

## بررسی اثر بیسفنول A بر تمایز استئوژنیک در سلول‌های بنیادی مزانشیم مغز استخوان رت بالغ: یک مطالعه‌ی آزمایشگاهی

آتنا سادات عظیمی Ph.D.، ملک سلیمانی مهرنجانی Ph.D.\*، مجید مهدیه Ph.D.

-دانشگاه اراک، دانشکده علوم پایه، گروه زیست شناسی، اراک، ایران

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

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۰۶/۱۳

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۴/۱۹

### چکیده

**هدف:** هدف از این مطالعه، بررسی اثر بیسفنول A بر تمایز استئوژنیک در سلول‌های بنیادی مزانشیم مغز استخوان مستخرج از رت بالغ بود.

**مواد و روش‌ها:** سلول‌های بنیادی مزانشیم مغز استخوان رت، با استفاده از روش فلشینگ استخراج شدند. در انتهای پاساژ سوم، سلول‌ها به گروه‌های کنترل و تیمار شده با غلظت‌های مختلف بیسفنول A (۱، ۵، ۱۰، ۵۰، ۱۰۰، ۲۵۰، ۵۰۰، ۱۰۰۰، ۲۰۰۰ و ۴۰۰۰ نانومولار) برای مدت ۲۱ روز، در محیط استئوژنیک حاوی ۱۰ درصد سرم جنین گاوی، تقسیم شدند. سپس نسبت معدنی شدن ماتریکس استخوانی، میزان کلسیم خارج سلولی، سطح بیان پروتئین‌های استئوپونتین و استئوکلسین، طی روند تمایز استئوژنیک مورد بررسی قرار گرفت. داده‌ها با روش آماری آنالیز واریانس یک‌طرفه مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت و تفاوت میانگین‌ها در سطح  $p < 0.05$  معنی‌دار در نظر گرفته شد.

**نتایج:** کاهش معنی‌دار در میزان معدنی شدن ماتریکس استخوانی، سطح کلسیم، سطح بیان و سنتز استئوکلسین و استئوپونتین در گروه سلول‌های تیمار شده با بیسفنول A در مقایسه با گروه کنترل، در یک رفتار وابسته به غلظت مشاهده شد ( $p < 0.05$ ).

**نتیجه‌گیری:** این نتایج نشان داد که بیسفنول A، به‌عنوان یک آلاینده زیست محیطی، یک کاهش معنی‌دار در تمایز استئوژنیک در سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان رت ایجاد کرد؛ بنابراین، بیسفنول A می‌تواند به‌عنوان یک عامل کاهش‌دهنده در تمایز سلولی در نظر گرفته شود.

**واژگان کلیدی:** بیسفنول A، سلول‌های بنیادی مزانشیم، تمایز استئوژنیک، ایمنوسیتوشیمی

## مقدمه

سلول‌های بنیادی مزانشیم مغز استخوان سلول‌های پرتوانی است که به راحتی استخراج، تخلیص و تکثیر شده و توانایی تمایز به انواعی از سلول‌ها نظیر سلول‌های استخوانی، غضروفی و چربی را دارا می‌باشند و می‌توان از آن‌ها در پیوندهای اتولوگ استفاده کرد. این سلول‌ها علاوه بر مغز استخوان در بافت‌هایی نظیر بافت چربی، پرده سینوویال و عضله اسکلتی نیز یافت می‌شوند (۱-۲). از آنجایی که سلول‌های بنیادی مزانشیم مغز استخوان در تماس مستقیم با خون محیطی بوده و همچنین به علت داشتن پتانسیل بالای تمایزی و توان تکثیر برای مدت طولانی، این رده از سلول‌های بنیادی، می‌تواند یک انتخاب مناسب برای بررسی اثر مواد سمی و آلاینده‌ها بر روی خواص بنیادین، میزان تکثیر و تمایز سلولی محسوب شود (۳).

از سوی دیگر امروزه در جوامع صنعتی، انسان و دیگر موجودات زنده به‌طور مستقیم و غیرمستقیم در معرض آلاینده‌های زیست محیطی بسیاری قرار دارند. یکی از مهم‌ترین این آلاینده‌های محیطی، بیسفنول A می‌باشد که ورود آن به چرخه‌های غذایی طی ۳۰ سال اخیر به‌طور فزاینده‌ای افزایش یافته است (۴).

بیسفنول A یا ۲-۲، بیس‌هیدروکسی‌فنل‌پروپان، مهم‌ترین الیل‌فنلی است که امروزه در صنایع بسته‌بندی غذایی کاربرد دارد (۵). این آلاینده صنعتی به‌عنوان یک زنواستروژن محیطی شناخته می‌شود و به دلیل داشتن اثرات استروژنیک روی سیستم تولیدمثل، جزء مخرب‌های اندوکربینی نیز طبقه‌بندی می‌شد (۶). 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، بطری آب معدنی، شیشه تغذیه اطفال، پلاستیک‌های (polyvinyl chloride) PVC، پلی‌کربنات‌ها و غیره استفاده می‌شود (۷-۸) و می‌تواند از

طریق آب، هوا و غذا وارد زنجیره غذایی انسان شد (۱۲-۹).

طبق مطالعات صورت گرفته توسط Yang و همکارانش، اثرسیتوتوکسیسیته بیسفنول A بر تمایز سلول‌های بنیادی جنینی انسان به سلول‌های اپی‌تلیال بررسی شده (۱۳) ولی با وجود اهمیت سلول‌های بنیادی مزانشیم مغز استخوان به‌عنوان یک ذخیره با ارزش در جایگزینی سلول‌های استخوانی به‌هنگام صدمات بافتی، تاکنون اثر این آلاینده زیست محیطی بر تمایز این سلول‌ها به استئوبلاست گزارش نشده است.

بنابراین با توجه به کاربرد گسترده بیسفنول A در محیط زیست و ورود آن به زنجیره غذایی طی ۳۰ سال اخیر و تهدید سلامت انسان، این مطالعه با هدف بررسی اثر سمیت بیسفنول A بر میزان تمایز استئوژنیک در سلول‌های بنیادی مزانشیم مغز استخوان رت بالغ به‌عنوان یک مدل آزمایشگاهی طراحی شد.

## مواد و روش‌ها

**جداسازی و کشت سلول‌های مغز استخوان:** در این مطالعه تجربی از رت‌های نژاد Wistar با سن ۵۰ روز و وزن  $140 \pm 20$  گرم استفاده شد. حیوانات مورد استفاده در این پژوهش پس از خریداری از انستیتو پاستور ایران در خانه حیوانات دانشگاه اراک در شرایط استاندارد دمایی  $27 \pm 3$  درجه سانتی‌گراد و با دسترسی آزاد به غذا و آب در قفس‌های پلی‌اتیلین نگهداری شد. در این پژوهش کلیه اصول اخلاقی کار با حیوانات آزمایشگاهی رعایت شده است. رت‌ها به کمک دی‌اتیلن‌تر بی‌هوش شده، استخوان‌های ران و ساق پای آن‌ها جدا و سپس بافت‌های پیوندی اطراف استخوان‌ها به‌طور کامل پاک شد. استخوان‌ها در محیط کشت DMEM (Dulbecco's Modified Eagles Medium, Gibco, Germany) حاوی ۱۵ درصد سرم FBS (Germany) و Bovine Serum (Gibco, Germany) و

St. Louis, MO, USA) رنگ آمیزی شد. سلول‌ها با آب مقطر شستشو و سپس اسیداستیک ۱۰ درصد به سلول‌ها افزوده و بدین ترتیب رنگ قرمز آلیزارین رد از ماتریکس استخوانی استخراج شد و با استفاده از میکروسکوپ نوری عکس برداری نمونه‌ها انجام شد. در پایان جذب محلول‌های قرمز رنگ حاصل در طول موج ۴۰۵ نانومتر با دستگاه اسپکتروفوتومتر (PGplus-Germany) ثبت شد (۱۴).

**انتخاب غلظت موثر و بررسی‌های بیشتر:** با توجه به نتایج به دست آمده از تکنیک رنگ آمیزی آلیزارین رد، ۲۵۰ نانومولار بیسفنول A به عنوان غلظت موثر انتخاب شد و مطالعه با دو گروه کنترل و تیمار با بیسفنول A (۲۵۰ نانومولار) ادامه یافت.

#### بررسی میزان رسوب کلسیم خارج سلولی (وان

**کوزا):** رنگ آمیزی و انکوزا با استفاده از نیترات نقره میزان رسوبات کلسیم ماتریکس خارج سلولی را نشان می‌دهد. جهت اندازه‌گیری میزان کلسیم موجود در ماتریکس خارج سلولی، سلول‌های بنیادی مزانشیم تمایز نیافته‌ی پاساژ سوم به تعداد  $1 \times 10^4$  در هر ویال پلیت ۲۴ خانه، با کمک فرمالدئید ۱۰ درصد به مدت ۱۰ دقیقه فیکس شدند و پس از شستشو با PBS، ۵۰۰ میکرولیتر نیترات نقره (Sigma Chemical) ۰/۱ درصد به سلول‌ها اضافه شد و در انتها، بررسی سلول‌ها با میکروسکوپ فلورسانس (Olympus, IX70) انجام شد (۱۵).

#### بررسی سنتز پروتئین‌های استئوکلسین و

**استئوپوننتین به روش ایمونوسیتوشیمی:** ابتدا  $1 \times 10^4$  سلول در هر خانه از پلیت ۱۲ خانه ریخته و به مدت ۲۱ روز سلول‌ها در گروه‌های مذکور، تیمار شد. پس از ۲۱ روز سلول‌ها در پارافرمالدهید فیکس و پس از شستشو با PBS، جهت افزایش نفوذپذیری، سلول‌ها با ۱۰ دقیقه Triton-x100 (T8532, Sigma) ۲۵ درصد انکوبه شد. سپس سلول‌ها با سرم آلبومین گاوی (BSA Bovine Serum Albumin) ۱ درصد در PBST (PBS-Tween ۰/۱ درصد) (Buffered Saline Tween) به مدت ۳۰ دقیقه انکوبه

پنی سیلین-استرپتومایسین (تهیه شده از شرکت Gibco, Germany) در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد قرار گرفته و به زیر هود لامینار منتقل شد. دو سر استخوان با قیچی استریل قطع و مغز استخوان با عمل فلاشینگ خارج و به داخل لوله فالکون حاوی محیط کشت کامل هدایت و سپس به مدت ۵ دقیقه در  $1200 \text{ rpm}$  سانتریفیوژ شد. محیط رویی خارج و رسوب سلولی در یک میلی‌لیتر محیط کشت تازه معلق شد و در فلاسک کشت T25 و در انکوباتور  $\text{CO}_2$  دار (دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و ۵ درصد  $\text{CO}_2$ ) انکوبه شد. پس از ۲۴ ساعت محیط رویی که حاوی سلول‌های غیرچسبنده بود، خارج و شستشوی سلول‌ها با PBS انجام شد. سپس به مدت دو هفته، هر سه روز یکبار محیط کشت سلول‌ها تعویض شد. زمانی که کف فلاسک به تراکم بالایی از سلول رسید، سلول‌ها با کمک Trypsin/EDTA (تهیه شده از شرکت Sigma-Aldrich) از کف فلاسک جدا و به فلاسک‌های جدید منتقل شدند. برای به دست آوردن خلوص بالایی از این سلول‌ها سه مرحله پاساژ تکرار شد.

#### کشت سلول‌ها در غلظت‌های مختلف بیسفنول A و

#### اندازه‌گیری میزان معدنی شدن ماتریکس استخوانی:

سلول‌های پاساژ سوم به تعداد  $5 \times 10^3$  سلول در هر خانه‌ی 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 گاوی، ۱۰ میلی‌مولار بتاگلیسرول فسفات، ۱۰ نانومولار دگزامتازون و ۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر آسکوربیک ۳-فسفات) و غلظت‌های 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 ۲۱ روز، میزان معدنی شدن ماتریکس استخوانی سلول‌ها با روش کمی و کیفی آلیزارین رد ارزیابی شد. برای انجام این روش محیط کشت رویی برداشته و سلول‌ها با فرمالین ۱۰ درصد فیکس شد و سپس با محلول رنگی آلیزارین رد (Sigma)

نسبت بین جذب در طول موج‌های ۲۶۰ و ۲۸۰ ثابت شد. تمامی مراحل در زیر هود لامینار صورت گرفت.

**سنتر c- (reverse transcription reaction)** ابتدا ۲ میکرولیتر از عصاره سلولی حاوی RNA (با غلظت ۰/۵ μg/μl) برداشته شد. به هرکدام از اپندورف‌ها ۱ میکرولیتر پرایمر oligo dT<sub>18</sub> اضافه و حدود ۳-۵ ثانیه نمونه را ورتکس شد. سپس نمونه‌ها به مدت ۵ دقیقه در ۷۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد و پس از آن روی یخ نگه‌داشته شد. در ادامه ۴ میکرولیتر 5x reaction buffer، ۱ میکرولیتر مهارکننده (۲۰ u/μl) RNase Ribo Lock، ۱ میکرولیتر از مخلوط dNTP به‌نمونه‌ها اضافه شد. پس از یک ورتکس کوتاه، ۲ میکرولیتر آنزیم رونویسی معکوس (۲۰ u/μl) M-MuLV به اپندورف‌ها اضافه و به مدت ۵ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داشته شد و جهت متوقف کردن واکنش، نمونه‌ها در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. در پایان نیز اپندورف‌ها در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شد.

**واکنش زنجیره پلی‌مراز (PCR)** واکنش RT-PCR در حجم ۲۵ میکرولیتر و با دمای آنیلینگ برابر با ۵۸ درجه سانتی‌گراد، در ۳۵ سیکل صورت گرفت و از ژن GAPDH (Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase) به‌عنوان کنترل داخلی استفاده شد. توالی پرایمر ژن‌های مورد نظر در جدول ۱ آورده شده است.

شد. در ادامه آنتی بادی اولیه رقیق شده در BSA ۱ درصد و PBST (آنتی‌بادی‌پلی‌کلونال استئوپونتین از شرکت ab8448, ABCAM) با رقت ۱:۲۵۰ و آنتی‌بادی مونوکلونال موشی استئوکلسین (شرکت ab13418, ABCAM) و با رقت ۱:۱۰۰۰ (به مدت ۴ ساعت، روی سلول‌ها قرار داده شد و پس از آن آنتی بادی ثانویه خرگوش (هر دو نوع آنتی‌بادی Alexa ۵۵۵ United Kingdom-Fluor® و با رقت ۱:۵۰۰) در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد روی سلول‌ها ریخته شد. سپس رنگ‌آمیزی هوخست (۱ u/μl - ۱/۰) صورت گرفت (۱۶) و با میکروسکوپ فلورسانس عکس‌برداری انجام شد.

### استخراج RNA و آنالیز RT-PCR

**کشت سلولی و جداسازی RNA** در این مرحله سلول‌ها به تعداد  $5 \times 10^4$  در فلاسک‌های T شکل  $25 \text{Cm}^2$  کشت و به مدت ۲۱ روز با محیط استئوژنیک و غلظت ۲۵۰ نانومولار بیسفنول A کشت و تیمار شدند و سپس با کمک اسکالپر، 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 (Qiagen) RNeasy mini kit و بر طبق دستورالعمل کارخانه سازنده استفاده شد و به‌منظور سنجش میزان RNA استخراج شده از دستگاه اسپکتروفتومتر استفاده شد و پس از صفر کردن دستگاه توسط آب دیونیزه به‌عنوان blank، ۳ میکرولیتر از نمونه با ۹۷ میکرولیتر آب دیونیزه رقیق و پس از وارد کردن ضریب رقت، مقدار RNA استخراج شده و همچنین

جدول ۱: توالی پرایمرهای استفاده شده در این مطالعه

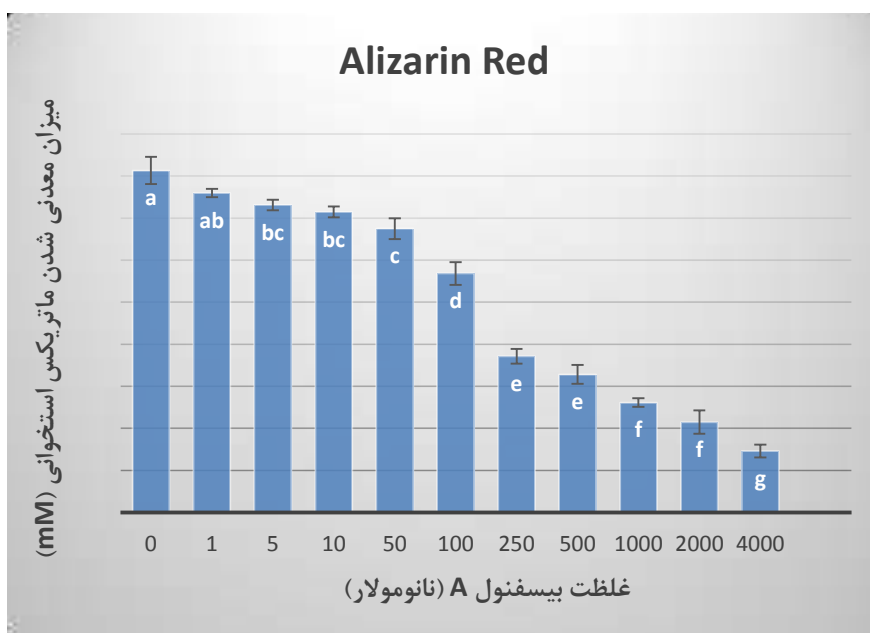
Gene	Primer sequences (5'-3')		Product size (bp)
GAPDH	Forward	TGATTCTACCCACGGCAAGTT	162 bp
	Reverse	TGATGGGTTTCCCATTGATGA	
Osteocalcin	Forward	CGCCTGGGTCTCTTCACTAC	143 bp
	Reverse	CTCACACTCCTCGCCCTATT	
Osteopontin	Forward	TTGCAGCCTTCTCAGCCAA	74 bp
	Reverse	GGAGGCAAAAGCAAATCACTG	

## 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  $p < 0.05$  معنی دار در نظر گرفته شد.

## نتایج

بررسی میزان معدنی شدن ماتریکس استخوانی سلول‌ها و انتخاب غلظت موثر از مقایسه روند میزان معدنی شدن ماتریکس استخوانی در سلول‌های بنیادی مزانشیم مغز استخوان تیمار شده با غلظت‌های مختلف بیسفنول A، پس از ۲۱ روز، در شرایط وابسته به غلظت، نسبت به گروه کنترل، کاهش معنی‌داری مشاهده شد ( $p < 0.05$ ) (نمودار ۱) (شکل ۱، C-D).



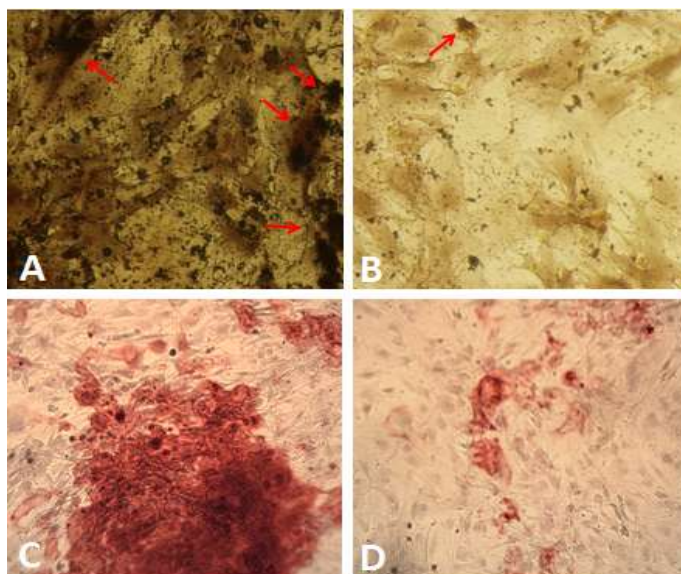
نمودار ۱: میانگین میزان معدنی شدن ماتریکس استخوانی سلول‌های بنیادی مزانشیم مغز استخوان رت پس از تیمار با غلظت‌های مختلف بیسفنول A در روز ۲۱. میانگین‌های با کد حرف‌های مختلف دارای تفاوت معنی‌دار هستند ( $p < 0.05$ , one way ANOVA, Tukey's test).

پس از ۲۱ روز در گروه سلول‌های تیمار شده با ۲۵۰ نانومولار بیسفنول A، کاهش قابل توجه سطح رسوب کلسیم را نسبت به گروه کنترل نشان داد (شکل ۱، A-B). در رنگ‌آمیزی آلیزارین رد، رنگ قرمز نشان‌دهنده معدنی شدن ماتریکس استخوانی در سلول‌های تمایز یافته به استئوبلاست و در رنگ‌آمیزی وان کوزا، ندول‌های قهوه‌ای رنگ، نشان‌دهنده رسوبات فسفات کلسیم حاصل از معدنی شدن ماتریکس خارج سلولی در سلول‌های تمایز یافته می‌باشند).

با توجه به نتایج حاصل از میزان معدنی شدن ماتریکس استخوانی سلول‌ها، غلظت ۲۵۰ نانومولار بیسفنول A طی ۲۱ روز، به‌عنوان غلظت موثر انتخاب شد و مطالعه با دو گروه کنترل و تیمار با بیسفنول A (۲۵۰ نانومولار) ادامه یافت.

### بررسی رسوب کلسیم به روش وان کوزا (Von Kossa)

مقایسه تصاویر حاصل از بررسی میزان رسوب کلسیم ماتریکس خارج سلولی توسط رنگ‌آمیزی Von Kossa

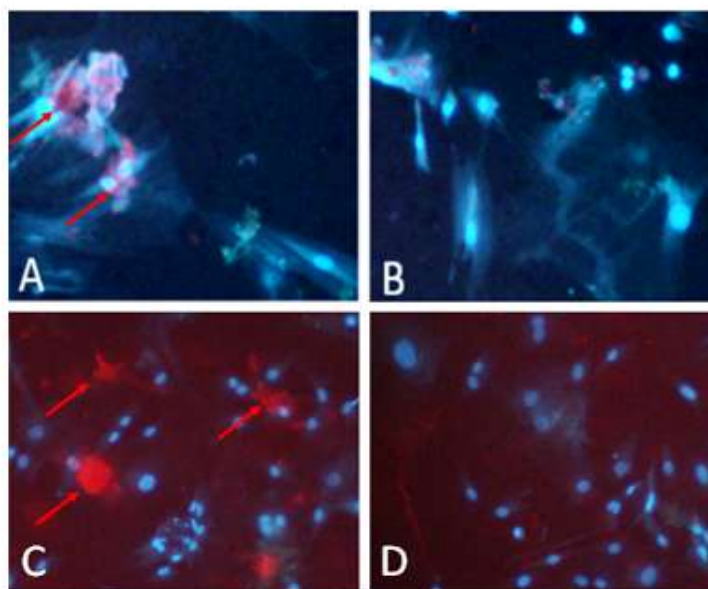


شکل ۱: رنگ آمیزی سلول‌های بنیادی مزانشیم مغز استخوان رت با نیترات نقره (وان کوزا) (B و A) (بزرگنمایی ۲۰۰x) و رنگ آلیزارین رد (C, D) (بزرگنمایی ۱۰x). A, C) گروه سلول‌های کنترل. B, D) سلول‌های تیمار شده با ۲۵۰ نانومولار بیسفنول A.

### ایمنوسیتوشیمی

از مقایسه رنگ آمیزی ایمنوسیتوشیمی، کاهش قابل توجهی در میزان سنتز پروتئین‌های استئوکلسین و

استئوپونتین در گروه سلول‌های تیمار شده با بیسفنول A نسبت به گروه کنترل مشاهده شد (شکل ۲).

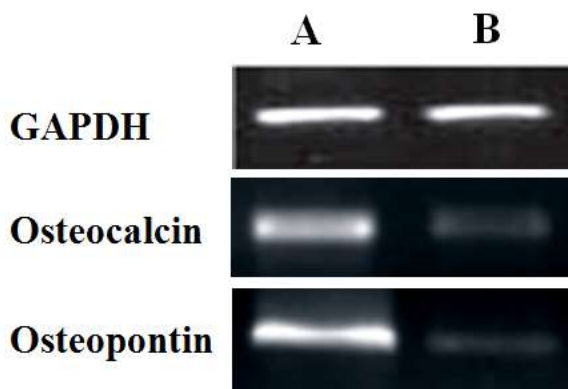


شکل ۲: ایمنوسیتوشیمی، [پروتئین‌های استئوکلسین (A)، گروه کنترل (B)، گروه سلول‌های تیمار شده با ۲۵۰ نانومولار بیسفنول A، به مدت ۲۱ روز، (بزرگنمایی ۴۰۰x)] و [استئوپونتین (C)، گروه کنترل (D)، گروه سلول‌های تیمار شده با بیسفنول A، (بزرگنمایی ۲۰۰x)] چنانچه مشاهده می‌شود از مقایسه میزان سنتز پروتئین‌های مذکور در گروه سلول‌های تیمار شده با بیسفنول A نسبت به گروه کنترل، کاهش قابل توجهی دیده شد.

### آنالیز کیفی سطح بیان ژن‌های استئوکلسین و استئوپونتین

بررسی میزان سطح بیان ژن‌های استئوکلسین و استئوپونتین توسط آنالیز RT-PCR در گروه سلول‌های

تیمار شده با بیسفنول A نسبت به گروه کنترل، کاهش قابل توجهی را نشان داد (شکل ۳).



شکل ۳: آنالیز کیفی سطح بیان ژن‌های استئوکلسین و استئوپونتین در سلول‌های بنیادی مزانشیم مغز استخوان رت، ۲۱ روز پس از تیمار با بیسفنول A با استفاده از تکنیک RT-PCR (A) گروه کنترل (B) گروه سلول‌های تیمار شده با بیسفنول A (۲۵۰ نانومولار)، نشان‌دهنده کاهش قابل توجه سطح بیان ژن‌های مذکور نسبت به گروه کنترل می‌باشد. ژن GAPDH به‌عنوان کنترل داخلی در نظر گرفته شده است.

#### بحث

در مطالعه حاضر بیسفنول A باعث کاهش سطح رسوبات فسفات کلسیمی ماتریکس خارج سلولی و در نتیجه مهار تمایز استئوژنیک در سلول‌های بنیادی مزانشیم مغز استخوان شد. این یافته‌ها در راستای نتایج تحقیقات دیگر محققین نیز می‌باشد.

به‌عنوان مثال Hwang و همکاران در سال ۲۰۱۳ اثر بیسفنول A (۱۲/۵-۰/۵ میکرومولار) را بر سلول‌های ماکروفاژ رده RAW264.7 و سلول‌های رده MC3T3-E1 موش مورد بررسی قرار دادند و مشاهده کردند که بیسفنول A در پروسه‌ی تمایز استئوبلاست و استئوکلاست‌ها باعث کاهش بیان ژن‌های Runx2 و osterix به‌همراه Wnt/ $\beta$ -catenin می‌شود (۱۷).

پروتئین Runx2 یک تنظیم‌کننده ضروری برای فرآیند استئوبلاستوژنیزس و تنظیم توده استخوانی می‌باشد (۱۸). بیسفنول A هم از طریق مهار مسیر سیگنال‌دهی Wnt/ $\beta$ -Catenin باعث مهار بیان ژن‌های Runx2، osterix، آلکالین فسفاتاز (ALP) و رسوب کلسیم می‌شود. فرآیند تمایز استئوژنیک، فرآیندی وابسته به مسیر سیگنالینگ Wnt می‌باشد و  $\beta$ -Catenin هم یک

پروتئین ضروری برای تمایز استئوبلاست و تنظیم توده‌ی استخوانی است. در این مسیر، کمپلکس Wnt باعث ایجاد کمپلکس بتاکاتنین و فاکتور Tcf/Lef در سلول شده و این کمپلکس باعث افزایش سطح کلسیم می‌شود. اما بیسفنول A با تولید رادیکال‌های آزاد و اثر بر فاکتور رونویسی FoxO باعث تخریب کمپلکس بتاکاتنین و فاکتور رونویسی Tcf/Lef می‌شود به‌دنبال آن با آزاد شدن بتاکاتنین، کمپلکس FoxO/ $\beta$  - Catenin تشکیل می‌شود، که تشکیل این کمپلکس، سبب مهار مسیر Wnt شده و در نتیجه باعث مهار بیان ژن Runx2 و تشکیل کلسیم می‌شود (۱۹).

بنابراین بیسفنول A بدین طریق و با مهار مسیر سیگنال‌دهی Wnt، میزان رسوبات فسفات کلسیمی ماتریکس خارج سلولی و در نتیجه تمایز استئوژنیک را در سلول‌های بنیادی مزانشیم مغز استخوان مهار می‌کند.

در این پژوهش سطح بیان ژن‌های استئوکلسین، استئوپونتین و همچنین میزان سنتز پروتئین‌های استئوکلسین و استئوپونتین که در تشکیل و حفظ شبکه استخوانی، افزایش معدنی شدن ماتریکس استخوانی و تمایز استئوژنیک نقش اساسی دارند و برای معدنی شدن بافت استخوان ضروری می‌باشند (۲۰-۲۱)، نیز مورد

The effect of long term treatment of lowest effective dose of para-nonylphenol on viability, morphology and proliferation of rat bone marrow mesenchymal stem cells. *Physiol Pharmacol.* 2011; 15(3): 308-317.

3. Kermani S, Karbalaie K, Madani H, Jahangirnejad AA, et al. Bone marrow mesenchymal stem cells as a suitable model for assessment of environmental pollution. *J Arak Univ Med Sci.* 2008; 11: 117-125.

4. Goetz NV, Wormuth M, Scheringer M, Hungerbühler K. Bisphenol a: how the most relevant exposure sources contribute to total consumer exposure. *Risk Anal.* 2010; 30(3): 473-87.

5. Terasaka H, Kadoma Y, Sakagami H, Fujisawa S. Cytotoxicity and apoptosis-inducing activity of Bisphenol A and hydroquinone in HL-60 cells. *Anticancer Res.* 2005; 25: 2241-2248.

6. Wang SW, Kim JM, Hwang KG. Effect of gestational exposure to Bisphenol A on neuronal stem cell differentiation in the neonatal rat hippocampus. *J Korean Child Neurol Soc.* 2011; 19(3): 218-230.

7. 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.

8. 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.

9. Kuo HW, Ding WH. Trace determination of bisphenol A and phytoestrogens in infant formula powders by gas chromatography-mass spectrometry. *J Chromatogr Sci.* 2004; 1027: 67-74.

بررسی قرار گرفت. از آنجاکه این فاکتورهای پروتئینی، خود به واسطه‌ی پروتئین Runx-2 بیان می‌شوند و طبق مطالعات صورت گرفته بیسفنول A هم از طریق مهار مسیر سیگنال‌دهی باعث کاهش سطح بیان ژن Runx-2 می‌شود (۲۰، ۲۲)، بنابراین بیسفنول A به‌طور غیرمستقیم و با مهار بیان ژن Runx2 و کاهش سطح رسوب کلسیم، باعث کاهش سطح بیان و میزان سنتز پروتئین‌های استئوپونتین و استئوکلسین که از مهم‌ترین شاخص‌های تمایز استئوژنیک هستند نیز می‌شود (۲۳)، (۲۴).

بنابراین نتایج ما پیشنهاد می‌کند که بیسفنول A باعث سرکوب تمایز استئوژنیک در سلول‌های بنیادی مزانشیم مشتق از مغز استخوان رت بالغ می‌شود.

#### نتیجه‌گیری

بیسفنول A، به‌عنوان یک آلاینده زیست محیطی و همچنین یک مخرب اندوکرینی، قادر است موجب مهار استئوبلاستوژنیزو در نتیجه تشکیل استخوان در سلول‌های بنیادی مزانشیم مغز استخوان شود. بنابراین بر اساس نتایج این مطالعه، پیشنهاد می‌شود که در زمینه ارتباط بین بیماری‌های استخوانی از جمله استئوپروزیس و سمیت بیسفنول A مطالعه و تحقیقات بیشتری در جوامع انسانی صورت گیرد.

#### تشکر و قدردانی

با تشکر از حوزه معاونت محترم پژوهش و فناوری دانشگاه اراک که با پشتیبانی، انجام این پروژه تحقیقاتی را امکان‌پذیر نمودند.

#### منابع

1. Eslaminejad MB. Mesenchymal Stem Cell: Isolation and biology. *J Iran Anat Sci.* 2007; 5: 61-73.
2. Abnosi MH, Soleimani Mehranjani M, Shariatzadeh SMA, Mahdijeh M, et al.



10. 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.
11. Thomson BM, Grounds PR. Bisphenol A in canned foods in New Zealand: an exposure assessment. *Food Addit Contam.* 2005; 22(1): 65–72.
12. 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.
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; 26: 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. *Indian J Med Res.* 2011; 67(4): 157-167.
15. Soleimani Mehranjani M, Azimi AS. In vitro study of the effect of vitamin e on viability, morphological changes and induction of osteogenic differentiation in adult rat bone marrow mesenchymal stem cells. *J Shahid Sadoughi Univ Med Sci* 2014; 22(4): 1406-18.
16. Juhasova J, Juhas S, Klim J, Strnadel J, et al. Osteogenic differentiation of miniature pig mesenchymal stem cells in 2d and 3d environment. *Physiol Res.* 2011; 60(3): 559-571.
17. Hwang JK, Min KH, Choi KH, Hwang YC, et al. Bisphenol A reduces differentiation and stimulates apoptosis of osteoclasts and osteoblasts. *Life Sci.* 2013; 93(9-11): 367-372.
18. Westhauser F, Karadjian M, Essers C, Senger AS, et al. Osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells is enhanced in a 45S5- supplemented  $\beta$ -TCP composite scaffold: an in-vitro comparison of Vitoss and Vitoss BA. *PloS One.* 2019; 14(2): e0212799.
19. Gaur T, Lengner CJ, Hovhannisyan H, Bhat RA, et al. Canonical WNT signaling promotes osteogenesis by directly stimulating Runx2 gene expression. *J Biol Chem.* 2005; 30: 280(39): 33132-40.
20. Ahn KH, Jung HK, Jung SE, Yi KW, et al. Microarray Analysis of Gene Expression During Differentiation of Human Mesenchymal Stem Cells Treated with Vitamin E in vitro into Osteoblasts. *Korean J of bone metab.* 2011; 18(1): 23-32.
21. Tsai MT, Lin YS, Chen WC, Ho CH, et al. Runx2 and Osterix gene expression in human bone marrow stromal cells are mediated by far-infrared radiation. *Proc World Cong Eng.* 2011; 3: 1-5.
22. Bae HK, Jung BD, Lee S, Park CK, et al. Correlation of spontaneous adipocyte generation with osteogenic differentiation of porcine skin-derived stem cells. *J Vet Sci.* 2019; 20(1): 16-26.
23. Birmingham E, Niebur GL, McHugh PE, Shaw G, et al. Osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells is regulated by osteocyte and osteoblast cells in a simplified bone niche. *Eur cell Mater.* 2012; 23: 13-27.
24. Gilbert L, He X, Farmer P, Rubin J, et al. Expression of the osteoblast differentiation factor RUNX2 (Cbfa1/AML3/PeBP $\alpha$ ) is inhibited by tumor necrosis factor- $\alpha$ . *Journal of Biological Chemistry.* 2002; 277(4): 2695-2701.

## The Effect of Bisphenol A on Osteogenic Differentiation in Adult Rat Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells: An in vitro Study

Azimi AS, Ph.D., Soleimani Mehranjani M, Ph.D.\*, Mahdiyeh M, Ph.D.

. Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, Arak University, Arak, Iran

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

Received: 10 Jul. 2019

Accepted: 4 Sep. 2019

---

### Abstract

**Aim :** The aim of this study was to investigate the effect of Bisphenol A on osteogenic differentiation in bone marrow mesenchymal stem cells obtained from adult rat.

**Material and Methods:** Rat bone marrow mesenchymal stem cells were extracted using the flashing-out method. At the end of the third passage, cells were divided into groups of control and Bisphenol A treated with different doses of 1, 5, 10, 50, 100, 250, 500, 1000, 2000 and 4000 nM for period of 21 days in the osteogenic media containing 10% of fetal bovine serum. Then rate of Bone matrix mineralization, extracellular calcium deposition, expression of osteopontin and osteocalcin proteins was investigated during the procedure of osteogenesis. Data was analyzed using one-way ANOVA and the means difference was considered significant at  $p < 0.05$ .

**Results:** A significant reduction in mean bone matrix mineralization, calcium deposition, expression and synthesis of osteopontin and osteocalcin was seen in the group of cells treated with Bisphenol A when compared to control group ( $p < 0.05$ ) in a dose and time dependent manner.

**Conclusion:** These results showed that Bisphenol A, as an environmental pollutant, caused a significant reduction in osteogenic differentiation in rat bone marrow mesenchymal stem cells; therefore, Bisphenol A can be considered as a reducing agent in cell differentiation.

**Keywords:** Bisphenol A, mesenchymal stem cells, Osteogenic differentiation, Immunocytochemistry