger JJ, Redmon SN, et al. Extracellular norepinephrine clearance by the norepinephrine transporter is required for skeletal homeostasis. *J Biol Chem*. 2013; 18; 288: 30105-13.

18- Hirai T, Tanaka K, Togari A. β-adrenergic receptor signaling regulates Ptgs2 by driving circadian gene expression in osteoblasts. *J Cell Sci*. 2014; 1;127: 3711-9.

19- Dominique D, Bonnet N, Bianchi N, et al. Deletion of B-adrenergic receptor 1, 2, or both leads to different bone phenotypes and response to mechanical stimulation. *J Bone Miner Res*. 2012; 27: 1252-62.

20- Pierroz DD, Bouxsein ML, Muzzin P, Rizzoli R, Ferrari SL. Bone loss following ovariectomy is maintained in absence of adrenergic receptor beta1 and beta2 signaling. *J Bone Miner Res*. 2005; 20: S277.

21- Yirmiya R, Goshen I, Bajayo A, et al. Depression induces bone loss through stimulation of the sympathetic nervous system. *PNAS*. 2006; 103: 16876-16881.

22- Bonnet N, Benhamou CL, Brunet-Imbault B, et al. Severe bone alterations under beta 2 agonist treatment: bone mass, microarchitecture and strength analyses in female rats. *Bone*. 2005; 37: 622-33.

23- Kitaura T, Tsunekawa N, Kraemer WJ. Inhibited longitudinal growth of bones in young male rats by clenbuterol. *Med Sci Sports Exerc*. 2002; 34: 267-73.

24- Hamrick MW, Della-Fera MA, Choi YH, Pennington C, Hartzell D, Baile CA. Leptin treatment induces loss of bone marrow adipocytes and increases bone formation in leptin-deficient ob/ob mice. *J Bone Miner Res*. 2005; 20: 994-1001.

25- Hamrick MW, Pennington C, Newton D, Xie D, Isales C. Leptin deficiency produces contrasting phenotypes in bones of the limb and spine. *Bone* . 2004; 34: 376-83.

26- De Vries F, Pouwels S, Bracke M, et al. Use of beta-2 agonists and risk of hip/femur fracture: a population based case-control study. *Pharmaco epidemiol Drug Saf*. 2007; 16: 612-29.

27- Schwartzman RJ. New treatments for reflex sympathetic dystrophy. *N Engl J Med*. 2000; 343: 1811-2.

28- Collomp K, Le Panse B, Portier H, et al. Effects of acute salbutamol intake during a wingate test. *Int J Sports Med*. 2005; 26: 513-7.

29- Veldhuis-Vlug AG, El Mahdiui M, Endert E, et al. Bone resorption is increased in pheochromocytoma patients and normalizes following adrenalectomy. *J Clin Endocrinol Metab*. 2012; 97: E2093-E2097.

30- Shui C, Spelsberg TC, Riggs BL, Khosla S. Changes in runx2/Cbfa1 expression and activity

during osteoblastic differentiation of human bone marrow stromal cells. *J Bone Miner Res*. 2003; 18: 213-221.

31- Liu F, Akiyama Y, Tai S, Maruyama K, Muramatsu K, Yamaguchi K. Changes in the expression of CD106, osteogenic genes and transcription factors involved in the osteogenic differentiation of human bone marrow mesenchymal stem cells. *J Bone Muner Metab*. 2008; 26: 312-20.

32- Brann DW, Hendry LB, Mahesh VB. Emerging diversities in the mechanism of action of steroid hormones. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 1995; 52: 113-33

33- Byers BAPavlath GK, Murphy TJ, Karsenty G, Garcia AJ. Cell type dependent up- regulation of in vitro mineralization after overexpression of the osteoblast specific transcription factor RUNX2.cbfa1. *J Bone Miner Res*. 2002; 17: 1931-44.

34- Aubin JE. Bone stem cells. *Journal of Cellular Biochemistry*. 1998; 73-82.

35- Kulterer B, Friedl G, Jandrositz A, et al. Gene expression profiling of human mesenchymal stem cells derived from bone marrow during expansion and osteoblast differentiation. *BMC Genomics*. 2007; 8:70.

Effects of Isoproterenol (beta-Adrenergic Agonist) on In Vitro Differentiation of Human Mesenchymal Stem Cells into Osteoblasts

Mohammadali F[1], Abroun S[1], Soleimani M[1], Atashi A[1], Kaviani S[1]

[1]Dept. of Hematology, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran.

***Corresponding Author**:* Abroun S, PhD, Department of Hematology, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Al-Ahmad Exp Way .Tehran, Iran .

E-mail: Abroun@modares.ac.ir

Received: 24 May 2014 **Accepted:** 9 Feb 2015

Background and Objective: The importance of β-adrenergic signals in bone formation and resorption has been well investigated. However, little is known about the role of β -adrenergic signals in osteoblastic differentiation of mesenchymal stem cells (MSCs), which is critically important in bone physiology and pharmacology. In this study, *RUNX2* and *Osteocalcin* gene expression were quantified in MSCs differentiated by osteoblastic differentiation medium (ODM) and Isoproterenol (ISO).

Materials and Methods: In this experimental study, human mesenchymal stem cells were treated by osteoblastic differentiation medium and ISO. RNA extraction was carried out from both osteoblastic differentiation medium at 4 and 21 days of differentiation and from undifferentiated MSCs. *RUNX2* and *osteocalcin* gene expression were quantified by quantitative Real Time-PCR.

Results: *Isoproterenol* decreased the expression of *RUNX2* and *osteocalcin* genes at 4 and 21 days of osteoblastic differentiation. Statistically significant difference was found at 21 days of differentiation *(P<0.05)*.

Conclusion: *Isoproterenol* negatively affects MSC osteogenesis. These findings suggest that human mesenchymal stem cell is also a target for β-adrenergic and may provide valuable *treatment* option in bone diseases.

Keywords: Mesenchymal stem cells, Osteoblastic differentiation Medium, Beta adrenergic,* Isoproterenol, *RUNX2, Osteocalcin