

مقایسه بیان کمی فاکتور نسخه برداری RUNX2 در تمایز سلول های بنیادی مزانشیمی با محیط تمایزی استئوبلاستی و داروی زولدرونیک اسید

مجید فرش دوستی حق^۱، مهرداد نوروزی نیا^۲، یوسف مرتضوی^۳، مسعود سلیمانی^۴، سعید کاویانی^۴، مریم محمودی نیا میمند^۴

دریافت مقاله: ۹۰/۷/۲۷ ارسال مقاله به نویسنده جهت اصلاح: ۹۰/۱۰/۱۱ دریافت اصلاحیه از نویسنده: ۹۰/۱۲/۶ پذیرش مقاله: ۹۰/۱۲/۲۳

چکیده

زمینه و هدف: RUNX2 اختصاصی ترین فاکتور نسخه برداری در تمایز سلول های بنیادی مزانشیمی به استئوبلاست می باشد. در این تحقیق، میزان بیان کمی این فاکتور در طول تمایز سلول های بنیادی مزانشیمی به استئوبلاست با استفاده از محیط تمایزی استئوبلاستی و داروی زولدرونیک اسید مورد ارزیابی قرار گرفت.

مواد و روش ها: در این مطالعه تجربی، سلول های بنیادی مزانشیمی انسانی تحت تیمار با محیط تمایزی استئوبلاستی و داروی زولدرونیک اسید قرار گرفتند. استخراج RNA در هفته های اول، دوم و سوم تمایز استئوبلاستیک و از سلول های بنیادی مزانشیمی تمایز نیافته صورت گرفت. بیان کمی RUNX2 با روش quantitative Real Time-PCR سنجیده شد.

یافته ها: بیان ژن RUNX2 تحت تأثیر محیط تمایزی در هفته های اول، دوم و سوم تمایز در مقایسه با سلول های بنیادی مزانشیمی تمایز نیافته، به ترتیب $1/76 \pm 0/09$ ، $3/25 \pm 0/30$ و $3/36 \pm 0/23$ برابر بود. مقایسه میزان افزایش بیان ژن RUNX2 در هفته اول تمایز با محیط تمایزی و داروی زولدرونیک اسید اختلاف معنی دار از نظر آماری نشان می دهد ($p < 0/05$). در حالی که میزان بیان RUNX2 در هفته دوم و سوم تمایز با محیط تمایزی و داروی زولدرونیک اسید تقریباً یکسان بود.

نتیجه گیری: بیان ژن RUNX2 در طول تمایز سلول های بنیادی مزانشیمی به استئوبلاست تحت تأثیر محیط تمایزی و داروی زولدرونیک اسید افزایش پیدا می کند. افزایش بیان RUNX2 در هفته اول تیمار با زولدرونیک اسید بیانگر تأثیر تسریع تمایز استئوبلاستی با داروی زولدرونیک اسید می باشد.

واژه های کلیدی: سلول های بنیادی مزانشیمی، محیط تمایزی، زولدرونیک اسید، فاکتور نسخه برداری RUNX2

۱- دکتری گروه آموزشی هماتولوژی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران استادیار مرکز تحقیقات هماتولوژی و انکولوژی، دانشگاه

علوم پزشکی تبریز

۲- استادیار گروه آموزشی هماتولوژی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران دانشکده علوم پزشکی

۳- دانشیار گروه آموزشی هماتولوژی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی زنجان

تلفن: ۰۲۴۱-۴۲۲۹۵۵۳، دورنگار: ۰۲۴۱-۴۲۲۹۵۵۳ پست الکترونیک: youmort@yahoo.com

۴- کارشناس ارشد مرکز تحقیقات سلولی مولکولی و سلول های بنیادی صارم، تهران

مقدمه

تمایز استئوبلاستیک سلول‌های بنیادی مزانشیمی، کلید اصلی و اولیه در تولید و ترمیم بافت‌های استخوانی و درمان بیماری‌های استخوانی است. اولین فاکتور نسخه برداری شناخته شده در رده استئوبلاستی که به عنوان "Master Swith" در تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی به رده استئوبلاستی عمل می‌کند، RUNX2 می‌باشد [۱] که به نام‌های فاکتور اختصاصی استئوبلاست-۲ (Osf-2)، پروتئین اتصالی پولیوماویروس 2αA (PEBP2αA) و یا پروتئین متصل شونده به هسته (Cbfa-1) نیز نامیده می‌شود [۲]. ژن RUNX2 بر روی بازوی کوتاه کروموزوم شماره ۶ (6p21) واقع است و دارای طولی حدود ۲۵۰ کیلو جفت باز است. این ژن حاوی ۸ اگزون بوده و نسخه برداری آن تحت کنترل دو پروموتور جدا بنام‌های P1 و P2 می‌باشد [۳-۴]. نشان داده شده که RUNX2 برای تمایز استئوبلاستی ضروری است. به طوری که موش‌های RUNX2 Knockout، فاقد استئوبلاست و در نتیجه فاقد استخوان هستند اما غضروف در این گونه موش‌ها تشکیل می‌شود [۵]. در انسان، موتاسیون‌های هتروزیگوت در ژن RUNX2 منجر به دیسپلازی کلیدوکرانیال (CCD) Cleido Cranial Dysplasia می‌گردد. این عارضه با هیپوپلازی یا آپلازی ترقوه، کوتاهی قد، دندان‌های اضافی، شکاف آشکار بین استخوان‌های جمجمه در نوزادان و سایر تغییرات در الگو و رشد اسکلت بدن همراه است [۶]. موش هتروزیگوت RUNX2 Knockout نیز دارای ناهنجاری‌های مشابه با CCD می‌باشد [۵]. RUNX2 در استئوبلاست‌های تمایز یافته نیز بیان می‌شود و منجر به بیان ژن‌های درگیر در

سنتز و رسوب ماتریکس استخوانی می‌گردد. این ژن‌ها شامل استئوکلسین، کلاژن تیپ I، استئوپونتین و کلاژن تیپ III می‌باشند. تمام این ژن‌ها یک توالی اختصاصی Enhancer دارند که RUNX2 به آن متصل شده و بدین ترتیب بیان آن‌ها را افزایش می‌دهد [۷-۸]. این یافته‌ها به نقش RUNX2 در استئوبلاست‌های بالغ دلالت می‌کند. RUNX2 نقطه کانونی سیگنال‌های فعالیت استئوبلاستی است. بنابراین، تنظیم فعالیت آن و بررسی تأثیر محرک‌های مختلف بر روی بیان آن حائز اهمیت خواهد بود.

سلول‌های بنیادی مزانشیمی با توانایی تمایز به رده‌های مختلف سلولی همانند رده استئوبلاستی، نقش مهمی در فیزیولوژی و پاتوفیزیولوژی مغز استخوان و اختلالات نئوپلاستیک ایفا می‌کنند [۹]. تمایز استئوبلاستیک سلول‌های بنیادی مزانشیمی در *In vivo* تحت کنترل فاکتورهای مختلف از جمله هورمون‌ها، فاکتورهای رشد، سیتوکین‌ها، مورفوژن‌ها مانند Bone Morphogenetic Proteins (BMP) و پروتئین‌های زمینه‌ای خارج سلولی Extra Cellular Matrix (ECM) می‌باشد. در *in vitro* بیشترین بازخورد القاء تمایز استئوبلاستی با استفاده از گلوکوکورتیکوئیدها حاصل می‌شود. القاء تمایز استئوبلاستی در سلول‌های بنیادی مزانشیمی در *In vitro* عمدتاً با استفاده از دگزامتازون، بتاگلیسرول فسفات، اسید آسکوربیک و ۱۰٪ Fetal Calf Serum (FCS) در محیط‌های عمومی کشت همانند Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) که به عنوان محیط تمایزی استئوبلاستی شناخته می‌شود، صورت می‌گیرد [۱۰]. تحقیقات نشان داده‌اند که فاکتورهای اپیژنتیک هم

شاخص استئوژنیک به مقدار داروی زولدرونیک اسید بستگی دارد به طوری که با کاهش مقدار داروی زولدرونیک اسید، بیان استئوکلسین و استئوپونتین در طول تمایز استئوبلاستیک کاهش پیدا می‌کند [۱۸-۱۹]. بر این اساس شناخت تأثیر زولدرونیک اسید بر روی بیان ژن‌های شاخص استئوبلاستی و مکانیسم اثر آن حائز اهمیت خواهد بود.

در این تحقیق به منظور بررسی تأثیر محرک‌های مختلف در القای تمایز استئوبلاستی همانند محیط تمایزی استئوبلاستی و داروی زولدرونیک اسید بر روی بیان کمی RUNX2، به عنوان مهم‌ترین فاکتور نسخه‌برداری در مسیر تمایز استئوبلاستی و همچنین شناخت مکانیسم القای تمایز استئوبلاستی توسط داروی زولدرونیک اسید، میزان بیان کمی فاکتور نسخه‌برداری RUNX2 در طول تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی با محیط تمایزی استئوبلاستی و داروی زولدرونیک اسید با استفاده از تکنیک quantitative Real Time-PCR مورد ارزیابی قرار گرفت. با توجه به کاربرد داروی زولدرونیک اسید در درمان پوکی استخوان، این تحقیق می‌تواند مکانیسم‌های احتمالی تأثیر داروی زولدرونیک اسید را بر روی سنتز بافت استخوانی به واسطه تأثیر آن بر روی مهم‌ترین فاکتور نسخه‌برداری مسیر استئوبلاستی مشخص نماید.

مواد و روش‌ها

تهیه و کشت سلول‌های بنیادی مزانشیمی انسانی: در این مطالعه تجربی، سلول‌های بنیادی مزانشیمی انسانی استخراج شده از مغز استخوان از مرکز تحقیقات فناوری بن یاخته اخذ شدند. این سلول‌ها در پاساژ اول بودند و ماهیت سلول‌های بنیادی مزانشیمی از نظر مارکرهای

می‌توانند در تمایز استئوبلاستی سلول‌های بنیادی مزانشیمی دخیل باشند [۱۱].

زولدرونیک اسید (Zoledronic Acid) به عنوان یک آمینو بی‌فسفونات نسل سوم، برای پیشگیری از شکستگی‌های اسکلتی در بیماران مختلف مورد استفاده قرار می‌گیرد. اسید زولدرونیک با نام شیمیایی ۱- هیدروکسی-۲- ایمیدازول-۱-یل- فسفونواتیل شناخته می‌شود [۱۲]. مکانیسم اولیه شناخته شده برای عملکرد آن‌ها این بود که بی‌فسفونات‌ها در ماتریکس مینرالیزه شده استخوان تجمع می‌یابند و آن را در مقابل تجزیه توسط استئوکلاست‌ها مقاوم می‌کنند. در سال ۲۰۰۷، FDA مجوز استفاده از این دارو جهت درمان استئوپوروز در زنان یائسه را صادر کرد. تحقیقات نشان داده‌اند که مصرف زولدرونیک اسید در زنان یائسه میزان شکستگی مهره‌ها را به شدت کاهش می‌دهد و دانسیته استخوان‌ها را بهبود می‌بخشد [۱۳]. زولدرونیک اسید پتانسیل و ویژگی‌های فارماکولوژیک بالاتری نسبت به سایر بی‌فسفونات‌ها دارد. زولدرونیک اسید علاوه بر مهار استئوکلاست‌ها، منجر به القاء تمایز استئوبلاستی می‌شود ولی مکانیسم اثر این دارو در القای تمایز استئوبلاستی به خوبی شناخته نشده است. تأثیر ضربانی زولدرونیک اسید به مدت ۳ تا ۶ ساعت در غلظت ۵ میکرومول و سپس کشت به مدت ۲ هفته تحت شرایط استئوژنیک منجر به القای تمایز استئوژنیک در human Mesenchymal Stem Cells (hMSC) می‌شود [۱۴]. تحقیقات اخیر نشان داده‌اند که داروی زولدرونیک اسید، تمایز استئوبلاستی را در مسیر مستقل از تغییرات اپی‌ژنتیک در طول تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی به استئوبلاست القا می‌کند [۱۵-۱۷]. همچنین تحقیقات نشان دادند که بیان ژن‌های

نمونه‌برداری از سلول‌های بنیادی تمایز نیافته و سلول‌های استئوبلاستی تمایز یافته (هفته اول، دوم و سوم) صورت گرفت. تمایز استئوبلاستی در یک پلیت ۶ خانه‌ای نیز همزمان با فلاسک‌ها انجام گرفت تا جهت رنگ‌آمیزی آلیزارین قرمز از آن استفاده گردد.

تیمار سلول‌های بنیادی مزانشیمی با داروی زولدرونیک اسید: داروی زولدرونیک اسید در ویال حاوی ۴ میلی‌گرم پودر زولدرونیک اسید از شرکت دارویی Novartis تهیه گردید. این دارو محلول در آب بوده و قابلیت انحلال در محیط کشت را نیز دارد. برای تیمار ضربانی (Pulse Treatment) از غلظت نهایی ۵ میکرومول در محیط کشت استفاده شد. برای القاء تمایز استئوبلاستی، hMSCs در فلاسک‌های TV۵ کشت داده شدند. بعد از این که سلول‌ها به همشاری ۴۰٪-۳۰٪ رسیدند، تحت تیمار ضربانی با ۵ میکرومولار داروی زولدرونیک اسید به مدت ۳ ساعت قرار گرفتند [۱۴]. سپس محیط کشت تخلیه شده و با (Phosphate PBS Buffered Saline) شستشو داده شد. نهایتاً محیط تمایزی بر روی آن‌ها اضافه گردید و به مدت ۲۱ روز کشت داده شدند. علاوه بر سلول‌های تیمار شده با داروی زولدرونیک اسید، MSCs بدون تیمار به‌عنوان کنترل، کشت داده شدند. نمونه‌برداری از سلول‌های بنیادی مزانشیمی تیمار نشده (روز صفر) و سلول‌های تیمار شده (هفته اول، دوم و سوم) صورت گرفت.

رنگ‌آمیزی آلیزارین قرمز: برای تأیید تمایز استئوبلاستی از رنگ‌آمیزی آلیزارین قرمز استفاده گردید. بدین منظور MSCs در پلیت‌های ۶ خانه‌ای کشت داده شدند. گروهی از سلول‌ها با محیط تمایزی استئوبلاستی و گروهی با زولدرونیک اسید تیمار شدند و گروهی هم به

سطحی ایمنوفوتویی و هم‌چنین قابلیت تمایز این سلول‌ها به سلول‌های رده مزانشیمی شامل استئوبلاست، کندروسیت و آدیپوسیت توسط مرکز تحقیقات فناوری بن یاخته انجام گرفته و تأیید شده بود. سلول‌های بنیادی مزانشیمی پس از دفیز کردن، در فلاسک کشت سلول TV۵ به همراه ۲۰ میلی‌لیتر محیط کشت DMEM-low glucose (Gibco)، ۱۰٪ FBS (Fetal Bovine Serum)، ۱۰۰ واحد بر میلی‌لیتر پنی‌سیلین و ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر استرپتومایسین در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد با دی‌اکسیدکربن ۵٪ کشت داده شدند. سلول‌های بنیادی مزانشیمی از نظر مورفولوژی در زیر میکروسکوپ معکوس به شکل سلول‌های شفاف، منعکس‌کننده نور و دوکی شکل بوده و هر روز نسبت به روز قبلی بر همشاری (Confluency) سلول‌ها افزوده می‌شد. تعویض محیط کشت هر دو روز یک‌بار صورت گرفت. وقتی سلول‌های بنیادی مزانشیمی به همشاری ۷۰٪ رسیدند، سلول‌ها تریپسینه شده و در فلاسک‌های جدید جهت القاء تمایز استئوبلاستی با محیط تمایزی و تیمار با داروی زولدرونیک اسید کشت داده شدند.

القاء تمایز استئوبلاستی در سلول‌های بنیادی مزانشیمی با محیط تمایزی: برای تهیه محیط تمایزی استئوبلاستی از محیط کشت عمومی DMEM، L-گلوتامین و ۱۰٪ FBS استفاده شد که به این محیط کشت، دگزامتازون با غلظت نهایی ۱۰ نانومول، بتا-گلیسرول فسفات با غلظت نهایی ۵ میلی‌مول و آسکوربات-۲-فسفات با غلظت نهایی ۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر اضافه گردید. القاء تمایز استئوبلاستیک در سلول‌های بنیادی مزانشیمی در پاساژ ۳-۲ و با همشاری ۴۰٪-۳۰٪ با افزودن محیط تمایزی صورت گرفت.

مایع جمع شده، افزوده شده و به خوبی توسط پپیت کردن مخلوط شد. مخلوط مورد نظر به ستون RNeasy اضافه شده و به مدت ۱۵ ثانیه سانتریفیوژ گردید. ستون RNeasy با بافر RW1 شستشو شد. سپس شستشو با بافر RPE در دو مرحله ادامه داده شد. نهایتاً، با افزودن RNase-free water به ستون و سانتریفیوژ آن، RNA استخراج شد. قبل از سنتز cDNA، تمامیت (Integrity) RNA با الکتروفورز بر روی ژل آگارز سنجیده شد. مقدار RNA استخراج شده به واسطه 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 ۴ میکرولیتر RNA استخراج شده از سلول‌های بنیادی مزانشیمی و سلول‌های تمایز یافته استئوبلاستی با محیط تمایزی و همچنین سلول‌های بنیادی مزانشیمی تیمار شده با داروی زولدرونیک اسید انجام گرفت. مخلوط واکنش برای سنتز cDNA شامل ۲۰ پیکومول پرایمر راندوم هگزامر، ۴ میکرولیتر بافر ۵X (محتوی ۲۵۰ میلی‌مول Tris-HCl، ۲۵۰ میلی‌مول KCl، ۲۰ میلی‌مول MgCl₂، ۵۰ میلی‌مول DTT)، مخلوط dNTP (۱۰ میلی‌مول)، آنزیم ترانس کریپتاز M-MuLV (Fermentase) که به حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر رسید. برنامه دمایی برای واکنش نسخه‌برداری معکوس ۴۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۶۰ دقیقه بود. غیرفعال‌سازی آنزیم به واسطه حرارت ۷۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه صورت گرفت. cDNA حاصل به طور مستقیم در واکنش quantitative Real Time-PCR مورد استفاده قرار گرفت و یا در فریزر -۲۰ درجه سانتی‌گراد جهت استفاده‌های بعدی ذخیره گردید.

عنوان کنترل بدون تیمار کشت داده شدند. رنگ‌آمیزی آلیزارین قرمز در روز ۲۱ کشت انجام گرفت. برای این منظور محیط کشت تخلیه شده و سلول‌ها با PBS شستشو شدند. سپس سلول‌ها با فرمالدهید ۴۰٪ تثبیت شده و مجدداً با PBS شستشو شدند. نهایتاً رنگ آلیزارین قرمز ۱٪ اضافه شده و به مدت ۳۰ دقیقه انکوبه شدند. سپس با آب مقطر شستشو شده و در زیر میکروسکوپ از نظر وجود رسوب‌های قرمز رنگ کلسیم مورد ارزیابی قرار گرفتند.

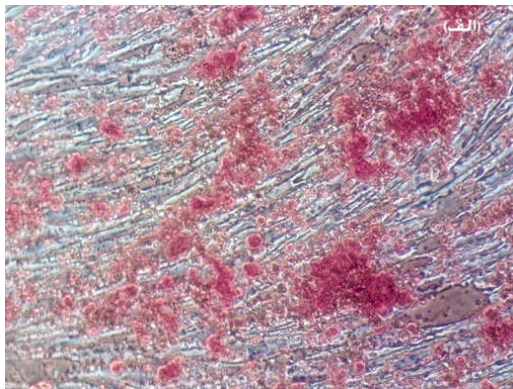
استخراج RNA: سلول‌های بنیادی مزانشیمی تمایز نیافته (روز صفر)، سلول‌های استئوبلاستی تمایز یافته با محیط تمایزی (هفته اول، دوم و سوم) و همچنین سلول‌های بنیادی مزانشیمی تیمار شده با داروی زولدرونیک اسید (هفته اول، دوم و سوم) با استفاده از RNeasy plus Mini Kit شرکت Qiagen (آمریکا) بر اساس پروتکل پیشنهادی کیت استخراج شدند. بدین منظور، ۱۰^۶ × ۳-۴ سلول از طریق تریپسینه کردن از فلاسک‌ها جدا کرده و با PBS شستشو داده و با سانتریفیوژ رسوب سلولی تهیه شد. برای لیز کردن سلول‌ها ۳۵۰ میکرولیتر بافر RTL اضافه شده و ورتکس شد تا رسوب سلولی به صورت سوسپانسیون سلولی در آمده و لیز شود. برای هموژنیزه کردن مخلوط لیز شده عمل ورتکس را به مدت یک دقیقه ادامه داده و یا حداقل ۵ بار با سرنگ ۲۰ میلی‌لیتری پپیتاژ شده تا لیزات هموژن بدست آید. در این مرحله، برای حذف آلودگی DNA ژنومی، لیزات را به ستون gDNA Eliminator اضافه کرده و ۳۰ ثانیه با سرعت ۱۰۰۰۰ دور در ثانیه سانتریفیوژ شد. بعد از سانتریفیوژ ستون را دور انداخته و مایع جمع شده حفظ می‌شود. یک حجم اتانول ۷۰٪ (۳۵۰ میکرولیتر) به

ثابت است. نتایج quantitative Real Time-PCR به صورت بیان نسبی ژن (Relative Gene Expression) گزارش شد ($2^{-\Delta\Delta Ct}$).

داده‌ها با استفاده از نرم افزار SPSS ویرایش ۱۱ آنالیز شد، آزمون مقایسات زوجی و آزمون t-test انجام گردید. هم‌چنین مقادیر P کمتر از ۰/۰۵ از نظر آماری معنی‌دار در نظر گرفته شد.

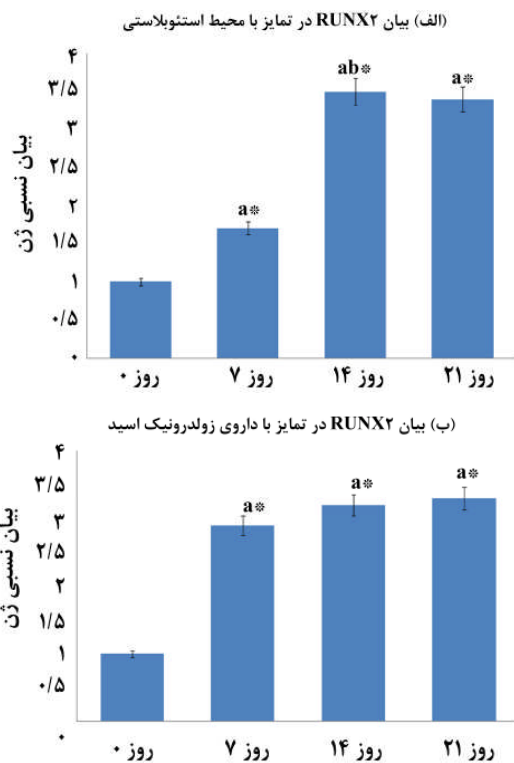
نتایج

تأیید تمایز استئوبلاستیک با رنگ‌آمیزی آلیزارین قرمز: توده‌های کلسیمی در این رنگ‌آمیزی به رنگ قرمز دیده می‌شوند که نشان‌دهنده تمایز استئوبلاستیک سلول‌های بنیادی مزانشیمی می‌باشد. رنگ‌آمیزی آلیزارین قرمز در سلول‌های تمایز یافته استئوبلاستی تیمار شده با محیط تمایزی (شکل ۱-الف) و هم‌چنین با داروی زولدرونیک اسید (روز ۲۱ تمایز) (شکل ۱-ب) رسوب قرمز رنگ توده‌های کلسیمی را نشان داد. سلول‌های بنیادی مزانشیمی برای این رنگ‌آمیزی منفی بود و هیچ گونه رسوب کلسیم در آن‌ها مشاهده نشد (شکل ۱-ج).

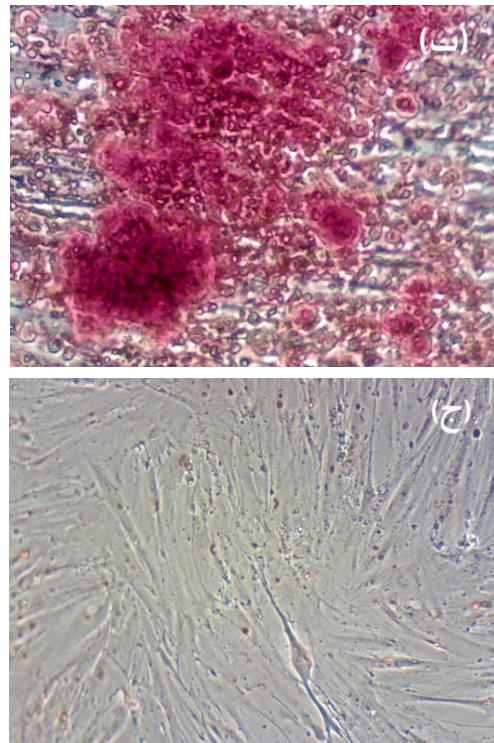


انجام quantitative Real Time-PCR: بیان کمتی mRNA ژن RUNX2 در نمونه‌های RNA استخراج شده از سلول‌های بنیادی مزانشیمی تمایز نیافته (روز صفر)، سلول‌های بنیادی مزانشیمی تمایز یافته با محیط تمایزی (هفته اول، دوم و سوم پس از القاء تمایز) و سلول‌های بنیادی مزانشیمی تیمار شده با داروی زولدرونیک اسید (هفته اول، دوم و سوم پس از تیمار) با استفاده از کیت Quantifast SYBR Green PCR مشخص شد. برای انجام quantitative Real Time-PCR از دستگاه ترمال سایکلر LineGene 9600 شرکت Bioer (چین) استفاده شد. توالی پرایمر مورد استفاده در quantitative Real Time-PCR برای ژن RUNX2 شامل Forward primer: CCCACGACAACCGCACCAT و Reverse primer: CACTCCGGCCCAAAATCTC بود. حجم نهایی واکنش ۲۵ میکرولیتر بود. مخلوط واکنش محتوی ۰/۵ میکرولیتر از هر پرایمر Forward و Reverse (۱۰ پیکومول)، ۱۲/۵ میکرولیتر از 2X QuantiFast SYBR Green PCR Master Mix، ۰/۵μl cDNA، ۱۱ میکرولیتر آب مقطر دوبار تقطیر بود. برنامه دمایی شامل یک سیکل ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه، ۴۰ سیکل ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ ثانیه، ۶۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه بود. 2X QuantiFast SYBR Green PCR Master Mix محتوی DNA پلی‌مراز HotStarTaq Plus، بافر QuantiFast SYBR Green PCR، مخلوط dNTPها (شامل dATP، dCTP، dGTP، dTTP) و رنگ رفرانس غیرفعال ROX بود. نهایتاً میزان بیان ژن RUNX2 نسبت به بیان GAPDH نرمال‌سازی شد ($\Delta Ct = Ct_{\text{gene of interest}} - Ct_{\text{GAPDH}}$). GAPDH جزء ژن‌های Housekeeping می‌باشد که بیان آن در سلول‌ها

استئوبلاست تحت تیمار داروی زولدرونیک اسید در هفته‌های اول، دوم و سوم نسبت به سلول‌های بنیادی مزانشیمی تیمار نشده به ترتیب $۲/۹۱ \pm ۰/۱۳$ ، $۳/۲۵ \pm ۰/۳$ و $۳/۳۶ \pm ۰/۲۳$ بود (نمودار ۱-ب). مقایسه میزان افزایش بیان ژن RUNX2 در هفته اول تمایز با محیط تمایزی $(۱/۷۶ \pm ۰/۰۹)$ برابر) و داروی زولدرونیک اسید $(۲/۹۱ \pm ۰/۱۳)$ برابر) اختلاف معنی‌دار از نظر آماری نشان می‌دهد ($p < ۰/۰۵$). در حالی که در هفته دوم و سوم تمایز با محیط تمایزی و همچنین داروی زولدرونیک اسید، میزان بیان RUNX2 تقریباً یکسان و حدود $۳/۵$ برابر است.



نمودار ۱- نتایج *quantitative Real Time-PCR* برای بیان ژن RUNX2 در (الف) تمایز با محیط تمایزی، (ب) تیمار با داروی زولدرونیک اسید. از آزمون *t-test* جهت مقایسات زوجی استفاده شد. (a) تفاوت معنی‌داری با سطح بیان RUNX2 در MSC تمایز نیافته. (b) تفاوت معنی‌داری سطح بیان RUNX2 در هفته دوم تمایز نسبت به هفته اول تمایز در القاء تمایز با محیط تمایزی. $p < ۰/۰۵$ *



شکل ۱- رنگ آمیزی آلیزارین قرمز. (الف) سلول‌های تمایز یافته استئوبلاستی تیمار شده با محیط تمایزی در روز ۲۱ تمایز. (ب) سلول‌های تمایز یافته استئوبلاستی تیمار شده با داروی زولدرونیک اسید در روز ۲۱ تمایز. (ج) سلول‌های بنیادی مزانشیمی تمایز نیافته. بیان کمی RUNX2 در تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی با محیط تمایزی استئوبلاستی و داروی زولدرونیک اسید

آنالیز بیان ژن نشان داد که بیان mRNA ژن RUNX2 در طول تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی به استئوبلاست تحت تأثیر محیط تمایزی و داروی زولدرونیک اسید افزایش پیدا می‌کند. بیان ژن RUNX2 در طول تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی به استئوبلاست تحت تأثیر محیط تمایزی در هفته‌های اول، دوم و سوم در مقایسه با سلول‌های بنیادی مزانشیمی تمایز نیافته، به ترتیب $۱/۷۶ \pm ۰/۰۹$ ، $۳/۲۵ \pm ۰/۲۵$ و $۳/۴۰ \pm ۰/۱۷$ برابر بود (نمودار ۱-الف). همچنین بیان ژن RUNX2 در طول تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی به

بحث

فاکتور نسخه‌برداری RUNX2، اختصاصی‌ترین فاکتور نسخه‌برداری در تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی به استئوبلاست می‌باشد. فاکتورهای متعددی بیان و عملکرد این فاکتور نسخه‌برداری را تحت کنترل دارند. در این تحقیق میزان بیان کمی این فاکتور در طول تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی به استئوبلاست مورد ارزیابی قرار گرفت و نشان داده شد که بیان آن در طول تمایز استئوبلاستی با محیط تمایزی و داروی زولدرونیک اسید افزایش پیدا می‌کند. این افزایش در هفته اول تمایز با زولدرونیک اسید $2/91 \pm 0/13$ برابر و در تمایز با محیط تمایزی $1/76 \pm 0/09$ برابر بود که احتمالاً بیانگر تأثیر تسریع تمایز استئوبلاستی با داروی زولدرونیک اسید در مقایسه با محیط تمایزی است. در حالی که در هفته‌های دوم و سوم تمایز با محیط تمایزی و همچنین داروی زولدرونیک اسید، میزان بیان RUNX2 تقریباً یکسان و حدود $3/5$ برابر است. افزایش بیان RUNX2 در هفته اول تمایز و تعادل بیان آن در هفته‌های دوم و سوم نشانگر نقش زودرس این فاکتور نسخه‌برداری در تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی به استئوبلاست می‌باشد. گلوکوکورتیکوئیدها شناخته‌شده‌ترین القاء‌کننده‌های تمایز استئوبلاستی و تشکیل استخوان در *In vitro* هستند که تأثیرشان به واسطه فعال‌سازی نسخه‌برداری RUNX2 است [۲۰]. هورمون‌های گلوکوکورتیکوئیدی تأثیرات تحریکی و مهارکنندگی پیچیده‌ای بر روی متابولیسم استخوان‌های اسکلتی دارند [۲۱]. سیگنال‌دهی گلوکوکورتیکوئیدهای اندوژن برای تشکیل نرمال استخوان در *In vivo* ضروری است [۲۲-۲۳] و گلوکوکورتیکوئیدهای سنتتیک همانند دگزامتازون تمایز

استئوبلاستی در مدل‌های *In vitro* را تسریع می‌کند [۲۴]. مکانیسمی که این هورمون‌ها بواسطه آن، استئوژنیزیس را القاء می‌کنند، هنوز به خوبی شناخته نشده است. همکاری دگزامتازون و فاکتورهای نسخه‌برداری استئوژنیک همانند RUNX2 اثر هم‌افزایی در القاء بیان استئوکلسین و سیالوپروتئین استخوانی، افزایش فعالیت آلکالن فسفاتاز و مینرالیزاسیون بیولوژیک دارد [۲۵-۲۶]. دگزامتازون سطوح فسفوسرین RUNX2 (به ویژه Ser125) را کاهش می‌دهد و در عین حال بیان MKP1 (Mitogen-Activated Protein Kinase Phosphatase 1) را به واسطه رسپتورهای گلوکوکورتیکوئیدی افزایش می‌دهد [۲۷-۲۹]. مهار MKP-1، کاهش فسفوریلاسیون سرین RUNX2 با واسطه دگزامتازون را از بین می‌برد و نشان‌دهنده این مطلب است که گلوکوکورتیکوئیدها فسفوریلاسیون RUNX2 را با واسطه MKP-1 انجام می‌دهند [۳۰-۳۱]. القاء موتاسیون Ser125 به اسید گلوتامیک، فسفوریلاسیون پایدار را تقلید و تمایز استئوبلاستی با واسطه RUNX2 را مهار می‌کند که این حالت با تیمار دگزامتازون اصلاح نمی‌گردد. بر عکس، القاء موتاسیون Ser125 به گلیسین، دفسفوریلاسیون پایدار را تقلید می‌کند که به طور بارز تمایز استئوبلاستی را افزایش می‌دهد که با تیمار دگزامتازون، تمایز استئوبلاستی تسریع می‌گردد [۳۲-۳۳]. تحقیقات نشان داده‌اند که دگزامتازون تمایز استئوبلاستی را بواسطه فسفوریلاسیون واحد Ser125 بر روی RUNX2 القاء می‌کند. دگزامتازون یکی از مواد اصلی تشکیل‌دهنده 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. با

استئوپروتگرین با مهار RANKL منجر به مهار فعالیت استئوکلاست‌ها و در نتیجه منجر به مهار بازجذب استخوان می‌شود [۳۸]. هم‌چنین نشان داده شده است که داروی زولدرونیک اسید، بیان سیالوپروتئین استخوانی را بواسطه مهار Rho GTPase در استئوبلاست‌ها افزایش می‌دهد [۳۹]

نتایج این تحقیق بیانگر تأثیر تسریع تمایز استئوبلاستی با داروی زولدرونیک اسید می‌باشد. این یافته می‌تواند توجیهی برای تأثیر استئوزنیک داروی زولدرونیک اسید باشد که با افزایش بیان مهم‌ترین فاکتور نسخه‌برداری تمایز استئوبلاستیک RUNX2 منجر به تمایز سریع‌تر سلول‌های بنیادی مزانشیمی به سمت سلول‌های استخوان ساز می‌شود.

نتیجه‌گیری

ژن‌های شاخص استئوبلاستی مانند استئوکلسین، استئوپوننتین، سیالوپروتئین استخوانی و کلاژن از اهداف فاکتورهای نسخه‌برداری اختصاصی استئوبلاستی همانند RUNX2 و OSX می‌باشند. بر این اساس، افزایش بیان این فاکتورهای نسخه‌برداری با افزایش بیان اهداف ژنی آن‌ها همراه خواهد بود که مقایسه نتایج تحقیقات مذکور با نتایج تحقیق حاضر توجیه‌کننده افزایش بیان شاخص‌های استئوبلاستی می‌باشد به نحوی که افزایش بیان RUNX2 در سلول‌های استئوبلاستی با افزایش بیان ژن‌های شاخص استئوبلاستی همراه است.

تشکر و قدردانی

این تحقیق با حمایت مالی دانشکده علوم پزشکی دانشگاه تربیت مدرس انجام شده است. از نمایندگی شرکت Novartis نیز به دلیل تأمین داروی زولدرونیک اسید صمیمانه تشکر و قدردانی می‌شود.

توجه به نقش دگزامتازون در تنظیم فعالیت و بیان RUNX2، نتایج این تحقیق می‌تواند مؤیدی بر یافته‌های قبلی باشد.

تحقیقات اخیر نشان داده‌اند که زولدرونیک اسید علاوه بر مهار استئوکلاست‌ها، می‌تواند منجر به تمایز MSCs به استئوبلاست‌ها شود ولی مکانیسم اثر این دارو بر روی MSCs و القاء تمایز به استئوبلاست‌ها هنوز به‌خوبی شناخته نشده است. مصرف زولدرونیک اسید میزان شکستگی مهره‌ها را به شدت کاهش می‌دهد و چگالی استخوان‌ها را بهبود می‌بخشد [۳۴]. در این تحقیق مشخص شد که تیمار سلول‌های بنیادی مزانشیمی با داروی زولدرونیک اسید و القاء تمایز آن‌ها به استئوبلاست با افزایش بیان RUNX2 همراه است. افزایش بیان RUNX2 در هفته اول تمایز با زولدرونیک اسید، بیانگر تأثیر تسریع تمایز استئوبلاستی با داروی زولدرونیک اسید در مقایسه با محیط تمایزی باشد. سایر تحقیقات هم تأثیر داروی زولدرونیک اسید بر روی بیان بعضی از ژن‌های استئوبلاستی را مورد بررسی قرار داده‌اند. تحقیقات نشان داده است که بی‌فسفونات‌ها مانند داروی زولدرونیک اسید، بیان استئوپروتگرین Osteoprotegerin (OPG) را در استئوبلاست‌ها افزایش می‌دهند [۳۵]. استئوپروتگرین یک عضو از ابرخانواده رسپتور فاکتور نکروز تومور Tumor Necrosis Factor Receptor (TNFR) می‌باشد که توسط استئوبلاست‌ها ترشح می‌گردد و به عنوان آنتاگونیست رسپتور محلول برای Receptor Activator of Nuclear Kappa-B Ligand factor (RANKL) عمل می‌کند [۳۷-۳۶]. RANKL فاکتور اصلی در تشکیل و فعال‌سازی استئوکلاست‌ها می‌باشد که افزایش فعالیت آن با افزایش بازجذب استخوان و بروز استئوپوروز همراه است.

References

- [1] Banerjee C, McCabe LR, Choi JY, Hiebert SW, Stein JL, Stein GS, et al. Runt homology domain proteins in osteoblast differentiation: AML3/CBFA1 is a major component of a bone-specific complex. *J Cell Biochem* 1997; 66(1): 1-8.
- [2] Karsenty G, Ducy P, Starbuck M, Priemel M, Shen J, Geoffroy V, et al. Cbfa1 as a regulator of osteoblast differentiation and function. *Bone* 1999; 25(1): 107-8.
- [3] Ducy P, Zhang R, Geoffroy V, Ridall AL, Karsenty G. Osf2/Cbfa1: a transcriptional activator of osteoblast differentiation. *Cell* 1997; 89(5): 747-54.
- [4] Ducy P, Starbuck M, Priemel M, Shen J, Pinero G, Geoffroy V, et al. A Cbfa1-dependent genetic pathway controls bone formation beyond embryonic development. *Genes Dev* 1999; 13(8): 1025-36.
- [5] Komori T, Yagi H, Nomura S, Yamaguchi A, Sasaki K, Deguchi K, et al. Targeted disruption of Cbfa1 results in a complete lack of bone formation owing to maturational arrest of osteoblasts. *Cell* 1997; 89(5): 755-64.
- [6] Mundlos S, Otto F, Mundlos C, Mulliken JB, Aylsworth AS, Albright S, et al. Mutations involving the transcription factor CBFA1 cause cleidocranial dysplasia. *Cell* 1997; 89(5): 773-9.
- [7] Otto F, Lubbert M, Stock M. Upstream and downstream targets of RUNX proteins. *J Cell Biochem* 2003; 89(1): 9-18.
- [8] Bidwell JP, Alvarez M, Feister H, Onyia J, Hock J. Nuclear matrix proteins and osteoblast gene expression. *J Bone Miner Res* 1998; 13(2): 155-67.
- [9] Saki N, Abroun S, Farshdousti Hagh M, Asgharei F. Neoplastic Bone Marrow Niche: Hematopoietic and Mesenchymal Stem Cells. *Cell Journal(Yakhteh)* 2011; 13(3): 131-6. [Farsi]
- [10] Cheng SL, Zhang SF, Avioli LV. Expression of bone matrix proteins during dexamethasone-induced mineralization of human bone marrow stromal cells. *J Cell Biochem* 1996; 61(2): 182-93.
- [11] Tarfiei G, Noruzinia M, Soleimani M, Kaviani S, Mahmoodinia Maymand M, Farshdousti Hagh M, et al. ROR2 Promoter Methylation

- Change in Osteoblastic Differentiation of Mesenchymal Stem Cells. *Cell Journal (Yakhteh)* 2011; 13(1): 11-8.[Farsi]
- [12] Green JR, Muller K, Jaeggi KA. Preclinical pharmacology of CGP 42'446, a new, potent, heterocyclic bisphosphonate compound. *J Bone Miner Res* 1994; 9(5): 745-51.
- [13] Leszczynski P. Zoledronic acid reduces risk of any new clinical fracture and risk of death after surgical repair of a low-trauma hip fracture. *Chir Narzadow Ruchu Ortop Pol* 2010; 75(3): 168-71.
- [14] Ebert R, Zeck S, Krug R, Meissner-Weigl J, Schneider D, Seefried L, et al. Pulse treatment with zoledronic acid causes sustained commitment of bone marrow derived mesenchymal stem cells for osteogenic differentiation. *Bone* 2009; 44(5): 858-64.
- [15] Farshdousti Hagh M, Noruzinia M, Mortazavi Y, Soleimani M, Kaviani S, Mahmoodinia Maymand M. Zoledronic acid induces osteoblastic differentiation of mesenchymal stem cells without change in hypomethylation status of OSTERIX promoter. *Cell Journal (Yakhteh)* 2012. In Press.[Farsi]
- [16] Farshdousti Hagh M, Noruzinia M, Mortazavi Y, Soleimani M, Kaviani S, Mahmoodinia Maymand M. Zoledronic acid effect on BSP expression and methylation during osteoblastic differentiation of mesenchymal stem cells. *Payavard Salamat* 2011; 15(1): 69-79. [Farsi]
- [17] Farshdousti Hagh M, Noruzinia M, Mortazavi Y, Soleimani M, Kaviani S, Mahmoodinia Maymand M. Evaluation of epigenetic rolls of RUNX2 and DLX5 genes in osteoblastic differentiation induced by zoledronic acid in mesenchymal stem cells. *J Modares Med Sci* 2011; 14(1): 59-69. [Farsi]
- [18] Perifanis V, Vyzantiadis T, Tziomalos K, Vakalopoulou S, Garipidou V, Athanassiou-Metaxa M, et al. Effect of zoledronic acid on markers of bone turnover and mineral density in osteoporotic patients with beta-thalassaemia. *Ann Hematol* 2007; 86(1): 23-30.
- [19] Zhang J, Zhang WY, Sun H. Effect of zoledronic acid on the differentiation and osteoprotegerin production of osteoblasts in rabbit. *Zhonghua Kou Qiang Yi Xue Za Zhi* 2010; 45(8): 502-5.
- [20] Brann DW, Hendry LB, Mahesh VB. Emerging diversities in the mechanism of action of steroid hormones. *J Steroid Biochem Mol Biol* 1995; 52(2): 113-33.

- [21] Ishida Y, Heersche JN. Glucocorticoid-induced osteoporosis: both in vivo and in vitro concentrations of glucocorticoids higher than physiological levels attenuate osteoblast differentiation. *J Bone Miner Res* 1998; 13(12): 1822-6.
- [22] Bellows CG, Aubin JE, Heersche JN. Physiological concentrations of glucocorticoids stimulate formation of bone nodules from isolated rat calvaria cells in vitro. *Endocrinology* 1987; 121(6): 1985-92.
- [23] Sher LB, Woitge HW, Adams DJ, Gronowicz GA, Krozowski Z, Harrison JR, et al. Transgenic expression of 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2 in osteoblasts reveals an anabolic role for endogenous glucocorticoids in bone. *Endocrinology* 2004; 145(2): 922-9.
- [24] Cheng SL, Yang JW, Rifas L, Zhang SF, Avioli LV. Differentiation of human bone marrow osteogenic stromal cells in vitro: induction of the osteoblast phenotype by dexamethasone. *Endocrinology* 1994; 134(1): 86-95.
- [25] Byers BA, Pavlath 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(11): 1931-44.
- [26] Yang S, Wei D, Wang D, Phimphilai M, Krebsbach PH, Franceschi RT. In vitro and in vivo synergistic interactions between the Runx2/Cbfa1 transcription factor and bone morphogenetic protein-2 in stimulating osteoblast differentiation. *J Bone Miner Res* 2003; 18(4): 705-15.
- [27] Banerjee C, Javed A, Choi JY, Green J, Rosen V, Van Wijnen AJ, et al. Differential regulation of the two principal Runx2/Cbfa1 n-terminal isoforms in response to bone morphogenetic protein-2 during development of the osteoblast phenotype. *Endocrinology* 2001; 142(9): 4026-39.
- [28] Xiao G, Jiang D, Gopalakrishnan R, Franceschi RT. Fibroblast growth factor 2 induction of the osteocalcin gene requires MAPK activity and phosphorylation of the osteoblast transcription factor, Cbfa1/Runx2. *J Biol Chem* 2002; 277(39): 36181-7.
- [29] Wee HJ, Huang G, Shigesada K, Ito Y. Serine phosphorylation of RUNX2 with novel potential functions as negative regulatory mechanisms. *EMBO Rep* 2002; 3(10): 967-74.
- [30] Xiao G, Jiang D, Thomas P, Benson MD, Guan K, Karsenty G, et al. MAPK pathways

- activate and phosphorylate the osteoblast-specific transcription factor, Cbfa1. *J Biol Chem* 2000; 275(6): 4453-9.
- [31] Wang FS, Wang CJ, Sheen-Chen SM, Kuo YR, Chen RF, Yang KD. Superoxide mediates shock wave induction of ERK-dependent osteogenic transcription factor (CBFA1) and mesenchymal cell differentiation toward osteoprogenitors. *J Biol Chem* 2002; 277(13): 10931-7.
- [32] Quack I, Vonderstrass B, Stock M, Aylsworth AS, Becker A, Brueton L, et al. Mutation analysis of core binding factor A1 in patients with cleidocranial dysplasia. *Am J Hum Genet* 1999; 65(5): 1268-78.
- [33] Phillips JE, Gersbach CA, Wojtowicz AM, Garcia AJ. Glucocorticoid-induced osteogenesis is negatively regulated by Runx2/Cbfa1 serine phosphorylation. *J Cell Sci* 2006; 119: 581-91.
- [34] Black DM, Delmas PD, Eastell R, Reid IR, Boonen S, Cauley JA, et al. Once-yearly zoledronic acid for treatment of postmenopausal osteoporosis. *N Engl J Med* 2007; 356(18): 1809-22.
- [35] Viereck V, Emons G, Lauck V, Frosch KH, Blaschke S, Grundker C, et al. Bisphosphonates pamidronate and zoledronic acid stimulate osteoprotegerin production by primary human osteoblasts. *Biochem Biophys Res Commun* 2002; 291(3): 680-6.
- [36] Simonet WS, Lacey DL, Dunstan CR, Kelley M, Chang MS, Luthy R, et al. Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density. *Cell* 1997; 89(2): 309-19.
- [37] Lacey DL, Timms E, Tan HL, Kelley MJ, Dunstan CR, Burgess T, et al. Osteoprotegerin ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation. *Cell* 1998; 93(2): 165-76.
- [38] Teitelbaum SL. Bone resorption by osteoclasts. *Science* 2000; 289(5484): 1504-8.
- [39] Chaplet M, Detry C, Deroanne C, Fisher LW, Castronovo V, Bellahcene A. Zoledronic acid up-regulates bone sialoprotein expression in osteoblastic cells through Rho GTPase inhibition. *Biochem J* 2004; 384(Pt 3): 591-8..

Comparison of Quantitative Expression of Runx2 in Mesenchymal Stem Cells (Mscs) Differentiated by Osteoblastic Differentiation Medium and Zoledronic Acid

M. Farshdousti Hagh¹, M. Noruzinia², Y. Mortazavi³, M. Soleimani⁴, S. Kaviani², M. Mahmoodinia Maymand⁴

Received: 19/10/2011 Sent for Revision: 01/01/2012 Received Revised Manuscript: 25/02/2012 Accepted: 13/03/2012

Background and Objectives: RUNX2 is the most specific transcription factor in osteoblastic differentiation of MSCs. In this research, RUNX2 expression was quantified in MSCs differentiated by osteogenic differentiation medium (ODM) and zoledronic acid (ZA).

Materials and Methods: In this experimental study, hMSCs were treated by osteogenic differentiation medium and ZA. RNA extraction was carried out from both osteoblastic differentiated cells in the first, second and third weeks of differentiation, and also from undifferentiated MSCs. RUNX2 expression was quantified by quantitative Real Time-PCR.

Results: Gene expression of RUNX2 in the first, second and third weeks of osteogenic differentiation by ODM compared to undifferentiated MSCs showed 1.76±0.09-fold, 3.54±0.25-fold and 3.40±0.17-fold increase in expression, respectively. Zoledronic acid increased the expression of RUNX2 2.91±0.13-fold, 3.25±0.3-fold and 3.36±0.23-fold at the same time points, respectively. Comparison of RUNX2 expression by ODM (1.76±0.09-fold) and ZA (2.91±0.13-fold) in the first week of differentiation showed statistical differences (P<0.05). Whereas, RUNX2 expression by both ODM and ZA in the second and third weeks of differentiation were approximately equal.

Conclusion: RUNX2 expression was increased in osteoblastic differentiation by both ODM and ZA. However, it seems that ZA can cause more expression of RUNX2 in the first week of osteoblastic differentiation.

Key words: Mesenchymal Stem Cells, Differentiation Medium, Zoledronic Acid, RUNX2 Transcription Factor

Funding: This research was funded by Tarbiat Modares University.

Conflict of interest: None declared.

Ethical approved: The Ethics Committee of Tarbiat Modares University approved the study.

How to cite this article: Farshdousti Hagh M, Noruzinia M, Mortazavi Y, Soleimani M, Kaviani S, Mahmoodinia Maymand M. 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(4): 377-90. [Farsi]

1- PhD of Hematology, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran, Hematology and Oncology Research Center, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran

2- Assistant Professor, Department of Hematology, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran.

3- Associated Professor, Department of Hematology, Zanjan University of Medical Sciences, Zanjan, Iran
(Corresponding Author) (0241) 42249553, Fax: (241) 4249553. E-mail: youmort@yahoo.com

4- MSc, Sarem Cell Research Center (SCRC), Tehran, Iran