

بررسی اثر بیسفنول A بر قابلیت حیات، تغییرات مورفولوژیک و القای آپوپتوزیس در سلول‌های بنیادی مزانشیم مغز استخوان رت بالغ

ملک سلیمانی مهرنجانی^{۱*}، Ph.D.، مجید مهدیه^۱، Ph.D.، آتنا سادات عظیمی^۱، M.Sc.، بیان لطفی^۲ M.Sc.

- ۱- دانشگاه اراک، دانشکده علوم پایه، گروه زیست‌شناسی، کدپستی ۸۳۴۹-۳۸۱۵۶، اراک، ایران
۲- کارشناس ارشد زیست‌شناسی جانوری، سلولی-تکوینی، دانشگاه اراک، دانشکده علوم پایه، گروه زیست‌شناسی، اراک، ایران

* پست الکترونیک نویسنده مسئول: m-soleimani@araku.ac.ir

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۴/۴/۲

تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۱۲/۱۷

چکیده

هدف: هدف از این پژوهش، بررسی اثر بیسفنول A بر قابلیت حیات، تغییرات مورفولوژیک و القای آپوپتوزیس در سلول‌های بنیادی مزانشیم مغز استخوان رت بالغ بود.

مواد و روش‌ها: سلول‌های بنیادی مزانشیم مغز استخوان با استفاده از روش فلشینگ استخراج شدند. سلول‌های پاساژ سوم به ۱۱ گروه کنترل و آزمایشی تقسیم شدند. سلول‌های گروه‌های آزمایشی با دوزهای مختلف بیسفنول A (۱، ۵، ۱۰، ۵۰، ۱۰۰، ۲۵۰، ۵۰۰، ۱۰۰۰، ۲۰۰۰ و ۴۰۰۰ نانومولار) طی چهار دوره ۵، ۱۰، ۱۵ و ۲۱ روزه، در محیط استئوژنیک حاوی ۱۰ درصد سرم جنین گاوی، جهت تعیین دوز موثر تیمار شدند. سپس قابلیت حیات، میزان آسیب DNA، تغییر در الگوی بیان ژن‌ها و همچنین تغییرات مورفولوژیک سلول‌ها، طی روند تمایز استئوژنیک بررسی شد. داده‌ها با روش آماری آنالیز واریانس یک‌طرفه و همچنین آنالیز t-test مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت و تفاوت میانگین‌ها در سطح $p < 0.05$ معنی‌دار در نظر گرفته شد.

نتایج: کاهش معنی‌داری در قابلیت حیات سلول‌ها، قطر هسته و سطح بیان ژن آنتی‌آپوپتیک Bcl-2 در سلول‌های تیمار شده با بیسفنول A نسبت به گروه کنترل مشاهده شد ($p < 0.05$). افزایش معنی‌داری نیز در میزان آسیب و شکستگی DNA و سطح بیان ژن آپوپتوتیک Bax در سلول‌های تیمار شده با بیسفنول A نسبت به گروه کنترل، مشاهده شد ($p < 0.05$).

نتیجه‌گیری: نتایج حاصل از این پژوهش پیشنهاد می‌کند که بیسفنول A در رفتاری وابسته به دوز، باعث کاهش قابلیت حیات و القای آپوپتوزیس در سلول‌های بنیادی مزانشیم مشتق از مغز استخوان می‌شود.

واژگان کلیدی: بیسفنول A، سلول بنیادی مزانشیم مغز استخوان، آپوپتوزیس، قابلیت حیات، تغییرات مورفولوژیک

مقدمه

امروزه هزاران ماده شیمیایی و صنعتی متفاوت ناخواسته وارد محیط زیست می‌شود که مخرب و بر هم زننده‌ی تعادل سیستم اندوکرینی انسان و دیگر جانوران می‌باشند، که از آن گروه می‌توان به بیسفنول A (BPA) اشاره کرد (۱). بیسفنول A یا ۲-۲، بیس هیدروکسی فنل پروپان (BPA)، یک الیل فنول است که به‌عنوان یک زواستروژن محیطی شناخته می‌شود و به‌دلیل داشتن اثرات استروژنی روی سیستم تولیدمثل، جزء مخرب‌های اندوکرینی (EDC) نیز طبقه‌بندی می‌شود (۲). بیسفنول A به‌طور وسیع در تولید انواع مواد و وسایل پزشکی از جمله لنزهای چشمی و کامپوزیت‌های دندانپزشکی و همچنین ظروف یک‌بار مصرف، پوشش داخلی قوطی‌های کنسرو، بطری‌های آب معدنی، شیشه‌های تغذیه اطفال، پلاستیک‌های PVC، پلی‌کربنات‌ها و غیره استفاده می‌شود (۳ و ۴). این آلاینده زیست محیطی می‌تواند از طریق آب، هوا (۱) و غذا وارد زنجیره غذایی انسان شود (۵-۸).

تحقیقات نشان داده است که بیسفنول A با تغییر در الگوی بیان ژن‌ها در سلول‌های اعصاب مرکزی (۹) و همچنین تولید گونه اکسیژن واکنش‌گر ROS (Reactive oxygen species) در سلول‌های اندوتلیال رده MSS31 (۱۰) باعث کاهش قابلیت حیات و مرگ سلول‌ها می‌شود.

سلول بنیادی مزانشیم، سلولی پیش‌ساز با توانایی‌های متعدد است که در برخی از بافت‌های بالغ نظیر مغز استخوان و بافت چربی یافت می‌شود و قادر به خود نوزایی با ظرفیت تکثیری بالا می‌باشد (۱۱). طبق مطالعات صورت گرفته توانایی سلول‌های بنیادی مزانشیم برای تشکیل استخوان، چربی و غضروف در هردو شرایط *In Vivo* و *In Vitro* به اثبات رسیده است (۱۲). اگرچه اثر سیتوتوکسیسیته بیسفنول A بر سلول‌های بنیادی جنینی انسان بررسی شده است (۱۳)، ولی با وجود اهمیت سلول‌های بنیادی مزانشیم مغز استخوان به‌عنوان یک ذخیره با ارزش در جایگزینی سلول‌های استخوانی به هنگام صدمات بافتی، تاکنون اثر این آلاینده صنعتی بر این سلول‌ها در محیط استئوژنیک، گزارش نشده است.

بنابراین با توجه به حضور بیسفنول A در محیط زیست، ورود گسترده آن به زنجیره غذایی طی ۳۰ سال اخیر و همچنین تهدید سلامت انسان، و از سوی دیگر پتانسیل بالای سلول‌های

بنیادی مزانشیم مغز استخوان در تمایز به استئوبلاست و کاربرد گسترده آن‌ها در ترمیم ضایعات استخوانی، لذا بر آن شدید تا اثر سیتوتوکسیسیته بیسفنول A را بر میزان تکثیر سلولی، تغییرات مورفولوژیک و القای آپوپتوزیس در سلول‌های بنیادی مزانشیم مغز استخوان رت بالغ طی روند تمایز به استئوبلاست، به‌عنوان یک مدل آزمایشگاهی مورد مطالعه و تحقیق قرار دهیم.

مواد و روش‌ها

جداسازی و کشت سلول‌های مغز استخوان: در این مطالعه تجربی از رت‌های نژاد Wistar با سن ۵۰ روز و وزن 140 ± 20 گرم استفاده شد. حیوان مورد استفاده در این پژوهش پس از خریداری از انستیتو پاستور در خانه حیوانات دانشگاه اراک در شرایط استاندارد دمای 27 ± 3 درجه سانتی‌گراد و با دسترسی آزاد به غذا و آب در قفس‌های پلی اتیلین نگهداری شد. با رعایت اصول اخلاقی، رت‌ها به کمک دی اتیلن اتر بی‌هوش شده، استخوان‌های ران و ساق پای آن‌ها جدا و سپس بافت‌های پیوندی اطراف استخوان‌ها به‌طور کامل پاک گردید. استخوان‌ها در محیط کشت (DMEM (Dulbecco's Modified Eagles Medium (Germany, Gibco, 15% حاوی سرم FBS (Germany, Gibco, Fetal Bovine Serum) و پنی‌سیلین-استریتومایسین (تهیه شده از شرکت Gibco, Germany) در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد قرار گرفته، به زیر هود لامینار منتقل شد. دو سر استخوان با قیچی استریل قطع و مغز استخوان با عمل فلاشینگ خارج و به‌داخل لوله فالكون حاوی محیط کشت کامل هدایت و سپس به‌مدت ۵ دقیقه در 1200 rpm سانترفیوژ شد. محیط رویی خارج و رسوب سلولی در یک میلی‌لیتر محیط کشت تازه معلق گردید و در فلاسک کشت T25 و در انکوباتور CO_2 دار (دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و ۵ درصد CO_2) انکوبه گردید. پس از ۲۴ ساعت محیط رویی که حاوی سلول‌های غیرچسبنده بود، خارج و شستشوی سلول‌ها با PBS انجام گردید. سپس به‌مدت دو هفته، هر سه روز یکبار محیط کشت سلول‌ها تعویض شد. زمانی که کف فلاسک به تراکم بالایی از سلول رسید، سلول‌ها با کمک $1 \times \text{Trypsin/EDTA}$ ۰/۲۵ درصد (تهیه شده از شرکت Sigma-Aldrich) از کف فلاسک جدا و به فلاسک‌های جدید منتقل شدند. برای به‌دست آوردن خلوص بالایی از این سلول‌ها سه مرحله پاساژ تکرار شد.

هر میلی‌لیتر محلول 1 درصد آگارز با دمای ذوب پایین تهیه شد. این سوسپانسیون بر روی اسلایدهای میکروسکوپی مفروش شده با آگارز ۱ درصد گذاشته شد و پس از لامل گذاری / آگارز نرمال ۵، اسلایدها به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. سپس لامل از روی اسلایدها به آرامی برداشته شد و اسلاید میکروسکوپی در بافر لیز حاوی EDTA 0.15 M, NaCl 2.5 M, Tris-base 10 Mm, NaSLS 1%, 0.1 Mm با pH= 10 به مدت ۶۰ دقیقه قرار داده شد. پس از آن اسلایدها در بافر الکتروفورز حاوی NaOH 300 mM, EDTA 1Mm با pH=13 با جریان ۳۰۰ آمپر به مدت ۲۰ دقیقه، الکتروفورز شد. در نهایت نمونه در بافر خنثی کننده حاوی Tris base 0.4M که با HCl به pH=7.5 رسیده بود، شستشو داده شده و پس از رنگ‌آمیزی با اتیدیوم بروماید به کمک میکروسکوپ Olympus مشاهده و عکس‌برداری صورت گرفت (۱۴).

استخراج RNA و آنالیز RT-PCR: جهت مطالعه دقیق‌تر و تایید تست کامت و همچنین تشخیص نوع مرگ سلولی القا شده در سلول‌های تیمار شده با بیسفنول A، از آنالیز RT-PCR استفاده شد.

کشت سلولی و جداسازی RNA: در این مرحله سلول‌ها به تعداد 5×10^3 در فلاسک‌های T شکل ۲۵ سانتی‌متر مکعب کشت و به مدت ۲۱ روز با محیط استئوژنیک و دوز ۲۵۰ نانومولار بیسفنول A کشت و تیمار شدند و سپس با کمک اسکراپر، سلول‌ها از کف فلاسک تراشیده و به اپندورف منتقل شدند. سلول‌ها در ازت مایع به فریزر ۸۰- درجه سانتی‌گراد انتقال یافتند. جهت جداسازی RNA از این سلول‌ها از کیت RNeasy mini kit (Qiagen) و برطبق دستورالعمل کارخانه سازنده استفاده شد و به‌منظور سنجش میزان RNA استخراج شده از دستگاه اسپکتروفتومتر استفاده شد و همچنین خلوص RNA با استفاده از نسبت جذب در طول موج ۲۶۰ به ۲۸۰ تعیین شد. تمامی مراحل در زیر هود لامینار صورت گرفت.

سنتر c-DNA (reverse transcription reaction)
برای سنتر c-DNA از c-DNA synthesis kit (frementas) استفاده شد و بدین منظور ۲ میکرولیتر RNA کل (Total) (۰/۵ میکروگرم بر میکرولیتر)، ۱ میکرولیتر پرایمر oligo (dT)₁₈ و تا حجم ۱۲ میکرولیتر آب فاقد نوکلئاز (Nuclease free water) در داخل میکروتیوب ۱،۵ میلی‌لیتری استریل که بر روی یخ قرار داده شده، ریخته شد. سپس به منظور حذف

کشت سلول‌ها در دوزهای مختلف بیسفنول A و بررسی قابلیت حیات آن‌ها: سلول‌های پاساژ سوم به تعداد 5×10^3 سلول در هر خانه ی پلیت ۲۴ خانه ای به مدت ۲۴ ساعت کشت و پس از چسبیدن این سلول‌ها به کف در حضور گروه کنترل (محیط استئوژنیک: محیط DMEM حاوی ۱۰ درصد سرم گاو، ۱۰ میلی‌مولار بتاگلیسرول فسفات، ۱۰ نانومولار دگزامتازون و ۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر آسکوربیک ۳-فسفات) و دوزهای ۱، ۵، ۱۰، ۵۰، ۱۰۰، ۲۵۰، ۵۰۰، ۱۰۰۰، ۲۰۰۰ و ۴۰۰۰ نانومولار بیسفنول A (تهیه شده از شرکت Sigma-Aldrich) در محیط استئوژنیک کشت شد (۱۴). پس از دوره‌های ۵، ۱۰، ۱۵ و ۲۱ روز قابلیت حیات سلول‌ها ارزیابی شد و بدین منظور، ۳۰ میکرولیتر محلول ۰/۰۱ مولار MTT به هر چاهک اضافه شد و به مدت ۴ ساعت انکوبه گردید. پس از اینکه کریستال‌های فورمازون تشکیل شد. این بلورها در حلال دی متیل سولفوکسید (DMSO) (تهیه شده از شرکت Sigma-Aldrich) حل و میزان جذب محلول حاصل در طول موج ۴۵۰ نانومتر توسط دستگاه (SCO diagnostic, Germany) ELAISA-reader اندازه‌گیری شد و با استفاده از منحنی استاندارد MTT تعداد سلول‌های زنده در گروه‌های مختلف تعیین شد (۱۴).

انتخاب دوز موثر: با توجه به نتایج به‌دست آمده از تست MTT، ۲۵۰ نانومولار بیسفنول A به‌عنوان دوز موثر انتخاب گردید و مطالعه با دو گروه کنترل و تیمار با بیسفنول A (۲۵۰ نانومولار) ادامه یافت.

آزمون کامت: تست کامت روش بسیار حساسی با عنوان "Single-cell alkaline gel electrophoresis" یا "Comet assay" می‌باشد که از آن جهت بررسی سلامت DNA هسته سلول‌های تیمار شده با بیسفنول A 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 و قطعه‌قطعه شدن شده باشد به دلیل اختلاف سرعت حرکت قطعات DNA با طول مختلف در میدان الکتریکی، اطراف هسته سلول‌ها هاله یا دنباله‌ای 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 گروه سلول‌های تیمار شده با ۲۵۰ نانومولار بیسفنول A، با تراکم ۲۰۰ هزار سلول در

دمای اتاق انجام شد. همچنین قطر هسته سلول‌ها به وسیله نرم‌افزار تصویری موتیک (Micro company version 1.2) optical group اندازه‌گیری شد. Hoechst 3342 رنگ فلورسنتی است که از طریق غشای پلاسمایی در سلول نفوذ کرده، DNA را رنگ می‌کند، که با استفاده از آن تغییرات هسته از قبیل تراکم کروماتین و قطعه قطعه شدن آن را می‌توان بررسی کرد. مورفولوژی سیتوپلاسم سلول‌ها به وسیله رنگ آکریدین اورنژ، بررسی شد. سلول‌ها بعد از رنگ‌آمیزی ۲ بار با PBS- شسته شدند و بررسی انجام شد و بلافاصله توسط میکروسکوپ فلورسنس (Olympus, IX70) عکس‌برداری شد (۱۵).

آنالیز آماری

داده‌های به دست آمده با استفاده از آزمون آماری One-Way ANOVA، تست Tukey و همچنین T-Test، تجزیه و تحلیل و تفاوت میانگین‌ها در سطح $p < 0.05$ معنی‌دار در نظر گرفته شد.

نتایج

بررسی قابلیت حیات و انتخاب دوز موثر

از مقایسه میزان قابلیت حیات در سلول‌های بنیادی مزانشیم مغز استخوان تیمار شده با دوزهای مختلف بیسفنول A و به صورت وابسته به دوز، نسبت به گروه کنترل، کاهش معنی‌داری مشاهده شد ($p < 0.05$) (جدول ۱ و شکل ۱).

با توجه به نتایج حاصل از تست MTT و رنگ‌آمیزی پروپیدیوم آیوداید، دوز ۲۵۰ نانومولار بیسفنول A در مدت ۲۱ روز، به عنوان دوز موثر انتخاب گردید و مطالعه با دو گروه کنترل و تیمار با بیسفنول A (۲۵۰ نانومولار) ادامه یافت.

ساختارهای ثانویه احتمالی تشکیل شده در RNA، نمونه‌ها به مدت ۵ دقیقه در ۷۰ درجه سانتی‌گراد انکوبه و پس از آن بر روی یخ قرار داده شدند. در ادامه ۴ میکرولیتر 5x reaction buffer، ۱ میکرولیتر مهارکننده RNase (20u/μl)، ۲ میکرولیتر از مخلوط dNTP (dATP, dGTP, dCTP, dTTP) (۱۰ mM) و ۱ میکرولیتر آنزیم ترانس کریپتاز معکوس M- (200 u/μl) MuIV به نمونه‌ها اضافه شد، به آرامی مخلوط و سپس سانتیفریوژ شدند.

برای شروع واکنش نمونه‌ها به مدت ۶۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند و در پایان با گرم کردن نمونه‌ها در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه واکنش متوقف گردید و محصول c-DNA حاصل برای واکنش‌های PCR مورد استفاده قرار گرفت.

واکنش زنجیره پلی‌مراز (pcr) : واکنش PCR با استفاده از

پرایمرهای اختصاصی Bax () Forward:

5'CTTTTTGTTACAGGGTTTCATCCAG3'

Reverse:

Bcl-2 (5'CTCTGCAGCTCCATATTATTGTCC3'

و Forward: 5'GCTGGGATGCTTTGTGGAA3')

در (Reverse: 5'CTCACTTGTGGCCAGGTA3'

حجم ۲۵ میکرولیتر و با دمای آنیلینگ ۵۸ درجه سانتی‌گراد، در

۳۵ سیکل صورت گرفت و از ژن Actine - () Forward:

Reverse: 5'CGTGCGTGACATTAAGAGAA3'

و به عنوان کنترل (5'CGCTCATTGCCGATAGTGAT3'

داخلی استفاده شد.

بررسی تغییرات مورفولوژیک در نمونه‌های استئوژنیک با

استفاده از رنگ‌آمیزی فلورسنت: به دنبال تیمار سلول‌ها در

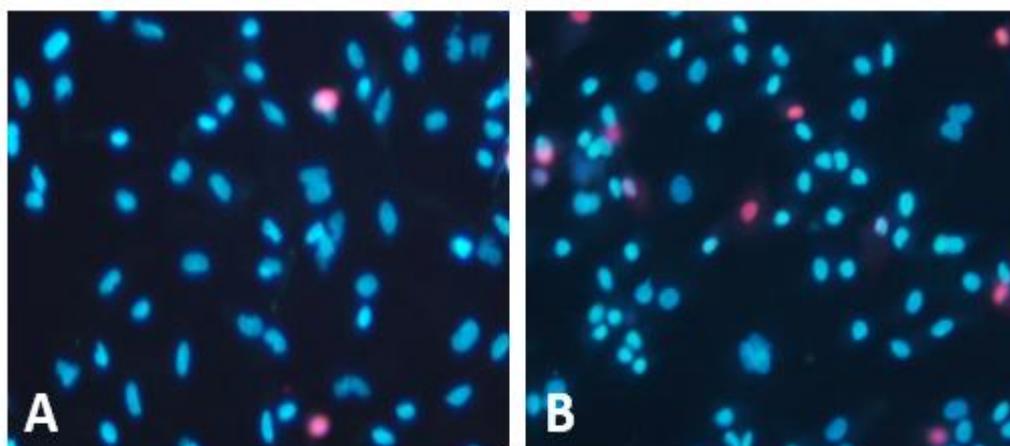
یک محیط استئوژنیک برای مدت ۲۱ روز، بررسی تغییرات

مورفولوژیک هسته سلول‌ها با استفاده از رنگ هوخست-

H33342 و پروپیدیوم آیوداید پس از ۵ دقیقه انکوبه کردن در

جدول ۱. مقایسه میانگین قابلیت حیات سلول‌های بنیادی مزانشیم مغز استخوان رت بالغ تیمار شده با دوزهای مختلف بیسفنول A در مقایسه با گروه کنترل. مقادیر به صورت $means \pm sd$ می‌باشد. میانگین‌ها با کد حرف‌های متفاوت دارای تفاوت معنی‌دار هستند (*one way ANOVA tukey, s test, p < 0.05*)

Dose (nM)	Number of viable cells ($\times 1000$)			
	Time (day)			
	5	10	15	21
0	10854.2 ^a ± 157	11750 ^a ± 826	15479.2 ^a ± 314	17854.2 ^a ± 538
10	10333.3 ^{ab} ± 308	10833 ^{abc} ± 219	14208 ^{ab} ± 320	14250 ^{ab} ± 286
50	9916.7 ^{abc} ± 344	10333 ^{bcd} ± 95	11125 ^{bc} ± 312	11854 ^{bc} ± 260
100	9645.8 ^{bc} ± 157	9895.8 ^{cd} ± 190	10750 ^{cd} ± 62	10979.2 ^c ± 157
250	9020.8 ^{cd} ± 425	9166.7 ^d ± 252	10104 ^d ± 95	7708.3 ^d ± 219
500	8229.2 ^d ± 485	7583.3 ^e ± 191	9291.7 ^e ± 320	6770.8 ^{de} ± 314
1000	7500 ^{ef} ± 472	6270.8 ^f ± 191	6562.5 ^f ± 125	6333.3 ^{de} ± 130
2000	6687.5 ^f ± 438	4562 ^g ± 225	5979.2 ^f ± 190	5895.8 ^e ± 200
4000	5270.8 ^g ± 538	3875 ^g ± 62	5187.5 ^g ± 62	1625 ^f ± 1488



شکل ۱: رنگ‌آمیزی سلول‌های بنیادی مزانشیم مغز استخوان رت با رنگ فلورسنت پروپیدیوم آیوید (بزرگنمایی $\times 20$). (A) گروه سلول‌های کنترل. (B) گروه سلول‌های تیمار شده با ۲۵۰ نانومولار بیسفنول A. (در رنگ آمیزی سلول‌ها با رنگ پروپیدیوم آیوید هسته‌های صورتی رنگ، سلول‌های مرده را نشان می‌دهد).

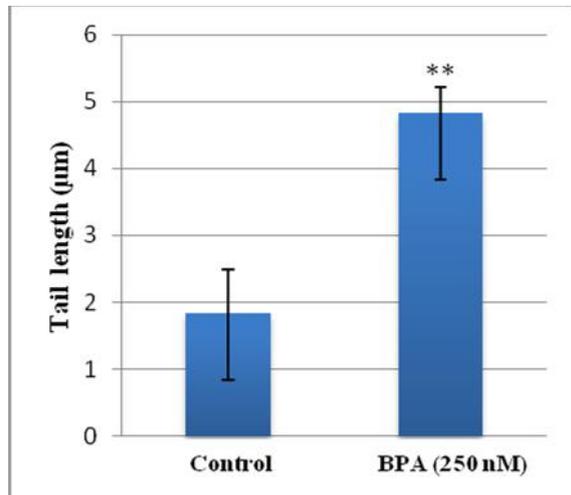
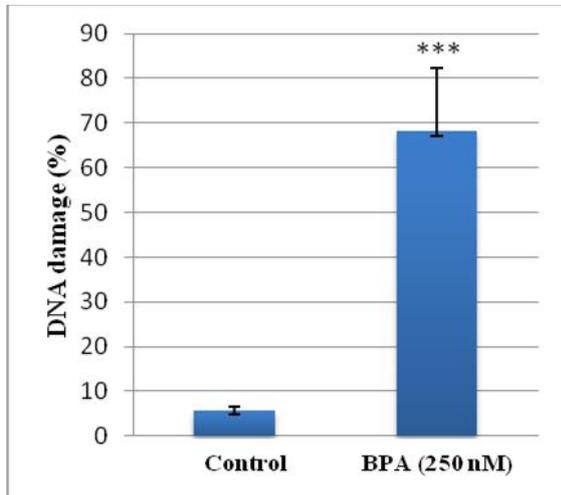
آزمون کامت

درحالی‌که در گروه تیمار با بیسفنول A، DNA شکسته شده تحت تاثیر میدان الکتریکی به صورت دنباله یا کامت به همراه باقی مانده هسته‌ها دیده شد و این خود نشانه تخریب DNA و مرگ سلولی، به دنبال تیمار سلول‌ها با ۲۵۰ نانومولار بیسفنول A بود (شکل ۲). همچنین طبق بررسی‌های صورت گرفته و مطالعات

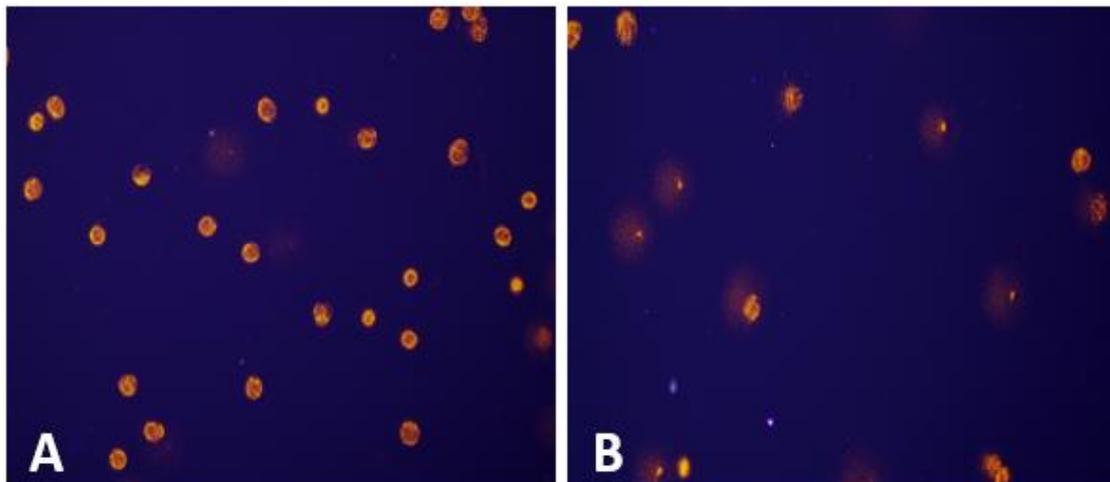
در بررسی اثر بیسفنول A بر سلامت هسته سلول‌های بنیادی مزانشیم توسط تکنیک کامت، مشخص شد که در گروه کنترل، هسته سلول‌ها به صورت یکنواخت با اتیدیوم برماید رنگ‌آمیزی شده و بدون هاله بود که بیانگر سلامت DNA می‌باشد.

میدان الکتریکی در سلول‌های بنیادی مزانشیم تیمار شده با بیسفنول A، در مقایسه با گروه کنترل بود (نمودار ۱).

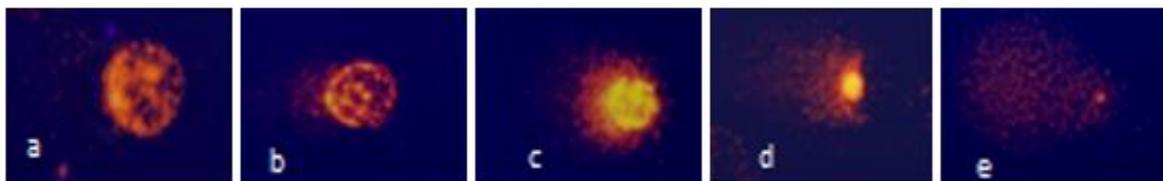
کمی نتایج حاصل از آزمون کامت، درجات مختلفی از طول دنباله‌ی کامت در تصاویر مشاهده شد و بر این اساس داده‌ها به پنج درجه متفاوت تقسیم شد (شکل ۳). به‌طور کلی داده‌های حاصل، حاکی از افزایش معنی دار میزان آسیب DNA و همچنین افزایش میزان حرکت قطعات شکسته شده DNA در



نمودار ۱: مقایسه اثر بیسفنول A 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 بیسفنول A (۲۵۰ نانومولار)، (T-Test)، $p < 0.01$ ** و $p < 0.001$ ***.



شکل ۲: تست کامت در سلول‌های بنیادی مزانشیم تمایز یافته به استئوبلاست، ۲۱ روز پس از تیمار با بیسفنول A (بزرگنمایی $200\times$). A: گروه کنترل، B: گروه سلول‌های تیمار شده با بیسفنول A (۲۵۰ نانومولار).

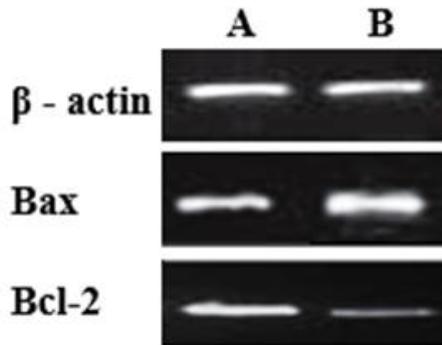


شکل ۳: درجه بندی سلول‌ها بر اساس طول و اندازه کامت A درجه صفر (بدون کامت)، B درجه یک، C درجه دو، D درجه سه، E درجه چهار.

آنالیز کیفی سطح بیان ژن‌های Bax و Bcl-2

به ترتیب افزایش و کاهش قابل توجهی را در میزان بیان ژن‌های مذکور، نشان داد (شکل ۴).

بررسی میزان سطح بیان ژن آپوپتوتیک Bax و ژن آنتی‌آپوپتوتیک Bcl-2 توسط آنالیز RT-PCR در گروه سلول‌های تیمار شده با بیسفنول A نسبت به گروه کنترل،



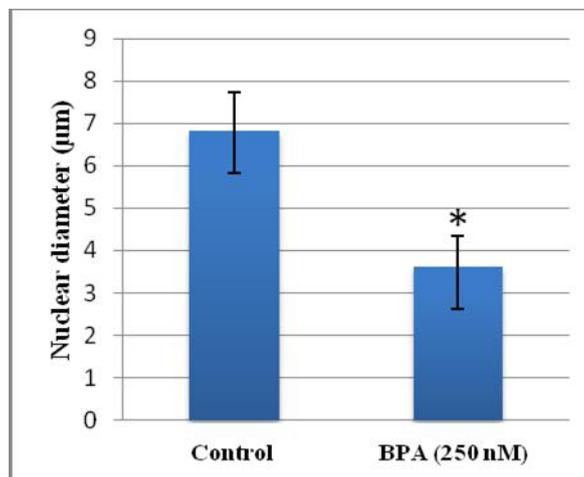
شکل ۴: آنالیز کیفی سطح بیان ژن‌های Bax و Bcl-2 در سلول‌های بنیادی مزانشیم مغز استخوان رت، ۲۱ روز پس از تیمار با بیسفنول A (A) گروه کنترل. (B) گروه سلول‌های تیمار شده با بیسفنول A (۲۵۰ نانومولار). ژن *actin* - به عنوان کنترل داخلی در نظر گرفته شده است.

بررسی تغییرات مورفولوژیک سلول‌ها

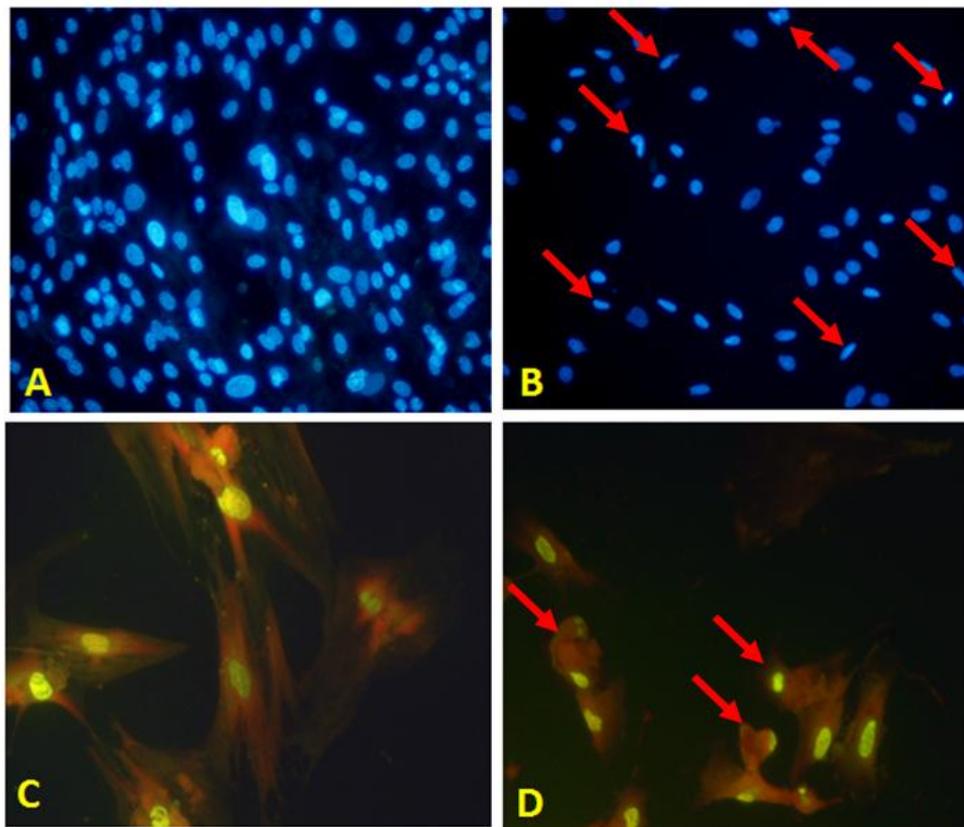
قطر هسته سلول‌های بنیادی مزانشیم تیمار شده با بیسفنول A نسبت به گروه کنترل، کاهش معنی‌داری ($p < 0.05$) را نشان داد (شکل ۵، A و B و نمودار ۲).

رنگ آمیزی سیتوپلاسم سلول‌ها با رنگ آکریدین اورنژ، سیتوپلاسم چندوجهی با زوائد قابل تشخیص را در

سلول‌های گروه کنترل نشان داد و این در حالی بود که سیتوپلاسم سلول‌ها در گروه تیمار شده با بیسفنول A، در مقایسه با گروه کنترل، در برخی قسمت‌ها منقبض و در برخی قسمت‌ها از حالت چندوجهی خارج شده بود. هسته نیز در برخی بخش‌ها از موقعیت مرکزی خود خارج و به حاشیه سیتوپلاسمی سلول کشیده شده بود (شکل ۵، C و D).



نمودار ۲: مقایسه اثر بیسفنول A بر میانگین قطر هسته‌ها در سلول‌های بنیادی مزانشیم مغز استخوان رت با گروه کنترل، ۲۱ روز پس از تیمار با بیسفنول A (۲۵۰ نانومولار)، ($p < 0.05$ *، T-Test).



شکل ۵: رنگ آمیزی هوخست (A و B) و آکریدین اورنژ (C و D) (بزرگنمایی ۴۰۰x) در سلول‌های بنیادی مزانشیم تمایز یافته به استئوبلاست، ۲۱ روز پس از تیمار با بیسفنول A در محیط استئوتیک. (A, C) گروه کنترل. (B, D) سلول‌های تیمار شده با ۲۵۰ نانومولار بیسفنول A (پیکان‌ها در شکل B، فشرده‌گی کروماتین را در هسته سلول‌های تیمار شده و در شکل D، چروکیدگی و انقباض سیتوپلاسم و کوچک شدن یا گرد شدن سلول‌ها به همراه خارج شدن هسته از موقعیت مرکزی خود را نشان می‌دهد).

بحث

بیسفنول A، یک الیل فنول است که در ساختمان خود دارای دو حلقه فنلی اشباع نشده می‌باشد و همین حلقه‌های فنلی هم، در بروز سمیت و اثرات آپوپتوتیک این ترکیب صنعتی نقش دارند (۱۹). بیسفنول A، پتانسیل کافی برای ایجاد آسیب‌های ژنتیکی را در سلول‌های بنیادی مزانشیم تمایز یافته و القای اثرات ژنوتوکسیک را در سلول‌ها دارد.

این آلاینده صنعتی باعث افزایش بیان ژن کاسپاز ۱۲، انتشار LDH، القای استرس رتیلولوم اندوپلاسمیک (ER stress) و تولید گونه اکسیژن واکنش گر (ROS) درون سلولی به واسطه‌ی مهار آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانتی می‌شود (۲۰ و ۲۱). استرس اکسیداتیو القا شده توسط بیسفنول A، باعث بروز پراکسیداسیون لیپیدی و آسیب غشای سلولی و در نتیجه افزایش آسیب DNA و کاهش قابلیت حیات در سلول‌ها می‌گردد. طبق تحقیقات صورت گرفته در سال ۲۰۱۲ (۱۸)، مشاهده شد که بیسفنول A، موجب افزایش سطح 8-OHdG که یک مارکر آسیب اکسیداتیوی DNA است، در سلول‌های تیمار شده می‌شود و

در مطالعه حاضر بیسفنول A، در رفتاری وابسته به دوز، باعث کاهش قابلیت حیات و افزایش میزان آسیب و شکستگی DNA، در سلول‌های بنیادی مزانشیم مغز استخوان رت بالغ شد، این یافته در راستای نتایج حاصل از مطالعه Hwang و همکاران (۱۶) بر روی سلول‌های رده MC3T3-E1 موش در سال ۲۰۱۳ می‌باشد.

Bredhult (۱۷) و همچنین Tiwaria و همکاران (۱۸) نیز به ترتیب در سال‌های ۲۰۰۹ و ۲۰۱۲، اثر بیسفنول A را بر سلول‌های اندوتلیال اندومتريوم انسان (HEECs) و سلول‌های رده MCF 7 مورد بررسی قرار دادند و مشاهده کردند که بیسفنول A در رفتاری وابسته به دوز و زمان، باعث کاهش قدرت تکثیر و قابلیت حیات، افزایش سطح استرس اکسیداتیو و پراکسیداسیون لیپیدی و همچنین آسیب DNA در سلول‌ها می‌شود.

نتیجه گیری

بیسفنول A، به عنوان یک آلاینده زیست محیطی و همچنین یک مخرب اندوکرینی (EDC)، قادر است از راه‌های مختلف موجب فعال سازی مسیرهای آپوپتوتیک شود و قدرت تکثیر و قابلیت حیات سلول‌های بنیادی مزانشیم مغز استخوان را کاهش دهد. بنابراین براساس نتایج حاصل از این مطالعه، پیشنهاد می‌شود که در زمینه ارتباط بین بیماری‌های استخوانی مثل استئوپروزیس و سطوح سرمی بیسفنول A تحقیقات بیشتری در جوامع انسانی صورت گیرد.

تشکر و قدردانی

با تشکر از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه اراک که با پشتیبانی مالی انجام این پروژه تحقیقاتی را امکانپذیر نمودند.

منابع

1. Flint S, Markle T, Thompson S, Wallace E. Bisphenol A exposure, effects, and policy: A wildlife perspective. *Journal of Environmental Management*. 2012; 104: 19-34.
2. Wang SW, Kim JM, Hwang KG. Effect of gestational exposure to Bisphenol A on neuronal stem cell differentiation in the neonatal rat hippocampus. *Piscataway, NJ, USA*. 2011; 18(3): 218-230.
3. Cabado AG, Aldea S, Porro C, Ojea G, et al. Migration of BADGE (bisphenol A diglycidyl-ether) and BFDGE (bisphenol F diglycidyl-ether) in canned seafood. *Food Chem Toxicol*. 2008; 46(5): 1674-1680.
4. Cao XL, Dufresne G, Clement G, Belisle S, et al. Levels of bisphenol A diglycidyl ether (BADGE) and bisphenol F diglycidyl ether (BFDGE) in canned liquid infant formula products in Canada and dietary intake estimates. *J AOAC Int*. 2009; 92(6): 1780-1789.
5. Kuo HW, Ding WH. Trace determination of bisphenol A and phytoestrogens in infant formula powders by gas chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr*. 2004; 1027(1-2): 67-74.
6. Munguia-Lopez EM, Gerardo-Lugo S, Peralta E, Bolumen S, et al. Migration of bisphenol A (BPA) from can coatings into a fatty-food stimulant and tuna fish. *Food Addit. Contam*. 2005; 22(9): 892-898.
7. Thomson BM, Grounds PR. Bisphenol A in canned foods in New Zealand: an exposure

سطح گلوکوتایون ردکتاز (GSH) را نیز کاهش می‌دهد و بدین طریق باعث افزایش آسیب و قطعه قطعه شدن DNA می‌شود. GSH یک آنتی‌اکسیدانت قوی است که به عنوان کوفاکتور برای آنزیم‌ها در جهت کاهش استرس اکسیداتیو عمل می‌کند (۱۸ و ۲۲).

البته افزایش میزان تولید ROS نیز می‌تواند علت افزایش آسیب DNA و کاهش قابلیت حیات ناشی از بیسفنول A باشد (۲۳).

بیسفنول A همچنین باعث تغییر در الگوی بیان برخی ژن‌ها، به خصوص افزایش سطح بیان ژن آپوپتوتیک Bax و کاهش سطح بیان ژن آنتی‌آپوپتوتیک Bcl-2 می‌شود. افزایش بیان ژن Bax، آبشار ژنی و سیگنال‌های آپوپتوتیک را فعال می‌کند (۹) که در نهایت به میتوکندری منتقل شده و باعث افزایش فعالیت کاسپازهای ۳ و ۸ و ۹ می‌شوند. تغییر در میزان بیان و فعالیت کاسپازها که نقش موثری در پیشبرد روند آپوپتوزیس دارند (۲۴)، می‌تواند مکانیسم احتمالی دیگری در آپوپتوزیس القا شده در سلول‌های بنیادی مزانشیم تیمار شده با بیسفنول A باشد.

در مطالعه‌ی ما تغییرات مورفولوژیکی نیز، یکی دیگر از تغییرات مشاهده شده در اثر تیمار با بیسفنول A در سلول‌های بنیادی مزانشیم مغز استخوان بود. این تغییرات شامل چروکیدگی و انقباض سیتوپلاسم و در بعضی بخش‌ها برآمدگی غشا و خارج شدن سلول از حالت چندوجهی خود بود. البته طبق مطالعات کمی صورت گرفته، فشردگی و کاهش قطر هسته‌ها نیز در سلول‌های تیمار شده با بیسفنول A مشاهده شد. تمام تغییرات مورفولوژیکی ذکر شده منطبق با تغییراتی است که در مرگ سلولی از نوع آپوپتوزیس رخ می‌دهد (۲۵ و ۲۶). پلیمریزاسیون و دپلیمریزاسیون پروتئین اکتین، مکانیسم اصلی در کنترل شکل سلول است و از آن‌جا که در طی مرگ سلولی انقباض به واسطه میوزین در حلقه‌های غشایی اکتین به‌طور هم‌زمان با تخریب پروتئولیتیک پروتئین‌های سایتواسکتال تحت تاثیر تیمار سلول‌ها توسط بیسفنول A، اتفاق می‌افتد، و این پروتئین‌ها هم در ارتباط مستقیم با اکتین هستند، بنابراین تغییرات مورفولوژیکی مشاهده شده در سلول‌ها ظاهر می‌شود (۲۷).

بنابراین نتایج ما پیشنهاد می‌کند که بیسفنول A باعث سرکوب بقای سلولی، کاهش قابلیت حیات و قدرت تکثیر سلول‌ها می‌شود و همچنین مرگ سلولی از نوع آپوپتوزیس را در سلول‌های بنیادی مزانشیم مغز استخوان رت بالغ القا می‌کند.

- Indian Journal of Medical Research. 2011; 67(4): 157-167.
15. Abnosi MH, Soleimani Mehranjani M, Shariatzadeh MA, Dehdehi L. Para-Nonylphenol Impairs Osteogenic Differentiation of Rat Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells by Influencing the Osteoblasts Mineralization. Iranian Journal of Basic Medical Sciences. 2012; 15(5): 1131-1139.
 16. Hwang JK, Min KH, Choi KH, Hwang YC, et al. Bisphenol A reduces differentiation and stimulates apoptosis of osteoclasts and osteoblasts. Life Sciences. 2013; 17; 93(9-11): 367-372.
 17. Bredhulta C, Sahlin L, Olovsson M. Gene expression analysis of human endometrial endothelial cells exposed to Bisphenol A. Reproductive Toxicology. 2009; 28(1): 18-25.
 18. Tiwaria D, Kamble J, Chilgunde S, Patil P, et al. Clastogenic and mutagenic effects of bisphenol A: An endocrine disruptor. Mutation Research. 2012; 743(1-2): 83-90.
 19. Wang SW, Kim JM, Hwang KG. Effect of gestational exposure to Bisphenol A on neuronal stem cell differentiation in the neonatal rat hippocampus. Piscataway, NJ, USA. 2001; 18(3): 218-230.
 20. Bindhumol V, Chitra KC, Mathur PP. Bisphenol A induces reactive oxygen species generation in the liver of male rats. Toxicology. 2003; 188(2-3): 117-124.
 21. Chitra KC, Latchoumycandane C, Mathur PP. Induction of oxidative stress by bisphenol A in the epididymal sperm of rats, Toxicology. 2003; 185(1-2): 119-127.
 22. Bast A, Haenen GR, Doelman CJ. Oxidants, antioxidants; state of arts, Am J. Med. 1991; 91: 25-135.
 23. Asahi J, Kamo H, Baba R, Doi Y, et al. Bisphenol A induces endoplasmic reticulum stress-associated apoptosis in mouse non-parenchymal hepatocytes. Life Sciences. 2010; 87: 431-438.
 24. Terasaka H, Kadoma Y, Sakagami H, Fujisawa S. Cytotoxicity and Apoptosis-inducing Activity of Bisphenol A and Hydroquinone in HL-60 Cells. Anticancer Research. 2005; 25: 2241-2248.
 25. Clarke PG. Developmental cell death: morphological diversity and multiple mechanisms. Anat Embryol (Berl). 1990; 181(3): 195-213.
 26. Wyllie AH, Kerr JF, Currie AR. Cell death: the significance of apoptosis. Int Rev Cytol. 1990; 68: 251-306.
 - assessment. Food Addit. Contam. 2005; 22(1): 65-72.
 8. Wolfgang D, Wolfgang V. Human exposure to bisphenol A by biomonitoring: methods, results and assessment of environmental exposures. Toxicol. Appl. Pharmacol. 2008; 228: 114-134.
 9. Oka T, Adati N, Shinkai T, Sakuma K, et al. Bisphenol A induces apoptosis in central neural cells during early development of *Xenopus laevis*. Biochemical and Biophysical Research Communications. 2003; 312(4): 877-882.
 10. Noguchi S, Nakatsuka M, Asagiri K, Habara T, et al. Bisphenol A stimulates NO synthesis through a non-genomic estrogen receptor-mediated mechanism in mouse endothelial cells. Toxicology Letters. 2002; 135: 95-101.
 11. Bosch P, Pratt S, Stice S. Isolation, characterization, gene modification, and nuclear reprogramming of porcine mesenchymal stem cells. Biol Reprod. 2006; 74(1): 46-57.
 12. Minguell J, Erices A, Conget P. Mesenchymal stem cells. Exp Biol Med (Maywood). 2001; 226(6): 507-20.
 13. Yang L, Luo L, Ji W, Gong C, et al. Effect of low dose bisphenol A on the early differentiation of human embryonic stem cells into mammary epithelial cells. Toxicol Lett. 2013; 218(3): 187-93.
 14. Soleimani Mehranjani M, Mosavi M. Cadmium chloride toxicity suppresses osteogenic potential of rat bone marrow mesenchymal stem cells through reducing cell viability and matrix mineralization.
 27. Iida H, Maehara K, Doiguchi M, Mori T, et al. Bisphenol A-induced apoptosis of cultured rat Sertoli cells. Reprod Toxicol. 2003; 17(4): 457-464.

Study of the Effect of Bisphenol A on Viability, Morphological Changes and Induction of Apoptosis in Adult Rat Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells

Soleimani Mehranjani M, Ph.D.^{1*}, Mahdiyeh M, Ph.D.¹, Azimi AS, M.Sc.², Lotfi, M.Sc.²

1. Department of Biology, Faculty of Science, Arak University, Arak 38156-8-8349
2. M.Sc. of Development Biology, Department of Biology, Faculty of Science, Arak University, Arak

* Email corresponding author: m-soleimani@araku.ac.ir

Received: 8 Mar. 2015

Accepted: 23 Jun. 2015

Abstract

Aim: This study aimed to investigate the effect of Bisphenol A on the cell viability, morphologic changes and induction of apoptosis in bone marrow mesenchymal stem cells of an adult rat.

Material and Methods: The bone marrow mesenchymal stem cells were extracted using flashing-out method. At the end of the third passage, cells were divided into 11 groups of control and experimental. Experimental cells were treated with the different doses of Bisphenol A (1, 5, 10, 50, 100, 250, 500, 1000, 2000 and 4000 nM) for four periods of 5, 10, 15 and 21 days in the osteogenic media containing 10% of fetal bovine serum. The cell viability, DNA damage, expression of genes and the morphologic changes of the cells were then investigated during the procedure of osteogenesis. The study data was analyzed using one-way ANOVA and T-Test setting the significant P value at $P < 0.05$.

Results: Within Bisphenol A treated cells, the mean viability, the mean of nuclei diameter and the expression of anti-apoptotic Bcl-2 gene of the mesenchymal stem cells treated with Bisphenol A significantly decreased ($P < 0.05$), compared to the control group. In addition the DNA damage and the expression of apoptotic Bax gene of the cells treated with Bisphenol A significantly increased, compared to the control group ($P < 0.05$).

Conclusion: Our data suggest that BPA decreases cell viability and induces apoptosis in mesenchymal stem cells, in a dose dependant manner.

Keywords: Bisphenol A, Bone marrow mesenchymal stem cell, Apoptosis, Viability, morphologic changes