مقاله پژوهشی

بررسی تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از بافت سینوویوم انسان به سلول‌های شبه عصبی در محیط آزمایشگاه

نویسندگان:

الهام کشافی جهرمی[۱]، حجت‌اله کریمی جشنی*[۲]، سعیده عرفانیان[۳]، کاوس صلح‌جو[۴]، عبدالعلی سپیدکار[۵]، حسام‌الدین فخری‌نیا[۵]

۱- گروه زیست‌شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی جهرم، جهرم، ایران
۲- گروه آناتومی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی جهرم، جهرم، ایران
۳- گروه بیوشیمی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی جهرم، جهرم، ایران
۴- گروه میکروب شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی جهرم، جهرم، ایران
۵- گروه جراحی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی جهرم، جهرم، ایران

Journal of Jahrom University of Medical Sciences, Vol. 11, No. 2, Summer 2013

چکیده:

مقدمه: سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از سینوویوم می‌توانند در محیط کشت تک لایه با روند پیری کند و نگهداری قابلیت‌های تمایزیشان به چندین رده به شکل وسیعی گسترش یابند. با تشخیص توانایی‌های بالای سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از سینوویوم، تمایز نورونی این سلول‌ها مورد بررسی قرارگرفته است.

روش کار: سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از بافت سینوویوم از مفصل زانوی بیماران با مشکل پارگی رباط صلیبی قدامی و بیماری کیست پشت زانویی جداسازی شدند. این سلول‌ها با غلظت‌های مختلف سرم گاوی و محیط کشت (Dubleco's Modified Eagles Media -DMEM) تکثیر یافتند. رنگ آمیزی آلیزارین رد و اویل رد برای بررسی بنیادی بودن سلول‌ها انجام شد. سپس در محیط آزمایشگاه سلول‌ها با بتا مرکاپتو اتانول و رتینوئیک اسید القا شدند. آزمایش واکنش زنجیره ای پلی مراز نسخه برداری معکوس (RT-PCR) برای بررسی بیان ژن‌های اختصاصی سلول‌های استئوسیتی و آدیپوسیتی و اثبات حضور ژن‌های نورونی انجام شد.

یافته‌ها: تحلیل ژنی حاکی از بیان شدن ژن‌های اختصاصی رده‌های آدیپوسیتی و استئوسیتی بود. همچنین با القای نورونی، سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از سینوویوم به انواع مختلفی از سلول‌های نورونی متمـــایز شدند. آزمایش RT-PCR، توصیف کننده سطوح mRNA کد شده برای نوروفیلامنت حد واسط و انولاز خاص نورونی در سلول‌های القا شده بود.

نتیجه گیری: در مجموع به نظر می‌رسد بافت سینوویوم که در بیش‌تر عمل‌های جراحی زانو قسمتی از آن کنده و دور ریخته می‌شود، می‌تواند به عنوان منبعی غنی از سلول‌های بنیادی مزانشیمی در پروتکل‌های سلول درمانی و نیز مهندسی بافت مورد استفاده قرار گیرد. القای سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از سینوویوم با مواد القایی از قبیل بتا مرکاپتو اتانول و رتینوئیک اسید می‌تواند سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از بافت سینوویوم را به شکل موثری به سلول‌های شبه‌عصبی متمایز کند.

واژگان کلیدی: سلول‌های بنیادی، تمایز سلول‌ها، سینوویوم

J Jahrom Univ Med Sci 2013; 11(2): 39-49

مقدمه:

سلول‌های بنیادی سلول‌های سوماتیک تمایز نیافته ای هستند که می‌توانند تحت شرایط خاص به یکی از انواع سلول‌های بالغ یا کاملاً تمایز یافته تبدیل شوند [۱]. این سلول‌ها از لحاظ منشأ به دو دسته عمده سلول‌های بنیادی جنینی و سلول‌های بنیادی بالغ تقسیم می‌شوند. سلول‌های بنیادی بالغ از بافت‌های مختلف بدن جدا می‌شوند و بسته به محل جدا شدن دارای خصوصیات متفاوتی می‌باشند. سلول‌های بنیادی بالغ در بسیاری از

* نویسنده مسئول، نشانی: جهرم، بولوار شهید مطهری، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی جهرم
تلفن تماس: ۱۰-۳۳۴۰۴۰۵ ۰۷۹۱ پست الکترونیک: hojat_karimi@yahoo.co.in
دریافت: ۱۳۹۱/۰۸/۲۷ اصلاح: ۱۳۹۱/۱۲/۲۱ پذیرش: ۱۳۹۲/۰۳/۰۶

[Downloaded from jmj.jums.ac.ir on 2022-10-05]
[DOI: 10.29252/jmj.11.2.6]

بافت‌های تخصص یافته بدن از جمله مغز، مغز استخوان، کبد، پانکراس، لوله گوارش، پوست، قرنیه و شبکیه چشم، عضله اسکلتی، عروق خونی و حتی پالپ عاج دندان یافت می‌شوند. نقش مهم این سلول‌ها در بافت‌های مختلف، تولید مجدد سلول‌های اختصاصی بالغ آن بافت است. بنابراین این سلول‌ها در همه اندام‌ها و بافت‌ها یافت می‌شوند و سلول‌های موجود در آن بافت را در طول حیات موجود زنده حفظ، نگهداری و پشتیبانی می‌کنند [۲]. سلول‌های بنیادی بالغ به طور مشخص چند توان بوده و سلول‌های حاصل از تقسیم شان، سلول‌های به نسبت متمایز شده هستند که با عنوان سلول‌های بینابینی یا پیش ساز شناخته می‌شوند. این سلول‌ها با تقسیم شدن به طور مکرر و افزایش تقسیمات، پتانسیل تمایزی کم‌تری داشته و بیش‌تر به سمت سلول‌های بالغ با سرنوشت مشخص پیش می‌روند. از مهم‌ترین سلول‌های بنیادی که امروزه توجه اکثر محققین را به خود جلب کرده است می‌توان به سلول‌های بنیادی مزانشیم اشاره کرد. سلول‌های بنیادی مزانشیمی دارای توانایی خود تجدیدی و تمایز بالایی هستند به نحوی که حتی قادر به تمایز به رده های سلول‌های اکتودرمی و اندودرمی نیز می‌باشند. جداسازی و تکثیر نسبتاً آسان و هم چنین قابلیت پیوند اتولوگ این سلول‌ها، آن‌ها را کاندید مناسبی برای سلول درمانی ساخته است. هر چند مغز استخوان به عنوان یکی از رایج‌ترین منابع سلول‌های بنیادی مزانشیمی مطرح است، اما این سلول‌ها را از منابع دیگری مانند بافت‌های چربی، بافت‌های جفت و بند ناف، خون محیطی نیز جدا کرده‌اند [۳-۵]. بافت سینوویوم نیز یکی از بافت‌هایی است که دارای سلول‌های بنیادی است. مطالعات نشان داده‌اند که قدرت تکثیر سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از بافت سینوویوم نسبت به سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از مغز استخوان، پریوستئوم، بافت چربی و عضله صد برابر بیش‌تر است [۶]. از طرفی این سلول‌ها دارای ویژگی خود تجدیدی طولانی مدت هستند و در طی پاساژهای متناوب و یا حتی طی مراحل انجماد روند پیری از خود نشان نمی‌دهند [۷]. به علاوه، این سلول‌ها دارای ویژگی‌های سرکوب کننده ایمنی مشابه سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق شده از مغز استخوان می‌باشند. این ویژگی باعث می‌شود که این سلول‌ها توانایی گریز از دستگاه ایمنی را داشته باشند و پاسخ ایمنی را مهار کنند [۸]. بافت سینوویوم می‌تواند از طریق آرتروسکوپی بدون این که فرایند تهاجمی زیادی روی دهد و بدون این که بیمار شکایت از درد داشته باشد استخراج و سلول‌های بنیادی مزانشیمی که خاصیت نوسازی بسیار بالایی دارند به دست آید. انجام این عمل آسان و بدون عوارض بوده و تنها مقدار کمی از بافت برای استخراج موفقیت آمیز این سلول‌ها کفایت می‌کند [۹]. علاوه بر بافت سینوویال سالم، در خصوص استخراج و تکثیر سلول‌های مزانشیمی از بافت‌های آسیب دیده سینوویوم بیماران روماتویید آرتریتیس و استئوآرتریتیس نیز مطالعاتی به طور موفقیت آمیز انجام شده است [۱۰]. بنابراین ضرورت دارد که سلول‌های بنیادی بافت سینوویوم به دلیل ویژگی‌های منحصر به فرد آن در مطالعات تمایز سلولی به رده های مختلف سلولی برای کاربردهای کلینیکی مورد پژوهش قرار گیرند.

بیماری‌هایی که دستگاه عصبی مرکزی فرد را هدف قرار می‌دهند، در زمره بیماری‌هایی هستند که بیش‌ترین آسیب و درد را برای انسان به همراه دارند. این بیماری‌های تحلیل برنده اعصاب، طیف وسیعی از بیماری آلزایمر تا سکته مغزی را شامل می‌شوند. با توجه به قابلیت تمایز و تبدیل سلول‌های بنیادی جنینی و بالغ به رده های سلولی مختلف از جمله سلول‌های عصبی، این سلول‌ها می‌توانند به درک بهتر مغز و دستگاه عصبی، علل پیشرفت بیماری، راه های درمانی احتمالی برای بیماری‌های تحلیل برنده اعصاب و حتی کشف داروهای جدید کمک کنند. همان طور که مطالعات اخیر نشان داده‌اند پیوند سلول‌های پیش ساز عصبی مشتق از مغز انسان بزرگ‌سال به مدل حیوانی مبتلا به ضایعه نخاعی سبب تجدید میلین سازی در این سلول‌ها می‌شود که مشابه روند تولید میلین در سلول‌های شوان است [۱۱]. مطالعه حاضر با توجه به جایگاه ویژه سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از بافت سینوویوم، به بررسی تمایز آن‌ها به سلول‌های عصبی می‌پردازد. در صورتی که بتوان سلول‌های جدا شده از بافت سینوویوم را به سلول‌های عصبی تمایز داد، می‌توان از سلول‌های تمایز یافته در پروتکل‌های درمانی برای ضایعات عصبی استفاده کرد.

روش کار:

جدا سازی و کشت سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از سینوویوم

مطالعه حاضر یک مطالعه تجربی است که در آن از ۱۲ بیمار مرد با سن تقریبی ۲۱- ۵۰ سال و ۴ بیمار مرد با سن ۳۷-۵۰ سال که به ترتیب تحت اعمال جراحی بازسازی لیگامان صلیبی قدامی و جداسازی کیست پشت زانویی قرار گرفته بودند، با اخذ رضایت از آنان و اجازه از دانشگاه علوم پزشکی جهرم در سال ۱۳۸۹ بافت سینوویوم تهیه شد. بافت جداشده در شرایط استریل به آزمایشگاه تحقیقات دانشگاه علوم پزشکی منتقل شدند. نمونه‌ها ابتدا خرد شدند و سپس با ریختن مقدار ۰/۰۵ میلی گرم پودر کلاژناز D (شرکت roche) به ازای هر ۲۰ سی سی محیط کشت روی آن‌ها، عمل هضم بافتی به مدت سه ساعت

[Downloaded from jmj.jums.ac.ir on 2022-10-05]
[DOI: 10.29252/jmj.11.2.6]

انجام شد. در پایان این زمان، بافت هضم شده از صافی نایلونی با ضخامت ۰/۷۰ میکرومتر عبور داده شد و سپس با PBS (Gibco BRL,USA) شسته و سوسپانسون حاصل به مدت ۵ دقیقه با سرعت ۱۵۰۰rpm سانتریفیوژ شد. رسوب حاصل در فلاسک های کشت سلولی و در محیط کشت DMEM (Gibco BRL, USA) حاوی ۱۵ درصد FBS (Gibco BRL,USA) و ۱۰۰ واحد در میلی لیتر پنی سیلین (Sigma,USA) و ۱۰۰ میکروگرم در میلی لیتر استرپتومایسین (Sigma,USA) در شرایط کشت سلولی (دمای ۳۷C° و فشار CO2 برابر با ۵ درصد) کشت داده شد. ۲۴ ساعت بعد محیط کشت سلول‌ها تعویض و سلول‌های شناور روی سطح فلاسک دور ریخته و سلول‌های چسبیده به فلاسک نگه داشته شدند. محیط کشت سلول‌ها هر سه روز یک بار تعویض می‌شد. هنگامی که تراکم سلول‌های چسبیده به کف فلاسک به ۷۰ تا ۸۰ درصد رسید، پاساژ سلول‌ها با تریپسین ۰/۲۵ درصد (Gibco BRL,USA) و اتیلن دی آمین تترا استیک اسید ۰/۰۴ درصد (Sigma,USA) انجام شد. برای خالص سازی سلول‌های مزانشیمی این عمل تا چهار پاساژ ادامه یافت. در این مطالعه برای اثبات بنیادی بودن سلول‌های کشت داده شده از آزمایش‌های تمایزی و سپس رنگ آمیزی های اختصاصی استفاده شد که پس از کشت و پاساژ سلول‌های جدا شده محیط کشت آن‌ها با محیط القا کننده استخوانی و محیط القا کننده چربی جایگزین شد. به طور مرتب هر سه روز یک بار و به مدت سه هفته، محیط کشت این سلول‌ها تعویض می‌شد. به طور هم زمان و مشابه، سلول‌هایی نیز به عنوان کنترل منفی در نظر گرفته شدند که محیط کشت آن‌ها DMEM و ۱۰ درصد سرم بود.

ارزیابی سلول‌های متمایز شده به استئوسیت ها و آدیپوسیت ها به ترتیب با رنگ آمیزی هیستوشیمیایی آلیزارین رد، اویل رد و آزمایش RT-PCR انجام شد [۷].

پیش القا و القای سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از سینوویوم

پس از تریپسینه کردن سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از بافت سینوویوم پاساژ چهارم، در طی دو مرحله پیش القا و القا به سلول‌های عصبی متمایز شدند. در مرحله پیش القا از بتا مرکاپتو اتانول یک میلی مولار در محیط کشت DMEM بدون سرم استفاده شد. پس از گذشت ۲۴ ساعت از مرحله پیش القا ابتدا شستشو با PBS انجام شد و سپس محیط کشت حاوی ۱۵ درصد سرم و رتینوئیک اسید یک میلی مولار به روی سلول‌ها اضافه شد. این فلاسک ها به مدت سه روز در انکوباتور در شرایط مناسب نگهداری شدند. بعد از این مرحله، سلول‌ها برای استخراج RNA و انجام آزمایش RT-PCR آماده شدند [۱۲ و ۱۶].

آزمایش RT-PCR

سلول‌های تحت تمایز و سلول‌های تمایز نیافته ابتدا تریپسینه و سانتریفیوژ شدند. سپس مایع رویی دور ریخته شد و رسوب سلولی حاصل برای استخراج RNA آماده شد. مراحل استخراج به کمک کیت کیاژن با شماره ۷۴۱۳۴ و با توجه به دستورالعمل آن انجام شد. سپس واکنش رونویسی معکوس با استفاده از کیت RT-PCR one step شرکت بیونیر (k-2055) عملی شد. این واکنش در حجم نهایی ۲۰ میکرو لیتر انجام و برای تهیه حجم RNA مذکور، آب مقطر استریل و پرایمرهای بالادست و پایین دست به لوله های Master mix (بیونیر Cat No:K- 2016) افزوده شد. پرایمر مورد استفاده در این مطالعه از مقالات مختلف انتخاب و در برنامه blast صحت آن‌ها مورد تایید قرار گرفته بود. پس از آماده ساختن حجم مورد نظر، آزمایش RT-PCR انجام گرفت. این واکنش به مدت ۷۰ دقیقه در دمای°C ۴۲ انجام و cDNA مذکور به منظور ورود به PCR برای ژن نوروفیلامنت حد واسط در شرایط ۳۵ سیکل تکرار (دناتوراسیون اولیه به مدت ۵ دقیقه در دمای °C ۹۵، دناتوراسیون ۴۵ ثانیه در دمای °C ۹۲، اتصال پرایمر به مدت یک دقیقه در دمای ۵۴°C، امتداد یافتن پرایمرها با DNA پلی مراز در دمای°C ۷۲ و زمان امتداد نهایی ۱۰ دقیقه) انجام شد. همچنین آزمایش PCR برای ژن‌های NES، LPL، ALP و GAPDH نیز با ۳۵ سیکل، در شرایط مشابه ژن نوروفیلامنت حد واسط و به ترتیب در دماهای اتصال پرایمر ۵۴/۱، ۵۵، ۵۴/۵ و ۵۸ درجه سانتی‌گراد با استفاده از دستگاه thermal cyclerانجام شد. ژن GAPDH به عنوان یک ژن House Keeping، جهت کنترل داخلی مورد استفاده قرار گرفته است. پرایمر ها و ژن‌های استفاده شده در جدول ۱ نشان داده شده‌اند.

یافته‌ها:

مشاهدات مورفولوژی قبل از القا

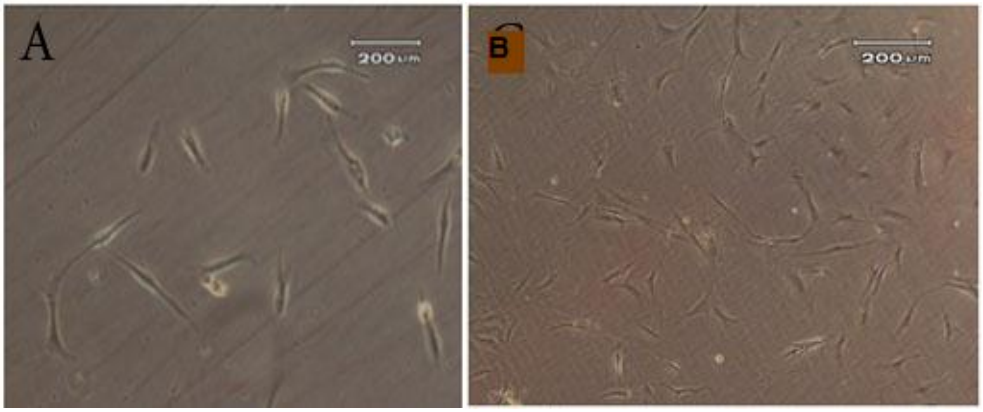
معمولاً سلول‌ها در روز اول به دو شکل در محیط نمایان هستند. تعدادی از آن‌ها که در حال تکثیر هستند ظاهری گرد، کروی و کوچک دارند و بقیه که تعداد بیش‌تری هستند به شکل دوکی و شبه فیبروبلاستی مشخص می‌شوند. برخی از سلول‌ها نیز به صورت پهن و چسبنده به کف فلاسک ظاهر شده که از نظر اندازه بزرگ‌تر از سایر سلول‌ها در محیط کشت دیده می‌شوند. بر اساس مشاهدات روزانه کشت سلولی، سه روز پس از کشت اولیه تعدادی معدود سلول‌های کشیده با مورفولوژی

[Downloaded from jmj.jums.ac.ir on 2022-10-05]
[DOI: 10.29252/jmj.11.2.6]

فیبروبلاست مانند مشاهده شد (شکل A۱). اما در روز هفتم کشت اولیه تعداد سلول‌های دوکی فیبروبلاستی شکل بیش‌تر شد. این سلول‌ها پس از دوره کشت اولیه و ورود به مرحله پاساژ سلولی خلوص بیشتری یافتند (شکل B۱) که با پاساژهای بالاتر سرعت تکثیرشان نیز افزایش یافت. پس از پاساژ چهارم، سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از بافت سینوویوم از نظر مورفولوژی ظاهری به نسبت یک دست شدند.

جدول ۱: توالی پرایمرهای مورد استفاده

نام ژن و شماره Refseq	توالی پرایمر	طول قطعه تکثیر شده	دمای اتصال پرایمرها
GAPDH	F: GTCAACGGATTTGGTCGTATTG R: CATGGGTGGAATCATATTGGAA	139bp	58 °C
LPL	F: GTC CGT GGC TAC CTG TCA TT R: AGC CCT TTC TCA AAG GCT TC	717 bp	55 °C
ALP	F: CTC CTC AGC CTC TGC AAC TG R: AGGGTCAGGAGATGAGACTGG	300bp	54/5 °C
NFM	F: GCAATATGAGGGGACTGCAT R: ACTGCTGTGACGTTTAACATCG	336-337bp	54 °C
NSE	F: GGG ACT GAG AAC AAA TCC AAG R: CTC CAA GGC TTC ACT GTT CTC	572bp	54/1 °C



شکل۱: سلول‌های جدا شده از بافت سینوویوم در محیط کشت، روز سوم و در مرحله پاساژ دوم سلولی
A: تصویر سلول‌های جدا شده از سینوویوم بیماری با پارگی رباط صلیبی سه روز پس از کشت اولیه (بزرگ نمایی ۲۰x)
B: تصویر سلول‌های جدا شده از سینوویوم بیماری با کیست پشت زانویی در پاساژ دوم (بزرگ نمایی ۲۰x)

مشاهدات مورفولوژی پس از القا

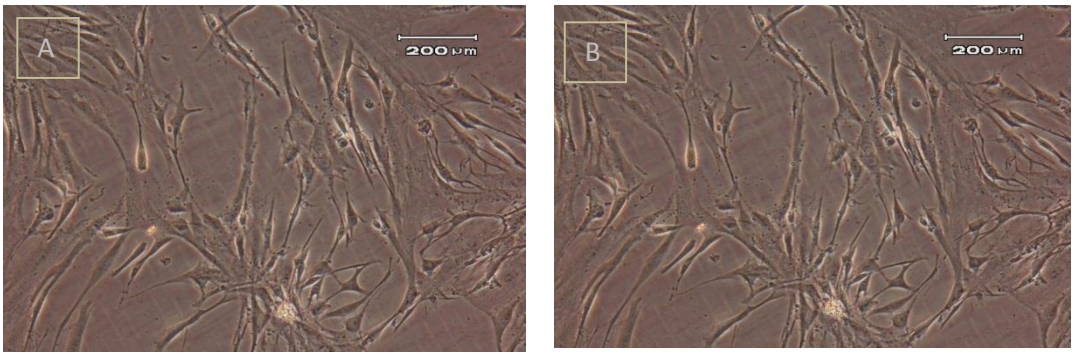
در بررسی مورفولوژی سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از بافت سینوویوم مشاهده شد که جسم سلولی پس از گذراندن پیش القا و القا برجسته شده و زواید و استطاله‌هایی با ابعادی بعضی اوقات چند برابر خود جسم سلولی در آن ایجاد می‌شود که با سلول‌های جانبی ارتباط پیدا می‌کنند (شکل ۲A و ۲B).

تعیین هویت سلول‌های خالص شده (ارزیابی بنیادی بودن سلول‌های کشت شده)

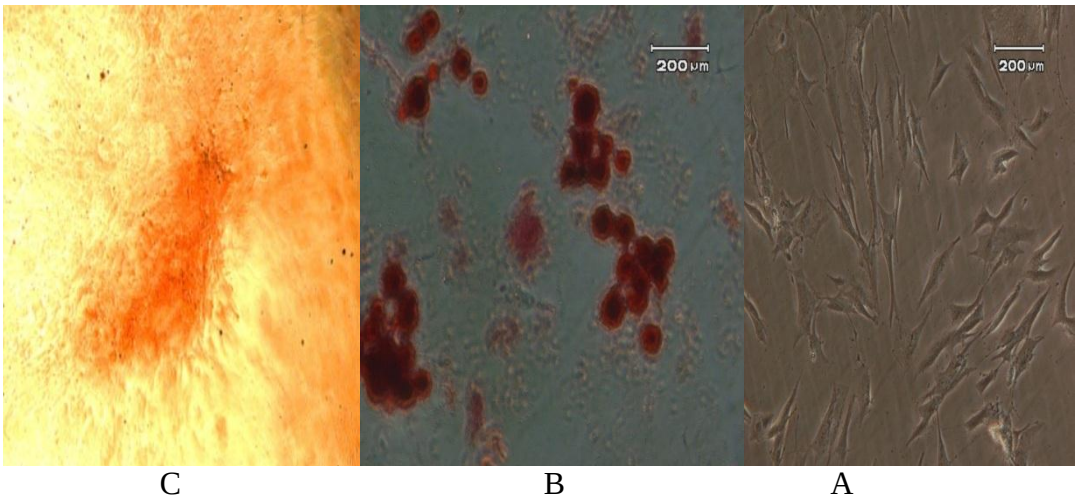
آزمایش تمایزی با رنگ آمیزی اختصاصی اویل رد و آلیزارین رد

سلول‌های کنترل منفی که به مدت ۲۱ روز در محیط بدون القا قرار داشتند با هر دو نوع رنگ آمیزی رنگ نگرفتند. در طی ۲۱ روز کشت سلول‌ها در محیط القا به سمت آدیپوسیت ها، واکوئل های چربی در سلول ظاهر شدند و توسط رنگ آمیزی اویل رد رنگ گرفتند. همچنین رنگ آمیزی اختصاصی تمایز یافتگی سلول‌ها به سمت سلول‌های استئوبلاستی به منظور تشخیص ذخایر کلسیمی بررسی شد. سلول‌های تمایز یافته با تشکیل ترابکول های استخوانی، در رنگ آمیزی آلیزارین رد به رنگ قرمز در آمدند. شکل ۳ این رنگ آمیزی را نشان می‌دهد.

[Downloaded from jmj.jums.ac.ir on 2022-10-05]
[DOI: 10.29252/jmj.11.2.6]



شکل A۲: سلول‌های در مرحله پیش القا با بتا مرکاپتو اتانول (بزرگ نمایی ۲۰x)
شکل B۲: سلول‌هایی که مرحله پیش‌القا را با بتا مرکاپتو اتانول گذراندند و با رتینوئیک اسید القا شدند (بزرگ نمایی ۲۰x)



شکل ۳: رنگ آمیزی اختصاصی اویل رد و آلیزارین رد
A: سلول‌های کنترل منفی که به مدت ۲۱ روز در محیط بدون القا قرار داشتند (بزرگ نمایی ×۲۰)
B: سلول‌هایی که به مدت ۲۱ روز در معرض محیط تمایز به رده آدیپوسیتی قرار گرفتند و با اویل رد رنگ آمیزی شدند (بزرگ نمایی ۱۰۰x)
C: سلول‌هایی که به مدت ۲۱ روز در معرض محیط تمایز به رده استئوسیتی قرار گرفتند و با آلیزارین رد رنگ آمیزی شدند (بزرگ نمایی ۱۰۰x)

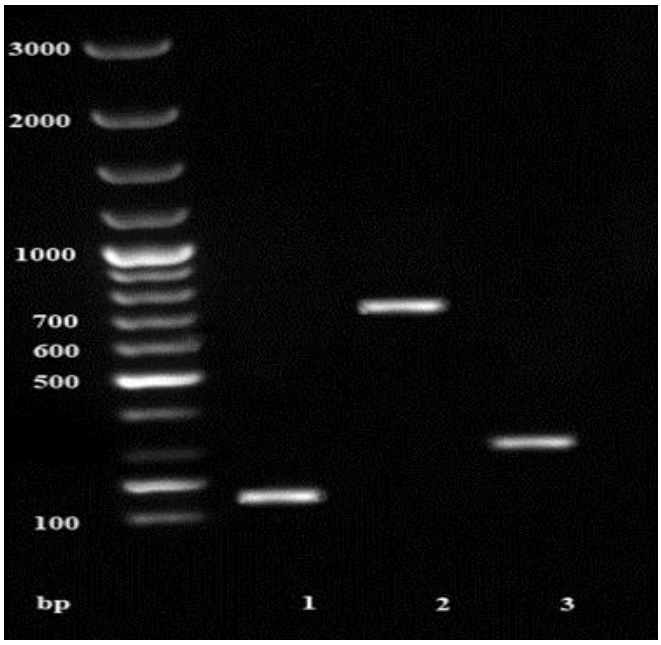
ارزیابی تمایز یافتگی سلول‌ها به کمک آزمایش RT-PCR

برای بررسی بیان ژن‌های مختص رده ای که سلول‌ها به سمت آن متمایز شدند از آزمایش RT-PCR استفاده شد. بدین منظور برای بررسی بیان ژن‌های ویژه سلول‌های آدیپوسیتی از لیپوپروتئین لیپاز (LPL) و برای ژن‌های استئوسیتی از آلکالین فسفاتاز (ALP) استفاده شد. همچنین ژن GAPDH به عنوان کنترل با ۱۳۹ جفت باز مورد استفاده قرار گرفت. طول قطعه ALP، ۳۰۰ جفت باز و طول قطعه LPL، ۷۱۷ جفت باز بود. نتایج RT-PCR ژن‌های مختص رده ای در شکل ۴ آورده شده است.

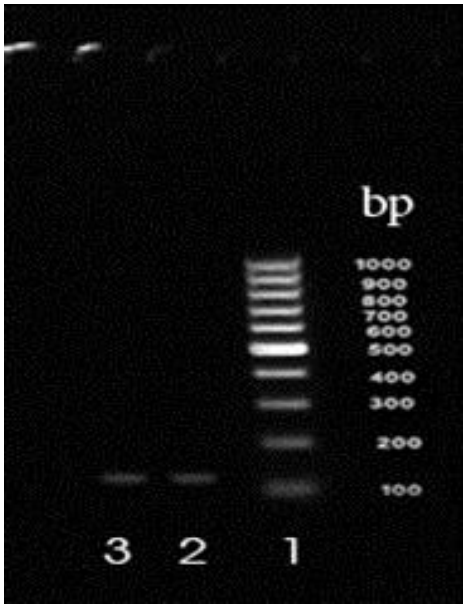
بررسی تمایز یافتگی سلول‌های بنیادی مشتق از بافت سینوویوم به سلول‌های شبه عصبی در محیط آزمایشگاه

برای اثبات تمایز سلول‌های مزانشیمی به سلول‌های عصبی، بیان ژن‌های عصبی با استفاده از RT-PCR بررسی شد. نتایج آزمایش RT- PCR نشان داد: الف: GAPDH که در همه انواع سلول‌ها بیان می‌شود و به عنوان کنترل استفاده شد در گروه القایی و گروه تمایز نیافته بیان شد. طول قطعه تکثیر شونده در پرایمر مورد استفاده GAPDH، ۱۳۹ جفت باز بود. شکل ۱– ۵ نشان دهنده الکتروفوروگرام از محصول RT-PCR حاصل از استخراج mRNA ژن GAPDH در گروه سلول‌های بنیادی مشتق از بافت سینوویوم پیش از القا و پس از القا می‌باشد. ردیف سمت راست DNA lader را نشان می‌دهد.

[Downloaded from jmj.jums.ac.ir on 2022-10-05]
[DOI: 10.29252/jmj.11.2.6]



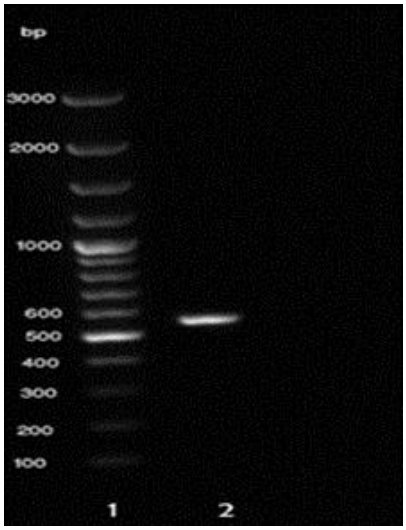
شکل ۴: نتایج ارزیابی تمایز یافتگی سلول‌ها به سمت رده های آدیپوسیتی و استئوسیتی
ستون ۱: بیان ژن GAPDH (۱۳۹جفت باز) به عنوان کنترل
ستون ۲: بیان ژن LPL (۷۱۷ جفت باز) در سلول‌های القا شده به سمت آدیپوسیت
ستون ۳: بیان ژن ALP (۳۰۰ جفت باز) در سلول‌های القا شده به سمت استئوسیت



شکل ۱-۵: الکتروفوروگرام از محصول RT-PCR حاصل از استخراج mRNA ژن GAPDH در گروه سلول‌های بنیادی مشتق از بافت سینوویوم پیش از القا و پس از القا
ستون ۱: مارکر وزن مولکولی
ستون ۲: بیان ژن GADPDH (۱۳۹ جفت باز) در سلول‌های بنیادی مشتق از بافت سینوویوم القا نشده
ستون ۳: بیان ژن GADPDH (۱۳۹ جفت باز) در سلول‌های بنیادی مشتق از بافت سینوویوم القا شده به سوی عصبی با بتا مرکاپتو اتانول

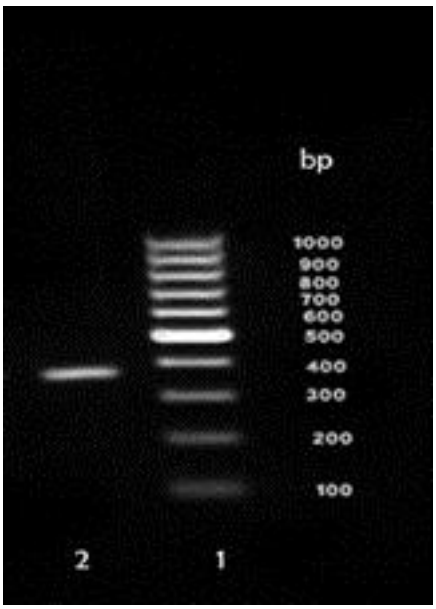
[Downloaded from jmj.jums.ac.ir on 2022-10-05]
[DOI: 10.29252/jmj.11.2.6]

ب: بیان ژن انولاز خاص نورونی با ۵۷۲ جفت باز در گروه القا شده
این ژن به طور اختصاصی در سلول‌های پیش ساز عصبی بیان می‌شود.



شکل ۲-۵- الکتروفوروگرام از محصول RT-PCR حاصل از استخراج mRNA ژن انولاز خاص نورونی در گروه سلول‌های بنیادی مشتق از بافت سینوویوم القا شده با بتا مرکاپتو اتانول.
ستون ۱: مارکر وزن مولکولی
ستون ۲: بیان ژن انولاز خاص نورونی (۵۷۲ جفت باز) در سلول‌های بنیادی مشتق از بافت سینوویوم القا شده به سمت عصبی با بتا مرکاپتو اتانول

ج: بیان ژن نوروفیلامنت حد واسط با ۳۳۷ جفت باز در گروه القا شده.
ژن نوروفیلامنت حد واسط در سلول‌های بالغ نورونی بیان می‌شود.



شکل ۳-۵. الکتروفوروگرام از محصول RT-PCR حاصل از استخراج mRNA ژن نوروفیلامنت حد واسط در گروه سلول‌های بنیادی مشتق از بافت سینوویوم القا شده با بتا مرکاپتو اتانول
ستون ۱: مارکر وزن مولکولی
ستون ۲: بیان ژن انولاز خاص نورونی (۵۷۲ جفت باز) در سلول‌های بنیادی مشتق از بافت سینوویوم القا شده به سمت عصبی با بتا مرکاپتو اتانول

[Downloaded from jmj.jums.ac.ir on 2022-10-05]
[DOI: 10.29252/jmj.11.2.6]

بحث:

ترمیم آسیب‌های نورونی دستگاه اعصاب مرکزی و بازسازی نورونی یکی از مهم‌ترین دغدغه های متخصصین اعصاب است. مطالعات اخیر نشان داده است که سلول‌های بنیادی جنینی، سلول‌های بنیادی عصبی و سلول‌های بنیادی مزانشیمی پتانسیل تمایز به نورون ها را دارند و در مدل‌های حیوانی می‌توانند پس از پیوند عملکرد نورونی نشان دهند [۱۳]. اگرچه موانع اخلاقی و قانونی برای استخراج، تخلیه و تمایز سلول‌های بنیادی جنینی وجود دارد و منابع دسترسی به آن‌ها نیز محدود و مشکل است، اما سلول‌های بنیادی مزانشیمی به دلیل توانایی بالای خود تجدیدی، دسترسی آسان، تمایز به رده های مختلف، ایمنی پایین و عدم داشتن مشکلات اخلاقی به شکل گسترده ای استفاده می‌شوند. در این مطالعه برای اولین بار در ایران به بررسی امکان تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از بافت سینوویوم به سلول‌های عصبی در محیط آزمایشگاه پرداخته شده است. بسیاری از محققین از سلول‌های بنیادی مزانشیمی برای القای سلول‌های نورونی یا سلول‌های نوروگلیا استفاده کرده‌اند. وودبوری و همکاران برای اولین بار گزارش کردند که سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از مغز استخوان می‌توانند سد تمایز به رده های مزانشیمی را شکسته و به نورون تمایز یابند. پروتکل تیمار سلول‌های مزانشیمی جهت تمایز به سلول‌های عصبی با کمک مواد القایی بتا مرکاپتو اتانول، DMSO، BHA بود. در روش این محققین، مرحله پیش القا ۲۴ ساعت قبل از القای نورونی با استفاده از محیط کشت DMEM، سرم ۲۰ درصد و به میزان یک میکرومولار از بتا مرکاپتو اتانول انجام شده است. در مرحله القا، سلول‌ها در محیط کشت DMEM و عامل القایی بتا مرکاپتو اتانول به میزان ۱۰-۱ میکرومولار قرار گرفتند. گروه‌های آزمایشی بعدی نیز به ترتیب در مواجهه با DMEM به همراه DMSO ۲ درصد و BHA ۲۰۰ میکرومولار قرار گرفتند. با این پروتکل ۸۰ درصد از سلول‌ها ژن‌های انولاز خاص نورونی و نوروفیلامنت حد واسط را بیان کردند [۱۴]. سانشز راموس و همکاران گزارش کردند سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از مغز استخوان انسانی و موشی می‌توانند به نورون ها و سلول‌های گلیا در حضور رتینوئیک اسید و فاکتورهای نوروتروفیک مشتق از مغز تمایز یابند. فاکتورهای نوروتروفیک مورد استفاده در این آزمایش شامل فاکتور رشد اپیدرمی (EGF) و فاکتور نوروتروفیک مشتق از مغز به همراه رتینوییک اسید ۰/۵ میکرومولار بودند. نتایج این تحقیق نشان داد که القای سلول‌های مزانشیمی مشتق از مغز استخوان در محیط کشت DMEM و سرم و حضور این عوامل نوروتروفیک بیان کننده مارکر سلول‌های پیش ساز عصبی مانند نستین و نئوون که نوعی پروتئین هسته ای ویژه سلول‌های نورونی است می‌باشد [۱۵]. نوع سرم استفاده شده، تفاوت در گونه یا نژاد و استفاده از مواد و القا کننده های تمایزی به سلول‌های شبه عصبی و گلیالی از مهم‌ترین عوامل ایجاد کننده تفاوت در تحقیقات تمایز سلول‌های مزانشیمی به سلول‌های عصبی است [۱۶]. در مطالعه حاضر از سرم، سلول‌های بافت سینوویوم انسانی و ماده القایی بتا مرکاپتو اتانول استفاده شد. نتایج نشان دهنده آن است که سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از بافت سینوویوم می‌توانند به سلول‌های نورونی با حضور عوامل القایی مانند بتا مرکاپتو اتانول بدون سرم و سپس حضور رتینوئیک اسید به همراه سرم متمایز شوند. مورفولوژی سلول‌ها بسیار مشابه نتایجی است که دیگر محققین با استفاده از این مواد القاگر به دست آورده‌اند [۱۴، ۱۶]. هر چند سازوکار دقیق القا تمایز نورونی بتا مرکاپتو اتانول شناخته شده نیست، اما احتمالاً ویژگی‌های آنتی اکسیدانی که بقای عصبی را در محیط کشت افزایش می‌دهد [۱۷] ممکن است به طور نسبی مسئول القا باشد. رتینوئیک اسید که مشتق از رتینول است نقش مهمی در تنظیم تکثیر سلولی، تمایز و آپوپتوز بازی می‌کند. این اسید در بافت‌های مختلف جنینی و بالغ حیوانات به ویژه در دستگاه عصبی وجود دارد و باعث پیشرفت در تمایز عصبی می‌شود [۱۸].

نتایج تحقیق حاضر با هر یک از مواد القایی نشان می‌دهد که سلول‌ها در گروه القا شونده به شکل سلول‌های شبه عصبی در می‌آیند (شکل A ۲). با افزودن رتینوئیک اسید به سلول‌هایی که پیش القا را پشت سر گذارده بودند، مشاهده شد که پس از سه روز میزان تراکم سلولی افزایش یافته و مورفولوژی سلول‌ها همچنان به شکل عصبی ولی کشیده شده‌اند (شکل ۲B). برای اثبات تمایزی بودن سلول‌ها، رنگ آمیزی های اختصاصی آلیزارین رد و اویل رد انجام شد (به ترتیب شکل‌های ۳B و ۳C). از آن جا که یکی از معیارهای اصلی در تشخیص سلول‌های بنیادی توانایی این سلول‌ها برای متمایز شدن به انواع سلول‌های بالغ است. بنابراین سلول‌های بنیادی بالغ مزانشیمی بایستی قادر باشند که انواع سلول‌های بافت مزانشیمی از جمله فیبروبلاست، کندروسیت، استئوسیت و آدیپوسیت را تولید کنند. سلول‌های مزانشیمی القا شده با محیط تمایز استخوانی و چربی پس از ۲۱ روز القا به ترتیب در رنگ آمیزی های آلیزارین رد و اویل رد تشکیل ترابکول های استخوانی و واکوئل های چربی را داده بودند. نتایج این نوع خاص از رنگ آمیزی دال بر بنیادی بودن سلول‌های مزانشیمی کشت داده شده است. کدیور و همکاران نیز با این روش رنگ

[Downloaded from jmj.jums.ac.ir on 2022-10-05]
[DOI: 10.29252/jmj.11.2.6]

آمیزی بنیادی بودن سلول‌های مزانشیمی مشتق شده از بافت سینوویوم را نشان داده‌اند [۱۹]. برای اثبات تمایز یافتگی سلول‌ها از آزمایش‌های مختلفی استفاده می‌شود. یکی از رایج‌ترین آزمایش‌های مورد استفاده، آزمایش RT-PCR می‌باشد که با دقت و حساسیت بالایی بیان ژن خاص مورد نظر در سلول را نشان می‌دهد. در این مطالعه بیان ژن LPL و ALP به ترتیب نشان از تمایز یافتگی این سلول‌ها به سمت رده های آدیپوسیتی و استئوسیتی بود که خود حاکی از بنیادی بودن آن‌ها است (شکل ۴). باری و همکاران نیز قبلاً با استفاده از برخی ژن‌های دیگر تمایز یافتگی این سلول‌ها را مشاهده کرده بودند. نتایج مطالعه حاضر با این مطالعه در یک راستا است [۲۰]. همچنین نتایج حاصل از تحقیق حاضر نشان می‌دهد که ژن‌های انولاز خاص نورونی (شکل ۲-۵) و نوروفیلامنت حد واسط (شکل ۳-۵) در گروه القا شونده بیان شده‌اند، در حالی که در گروه بدون القا بیان نشده‌اند. ژن انولاز خاص نورونی یکی از انواع ژن‌هایی است که در سلول‌های عصبی بیان می‌شود. پژوهش‌ها نشان می‌دهد که فعالیت آنزیمی، پروتئینی و mRNA انولاز خاص نورونی در اولیگودندروسیت های کشت شده در مقایسه با نورون های کشت شده در موش مشاهده شده است. بیان انولاز خاص نورونی در طول تمایز پیش سازهای اولیگودندروسیتی افزایش می‌یابد. در محیط بدن موجود زنده، پروتئین‌های انولاز خاص نورونی در اولیگودندروسیت های تمایز یافته و در سلول‌های بالغ کاملاً سرکوب می‌شوند. از طرفی، فعالیت‌های آنزیمی، پروتئینی و mRNA انولاز خاص نورونی در آستروسیت های نوع یک در سطوح بسیار پایین‌تر نسبت به نورون ها و اولیگودندروسیت ها مشاهده شده است. از این رو، انولاز خاص نورونی برای اثبات تمایز یافتگی نورون ها تخصصی نیست، اما می‌تواند نشان دهنده تمایز در سلول‌های گلیال باشد [۲۱]. بنابراین، احتمال می‌رود بیان ژن انولاز خاص نورونی در این جا نیز دال بر تمایز یافتگی سلول‌های بنیادی مشتق از بافت سینوویوم به سمت سلول‌های گلیال باشد. از دیگر ژن‌های عصبی بیان شده نوروفیلامنت حد واسط بود. به طور کلی نوروفیلامنت ها دسته بزرگی از فیلامنت های حد واسط نورون های دستگاه عصبی مرکزی و محیطی هستند که از واحدهای نوروفیلامنت با وزن مولکولی بالا پایین و نوروفیلامنت حد واسط تشکیل شده‌اند. حضور نوروفیلامنت ها ضمانت کننده هتروپلیمریزاسیون است. نوروفیلامنت هایی چون نوروفیلامنت حد واسط در سلول‌های تمایز یافته عصبی بالغ یافت می‌شوند [۲۲]. بنابراین به نظر می‌رسد که سلول‌های بنیادی مشتق از بافت سینوویوم القا شده در این پژوهش توانایی تمایز به سلول‌های شبه عصبی را داشته‌اند. این نتایج در راستای نتایجی است که دیگر محققان انتشار داده‌اند. برای نمونه، ژیمینگ لیو (Zhiming Liu) و همکاران نیز سلول‌های بنیادی مشتق از بافت سینوویوم استخراج شده از مفصل تمپوماندیبولار را با استفاده از bfgf (25ng/ml) به سلول‌های عصبی تمایز دادند. سرم مورد استفاده آن ها FCS و محیط کشت DMEM بود. نتایج آزمایش RT-PCR و ایمونوسیتوشیمی این محققین حاکی از بیان نوروفیلامنت زنجیره سبک و حضور نستین در سلول‌های القا شده بود [۲۳]. همچنین سوجئونگ (Sujeong) با استفاده از سلول‌های بنیادی بافت چربی و با bfgf (100ng/ml) و forskolin ۱۰ میکرومولار، نورون ها و نوروگلیا را ایجاد و بیان بسیاری از مارکرهای نورونی مانند انولاز خاص نورونی، نوروفیلامنت حد واسط، نوروفیلامنت زنجیره سبک و MAP2 که ژنی بیان کننده پروتئین مرتبط با میکروتوبول است را مثبت ارزیابی کرد [۲۴]. به هر حال به نظر می‌رسد مهم‌ترین علت نتایج متفاوت در مطالعات مختلف به نوع ماده القایی و سرم استفاده شده ارتباط داشته باشد. همچنین این موضوع دور از ذهن نیست که توانایی متفاوت این سلول‌ها برای بقا و تکثیر دلیل تفاوت قابلیت‌های تمایزی این سلول‌ها باشد.

نتیجه گیری: با توجه به این واقعیت که قدرت تکثیر سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از بافت سینوویوم در مقایسه با سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از مغز استخوان، پریوستئوم، بافت چربی و عضله صد برابر بیش‌تر است و همچنین این سلول‌ها قابلیت‌ها خود تجدیدی بالایی داشته و روند پیری در آن‌ها کند می‌باشد، بنابراین کاندید مناسبی جهت تمایز یافتگی به سایر سلول‌ها و در نتیجه قابل استفاده در مطالعات کلینیکی باشند. به نظر می‌رسد بافت سینوویوم می‌تواند به عنوان منبعی غنی از سلول‌های بنیادی مزانشیمی جهت استفاده در پروتکل‌های سلول درمانی و نیز مهندسی بافت مورد توجه قرار گیرد.

تقدیر و تشکر: بدین وسیله نویسندگان این مقاله از معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی جهرم بابت تأمین هزینه انجام پژوهش و از آقای دکتر مازیار بهاءالدین برای همکاری در تهیه نمونه های مورد مطالعه سپاسگزاری می‌نمایند.

تعارض منافع: نویسندگان هیچ‌گونه تعارض منافعی در این مطالعه نداشته‌اند.

[Downloaded from jmj.jums.ac.ir on 2022-10-05]
[DOI: 10.29252/jmj.11.2.6]

References:

1. Paulette M. Stem cells and their potential for clinical application. JAMA 2008; 299(14): 1724-5.
2. Piersma AH, Brockbank KG, Ploemacher R, et al. Characterization of fibroblastic stromal cells from murine bone marrow. Exp Hematol 1985; 13(4): 237-43.
3. Zuk PA, Zhu M, Mizuno H, et al. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. Tissue Eng 2001; 7(2): 211-28.
4. Bieback K, Kern S, Klüter H, et al. Critical parameters for the isolation of mesenchymal stem cells from umbilical cord blood. Stem Cells 2004; 22(4): 623-34.
5. Zvaifler NJ, Marinova-Mutafchieva L, Adams G, et al. Mesenchymal precursor cells in the blood of normal individuals. Arthritis Res 2000; 2(6): 477-88.
6. Yoshimura H, Muneta T, Nimura A, et al. Comparison of rat mesenchymal stem cells derived from bone marrow, synovium, periosteum, adipose tissue,and muscle. Cell Tissue Res 2007; 327(3): 449-62.
7. De Bari C, Dell'Accio F, Tylzanowski P, et al. Multipotent esenchymal stem cells from adult human synovial membrane. Arthritis Rheum 2001; 44(8): 1928-42.
8. Djouad F, Bony C, Häup T, et al. Transcriptional profiles discriminate bone marrow-derived and synovium-derived mesenchymal stem cells. Arthritis Res Ther 2005; 7(8): 1304-15.
9. Sakaguchi Y, Sekiya I, Yagishita K, et al. Comparison of human stem cells derived from various mesenchymal tissues: superiority of synovium as a cell source. Arthritis Rheum 2005; 52(8): 2521-9.
10. Nagase T, MunetaT, Ju YJ, et al. Analysis of the chondrogenic potential of human synovial stem cells according to harvest site and culture parameters in knees with medial compartment osteoarthritis. Arthritis Rheum 2008; 58(5): 1389-98.
11. Yukinori A, Osamu H, Takaaki K, et al. Transplantation of clonal neural precursor cells derived from adult human brain establishes functional peripheral myelin in the rat spinal cord. Exp Neurol 2001 ;167(1): 27-39.
12. Keilhoff G, Goihl A, Langnäse K, et al. Transdifferentiation of mesenchymal stem cells into Schwann cell-like myelinating cells. Europ J Cell Biol 2006; 85(1): 11-24.
13. Wichterle H, Lieberam I, Porter JA, et al. Directed differentiation of embryonic stem cells into motor neurons. Cell 2002; 110(3): 385-97.
14. Woodbury D, Schwarz EJ, Prockop DJ, et al. Adult rat and human bone marrow stromal cells differentiate into neurons. J Neurosci Res 2000; (61) 364-70.
15. Sanchez-Ramos J, Song S, Cardozo-Pelaez FC, et al. Adult bone marrow stromal cells differentiate into neural cells in vitro. Exp Neurol 2000;164(2): 247-56.
16. Kaka GH, Tiraihi T, Aziz Zadeh Delshad A. A study on transdifferentiation of bone marrow stromal cells into neuronal and glial-like cells in vitro by different inducers. J Iran Anatom Sci 2009; 6: 525-36. (Persian)
17. Ishii K, Katayama M, Hori K, et al. Effects of 2-mercaptoethanol on survival and differentiation of fetal mouse brain neurons cultured in vitro. Neurosci Lett 1999; 163(2): 159-62.
18. Takahashi J, Palmer TD, Gage FH. Retinoic acid and neurotrophins collaborate to regulate neurogenesis in adultderived neural stem cell cultures. J Neurobiol 1999; 38(1): 65-81.
19. Kadivar M, Darvish M, Salehi Moghadam M. Isolation, culture and characterization of human synovium-derived mesenchymal stem cells. Yakhteh Med J 2008; 11: 160-7. (Persian)
20. De Bari C, Dell'Accio F, Tylzanowski P, et al. Multipotent esenchymal stem cells from adult human synovial membrane. Arthritis Rheum 2001; 44(8): 1928-42.
21. Sensenbrenner, M. Expression of two neuronal markers, growth-associated protein 43 and neuron-specific enolase, in rat glial cells. J Mol Med 1997; 75(9): 653-63.
22. Zhu Q, Lindenbaum M, Levavasseur F, et al. Disruption of the NF-H Gene Increases Axonal Microtubule Content and Velocity of Neurofilament Transport: Relief of Axonopathy Resulting from the Toxin β,β′-Iminodipropionitrile. J Cell Biol 1998; 143(1): 183-93.
23. Liu Z, Long X, Li J, et al. Differentiation of temporomandibular joint synovial mesenchymal stem cells into neuronal cells in vitro: an in vitro study. Cell Biol Int 2011; 35(1): 987-92.
24. Sujeong J, Hyong-Ho C, Yong-Bum Cho, et al. Functional neural differentiation of human adipose tissue-derived stem cells using bFGF and forskolin. BMC Cell Biol 2010; 11: 1-13.

[Downloaded from jmj.jums.ac.ir on 2022-10-05]

[DOI: 10.29252/jmj.11.2.6]

Original Article

Transdifferentiation of human synovium-derived mesenchymal stem cell into neuronal-like cells in vitro

Received: 11/17/2012 Revised: 03/11/2013 Accepted: 05/27/2013

Kashafi E[1], Karimi Jashni H[*2], Erfaniyan S[3], Solhjou K[4], Sepidkar A[5], Fakhryniya H[5]

1. Dept. of Biology, Islamic Azad University, Jahrom Branch, Jahrom, Iran
2. Dept. of Anatomy, School of Medicine, Jahrom University of Medical Sciences, Jahrom, Iran
3. Dept. of Research Lab, School of Medicine, Jahrom University of Medical Sciences, Jahrom, Iran
4. Dept. of Microbiology, School of Medicine, Jahrom University of Medical Sciences, Jahrom, Iran
5. Dept. of Surgery, School of Medicine, Jahrom University of Medical Sciences, Jahrom, Iran

Journal of Jahrom University of Medical Sciences, Vol. 11, No. 2, Summer 2013

J Jahrom Univ Med Sci 2013; 11(2): 39-49

Abstract:

Introduction:

Synovial mesenchymal stem cells (SMSCs) could be expanded extensively in monolayer with limited senescence, maintaining their multilineage differentiation potential in vitro. We characterized the multi-potent ability of human synovial membrane derived stem cells (SMSCs) and investigated the neural differentiation potential of these cells.

Materials and Methods:

SMSCs were isolated from the knee joint of ACL (Anterior cruciate ligament) and baker cyst patient. These cells were proliferated and amplified with the indicated concentration of FBS (Fetal Bovin Serum) and DMEM in vitro. Alizarin red and oil red staining was done to investigate stemness property of the cells. Then, they were induced in vitro by β-ercaptoethanol (BME), and Retinoic acid (RA). Reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) analysis was done to prove the neural gene and osteocyte and adipocyte cells specific genes.

Results:

RT-PCR analysis showed the expression of osteogenic and adipogenic genes. Following neural induction, SMSCs were differentiated into various types of neural cells in vitro. RT-PCR analysis also demonstrated that the mRNA levels encoding for neurofilament medium (NFM), neuron specific enolase (NSE) were also highly increased in induced SMSCs.

Conclusion:

These results suggest that synovium tissue, which is discarded in most of the knee operations, can be used for cell therapy and tissue engineering protocols as an enrichment source of potent mesenchymal stem cells. Induction of SMSCs by inducers such as BME-RA could highly transdifferentiate SMSCs into neuronal-like cells.

Keywords: Stem Cells, Cell Differentiation, Synovium

[Downloaded from jmj.jums.ac.ir on 2022-10-05]

[DOI: 10.29252/jmj.11.2.6]

* Corresponding author, Email: hojat_karimi@yahoo.co.in