

نقش بیان موقت miR-182 و miR-183 در القای ویژگی‌های شبه‌گیرنده نوری در سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان انسان

چکیده

دریافت: ۱۴۰۴/۰۳/۲۰ ویرایش: ۱۴۰۴/۰۳/۲۷ پذیرش: ۱۴۰۴/۰۴/۲۵ آنلاین: ۱۴۰۴/۰۵/۰۱

زمینه و هدف: مرگ سلول‌های گیرنده نوری شبکه، یکی از عوامل اصلی بروز دژنراسیون شبکه محسوب می‌شود که تاکنون درمان مؤثری برای آن معرفی نشده است. مطالعات بالینی و پیش‌بالینی نشان می‌دهند که استفاده از سلول‌های بنیادی، رویکردی امید بخش در درمان این بیماری‌هاست. همچنین شواهد موجود حاکی از آن است که miRNA-182 و miRNA-183 نقش‌های کلیدی در رشد، تمایز و بقای گیرنده‌های نوری در مدل‌های حیوانی ایفا می‌کنند. بنابراین، هدف این مطالعه القای ویژگی‌های شبه‌گیرنده نوری در سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان انسان از طریق افزایش بیان miR-182 و miR-183 است.

روش بررسی: این مطالعه تجربی در بازه زمانی فروردین ۱۳۹۸ تا اسفند ۱۳۹۹ در مرکز تحقیقات بیوشیمی بالینی دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد انجام شد. در این مطالعه، تاثیر افزایش بیان miRNA-182 و miRNA-183 بر تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان انسان (hBMSCs) به سلول‌های شبه‌گیرنده نوری بررسی شد. برای این منظور، miRNA-182 و miRNA-183 به hBMSCs ترانسفکت شدند و سطح بیان آن‌ها با روش Real-Time PCR ارزیابی گردید. همچنین، بیان ژن‌های اختصاصی شبکه شامل OTX2، NRL، SLC1A1، PKC و Recoverin با استفاده از روش Real-Time PCR بررسی شد.

یافته‌ها: یافته‌ها نشان دادند که ترانسفکشن hBMSCs با miRNA-182 و miRNA-183 به کمک لیپوفکتامین، منجر به افزایش معنادار بیان ژن‌های مرتبط با تمایز شبکه از جمله CRX، OTX2، PKCα، Recoverin، NRL و RHO گردید. **نتیجه‌گیری:** نتایج این پژوهش بیانگر آن است که افزایش بیان miRNA-182 و miRNA-183 می‌تواند به‌طور بالقوه تمایز سلول‌های hBMSCs را به سلول‌های شبه‌گیرنده نوری تسهیل نماید. این یافته‌ها بیانگر پتانسیل درمانی و نقش تنظیمی miRNAها در تمایز، بقا و حفاظت سلول‌های شبکه است.

کلمات کلیدی: سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از مغز استخوان انسان، miRNA-182، miRNA-183، سلول‌های گیرنده نوری.

سمانه عرب^۱، محمد رضا محمودیان ثانی^۲، نجمه فتاحی^۳، زکیه اخلاصی^۴، سمیرا اصغرزاده^{۵*}

۱- گروه مهندسی بافت و علوم سلولی کاربردی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی سمنان، سمنان، ایران.
۲- مرکز تحقیقات بیماری‌های تالاسمی و هموگلوبینوپاتی، پژوهشکده سلامت دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز، اهواز، ایران.
۳- مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، پژوهشکده علوم پایه سلامت، دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد، شهرکرد، ایران.
۴- مرکز تحقیقات بیوشیمی بالینی، پژوهشکده علوم پایه سلامت، دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد، شهرکرد، ایران.

* نویسنده مسئول: شهرکرد، دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد، پژوهشکده علوم پایه سلامت، مرکز تحقیقات بیوشیمی بالینی.

تلفن: ۰۳۸-۳۳۴۶۶۹۱
E-mail: Asgharzade1396@gmail.com

مقدمه

جراحی، بسیاری از بیماری‌های تحلیل‌برنده شبکه همچنان درمان‌ناپذیر مانده و آسیب بینایی پیشرفت می‌کند.^۱ سلول‌های بنیادی به‌عنوان گزینه‌ای موثر برای بازسازی شبکه معرفی شده‌اند، زیرا توانایی خودنوسازی و تمایز به انواع سلول‌ها را دارند.^۳ ساختار منحصر به فرد شبکه، حجم کم بافت، امکان تزریق دقیق، روش‌های

طبق آمار جهانی، حدود ۴۳ میلیون نفر نابینا هستند و شایع‌ترین بیماری‌های زمینه‌ساز شامل دژنراسیون ماکولا، رتینوپاتی دیابتی و گلوکوم است.^۱ با وجود پیشرفت‌های درمانی دارویی، لیزری و

روش بررسی

این مطالعه تجربی و کنترل شده در بازه زمانی فروردین ۱۳۹۸ تا اسفند ۱۳۹۹ در مرکز تحقیقات بیوشیمی بالینی دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد پس از اخذ کد اخلاق (IR.SKUMS.REC.1398.056) از دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد انجام شد. تمامی آزمایش‌ها در شرایط استاندارد آزمایشگاهی، با سه تکرار بیولوژیک و سه تکرار تکنیکال برای اطمینان از دقت و قابلیت تکرار نتایج انجام گردید.

گروه‌های تیماری شامل miRNA-182، miRNA-183 و کنترل Scramble بودند و نمونه‌ها در ۲۴ و ۴۸ ساعت برداشت شدند. پیامد اصلی، تغییر نسبی بیان ژن‌های CRX، OTX2، NRL، RHO، Recoverin، PKC α و SLC1A1 و پیامدهای ثانویه شامل وابستگی اثر به زمان و تفاوت پاسخ بین دو miRNA بود. hBMSCs از انستیتو پاستور (تهران، ایران) تهیه و در DMEM حاوی ۱۵٪ FBS، دو میلی‌مولار L-گلوتامین و یک درصد آنتی‌بیوتیک کشت داده شدند و محیط هر سه روز تعویض شد. ترانسفکشن روی سلول‌های پاساژ چهارم انجام شد. ترانسفکشن سلولی، ترانسفکشن hBMSCs با لیپوفکتامین ۲۰۰۰ (Invitrogen) طبق دستور شرکت انجام شد. حدود ۱۵۰۰۰ سلول در هر چاهک پلیت شش چاهکی در محیط DMEM بدون FBS ولی حاوی آنتی‌بیوتیک کشت داده شدند. کمپلکس ترانسفکشن شامل ۵۰ نانومولار miRNA-182 یا miRNA-183 به همراه ۱۰ میکرولیتر لیپوفکتامین در ۲۰۰ میکرولیتر DMEM به مدت ۱۵ دقیقه آماده و به سلول‌ها اضافه شد.

پس از پنج ساعت، محیط حاوی FBS و آنتی‌بیوتیک افزوده و سلول‌ها به مدت ۲۴ و ۴۸ ساعت انکوبه شدند. گروه کنترل با Scrambled ترانسفکت شد و موفقیت ترانسفکشن با Real-Time PCR تایید گردید. هر آزمایش در سه تکرار مستقل انجام شد و تراکم سلول‌ها حدود ۷۰٪-۶۰٪ بود.

استخراج RNA و انجام Real-Time PCR، استخراج miRNA با کیت miRNeasy (Qiagen) و RNA تام سلول‌های ترانسفکت شده با miRNA یا Scramble با کیت (Favorgen Biotech، تایوان) انجام شد. کیفیت و خلوص RNA با جذب نوری در طول موج‌های ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر توسط NanoDrop (Thermo Fisher) سنجیده شد. سپس RNA ها برای سنتز cDNA استفاده شدند، سنتز cDNA از RNA تام

کم‌تهاجمی، سد خونی-شبکیه‌ای و شفافیت چشم، آن را به هدف مناسبی برای پیوند سلول‌های بنیادی تبدیل کرده است.^۴

انواع سلول‌های بنیادی شامل CD34⁺، iPSC، سلول‌های پیش‌ساز شبکیه، MSC و آگروزوم‌ها در مطالعات بالینی برای درمان بیماری‌های شبکیه استفاده شده‌اند.^{۵،۶} به‌ویژه MSC ها به دلیل دسترسی آسان، ایمنی بالا و توانایی تمایز به سلول‌های شبکیه، مورد توجه‌اند. این سلول‌ها با ترشح فاکتورهای محافظ عصبی و ضدالتهاب، از پیشرفت بیماری‌ها جلوگیری و بازسازی بافت آسیب‌دیده را تسهیل می‌کنند.^{۷،۸}

microRNA ها به‌عنوان تنظیم‌کننده‌های اپی‌ژنتیکی، نقش کلیدی در عملکرد سلول‌های شبکیه دارند. خوشه miRNA-183 شامل miR-183، miR-96 و miR-182 عمدتاً در بافت‌های حسی بیان می‌شود و برای رشد و بقای سلول‌های گیرنده نوری ضروری است.^۹ حذف این خوشه در مدل‌های حیوانی موجب اختلال در تمایز و بلوغ فتورسپتورها، آسیب سیناپسی و دژنراسیون شبکیه می‌شود، درحالی‌که افزایش بیان آن ژن‌های مسیر تمایز نورونی را فعال و سلول‌های بنیادی را به فنوتیپ گیرنده نوری هدایت می‌کند.^{۱۰} این خوشه علاوه‌بر تنظیم ژن‌های حیاتی، عملکرد فتورسپتورها را با کنترل سیناپس‌سازی، انتقال سیگنال عصبی و حفاظت سلولی حفظ می‌کند.^{۱۱،۱۲} miR-182 و miR-96 برای حفظ بخش خارجی سلول‌های مخروطی و عملکرد بینایی حیاتی‌اند.^{۱۳،۱۴} و حذف miR-182 باعث نقص ساختاری شدید در فتورسپتورها می‌شود.^{۱۳} کاهش بیان خوشه miR-183/96/182 در مدل‌های ترانس‌ژنیک بیماری‌های رتینیت پیگمنتوزا با پاتولوژی شبکیه انسان مرتبط است.^{۱۵}

هدف این مطالعه بررسی اثر گذرای miRNA-182 و miRNA-183 بر القای ویژگی‌های شبه‌گیرنده نوری در سلول‌های بنیادی انسانی مشتق از مغز استخوان (hBMSCs) از طریق سنجش مارکرهای اختصاصی شبکیه است. سوالات پژوهش شامل افزایش بیان ژن‌های شبکیه در ۲۴ و ۴۸ ساعت، وابستگی اثرات به زمان و تفاوت پاسخ بین دو miRNA است. فرضیه‌ها عبارتند از افزایش بیان مارکرهای شبکیه توسط هر دو miRNA، اثر بزرگ‌تر در ۴۸ ساعت، و شروع زودهنگام اثر با miRNA-182 در مقابل الگوی دیرتر و گسترده‌تر miRNA-183.

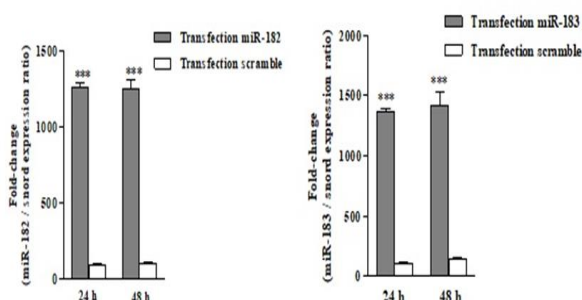
شد. بیان نسبی ژن‌ها با روش $2^{-\Delta\Delta Ct}$ محاسبه و برای نرمال‌سازی، GAPDH به‌عنوان ژن مرجع mRNA و Snord به‌عنوان ژن مرجع miRNA در نظر گرفته شدند. توالی پرایمرها در جدول ۱ ارائه شده است.

با کیت (Thermo Fisher, RevertAid RT K1691) و سنتز cDNA اختصاصی miRNA با کیت BONmiR (بن‌یاخته، ایران) انجام شد. Real-Time PCR کمی با روش SYBR Green و کیت (Takara Bio, ژاپن) روی دستگاه Rotor-Gene 6000 Corbett Life Science اجرا

جدول ۱: توالی پرایمرها مورد استفاده در Real-Time PCR

نام ژن	توالی	اندازه محصول جفت باز	کد شناسایی یا شناسه
CRX	F-GGAGCTGGAGGCACTGT R-ACAAACCTGAACCTGGAC	۱۰۳	>NM_000554.6
OTX2	F-CATGAGGCTGTAAGTTCCAC R-TTGTTTGGAGGTGCAAAGTC	۱۲۶	>NM_021728.4
Protein kinase C alpha (PRKCA)	F- CCCGACACTGATGACCCCA R- AAGTCCATAGAGCAGTGACCC	۹۹	>XM_047436389.1
SLC1A1	F-CATCAGTATCAGGCCACA R-GGCACTCAGCACAATCACCA	۸۸	>XM_011518008.4
Recoverin (RCVRN)	F-GGGACCATCAGCAAGAAT R-GATCTTCTCGGCTCGCTTT	۱۲۳	>NM_002903.3
Rhodopsin (RHO)	F-GTCCAGGTACATCCCCG R-ACGAACATGTAGATGACAA	۱۰۲	>NM_000539.3

دو miRNA در گروه ترانسفکت شده به‌طور معناداری نسبت به کنترل افزایش یافت ($P<0/001$)، که موفقیت ترانسفکشن را تایید می‌کند. آنالیز Real-Time PCR نشان داد که سطح بیان miRNA-182 و miRNA-183 در سلول‌های ترانسفکت شده پس از ۲۴ و ۴۸ ساعت به‌طور قابل توجهی افزایش یافته است ($P<0/001$) و ژن Snord به‌عنوان کنترل داخلی برای نرمال‌سازی داده‌ها استفاده شد (شکل ۱).

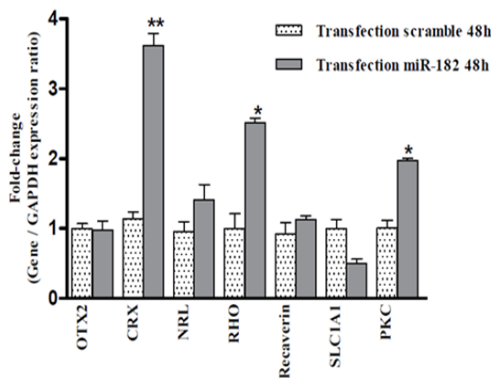


شکل ۱: بیان miRNA-182 و miRNA-183 در سلول‌های hBMSCs ترانسفکت شده با این دو microRNA در مقایسه با گروه کنترل (Scramble)

تحلیل آماری، داده‌ها با SPSS software, version 20 (SPSS تحلیل GenEx و GraphPad Prism, Inc., Chicago, IL, USA) شدند. پس از پیش‌پردازش Real-Time PCR، سطح بیان ژن‌ها ارزیابی شد. با توجه به عدم نرمال بودن داده‌ها (Shapiro-Wilk test)، مقایسه‌ها با آزمون Mann-Whitney U test انجام شد. نتایج به‌صورت میانگین $\pm$ انحراف معیار و بازه اطمینان ۹۵٪ گزارش و ($P<0/05$) معنادار در نظر گرفته شد. محدودیت‌ها شامل انجام آزمایش‌ها در شرایط in vitro با نمونه محدود (سه تکرار بیولوژیک و تکنیکال) و طبیعت اولیه یافته‌هاست، که نیاز به تایید در مطالعات in vivo با حجم نمونه بیشتر دارد.

یافته‌ها

سطح بیان miRNA-182 و miRNA-183 در hBMSCs با Real-Time PCR در ۲۴ و ۴۸ ساعت پس از ترانسفکشن بررسی شد. دو گروه مورد ارزیابی بودند: سلول‌های ترانسفکت شده با miRNA-182 و miRNA-183 و گروه کنترل (Scramble). نتایج نشان داد بیان هر

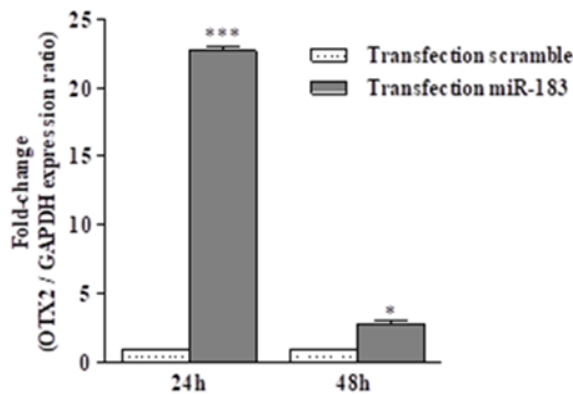


شکل ۳: تغییرات بیان ژنهای OTX2, CRX, NRL, RHO, Recoverin, SLC1A1 و PKC در سلولهای ترانسفکت شده پس از ۴۸ ساعت ($P^{*} < 0.05$) و ($P^{**} < 0.01$)

بازه اطمینان ۹۵٪ (CI) برای تفاوت بیان ژنها در ۴۸

ساعت به شرح زیر است:

OTX2: 0.838–1.165; CRX: 0.697–1.273; NRL: 1.030 – 1.316; RHO: 2.896 – 4.227; Recoverin: 0.755–1.222; SLC1A1: 0.908–1.930; PKC: 0.527–1.498.



شکل ۴: تغییرات بیان ژن OTX2 در سلولهای ترانسفکت شده با miR-183 پس از ۲۴ و ۴۸ ساعت ($P^{*} < 0.05$) و ($P^{***} < 0.001$).

بازه اطمینان ۹۵٪ (CI) برای تفاوت بیان ژن OTX2 به

شرح زیر است:

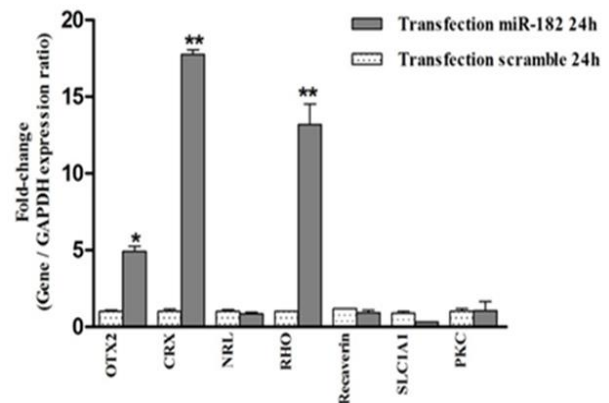
۲۴h: 21.549–23.803

۴۸h: 2.351–3.398

بیان ژنهای پیش ساز و تمایزی، برای بررسی تاثیر ترانسفکشن بر بیان ژنهای پیش ساز و تمایزی شبکه CRX, OTX2, NRL, SLC1A1, RHO, PKC و Recoverin در Real-Time PCR در بازه های ۲۴ و ۴۸ ساعت انجام شد.

ترانسفکشن با miRNA-182 موجب افزایش معنادار بیان CRX, OTX2 و RHO پس از ۲۴ ساعت ($P < 0.05$), ($P < 0.001$) و ($P < 0.01$) و افزایش CRX, RHO و PKC پس از ۴۸ ساعت ($P < 0.01$), ($P < 0.05$) و ($P < 0.05$) نسبت به کنترل شد (شکل ۲ و ۳)، که نشان دهنده اثر قابل توجه miRNA-182 بر ژنهای کلیدی تمایزی hBMSCs است.

در بررسی تاثیر miRNA-183 مشاهده شد که بیان ژن OTX2 هم در ۲۴ ساعت ($P < 0.001$) و هم در ۴۸ ساعت ($P < 0.05$) پس از ترانسفکشن نسبت به گروه کنترل، افزایش معناداری داشت (شکل ۴). بالاین حال، در سایر ژنها تفاوت معناداری در زمان ۲۴ ساعت مشاهده نشد.



شکل ۲: تغییرات بیان ژنهای OTX2, CRX, NRL, RHO, Recoverin, SLC1A1 و PKC در سلولهای ترانسفکت شده پس از ۲۴ ساعت ($P^{*} < 0.05$) و ($P^{**} < 0.01$)

بازه اطمینان ۹۵٪ (CI) برای تفاوت بیان ژنها در ۲۴

ساعت به شرح زیر است:

OTX2: 3.377– 4.448; CRX: 16.21–17.29; NRL: – 0.401– 0.079; RHO: 10.16 – 14.27; Recoverin: – 0.462 – 0.087; SLC1A1: – 0.739 – – 0.419; PKC: – 0.431–0.793

بازه اطمینان ۹۵٪ (CI/۹۵) برای تفاوت بیان ژن‌ها پس از ۲۴ ساعت به شرح زیر است:

CRX: 0.435 – 0.554; NRL: 1.000 – 1.125; RHO: 0.634 – 0.766; Recoverin: 0.122 – 0.138; SLC1: 0.372 – 0.374; PKC: 0.607 – 0.624

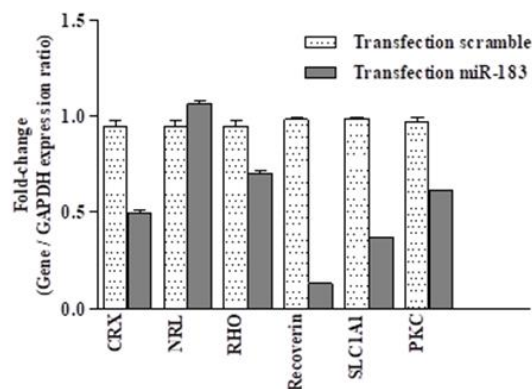
بازه اطمینان ۹۵٪ (CI/۹۵) برای تفاوت بیان ژن‌ها پس از ۴۸ ساعت به شرح زیر است:

CRX: 1.716 – 2.560; NRL: 5.372 – 7.110; RHO: 0.281 – 0.443; Recoverin: 1.311 – 2.574; SLC1: 0.190 – 0.264; PKC: 3.629 – 8.159.

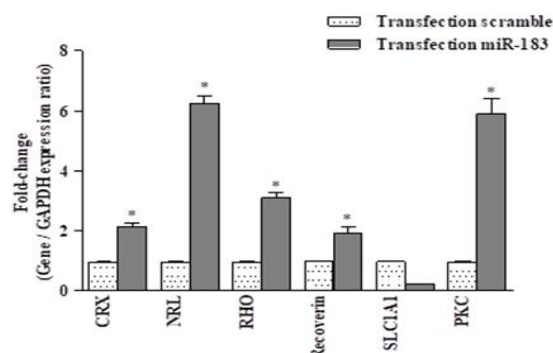
بحث

عملکرد صحیح دستگاه بینایی وابسته به سلامت سلول‌های گیرنده نوری است که قابلیت بازسازی ندارند و آسیب آن‌ها می‌تواند منجر به کاهش بینایی و حتی نابینایی کامل شود. استفاده از hBMSCs به دلیل توانایی بالا در گسترش، تمایز به انواع سلولی و امکان پیوند اتولوگ، به عنوان رویکردی نوین در بازسازی سلول‌های گیرنده نوری امیدبخش است. مطالعات پیشین نشان داده‌اند که پیوند hBMSCs می‌تواند به بازسازی سلول‌های آسیب‌دیده در مدل‌های حیوانی منجر شود.^{۱۶} خانواده miRNA-183 نقش مهمی در تکامل دستگاه بینایی دارد و جهش در این خانواده ژنی با نابینایی مرتبط است. Fan و همکاران نشان دادند که حذف این خوشه ژنی در موش‌ها موجب اختلال عملکرد سلول‌های گیرنده حسی و عصبی می‌شود.^{۱۷} در مطالعه حاضر، سلول‌های hBMSCs با miRNA-182 و miRNA-183 ترانسفکت شده و بیان این miRNA ها به همراه ژن‌های شاخص گیرنده نوری شامل RHO و Recoverin و ژن‌های مرتبط با عملکرد نورونی مانند PKC، OTX2 و CRX بررسی شد. CRX فاکتور کلیدی در برنامه‌ریزی مجدد PBMC ها به سلول‌های شبه گیرنده نوری است.^{۱۸} OTX2 در تمایز نهایی و بلوغ سلول‌های گیرنده نوری سلول‌های دوقطبی شبکیه نقش دارد.^{۱۹} ژن RHO پروتئین رودوپسین را کد می‌کند که مسئول تبدیل نور به سیگنال الکتریکی است و جهش آن با رتینیت پیگمنتوزا مرتبط است.^{۲۰} PKC نقش موثری در تمایز سلول‌های پیش‌ساز شبکیه دارد.^{۲۱} Recoverin در انتقال پیام نوری حیاتی است.^{۲۲} نتایج مطالعه حاضر نشان داد ترانسفکشن

براساس نتایج حاصل از (شکل ۵)، ترانسفکشن سلول‌های hBMSCs با miRNA-183 پس از ۲۴ ساعت موجب تغییر معناداری در سطح بیان ژن‌های CRX، NRL، RHO، Recoverin، SLC1A1 و PKC در مقایسه با گروه کنترل نشد. اما نتایج حاصل از (شکل ۶) نشان دادند که پس از ۴۸ ساعت، بیان ژن‌های CRX، NRL، RHO، Recoverin و PKC به‌طور قابل توجهی نسبت به کنترل افزایش یافته‌اند ($P < 0.05$). این نتایج نشان می‌دهند که تاثیر ترانسفکشن با miRNA-182 و miRNA-183 بر بیان ژن‌های شبکیه، به زمان بستگی دارد. به گونه‌ای که در بازه زمانی ۴۸ ساعته، افزایش بیان ژن‌ها آشکار شده است، درحالی‌که در زمان ۲۴ ساعت، برخی از ژن‌ها واکنشی نشان ندادند.



شکل ۵: بررسی سطح بیان ژن‌های CRX، NRL، RHO، Recoverin، SLC1A1 و PKC در سلول‌های hBMSCs ترانسفکت شده با miRNA-183 پس از ۲۴ ساعت.



شکل ۶: تغییرات بیان ژن‌های CRX، NRL، RHO، Recoverin، SLC1A1 و PKC در سلول‌های ترانسفکت شده با miRNA-183 پس از ۴۸ ساعت ($P < 0.05$).

هدف و عملکرد سلول‌ها در مدل‌های حیوانی دژنراسیون شبکیه با نشانگرهای ژنی و آزمون‌های ERG یا Patch-clamp ضروری است. همچنین مقایسه منابع سلولی hBMSCs، hiPSC و hESC می‌تواند بهترین پلتفرم برای بازسازی بینایی را مشخص کند. محدودیت‌های مطالعه شامل انجام آزمایش‌ها در شرایط *in vitro* با تعداد محدود نمونه‌ها و طبیعت اولیه نتایج است که نیازمند تایید در مطالعات *in vivo* با حجم نمونه بیشتر برای تعمیم‌پذیری است.

نتیجه‌گیری، نتایج نشان می‌دهد افزایش گذرای miRNA-182 و miRNA-183 در hBMSCs تمایز آنها به سلول‌های شبه گیرنده نوری را تقویت می‌کند، که با بیان ژن‌های CRX، OTX2، RHO، Recoverin، PKC و NRL تایید شد. این یافته‌ها پیشنهاد می‌کنند miRNAهای خاص می‌توانند ابزار موثری برای بهبود پروتکل‌های تمایز سلولی در مهندسی بافت شبکیه باشند و در ترکیب با سایر تکنیک‌های مولکولی و فاکتورهای تمایزی، مسیر توسعه درمان‌های بازساختی برای بیماری‌های تحلیل‌برنده شبکیه را هموار کنند. با این حال، بررسی‌های بیشتر در مدل‌های حیوانی و مطالعات عملکردی برای تایید نتایج و کاربرد بالینی ضروری است.

سپاسگزاری: این مقاله حاضر برگرفته از پایان نامه تحت عنوان "بررسی بیومارکرهای تمایزی فتورسپتور در سلول‌های مزانشیمی مغز استخوان انسانی تحت تاثیر ترنسفکت miRNA-182" در مقطع دکتری عمومی در سال ۱۳۹۸-۱۳۹۹ با کد گرنت ۵۰۱۷ در دانشگاه علوم پزشکی شهر کرد اجرا شده است.

hBMSCs با miRNA-182 و miRNA-183 منجر به افزایش بیان RHO، PKC، OTX2، NRL، Recoverin و CRX شد. این یافته‌ها با مطالعه Davari و همکاران همسو است که نشان دادند ترانسفکشن سلول‌های hRPE با miR-183، miR-96 و miR-182 به تمایز نورونی و افزایش بیان ژن‌های خاص شبکیه مانند OTX2، NRL، PDC و DCT منجر شد و بیان پروتئین‌های اختصاصی رودوپسین، CRX، Red Opsin و مارکر سلول‌های گانگلیونی Thy1 مشاهده گردید.^{۲۳} مطالعات دیگر با استفاده از ناقل‌های ویروسی Sendai یا عوامل تمایزی مانند B27، Dkk1، Noggin، IGF-1 و FGF نیز تمایز موفق سلول‌های بنیادی به سلول‌های شبکیه‌ای را گزارش کردند.^{۲۴، ۲۵} خوشه miR-183/96/182 نشان داده است که بیان CRX و RHO را افزایش می‌دهد و تمایز سلول‌های بنیادی به سلول‌های گیرنده نوری را تحریک می‌کند.^{۲۵} با این حال، استفاده ترکیبی از miRNA-182 و miRNA-183 ممکن است اثربخشی مسیرهای تمایز را نسبت به کل خوشه کاهش دهد، احتمالاً به دلیل اثرات رقابتی یا سرکوبی مسیرهای فعال‌شده توسط دیگر miRNAها. مطالعات تکاملی و بیماری‌شناسی نشان داده‌اند که این خوشه در گونه‌های مختلف حفظ شده و جهش یا کاهش بیان آن با دژنراسیون رتینال و اختلالات عملکردی مرتبط است.^{۲۶-۲۹} بهبود نتایج می‌تواند از طریق استفاده از محیط‌های کشت تعریف‌شده، فاکتورهای اختصاصی، سیستم‌های ترانسفکشن ویروسی با راندمان بالا، ارزیابی دوز-پاسخ miRNA و ترکیب با فاکتورهای رونویسی CRX و OTX2 حاصل شود. بررسی اپی‌ژنتیک ژن‌های

References

1. Flaxman SR, Bourne RRA, Resnikoff S, et al. Global causes of blindness and distance vision impairment 1990–2020: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Glob Health*. 2017;5(12):e1221–34.
2. da Cruz L, Fynes K, Georgiadis O, et al. Phase 1 clinical study of an embryonic stem cell-derived retinal pigment epithelium patch in age-related macular degeneration. *Nat Biotechnol*. 2018;36(4):328–37.
3. Liu Y, Chen SJ, Li SY, et al. Long-term safety of human retinal progenitor cell transplantation in retinitis pigmentosa patients. *Stem Cell Res Ther*. 2017;8(1):209.
4. Gonzalez-Cordero A, West EL, Pearson RA, et al. Photoreceptor precursors derived from three-dimensional embryonic stem cell cultures integrate and mature within adult degenerate retina. *Nat Biotechnol*. 2013;31(8):741–7.
5. Salehi H, Rahmani S, Asgari HR, et al. Role of bone marrow-derived mesenchymal stem cells in retinal degeneration. *J Cell Biochem*. 2018;119(1):299–311.
6. Mead B, Berry M, Logan A, et al. Stem cell treatment of degenerative eye disease. *Stem Cell Res*. 2015;14(3):243–57.
7. Johnson TV, Martin KR. Development and characterization of an adult retinal explant organotypic tissue culture system as an *in vitro* intraocular stem cell transplantation model. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2008;49(8):3503–12.
8. Gaddam S, Ventura-Silva AP, Pritchard MA, et al. Systemic administration of bone marrow-derived stem cells modulates degeneration and regeneration in degenerative retinal diseases. *Stem Cell Res Ther*. 2020;11(1):1–11.
9. Xiang M. Intrinsic control of mammalian retinogenesis. *Cell Mol Life Sci*. 2013;70(15):2519–32.
10. Busskamp V, Krol J, Nelidova D, et al. miRNAs 182 and 183 are necessary to maintain adult cone photoreceptor outer segments and visual function. *Neuron*. 2014;83(3):586–600.
11. Lumayag S, Haldin CE, Corbett NJ, et al. Inactivation of the microRNA-183/96/182 cluster results in syndromic retinal degeneration. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2013;110(6):E507–16.

12. Barishak YR. Embryology of the eye and its adnexa. *Dev Ophthalmol*. 2017;60:1–2.
 13. Fan Y, Wu J, Wang X, et al. Conditional knockout of miR-183/96/182 cluster in retina leads to multiple retinal dysfunction. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2017;58(8):2768–76.
 14. Ghinia MG, Aponte JD, Burns ME, et al. Expression and function of microRNAs in the vertebrate retina. *Cell Tissue Res*. 2014;356(1):187–99.
 15. Xiang L, Chen S, Wang L, et al. Downregulation of miR-183/96/182 cluster is associated with photoreceptor degeneration in retinitis pigmentosa. *Cell Death Dis*. 2017;8(4):e2721.
 16. Ng TK, Fortino VR, Pelaez D, et al. Progress of mesenchymal stem cell therapy for degenerative retinal diseases. *World J Stem Cells*. 2014;6(1):111–9.
 17. Fan Y, Chen J, Zhang C, et al. Functional loss of miR-183/96/182 cluster results in syndromic retinal degeneration and disruption of photoreceptor function. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2017;58(8):2768–76.
 18. Komuta Y, Haruta M, Kosaka M, et al. Embryonic stem cell-derived photoreceptor precursor-like cells induce visual function after transplantation into a degenerate retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2010;51(4):2052–60.
 19. Koike C, Nishida A, Ueno S, et al. Functional roles of Otx2 transcription factor in postnatal mouse retinal development. *Mol Cell Biol*. 2007;27(23):8318–29.
 20. Wright AF, Chakarova CF, Abd El-Aziz MM, et al. Photoreceptor degeneration: genetic and mechanistic dissection of retinitis pigmentosa. *Nat Rev Genet*. 2010;11(4):273–84.
 21. He L, Hannon GJ. MicroRNAs: small RNAs with a big role in gene regulation. *Nat Rev Genet*. 2004;5(7):522–31.
 22. Duda T, Pertzov A, Sharma RK. Vertebrate photoreceptor sensory cilia as calcium-modulated signaling organelles: a novel role for recoverin in cGMP synthesis. *Mol Cell Biochem*. 2015;407(1–2):1–15.
 23. Davari M, Talaei-Khozani T, Talaei-Khozani M, et al. MicroRNA-mediated conversion of human retinal pigment epithelium cells to photoreceptor-like cells. *Mol Cell Probes*. 2020;54:101667.
 24. Osakada F, Ikeda H, Mandai M, et al. Toward the generation of rod and cone photoreceptors from mouse, monkey and human embryonic stem cells. *Nat Biotechnol*. 2008;26(2):215–24.
 25. Avellino R, Carrella S, Pirozzi M, et al. miR-183 family and its regulative loop in the retina. *Cell Mol Life Sci*. 2017;74(12):2015–30.
 26. Yeh L-K, Chen W-L, Li W-J, et al. miR-183 regulates cell proliferation and survival by targeting the AKT/mTOR pathway in zebrafish embryos. *Int J Mol Sci*. 2019;20(10):2460.
 27. Conte I, Banfi S. miR-183 cluster: a new key player in retinal degeneration. *J Ophthalmol*. 2014;2014:1–9.
 28. Karali M, Peluso I, Marigo V, et al. Identification and characterization of microRNAs expressed in the mouse eye. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2007;48(2):509–15.
- Pierret C, Morrison M, Lagali PS. miRNA Regulation of Photoreceptor Development and Function. In: Tombran-Tink J, Barnstable CJ, eds. *Retinal Degenerative Diseases. Advances in Experimental Medicine and Biology*, vol 1185. Springer, Cham; 2019.

The transient role of miR-182 and miR-183 expression in inducing photoreceptor-like characteristics in human bone marrow-derived mesenchymal stem cells

Samaneh Arab Ph.D.¹
 Mohammad-Reza
 Mahmoudian-Sani Ph.D.²
 Najmeh Fattahi Ph.D.³
 Zakiye Ekhlasi M.D.⁴
 Samira Asgharzade Ph.D.^{4*}

1- Department of Tissue
 Engineering and Applied Cellular
 Sciences, Faculty of Medicine,
 Semnan University of Medical
 Sciences, Semnan, Iran.

2- Thalassemia and
 Hemoglobinopathy Research
 Center, Health research institute,
 Ahvaz Jundishapur University of
 Medical Sciences, Ahvaz, Iran.

3- Cellular and Molecular Research
 Center, Basic Health Sciences
 Institute, Shahrekord University of
 Medical Sciences, Shahrekord, Iran.

4- Clinical Biochemistry Research
 Center, Basic Health Sciences
 Institute, Shahrekord University of
 Medical Sciences, Shahrekord, Iran.

* Corresponding author: Clinical
 Biochemistry Research Center, Basic
 Health Sciences Institute, Shahrekord
 University of Medical Sciences,
 Shahrekord, Iran.
 Tel: +98-3833346691
 E-mail: Asgharzade1396@gmail.com.

Abstract

Received: 10 Jun. 2025 Revised: 17 Jun. 2025 Accepted: 16 Jul. 2025 Available online: 23 Jul. 2025

Background: Retinal photoreceptor degeneration is a major cause of blindness. Stem cell therapies offer promise, and the miR-183/96/182 cluster, particularly miR-182 and miR-183, plays a crucial role in photoreceptor development and survival. Targeting these miRNAs may enhance human bone marrow-derived mesenchymal stem cells (hBMSCs) differentiation into photoreceptor-like cells, improving their therapeutic potential.

Methods: This in vitro study was conducted from April 2019 to March 2021 at the Clinical Biochemistry Research Center, Shahrekord University of Medical Sciences. hBMSCs were cultured in DMEM with fetal bovine serum and transfected with miR-182 and miR-183 mimics using Lipofectamine, with a scramble miRNA control. Transfection efficiency and miRNA overexpression were evaluated at 24 and 48 hours using real-time PCR. miRNA expression was normalised to Snord, while mRNA levels were normalised to GAPDH using the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method. Photoreceptor-like differentiation was assessed by measuring the expression of retina-specific transcription factors and markers (OTX2, CRX, NRL, SLC1A1, PKC α , Recoverin, and RHO). Statistical analyses included the Shapiro–Wilk test for normality and the Mann–Whitney U test for group comparisons. Data were reported as Mean $\pm$ SEM, with 95% confidence intervals, and significance set at $\alpha = 0.05$.

Results: Transfection of miR-182 and miR-183 significantly increased miRNA levels at 24–48 hours ($P < 0.001$) compared to the scramble control. This led to a marked upregulation of retinal-related genes, including CRX, OTX2, PKC α , Recoverin, NRL, and RHO, indicating activation of the photoreceptor gene network. Time-resolved analysis revealed stronger effects at 24–48 hours, supporting a transient window for pro-differentiation. RHO and CRX exhibited the most significant increases, while OTX2 and PKC α showed parallel rises, suggesting coordinated activation of early and intermediate photoreceptor programs. Scramble controls did not show comparable changes.

Conclusion: Transient overexpression of miR-182 and miR-183 in hBMSCs activates a photoreceptor-like gene expression program, promoting differentiation toward photoreceptor-like cells. This finding supports the potential use of miR-182/183 in stem cell-based therapies for retinal degeneration. Further studies should confirm protein expression, functional outcomes, and in vivo efficacy.

Keywords: human bone marrow-derived mesenchymal stem cells, miRNA-182, miRNA-183, photoreceptor cells.