

Gene Expression Profile Alterations during Stem Cell Differentiation into Nucleus Pulposus Cells: An *in-Silico* Study

Akram Gholipour¹, Mahshid Malakootian¹, Maziar Oveisee^{2*}

1. Cardiogenetic Research Center, Rajaie Cardiovascular Medical and Research Center, Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran.
2. Department of Orthopedics, School of Medicine, Bam University of Medical Sciences, Bam, Iran.

Received: February 22, 2022; Accepted: July 23, 2022

Abstract

Background and Aim: Although the degeneration of nucleus pulposus cells (NPCs) is one of the main causes of intervertebral disc degeneration, the molecular complications of this disease have yet to be clarified. The ability of stem cells to differentiate into different types of cells, especially NPCs, has attracted much attention. This study aimed to investigate the role of genes with differential expressions in stem cell differentiation into NPCs and to identify the salient signaling pathways involved. Since there has not been an extensive study on the important genes of NPC cell differentiation, it is necessary to investigate this process.

Methods: RNA-sequencing raw files of stem cell samples and differentiated NPCs with the accession number GSE122429 from the GEO database. The samples were analyzed, and genes with differential expressions were isolated in the R programming language with the Limma package via logarithmic fold changes (logFC) $\neq 3$ and adjusted *P*-values < 0.05 . Functional analysis was conducted on the signaling pathways and biological processes of the differentially expressed genes using the Enrichr database.

Results: In NPCs, 170 genes were upregulated, and 102 genes were downregulated. The functional analysis revealed that the differentially expressed genes were mostly involved in the extracellular matrix organization, collagen organization, and positive cellular processes. The study of signaling pathways identified the neural crest differentiation pathway as the most significant pathway in the evaluated samples. Considering logFC $\neq 3$, overexpression was detected in *MSX2*, *OLIG3*, *WNT3A*, *TWIST1*, *PAX3*, *RHOB*, *CDH6*, *COL2A1*, *CDH1*, *ZIC1*, *PMP22*, *SNAI2*, and *MSX1*, all of which are involved in the neural crest differentiation pathway.

Conclusion: Our results should expand the knowledge of the molecular pathways involved in stem cell differentiation into NPCs and proffer new clues to the treatment of intervertebral disc degeneration. Nonetheless, more detailed molecular studies are needed to determine the reliable biomarkers of NPCs.

Keywords: NPCs, Differentiation markers, Stem cells, Intervertebral disc degeneration

Please cite this article as: Gholipour A, Malakootian M, Oveisee M. Gene Expression Profile Alterations during Stem Cell Differentiation into Nucleus Pulposus Cells: An *in-Silico* Study. *Pejouhesh dar Pezeshki*. 2022;46(4):81-90.

*Corresponding Author: Maziar Oveisee; Email: maziar.oveisee@gmail.com

بررسی بیوانفورماتیکی تغییرات بیانی ژن‌های مؤثر در تمایز سلول‌های بنیادی به سلول‌های Nucleus Pulposus Cells

اکرم قلی پور^۱، مهشید ملکوتیان^۱، مازیار اویسی^{۲*}

۱- مرکز تحقیقات کاردیو ژنتیک، مرکز آموزشی، تحقیقاتی و درمانی قلب و عروق شهید رجایی، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران.

۲- گروه ارتوپدی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی بم، ایران.

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۱۲/۰۳ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۵/۰۱

خلاصه

سابقه و هدف: دژنه شدن سلول‌های هسته پالپوزوس (NPCs) یکی از عوامل اصلی دژنراسیون دیسک بین مهره‌ای است. درمان‌های فعلی محدود به تسکین علائم بوده و بر روی بازسازی سلول‌های NP از دست رفته و ترمیم ساختار دیسک اصلی تمرکز نمی‌کنند. از آنجا که پیچیدگی‌های مولکولی این بیماری هنوز به خوبی شناخته نشده است، توانایی سلول‌های بنیادی برای تمایز به انواع سلول‌ها، خصوصاً تمایز به سلول‌های NPCs توجه زیادی را به خود جلب کرده است. هدف از این مطالعه بررسی و معرفی ژن‌های دارای تفاوت بیان در تمایز سلول‌های بنیادی به NPCs و شناسایی مسیرهای مولکولی مهم در فرآیند تمایز است. از آنجا که در ارتباط با ژن‌های مهم تمایز سلول‌های NPC تاکنون مطالعه‌ای گسترده‌ای انجام نگرفته است، نیاز است بررسی بر روی این مسیر انجام شود.

روش کار: ابتدا فایل‌های خام حاصل از RNA-sequencing سلول‌های بنیادی و NPCs تمایز یافته، از دیتاست با شماره GSE122429 از پایگاه داده GEO به دست آمد و مراحل آنالیز نمونه‌ها انجام شد. ژن‌های دارای تفاوت بیان با بررسی دو پارامتر آماری $\log_2(\text{FC}) \neq 3$ و $\text{Adjusted p-values} < 0.05$ در زبان برنامه نویسی R و با پکیج Limma جداسازی شد. سپس، آنالیز عملکردی ژن‌ها از جمله مسیرهای سیگنالینگ، فرآیندهای بیولوژیکی ژن‌های دارای تفاوت بیان در مسیر تمایز توسط پایگاه داده Enrichr بررسی شد.

یافته‌ها: نتایج آنالیز بیان داده‌ها، افزایش بیان ۱۷۰ ژن و کاهش بیان ۱۰۲ ژن را در سلول‌های تمایز یافته نشان داد. همچنین با بررسی آنالیزهای عملکردی مشخص شد ژن‌های دارای تفاوت بیان در سازماندهی ماتریکس خارج سلولی، سازماندهی کلاژن و تنظیم مثبت فرآیندهای سلولی دخالت دارند. بررسی مسیرهای سیگنالینگ مشخص کرد مسیر تمایز Neural Crest مهم‌ترین مسیر دخیل در بین نمونه‌های مورد بررسی بود که ژن‌های *OLIG3*, *MSX2*, *logFC* و $\text{Adjusted p-values} < 0.05$ در این مسیر تأثیر داشته و افزایش بیان داشتند.

نتیجه‌گیری: به نظر می‌رسد که دانسته‌های ما از مسیرهای مولکولی دخیل در فرآیند تمایز سلول‌های NPC کمک کرد و بررسی‌های مولکولی دقیق‌تر منجر به دستیابی به ژن‌های قابل اعتماد برای شناسایی بیومارکرهای تمایز سلول‌های NPC خواهد شد که به این ترتیب سرنخ‌های جدیدی برای درمان دژنراسیون دیسک بین مهره‌ای فراهم می‌شود.

واژگان کلیدی: سلول‌های NPCs؛ مارکرهای تمایزی؛ سلول‌های بنیادی؛ دژنراسیون دیسک بین مهره‌ای

به این مقاله، به صورت زیر استناد کنید:

Gholipour A, Malakootian M, Oveisee M. Gene Expression Profile Alterations during Stem Cell Differentiation into Nucleus Pulposus Cells: An *in-Silico* Study. *Pejouhesh dar Pezeshki*. 2022;46(4):81-90.

*نویسنده مسئول مکاتبات: مازیار اویسی؛ آدرس پست الکترونیکی: maziar.oveisee@gmail.com

مقدمه

دژنراسیون دیسک بین مهره‌ای^۱ (IDD) یکی از دلایل اصلی کمردرد است که کیفیت زندگی را در بیش از ۵۰ درصد از جمعیت جهان مختل می‌کند و درمان‌های رایج و سنتی همچنان در بسیاری از موارد در بهبود کیفیت زندگی بیمار تاثیرگذار نیست (۱). دیسک بین مهره‌ای از سه بافت وابسته به هم تشکیل شده است: هسته پالپوزوس که ساختار ژلاتینی هیدراته مرکزی است. این هسته مابین صفحه غضروفی در انتهای مهره مجاور قرار گرفته است و توسط ساختار فیبروز حلقوی احاطه شده است (۲). عملکرد این هسته توزیع فشار هیدرولیک در همه جهات در هر دیسک تحت فشار بالا است. این هسته شامل فیبریل‌های کلاژن، پروتئوگلیکان‌ها و فیبرونکتین/لامینین‌ها و سلول‌های هسته پالپوزیس هستند. سلول‌های این سه بخش، پروتئین‌های ماتریکس خارج سلولی (ECM) مانند کلاژن‌ها، پروتئوگلیکان‌ها و فیبرونکتین/لامینین‌ها را سنتز می‌کنند که یکپارچگی ساختاری و عملکردی دیسک را حفظ می‌کنند (۳).

سلول‌های هسته پالپوزیس (NPCs) در محیطی قرار دارند که منبع عروقی محدودی دارد و از طریق گلیکولیز بی‌هوازی انرژی تولید می‌کند. سلول‌ها کلاژن II و X را سنتز می‌کنند، فاکتور قابل القای هیپوکسی-۱ را بیان می‌کنند و اینترلوکین-۱، -۶ و -۱۰ و فاکتور تحریک‌کننده-کلنی ماکروفاژ-گرانولوسیت را ترشح می‌کنند. از سویی دیگر، فشار مکانیکی (mechanical stress) بر روی سلول‌های هسته پالپوزوس سبب افزایش تکثیر سلولی می‌شود. در طول تکامل، NPC از تقسیم‌بندی نوتوکورد جنینی تشکیل می‌شود، ساختاری میله‌مانند که رشد طولی را هدایت می‌کند و سیگنال‌هایی را برای القا و الگوبرداری از اسکروتوم تولید می‌کند که سبب ایجاد اجسام مهره‌ها می‌شود (۴، ۵). سلول‌های NPC جنین انسان با حضور سلول‌های بزرگ شبه نوتوکورد واکوئله^۲ (NCL) مشخص می‌شوند، در حالی که

سلول‌های کوچک شبیه سلول‌های غضروفی غیر واکوئله^۳ (CLCs) در سلول‌های NPC بالغ وجود دارند (۶، ۷). مطالعات بسیاری نشان داده‌اند که سلول‌های NPC مانند، پتانسیل بالایی را در بازسازی دیسک‌های بین مهره‌ای نشان داده‌اند و مسئول حفظ هموستاز بافت هستند (۸، ۹). همچنین مشخص شده است که تکنولوژی سلول‌های بنیادی پرتوان القایی هم می‌تواند منبع دیگری برای تمایز به انواع سلول‌ها در شرایط آزمایشگاه^۴ باشند. در مجموع سلول‌های هسته پالپوزوس یک مدل آزمایشگاهی مناسب برای مطالعه رویدادهای سلولی و مولکولی درگیر در دژنراسیون دیسک، مهندسی بافت و سلول درمانی برای اختلالات دیسک ستون فقرات^۵ ارائه می‌کنند. اخیراً مطالعات سلول درمانی برای درمان بیماری تحلیل دیسک نتایج امیدوارکننده‌ای برای استفاده از این سلول‌ها در درمان نشان داد. اما همچنان این مساله که سلول‌های پیوند شده (منتقل شده) به بافت سالم به هسته پالپوزوس تبدیل شوند مساله چالش برانگیزی است و بسیار مهم است که بدانیم آیا سلول‌های پیوندی سبب ایجاد بافت سالم هسته پالپوزوس NPC می‌شود یا خیر؟ ضمن اینکه باید توجه داشت که فنوتیپ سلول NPC منحصر به فرد است و با بیان مجموعه مشخصی از ژن‌ها که نشان‌دهنده فیزیولوژی و عملکرد تخصصی این سلول‌ها هستند، تعریف می‌شود. (۱۰، ۸) در نتیجه از آنجا که در ارتباط با ژن‌های مهم سلول‌های تمایز یافته NPC از سلول‌های بنیادی همه توان، تاکنون مطالعه‌ای گسترده‌ای انجام نگرفته است، نیاز است فرآیندهای درگیر در مسیر تمایز این سلول‌ها بررسی شود. بنابراین، هدف از انجام این مطالعه این است که با استفاده از آنالیزهای بیوانفورماتیکی به بررسی پروفایل ژن‌های دارای تفاوت بیان در بین سلول‌های بنیادی جنینی و سلول‌های NPC تمایز یافته از آن پرداخته و مسیرهای مولکولی مرتبط با ژن‌های دارای تفاوت بیان را در این سلول‌ها نشان دهیم.

³ .non- vacuolated chondrocyte like cells⁴ .in vitro⁵ Spine disc disorders¹ .Intervertebral disc degeneration² .vacuolated notochord- like cells

روش کار

به دست آوردن دیتاست و نمونه‌های مورد بررسی:

در این مطالعه از داده‌های بیوانفورماتیکی استفاده شده است که دیتاسیت استفاده شده در مطالعه حاضر با شماره GSE122429، از پایگاه داده (GEO) NCBI Gene Expression Omnibus (GEO) دانلود شد. نمونه‌های RNA-sequencing شامل ۳ تکرار سلول‌های بنیادی (hESC / iPSCs) و ۱۲ تکرار از سلول‌های Nucleus Pulposus Cells (NPC) تمایز یافته از انواع سلول‌های بنیادی hESC / iPSCs هستند (۱۱).

آنالیز بیوانفورماتیکی داده‌های خام نمونه‌ها:

در ابتدا فایل‌های خام داده‌ها، با استفاده از نرم‌افزار FastQC (۱۲) بررسی شد تا از نظر کیفیت خوانش‌ها بررسی شوند. سپس برای از بین بردن توالی‌های آدپتور و خوانش‌های نامناسب از Trimmomatic, version 0.36 استفاده شد (۱۳). همچنین بعد از این مرحله نیز، کیفیت خوانش‌ها با نرم‌افزار FastQC بررسی و تأیید شد. هم ردیف کردن توالی‌ها با ژنوم hg38 توسط HISAT2, version 2.1.0 انجام گرفت (۱۴). در ادامه، RefSeq به دست آمده از پایگاه داده UCSC، به عنوان رفرنس annotation برای ژن‌ها استفاده شد. میزان خوانش هر ژن نیز با HTSeq, version 0.9.1 آنالیز شد (۱۵). در ژن‌های دارای تفاوت بیان بین سلول‌های بنیادی و سلول‌های NPC تمایز یافته مشخص شدند. برای انجام آنالیزهای آماری از زبان برنامه نویسی R و پکیج limma که یکی از نرم‌افزارهای آنالیز آماری جدید است و در بررسی مطالعات بیان ژن کاربرد دارد، استفاده شد. پکیج R Limma برای تجزیه و تحلیل داده‌های بیان ژن، به ویژه استفاده از مدل‌های خطی برای تجزیه و تحلیل آزمایش‌های طراحی شده در ارزیابی ژن‌های دارای بیان متمایز استفاده می‌شود. Limma توانایی تجزیه و تحلیل مقایسه‌ای بین بسیاری از ژن‌ها را به طور همزمان در آزمایش‌های طراحی شده فراهم می‌کند (۱۶). در این مطالعه ژن‌های معنادار بین سلول‌های بنیادی و سلول‌های NPC تمایز یافته، با در نظر

گرفتن دو پارامتر آماری $\log\text{FoldChanges}(\log\text{FC}) \neq 3$ و Adjusted p-values < 0.05، که از جمله فاکتورهای مهم برای تأیید معناداری آماری در پکیج limma است، جداسازی شدند، که این ژن‌های به دست آمده با پارامترهای آماری ذکر شده، احتمال دارد در فرآیندهای مهم تمایز سلول‌های NPC نقش داشته و در ادامه آنالیزها، از آنها استفاده خواهد شد.

آنالیز عملکردی برای ژن‌های دارای تفاوت بیان:

با استفاده از پایگاه داده Enrichr (http://amp.pharm.mssm.edu/Enrichr) نیز Gene Ontology (GO) که شامل فرآیندهای بیولوژیکی (BP^۱)، عملکردهای مولکولی (MF^۲) و محتوای سلولی (CC^۳) است، آنالیز شد. همچنین با استفاده از پایگاه داده WikiPathway 2021، مسیرهای مهمی که ژن‌های دارای تفاوت بیان بین نمونه‌های بیمار و نرمال در آن دخیل بودند بررسی شد. در ادامه ژن‌های مهم‌ترین مسیر دخیل در تمایز سلول‌های بنیادی به سلول‌های NPC بررسی شد.

یافته‌ها

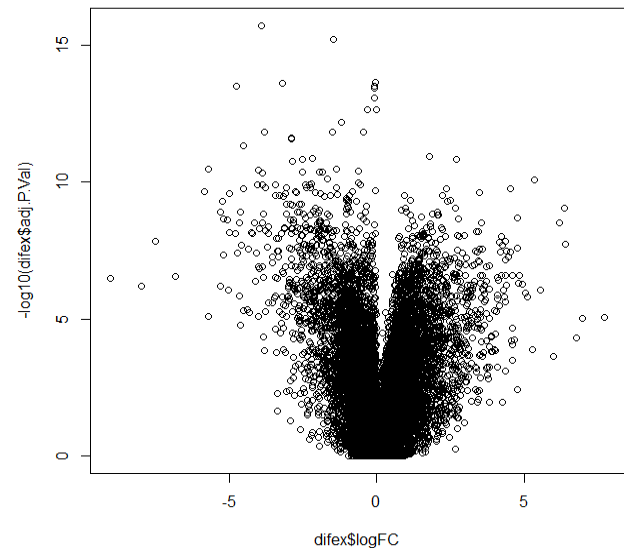
ژن‌های دارای تفاوت بیان بین سلول‌های NPC تمایز یافته و سلول‌های بنیادی:

نتایج ما نشان داد که با در نظر گرفتن دو پارامتر $\log\text{FoldChanges}(\log\text{FC}) \neq 3$ و Adjusted p-values < 0.05، ۲۷۲ ژن دارای تفاوت بیان معنادار در بین دو گروه بودند که از این بین، ۱۷۰ ژن در بین سلول‌های تمایز یافته NPC و سلول‌های بنیادی دارای افزایش بیان و ۱۰۲ ژن نیز کاهش بیان داشتند. نمودار آتشفشانی در شکل ۱ میزان ژن‌های دارای تفاوت بیان را در بین نمونه‌های مورد بررسی نشان داده است. همچنین اسامی ژن‌ها در جدول ضمیمه ۱ قرار گرفته است.

¹. Biological Process². Molecular Function³. Cellular Component

نتایج آنالیز عملکردی ژن‌های دارای تفاوت بیان:

آنالیزهای GO شامل فرآیندهای بیولوژیکی، عملکردهای مولکولی و بررسی محتوای سلولی بررسی شد. آنالیز فرآیندهای بیولوژیکی (BP) ژن‌های دارای تفاوت بیان در بین نمونه‌های ذکر شده بررسی و مشخص شد که ژن‌های دارای تفاوت بیان در فرآیندهای بیولوژیکی مانند سازماندهی ماتریکس خارج سلولی، سازماندهی کلاژن و تنظیم مثبت فرآیندهای سلولی دخالت دارند. همچنین بررسی عملکردهای مولکولی (MF) مشخص کرد که ژن‌های دارای تفاوت بیان در عملکردهای مولکولی مانند تنظیم *cis* برای RNA polymerase II، تنظیم اتصالات خاص توالی DNA و فعالیت ریسپتور- لیگاند نقش دارند. بررسی محتوای سلولی (CC) نیز نشان داد که ژن‌های دارای تفاوت بیان می‌توانند در ماتریکس خارج سلولی حاوی کلاژن، شبکه آندوپلاسمی و نورون projection حضور داشته باشند که در جدول (1A-C) مشخص شده‌اند.



شکل ۱- نمودار آتش‌فشانی ژن‌های دارای تفاوت بیان.

در این نمودار، نقاط نشان‌دهنده ژن‌های دارای تفاوت بیان بین نمونه‌های سلول‌ای تمایز یافته NPC و سلول‌های بنیادی هستند که از این بین ۲۷۲ ژن با بررسی فاکتور $\log_2\text{FoldChanges} \neq 3$ دارای تفاوت بیان معنادار هستند.

جدول ۱- A) فرآیندهای بیولوژیکی (BP)

Number	Name	P-value	Adjusted p-value
1	extracellular matrix organization (GO:0030198)	9.973e-10	0.000001883
2	collagen fibril organization (GO:0030199)	2.943e-9	0.000002779
3	positive regulation of cellular process (GO:0048522)	9.203e-9	0.000005792
4	extracellular structure organization (GO:0043062)	4.716e-8	0.00001899
5	external encapsulating structure organization (GO:0045229)	5.030e-8	0.00001899
6	regulation of cell migration (GO:0030334)	2.079e-7	0.00006542
7	supramolecular fiber organization (GO:0097435)	3.743e-7	0.00008871
8	negative regulation of cell differentiation (GO:0045596)	3.759e-7	0.00008871
9	positive regulation of cell population proliferation (GO:0008284)	6.171e-7	0.0001294
10	positive regulation of cell migration (GO:0030335)	9.311e-7	0.0001758

جدول ۱- B) عملکردهای مولکولی (MF)

Number	Name	P-value	Adjusted p-value
1	RNA polymerase II cis-regulatory region sequence-specific DNA binding (GO:0000978)	9.785e-7	0.0001305
2	cis-regulatory region sequence-specific DNA binding (GO:0000987)	9.785e-7	0.0001305
3	sequence-specific DNA binding (GO:0043565)	0.000001456	0.0001305
4	RNA polymerase II transcription regulatory region sequence-specific DNA binding (GO:0000977)	0.000003191	0.0002146
5	receptor ligand activity (GO:0048018)	0.000005154	0.0002773
6	platelet-derived growth factor binding (GO:0048407)	0.00001024	0.0003971
7	double-stranded DNA binding (GO:0003690)	0.00001033	0.0003971
8	frizzled binding (GO:0005109)	0.00009035	0.003038
9	R-SMAD binding (GO:0070412)	0.0001104	0.003221
10	sequence-specific double-stranded DNA binding (GO:1990837)	0.0001198	0.003221

جدول ۱- (C) محتوای سلولی (CC) ژن‌های دارای تفاوت بیان

Number	Name	P-value	Adjusted p-value
1	collagen-containing extracellular matrix (GO:0062023)	4.024e-13	5.714e-11
2	endoplasmic reticulum lumen (GO:0005788)	0.000001984	0.0001409
3	filopodium (GO:0030175)	0.00001325	0.0006270
4	catenin complex (GO:0016342)	0.0007884	0.02799
5	neuron projection (GO:0043005)	0.001669	0.04740
6	platelet alpha granule lumen (GO:0031093)	0.002178	0.05156
7	intracellular organelle lumen (GO:0070013)	0.002957	0.05998
8	endocytic vesicle (GO:0030139)	0.004436	0.07875
9	actin-based cell projection (GO:0098858)	0.005497	0.08041
10	endocytic vesicle membrane (GO:0030666)	0.005964	0.08041

در نمودارهای مشخص شده در قسمت P-value، نماد (عدد e-) برای نوشتن و مقایسه اعداد بسیار بزرگ یا در این مورد بسیار کوچک آسان است و به معنای حرکت دادن نقطه اعشار با توجه به عدد نوشته شده به سمت چپ است.

در ادامه نتایج آنالیز مسیرهای سیگنالینگ دارای Adjusted p-values < 0.05 نشان داد که ژن‌های دارای تفاوت بیان بین سلول‌های تمایز یافته NPC و سلول‌های بنیادی بیشتر در مسیرهای تمایز Neural Crest، آسیب Spinal Cord و هدف قرار گرفتن توسط microRNAهای تنظیم کننده ماتریکس خارج سلولی و گیرنده‌های غشایی دخالت دارند که در جدول ۲ نمایش داده شده است.

جدول ۲- مسیرهای سیگنالینگ دخیل در ژن‌های دارای تفاوت بیان بین سلول‌های تمایز یافته NPC و سلول‌های بنیادی.

Number	Name	P-value	Adjusted p-value
1	Neural Crest Differentiation WP2064	1.150e-9	2.943e-7
2	Cardiac Progenitor Differentiation WP2406	3.663e-8	0.000004689
3	Spinal Cord Injury WP2431	7.461e-8	0.000006202
4	TGF- β Signaling in Thyroid Cells for Epithelial-Mesenchymal Transition WP3859	9.691e-8	0.000006202
5	miRNA targets in ECM and membrane receptors WP2911	3.721e-7	0.00001905
6	Epithelial to mesenchymal transition in colorectal cancer WP4239	0.000002032	0.00008227
7	miR-509-3p alteration of YAP1/ECM axis WP3967	0.000002427	0.00008227
8	ncRNAs involved in Wnt signaling in hepatocellular carcinoma WP4336	0.000002571	0.00008227
9	Endoderm differentiation WP2853	0.000003713	0.0001056
10	Glucocorticoid Receptor Pathway WP2880	0.000004807	0.0001186

در قسمت P-value، نماد (عدد e-) برای نوشتن و مقایسه اعداد بسیار بزرگ یا در این مورد بسیار کوچک آسان است و به معنای حرکت دادن نقطه اعشار با توجه به عدد نوشته شده به سمت چپ است.

همان‌طور که در جدول ۲ مشخص شده است مسیر تمایز Neural Crest مهم‌ترین مسیر دخیل در بین نمونه‌های مورد بررسی بود. مطالعات نشان داد که در این مسیر، ژن‌های *MSX2*، *OLIG3* (logFC = 4.010906)، *WNT3A* (logFC = 4.139237)، *CDH1* (logFC = 3.101393)، *ZIC1* (logFC = 6.350231)، *PAX3* (logFC = 4.104148)، *RHOB* (logFC = 3.619282)، *CDH6* (logFC = 4.355734)، *COL2A1* (logFC = 4.181127) و *TWIST1* (logFC = 3.767965).

پروتئین‌های TWIST1 و TWIST2 در بافت‌های سالم NPC به میزان زیادی بیان شدند، اما در بافت دژنره شده به طور قابل‌توجهی کاهش می‌یابند. علاوه بر این مشخص شد که این ژن‌ها از طریق تأثیر بر مسیر p53/p21 که از نشانگرهای پیری سلولی هستند، مکانیسم عملکردی خود را القا خواهند کرد (۲۱). Song و همکارانش نشان دادند که فعال کردن بیان ژن *P0* و *PMP22* مرتبط با میلین برای ترمیم آسیب عصبی و کمک به بازسازی عصب مناسب است (۲۲). یافته‌های حاصل از این مطالعه در خصوص تغییرات بیان ژن‌های مختلف که در مسیرهایی مانند مسیر تمایز Neural Crest نقش دارند، احتمالاً می‌توانند در تنظیم آسیب‌های وارد شده به Spinal Cord نقش داشته باشند که در نتیجه می‌توانند به عنوان مارکرهای مهم در تنظیم تمایز سلول‌های NPC مورد توجه قرار بگیرند و در نتیجه احتمالاً در ایجاد و یا پیشرفت بیماری دژنراسیون دیسک بین مهره‌ای نیز نقش بسزایی خواهند داشت.

سلول‌های بنیادی پرتوان انسانی (hPSCs) منبع مهمی برای درمان بیماری‌های مختلف از جمله آسیب نخاعی و دژنراسیون اسکلتی هستند (۲۳، ۲۴). تلاش‌هایی برای تمایز hPSC‌ها به سلول‌های NPC مانند گزارش شده است، اما مشکلات متعددی باقی مانده است. مهم‌ترین مشکل نبود مارکرهای مولکولی کلیدی شناسایی‌کننده سلول‌های مشتق شده به عنوان سلول‌های نوتوکوردال جنینی و سلول‌های NPC است (۲۵، ۲۶، ۲۷). مطالعه‌ای نشان داد که زیرمجموعه‌ای از سلول‌های پیش‌ساز NPC مارکرهای GD2 و TIE2 (یک نشانگر سلول اندوتلیال) را بیان می‌کنند (۲۷). اخیراً یک پروتکل سه مرحله‌ای برای تمایز سلول‌های NPC-مانند، در حضور فاکتورهایی مانند TGF- β 3 در شرایط کشت سه بعدی بررسی شده است (۲۵). در مطالعه دیگری، یک پروتکل سه مرحله‌ای تمایز شرح داده شده است که مارکرهای تمایزی اکتیوین A، WNT3A و FGF2، به دنبال آن NT4، FOLLISTATIN و BMP4 و در نهایت TGF- β 1، GDF5 و BMP2 برای تمایز به سلول‌های NPC مانند بررسی شد (۱۸). به علاوه، بیان نشانگرهایی مانند SOX9، COL2A1 در بین سلول‌های NPC مانند از iPSC‌های

PMP22 (logFC = 3.254959)،

SNAI2 (logFC = 4.101619)

MSX1 (logFC = 4.794158) نقش مهمی دارند که میزان پارامتر logFC که از جمله معیارهای معرفی شده برای سطح سنجش معناداری است، مشخص شده است.

بحث

بررسی‌ها نشان داد که ژن‌های *WNT3A*، *OLIG3*، *MSX2*، *CDH1*، *COL2A1*، *CDH6*، *RHOB*، *PAX3*، *TWIST1*، *PMP22*، *SNAI2*، *ZIC1* در سلول‌های NPC افزایش بیان داشتند و این ژن‌ها در تمایز سلول‌های بنیادی به سلول‌های NPC و مسیر تمایز Neural Crest نقش داشتند. در ارتباط با ژن‌های *CDH1*، *COL2A1*، *CDH6*، *RHOB*، *PAX3*، *SNAI2* و *ZIC1* به دست آمده در این مطالعه، در تمایز سلول‌های NPC تاکنون مطالعه‌ای انجام نگرفته است. همچنین آنالیزهای GO نشان داد ژن‌های دارای تفاوت بیان در بین نمونه‌های ذکر شده در فرآیندهای بیولوژیکی مانند سازماندهی ماتریکس خارج سلولی، سازماندهی کلاژن و در عملکردهای مولکولی (MF) مانند تنظیم cis برای RNA polymerase II و فعالیت ریسپتور-لیگاند و همچنین در ماتریکس خارج سلولی حاوی کلاژن، شبکه آندوپلاسمی و نورون تأثیرگذار هستند.

در بررسی Sive و همکارانش مشخص شد، ژن *COL2A1* از جمله نشانگرهای سلول NPC است (۱۷). همچنین Xia و همکارانش نیز نشان دادند که *WNT3A* نیز نشانگرهای سلول NPC است (۱۸) که با نتایج مطالعه ما هم‌راستا است. بررسی توسط Liu و همکارانش نشان دادند که ژن *MSX2* می‌تواند در مراحل اولیه مهم در کرانیوسینوستوز در تمایز سلول‌های استخوانی و متعاقب آن در افزایش مجموعه سلول‌های استخوانی نقش داشته باشد (۱۹). همچنین بررسی توسط Lowenstein و همکارانش نشان داد که *Olig3* به عنوان یک عامل کلیدی در رشد اولیه مخچه است (۲۰). در ادامه Qiu و همکارانش مشخص کردند که دژنره شدن سلول‌های NPC که با TNF- α القا شده بود، مربوط به سطح TWIST1/2 است. زیرا

نتیجه‌گیری و پیشنهادات

نهایتاً یافته‌های حاصل از این مطالعه همراه با بررسی مطالعات در دسترس در پایگاه‌های علمی بیانگر بیان متمایز ژن‌ها در سلول‌های بنیادی جنینی و سلول‌های NPC تمایز یافته حاصل از آنها بوده است که در این راستا ژن‌های مرتبط با مسیر Neural Crest بیشترین تغییرات را نشان دادند. در مجموع این یافته‌ها بیانگر نقش احتمالی این ژن‌ها در تنظیم آسیب‌های مجرای ستون فقرات بوده که باید در مطالعات آینده تجربی و بالینی به عنوان نشانگرهای زیستی در بیماری دژنراسیون دیسک بین مهره‌ای مورد توجه قرار گیرند. در نتیجه از جنبه‌های مثبت این تحقیق این خواهد بود که این مطالعه با استفاده از آنالیز بیوانفورماتیکی، ژن‌های مهم دارای تفاوت بیان بین سلول‌های بنیادی و سلول‌های تمایز یافته NPC را نشان داده و همچنین مشخص شد که ژن‌ها و مسیرهای بسیاری در تمایز سلول‌های NPC نقش دارند که می‌توانند به عنوان مارکرهای مهم در تنظیم تمایز سلول‌های NPC مورد توجه قرار بگیرند. همچنین در این تحقیق محدودیت‌هایی نیز وجود داشت که از آن جمله می‌توان به عدم حضور نمونه‌ها و بررسی‌های آزمایشگاهی اشاره کرد. در نتیجه در ادامه برای آشکارسازی چنین تنظیم‌کننده‌هایی، پیشنهاد می‌شود شبکه تنظیم‌کننده سلول‌های NPC را کاملاً بررسی کرده تا شواهد جدیدی در مورد شبکه تنظیمی IDD ارائه شود، همچنین پیشنهاد می‌شود که برای تایید اثر ژن‌های گزارش شده در این مطالعه بیان این ژن‌ها و عملکرد آنها هم به صورت آزمایشگاهی هم تأیید شوند.

تشکر و قدردانی

نویسندگان مقاله کمال تشکر و قدردانی را از معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی بم و مرکز قلب و عروق شهید رجایی را دارند. جدول ضمیمه ۱ در صورت مکاتبه با نویسنده مسئول در دسترس خواهد بود.

تعارض منافع

نویسندگان، تعارض منافع را گزارش نکرده‌اند.

متمایز موش و برای جداسازی سلول‌های NPC جنین انسان استفاده شده بود (۲۸، ۱۷). همچنین بررسی‌ها نشان داده است که در میان ۱۴۸ ژن شناسایی شده در سلول‌های NPC، ژن‌هایی وجود دارند که که گزارش شده است که عوامل خطر ژنتیکی مرتبط با IDD و یا کمردرد هستند، مانند *COL9A2*، *COL11A1*، *CHST3*، *THBS1* و *SOX5* (۳۶-۲۹).

در بررسی که توسط Xu و همکاران انجام شد، استفاده از تجزیه و تحلیل ترکیبی داده‌های پروتئومی و ترانسکریپتومیک برای شناسایی شبکه‌های تنظیمی جدید سلول‌های هسته پالپوزوس در دژنراسیون دیسک بین مهره‌ای بررسی شد. در این بررسی مشخص شد که شش ژن (*COL6A2*، *KRT19*، *CHI3L1*، *DPT*، *TNFAIP6* و *COL11A2*) تغییرات هماهنگی را در سطح پروتئین و mRNA نشان دادند. تجزیه و تحلیل عملکردی بیشتر نشان داد که این ژن‌ها می‌توانند با تغییر بیان خود به طور قابل توجهی بر دژنراسیون سلول هسته پالپوزوس تأثیر بگذارند و ممکن است نقش حیاتی در پاتوژنز دژنراسیون دیسک بین مهره‌ای ایفا کنند (۳۷). همچنین Tu و همکارانش، وضعیت ترانسکریپتوم سلول‌های NPC انسانی را بررسی کردند که در این مطالعه ویژگی‌های فنوتیپی را در NPC نشان دادند و مشخص کردند که CD24 می‌تواند در ترکیب با CD11b و OLR1 برای تشخیص حضور GMDSCs (granulocytic myeloid-derived suppressor cells) در بافت‌های NPC دژنراتیو استفاده شود. بیان CD24 با شدت دژنره شدن دیسک کاهش می‌یابد در نتیجه بینش جدیدی برای درمان دژنره شدن دیسک ارائه شد (۳۸).

مطالعات و بررسی‌های اپیدمیولوژیک نشان داد که علایمی مانند کمردرد و گردن درد که از اختلالات اسکلتی عضلانی شایعی هستند، ارتباط نزدیکی با نقص‌های عصبی ناشی از دژنراسیون دیسک بین مهره‌ای (IDD) دارد. ناحیه Nucleus pulposus دیسک در طول فرآیند بیماری‌زا آسیب پذیرترین بخش بوده و چنین انحطاطی بر عملکرد طبیعی آن یعنی جذب فشار و حفظ انعطاف‌پذیری ستون فقرات تأثیر می‌گذارد (۴۲-۳۹).

References

1. GBD 2017 Disease and Injury Incidence and Prevalence Collaborators. Global, regional, and national incidence, prevalence, and years lived with disability for 354 diseases and injuries for 195 countries and territories, 1990-2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017. *Lancet* 2018; 392, 1789–1858.
2. Happey F, Johnson A.G, Naylor A, Turner R.L. Preliminary observations concerning the fine structure of the intervertebral disc. *J. Bone Joint Surg. Br* 1964;46, 563–567.
3. Roberts S, Evans H, Trivedi J, Menage J. Histology and pathology of the human intervertebral disc. *J. Bone Joint Surg. Am* 2006; 88 (2):10–14.
4. Lawson L.Y, Harfe B.D. Developmental mechanisms of intervertebral disc and vertebral column formation. *Wiley Interdiscip. Rev. Dev. Biol* 2017; 6.
5. Stemple D.L. Structure and function of the notochord: an essential organ for chordate development. *Development* 2005;132:2503–2512.
6. Risbud M.V, Schoepflin Z.R, Mwale F, Kandel R.A, Grad S, Iatridis J.C, et al. Defining the phenotype of young healthy nucleus pulposus cells: recommendations of the Spine Research Interest Group at the 2014 annual ORS meeting. *J. Orthop. Res* 2015;33:283–293.
7. Rodrigues-Pinto R, Richardson S.M, Hoyland J.A. An understanding of intervertebral disc development, maturation and cell phenotype provides clues to direct cell-based tissue regeneration therapies for disc degeneration. *Eur. Spine J* 2014;23:1803–1814.
8. Perez-Cruet M, Beeravolu N, McKee C, Brougham J, Khan I, Bakshi S, et al. Potential of human nucleus pulposus-like cells derived from umbilical cord to treat degenerative disc disease. *Neurosurgery* 2019;84:272–283.
9. Zhou X, Ma C, Hu B, Tao Y, Wang J, Huang X, et al. FoxA2 regulates the type II collagen-induced nucleus pulposus-like differentiation of adipose-derived stem cells by activation of the Shh signaling pathway. *FASEB J* 2018.
10. Gholipour A, Shakerian F, Zahedmer A, Irani S, Mowla SJ, Malakootian M. The importance of cardiac differentiation of human embryonic stem cells in identifying biomarkers associated with heart disease, *Razi Journal of Medical Science* 2022;28(12): 153-165.
11. Yuelin Zhang, Zhao Zhang, Peikai Chen, Chui Yan Ma, Cheng Li, Tiffany Y K Au, et al. Directed Differentiation of Notochord-like and Nucleus Pulposus-like Cells Using Human Pluripotent Stem Cells, *Cell Rep* 2020;30(8):2791-2806.e5.
12. Andrews, S. (2010). FastQC: A Quality Control Tool for High Throughput Sequence Data [Online]
13. Bolger, A. M., Lohse, M., & Usadel, B. (2014). Trimmomatic: A flexible trimmer for Illumina Sequence Data.
14. Kim, D., Paggi, J.M., Park, C. et al. Graph-based genome alignment and genotyping with HISAT2 and HISAT-genotype.
15. S Anders, T P Pyl, W Huber: HTSeq — A Python framework to work with high-throughput sequencing data.
16. Matthew E. Ritchie, Belinda Phipson, Di Wu, Yifang Hu, Charity W. Law, et al. Smyth. limma powers differential expression analyses for RNA-seq and microarray studies. *Nucleic Acids Research* 2015;43(7):e47.
17. Sive J.I, Baird P, Jeziorsk M, Watkins A, Hoyland J.A, Freemont A.J. Expression of chondrocyte markers by cells of normal and degenerate intervertebral discs. *Mol. Pathol* 2002;55: 91–97.
18. Xia K, Zhu J, Hua J, Gong Z, Yu C, Zhou X, et al. Intradiscal injection of induced pluripotent stem cell-derived nucleus pulposus-like cell-seeded polymeric microspheres promotes rat disc regeneration. *Stem Cells Int* 2019; 6806540.
19. Liu Y, Tang Z, Ramendra K. Kundu R, Wu L, Luo W, Zhu D, et al. Msx2 Gene Dosage Influences the Number of Proliferative Osteogenic Cells in Growth Centers of the Developing Murine Skull: A Possible Mechanism for MSX2-Mediated Craniosynostosis in Humans, *Developmental Biology* 1999;205:260–274
20. Lowenstein ED, Rusanova A, Stelzer J, Hernaiz-Llorens M, E S Adrian, Epifanova E, et al. Olig3 regulates early cerebellar development, *eLife* 2021;10:e64684.
21. Qiu H.B, Bian W.G, Zhang L.J, Mei N, Wu Y, Wei Y-Q, et al. Inhibition of p53/p21 by TWIST alleviates TNF- α induced nucleus pulposus cell senescence in vitro. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences* 2020; 24: 12645-12654.
22. ong W, Jiang W, Wang Ch, Xie J, Liang X, Sun Y, et al. Jinmaitong, a Traditional Chinese Compound Prescription, Ameliorates the Streptozocin-Induced

Diabetic Peripheral Neuropathy Rats by Increasing Sciatic Nerve IGF-1 and IGF-1R Expression. *Frontiers in Pharmacology* 2019; 10.

23. Okubo T, Nagoshi N, Kohyama J, Tsuji O, Shinozaki M, Shibata S, et al. Treatment with a gamma-secretase inhibitor promotes functional recovery in human iPSC-derived transplants for chronic spinal cord injury. *Stem Cell Reports* 2018 11:1416–1432.

24. Sheyn D, Ben-David S, Shapiro G, De Mel S, Bez M, Ornelas L, et al. Human induced pluripotent stem cells differentiate into functional mesenchymal stem cells and repair bone defects. *Stem Cells Transl. Med* 2016;5:1447–1460.

25. Tang R, Jing L, Willard V.P, Wu C.L, Guilak F, Chen J, et al. Differentiation of human induced pluripotent stem cells into nucleus pulposus-like cells. *Stem Cell Res. Ther* 2018;9(61).

26. Zhu Y, Liang Y, Zhu H, Lian C, Wang L, Wang Y, et al. The generation and functional characterization of induced pluripotent stem cells from human intervertebral disc nucleus pulposus cells. *Oncotarget* 2017;8:42700–42711.

27. Sakai D, Nakamura Y, Nakai T, Mishima T, Kato S, Grad S, et al. Exhaustion of nucleus pulposus progenitor cells with ageing and degeneration of the intervertebral disc. *Nat. Commun* 2012;3: 1264.

28. Chen J, Lee E.J, Jing L, Christoforou N, Leong K.W, Setton L.A. Differentiation of mouse induced pluripotent stem cells (iPSCs) into nucleus pulposus-like cells in vitro. *PLoS ONE* 2013; 8: e75548.

29. Annunen S, Paassilta P, Lohiniva J, Pera la M, Pihlajamaa T, Karppinen J, et al. An allele of COL9A2 associated with intervertebral disc disease. *Science* 1999;285:409–412.

30. Dornand J, Sekkat C, Mani J.C, Gerber M. Lipoxigenase inhibitors suppress IL-2 synthesis: relationship with rise of $[Ca^{++}]_i$ and the events dependent on protein kinase C activation. *Immunol. Lett* 1987;16:101–106.

31. Jim J.J, Noponen-Hietala N, Cheung K.M, Ott J, Karppinen J, Sahraravand A, et al. The TRP2 allele of COL9A2 is an age-dependent risk factor for the development and severity of intervertebral disc degeneration. *Spine* 2005;30:2735–2742.

32. Kawaguchi Y, Osada R, Kanamori M, Ishihara H, Ohmori K, Matsui H, et al. Association between an aggrecan gene polymorphism and lumbar disc degeneration. *Spine* 1999;24:2456–2460.

33. Martirosyan N.L, Patel A.A, Carotenuto A, Kalani M.Y, Belykh E, Walker C.T, et al. Genetic alterations in intervertebral disc disease. *Front. Surg* 2016; 3(59).

34. Noponen-Hietala N, Kyllonen E, Mannikko M, Ilkko E, Karppinen J, Ott J, et al. Sequence variations in the collagen IX and XI genes are associated with degenerative lumbar spinal stenosis. *Ann.Rheum.Dis* 2003;62:1208–1214.

35. Song Y.Q, Karasugi T, Cheung K.M, Chiba K, Ho D.W, Miyake A, et al. Lumbar disc degeneration is linked to a carbohydrate sulfotransferase 3 variant. *J. Clin. Invest* 2013;123: 4909–4917.

36. Suri P, Palmer M.R, Tsepilov Y.A, Freidin M.B, Boer C.G, Yau M.S, et al. Genome-wide meta-analysis of 158,000 individuals of European ancestry identifies three loci associated with chronic back pain. *PLoS Gene.* 2018;14:e1007601.

37. Xu Ch, Luo Sh, Wei L, Wu H, Gu W, Zhou W, et al. Integrated transcriptome and proteome analyses identify novel regulatory network of nucleus pulposus cells in intervertebral disc degeneration, *BMC Med Genomics* 2021;14:40.

38. Tu J, Li W, Yang S, Yang P, Yan Q, Wang Sh, et al. Single-Cell Transcriptome Profiling Reveals Multicellular Ecosystem of Nucleus Pulposus during Degeneration Progression, *Adv. Sci* 2021; 2103631.

39. Lai A, Moon A, Purmessur D, Skovrlj B, Winkelstein BA, Cho SK, et al. Assessment of functional and behavioral changes sensitive to painful disc degeneration. *J Orthop Res Of Publ Orthop Res Soc* 2015;33(5):755–64.

40. Hu B, Shi C, Tian Y, Zhang Y, Xu C, Chen H, et al. TGF-beta induces upregulation of chondroitin sulfate synthase 1 (CHSY1) in nucleus pulposus cells through MAPK signaling. *Cell Physiol Biochem Int J Exp Cell Physiol Biochem Pharmacol* 2015;37(2):793–804.

41. Hu B, Xu C, Tian Y, Shi C, Zhang Y, Deng L, et al. Inflammatory microRNA-194 and -515 attenuate the biosynthesis of chondroitin sulfate during human intervertebral disc degeneration. *Oncotarget* 2017;8(30):49303–17

42. Malakootian M, Gholipour A, Mahrokh B.M, Arabian M, Oveisee M. Potential Roles of Circular RNAs and Environmental and Clinical Factors in Intervertebral Disc Degeneration. *Environmental Health Engineering and Management Journal.* 2022;9(2):189-200.