خون
فصلنامه پژوهشی
دوره ۱۲ شماره ۳ پاییز ۹۴ (۲۷۶-۲۶۶)
مقاله پژوهشی

جداسازی، تکثیر و تمایز سلول‌های استرومال مزانشیمی خون بند ناف انسانی به سلول‌های پروژنیتور عصبی در محیط آزمایشگاهی

حسن رفیعی‌مهر[۱]، مریم خیراندیش[۲]، مسعود سلیمانی[۳]

چکیده

سابقه و هدف

خون بند ناف دارای مزایای فراوانی نسبت به سایر منابع سلول‌های استرومال مزانشیمی است. این مطالعه با هدف فراهم کردن یک دستورالعمل جدید جهت تمایز عصبی سلول‌های استرومال مزانشیمی خون بند ناف انسانی در محیط آزمایشگاه انجام گرفت.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه تجربی، سلول‌های بنیادی مزانشیمی خون بند ناف انسانی پس از جداسازی و تایید مورفولوژیکی، تمایز به رده چربی و استخوان و ایمنوفنوتایپ، با رتینوئیک اسید، فاکتور رشد فیبروبلاستی، فاکتور رشد عصبی، فاکتور رشد اپیدرمال، اسید اسکوربیک، ایزوبوتیل گزانتین و محیط کشت نوروبازال جهت القای تمایز عصبی تیمار گردید. بیان نسبی ژن‌های اختصاصی عصبی با Real-Time PCR ، نرم‌افزار REST ۲۰۰۹ و SPSS ۱۱/۵ مورد بررسی قرارگرفت.

یافته‌ها

نتایج نشان داد که سلول‌های استرومال مزانشیمی، دوکی بوده و پتانسیل تمایز به رده چربی و استخوان را دارند. فلوسیتومتری برای(۷۸٪) CD73 ، (۷۸٪) CD105 مثبت و برای CD45 (۲٪) و (۲/۵٪) HLA-DR منفی بود. پس از تمایز عصبی و تغییر شکل قابل توجه سلول‌های استرومال مزانشیمی به سلول‌های عصبی، نتایج تجزیه و تحلیل Real-Time PCR نشان داد که بیان ژن‌هایی نظیر *MBP* ، *nestin* ، *MAP-2* و *GFAP* به طور معناداری در مقایسه با سلول‌های تمایز نیافته(کنترل) افزایش یافته است($p < ۰/۰۵$).

نتیجه‌گیری

مطالعه حاضر نشان داد، تیمار سلول‌های استرومال مزانشیمی با ترکیبی از فاکتورهای رشد و مواد شیمیایی باعث القای تمایز عصبی شده و می‌تواند باعث افزایش کارآیی سلول درمانی بیماری‌های نورودژنراتیو براساس سلول‌های بنیادی در آینده گردد. هر چند که عملکرد سلول‌های پروژنیتور عصبی به دست آمده قبل از کاربرد بالینی باید در مدل‌های حیوانی ارزیابی شود.

کلمات کلیدی: سلول‌های استرومال مزانشیمی، سلول درمانی، تمایز سلولی

تاریخ دریافت : ۹۳/۱۱/۱۸
تاریخ پذیرش : ۹۴/ ۲/۸

۱ـ دانشجوی PhD هماتولوژی و بانک خون ـ مرکز تحقیقات انتقال خون – مؤسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون – تهران و دانشکده پیراپزشکی دانشگاه علوم پزشکی همدان ـ همدان ـ ایران

۲ـ مؤلف مسئول: PhD ایمونولوژی ـ دانشیار مرکز تحقیقات انتقال خون – مؤسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون – تهران – ایران– صندوق پستی: ۱۱۵۷-۱۴۶۶۵

۳– PhD هماتولوژی و بانک خون ـ دانشیار دانشکده پزشکی دانشگاه تربیت مدرس ـ تهران ـ ایران

مقدمه

تولید سیگنال‌های التهابی و تخریب اولیگودندروسیت‌ها و آکسون‌ها در بیمارهای نورودژنراتیو باعث می‌شوند که میلین‌سازی مجدد رخ ندهد. داروهای فعلی که در دو دهه اخیر برای بیمارهای نورودژنراتیو مانند مولتیپل اسکلروزیس مورد تایید قرار گرفته و استفاده می‌شود، عمدتاً نرخ عود بیماری را کاهش می‌دهند و تاثیر چندانی بر توقف پیشرفت بیماری و ترمیم بافت عصبی یا افزایش روند رمیلینه شدن ندارند(۲، ۱). امروزه سلول درمانی بر اساس سلول‌های بنیادی در بیمارهای نورودژنراتیو مورد توجه زیادی قرار گرفته است. بدین منظور مطالعه‌های وسیعی در کلینیک و مدل‌های حیوانی انجام شده و ادامه دارد(۳).

ملاحظات اخلاقی، مشکلات تکنیکی و ایمونولوژیکی، استفاده از سلول‌های بنیادی جنینی و عصبی را با چالش مواجه کرده است(۴). سلول‌های استرومال مزانشیمی (mesenchymal stromal cells: MSCs) به دلیل نداشتن مشکلات مربوط به سلول‌های بنیادی عصبی(NSCs : neural stem cells) و سلول‌های بنیادی جنینی(ESCs : embryonic stem cells)، امروزه طرفداران زیادی را پیدا کرده است. سلول MSC ، غیر هماتوپوئتیک با توانایی خودنوسازی و تمایز به سلول‌های رده مزودرم، اکتودرم و آندودرم هستند و از بافت‌های پیوندی مختلف بدن می‌توان آن‌ها را جدا کرد. MSC از نظر مورفولوژی فیبروبلاست مانند (دوکی شکل) بوده و با بیان مارکرهای آنتی‌ژنی سطحی CD73 ، CD90 ، CD105 و CD29 و عدم بیان مارکرهای CD11bc ، CD45 و CD34 مشخص می‌شوند. سلول‌های مزانشیمی، سلول‌های NK و عملکرد سلول‌های T سیتوتوکسیک را سرکوب می‌کنند. تولید سلول‌های Th-1 و Th-17 را مهار کرده و باعث تحریک تولید سلول‌های T تنظیم‌کننده(Treg) می‌شود. سلول‌های استرومال مزانشیمی می‌توانند به سیستم عصبی مرکزی مهاجرت نموده و جایگزین بافت آسیب دیده شوند و می‌توانند با ترشح فاکتورهای پاراکرینی، از نورون در برابر استرس‌های اکسیداتیو حمایت کنند(۷-۵). مغز استخوان در دسترس‌ترین و متداولترین منبع MSC می‌باشد اما به علت بیان بالای ویروس، میزان بیان HLA-ABC بیشتر، روش‌های دردناک و تهاجمی جمع‌آوری نمونه و... لزوم شناسایی منابع دیگر MSCs را اثبات می‌کنند. سلول‌های استرومال مزانشیمی خون بند ناف در مقایسه با مغز استخوان به دلایلی مانند: پتانسیل ایمونوژنیک کمتر، نداشتن واکنش پیوند علیه میزبان، قابلیت بیشتر تمایز به سلول عصبی، دسترسی سریع و جمع‌آوری آسان آن، به عنوان یکی از منابع جایگزین سلول‌های استرومال مزانشیمی مغز استخوان مورد مطالعه و استفاده قرار گرفته است. سلول‌های استرومال مزانشیمی امروزه به عنوان یک ابزار نویدبخش در بیماری‌های نورودژنراتیو مورد توجه قرار گرفته است(۷-۵). چالش‌هایی مانند، احتمال تشکیل تومور و بافت‌های ناخواسته، موجب گرایش محققان به تمایزعصبی سلول‌های استرومال مزانشیمی آن و استفاده از سلول‌های پیش‌ساز عصبی مشتق از سلول‌های استرومال مزانشیمی گردیده است(۱۰-۸).

در سال ۲۰۰۰ میلادی، تمایز عصبی سلول‌های استرومال مزانشیمی با انتشار چهار مقاله، دو تا مربوط به تمایز در محیط آزمایشگاهی و دو مقاله دیگر مربوط به تمایز عصبی در محیط بدن، توجه محققان را به خود جلب کرد(۱۴-۱۱). اگر چه تمایز عصبی سلول‌های استرومال مزانشیمی توسط برخی از محققان به چالش کشیده شد، اما گروهی دیگر از محققان تمایز عصبی را تایید کردند(۱۵). محققانی که منتقد تمایز عصبی در آزمایشگاه یا در محیط بدن بودند، ادعا می‌کردند سلول‌های شبه عصبی ناشی از سلول‌های استرومال مزانشیمی واقعیت ندارد و بیشتر آرتیفکت هستند و برخی از منتقدان تمایز عصبی هم ادعا کردند که کسب فنوتیپ عصبی توسط این سلول‌ها در محیط بدن به علت تمایز عصبی نیست، بلکه ناشی از ادغام این سلول‌ها با سلول‌های میزبان می‌باشد(۱۷، ۱۶). به هر حال با این گزارش‌ها، اولین نوید در زمینه کاربردی کردن این نوع از سلول‌های بنیادی در درمان بیماری‌های نورودژنراتیو داده شد. با توجه به تاریخچه موجود در زمینه تمایز سلول‌های استرومال مزانشیمی به سلول‌های عصبی می‌توان به این نتیجه رسید که هنوز دستورالعمل استانداردی به منظور تمایز عصبی و تولید سلول‌های

عصبی در مقیاس بالا برای مصارف بالینی گزارش نشده است. در این مطالعه ضمن تنظیم دستورالعمل جدید برای تمایز عصبی سلول‌های استرومال مزانشیمی، اثرات هم زمان و ترکیبی برخی از فاکتورهای رشد و مواد شیمیایی با روش Real Time-PCR بررسی گردید.

مواد و روش‌ها

جداسازی سلول‌های استرومال مزانشیمی از خون بند ناف:

در این مطالعه تجربی، سلول‌ها از خون بند ناف پس از دریافت فرم رضایت‌نامه جدا شدند. ابتدا سلول‌های تک هسته‌ای خون بند ناف(Mono nuclear cells = MNCs) بر اساس دستورالعمل کوگلر و همکارانش استخراج و پاساژ داده شدند(۱۹، ۱۸). به طور خلاصه MNCs خون بند ناف با استفاده از فایکول(۱/۰۷۷، سیگما، آمریکا) با سانتریفوژ شیب غلظتی جداسازی و در فلاسک cm^2 ۲۵ حاوی ۶ میلی‌لیتر محیط کشت DMEM -LG با ۱۰٪ FBS (اینویتروژن، آمریکا)، ۱٪پنی‌سیلین و ۱٪ استرپتومایسین (سیناژن، ایران) در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و ۵٪ CO_2 کشت داده شد. ۴۸ ساعت پس از آغاز کشت، سلول‌های غیر چسبنده به وسیله تعویض محیط کشت حذف شدند و سلول‌های چسبنده باقی ماندند. تعویض محیط کشت سلولی با فاصله زمانی ۳ روز موجب حذف سلول‌های غیر چسبنده شد. در نهایت سلول‌های استرومال مزانشیمی حاصل از پاساژ سوم برای آزمایش‌های نهایی فراهم شدند.

تعیین درصد زنده‌بودن سلول‌ها(Viability test):

حدود ۵۰ میکرولیتر از سوسپانسیون سلولی را با ۵۰ میکرولیتر از رنگ تریپان‌بلو ۰/۴٪ مخلوط کرده پس از ۳۰ ثانیه، یک قطره از این مخلوط را برداشته و با استفاده از لام نئوبار در خانه‌های مربوط به شمارش گلبول‌های سفید شمارش شدند. رنگ تریپان‌بلو در سلول‌های مرده نفوذ کرده و آن‌ها را آبی رنگ می‌کند اما وارد سلول‌های زنده نمی‌شود. به این ترتیب درصد سلول‌های زنده به دست می‌آید. در مطالعه حاضر، درصد زنده بودن(viability) سلول‌ها با رنگ‌آمیزی تریپان‌بلو بیش از ۹۰٪ بود.

بررسی ایمونوفنوتایپ سلولی:

به منظور بررسی مارکرهای سطحی، سلول‌های تریپسینه شده (از پاساژ سوم سلول‌های استرومال مزانشیمی خون بند ناف) در ۱ میلی لیتر محلول(Phosphate Buffered Saline) PBS سوسپانسیون شدند. ۵۰ میکرولیتر از سلول‌ها را با ۵ میکرولیتر از آنتی‌بادی‌های CD34 ، HLA-DR ، CD105 کنژوگه با فیکواریترین(PE) و آنتی‌بادی‌های CD90 ، CD73 و CD45 کنژوگه بافلورسئین ایزوتیوسیانات (FITC) و برای کنترل منفی با آنتی‌بادی‌های PE-IgG1 و FITC-IgG1 مخلوط شدند(آنتی‌بادی‌ها مربوط به شرکت بیوساینس ـ امریکا بود) و به مدت ۲۰ تا ۳۰ دقیقه در ۴ درجه سانتی‌گراد و در تاریکی انکوبه شدند. در مرحله بعد سلول‌ها با ۲٪ PBS-BSA شستشو داده شدند و در ۵۰۰ میلی‌لیتر PBS سوسپانسیون شدند و در انتها به منظور فیکس شدن سلول‌ها، ۵۰ میکرولیتر پارافرم آلدئید ۱٪ به لوله‌ها اضافه و با دستگاه فلوسیتومتری تجزیه و تحلیل شدند.

تمایز سلول‌های استرومال مزانشیمی به رده چربی:

برای تمایز به رده چربی از سلول‌های پاساژ ۵-۳ استفاده گردید. بعد از شمارش سلولی، تعداد ۱×۱۰^{۴}سلول به همراه ۱ میلی‌لیتر محیط کشت DMEM-LG حاوی سرم ۱۰٪ به چاهک‌های پلیت ۲۴ خانه‌ای افزوده شد و در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد دارای رطوبت و ۵٪ CO_2 قرار داده شد. هنگامی که تراکم سلول‌ها به ۶۰٪ رسید، محیط کشت DMEM-LG خالی شد و ۱ میلی‌لیتر از محیط تمایز به چربی شامل دگزامتازون، انسولین و ایندومتاسین و ایزوبوتیل متیل گزانتین به پلیت ۲۴ خانه‌ای افزوده شد. پلیت دوباره در انکوباتور قرار داده شد. به مدت ۳هفته، محیط تمایزی هر ۳ روز یک بار تعویض شد. بعد از ۲۱ روز، تمایز سلول‌ها با رنگ‌آمیزی اویل رد مورد بررسی قرار گرفت.

تمایز سلول‌های استرومال مزانشیمی به رده استخوانی:

برای تمایز به استئوبلاست از سلول‌های پاساژ ۵-۳ استفاده گردید. به طورخلاصه بعد از شمارش سلولی،

تعداد ۱×۱۰^{۴} سلول بـه همـراه ۱ میلـی‌لیتـر محـیط کشـت DMEM-LG حاوی سـرم ۱۰٪ بـه چاهـک‌هـای پلیـت ۲۴ خانـه‌ای افـزوده شـد و در انکوبـاتور بـا دمـای ۳۷ درجـه سانتی‌گراد دارای رطوبت و ۵٪ CO_2 قرار داده شد. هنگامی که تراکم سلول‌ها به ۶۰٪ رسید، محیط کشت DMEM-LG خالی شد و ۱ میلی‌لیتر از محیط تمایز بـه اسـتخوان شـامل دگزامتازون، گلیسرول دو فسـفات و اسـید آسـکوربیک دو فسفات، به پلیت ۲۴ خانه‌ای افزوده شـد. پلیـت دوبـاره در انکوباتور قرار داده شد. به مدت ۲۰ روز، محیط تمایزی هر ۳ روز یک بار تعویض شد. بعد از ۲۰روز، تمایز سـلول‌هـا با رنگ‌آمیزی آلیزارین رد مورد بررسی قرار گرفت.

تمایز سلول‌های استرومال مزانشیمی به رده عصبی:

برای تمایز به رده عصـبی از سـلول‌هـای پاسـاژ ۵-۳ و مطابق دستوالعمل با کمی تغییر استفاده گردید(۲۱، ۲۰). بـه طور خلاصه هنگامی که تراکم سلولی در فلاسـک $۷۵\ cm^2$ حاوی محیط کشت DMEM-HG به ۷۰٪ رسـید، تریپسـینه گردید. بعد از شمارش سـلولی، تعـداد $۱۰^{۴} \times ۲$ سـلول بـه همـراه ۱ میلـی‌لیتـر محـیط کشـت حـاوی سـرم۱۰٪ بـه چاهک‌های پلیت ۲۴ خانه‌ای افزوده شد و در انکوباتور بـا دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد دارای رطوبـت و ۵٪ CO_2 قـرار داده شد. هنگامی که تراکم سلول‌ها به ۶۰٪ رسـید، محـیط کشـت خـالی شـد و۱ میلـی‌لیتـر ازمحـیط تمـایز عصـبی: رتینوئیک اسید ۵ میکرومولار، فاکتور رشد فیبروبلاستی ۱۰ نانوگرم در میلی‌لیتر، فاکتور رشد اپیـدرمال ۱۰ نـانوگرم در میلی‌لیتر، فـاکتور رشـد عصـبی ۱۰ نـانوگرم در میلـی‌لیتـر، ایزوبوتیل متیل گزانتین ۰/۵ میلی‌مولار و آسـکوربیک اسـید ۱۰۰ میکرومولار به پلیت ۲۴ خانـه‌ای افـزوده شـد. پلیـت دوباره در انکوباتور قرار داده شد. محیط تمایزی هر ۳ روز یک بار تعویض شـد. در زمـان‌هـای مختلـف مورفولـوژی سلول‌ها و به منظور تاییـد تمـایز سـلول‌هـا، بیـان ژن‌هـای اختصاصـی عصـبی بـا روش Real Time-PCR بررسـی گردید.

آنالیز RT-PCR:

سلول‌های تمایز یافته(آزمایش) و سلول‌های تمایز نیافته (کنترل) از نظر بیان ژن‌های اختصاصی عصبی مورد بررسی قرار گرفتند. RNA سلول‌هـای آزمـایش و کنتـرل بـا کیـت RNX-Plus (سیناژن)، بر اسـاس دسـتورالعمل‌هـای کیـت، جداسازی شده و جهت ادامه آزمون‌ها در فریزر ۷۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. برای رفع آلودگی احتمـالی DNA نیز، نمونه‌های استخراج شده بـا آنـزیم DNase1 (فرمنتـاز) تیمـار شـدند. سـپس میـزان RNA بـه وسـیله دسـتگاه اسـپکتروفتومتر(نـانودراپ) تعیـین گردیـد. از روی RNA استخراج شده، cDNA در واکنش رونویسی معکوس (RT-PCR) با استفاده از آغازگر هگزامر رندوم و آنـزیم تـرانس کریپتاز مطابق با دستورالعمل ساخت cDNA (سیناژن) تهیه گردید. در ادامه با آغازگرهای اختصاصی ژن‌هـای عصـبی، واکنش‌های زنجیره‌ای پلیمراز(PCR) مطابق بـا دسـتوالعمل کیت تاکارا و با دستگاه ترمال سایکلر انجام شـد. محصـول نهایی PCR در ژل آگاروز ۲٪ الکتروفورز شده و بـا رنـگ Sybersafe مورد ارزیابی قرار گرفت(جدول ۱).

جدول ۱: اجزای مورد نیاز جهت Real Time PCR

اجزا	غلظت
MasterMix syber green (amplicon)	۶/۵ µL
Primer F+R	۱۰ pmol (۱ µL)
(Template)1*103 ng (cDNA)	۱ µL
Distilled Water	Up to ۱۳ µL (۴/۵ µL)

تایید تمایز سلول‌های استرومال مزانشیمی به رده عصبی با روش Real-Time PCR:

بیـان کمـی mRNA ژن‌هـای عصـبی *MBP*، *nestin*، *GFAP* و *MAP2* در نمونه‌های حاصل از cDNA بـه دسـت آمده از سلول‌های کشـت داده شـده تحـت شـرایط تمـایز عصبی پس از ۶ روز بررسی گردید. مراحل انجام آزمـایش و نحوه ساخت مستر میکس و برنامه دمـایی واکـنش طبـق دسـتور عمـل ذکـر شـده در کیـت Syber-Detect MMX (کانادا، آلفابیو) مـی‌باشـد. بـه طـور خلاصـه، ابتـدا cDNA ساخته شده در مرحله قبل را با DEPC Water به نسـبت ۱ به ۲ رقیـق مـی‌کنـیم. بعـد از رقیـق کـردن، فلوسـیتومتری

مختصر می‌گردد. تمامی مراحل بر روی بلوک یخ انجام می‌شود. قبل از استفاده از آنزیم و مستر میکس، آن‌ها را فلوسیتومتری کرده و بر روی بلوک یخ قرار می‌دهیم. در مرحله بعد به تعداد نمونه‌ها در یک میکروتیوپ جداگانه محلول کاری درست می‌کنیم و در دستگاه ترمال سایکلر Corrbet Science Rotor-Gene 6000 قرار می‌دهیم(جدول ۲).

جدول ۲ : مراحل واکنش 2 Step-Real-Time PCR اجرا شده برای بررسی بیان مارکرهای عصبی

مرحله	دما	زمان	سیکل
دناتوره اولیه	۹۵ درجه سانتی‌گراد	۳۰ ثانیه	۱
دناتوره	۹۵ درجه سانتی‌گراد	۵ ثانیه	۳۰-۴۵
اتصال آغازگرها و گسترش	۶۰ درجه سانتی‌گراد	۳۰ ثانیه	

نتایج بیان نسبی ژن‌های اختصاصی عصبی توسط نرم‌افزار دستگاه Real-Time PCR استخراج و معناداری نتایج با نرم‌افزار REST 2009 و SPSS ۱۱/۵ مشخص گردید.

یافته‌ها

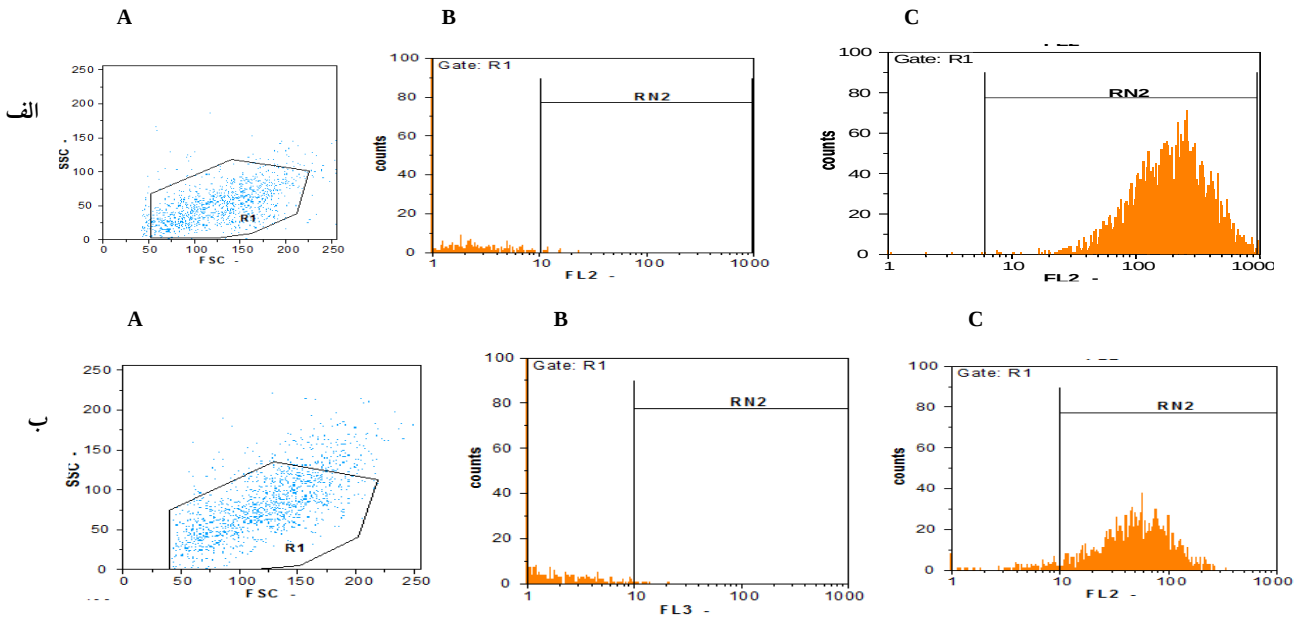
برای اطمینان از میزان خلوص سلول‌های استرومال مزانشیمی جدا شده از خون بند ناف وتوان تمایزی به سلول‌های رده مزانشیمی و عصبی، به ترتیب فلوسیتومتری، رنگ‌آمیزی اختصاصی و PCR انجام گرفت.

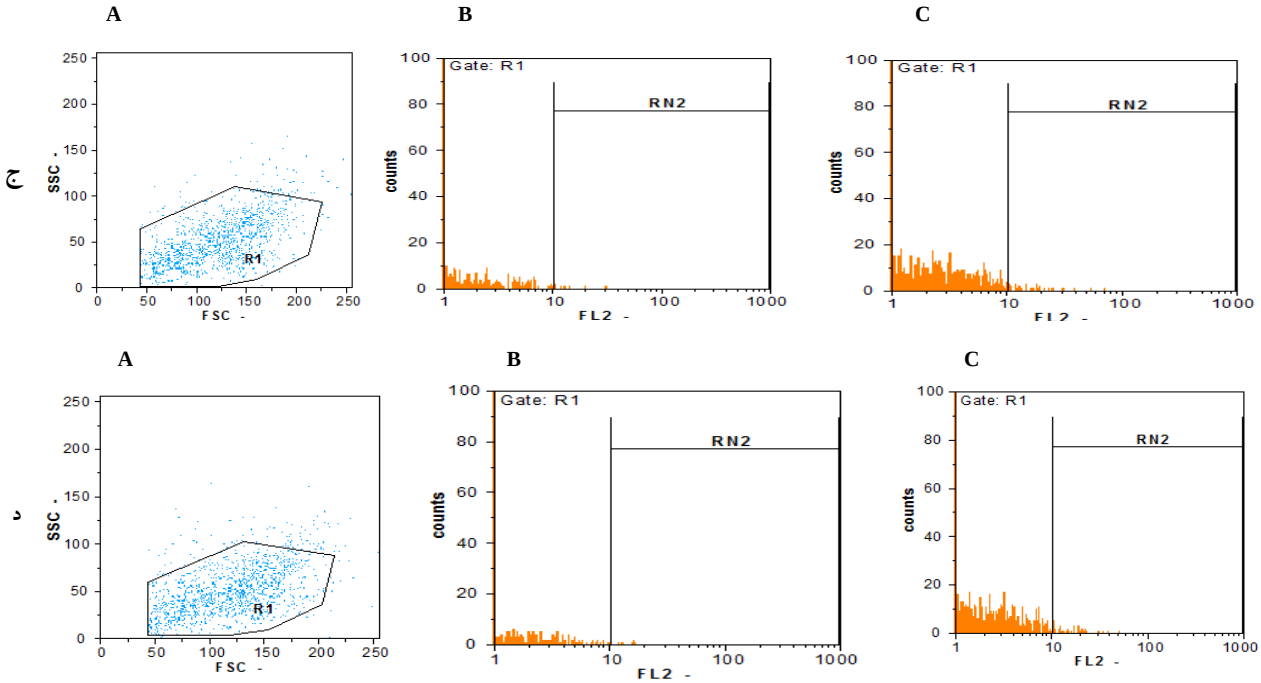
بررسی ایمونوفنوتایپ سلولی:

نتایج مربوط به بیان شاخص‌ها یا مارکرهای سطحی سلول‌های استرومال مزانشیمی در نمودار ۱ نشان داده شده و یافته‌ها با استفاده از برنامه آماری SPSS ۱۱/۵ بررسی شده‌اند.

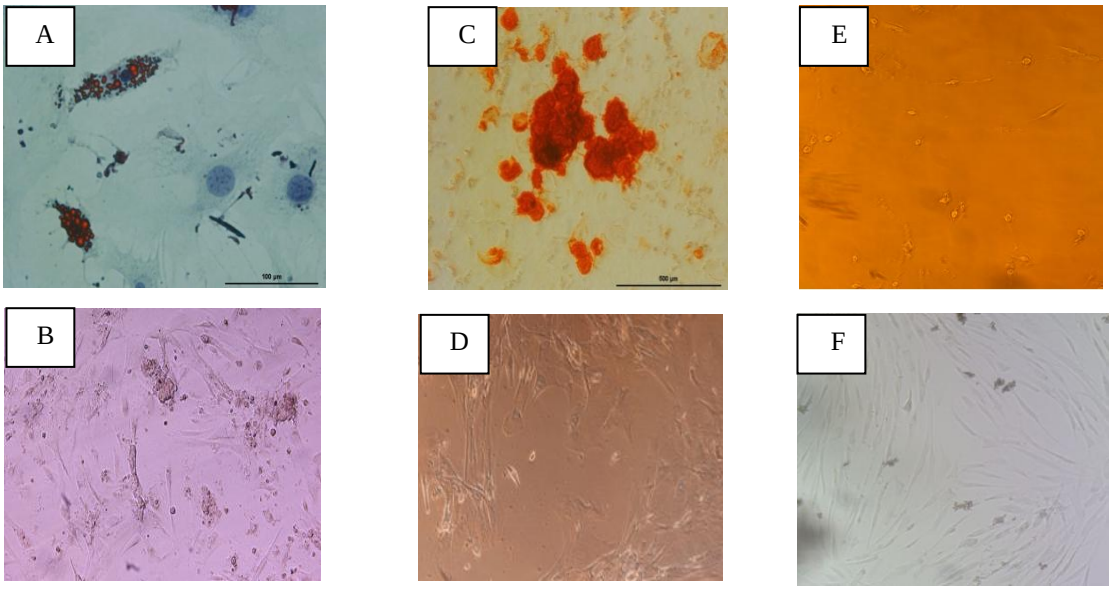
بررسی پتانسیل تمایزی سلولی:

سلول‌های استرومال مزانشیمی خون بند ناف (برگرفته از پاساژ ۳) که تحت تاثیر تمایز آدیپوسیتی قرار گرفته بودند، به علت حضور واکوئل‌های چربی با رنگ‌آمیزی Oil-Red-O واکنش مثبت نشان دادند(شکل ۱). هم چنین سلول‌های استرومال مزانشیمی خون بند ناف که به مدت دو هفته در محیط تمایز به استخوان قرار گرفته بودند، ابتدا تغییرات مورفولوژی را نشان داده سپس به علت رسوب کلسیم در سطح سلول(معدنی شدن)، با رنگ‌آمیزی اختصاصی آلیزارین رد به رنگ قرمز درآمدند(شکل ۱). سلول‌های استرومال مزانشیمی خون بند ناف پس از تمایز عصبی، از شکل دوکی خارج شده دارای سیتوپلاسم کشیده با جسم سلولی کوچک و دارای یک یا چند زوائد سیتوپلاسمی گردیدند(شکل ۱).





نمودار ۱: بررسی مارکرهای اختصاصی سلول استرومال مزانشیمی خون بند ناف. همان طوری که در شکل دیده می‌شود، این سلول‌ها مارکرهای اختصاصی سلول استرومال مزانشیمی CD73 و CD105 را بیان می‌کنند ولی از نظر مارکرهایی مانند CD45 ، HLA-DR منفی می‌باشند. A : توزیع جمعیت سلول استرومال مزانشیمی(الف، ب، ج و د). B : نمودار کنترل ایزوتیپ آنتی‌ژن CD73 (الـف)، CD105 (ب)، CD45 (ج) و HLA-DR (د) . C : نمودار بیان آنتی‌ژن CD73 (الف)، CD105 (ب)، CD45 (ج) و HLA-DR (د)



شکل ۱: توانایی تمایز سلول‌های استرومال مزانشیمی خون بند ناف در اثر اضافه کردن فاکتورهای القایی قابل مشاهده است. شکل A و B به ترتیب نشان‌دهنده سلول‌های استرومال مزانشیمی خون بند ناف بعد از القای آدیپوژنیک و قبل از القا است. تمایز به رده چربی که از گرانول‌های چربی رنگ شده با oil red مشخص شده است. شکل C و D به ترتیب نشان‌دهنده سلول‌های استرومال مزانشیمی خون بند ناف بعد از القای استئوژنیک و قبل از القا است. تمایز به رده استخوانی که از طریق رسوب کلسیم رنگ شده با آلیزارین رد مشخص شده است. شکل E و F به ترتیب نشان‌دهنده سلول‌های استرومال مزانشیمی خون بند ناف بعد از القای نوروژنیک و قبل از القا است. تمایز به رده عصبی که از طریق زوائد دندریتی شکل، سیتوپلاسم کشیده و جسم سلولی کوچک مشخص شده است(بزرگ‌نمایی X ۱۰۰).

جدول ۳: مشخصات آغازگرهای طراحی شده برای بررسی بیان ژن‌های اختصاصی عصبی در سطح سلول استرومال مزانشیمی تمایز یافته

مارکرها	آغازگر جلوبرنده	آغازگر معکوس	Ampilicon size (bp)	چرخه
MAP2	AGT TCC AGC AGC GTG ATG	CAT TCT CTC TTC AGC CTT CTC	۹۷	۳۵
GFAP	GCA GAC CTT CTC CAA CCT G	ACT CCT TAA TGA CCT CTC CAT C	۱۲۷	۳۵
MBP	ACC CCG TAG TCC ACT TCT TC	ACT CCC TTG AAT CCC TTG TG	۱۷۹	۳۵
Nestin	GAA GGT GAA GGG CAA ATC TG	CCT CTT CTT CCC ATA TTT CCT G	۹۶	۳۵

جدول ۴ : میزان بیان ژن‌های اختصاصی عصبی در سطح سلول استرومال مزانشیمی تمایز یافته با روش Real-Time PCR (با استفاده از نرم‌افزار REST ۲۰۰۹ V2 ۰/۱۳)

ژن‌ها	انواع	Reaction Efficiency	Expression	Std. Error	CI ٪۹۵	P(H1)	Result
b-actin (n =۲)	REF	۱/۰	۱/۰۰۰				
MAP-2 (n =۲)	TRG	۱/۰	۹/۷۱۴	۶/۶۱۱–۱۶/۸۸۰	۴/۴۸۱–۲۲/۱۲۴	۰/۰۰۰	Up
GFAP (n =۲)	TRG	۱/۰	۵۴/۵۶۹	۳۹/۹۰۹–۸۴/۷۱۳	۲۸/۶۴۱–۱۰۷/۸۸۳	۰/۰۰۰	Up
nestin (n =۲)	TRG	۱/۰	۰/۸۵۰	۰/۳۳۲–۳/۷۱۸	۰/۱۵۵–۵/۵۸۹	۰/۶۸۰	
MBP (n =۲)	TRG	۱/۰	۳/۰۶۳	۱/۶۹۲–۶/۶۴۹	۱/۱۲۷–۸/۷۹۰	۰/۰۰۰	UP

P(H1) -Probability of alternate hypothesis that difference between sample and control groups is due only to chance.

بررسی کمی بیان ژن‌های اختصاصی عصبی:

بیان کمی mRNA ژن‌های عصبی(*Nestin* ، *MBP* ، *MAP2* و *GFAP*) با استفاده از cDNA حاصل از سلول‌های پروژنیتور عصبی با quantitative Real-Time PCR ، پس از نرمال‌سازی با ژن بتااکتین و آنالیز از طریق روش REST-2009 مورد ارزیابی قرار گرفت. ژن‌های نامبرده در سلول‌های گروه آزمایش به خوبی بیان شده‌اند در حالی که در سلول‌های کنترل(سلول‌های غیر تمایز یافته)، بیان ژن‌های عصبی دیده نشد. نتایج آنالیز از طریق نرم‌افزار REST-2009 نشان داد که میزان بیان *MAP2* ، *GFAP* و *MBP* در سلول‌های پروژنیتور عصبی نسبت به سلول‌های استرومال مزانشیمی افزایش معناداری دارد اما ژن *nestin* تغییر معناداری نداشت. هم چنین آنالیز آماری نشان داد که بیشترین بیان ژنی مربوط به *GFAP* و کمترین بیان ژنی مربوط به *nestin* می‌باشد(جداول ۳ و ۴).

بحث

امروزه سلول‌های بنیادی مزانشیمی(MSCs) به عنوان یک منبع سلولی ایده‌آل در رابطه با سلول درمانی شناخته می‌شوند. مروری بر مطالعه‌های انجام شده نشان می‌دهد که تاکنون القای تمایز عصبی در رده‌های مختلفی از سلول‌های بنیادی از جمله سلول‌های استرومال مزانشیمی، سلول‌های بنیادی جنینی و سلول‌های بنیادی عصبی انجام گرفته است(۵). از سال ۲۰۰۰ وقتی وود بری و همکاران در *in vitro* و برازلتون و همکاران در *in vivo* تمایز سلول‌های استرومال مزانشیمی به سلول عصبی را گزارش کردند، تحقیقات در زمینه سلول درمانی و ترمیم بافت عصبی در بیماری‌های نورودژنراتیو توسعه وسیعی پیداکرد(۱۴، ۱۲، ۱۱). با این وجود هنوز چالش‌ها و نگرانی‌های زیادی در مورد چگونگی تعامل، کارآیی و ایمن بودن سلول‌های القا شده همانند خود سلول‌های استرومال مزانشیمی وجود دارد.

در مطالعه حاضر به دلیل ویژگی‌هایی مانند ظرفیت تکثیر و تمایز نوروژنیک بیشتر و روند کند پیری نسبت به سلول‌های استرومال مغز استخوان و دیگر منابع شناخته شده، از سلول‌های استرومال مزانشیمی خون بند ناف برای القای عصبی استفاده گردید(۶). در این پژوهش پس از ۶ روز تیمار با رتینوئیک اسید، فاکتور رشد فیبروبلاستی،

فاکتور رشد عصبی، فاکتور رشد اپیدرمال، اسید اسکوربیک و ایزوبوتیل متیل گزانتین، بیان برخی ژن‌های اختصاصی عصبی با RT-PCR و Real-Time PCR ، نشان داد که *nestin* در سلول‌های مزانشیمی تیمار شده تفاوت معناداری با سلول‌های مزانشیمی تیمار نشده(گروه کنترل) ندارد در حالی که میزان بیان مارکرهای *MAP-2* ، *GFAP* و *MBP* تفاوت معناداری در مقایسه با گروه کنترل داشت. کمترین بیان ژنی مربوط به *nestin* و بیشترین بیان مربوط به *GFAP* بود(جدول ۴). هم چنین نتایج این تحقیق نشان داد که رتینوئیک اسید در مقایسه با دیگر فاکتورها نقش مهم‌تری در تمایز و هویت سلول‌های پروژنیتور به دست آمده دارد به طوری که در غلظت یک تا ۵ میکرومولار باعث تولید سلول نورونی و در حضور غلظت پایین رتینوئیک اسید (۰/۲ میکرومولار)، عمدتاً باعث تولید سلول‌های GFAP مثبت می‌گردد. در اکثر مطالعه‌های مشابه برای تایید تمایز عصبی از روش‌هایی مانند فلوسیتومتری، ایمنوسیتوشیمی و وسترن بلات برای تایید تمایز استفاده گردیده است اما در این مطالعه برای اولین بار برای تایید تمایز از روش Real-Time PCR استفاده گردید که تاکنون گزارش مشابهی منتشر نشده است.

دنگ و همکاران در سال ۲۰۰۱ و هو وهمکاران در سال ۲۰۰۳ گزارش کردند که سلول‌های استرومال مزانشیمی خون بند ناف تحت تاثیر dbcAMP و ایزوبوتیل متیل گزانتین توانایی تمایز به سلول‌های شبه عصبی را دارند(۲۳، ۲۲). اسکار و همکاران در سال ۲۰۰۴ نشان دادند که در حضور فاکتور رشد عصبی، رتینوئیک اسید، هیدروکورتیزون و مرکاپتواتانول، سلول‌های استرومال مزانشیمی مشتق از خون بند ناف به سلول‌های پروژنیتور عصبی تمایز می‌یابند(۲۴). سال ۲۰۰۶ تروپل و همکاران عملکرد سلول‌های عصبی تمایز یافته از سلول‌های استرومایی مغز استخوان را نشان دادند(۲۵). نعمتی و همکاران در سال ۲۰۰۹ جهت بررسی میزان بیان مارکرهای اختصاصی سلول‌های بنیادی عصبی در سلول‌های استرومال مزانشیمی مغز استخوان، پس از یک هفته تیمار با فاکتور رشد عصبی و فاکتور رشد اپیدرمال و رتینوئیک اسید، از فلوسیتومتری استفاده کردند. یافته‌های فلوسیتومتری نشان داد که سلول‌ها بعد از القا حدود ۹۰٪ مارکر نستین، ۴۱٪ مارکر توبولین و ۶۷٪ مارکر GFAP را بیان می‌کنند. تغییرات مورفولوژیکی نیز در راستای نتایج حاصل از آنالیزهای فلوسیتومتری بودند(۲۶). کشافی و همکاران در سال ۲۰۱۳ برای بررسی تمایز سلول‌های استرومال مزانشیمی بافت سینوویوم به سلول‌های شبه عصبی در محیط آزمایشگاهی، از RT-PCR استفاده کردند. بدین منظور سلول‌های استرومال مزانشیمی سه روز با مرکاپتواتانول و رتینوئیک اسید تیمار گردیدند(۲۷).

در مطالعه‌های گذشته از مواد شیمیایی مانند بتامرکاپتواتانول و دی‌متیل سولفوکساید برای تمایز عصبی استفاده گردیده است(۱۴، ۱۲، ۱۱). اما مطالعه‌های اخیر نشان می‌دهد که القاکننده‌های شیمیائی باعث بیان ناپایدار ژن‌های عصبی و مرگ زودرس سلول در آزمایشگاه شده که این امر موجب کاهش کارآیی سلول درمانی خواهد شد. هم چنین نتایج ضد و نقیض در عملکردی بودن سلول‌های القا شده با این روش گزارش گردیده است. با این وجود هنوز استراتژی و دستورالعمل استاندارد در خصوص جداسازی، کشت و تمایز عصبی ارایه نشده است. با توجه به تجربیات گذشته، در بررسی حاضر سعی شد با اصلاح دستورالعمل‌های رایج تمایز عصبی، تنظیم دستورالعمل جدید(حاوی رتینوئیک اسید، فاکتور رشد فیبروبلاستی، فاکتور رشد عصبی، فاکتور رشد اپیدرمال، اسید اسکوربیک و ایزوبوتیل متیل گزانتین) و استفاده از نوروبازال مدیوم و پرتکرارترین فاکتورهای رشد و مواد شیمیایی، روش کارآمدتری برای القای تمایز در سلول‌های استرومال مزانشیمی انتخاب گردد. در این پژوهش با حذف بتامرکاپتواتانول(به علت القای مرگ سلولی) و استفاده از دستورالعمل تنظیم شده، بعد از ۲۴ ساعت تغییر شکل سلول‌ها به سمت عصبی دیده شد و از سلول‌های روز ششم تمایز، جهت آنالیز دقیق‌تر مورفولوژی و بیان پایدارتر و مداومتر ژن‌های عصبی استفاده گردید. احتمالاً عواملی مانند نوع سرم استفاده شده جهت تکثیر و تمایز سلولی، نوع و غلظت مواد القاگر، دستورالعمل تمایز، منبع سلول، نحوه جمع‌آوری و پردازش سلولی و روش تایید تمایز عصبی از علل تناقض در نتایج مطالعه‌های مختلف تمایز

عصبی توسط محققان می‌باشد(۲۸، ۱۲، ۱۱).

سلول‌های پروژنیتور عصبی مشتق از سلول استرومال مزانشیمی در مقایسه با خود سلول مزانشیمی، علاوه بر حفظ خصوصیات تعدیل ایمنی و حفاظت عصبی، به علت متعهد شدن به رده عصبی در آزمایشگاه و احتمال بسیار کمتر در تشکیل رده مزانشیمی(بافت ناخواسته) پس از پیوند، می‌تواند به عنوان کاندید مناسب‌تری در سلول درمانی اماس باشد. هر چند انجام تحقیقات وسیع‌تر در شناسایی مناسب‌ترین روش جداسازی و منبع سلول، تعیین غلظت بهینه فاکتورهای القاگر عصبی، ارزیابی هویت واقعی سلول‌های القا شده در محیط آزمایشگاهی و بررسی ایمنی و کارآیی آن‌ها در مدل حیوانی قبل از کاربرد بالینی ضروری می‌باشد.

نتیجه‌گیری

در مجموع یافته‌های این مطالعه نشان داد سلول‌های استرومال مزانشیمی جدا شده از خون بند ناف توانایی تمایز به سلول‌های نورونی را دارند و هویت سلول به دست آمده به نوع روش القا بستگی دارد. به منظور به دست آوردن نتیجه مناسب تمایز عصبی، لازم است که از ترکیبی از فاکتورهای رشد و عوامل شیمیایی استفاده کرد. کاربرد ترکیبی مواد شیمیایی و فاکتورهای رشد و کنترل غلظت بهینه آن‌ها می‌تواند راه‌کار جدیدی جهت القای تمایز عصبی و کنترل هویت سلول‌های پروژنیتور عصبی مشتق از سلول‌های استرومال مزانشیمی خون بند ناف در آزمایشگاه باشد. به نظر می‌رسد با توجه به قدرت تکثیر بالا، روند کند پیری و تمایز نوروژنیک، بیشتر سلول‌های استرومال مزانشیمی خون بند ناف کاندید مناسبی جهت تمایز به سایر سلول‌ها از جمله سلول‌های نورونی و در نتیجه قابل استفاده در مطالعه‌های کلینیکی، دستورالعمل‌های سلول درمانی و مهندسی بافت باشد.

تشکر و قدردانی

این پژوهش در قالب پایان‌نامه، با مساعدت مالی مرکز تحقیقات مؤسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون و حمایت مرکز تحقیقات و فناوری بن‌یاخته انجام گردید. نویسندگان، از پرسنل محترم بخش پاتولوژی مرکز تحقیقات سازمان انتقال خون و خانم توکلی(مرکز تحقیقات وفناوری بن یاخته)، به دلیل همکاری صمیمانه در انجام این تحقیق، تشکر و قدردانی می‌نمایند.

References :

1- Etemadifar M, Sajjadi S, Nasr Z, Firoozeei TS, Abtahi S-H, Akbari M, *et al*. Epidemiology of multiple sclerosis in Iran: a systematic review. Eur Neurol 2013; 70(5-6): 356-63.
2- Kingwell E, Marriott JJ, Jetté N, Pringsheim T, Makhani N, Morrow SA, *et al*. Incidence and prevalence of multiple sclerosis in Europe: a systematic review. BMC Neurol 2013; 13(1): 128.
3- Milo R, Miller A. Revised diagnostic criteria of multiple sclerosis. Autoimmun Rev 2014; 13(4-5): 518-24.
4- Liu S, Li C, Xing Y, Tao F. Effect of transplantation of human embryonic stem cell-derived neural progenitor cells on adult neurogenesis in aged hippocampus. Am J Stem Cells 2014; 3(1): 21-6.
5- Joyce N, Annett G, Wirthlin L, Olson S, Bauer G, Nolta JA. Mesenchymal stem cells for the treatment of neurodegenerative disease. Regen Med 2010; 5(6): 933-46.
6- Tisato V, Naresh K, Girdlestone J, Navarrete C, Dazzi F. Mesenchymal stem cells of cord blood origin are effective at preventing but not treating graft-versus-host disease. Leukemia 2007; 21(9): 1992-9.
7- Zhang J, Li Y, Chen J, Cui Y, Lu M, Elias SB, *et al*. Human bone marrow stromal cell treatment improves neurological functional recovery in EAE mice. Exp Neurol 2005; 195(1): 16-26.
8- Hoveizi E, Tavakol S, Ebrahimi-Barough S. Neuroprotective Effect of Transplanted Neural Precursors Embedded on PLA/CS Scaffold in an Animal Model of Multiple Sclerosis. Mol Neurobiol 2015: 51(3): 1334-42.
9- Harris VK, Yan QJ, Vyshkina T, Sahabi S, Liu X, Sadiq SA. Clinical and pathological effects of intrathecal injection of mesenchymal stem cell-derived neural progenitors in an experimental model of multiple sclerosis. J Neurol Sci 2012; 313(1-2): 167-77.
10- Harris VK, Faroqui R, Vyshkina T, Sadiq SA. Characterization of autologous mesenchymal stem cell-derived neural progenitors as a feasible source of stem cells for central nervous system applications in multiple sclerosis. Stem Cells Transl Med 2012; 1(7): 536-47.
11- Woodbury D, Schwarz EJ, Prockop DJ, Black IB. Adult rat and human bone marrow stromal cells

differentiate into neurons. J Neurosci Res 2000; 61(4): 364-70.
12- Sanchez-Ramos J, Song S, Cardozo-Pelaez F, Hazzi C, Stedeford T, Willing A, *et al*. Adult bone marrow stromal cells differentiate into neural cells *in vitro*. Exp Neurol 2000; 164(2): 247-56.
13- Mezey E, Chandross KJ, Harta G, Maki RA, McKercher SR. Turning blood into brain: cells bearing neuronal antigens generated *in vivo* from bone marrow. Science 2000; 290(5497): 1779-82.
14- Brazelton TR, Rossi FM, Keshet GI, Blau HM. From marrow to brain: expression of neuronal phenotypes in adult mice. Science 2000; 290(5497): 1775-9.
15- Weimann JM, Johansson CB, Trejo A, Blau HM . Stable reprogrammed heterokaryons form spontaneously in Purkinje neurons after bone marrow transplant. Nat Cell Biol 2003; 5(11): 959-66.
16- Wagers AJ, Sherwood RI, Christensen JL, Weissman IL. Little evidence for developmental plasticity of adult hematopoietic stem cells. Science 2002; 297(5590): 2256-9.
17- Morshead CM, Benveniste P, Iscove NN, van der Kooy D. Hematopoietic competence is a rare property of neural stem cells that may depend on genetic and epigenetic alterations. Nat Med 2002; 8(3): 268-73.
18- Kögler G, Sensken S, Wernet P. Comparative generation and characterization of pluripotent unrestricted somatic stem cells with mesenchymal stem cells from human cord blood. Exp Hematol 2006; 34(11): 1589-95.
19- Kögler G, Somville T, Göbel U, Hakenberg P, Knipper A, Fischer J, *et al*. Haematopoietic transplant potential of unrelated and related cord blood: the first six years of the eurocord/netcord Bank Germany. Klin Pädiatr 1999; 211(04): 224-32.
20- Tio M, Tan KH, Lee W, Wang TT, Udolph G. Roles of db-cAMP, IBMX and RA in aspects of neural differentiation of cord blood derived mesenchymal-like stem cells. PLoS One 2010; 5(2): e9398.
21- Wang T, Tio M, Lee W, Beerheide W, Udolph G. Neural differentiation of mesenchymal-like stem cells from cord blood is mediated by PKA. Biochem Biophys Res Commun 2007; 357(4): 1021-7.
22- Deng W, Obrocka M, Fischer I, Prockop DJ. *In Vitro* Differentiation of Human Marrow Stromal Cells into Early Progenitors of Neural Cells by Conditions That Increase Intracellular Cyclic AMP. Biochem Biophys Res Commun 2001; 282(1): 148-52.
23- Hou L, Cao H, Wang D, Wei G, Bai C, Zhang Y, *et al*. Induction of umbilical cord blood mesenchymal stem cells into neuron-like cells *in vitro*. Int J Hematol 2003; 78(3): 256-61.
24- Lee OK, Kuo TK, Chen WM, Lee KD, Hsieh SL, Chen TH. Isolation of multipotent mesenchymal stem cells from umbilical cord blood. Blood 2004; 103(5): 1669-75.
25- Tropel P, Platet N, Platel JC, Noel D, Albrieux M, Benabid AL, *et al*. Functional neuronal differentiation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells. Stem Cells 2006; 24(12): 2868-76.
26- Nemati Sh. Differentiation of human bone marrow mesenchymal stem cells to neural-like cells *in vitro*. Tehran University Medical Journal 2009; 67: 527-34. [Article in Farsi]
27- Kashafi E, Karimi Jashni H, Erfaniyan S, Solhjou K, Sepidkar A, Fakhryniya H. Transdifferentiation of human synovium-derived mesenchymal stem cell into neuronal like cells *in vitro*. Pars Journal of Medical Sciences 2013; 11(2): 39-49.
28- Taran R, Mamidi MK, Singh G, Dutta S, Parhar IS, John JP, *et al*. *In vitro* and *in vivo* neurogenic potential of mesenchymal stem cells isolated from different sources. J Biosci 2014; 39(1): 157-69.

Sci J Iran Blood Transfus Organ 2015; 12(3): 266-276

Original Article

Isolation, expansion, and *in vitro* differentiation of human umbilical cord blood mesenchymal stromal cells into neural progenitor cells

Rafieemehr H.[1,2], Kheirandish M.[1], Soleimani M.[3]

[1]Blood Transfusion Research Center,High Institute for Research and Education in Transfusion Medicine, Tehran, Iran
[2]School of Alliel Medicine, Hamadan University of Medical Sciences, Hamadan, Iran
[3]Department of Hematology and Blood Banking, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

Abstract

Background and Objectives

Umbilical cord blood, as a source of mesenchymal stromal cells, has many advantages compared to other sources. This study aimed to provide a new method for the *in vitro* neural differentiation of human umbilical cord blood derived mesenchymal stromal cells (MSCs hUCB).

Materials and Methods

In this experimental study, MSCs hUCBs were isolated and characterized by morphologic, adipogenic, and osteogenic differentiation and immunophenotypical analysis. Then, neural induction of MSCs hUCB was performed by using RA, bFGF, NGF, EGF, AsA , IBMX, and neurobasal medium. Then, the relative expression of neural-specific genes was investigated by quantitative real-time PCR assays, REST 2009, and SPSS 11.5 software.

Results

Our results showed the osteocytic and adipocytic differentiation capacity and fibroblast-like morphology of MSCs hUCB. Flow cytometry analysis of MSCs hUCB revealed that the cells are positive for CD105 (78%), CD73 (78%), and negative for CD45 (2%), HLA-DR (2.5%). The cells showed the remarkable transition from fibroblast-like morphology to nueral progenitor cells. The results showed that the expression of *GFAP*, *MBP*, *nestin*, *MAP-2* genes after neural induction significantly increased in comparison with that of the control as measured by quantitative real-time PCR assays ($p < 0.05$).

Conclusions

Treatment of MSCs hUCB with a set of growth factors and chemical materials induces neural differentiation and increases the efficiency of cell-based therapy for neurodegenerative diseases in the future. Although, the functionality of neural progenitor cells must be carefully assessed in animal models prior to use in clinical application.

Key words: Mesenchymal Stromal Cells, Cell- and Tissue-Based Therapy, Cell Differentiation

Received: 7 Feb 2015
Accepted:28 Apr 2015

Correspondence: Kheirandish M., PhD of Immunology. Associate Professor of Blood Transfusion Research Center, High Institute for Research and Education in Transfusion Medicine.
P.O.Box:14665-1157, Tehran, Iran. Tel: (+9821) 82052208; Fax : (+9821) 88601599
E-mail: *m.kheirandish@ibto.ir*