

مقاله پژوهشی

بررسی الگوی بیان ژن سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از چربی انسان پس از تیمار با سیلیبینین

سوگند عابدی^۱، فرشید کفیل‌زاده^۲، سهیلا زمانلوئی بنیسی^{۳،۴*}، یعقوب طاهری^۵

۱. گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، واحد تهران مرکزی، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

۲. گروه زیست‌شناسی، واحد جهرم، دانشگاه آزاد اسلامی، جهرم، ایران

۳. گروه مهندسی پزشکی، دانشکده مهندسی، واحد تهران مرکزی، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

۴. مرکز تحقیقات سلول‌های بنیادی و سلول‌درمانی، پژوهشکده مهندسی بافت و پزشکی بازساختی، واحد تهران مرکزی، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

۵. گروه زیست‌شناسی، واحد جهرم، دانشگاه آزاد اسلامی، جهرم، ایران

پذیرش: ۱۷ شهریور ۱۴۰۵

دریافت: ۲۰ مرداد ۱۴۰۵

چکیده

زمینه و هدف: سلول‌های بنیادی مشتق از بافت چربی به دلیل قابلیت تمایز بالا و خواص تعدیل‌کنندگی ایمنی، در پزشکی بازساختی جایگاه ویژه‌ای دارند. سیلیبینین، ترکیب زیست‌فعال اصلی خار مریم، دارای خواص ضدالتهابی و آنتی‌اکسیدانی است. این مطالعه با هدف بررسی تأثیر سیلیبینین بر الگوی بیان ژنومیک انجام شد.

روش‌ها: سلول‌های بنیادی با غلظت‌های ۰/۵، ۱ و ۱۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر سیلیبینین تیمار شدند. زنده‌مانی سلولی با روش سنجش ام تی تی ارزیابی گردید. سپس، توالی‌یابی آر ای بر روی سلول‌های تیمار شده با غلظت ۰/۵ میکروگرم (در روز دوازدهم) در مقایسه با گروه شاهد انجام شد. تحلیل غنی‌سازی مجموعه ژنی از طریق ابزار وب گستالت صورت گرفت.

یافته‌ها: غلظت‌های ۰/۵ و ۱ میکروگرم سیلیبینین سبب افزایش حیات و فعالیت متابولیکی سلول شدند، در حالی که غلظت ۱۰ میکروگرم اثر سمیت داشت. در مجموع ۲۵۷ ژن با بیان متفاوت شناسایی شد که ۸۹ ژن آن در فرآیندهای زیستی کلیدی نقش داشتند. مهم‌ترین تغییرات شامل کاهش بیان ژن‌های آر ای جی دی بی (۱۴/۶۷- برابری) و تی ان اف اس اف ۱۸ (۱۸/۶۴- برابری) و افزایش بیان ژن‌های سی دی ۳۶ (۸/۶۵+ برابری) و اف جی اف ۱ (۸/۹۵+ برابری) بود.

نتیجه‌گیری: سیلیبینین در غلظت ۰/۵ میکروگرم با ایجاد یک الگوی ترانسکریپتومی اختصاصی، مسیرهای دخیل در چسبندگی سلولی، سازمان‌دهی ماتریس خارج سلولی، رگ‌زایی و تنظیم فعالیت هسته‌ای را به‌طور معنی‌داری تحت تأثیر قرار می‌دهد. تنظیم هماهنگ این ژن‌ها نشان می‌دهد که سیلیبینین بیان ژن‌های کلیدی مرتبط با فرآیندهای سلولی را تعدیل می‌کند و بیش‌های مولکولی بالقوه‌ای در مورد نقش تنظیمی آن در این فرآیندها ارائه می‌دهد.

واژه‌های کلیدی: الگوی بیان ژن، توالی‌یابی آر ای، سلول بنیادی مزانشیمی، سیلیبینین

مقدمه

سلول‌های بنیادی مشتق از بافت چربی انسان (hADSCs)^۱ به دلیل دسترسی آسان، قابلیت کشت مطلوب، توان بازسازی بالا و ملاحظات اخلاقی کمتر، یکی از امیدوارکننده‌ترین منابع سلول‌های بنیادی مزانشیمی محسوب می‌شوند [۱]. این سلول‌های بنیادی مزانشیمی که از بافت چربی جدا شده‌اند، می‌توانند به رده‌های مختلفی از جمله

استئوبلاست‌ها، کندروسیت‌ها، آدیپوسیت‌ها و سلول‌های اندوتلیال تمایز یابند و این امر آن‌ها را به گزینه‌های جذابی برای مهندسی بافت و درمان‌های مبتنی بر سلول تبدیل می‌کند [۲]. مطالعات اخیر نشان داده‌اند که این سلول‌ها می‌توانند التهاب را کاهش داده و بازسازی بافت را از طریق تنظیم عملکرد سلول‌های ایمنی و ترشح فاکتورهای زیست‌فعال تسهیل کنند [۳]. سیلیبینین^۲ (SB) مهم‌ترین ترکیب

² Silibinin¹ Human adipose-derived stem cells

با سنجش MTT، و در ادامه با انجام توالی‌یابی RNA و آنالیز مسیرهای زیستی جهت شناسایی تغییرات الگوی بیان ژنومیک انجام پذیرفت.

در این مطالعه، هدف ما بررسی اثرات سیلیسین بر روی سلول‌های بنیادی مشتق از بافت چربی انسان بود که ابتدا با تعیین غلظت بهینه غیر سمی برای سلول با استفاده از سنجش ام تی تی و به دنبال آن توالی‌یابی آر ان ای برای شناسایی تغییرات رونویسی در سطح ژنوم انجام شد.

مواد و روش‌ها

کشت سلولی و تیمار با سیلیسین

سلول‌های بنیادی مشتق از چربی انسان (hADSCs) که از مرکز تحقیقات فناوری سلول‌های بنیادی (تهران، ایران) تهیه شده بودند، در این مطالعه مورد استفاده قرار گرفتند. سلول‌ها در محیط کشت با گلوکز کم (DMEM)^۴ خریداری شده از شرکت Biomedica (سنگاپور) غنی شده با ۱۰ درصد سرم جنین گاوی^۵ (FBS) خریداری شده از شرکت Gibco (آمریکا)، ۱۰۰ واحد در میلی‌لیتر پنی‌سیلین و ۱۰۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر استرپتومایسین کشت داده شدند. انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد در جو مرطوب حاوی ۵ درصد کربن دی‌اکسید انجام شد. تمام آزمایش‌ها با استفاده از سلول‌ها در پاساژ سوم انجام شد. برای تیمار با سیلیسین (Sigma-Aldrich، آمریکا)، سلول‌ها در محیط‌های حاوی غلظت‌های مختلف سیلیسین شامل ۰/۵، ۱ و ۱۰ میکروگرم کشت داده شدند. محلول ذخیره ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر سیلیسین با حل کردن ۱ میلی‌گرم سیلیسین در ۱۰ میلی‌لیتر دی‌متیل سولفوکسید (DMSO)^۶ تهیه شد.

سیلیسین در استوک DMSO حل شد؛ با رقت‌سازی‌های انجام‌شده در محیط کشت کامل، غلظت نهایی DMSO در بالاترین دوز تست‌شده (۱۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) برابر با ۰/۰۵ درصد (حجمی/حجمی) بود که بسیار کمتر از آستانه سمیت شناخته‌شده برای MSCها (کمتر از ۰/۱٪) است. همچنین یک گروه «کنترل حلال» (Vehicle Control) محیط حاوی ۰/۰۵ درصد DMSO بدون دارو) موازی با گروه

زیست‌فعال موجود در عصاره گیاه خارمریم است که به دلیل خواص آنتی‌اکسیدانی، ضدالتهابی، ضدفیبروتیک و محافظت‌کننده از کبد، در سال‌های اخیر توجه زیادی را در پژوهش‌های زیست‌پزشکی به خود جلب کرده است. مطالعات نشان داده‌اند در درمان بیماری‌های مختلف توان درمانی قابل توجهی دارد [۴]. علاوه بر این حضور سیلیسین در داربست موجب بهبود چسبندگی اولیه سلول‌ها، افزایش تکثیر طولانی‌مدت و حفظ زیست‌سازگاری مناسب می‌شود [۵].

توالی‌یابی آر ان ای با توان عملیاتی بالا بستری بی‌طرفانه برای تجزیه و تحلیل جامع رونوشت‌ها فراهم می‌کند و امکان شناسایی ژن‌های با بیان متفاوت (DEGs)^۳ و کشف عملکردهای زیستی جدید و ارتباطات بیماری را فراهم می‌کند [۶].

مطالعات نوین با به‌کارگیری رویکردهای اومیکس (Omics)، ترنسکریپتومیکس (پروفایل بیان ژن مبتنی بر RNA-seq) و آنالیز مسیرهای سیگنالینگ، مشخص کرده‌اند که سیلیسین شبکه‌های تنظیمی متعددی را در سطح رونویسی هدایت می‌کند؛ از جمله تعدیل مسیرهای پیام‌رسانی کلیدی نظیر MAPK، PI3K/Akt و STAT3 و همچنین تأثیر بر تنظیم ژن‌های درگیر در بقای سلولی و گذار اپیتلیالی به مزانشیمی (EMT) [۷]. علاوه بر این، در زمینه سلول‌های بنیادی، شواهد نشان داده‌اند که سیلیسین در تنظیم سرنوشت و تمایز رده‌های سلولی—مانند تحریک تمایز استخوانی در سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان انسان (hBMSCs) از طریق فعال‌سازی فاکتورهای Runx2 و مسیر BMP-2—نقش تنظیمی مهمی ایفا می‌کند [۸].

با وجود این پیشرفت‌ها، شناسایی دقیق پاسخ‌های رونویسی و اثرات ژنومیک حاصل از مواجهه با سیلیسین در سطح سلول‌های hADSCs همچنان نیازمند واکاوی جامع‌تری است. امروزه فناوری توالی‌یابی RNA با توان بالا (RNA-Seq) همراه با تحلیل غنی‌سازی عملکردی و مسیرهای پیام‌رسانی زیستی، بستری بی‌طرفانه و قدرتمند را برای شناسایی ژن‌های با بیان افتراقی (DEGs) و ترسیم اثرات مولکولی فراهم می‌سازد. از این رو، هدف از پژوهش حاضر بررسی اثرات سیلیسین بر سلول‌های بنیادی مشتق از بافت چربی انسان بود که ابتدا با ارزیابی سمیت سلولی و تعیین غلظت بهینه غیرسمی

^۴ Dulbecco's Modified Eagle's Medium

^۵ Fetal bovine serum

^۶ Dimethyl sulfoxide

^۳ Differentially expressed genes

بدون تیمار ارزیابی شد. انتخاب این بازه غلظت بر مبنای مطالعات پیشین سمیت‌سنجی و اثرات بیولوژیک سیلیسین بر سلول‌های بنیادی مزانشیمی صورت پذیرفت. پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون، محلول MTT (با غلظت ۵ میلی گرم بر میلی لیتر) اضافه و پس از ۴ ساعت انکوباسیون در تاریکی، کریستال‌های فورمازان با ۱۰۰ میکرولیتر DMSO حل شدند. میزان جذب نوری در طول موج ۵۷۰ نانومتر (با طول موج مرجع ۶۳۰ نانومتر) توسط دستگاه الیزا ریدر (Bio-Rad, USA) قرائت گردید.

استخراج آر ان ای و تعیین توالی ترانسکریپتوم

کل آر ان ای در روز ۱۲ پس از تیمار با استفاده از کیت اختصاصی استخراج آر ان ای طبق دستورالعمل شرکت سازنده از سلول‌ها جدا شد. مشخصات کامل کیت استخراج RNA شامل نام تجاری کیت (RNeasy Mini Kit)، شرکت سازنده (Qiagen، هیلدن، آلمان) و شماره کاتالوگ (#۷۴۱۰۴) همراه با ارزیابی خلوص (NanoDrop) و یکپارچگی ($RIN > 8$) با Bioanalyzer 2100 می باشد. غلظت آر ان ای با استفاده از طیف‌سنج نوری تعیین شد و کیفیت و یکپارچگی آن با استفاده از الکتروفورز مویرگی ارزیابی شد. فقط نمونه‌هایی با شاخص یکپارچگی آر ان ای (RIN) ≥ 7 بیشتر از ۸ مورد پردازش بیشتر قرار گرفتند. کتابخانه‌های توالی‌یابی با استفاده از کیت کاپا ساخته شدند و تحت تعیین توالی دوطرفه با طول ۱۵۰ جفت باز قرار گرفتند. نمونه‌های سلول‌های کنترل و تیمار شده با SB بر روی پلتفرم ایلومینا هایسک در شرکت فناوری بیوانفورماتیک نواژن پکن توالی‌یابی شدند. کیفیت داده‌های خام توالی‌یابی با استفاده از فست کیو سی نسخه ۰/۱۱/۵ ارزیابی شد. فایل‌های فست کیو فیلتر شده با استفاده از ابزار هم‌ترازی HISAT2 با ژنوم مرجع انسانی (GRCh38/hg38) هم‌تراز شدند و فایل‌های SAM^۸ تولید شدند. کمی‌سازی خوانش با استفاده از ابزار FeatureCounts و بر اساس حاشیه‌نویسی ژنی RefSeq برای ژن اچ جی ۳۸ انجام شد. تجزیه و تحلیل بیان افتراقی با نرم‌افزار NOISeq نسخه ۲/۲۲/۰ با آستانه احتمال ۸۰ درصد انجام شد. ژن‌هایی با تغییر بیان بیش از ۲ برابر یا کمتر از ۲- برابر ($|\log_2FC| \geq 1$)، مقدار $p \leq 0.05$ و نرخ کشف کاذب

تیمار و کنترل دست‌نخورده (Untreated Control) سنجیده شد که هیچ‌گونه اثر سوء بر زیست‌پذیری و مورفولوژی سلول‌ها نشان نداد. یک گروه «کنترل حلال» (Vehicle Control) محیط حاوی ۰/۰۵ درصد DMSO بدون دارو) موازی با گروه تیمار و کنترل دست‌نخورده (Untreated Control) سنجیده شد که هیچ‌گونه اثر سوء بر زیست‌پذیری و مورفولوژی سلول‌ها نشان نداد.

سنجش زیست‌پذیری سلول

حیات و فعالیت متابولیکی سلول با استفاده از رنگ‌سنجی MTT ارزیابی شد. به طور خلاصه، سلول‌های گروه‌های کنترل و تحت درمان با SB با تراکم 10^4 سلول در میلی‌لیتر به حالت تعلیق درآمدند و در سه تکرار در پلیت‌های ۹۶ چاهکی کشت داده شدند. پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد در جو ۵ درصد کربن دی‌اکسید، محیط کشت خارج شد و سلول‌ها به مدت ۴ ساعت در معرض محلول ۵ میلی گرم در میلی‌لیتر MTT (Sigma-Aldrich، آمریکا) قرار گرفتند. سپس، ۱۰۰ میکرولیتر DMSO (Sigma-Aldrich، آمریکا) به هر چاهک اضافه شد. میزان جذب با استفاده از دستگاه الیزا ریدر در طول موج ۵۷۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. آزمون در قالب ۳ تکرار مستقل زیستی (Biological replicates) انجام شد که هر تکرار شامل ۵ تکرار فنی (Technical replicates/ wells per group) در پلیت ۹۶ خانه‌ای بود و داده‌ها به صورت میانگین $\pm$ انحراف معیار تحلیل شدند. به منظور ارزیابی زیست‌پذیری و تعیین غلظت‌های غیرسمی سیلیسین، سنجش ام تی تی مطابق با روش استاندارد [۹] و راهنمای استاندارد ISO 10993-5 انجام گرفت. سلول‌های hADSCs با تراکم 10^4 سلول در هر چاهک پلیت ۹۶ خانه‌ای کشت داده شدند. پودر سیلیسین (Sigma-Aldrich, USA) در دی‌متیل سولفوکسید (DMSO) حل شده و محلول ذخیره تهیه گردید. سپس رقت‌های کاری با محیط کشت کامل به‌گونه‌ای رقیق‌سازی شدند که غلظت‌های نهایی ۰/۵، ۱ و ۱۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر از سیلیسین به دست آید. به منظور حذف اثر احتمالی حلال، غلظت نهایی DMSO در تمامی چاهک‌ها در سطح کمتر از ۰/۰۵ درصد (حجمی/حجمی) ثابت نگه داشته شد و گروه کنترل حلال (Vehicle Control) حاوی ۰/۰۵ درصد DMSO بدون دارو به صورت موازی با گروه کنترل

⁷ RNA integrity number

⁸ Sequence alignment map

تجزیه و تحلیل آماری

تمام آزمایش‌ها به صورت سه تکرار انجام شد. داده‌ها به صورت میانگین $\pm$ انحراف معیار ارائه شده‌اند. معناداری آماری با استفاده از آزمون مقایسه میانگین دو گروه تعیین شد. تجزیه و تحلیل آماری با استفاده از نرم‌افزار تحلیل آماری انجام شد و مقادیر $p < 0.05$ و $p < 0.01$ نشان‌دهنده تفاوت آماری معنادار در نظر گرفته شد. داده‌های آزمون MTT با سه تکرار مستقل انجام و نتایج به صورت میانگین $\pm$ انحراف معیار گزارش شدند. مقایسه آماری بین گروه‌ها با آزمون تحلیل واریانس یک‌طرفه (One-Way ANOVA) و آزمون تعقیبی توکی (Tukey's post-hoc test) در نرم‌افزار GraphPad Prism انجام شد و سطح معنی‌داری در نظر گرفته شد. در تحلیل داده‌های RNA-Seq، پس از کنترل کیفی با FastQC، خوانش‌ها توسط ابزار HISAT2 نسخه ۲.۲.۱ با ژنوم مرجع انسان (GRCh38/hg38) هم‌تراز شده و شمارش خوانش‌ها با FeatureCounts نسخه ۲.۰.۱ انجام گرفت. شناسایی ژن‌های با بیان افتراقی (DEGs) با استفاده از بسته نرم‌افزاری NOISeq نسخه ۲.۴۰.۰ در محیط R با اعمال شروط $|\log_2FC| \geq 1$ ، $FDR \leq 0.01$ و $p \leq 0.05$ تعیین شد. آنالیز مسیرهای زیستی و هستی‌شناسی ژن (GO) با ابزار WebGestalt 2024 انجام پذیرفت. فایل اکسل تکمیلی تحت عنوان DE آماده شد که شامل لیست کامل تمام ۲۵۷ ژن تغییر یافته به همراه Gene Symbol, Ensembl ID, log₂ FC, p-value و FDR/q-value می‌باشد. که به صورت لینک DOI در سایت زودو بارگزاری شده است. <https://doi.org/10.5281/zenodo.20820248>

تاییدیه اخلاق

سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از چربی انسان که در این مطالعه استفاده شدند، از مرکز تحقیقات فناوری سلول‌های بنیادی، تهران، ایران تهیه شدند. تهیه و استفاده از سلول‌ها مطابق با مقررات اخلاقی موسسه ارائه دهنده سلول، مطابق با رویه‌های شرح داده شده در مطالعه منتشر شده در مجله بین‌المللی مواد پلیمری و زیست‌مواد پلیمری (10.1080/00914037.2017.1297941) انجام شد. این مطالعه توسط کمیته اخلاق [دانشگاه آزاد اسلامی، واحد کازرون] (شماره تایید: [IR.IAU.KAU.REC.1403.217]) تایید شد. تمام آزمایش‌ها مطابق با دستورالعمل‌ها و مقررات نهادهای انجام شد.

اصلاح شده (FDR)⁹ برابر یا کمتر از ۰/۱ بودند به عنوان ژن‌های دارای بیان افتراقی معنی‌دار بین گروه‌ها در نظر گرفته شدند.

آنالیز غنی‌سازی مجموعه ژن و متآنالیز

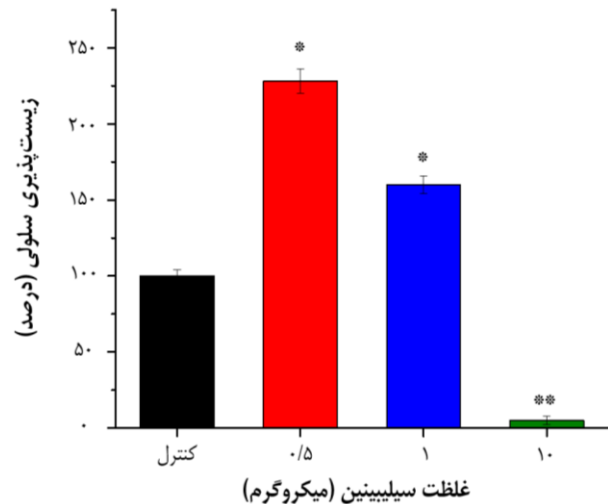
تجزیه و تحلیل غنی‌سازی عملکردی با استفاده از ابزارهایی مانند وب گستالت به محققان این امکان را می‌دهد که داده‌های بیان ژن در مقیاس بزرگ را با شناسایی مسیرهای بیش از حد بیان شده و مجموعه‌های ژنی مرتبط با فرآیندهای زیستی و بیماری‌ها را تفسیر کنند. نسخه ۲۰۲۴ وب گستالت سرعت تجزیه و تحلیل بهبود یافته و پشتیبانی جدیدی برای ادغام داده‌های چند اومیکس ارائه می‌دهد که آن را به ابزاری قدرتمند برای تفسیر داده‌های رونوشت‌سازی تبدیل می‌کند. برای شناسایی مسیرهای زیستی و فنوتیپ‌های فرآیندهای زیستی مرتبط با ژن‌های با بیان افتراقی (DEGs) شناسایی شده توسط توالی یابی آر آن ای، آنالیز غنی‌سازی عملکردی با استفاده از وب گستالت انجام شد. فهرست ژن‌هایی که دارای $FDR \leq 0.01$ و $p \leq 0.05$ ، $|\log_2FC| \geq 1$ بودند به وب گستالت ارسال شد. تحلیل بیش‌نمایی (ORA)^{۱۰} با استفاده از پارامترهای زیر انجام شد: ارگانیسم مورد نظر هومو ساپینس^{۱۱} بود، پایگاه‌های داده عملکردی شامل هستی‌شناسی ژن (فرآیند زیستی، جزء سلولی، عملکرد مولکولی) و مجموعه‌های ژن مرتبط با بیماری بود، مجموعه مرجع، کدگذاری پروتئین ژنوم (کل ژنوم انسان به عنوان پس‌زمینه) بود و تصحیح آزمایش چندگانه با استفاده از روش بنجامینی-هوچبرگ با $0.05 \leq FDR$ انجام شد. برای تجزیه و تحلیل ارتباط ژن‌ها در فرآیند زیستی، پایگاه داده عملکردی Processes انتخاب شد که شامل ارتباطات میان ژن‌ها و فرآیندهای زیستی است که از منابع مختلفی از جمله PharmGKB و GLAD4U گردآوری شده است. مجموعه‌های ژنی غنی‌شده در صورت داشتن مقدار p تعدیل‌شده با $FDR \leq 0.05$ معنی‌دار در نظر گرفته شدند. نسبت غنی‌سازی (ژن‌های هم‌پوشانی مشاهده‌شده/مورد انتظار) برای هر عبارت معنی‌دار محاسبه شد. تجسم نتایج با استفاده از گزارش‌های تعاملی HTML تولید شده توسط وب گستالت شامل نمودارهای میله‌ای و جداول نتایج دقیق انجام شد.

⁹ False discovery rate

¹⁰ Over-representation analysis

¹¹ Homo sapiens

تیمار با ۰/۵ میکروگرم و ۱ میکروگرم SB منجر به افزایش آماری معنی‌داری در تکثیر سلولی شد ($p < ۰/۰۵$). در مقابل، قرار گرفتن در معرض بالاترین غلظت (۱۰ میکروگرم) به طور قابل توجهی زیست‌پذیری سلول‌ها را کاهش داد ($p < ۰/۰۱$)، که نشان دهنده اثرات سمی در این دوز است. بر اساس این یافته‌ها، غلظت ۰/۵ میکروگرم به عنوان دوز بهینه برای آزمایش‌های بعدی انتخاب شد.



شکل ۱- نتایج آزمون زیست‌پذیری سلول‌ها برای غلظت‌های مختلف سیلیبینین در مقایسه با کنترل،*: تفاوت معنی‌دار با گروه کنترل با $p < ۰/۰۵$ و **: تفاوت معنی‌دار با گروه کنترل با $p < ۰/۰۱$.

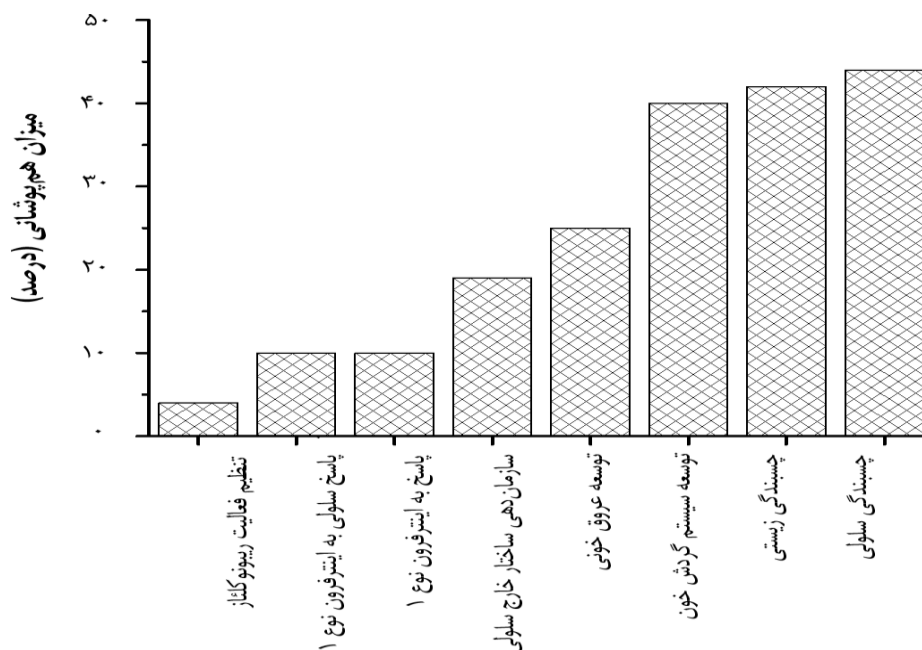
آنالیز ترانسکریپتومی و بیان افتراقی ژن

توالی یابی آر آن ای برای مقایسه الگوهای بیان ژن سلول‌های کنترل و تیمار شده با SB انجام شد. در مجموع ۴۶/۸ میلیون و ۵۲/۳ میلیون خوانش خام (طول خوانش ۱۵۰ جفت باز) به ترتیب برای گروه‌های کنترل و تیمار شده با SB ایجاد شد. این خوانش‌ها با ژنوم مرجع انسانی هم‌تراز شدند. نرخ نقشه‌برداری برای گروه کنترل ۹۶/۳۶ درصد (۴۵/۱ میلیون خوانش) و برای گروه تیمار شده با SB ۹۸/۴۷ درصد (۵۱/۵ میلیون خوانش) بود. آنالیز بیان افتراقی، که با استفاده از آستانه احتمال ≤ ۸۰ درصد انجام شد، در مجموع ۲۵۷ ژن با بیان افتراقی (DEG) را شناسایی کرد. در میان این ژن‌ها، ۸۹ ژن پس از تیمار با سیلیبینین به طور قابل توجهی با ژن‌های فرآیندهای زیستی هم‌پوشانی داشتند. هم‌پوشانی ژن‌ها در شکل ۲ نشان داده شده است.

یافته‌ها

تکثیر سلولی

برای ارزیابی اثر سیلیبینین بر ظرفیت تکثیر hADSC، سلول‌ها به مدت ۲۴ ساعت در معرض غلظت‌های مختلف SB (۰/۵، ۱ و ۱۰ میکروگرم) قرار گرفتند و سپس سنجش MTT انجام شد (شکل ۱). در مقایسه با گروه کنترل بدون تیمار،



شکل ۲- نمایش میزان هم‌پوشانی ژن‌ها.

جدول ۱- مجموعه‌های ژنی غنی‌شده مرتبط با فرایندهای زیستی شناسایی شده با وب گستالت

شناسه	نام فرآیند زیستی	اندازه	تعداد ژن‌های هم‌پوشان	تعداد مورد انتظار	نسبت غنی‌سازی
GO:0022610	چسبندگی زیستی	۱۳۷۷	۴۲	۱۹/۷۵	۲/۱۳
GO:0001568	تکامل رگ‌های خونی	۶۵۴	۲۵	۳/۳۸	۲/۶۷
GO:0007155	چسبندگی سلولی	۱۳۶۹	۴۲	۱۹/۶۳	۲/۱۴
GO:0071357	پاسخ سلولی به اینترفرون نوع ۱	۸۴	۱۰	۱/۲۰	۸/۳۰
GO:0072359	تکامل دستگاه گردش خون	۱۰۲۶	۴۰	۱۴/۷۱	۲/۷۲
GO:0043062	سازمان‌یابی ساختار خارج سلولی	۴۰۰	۱۹	۵/۷۴	۳/۳۱
GO:0060700	تنظیم فعالیت ریبونوکلاز	۹	۴	۰/۱۳	۳۰/۹۹
GO:0034340	پاسخ به اینترفرون نوع ۱	۸۹	۱۰	۱/۲۸	۷/۸۴

تجزیه و تحلیل غنی‌سازی، ارتباط فرایندهای زیستی مختلف را با تمرکز بر عملکرد تنظیم سلول‌های بدن شناسایی می‌کند.

برای بررسی ارتباط تغییرات رونویسی ناشی از سیلیبیین در سلول‌ها با فرایندها، تجزیه و تحلیل بیش از حد با استفاده از پایگاه داده عملکردی وب گستالت انجام شد. همان‌طور که در جدول ۱ خلاصه شده است، ژن‌های با بیان متفاوت (DEGs) به طور قابل توجهی در فرایندهای مختلف زیستی نشان داده شده‌اند. در میان ۸۹ ژنی که با ژن‌های مربوط به فرایندهای زیستی هم‌پوشانی داشتند، ۱۰ ژن مجزا به عنوان قابل توجه‌ترین یافته‌ها پدیدار شدند و کاهش یا افزایش معناداری از خود نشان دادند که می‌تواند در اثرگذاری عملکرد ژن‌ها در سلول و نحوه تنظیم سلول نقش قابل توجهی داشته باشند. بیشترین یا قوی‌ترین میزان غنی‌شدگی یعنی ژنی که از نظر آماری بالاترین درجه اهمیت را در نتایج داشته است ژن‌های مربوط به فرآیند چسبندگی سولی (GO:0022610) است. این ژن‌ها دارای هم‌پوشانی ۴۲ ژن، تعداد مورد انتظار ۱۹/۷۵ ژن، نسبت غنی‌سازی ۲/۱۳، مقدار p برابر $10^{-6} \times 2/298$ و مقدار FRD برابر $10^{-3} \times 3/482$ است که نشان‌دهنده‌ی ارتباط بسیار معنی‌دار آن‌ها با مسیرهای عملکردی سلول است. ژن‌های مربوط به توسعه سیستم گردش خونی (GO:0072359) نیز به طور قابل توجهی غنی‌شده بود، این ژن‌ها دارای هم‌پوشانی ۴۰ ژن، تعداد ژن مورد انتظار ۱۴/۷۱، نسبت غنی‌سازی ۲/۷۲، مقدار p برابر $10^{-9} \times 6/644$ و مقدار FRD برابر $10^{-5} \times 6/440$ بود، که نشان‌دهنده ارتباط بالقوه آن‌ها با فرایندهای مرتبط با بازسازی عروق و بافت است. ده ژن هم‌پوشان که در

غنی‌سازی فرایندهای زیستی نقش دارند، در جدول ۲ فهرست شده‌اند. بارزترین تغییر برای FGF1 با میزان تغییر ۸/۹۵ ($p < 0.01$) و CD36 با میزان تغییر ۸/۶۵ ($p < 0.01$) مشاهده شد. هم‌چنین، ARHGDIB دارای میزان تغییر ۱۴/۶۷- ($p < 0.05$)، TNFSF18 دارای میزان تغییر ۱۸/۶۴- ($p < 0.05$) و MEF2C دارای میزان تغییر ۱۱/۲۵- بود. ژن‌های باقی‌مانده شامل ELN^{۱۲}، RSAD2^{۱۳}، MX1^{۱۴}، افزایش بیان متوسطی با تغییرات برابر از ۲/۱۲ تا ۲/۸۱ نشان دادند (جدول ۲ و شکل ۳).

بحث

اولین دسته اصلی ژن‌های تنظیم‌شده در مطالعه حاضر شامل ARHGDIB، TNFSF18 و PKP3 است که همگی در فرایندهای مختلف زیستی از جمله چسبندگی سلولی، سازماندهی ساختار خارج سلولی و تنظیم رفتار سلول دخیل هستند [۱۰، ۱۱]. پروتئین ARHGDIB، نقش کلیدی در تنظیم فعالیت پروتئین‌های کوچک خانواده رو جی تی پی ای^{۱۵}، از جمله Rac1، RhoA و Cdc42 ایفا می‌کند [۱۲]. این مولکول‌ها مسئول سازماندهی اسکلت سلولی حرکت سلولی، چسبندگی سلولی، شکل سلول و مهاجرت سلولی هستند [۱۳]. کاهش شدید بیان در سلول‌های بنیادی مزانشیمی تیمار شده با سیلیبیین نشان می‌دهد که این ترکیب احتمالاً مسیرهای

¹² Elastin

¹³ Radical S-adenosylmethionine domain containing 2

¹⁴ MX dynamin like GTPase 1

¹⁵ Rho GTPase

جدول ۲- نمایش ژن‌های با بیان متفاوت که با مجموعه ژن‌های فرایندهای زیستی مختلف هم‌پوشانی دارند.

نماد ژن	نام ژن	شناسه ژن در پایگاه داده Entrez	میزان تغییر بیان ژن
ARHGDIB	مهارکننده بتای تفکیک GDP از Rho	۳۹۷	-۱۴/۶۷
CD36	مولکول CD36	۹۴۸	۸/۶۵
TNFSF18	عضو ۱۸ ابرخانواده فاکتور نکروز توموری	۸۹۹۵	-۱۸/۶۴
RSAD2	پروتئین ۲ حاوی حوزه‌ی رادیکال S-آدنوزیل متیونین	۹۱۵۴۳	۲/۵۹
FGF1	فاکتور رشد فیبروبلاستی ۱	۲۲۴۶	۸/۹۵
MEF2C	فاکتور تقویت‌کننده‌ی میوسیت 2C	۴۲۰۸	-۱۱/۲۵
ELN	الاستین	۲۰۰۶	۲/۸۱
MX1	GTPase شبه‌دینامین MX1	۴۵۹۹	۲/۳۴
OAS1	سنتاز ۱-۲-۵- الیگوانیلات	۴۹۳۸	-۳/۰۳
PKP3	پلاکوفیلین ۳	۱۱۱۸۷	-۷/۲۰

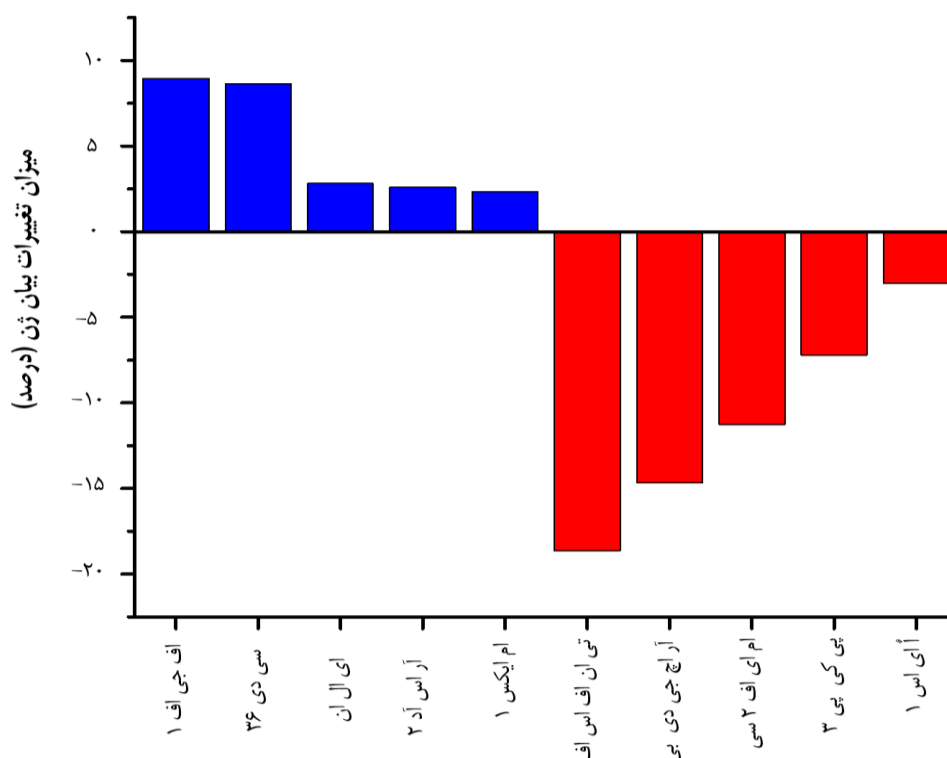
وابسته به رو جی تی پی ایز را باز تنظیم می‌کند. ژن TNFSF18 عمدتاً در سلول‌های ارائه‌دهنده آنتی‌ژن، سلول‌های اندوتلیال و برخی سلول‌های مزانشیمی بیان می‌شود و نقش مهمی در تنظیم پاسخ‌های ایمنی، برهم‌کنش سلول-سلول و ارتباط بین سلول‌های ایمنی و سلول‌های بافتی دارد [۱۴]. کاهش شدید بیان TNFSF18 پس از تیمار hADSC با سیلیسین نشان می‌دهد که این ترکیب ممکن است از طریق مهار سیگنال‌های وابسته به خانواده تی ان اف، بر تعاملات سلول-سلول و فرآیند چسبندگی سلولی اثر بگذارد. ژن PKP3 عضو خانواده پلاکوفیلین‌ها و از اجزای اصلی دسموزوم‌ها است. علاوه بر نقش ساختاری، PKP3 در تنظیم سازمان‌دهی اسکلت سلولی، تکثیر سلولی و مسیرهای پیام‌رسانی داخل سلولی نیز مشارکت دارد [۱۵]. در مطالعه حاضر، تیمار سلول‌های hADSC با سیلیسین موجب کاهش قابل توجه بیان ژن PKP3 شد. کاهش بیان ژن PKP3 پس از تیمار با سیلیسین نشان می‌دهد که این ترکیب ممکن است با کاهش استحکام اتصالات بین سلولی و تنظیم فرآیند چسبندگی سلولی، شرایط مناسب‌تری برای مهاجرت و بازآرایی سلول‌های بنیادی فراهم کند.

دومین دسته اصلی ژن‌های تنظیم‌شده شامل FGF1، CD36 و MEF2C هستند که همگی نقش مهمی در رگ‌زایی، ترمیم بافت و بقای سلول دارند. ژن FGF1 یکی از اعضای خانواده فاکتورهای رشد فیبروبلاستی است که نقش اساسی در رشد، تکامل و بازسازی بافت‌ها ایفا می‌کند [۱۶].

بیشترین افزایش بیان در مطالعه ما برای FGF1 مشاهده شد که با خواص محافظت سلولی سیلیسین گزارش شده توسط شن و همکارانش مطابقت دارد [۱۷]. ژن CD36 یک گیرنده جمع‌کننده چند منظوره است که در جذب اسیدهای چرب، رگ‌زایی و تنظیم ایمنی نقش دارد [۱۸]. میزان افزایش بیان CD36 توسط سیلیسین قابل توجه است. این افزایش ممکن است توانایی hADSC را در جذب اسیدهای چرب افزایش دهد و به طور بالقوه متابولیسم آن‌ها را به سمت استفاده از لیپید تغییر دهد، که می‌تواند منبع انرژی جایگزینی برای سلول‌های در حال تکثیر فراهم کند. بنابراین، افزایش بیان CD36 ممکن است ظرفیت رگ‌زایی hADSC را افزایش دهد، که با افزایش بیان FGF1 مشاهده شده در مطالعه ما مطابقت دارد. افزایش بیان رونوشت‌های FGF1 و CD36 نشان می‌دهد که سیلیسین ممکن است مسیرهای تنظیمی بالادست دخیل در سیگنال‌دهی رگ‌زایی و متابولیسم سلولی را تحت تأثیر قرار دهد، با این حال تأیید اثرات واقعی رگ‌زایی مستلزم انجام آزمون‌های عملکردی پروتئینی و مدل‌های تشکیل لوله^{۱۶} خواهد بود.

MEF2C نقش اساسی در تنظیم بیان ژن‌های مرتبط با رشد و تکامل سیستم قلبی-عروقی، عضله اسکلتی و عصبی دارد [۱۹]. کاهش بیان MEF2C پس از تیمار hADSC با سیلیسین نشان می‌دهد که این ترکیب احتمالاً بخشی از

¹⁶ Tube formation assay



شکل ۳- میزان تغییرات بیان ده ژن انتخابی که بیشترین و کمترین تغییرات را داشته‌اند.

ویروسی ایفا می‌کنند [۲۱]. RSAD2 یکی از ژن‌های شاخص پاسخ به اینترفرون نوع ۱ است وظایف اصلی آن شامل مهار تکثیر و همانندسازی ویروس‌ها، تقویت ایمنی ذاتی سلول و تنظیم تولید سائتوکین‌ها و پاسخ‌های ضدویروسی است [۲۲]. MX1 بخشی از سیستم دفاعی ذاتی hADSC محسوب می‌شود [۲۳]. تغییر بیان هم‌زمان این ژن‌ها نشان‌دهنده فعال شدن یک برنامه رونویسی وابسته به اینترفرون است. در سلول‌های بنیادی مزانشیمی، فعال شدن این برنامه می‌تواند فراتر از پاسخ ایمنی عمل کرده و بر تنظیم التهاب، حفظ هموستاز سلولی، مقاومت در برابر تنش‌های محیطی و ظرفیت ترمیم بافت اثر بگذارد. لازم به ذکر است که یافته‌های ما تحت شرایط کشت پایه در hADSC به دست آمده است. دینامیک بیان MX1 و RSAD2 ممکن است تحت تأثیر چالش ویروسی یا تحت شرایط التهابی به طور قابل توجهی متفاوت باشد.

OAS1 یک سنتتاز ۲، ۵-ایگوایزوآدنیلالات القا شده توسط اینترفرون را کد می‌کند که به هدایت پاسخ ضد ویروسی ذاتی کمک می‌کند. این پروتئین به طور گسترده بیان می‌شود و در رشد سلولی و آپوپتوز نقش دارد [۲۴]. در مطالعه ما، تیمار

برنامه‌های رونویسی مرتبط با توسعه سیستم گردش خون را تعدیل می‌کند. با این حال، افزایش هم‌زمان FGF1 نشان می‌دهد که سیلیبینین مسیرهای عروقی را به صورت یکنواخت تنظیم نمی‌کند، بلکه بین ژن‌های مختلف این شبکه تمایز قائل می‌شود.

دسته سوم ژن تنظیم‌شده شامل ELN هستند که در حفظ هویت سلول‌های بنیادی و تنظیم تمایز نقش دارد. ژن ELN مسئول کد کردن پروتئین الاستین است که یکی از اجزای اصلی ماتریس خارج سلولی محسوب می‌شود [۲۰]. مطالعات نشان داده‌اند که افزایش بیان ELN در MSCs می‌تواند منجر به افزایش تولید ماتریس خارج سلولی شود. چسبندگی سلول به بستر را بهبود می‌بخشد و مهاجرت و سازمان‌دهی سلولی را تسهیل می‌کند. در مطالعه حاضر، تیمار hADSC با سیلیبینین موجب افزایش بیان ELN شد. این افزایش بیان نشان می‌دهد که سیلیبینین احتمالاً می‌تواند ظرفیت hADSC را برای تولید و سازمان‌دهی ماتریس خارج سلولی افزایش دهد.

MX1 و RSAD2 ژن‌های اصلی تحریک‌شده با اینترفرون (ISG)^{۱۷} هستند که نقش‌های اساسی در دفاع ضد

¹⁷ Interferon-stimulated genes

عملکردی مانند رگ‌زایی، واکنش‌پذیری عروقی را ارزیابی نکردیم. سوم این‌که، ما اثرات سیلیبیین را در مدل‌های حیوانی آزمایش نکردیم. چهارم این‌که توالی یابی آر آن ای بر روی تعداد محدودی از نمونه‌ها انجام شد و مطالعات آینده با تکرارهای زیستی برای تأیید استحکام مورد نیاز است. با وجود این محدودیت‌ها، یافته‌های ما یک منبع رونویسی جامع برای درک اثرات سیلیبیین بر hADSC ارائه می‌دهد.

نتیجه‌گیری

این مطالعه نشان می‌دهد که سیلیبیین (۰/۵ میکروگرم) تکثیر سلول‌های بنیادی مشتق از بافت چربی انسان را افزایش می‌دهد و تغییرات رونویسی قابل توجهی را با ۲۵۷ ژن با بیان متفاوت القا می‌کند. بیشترین افزایش بیان برای FGF1 و CD36 مشاهده شد، در حالی که ARHGDIB و TNFSF18 کاهش بیان داشتند. تجزیه و تحلیل غنی‌سازی، ارتباط معنی‌داری را با چسبندگی سلولی، تکامل سیستم گردش خون و سازمان‌دهی ساختار خارج سلولی نشان داد. این یافته‌ها نشان می‌دهد که سیلیبیین یک برنامه رونویسی هماهنگ پیش‌رگ‌زایی، پیش‌بقا و ضدالتهابی را در سلول‌ها فعال می‌کند. علیرغم محدودیت‌هایی مانند عدم اعتبارسنجی عملکردی و مطالعات درون‌تنی، این مطالعه یک منبع جامع رونویسی برای درک اثرات سیلیبیین بر سلول‌های بنیادی مشتق از بافت چربی انسان ارائه می‌دهد.

ملاحظات اخلاقی

کد اخلاق پژوهش حاضر از کمیته تخصصی اخلاق در کار با حیوانات آزمایشگاهی دانشگاه کازرون با کد شناسه [IR.IAU.KAU.REC.1403.217] دریافت شده است.

ملاحظات مالی

این پژوهش با حمایت مالی محقق انجام شد.

تعارض در منافع

نویسندگان این مقاله تعارض در منافع ندارند.

hADSC با سیلیبیین موجب کاهش بیان OAS1 شد. در نگاه اول، این نتیجه ممکن است با افزایش RSAD2 و MX1 متناقض به نظر برسد، با این حال، این الگو احتمالاً نشان‌دهنده آن است که سیلیبیین مسیر اینترفرون نوع ۱ را به صورت انتخابی تنظیم می‌کند، نه اینکه همه ژن‌های وابسته به این مسیر را به یک شکل فعال یا مهار کند.

یافته‌های پژوهش حاضر نشان داد که تیمار سلول‌های hADSCs با غلظت فیزیولوژیک سیلیبیین (۰/۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر) منجر به القای یک برنامه رونویسی پیش‌بقایی و بازسازی‌کننده می‌گردد که این نتایج با گزارش‌های پیشین پیرامون اثرات تنظیمی سیلیبیین بر رفتار سلول‌های بنیادی مزانشیمی هم‌خوانی بالایی دارد. مطالعات گذشته نشان داده‌اند که سیلیبیین در غلظت‌های پایین موجب تحریک تمایز استئوبلاستی سلول‌های بنیادی مزانشیمی انسان (BMSCs) از طریق فعال‌سازی مسیر BMP-2/Runx2 و مسیر سیگنالینگ MAPK/ERK می‌گردد [۲۵]. در مطالعه حاضر، افزایش بیان ژن‌های کلیدی نظیر FGF1 و CD36 به همراه غنی‌سازی مسیرهای سازمان‌دهی ماتریکس خارج سلولی (ECM) و چسبندگی سلولی نشان می‌دهد که سیلیبیین نه تنها تکثیر اولیه hADSCs را حفظ می‌کند، بلکه بستر ساز ترشح فاکتورهای پاراکراین و مهاجرت سلولی است. علاوه بر این، کاهش چشمگیر بیان ژن‌های مرتبط با آپوپتوز و التهاب از جمله ARHGDIB و TNFSF18 در همسویی با خواص آنتی‌اکسیدانی و محافظت سلولی اثبات شده سیلیبیین است که پیش‌تر در حفظ ظرفیت تکثیر سلول‌های بنیادی در برابر تنش‌های اکسیداتیو گزارش شده بود. این همگرایی مولکولی تأیید می‌کند که سیلیبیین از طریق تعدیل شبکه‌های رونویسی اختصاصی، ظرفیت سلول‌های hADSCs را در مهندسی بافت و طب بازسازی به شکل معناداری ارتقا می‌بخشد.

محدودیت‌های مطالعه

باید به چندین محدودیت این مطالعه اذعان کرد. نخست این‌که تمام آزمایش‌ها بر روی hADSC انجام شد و اثرات سیلیبیین بر سایر انواع سلول‌های بنیادی اعم از سلول‌های مزانشیمی مغز استخوان، بند ناف، پالپ دندان، خون و ... و یا سایر انواع سلول‌های بنیادی بالغ ناشناخته باقی مانده است. دوم این‌که ما تغییرات رونویسی را شناسایی کردیم اما پیامدهای

نقش نویسندگان

س.ع.: انجام پروژه و نگارش مقاله؛ س.ز.ب.: جمع‌آوری داده‌ها و تهیه پیش‌نویس مقاله؛ ف.ک.: جمع‌آوری داده‌ها و تهیه پیش‌نویس مقاله؛ ی.ط.: نظارت بر حسن انجام کار.

اظہارنامہ

حین آماده‌سازی این اثر، نویسنده از هیچ ابزار هوش مصنوعی استفاده ننموده است.

فہرست منابع

- [1] Skrypnyk M, Current progress and limitations of research regarding the therapeutic use of adipose-derived stem cells: literature review. *J Umm Al-Qura Univ Appl Sci* 11 (2025) 63-75.
- [2] Han X, Liao R, Li X, Zhang C, Huo S, Qin, L, Xiong Y, He T, Xiao G, Zhang T, Mesenchymal stem cells in treating human diseases: molecular mechanisms and clinical studies. *Signal Transduct Target Ther* 22 (2025) 1-41.
- [3] Kotani T, Saito T, Suzuka T, Matsuda S, Adipose-derived mesenchymal stem cell therapy for connective tissue diseases and complications. *Inflamm Regen* 44 (2024) 1-23.
- [4] Wang Y, Yang Y, Advances in research on the mechanisms of anti-inflammation of silybin: A review. *Front Immunol* 17 (2026) 1-18.
- [5] Dadashpour M, Kalavi S, Gorgzadeh A, Nosrati R, Firouzi Amandi A, Mohammadikhah M, Seghin Sara MR, Alizadeh E, Preparation and in vitro evaluation of cell adhesion and long-term proliferation of stem cells cultured on silibinin co-embedded PLGA/Collagen electrospun composite nanofibers. *Exp Cell Res* 435 (2024) 1-11.
- [6] Kim D, Lim B, Jang M, Lim S, Kim J, RNA sequencing and data analysis: A revolutionary approach to transcriptome profiling in livestock. In: Kim JM, Kumar Pathak R, Bioinformatics in veterinary science. 1nd ed. Singapore: Springer, 2025: 23-40.
- [7] Kaipa PR, Guda C, Transcriptome profiling reveals Silibinin dose-dependent response network in non-small cell lung cancer cells. *PeerJ* 8 (2020) e10373.
- [8] Kohn KW, Zeeberg BM, Reinhold WC, Pommier Y, Gene expression correlations in human cancer cell lines define molecular interaction networks for epithelial phenotype. *PLoS One* 9 (2014) 1-29.
- [9] Ghasemi M, Turnbull T, Sebastian S, Kempson I, The MTT assay: utility, limitations, pitfalls, and interpretation in bulk and single-cell analysis. *Int J Mol Sci* 22 (2021) 1-30.
- [10] Jin A, Wang S, Wang J, Yu P, Wang Y, Shi J, Zhou S, Simulating the dedifferentiation process of thyroid Cancer: Insights from mouse models and ultrasound imaging. *Ultrasound Med Biol* 52 (2026) 2030-2038.
- [11] Yan X, Li R, Xu J, Liu H, He M, Jiang X, Ren C, Zhou Q, ARHGDI B as a prognostic biomarker and modulator of the immunosuppressive microenvironment in glioma. *Cancer Immunol*

Immunother 74 (2025) 1-17.

- [12] Dovas A, Couchman JR, RhoGDI: multiple functions in the regulation of Rho family GTPase activities. *Biochem J* 9 (2005) 1-9.
- [13] Mosaddeghzadeh N, Ahmadian MR, The RHO family GTPases: Mechanisms of regulation. *Cells* 10 (2021) 1-24.
- [14] Federico A, Dallio M, Loguercio C, Silymarin/silybin and chronic liver disease: A marriage of many years. *Molecules* 22 (2017) 1-16.
- [15] Kowalczyk AP, Green KJ, Structure, function and regulation of desmosomes andrew. *Prog Mol Biol Transl Sci* 116 (2013) 95-118.
- [16] Cai T, Zhu WEI, Chen X, Zhou S, Jia L, Sun Y, Fibroblast growth factor 2 induces mesenchymal stem cells to differentiate into tenocytes through the MAPK pathway. *Mol Med Rep* 8 (2013) 1323-1328.
- [17] Shen N, Polyanskaya A, Qi X, Al Othman A, Permyakova A, Volkova M, Marina M, Mezentsev A, Durymanov M, Modification of mesenchymal stromal cells with silibinin-loaded PLGA nanoparticles improves their therapeutic efficacy for cutaneous wound repair. *Nanomedicine* 61 (2024) 1-11.
- [18] Zhang X, Luo L, Wu Y, The role of CD36 in immune function: bridging innate and adaptive responses. *Front Immunol* 1 (2026) 1-16.
- [19] Zhang J, Xie Y, Jiang S, Huang S, Lv H, Qin Y, Xu J, Dai Z, Wang H, Dai Y, Yang Y, An Y, Zhang G, Emerging therapeutic significance of MEF2C: Structure, function and its implications in diseases. *Dev Dyn* (2026).
- [20] Lin C, Coccione A, Wagenseil J, Elastin, arterial mechanics, and stenosis. *Am J Physiol Cell Physiol* 322 (2022) C875-C886.
- [21] Cui Q, Miao Y, Li M, Zheng H, Yuan Y, Viperin: A Multifunctional protein in antiviral Immunity and disease pathogenesis. *Pathogens* 21 (2025) 1-15.
- [22] RSAD2 radical S-adenosyl methionine domain containing 2 [Homo sapiens (human)] Gene ID: 91543, updated on 5-Aug-2026. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/91543>.
- [23] MX1 MX dynamin like GTPase 1 [Homo sapiens (human)] Gene ID: 4599, updated on 5-Aug-2026. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/4599>.
- [24] Silverman RH, Viral encounters with 2',5'-oligoadenylate synthetase and RNase L during the interferon antiviral response. *J Virol* 81 (2007) 12720-12729.
- [25] Liu B, Xiang L, Zou F, Silibinin promotes osteoblast differentiation of human bone marrow stem cells (hBMSCs). *Eur J Pharmacol* 720 (2013) 313-322.

Research paper

Transcriptomic analysis of the effect of silibinin on human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells using RNA sequencing

Sogand Abedi¹, Farshid Kafilzadeh², Soheila Zamanlui Benisi^{3,4*}, Yaghoob Tahery⁵

1. Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, Central Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

2. Department of Biology, Jahrom Branch, Islamic Azad University, Jahrom, Iran

3. Department of Biomedical Engineering, Islamic Faculty of Engineering,
Central Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran4. Stem Cell and Cell Therapy Research Center, Tissue Engineering and Regenerative
Medicine Institute, Central Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

5. Department of Biology, Jahrom Branch, Islamic Azad University, Jahrom, Iran

Received: 11 August 2026

Accepted: 8 September 2026

Abstract

Background: Human adipose-derived stem cells (hADSCs) are vital in regenerative medicine due to their high differentiation potential and immunomodulatory properties. Silibinin, the primary bioactive compound in milk thistle, possesses diverse pharmacological effects, including anti-inflammatory and antioxidant properties. However, its impact on the genomic expression patterns of hADSCs remains unexplored.

Methods: hADSCs were treated with varying silibinin concentrations (0.5, 1, and 10 µg/mL) for 24 hours, and viability was assessed via MTT assay. To identify differentially expressed genes (DEGs), RNA sequencing (RNA-Seq) was performed on control and 0.5 µg/mL-treated cells on day 12. Gene set enrichment analysis was conducted using WebGestalt (2024) and relevant biological databases.

Results: MTT assays revealed that 0.5 and 1 µg/mL concentrations enhanced cell proliferation, whereas 10 µg/mL exhibited cytotoxicity. RNA-Seq identified 257 DEGs, with 89 genes significantly involved in various biological processes. Key findings included significant differential expression of ARHGDIB (fold change: -14.67), CD36 (+8.65), TNFSF18 (-18.64), and FGF1 (+8.95).

Conclusion: Silibinin (0.5 µg/mL) promotes hADSC proliferation and induces a specific transcriptomic profile. This profile significantly enriches genes associated with cell adhesion, extracellular structure organization, angiogenesis, and ribonuclease activity regulation. The coordinated regulation of genes involved in inflammation, vascular differentiation, and bioadhesion highlights silibinin's therapeutic potential for tissue repair and enhancing cellular functions in regenerative therapies.

Keywords: Adipose-derived mesenchymal stem cells, Gene expression profiling, RNA sequencing, Silibinin

Please cite this article as follows:

Abedi S, Kafilzadeh F, Zamanlui Benisi S, Tahery Y, Transcriptomic analysis of the effects of silibinin on human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells using RNA sequencing. *Iran J Physiol Pharmacol* 10 (2026) 71-81.

*Corresponding authors: Soh.zamanluibenisi@iauctb.ac.ir (ORCID: 0000-0003-3623-8064)