مقاله پژوهشی

مهار فاکتور Wnt3a موجب کاهش تمایز سلول‌های بنیادی قلبی رت به سلول‌های آندوتلیال می‌شود

نسیم بندریان[۱]، رضا رهبرقاضی[۲،۳]، مهدی مهدی پور[۴]، مهدی احمدی[۵]، آیسا رضابخش[۶]، سانیا حیاتی[۷]، مجید خاکسار[۸]

تاریخ دریافت ۱۴۰۰/۱۰/۰۸ تاریخ پذیرش ۱۴۰۰/۱۲/۲۲

چکیده

پیش‌زمینه و هدف: سکته قلبی، یکی از عمده‌ترین علل مرگ‌ومیر در کشورهای صنعتی و رو به رشد است. توانایی محدود ترمیمی سلول‌های قلبی پس از حمله ایسکمی باعث آسیب گسترده شده و فرد را مستعد نارسایی قلبی می‌کند. در حال حاضر، دارودرمانی یکی از راه‌های اصلی برای جلوگیری از گسترش ضایعه و حفظ یکپارچگی بافت میوکاردیوم پس از حمله ایسکمی است. امروزه استفاده از سلول‌های بنیادی جهت بازیابی ساختاری و حفظ عملکرد قلبی در بیماران امیدهای تازه‌ای را پیش روی متخصصین بالین قرار داده است. این سلول‌ها با ترشح انواع فاکتورها و تمایز به رده‌های سلولی مختلف ازجمله سلول‌های عروقی باعث تسریع روند ترمیم می‌شوند. در این مطالعه نقش مهار فاکتور Wnt3a بر روند تمایزی سلول‌های بنیادی قلبی رت (H9C2) به سمت سلول‌های آندوتلیال موردبررسی قرار گرفته است.

مواد و روش کار: در این پژوهش تجربی- آزمایشگاهی، سلول‌های کاردیومیوبلاست رت (H9C2) در محیط کشت DMEM/HG تکثیر و با ۱۰ میکرومولار LGK-974 (مهارکننده Wnt3a) به مدت ۴۸ ساعت انکوبه شدند. بقاء سلولی با استفاده از روش MTT بررسی شد. توان تمایزی به سلول‌های آندوتلیال، از طریق اندازه‌گیری بیان ژن‌ها و سطوح پروتئینی فاکتورهای VE-cadherin و vWF با استفاده از روش اندازه‌گیری بیان ژن و وسترن بلات بررسی شد.

یافته‌ها: مهار Wnt3a در سلول‌های H9C2 به‌طور معنی‌داری بقاء این سلول‌ها را بعد از ۴۸ ساعت در مقایسه با گروه کنترل کاهش داد ($p<0.05$). بر اساس نتایج به‌دست‌آمده، میزان بیان ژنی و سطوح پروتئینی فاکتورهای VE-cadherin و vWF در گروه تیمار شده با LGK-974 به‌طور معنی‌داری کاهش یافت ($p<0.05$).

بحث و نتیجه‌گیری: مهار فاکتور Wnt3a می‌تواند توان رگ‌زایی سلول‌های پیش‌ساز قلبی رت را کاهش دهد.

کلیدواژه‌ها: سلول‌های بنیادی قلب رت (H9C2)،Wnt3a، بقاء، تمایز آندوتلیالی

مجله مطالعات علوم پزشکی، دوره سی و دوم، شماره دهم، ص ۷۸۱-۷۷۳، دی ۱۴۰۰

آدرس مکاتبه: تبریز، فلکه دانشگاه، خیابان دانشگاه، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، دانشکده علوم نوین پزشکی، گروه علوم سلولی کاربردی، کد پستی: ۵۱۶۶۶۵۳۴۳۱، تلفن ۳۳۵۵۷۸۹-۰۴۱

Email: rezarahbardvm@gmail.com ،rahbarghazir@tbzmed.ac.ir

مقدمه

انسداد عروق کرونری[۹] نکروز کانونی و تغییرات فیبروزی گسترده ایی را در بافت قلب به وجود می‌آورد (۱). بعد از انسداد عروق کرونری و ایسکمی بافتی، عملکرد فیزیولوژیک سلول‌های قلبی (کاردیومیوست‌ها) نیز مختل می‌گردد. این سلول‌ها فاقد توانایی لازم برای بازیابی عملکرد و جبران تغییرات پاتولوژیکی به

[۱] مرکز تحقیقات سل و بیماری‌های ریوی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران
[۲] مرکز تحقیقات سل و بیماری‌های ریوی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران (نویسنده مسئول)
[۳] گروه علوم سلولی کاربردی، دانشکده علوم نوین پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران
[۴] مرکز تحقیقات سلول‌های بنیادی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران
[۵] مرکز تحقیقات سل و بیماری‌های ریوی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران
[۶] مرکز تحقیقات قلب و عروق، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران
[۷] مرکز تحقیقات بیماری‌های عفونی و گرمسیری، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز،
[۸] مرکز تحقیقات سلول‌های بنیادی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران

۹. Coronary artery

[Downloaded from umj.umsu.ac.ir on 2024-09-15]

[DOI: 10.52547/umj.32.10.773]

دنبال ایسکمی می‌باشند (۲). امروزه، داورهای ترومبولیتیک[۱] و جراحی به‌عنوان گزینه‌های پیش رو در بیماران مبتلا به بیماری‌های ایسکمیک قلبی مطرح هستند (۲). در این میان، شناسایی انواع رده‌های سلول‌های بنیادی در بافت‌های مختلف و تکثیر و ازدیاد آن‌ها در محیط آزمایشگاهی امیدهای زیادی را برای درمان بیماری‌های مختلف ازجمله بیماری‌های قلبی فراهم نموده است (۳). این سلول‌ها دارای توان تمایزی بوده و با ترشح انواع فاکتورهای رشد موجب تسریع روند ترمیم در بافت قلب می‌شوند. سلول‌های بنیادی قلبی[۲]در بافت قلب با دارا بودن فاکتورهای سطحی ازجمله c-Kit، Sca-1، Islet-1 و PDGFRα[۳] دارای قابلیت تمایز به انواع رده‌های سلولی ازجمله سلول‌های آندوتلیال[۴]، پریسیت‌ها[۵]و کاردیومیوست-های بالغ هستند. علاوه بر این سلول‌های بنیادی قلبی قادر هستند با ترشح انواع فاکتورهای رگ‌زا ازجمله فاکتور رشد عروق آندوتلیالی[۶] میزان خون‌رسانی را به بافت آسیب‌دیده افزایش داده و موجب تسریع روند بهبودی در افراد دچار ایسکمی قلبی شوند (۳).

رگ زایی به فرآیند نو عروق زایی از بستر عروق پیشین اطلاق می‌گردد (۴). این فرآیند در پاسخ به هیپوکسی بافتی و کاهش خون‌رسانی به اندام‌ها فعال می‌گردد (۵). ترشح انواع فاکتورها از طریق سلول‌های هیپوکسیک و آسیب‌دیده از قبیل فاکتور القایی هیپوکسی[۷]، فاکتور رشد آندوتلیال عروقی[۸]، فاکتور مشتق استرومایی[۹] باعث تحریک گیرنده‌های VEGFR-2 و Tie-2 بر سطح سلول‌های آندوتلیال مجاور می‌شود (۶). درنتیجه تحریک این گیرنده‌ها، سیگنال‌های وابسته به عملکرد سلول‌های آندوتلیال افزایش یافته و بعد از مهاجرت به سمت بافت آسیب‌دیده در تشکیل عروق خونی جدید ایفای نقش می‌کنند؛ بنابراین افزایش میزان تراکم سلول‌های آندوتلیالی به‌عنوان یکی از مکانیسم‌های پایه‌ای در کاهش اثرات مخرب ایسکمی در بافت آسیب‌دیده است. نقش محور آبشار مولکولی Wnt/β-Catenin در بلوغ و تمایزی سلول‌های بنیادی مختلف به انواع رده‌های سلولی پیش‌ازاین نشان داده شده است (۷). نشان داده شده است که با تداوم روند پیری و نیز مهار فاکتور Wnt توان ترمیمی سلول‌های بنیادی قلبی $Sca\text{-}1^{+}$ دچار افول می‌گردد (۸). در یک مطالعه‌ی تجربی، اثر آبشار مولکولی Wnt/β-Catenin بر روند رگ زایی سلول‌های بنیادی آندوتلیالی به‌صورت هم کشت با سلول‌های بنیادی عصبی از طریق مهار فسفوریلاسیون فاکتور GSK-3β در محیط برون تنی اثبات شد (۹). این امر نشان‌دهنده نقش محوری فاکتور Wnt3a بر رفتارهای بیولوژیکی سلول‌های بنیادی ازجمله سلول‌های بنیادی قلبی است. بر اساس اطلاعات نویسندگان مقاله حاضر، تاکنون مطالعه‌ای در خصوص اثرات مستقیم فاکتور Wnt3a بر روند رگ زایی سلول‌های بنیادی قلبی از طریق تمایز به سلول‌های آندوتلیال رگی انجام نشده است. در این مطالعه تجربی- آزمایشگاهی، نقش مهار فاکتور Wnt3a بر روند تمایزی سلول‌های بنیادی رت (رده سلولی H9C2) در محیط برون تنی موردبررسی قرار گرفته است.

مواد و روش کار

کشت رده سلولی H9C2:

رده سلولی H9C2 از بانک سلولی ایران (موسسه پاستور، تهران) خریداری شد. سلول‌ها در محیط کشت DMEM/HG[۱۰] حاوی ۱۰درصد سرم جنین گاوی و ۱درصد محلول آنتی‌بیوتیک پنی‌سیلین- استرپتومایسین کشت شدند. به‌منظور تحریک رشد سلولی از انکوباتور حاوی ۵درصد CO_2 با رطوبت نسبی ۹۵درصد و دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد استفاده شد. محیط کشت هر ۴-۳ روز تعویض و سلول‌ها در تراکم نسبی ۸۰-۷۰درصد با استفاده از محلول ۲۵/.درصد تریپسین-EDTA پاساژ داده شدند. سلول‌ها بین پاساژهای ۴-۳ برای مطالعات و آزمایشات استفاده شدند. در این مطالعه، سلول‌ها به‌صورت تصادفی به دو گروه کنترل و تیمار به تقسیم‌بندی شدند. به‌منظور القاء تمایز سلول‌های H9C2 به سمت سلول‌های آندوتلیال از فاکتور VEGF به میزان ۱۰ نانوگرم بر هر میلی‌لیتر از محیط کشت استفاده شد.

بررسی بقاء سلولی:

برای این منظور، تعداد ۱۰۰۰۰ سلول H9C2 در ۲۰۰ میکرولیتر محیط کشت کامل به ازای هر چاهک پلیت ۹۶ تایی کشت داده شدند. بعد از رسیدن به تراکم ۸۰-۷۰درصد ، ۱۰ میکرولیتر مهارگر LGK-974 به محیط کشت سلول افزوده و به مدت ۴۸ ساعت انکوبه گردید. سپس مایع رویی خارج و ۲۰۰ میکرولیتر محلول ۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر پودر MTT[۱۱] به هر یک

۱. Thrombolytic therapy
۲. Cardiac stem cells
۳. Platelet-derived growth factor receptor A
۴.Endothelial cells
۵. Pericytes (alpha smooth muscle cells)
۶. Vascular endothelial growth factor
۷. Hypoxia-inducible factor 1-alpha
۸. Vascular endothelial growth factor
۹. Stromal Cell-Derived Factor-1 alpha
۱۰. Glycogen synthase kinase 3 beta
۱۰. Dulbecco's Modified Eagle Medium/High glucose
۱۰. 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide

[Downloaded from umj.umsu.ac.ir on 2024-09-15]
[DOI: 10.52547/umj.32.10.773]

از چاهک‌ها ریخته شد. بعد از گذشت ۴-۳ ساعت محلول رویی خارج و ۱۰۰ میکرولیتر DMSO جایگزین گردید. ا به مدت ۱۵ دقیقه در دمای معمولی نگه‌داشته شده و بعد از تولید رنگ آبی متمایل به بنفش شدت رنگ چاهک‌ها توسط دستگاه میکروپلیت ریدر (BioTek) خوانده شد. در این مطالعه بقاء سلولی به‌صورت درصد گروه کنترل بیان شده است.

اندازه‌گیری بیان ژن‌های VE-cadherin و vWF[1] با استفاده از آنالیز Real-time PCR:

برای این منظور تعداد یک‌میلیون (۱×۱۰^۶) سلول H9C2 در هر چاهک پلیت‌های ۶ تایی کشت داده شد. ۴۸ ساعت بعد از تیمار با مهارکننده Wnt3a، سلول‌ها توسط محلول تریپسین جمع‌آوری و محتوی RNA توسط کیت Trizol (شرکت Maxell کره جنوبی) استخراج شد. به‌منظور کنترل کیفی و کمی RNA های استخراج‌شده جذب نوری در طول‌موج‌های ۲۶۰/۲۸۰ و ۲۶۰/۲۳۰ توسط دستگاه نانودراپ خوانده شد. سنتز cDNA با استفاده از کیت DNA synthetase شرکت یکتا تجهیز آزما بر اساس توصیه کارخانه سازنده انجام شد. بعد از آماده‌سازی، ۷ میکرولیتر مخلوط SYBR Green به همراه Master Mix PCR، یک میکرولیتر از هرکدام از پرایمرهای مستقیم و معکوس (غلظت ۱۰ پیکومول)، ۱ میکرولیتر cDNA الگو در هر ویال ریخته و حجم آن با آب مقطر تا حجم نهایی ۱۴ میکرولیتر رسانده شد. برای انجام واکنش Real-time PCR، از دستگاه Roche LightCycler96 استفاده شد. داده‌ها با استفاده از ژن بتا اکتین به‌عنوان ژن مرجع و روش $^{(\Delta\Delta Ct)}$ ۲ آنالیز شدند (۱۰). برای طراحی پرایمرها از نرم‌افزار Oligo7 استفاده شد (جدول ۱).

جدول (۱): پرایمرهای طراحی‌شده برای آنالیز Real-time PCR

Gene Name	Forward and Reverse Primers	Annealing temperature
Wnt3a	F: GGGCACTAACAAGTCGGGT R: GGGCATGATCTCCACGTAGT	۶۰
CDH5	F: GTGGAGGCCAACGAATTGGA R: CGTAGGGCTGGGCAAATTCT	۶۰
vWF	F: GTGGATGAGGATGGGAACGAGAAG R: AAGGTGACGATGTGCCGAGTG	۶۰
β-Actin	F 5'-TCACCCACACTGTGCCCATCTACGA-3' R 5'-GGATGCCACAGGATTCCATACCC-3	۶۰

اندازه‌گیری سطوح پروتئینی VE-Cadherin و vWF با استفاده از آنالیز وسترن بلات:

۴۸ ساعت بعد از تیمار با مهارکننده Wnt3a، سلول‌های H9C2 توسط محلول تریپسین جمع‌آوری و محتوی پروتئینی توسط محلول بافر لیز پروتئینی[1]استخراج شد. برای این منظور سلول‌ها به مدت ۳۰ دقیقه در مجاورت بافر لیز در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. بعد از ورتکس، نمونه‌ها در دور ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه سانتیریفیوژ و محلول فوقانی برای انجام آنالیز وسترن بلات جمع‌آوری شد. برای این منظور، ۱۰ میکروگرم از هر نمونه با بافر لودینگ مخلوط و بر روی چاهک‌های ژل ۱۰درصد SDS-PAGE بارگذاری و الکتروفورز شد. بعد از اتمام روند الکتروفورزیس، پروتئین‌ها بر روی غشاء PVDF توسط بافر ترانسفر منتقل شدند. غشاءها با محلول ۱درصد آلبومین سرم گاوی به مدت ۳۰ دقیقه مجاور و سپس محلول آنتی‌بادی‌های anti-VE Cadherin، vWF و Wnt3a به مدت یک ساعت در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. بعد از سه باز شستشو با محلول TBST (سه بار هر بار به مدت ۱۰ دقیقه)، محلول آنتی‌بادی ثانویه کونژوگه با HRP در غلظت‌های توصیه‌شده کارخانه اضافه گردید. بعد از گذشت یک ساعت، غشاءها توسط محلول TBST شستشو داده شده و با محلول ECL advanced reagents مجاور شدند. برای ظهور باندها، از کاست و فیلم‌های X-ray استفاده شد. به‌منظور ارزیابی نیمه کمی باندها، با استفاده از نرم‌افزار ImageJ تراکم باندها مشخص و با باند مرجع بتا اکتین مقایسه شد.

۱. von Willebrand factor

۱. RIPA

[Downloaded from umj.umsu.ac.ir on 2024-09-15]

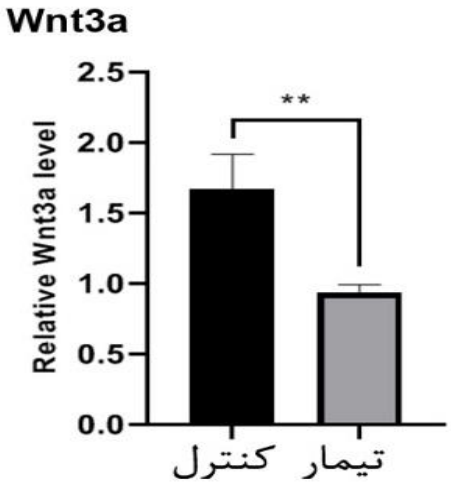
[DOI: 10.52547/umj.32.10.773]

در این مطالعه داده‌ها به‌صورت میانگین ± انحراف معیار نمایش داده شده است. تفاوت آماری بین گروه‌ها، با استفاده از آنالیز Student t test و نرم‌افزار GraphPad Prism Version 6 انجام شد. مقدار $p<0.05$ برای نشان دادن اختلاف آماری، معنی‌دار در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

بررسی اثر مهار Wnt3a بر میزان بقاء سلول‌های بنیادی قلب رت:

در این مطالعه به‌منظور بررسی عدم سمیت مهارکننده شیمیایی Wnt3a (LGK-974) با غلظت ۱۰ میکرومول و تیمار ۴۸ ساعت بر بقاء سلول‌های بنیادی قلب رت H9C2، از تست MTT استفاده شد (**شکل ۱**). بر اساس نتایج به‌دست‌آمده، تیمار سلول‌های بنیادی قلب رت H9C2 با مهارکننده شیمیایی Wnt3a (LGK-974) موجب کاهش غیر معنی‌دار بقاء سلول‌های گروه تیمار (٪۲۸/۲ ± ۹۱/۳۸) نسبت به گروه کنترل (٪۹۸/. ± ۱۰۰) شد. بر اساس نتایج آزمون تی مستقل، تفاوت معنی‌داری بین دو گروه موردمطالعه (تیمار شده با مهارکننده شیمیایی LGK-974 و گروه کنترل) مشاهده نشد (t=./۷۴۸۳، p= ./۴۷۱۵).



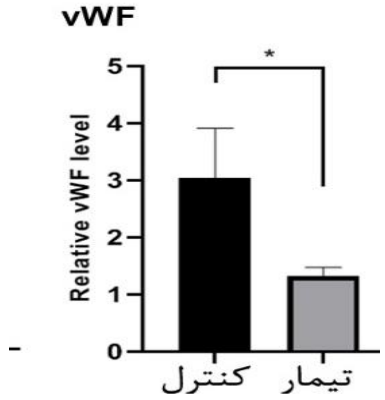
شکل (۱): بررسی میزان بقاء رده سلول‌های کاردیومیوبلاست H9C2 با استفاده از روش MTT. نتایج نشان داد که تیمار سلول‌های H9C2 با ۱۰ میکرومولار LGK-974 (مهارگر Wnt) بعد از ۴۸ ساعت تأثیری بر بقاء سلول‌ها در مقایسه با گروه کنترل نشان نداد ($p>0.05$). (شش بار تکرار). آنالیز آماری Student t test

مهار Wnt3a باعث کاهش بیان ژن‌های VE-Cadherin و vWF می‌شود:

به‌منظور ارزیابی توان رگ‌زایی سلـــول‌های بنیادی قلب رت H9C2 تیمار شده با مهارکننده Wnt3a، بیان ژن‌های VE-Cadherin و vWF با استفاده از روش real-time PCR اندازه‌گیری شد (شکل ۲). بر این اساس مشاهده شد، انکوباسیون سلول‌های بنیادی قلب رت H9C2 با غلظت ۱۰ میکرومول LGK-974 به مدت ۴۸ ساعت باعث کاهش معنی‌دار ژن‌های VE-Cadherin و vWF در مقایسه با گروه کنترل می‌شود (p<./۰۵). همان‌طوری که در شکل شماره ۲ مشاهده می‌شود، بیان ژن VE-Cadherin به میزان ۱۸/. ± ۶۱/. نسبت به گروه کنترل کاهش یافته است (t=۳/۷۴۷، p<./۰۵). به‌طور مشابهی، بیان ژن vWF در گروه تیمار به میزان ۳۱/. ± ۴۲/. نسبت به گروه کنترل کاهش معنی‌داری نشان داد (t=۳/۲۱۴، p<./۰۵). نتایج حاضر تائید کننده اثر مهاری فاکتور LGK-974 بر توان رگ‌زایی سلول‌های بنیادی قلب رت با کاهش بیان ژن‌های VE-Cadherin و vWF در محیط برون تنی می‌باشد. به‌عبارت‌دیگر، کاهش فعالیت فاکتور Wnt3a خاصیت رگ زایی سلول‌های بنیادی قلب رت را از طریق کاهش تمایز به سلول‌های آندوتلیال کنترل می‌کند.

[Downloaded from umj.umsu.ac.ir on 2024-09-15]

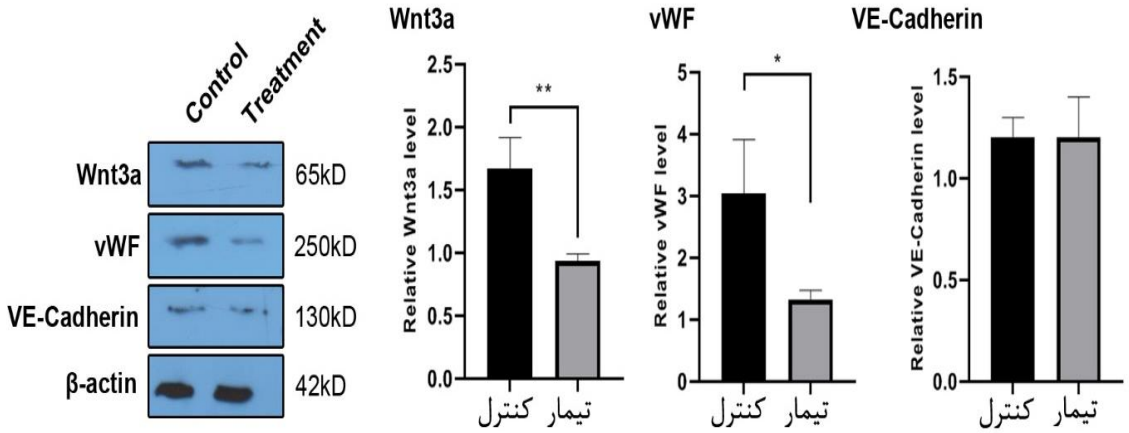
[DOI: 10.52547/umj.32.10.773]



شکل (۲): بررسی بیان ژن‌های اختصاصی رده آندوتلیال (VE-Cadherinو vWF) با استفاده از روش Real-time PCR. تیمار سلول‌های H9C2 با ۱۰ میکرومولار LGK-974 باعث کاهش معنی‌دار ژن‌های VE-Cadherinو vWF در مقایسه با گروه کنترل می‌شود (p<0.05). (سه بار تکرار). آنالیز آماری Student t test

مهار Wnt3a باعث کاهش میزان پروتئین‌های VE-Cadherin و vWF می‌شود:

با استفاده از فن وسترن بلات، میزان سنتز پروتئین‌های VE-Cadherin و vWF بعد از تیمار سلول‌های بنیادی قلب رت H9C2 با مهارکننده LGK-974 مورد ارزیابی قرار گرفت (شکل ۳). با مقایسه میزان پروتئین Wnt3a در گروه تیمار (۰۹۳/. ± ۹۲۵/.) و کنترل (۲۵/. ± ۱/۶۷) مشخص شد که میزان این فاکتور به دنبال استفاده از مهارکننده LGK-974 به‌طور معنی‌دار (p<۰۰۸۴/.، t=۴/۸۳۸) کاهش می‌یابد (شکل ۳). بر اساس داده‌های فن وسترن بلات و آنالیز تی تست، تیمار سلول‌های بنیادی قلب رت H9C2 با مهارکننده شیمیایی LGK-974 موجب کاهش سنتز فاکتور vWF (۲۰۸/. ± ۱/۰۱) در مقایسه با گروه کنترل (۹۸۱/. ± ۳) می‌شود (p<۰۳۰۵/.، t=۳/۲۸۲). بااین‌حال، تفاوت معنی‌داری در مقادیر پروتئین VE-Cadherin در دو گروه کنترل و تیمار مشاهده نشد (p>۸۵۷۳، t=۱۹۱۷). بر اساس این نتایج می‌توان گفت مهار فاکتور Wnt3a می‌تواند میزان سنتز پروتئین‌های مرتبط با عملکرد رگ-زایی را در سلول‌های بنیادی قلب رت کاهش دهد.



شکل (۳): بررسی میزان پروتئین‌های VE-Cadherinو vWF با استفاده از روش وسترن بلات. میزان سنتز پروتئین‌های VE-Cadherin و vWF در سلول‌های رده H9C2 بعد از تیمار با ۱۰ میکرومولار LGK-974 به‌شدت کاهش یافت. این داده‌ها نشان‌دهنده کاهش توان تمایزی سلول‌های H9C2 به سمت سلول‌های رده آندوتلیالی است. (سه بار تکرار). آنالیز آماری Student t test

[Downloaded from umj.umsu.ac.ir on 2024-09-15]
[DOI: 10.52547/umj.32.10.773]

بحث و نتیجه‌گیری

آسیب‌های پاتولوژیک در بافت قلب به دنبال رخداد ایسکمی یکی از چالش‌های عمده در طب انسانی است (۱۱). توانایی محدود بافت قلبی در ترمیم قسمت آسیب‌دیده از طریق مداخلات دارویی و رهیافت جراحی به‌عنوان گزینه‌های درمانی مطرح می‌باشند (۱۱). بااین‌وجود، این روش‌ها در بسیاری از موارد در تسریع روند درمانی مؤثر نبوده و موجب رخداد نارسایی مزمن قلبی می‌گردند (۱۲). در سال‌های اخیر، استفاده از سلول‌های بنیادی در تخفیف آسیب‌های پاتولوژیک قلبی مطرح شده است (۳). همانند سایر بافت‌ها، سلول-های بنیادی قلبی دارای توانایی تمایز و تولید سلول‌های بالغ کاردیومیوسیت، آندوتلیال و ماهیچه صاف را در محیط آزمایشگاهی دارند (۱۳, ۱۴). نشان داده شده است که تمایز سلول‌های بنیادی قلبی به سلول‌های آندوتلیال می‌تواند از طریق القاء رگ‌زایی و افزایش خون‌رسانی به ناحیه آسیب‌دیده، عوارض بعد از سکته قلبی را کاهش دهد (۱۵). مطالعات مولکولی نقش بسیاری از فاکتورهای درون‌سلولی را در روند تمایز سلولی نشان داده است (۱۵). در این مطالعه تجربی- آزمایشگاهی، توان تمایزی سلول‌های بنیادی قلب رت (H9C2) به رده سلولی آندوتلیال بعد از مهار فاکتور Wnt3a در محیط برون تنی موردبررسی قرار گرفت. برای مهار سیگنال Wnt از مهارکننده شیمیایی LGK-974 استفاده شد. مهارکننده باعث کاهش فعالیت Porcupine شده و از ترشح و فعالیت Wnt3a جلوگیری می‌کند (۱۶). نشان داده شده است که فاکتور Porcupine برای پالمیتولاسیون گیرنده Wnt و عملکرد آن نیاز است. بر اساس مطالعات قبلی، نقش بالقوه آبشار مولکولی Wnt3a و مسیرهای بیوشیمیایی رابط در بلوغ و توان تمایزی سلولی بنیادی قلبی نشان داده شده است (۱۷). به‌عنوان‌مثال، مهار برخی از افکتورهای مسیر آبشاری Wnt توان تمایز سلول‌های بنیادی جنینی را به سمت کاردیومیوسیت‌ها کاهش می‌دهد (۱۸). بالعکس، فعال شدن فاکتورهای Wnt4, 5a, 11 توان کاردیوژنز این سلول‌ها را زیاد می‌کند (۱۹). بر اساس اطلاعات نویسندگان مقاله حاضر، نقش سیگنالینگ Wnt در توان رگ‌زایی سلول‌های بنیادی قلبی به‌درستی مشخص نشده است.

نتایج این مطالعه نشان داد که مهار سیگنالینگ Wnt باعث کاهش توان تمایز سلول‌های H9C2 به سمت سلول‌های آندوتلیال می‌شود. مطالعات بیان ژنی و پروتئینی نشان داد که میزان مولکول-های VE-Cadherin و vWF (شاخص‌های عملکردی سلول‌های آندوتلیال) در سلول‌های قلبی تیمار شده با مهارگر Wnt3a در مقایسه با گروه کنترل کاهش معنی‌داری داشت. Tian و همکاران نشان دادند که تنظیم عملکرد آبشار مولکولی Wnt می‌تواند توان تمایز را در سلول‌های بنیادی انسانی به سمت سلول‌های قلبی را تحت تأثیر قرار دهد (۱۶). در همین راستا، مهار گلیکوژن سنتاز کیناز ۳ میزان تمایزی قلبی را کاهش داده درحالی‌که افزایش بیان β-catenin از افکتورهای مسیر آبشاری Wnt توان تمایزی را تا حدود ۹۸درصد افزایش می‌دهد (۲۰, ۲۱). این داده‌ها نقش کلیدی سیگنال Wnt را در القاء تمایز سلول‌های بنیادی به سلول‌های قلبی نشان می‌دهند. در مطالعه‌ای مشابه مهار Wnt توسط فاکتور Pyrvinium pamoate تکثیر سلول‌های بنیادی مزانشیمی را افزایش ولی توان تمایزی به رده‌های استخوان و غضروف را به نحو بارزی کاهش داد (۲۲). با توجه به داده‌های مختلف، نقش کلیدی فاکتور Wnt3a در تمایز سلول‌های بنیادی قلب به سمت رده‌های آندوتلیال بررسی نشده است. در خصوص نقش محوری فاکتور Wnt در القاء رگ زایی و توان تمایزی به سمت سلول‌های بنیادی به سمت رده آندوتلیال، نشان داده شده است که فاکتور Wnt می‌تواند بیان و تولید فاکتور VEGF را کنترل کند (۲۳). تحریک محور β-catenin در تولید پروتئین‌های ماتریکس خارج سلولی با خاصیت رگ زایی از طریق مسیر TGF-β مؤثر است (۲۴). نتایج مطالعه حاضر نشان داد که مهار فعالیت و ترشح فاکتور Wnt3a میزان تمایز سلول‌های بنیادی قلبی رت به سلول‌های آندوتلیال را کاهش می-دهد. با توجه به نقش محوری سیگنال Wnt در فعالیت سلول‌های بنیادی، به نظر می‌رسد که با کنترل فعالیت فاکتورهای موجود در این مسیر بتوان توان رگ زایی سلول‌های بنیادی را بعد از پیوند در بافت ایسکمیک قلب کنترل کرد. در مطالعه حاضر توان رگ زایی سلول‌های H9C2 تنها در محیط برون تنی بررسی شد. به نظر می‌رسد که تنظیم فعالیت سیگنال Wnt در محیط درون تنی (انواع مدل‌های ایسکمیک قلبی حیوانی) اطلاعات ارزشمندی از توان رگ زایی این سلول‌ها در اختیار ما قرار می‌دهد. پیشنهاد می‌گردد مطالعات آتی، توان تمایزی سلول‌های بنیادی قلبی را بعد از تحریک و مهار سیگنال Wnt در مدت‌زمان طولانی‌تری موردبررسی قرار دهند.

تعارض در منافع: ندارد.

تشکر و قدردانی: بدین‌وسیله از کلیه افرادی که ما را در اجرای این مطالعه یاری نمودند قدردانی می‌گردد. این مقاله برگرفته از پایان‌نامه مقطع کارشناسی ارشد است و منبع مالی آن را مرکز تحقیقات سل و بیماری‌های ریوی دانشگاه علوم پزشکی تبریز (کد اخلاق IR.TBZMED.VCR.REC.1397.485) تأمین کرده است.

[Downloaded from umj.umsu.ac.ir on 2024-09-15]

[DOI: 10.52547/umj.32.10.773]

References:

1. Dixit P, Katare R. Challenges in identifying the best source of stem cells for cardiac regeneration therapy. Stem Cell Res Ther 2015;6(1):26.
2. Kumar D, Kamp TJ, LeWinter MM. Embryonic stem cells: differentiation into cardiomyocytes and potential for heart repair and regeneration. Coron Artery Dis 2005;16(2):111-6.
3. Rahbarghazi R, Nassiri SM, Ahmadi SH, Mohammadi E, Rabbani S, Araghi A, et al. Dynamic induction of pro-angiogenic milieu after transplantation of marrow-derived mesenchymal stem cells in experimental myocardial infarction. Intl J Cardiol 2014;173(3):453-66.
4. Lee J-H, Parthiban P, Jin G-Z, Knowles JC, Kim H-W. Materials roles for promoting angiogenesis in tissue regeneration. Prog Mater Sci 2021;117:100732.
5. Guo Y, Guo Y, Chen C, Fan D, Wu X, Zhao L, et al. Circ3823 contributes to growth, metastasis and angiogenesis of colorectal cancer: Involvement of miR-30c-5p/TCF7 axis. Mol Cancer 2021;20(1):1-21.
6. Zhou W, Yang L, Nie L, Lin H. Unraveling the molecular mechanisms between inflammation and tumor angiogenesis. Am J Cancer Res 2021;11(2):301-17.
7. Brunt KR, Zhang Y, Mihic A, Li M, Li S-H, Xue P, et al. Role of WNT/β-catenin signaling in rejuvenating myogenic differentiation of aged mesenchymal stem cells from cardiac patients. Am J Clin Pathol 2012;181(6):2067-78.
8. Tanaka T, Obana M, Mohri T, Ebara M, Otani Y, Maeda M, et al. Interleukin-27 induces the endothelial differentiation in Sca-1+ cardiac resident stem cells. Cytokine 2015;75(2):365-72.
9. Du Y, Zhang S, Yu T, Du G, Zhang H, Yin Z. Wnt3a is critical for endothelial progenitor cell-mediated neural stem cell proliferation and differentiation. Mol Med Rep 2016;14(3):2473-82. Epub 2016/08/01.
10. Sheshpari S, Shahnazi M, Ahmadian S, Nouri M, Abbasi MM, Beheshti R, et al. Intra-ovarian injection of bone marrow-derived c-Kit+ cells for ovarian rejuvenation in menopausal rats. BioImpacts 2021.
11. Sidik N, Morrow A, Berry C. Human Microcirculation in Ischemic Heart Disease. Arterioscler Thromb Vasc Biol 2020;40(1):11-3.
12. Liu C, Han D, Liang P, Li Y, Cao F. The Current Dilemma and Breakthrough of Stem Cell Therapy in Ischemic Heart Disease. Front Cell Dev Biol 2021;(9):940.
13. Sebastião MJ, Serra M, Pereira R, Palacios I, Gomes-Alves P, Alves PM. Human cardiac progenitor cell activation and regeneration mechanisms: exploring a novel myocardial ischemia/reperfusion in vitro model. Stem Cell Res Ther 2019;10(1):77.
14. Khaksar M, Sayyari M, Rezaie J, Pouyafar A, Montazersaheb S, Rahbarghazi R. High glucose condition limited the angiogenic/cardiogenic capacity of murine cardiac progenitor cells in in vitro and in vivo milieu. Cell Biochem Funct 2018;36(7):346-56.
15. Mauretti A, Spaans S, Bax NAM, Sahlgren C, Bouten CVC. Cardiac Progenitor Cells and the Interplay with Their Microenvironment. Stem Cells Int 2017;2017:7471582-. Epub 2017/09/17.
16. Tian D, Shi Y, Chen D, Liu Q, Fan F. The Wnt inhibitor LGK-974 enhances radiosensitivity of HepG2 cells by modulating Nrf2 signaling. Int J Oncol 2017;51(2):545-54.
17. Zhao M, Tang Y, Zhou Y, Zhang J. Deciphering role of Wnt signalling in cardiac mesoderm and cardiomyocyte differentiation from human iPSCs: Four-dimensional control of Wnt pathway for hiPSC-CMs differentiation. Sci Rep 2019;9(1):1-15.
18. Münsterberg A, Hoppler S. WNT and BMP regulate roadblocks toward cardiomyocyte differentiation: lessons learned from embryos inform human stem cell differentiation. Stem Cell Investig 2016;3:33.

[Downloaded from umj.umsu.ac.ir on 2024-09-15]

[DOI: 10.52547/umj.32.10.773]

19. Mazzotta S, Neves C, Bonner RJ, Bernardo AS, Docherty K, Hoppler S. Distinctive roles of canonical and noncanonical Wnt signaling in human embryonic cardiomyocyte development. Stem Rell Rep 2016;7(4):764-76.
20. Cho J, Rameshwar P, Sadoshima J. Distinct Roles of Glycogen Synthase Kinase (GSK)-3α and GSK-3β in Mediating Cardiomyocyte Differentiation in Murine Bone Marrow-derived Mesenchymal Stem Cells. J Biol Chem 2009;284(52):36647-58.
21. Cohen ED, Tian Y, Morrisey EE. Wnt signaling: an essential regulator of cardiovascular differentiation, morphogenesis and progenitor self-renewal. Development 2008;135 (5): 789–798..
22. Saraswati S, Deskins DL, Holt GE, Young PP. Pyrvinium, a potent small molecule Wnt inhibitor, increases engraftment and inhibits lineage commitment of mesenchymal stem cells (MSCs). Wound Repair Regen 2012;20(2):185-93. Epub 2012/02/14.
23. Olsen JJ, Pohl SÖ-G, Deshmukh A, Visweswaran M, Ward NC, Arfuso F, et al. The Role of Wnt Signalling in Angiogenesis. Clin Biochem Rev 2017;38(3):131-42.
24. Hawkins AG, Pedersen EA, Treichel S, Temprine K, Sperring C, Read JA, et al. Wnt/β-catenin–activated Ewing sarcoma cells promote the angiogenic switch. JCI Insight. 2020;(5):13.

[Downloaded from umj.umsu.ac.ir on 2024-09-15]

[DOI: 10.52547/umj.32.10.773]

Original Article

INHIBITION OF WNT3A DIMINISHED ANGIOGENIC DIFFERENTIATION CAPACITY OF RAT CARDIAC PROGENITOR CELLS

Nasim Bandarian[1], Reza Rahbarghazi[1, 2], Mahdi Mahdipour[3], Mahdi Ahmadi[3], Aysa Rezabakhsh[4], Sanya Haiaty[5], Majid Khaksar[3]

Received: 29 December, 2021; Accepted: 13 March, 2022

Abstract

***Background & Aims**:* Myocardial infarction is a leading cause of human mortality in industrialized and developing societies. Limited restorative ability of of cardiomyocytes after ischemic changes can causes extensive damage lead to prominent chronic heart failure. At present, the application of certain drugs is touted as one of the main available approaches to inhibit the spread of the lesion and to maintain the integrity of the myocardial tissue after infarction. Today, the transplantation of stem cells to restore structure and maintain heart function has opened new hopes for clinicians in human medicine. These cells accelerate the healing process by secreting a variety of factors and differentiation into varient cell lines, including vascular cells. Here, we investigated the inhibitory role of Wnt3a factor on the process of differentiation of rat cardiomyoblast (H9C2) to endothelial cells.

Materials & Methods: In this experimental study, rat cardiomyoblast (H9C2) were expanded in DMEM/HG and exposed to 10 µM LGK-974 (a Wnt3a inhibitor) for 48 hours. The viability of cells was determined using MTT method. The ability to differentiation into endothelial cells was assessed by measuring expression and protein levels of VE-Cadherin and vWF using real-time PCR and western blotting.

***Results*:** The inhibition of Wnt3a in H9C2 cells could significantly reduce cell survival rate after 48 hours compared to the control cells ($p<0.05$). Based on data, expression and protein levels of VE-Cadherin and vWF were significantly diminished in group incubated with LGK-974

***Conclusion*:** The inhibition of Wnt3a can suppress the angiogenic potential of rat cardio myoblasts

***Keywords*:** Rat Cardiac Progenitor Cells (H9C2); Wnt3a; Survival; Endothelial Differentiation

Address: Department of Applied Cell Sciences, Faculty of Advanced Medical Sciences, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran
Tel: +98413355789
Email: rezarahbardvm@gmail.com ،rahbarghazir@tbzmed.ac.ir

SOURCE: STUD MED SCI 2022: 32(10): 781 ISSN: 2717-008X

Copyright © 2022 Studies in Medical Sciences
This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-noncommercial 4.0 International License which permits copy and redistribute the material just in noncommercial usages, provided the original work is properly cited.

[1] Tuberculosis and Lung Disease Research Center, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran
[2] Department of Applied Cell Sciences, Faculty of Advanced Medical Sciences, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran (Corresponding Author)
[3] Stem Cell Research Center, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran
[4] Cardiovascular Research Center, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran
[5] Infectious and Tropical Diseases Research Center, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran

[Downloaded from umj.umsu.ac.ir on 2024-09-15]

[DOI: 10.52547/umj.32.10.773]