

بیان ژن‌های خود بازسازی Oct-4، Sox-2، Nanog، Nucleostemin، Bmi-1 و Sox-9 در سلول‌های بنیادین مزانشیمی ورید بند ناف انسان

عباس جعفری کرمانی^۱، دکتر فردین فتحی^۲، دکتر سید جواد مولی^۳، یوسف قیصری^۴

چکیده

سابقه و هدف

سلول‌های بنیادین با دو ویژگی کلیدی توانایی خودبازسازی و پر توان بودن آن‌ها تعریف می‌شوند. از آن جا که مکانیسم‌های کنترل کننده خودبازسازی در سلول‌های بنیادین مختلف می‌تواند متفاوت باشد، بررسی بیان ژن‌های مسؤول خودبازسازی در سلول‌های مختلف دارای اهمیت بسیار زیادی است. سلول‌های بنیادین بند ناف به تازگی مورد توجه زیادی قرار گرفته‌اند، چرا که این سلول‌ها دارای مزایای زیادی نسبت به سایر سلول‌های بنیادین، برای استفاده در روش‌های سلول درمانی هستند. هدف از انجام مطالعه حاضر، بررسی بیان ژن‌های خودبازسازی Oct-4، Sox2، Nanog، Sox-9 و Nucleostemin در سلول‌های بنیادین مزانشیمی جدا شده از ورید بند ناف انسان می‌باشد.

مواد و روش‌ها

مطالعه انجام شده از نوع تجربی بود. بند ناف‌ها در شرایط استریل جداسازی و در بافر HBSS به آزمایشگاه انتقال یافتند. سلول‌های بنیادین مزانشیمی به وسیله تیمار با آنزیم کلاژناز استخراج و بر اساس توانایی چسبیدن به ظروف پلاستیکی و در محیط DMEM حاوی ۱۵٪ FBS کشت داده شدند. سپس مارکرهای سطحی CD105، CD45، HLA-DR، CD166، CD54 و CD34 در این سلول‌ها بررسی شد و نهایتاً بیان ژن‌های مسؤول خودبازسازی با استفاده از روش‌های RT-PCR و ایمونوسیتوشیمی مورد مطالعه قرار گرفت.

یافته‌ها

بررسی فلوسایتومتری مارکرهای سطحی سلول‌های جداسازی شده نشان داد که این سلول‌ها برای مارکر CD105(SH2)(۹۸٪) مثبت و برای مارکرهای CD34 (۱٪)، CD54 (۱٪)، CD45 (۰٪)، CD106 (۰٪)، CD166 (۰٪)، HLA-DR (۰٪) منفی هستند. هم چنین بررسی‌های انجام شده، برای اولین بار بیان ژن‌های Oct-4، Nanog، Nucleostemin، Bmi-1 و Sox-9 و عدم بیان ژن Sox-2 را در سلول‌های بنیادین مزانشیمی ورید بند ناف انسان نشان داد.

نتیجه گیری

نتایج حاصله نشان می‌دهد مکانیسم‌هایی که هم اکنون برای عملکرد ژن‌های Oct-4، Sox-2 و Nanog شناخته شده است، تنها مکانیسم ممکن برای تنظیم خودبازسازی از طریق این ژن‌ها نیست، بلکه ترکیبی از ژن‌های دخیل در تنظیم خودبازسازی سلول‌های بنیادین جنینی و بالغ نیز می‌تواند برای تنظیم خودبازسازی سلول‌های بنیادین مورد استفاده قرار بگیرد.

کلمات کلیدی: سلول‌های بنیادین مزانشیمی، بند ناف، ایمونوسیتوشیمی، PCR

تاریخ دریافت: ۱۶/۵/۲۴

تاریخ پذیرش: ۱۶/۱۱/۱۰

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد ژنتیک - دانشکده علوم پایه دانشگاه تربیت مدرس

۲- مؤلف مسؤول: PhD آناتومی - استادیار دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی کردستان - صندوق پستی ۶۶۱۷۷-۱۳۴۴۶

۳- PhD ژنتیک - دانشیار دانشکده علوم پایه دانشگاه تربیت مدرس

۴- دانشجوی PhD فرآورده‌های بیولوژیک - انستیتو پاستور ایران

مقدمه

در طی سالیان اخیر، پیشرفت‌های شگرفی در زمینه علم سلول‌های بنیادین صورت گرفته است. از جمله مهم‌ترین این پیشرفت‌ها می‌توان به ظهور روش‌های سلول درمانی (Cell therapy) اشاره کرد. در روش‌های سلول درمانی، که تا به امروز به عنوان نقطه عطف پیشرفت‌ها در زمینه پزشکی ترمیمی (Regenerative medicine) محسوب می‌شوند، سلول‌های بنیادین برای درمان طیف وسیعی از بیماری‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرند (۱).

سلول‌های بنیادین در یک تقسیم‌بندی کلی به دو دسته سلول‌های بنیادین جنینی (Embryonic Stem Cells) و سلول‌های بنیادین بالغ (Adult Stem Cells) دسته‌بندی می‌شوند. سلول‌های بنیادین جنینی و بالغ از نظر منشاء، قدرت تمایز به سلول‌های مختلف و مدت زمان حفظ توانایی خودبازسازی متفاوت هستند (۲). سلول‌های بنیادین از نظر تعریف به سلول‌هایی گفته می‌شود که توانایی خودبازسازی و تمایز به سلول‌های مختلف سازنده بدن را دارا می‌باشند. این دو ویژگی بسیار مهم باعث شده است که تحقیقات وسیعی بر روی این سلول‌ها جهت تمایز آن‌ها به سلول‌های مختلف و به کارگیری آن‌ها در درمان بیماری‌ها به عمل آید.

تاکنون سلول‌های بنیادین بالغ در بافت‌های مختلفی از جمله بافت عصبی، مغز استخوان، پوست، کبد، بافت چربی و بند ناف یافت شده‌اند (۲).

از آن جا که مکانیسم‌های کنترل کننده خودبازسازی در سلول‌های بنیادین مختلف می‌تواند متفاوت باشد، بررسی بیان ژن‌های مسؤول خودبازسازی در سلول‌های مختلف دارای اهمیت بسیار زیادی است. در صورت مشخص شدن مکانیسم‌های دخیل در تنظیم پتانسیل خودبازسازی سلول‌های بنیادین، جهش بزرگی در روش‌های سلول درمانی به وقوع خواهد پیوست. چرا که سلول‌های بنیادین مورد استفاده در روش‌های درمانی، تا حد زیادی تحت کنترل واقع شده و در نتیجه، نه تنها از خطر ایجاد تراتوما توسط آن‌ها کاسته می‌شود، بلکه تمایز آن‌ها به سلول‌های مورد نظر نیز به صورت کاملاً کنترل شده انجام خواهد گرفت. علاوه بر این از آن جا که وقوع سرطان در

بافت‌های مختلف بدن، حاصل تکثیر کنترل نشده سلول‌ها است، بالطبع شناسایی مکانیسم‌های خودبازسازی، کمک بزرگی برای توسعه روش‌های درمانی هدفمند خواهد بود. اولین قدم در راه شناسایی مکانیسم‌های خودبازسازی در یک نوع سلول بنیادین، مشخص کردن ژن‌های خودبازسازی است که در آن نوعی سلول خاص بیان می‌شود (۳).

سلول‌های بنیادین بند ناف به تازگی مورد توجه زیادی قرار گرفته‌اند، چرا که این سلول‌ها دارای مزایای زیادی نسبت به سایر سلول‌های بنیادین، برای استفاده در روش‌های سلول درمانی هستند. از جمله مهم‌ترین این مزایا می‌توان به در دسترس بودن بند ناف به میزان زیاد و غیر تهاجمی بودن روش‌های تهیه آن‌ها اشاره کرد. در صورت جداسازی سلول‌های بنیادین از بند ناف، روزانه به ازای هر تولد، یک نوع سلول جدید، با یک ترکیب HLA جدید به بانک سلولی اضافه می‌گردد. به علاوه، نشان داده شده که در پیوندهایی که از سلول‌های بنیادین بند ناف استفاده می‌شود، انعطاف‌پذیری در برابر عدم تطابق HLA، بیشتر از زمانی است که سایر سلول‌ها برای پیوند مورد استفاده قرار می‌گیرند. در نتیجه، استفاده از این سلول‌ها تا حد زیادی باعث افزایش احتمال موفقیت در انجام پیوندهای غیر اتولوگ می‌گردد. از جمله مزایای دیگر سلول‌های بنیادین بند ناف، می‌توان به میزان بلوغ آن‌ها اشاره کرد. به طور کلی سلول‌های بنیادین بند ناف از نظر میزان بلوغ، حد واسط سلول‌های بنیادین بالغ و جنینی هستند. این امر نتایج متعددی را به همراه دارد که از جمله آن‌ها می‌توان به پتانسیل تکثیر بیشتر و تمایز راحت‌تر این سلول‌ها نسبت به سلول‌های بنیادین بالغ اشاره کرد. از طرفی سلول‌های بنیادین بند ناف مشکلات استفاده از سلول‌های بنیادین جنینی از قبیل خطر ایجاد تراتوما و مسایل اخلاقی را نیز دارا نمی‌باشند (۴-۷).

هدف از انجام مطالعه حاضر، بررسی بیان ژن‌های خودبازسازی Sox-9 ، Bmi-1 ، Nanog ، Sox2 ، Oct-4 ، Nucleostemin در سلول‌های بنیادین مزانشیمی جدا شده از ورید بند ناف انسان می‌باشد. ژن‌های نام برده شده، همگی جزو فاکتورهای رونویسی هستند که بیان سایر

ژن‌ها در طول دوران نمو را تنظیم می‌نمایند. کاهش بیان این ژن‌ها، منجر به کاهش پرتوانی و پتانسیل خودبازسازی سلول و ورود به پروسه تمایز می‌گردد (۸-۱۲). تا به امروز هیچ گزارشی مبنی بر بررسی بیان این ژن‌ها در سلول‌های بنیادین مزانشیمی ورید بند ناف انسان ارایه نشده است.

مواد و روش‌ها

مطالعه انجام شده از نوع تجربی بود. برای جداسازی سلول‌های بنیادین مزانشیمی از ورید بند ناف انسان، بند ناف نوزاد تازه متولد شده در بافر HBSS حاوی آنتی‌بیوتیک و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد از بیمارستان به آزمایشگاه منتقل شد (n=۱۵) و پس از ضد عفونی شدن در الکل ۷۵٪ به مدت ۳۰ ثانیه، دوباره به بافر HBSS منتقل گردید. سپس سلول‌های بنیادین مزانشیمی به وسیله تیمار با آنزیم کلاژناز از ورید بند ناف استخراج گردید. به این صورت که ابتدا یک انتهای بند ناف مسدود شد و پس از تزریق آنزیم کلاژناز به درون ورید، با استفاده از سرنگ، انتهای دوم نیز مسدود گردید و بند ناف به مدت ۲ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. سپس دو انتهای بند ناف باز شد و با تزریق محیط کشت به درون ورید، سلول‌های جدا شده از ورید خارج شده و در محیط کشت DMEM حاوی آنتی‌بیوتیک و ۱۵٪ FBS به فلاسک مخصوص کشت سلول منتقل و در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد حاوی ۵٪ CO₂ قرار داده شدند. پس از گذشت سه روز، سلول‌هایی که به کف فلاسک نچسبیده بودند، با تعویض محیط از فلاسک خارج شدند. محیط کشت سلول‌ها به مدت دو هفته و هر ۳ روز یک مرتبه تعویض شد. پس از گذشت این زمان، سلول‌های باقی مانده در فلاسک، همان سلول‌های بنیادین مزانشیمی ورید بند ناف بودند که در مراحل بعدی تحقیق مورد استفاده قرار گرفتند. کشت این سلول‌ها بدون تغییر قابل توجهی در پتانسیل تکثیر آن‌ها، تا بیش از ۱۵ پاساژ ادامه یافت. بررسی مارکرهای سطحی با استفاده از آنتی‌بادی‌های PE-CD106، PE-CD54، FITC-CD45، PE-HLA-DR (بیوساینس)، PE-CD166، PE-CD105 (R&D سیستم) و PE-CD34 (داکو) انجام شد. لازم به ذکر است که کلیه آنتی‌بادی‌های

مورد استفاده، آنتی‌بادی‌های تولید شده توسط موش هستند که آنتی‌ژن انسانی را شناسایی می‌کنند و همگی از یک کلاس IgG می‌باشند. برای بررسی مارکرهای سطحی توسط فلوسایتومتر، سلول‌های پاساژ پنجم با استفاده از تریپسین از کف فلاسک جدا شدند و از سرم ۳٪ رت برای جلوگیری از اتصالات غیر اختصاصی استفاده شد. سلول‌ها با آنتی‌بادی‌های مورد نظر به مدت یک ساعت در ۳٪ PBS-BSA، در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. برای هر آنتی‌بادی ۱ × ۱۰^۶ سلول مورد استفاده قرار گرفت. سپس سلول‌ها با استفاده از پارافرم آلدئید ۱٪ فیکس شده و Gating سلول‌ها بر اساس FSC (Forward Scatter) و SSC (Side Scatter) با استفاده از دستگاه فلوسایتومتر (Partec PAS) انجام شد. برای حذف اثر اتصال اختصاصی آنتی‌بادی‌ها از آنتی‌بادی‌های کنترل منفی ایزوتایپ (بیوساینس) استفاده شد. از آن جا که کلیه آنتی‌بادی‌های دارای فلروکروم (PE)، از یک کلاس IgG هستند و همگی در موش تولید شده‌اند، برای همه آن‌ها از یک ایزوتایپ کنترل مشترک استفاده شد. از روش RT-PCR برای بررسی بیان ژن‌های مورد مطالعه استفاده شد (جدول ۱). برای این منظور، ابتدا با استفاده از محلول RNX (Plus - سیناژن)، RNA کل را از سلول‌ها استخراج نموده و پس از اطمینان یافتن از کیفیت RNA استخراج شده با انجام الکتروفورز ژل آگارز و اسپکتروفتومتری، جهت تهیه cDNA از آغازگر Oligo dT (بیوتک - آلمان) و کیت Rt (بیونیر - کره جنوبی) استفاده شد. واکنش RT در حجم نهایی ۵۰ میکرولیتر انجام گرفت. پس از تهیه cDNA، واکنش PCR جهت تکثیر قطعه مورد نظر انجام گرفت. واکنش PCR در حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر انجام شد و جهت تهیه حجم مذکور، علاوه بر DNA الگو (محصول واکنش RT) از کیت PCR (بیونیر - کره جنوبی)، آب مقطر استریل و آغازگرهای بالادست (Forward) و پایین دست (Reverse)، با مشخصات مورد اشاره در جدول شماره ۱ استفاده شد.

پس از آماده ساختن حجم مورد نظر جهت انجام واکنش، واکنش PCR با شرایط ۴۵ ثانیه دناتوره شدن در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد، ۴۵ ثانیه آنیلینگ در دمای

جدول ۱: اسامی ژن‌ها و توالی مربوط به آغازگرهای بالادست (F) و پایین‌دستی (R) که در این پژوهش استفاده شدند.

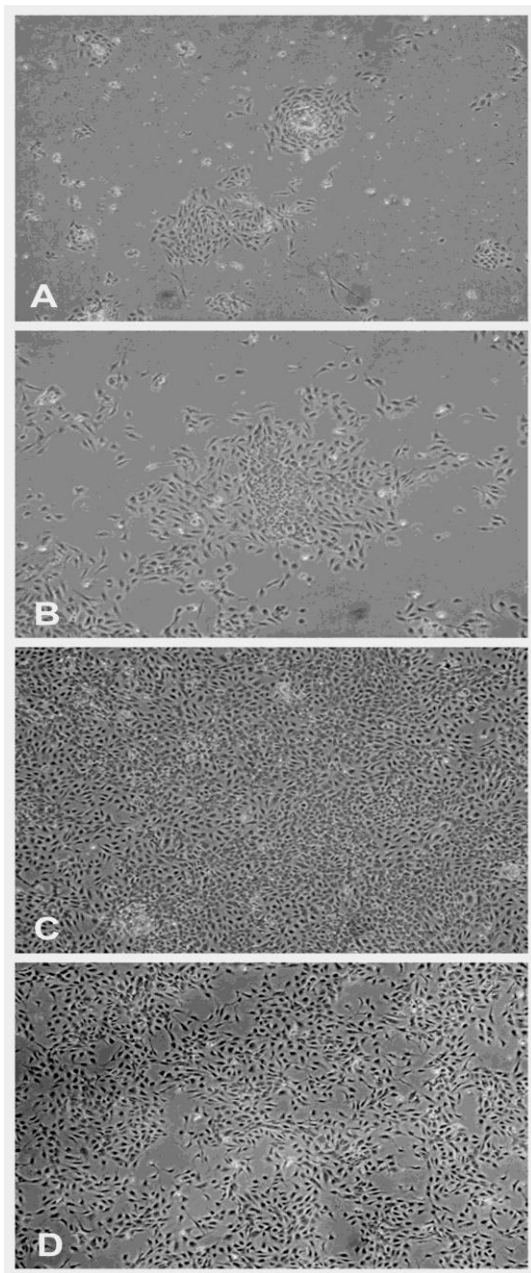
نام ژن	اندازه (bp)		توالی آغازگر
Oct-4	۴۷۰	F	GAGAATTTGTTCTCCTGCAGTGC
		R	GTTCCCAATTCCTTCCTTAGTG
Sox-2	۴۲۶	F	ATGGGTTCGGTGGTCAAGTC
		R	GTGGATGGGATTGGTGTCTC
Nanog	۴۷۰	F	ACCTATGCCTGTGATTTGTGG
		R	AAGAGTAGAGGCTGGGGTAGG
Nucleostemin	۷۴۷	F	CAGAGATCCTCTTGGTTGCAG
		R	AATGAGGCACCTGTCCACTC
Bmi-1	۴۱۳	F	TACTCCAGTGCAGTCTCCTC
		R	TCCCATCTTTCTTAACACAG
Sox-9	۵۵۷	F	CGCGTATGAATCTCCTGGAC
		R	CGTTCTTCACCGACTTCCTC
β_2m	۲۰۰	F	CTACTCTCTCTTCTGGCCTG
		R	GACAAGTCTGAATGCTCCAC

۶۴-۶۰ درجه سانتی‌گراد (بر اساس نوع آغازگر) و ۱ دقیقه اکستنشن در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد انجام گرفت. تعداد ۳۵ سیکل و یک سیکل اکستنشن نهایی به مدت پنج دقیقه در ۷۲ درجه سانتی‌گراد در نظر گرفته شد. جهت انجام هر دو واکنش RT-PCR از دستگاه ماستر سايکلر (اپندورف) استفاده شد. ژن β_2m به عنوان کنترل داخلی مورد استفاده قرار گرفت. بعد از اتمام واکنش، ۸ میکرولیتر از محصول واکنش PCR توسط الکتروفورز ژل آگارز ۱ درصد بررسی شد. به منظور حصول اطمینان از صحیح بودن نتایج به دست آمده، هر واکنش RT-PCR سه مرتبه تکرار شد. آغازگرهای مورد استفاده در این مطالعه با کمک نرم‌افزار Gene runner طراحی شدند. کلیه آغازگرها از شرکت MWG آلمان خریداری شدند.

در طول آزمایش از میکروسکوپ معکوس فلورسنت (Nikon-TE ۳۰۰) جهت ارزیابی سلول‌ها استفاده شد. به منظور انجام ارزیابی‌های ایمونوسیتوشیمی، سلول‌ها به

مدت ۷ دقیقه با استفاده از پارافرمالدئید ۴ درصد در دمای اتاق فیکس شدند. از بافر بلاک‌کننده حاوی Triton X-۱۰۰ و سرم Donkey جهت نفوذپذیری سلول‌ها و مهار آنتی‌ژن‌های غیر اختصاصی که احتمال اتصال آنتی‌بادی ثانویه به آن‌ها وجود داشت استفاده شد.

آنتی‌بادی اولیه Goat anti human Oct-4 (سانتاکروز بیوتکنولوژی) با غلظت ۱/۵۰۰ و Goat anti human Nucleostemin (سانتاکروز بیوتکنولوژی) با غلظت ۱/۲۵۰ به مدت ۲ ساعت در دمای ۳۷ °C مورد استفاده قرار گرفتند. سپس آنتی‌بادی ثانویه Donkey anti goat (سانتاکروز بیوتکنولوژی) متصل به Texas Red با غلظت ۱/۴۰۰ به مدت یک ساعت در دمای ۳۷ °C استفاده شد. پس از شستشوی سلول‌ها با بافر فسفات، از Vector hard set (Vector Laboratories) که همراه آن رنگ داپی هم موجود بود، جهت ماونت کردن سلول‌ها استفاده شد و نهایتاً سلول‌ها به کمک میکروسکوپ فلورسنت مطالعه و



شکل ۱: تصویر سلول‌های بنیادین مزانشیمی جدا شده از بند ناف انسان. همان طور که مشاهده می‌شود، سلول‌های جداسازی شده ابتدا به صورت کلنی‌های مجزا به کف فلاسک می‌چسبند. سپس در اثر تکثیر سلول‌ها، اندازه کلونی‌ها بزرگ‌تر می‌شود، تا جایی که پس از گذشت تقریباً ۶ روز، کل سطح فلاسک با سلول‌ها پوشیده می‌شود. شکل‌های A، B و C به ترتیب، سلول‌های بنیادین مزانشیمی ورید بند ناف انسان را پس از گذشت ۲، ۴ و ۶ روز از زمان جداسازی نشان می‌دهند. شکل D نشان‌دهنده سلول‌ها در پاساژ چهارم می‌باشد. همان طور که مشاهده می‌شود، این سلول‌ها از نظر مورفولوژی شبیه سلول‌های تازه جداسازی شده می‌باشند.

عکسبرداری شدند. هم چنین، یک چاهک به عنوان کنترل در نظر گرفته شد که در آن، آنتی‌بادی اولیه اضافه نگردید. به منظور حصول اطمینان از صحیح بودن نتایج به دست آمده، هر آزمایش ایمونوسیتوشیمی دو مرتبه تکرار شد.

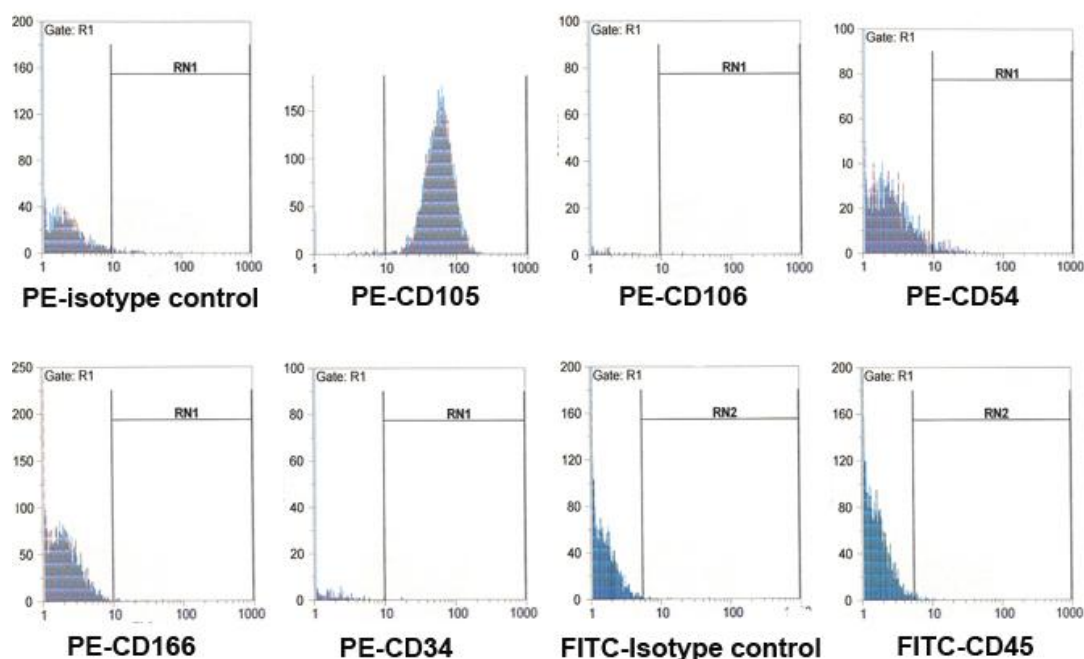
یافته‌ها

سلول‌های جداسازی شده با روش مورد استفاده در این مطالعه، دارای مورفولوژی شبیه سلول‌های فیروپلاستی بوده و ابتدا به صورت کلنی‌های مجزا به کف فلاسک می‌چسبند. سپس در اثر تکثیر سلول‌ها، اندازه کلونی‌ها بزرگ‌تر می‌شود، تا جایی که پس از گذشت تقریباً ۶ روز، کل سطح فلاسک با سلول‌ها پوشیده می‌شود (شکل ۱). کشت این سلول‌ها بدون تغییر قابل توجهی در مورفولوژی و پتانسیل تکثیر، تا بیش از ۱۵ پاساژ ادامه یافت که این امر نشان‌دهنده توانایی خودبازسازی و در نتیجه ماهیت بنیادین جمعیت سلولی جداسازی شده بود. بررسی فلوسایتومتری مارکرهای سطحی سلول‌های جداسازی شده نشان داد که این سلول‌ها برای مارکر CD105 (SH2) (۹۸٪) مثبت و برای مارکرهای CD34 (۰٪)، CD54 (۱٪)، CD45 (۰٪)، CD106 (۰٪)، CD166 (۱٪) و HLA-DR (۰٪) منفی بودند (شکل ۲). بررسی‌های RT-PCR نشان‌دهنده بیان ژن‌های Oct-4، Nanog، Nucleostemin، Bmi-1 و Sox-9 و عدم بیان ژن Sox-2 در سلول‌های بنیادین مزانشیمی ورید بند ناف انسان بود (شکل ۳). از طرفی ارزیابی‌های ایمونوسیتوشیمی نیز بیان ژن‌های Oct-4 و Nucleostemin را در این سلول‌ها تایید کردند (شکل ۴).

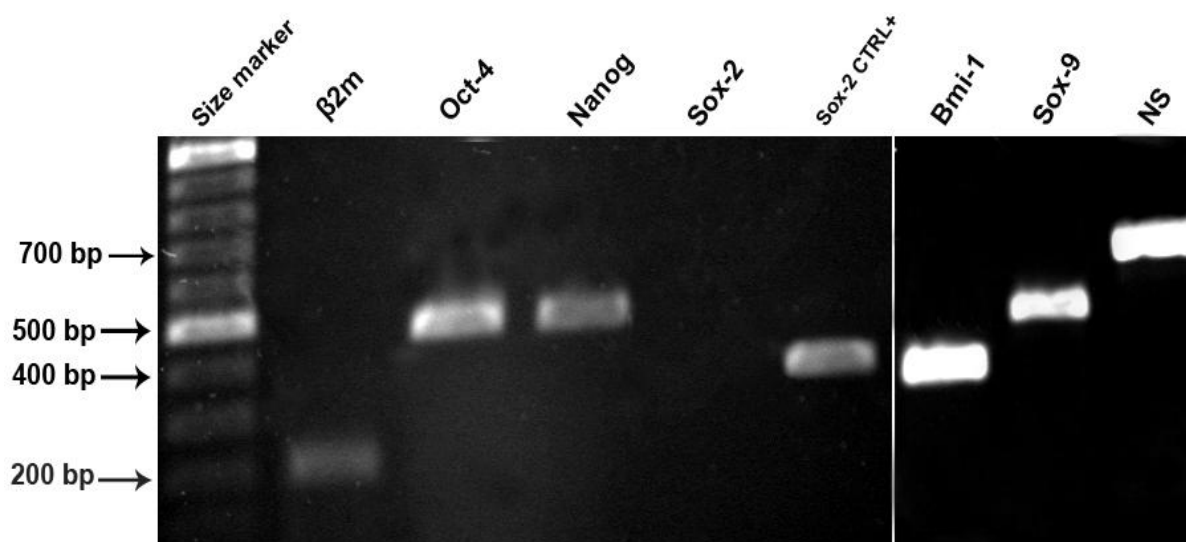
بحث

پس از موفقیت کلاکمن و همکارانش (سال ۱۹۸۸) در استفاده از سلول‌های بنیادین خون‌ساز بند ناف در درمان بیماری آنمی فانکونی، توجه بسیاری از محققین به این سلول‌ها جلب شد و بدین ترتیب پنجره تازه‌ای به روی روش‌های سلول درمانی باز گردید (۱۳).

از آن زمان تاکنون، بررسی‌های زیادی بر روی سلول‌های بنیادین بند ناف صورت گرفته است. در نتیجه این بررسی‌ها نشان داده که سلول‌های بنیادین بند ناف، نه تنها محدودیت‌های ذکر شده در استفاده از سایر انواع



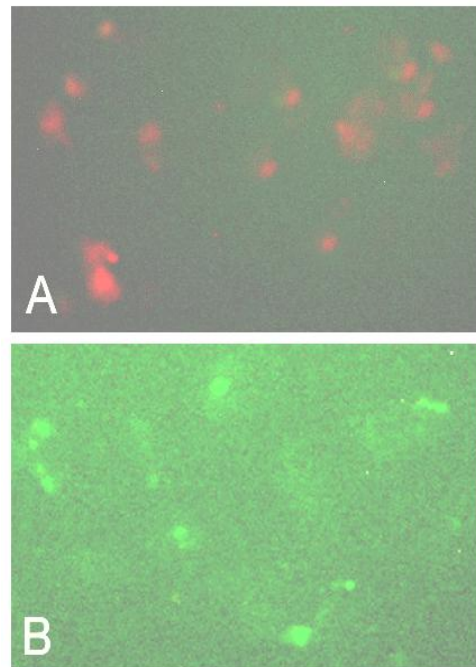
شکل ۲: نتایج فلوسایتومتری نشان داد که سلول‌های جداسازی شده برای مارکر CD105 مثبت و برای مارکرهای CD34، CD106، CD166، CD54، CD45 منفی هستند. از آن جا که کلیه آنتی‌بادی‌های دارای فلروکروم PE، از یک کلاس IgG هستند و همگی در موش تولید شده‌اند، برای همه آن‌ها از یک ایزوتاوپ کنترل مشترک استفاده شد.



شکل ۳: بررسی‌های RT-PCR نشان دهنده بیان ژن‌های Oct-4، Nanog، Nucleostemin، Bmi-1 و Sox-9 و عدم بیان ژن Sox-2 در سلول‌های بنیادین مزانشیمی ورید بند ناف انسان بود. برای حصول اطمینان از عملکرد آغازگر ژن Sox-2، لاین سلولی گلیوبلاستوما U87MG که ژن Sox-2 را بیان می‌کند، به عنوان کنترل مثبت مورد استفاده قرار گرفت.

امروزه مطالعات مختلفی نشان داده‌اند که منشاء اصلی سرطان در بافت‌های مختلف، سلول‌های بنیادین موجود در آن بافت می‌باشند که مکانیسم‌های خودبازسازی در آن‌ها دچار اختلال شده و به همین دلیل این سلول‌ها ماهیت سرطانی پیدا کرده و به طور نامتناهی تقسیم می‌شوند. لذا در صورت مشخص شدن مکانیسم‌های دخیل در تنظیم خودبازسازی سلول‌های بنیادین، می‌توان رشد این سلول‌ها را کنترل کرد که این مطلب در آینده می‌تواند به عنوان یک روش هدفمند برای درمان سرطان مورد استفاده قرار گیرد. از آن جا که پتانسیل خودبازسازی در سلول‌های بنیادین مختلف می‌تواند توسط مکانیسم‌های مختلفی کنترل شود، لذا مطالعه مکانیسم‌های کنترل کننده خودبازسازی در سلول‌های بنیادین مختلف دارای اهمیت بسیار زیادی می‌باشد. اولین قدم در راه شناسایی مکانیسم‌های تنظیمی خودبازسازی در سلول‌های مختلف، مشخص کردن ژن‌های مشغول خودبازسازی است که در این سلول‌ها بیان می‌شوند.

در این مطالعه سلول‌های بنیادین مزانشیمی ورید بند ناف از نظر بیان ژن‌های دخیل در خودبازسازی مورد بررسی قرار گرفتند. توانایی تکثیر تا بیش از ۱۵ پاساژ، بدون مشاهده تغییر قابل توجهی در مورفولوژی و پتانسیل تکثیر سلول‌های جداسازی شده از ورید بند ناف انسان و هم چنین بیان ژن‌های مسئول خودبازسازی در این سلول‌ها نشان‌دهنده ماهیت بنیادین این سلول‌ها بود. از طرفی چسبیدن سلول‌های جداسازی شده به کف فلاسک‌های کشت سلول پلاستیکی و بیان مارکر سطحی CD105 (SH2) که جزو مارکری است که در سلول‌های مزانشیمی بیان می‌شود و هم چنین عدم بیان مارکرهای سطحی هماتوپویتیک و اندوتلیال توسط سلول‌های جدا سازی شده، نشان‌دهنده ماهیت مزانشیمی این سلول‌ها بود. مطالعه حاضر، اولین گزارش مبنی بر بررسی بیان ژن‌های دخیل در خودبازسازی در سلول‌های بنیادین مزانشیمی ورید بند ناف انسان می‌باشد. ژن‌های Oct-4، Sox-2 و Nanog ژن‌های اصلی تنظیم کننده خودبازسازی در سلول‌های بنیادین جنینی هستند (۱۸-۱۶). از طرفی ژن‌های Nucleostemin، Bmi-1 و Sox-9 در تنظیم



شکل ۴: ارزیابی ایمونوسیتوشیمی بیان ژن‌های Oct-4 (A) و Nucleostemin (B) را در سلول‌های بنیادین مزانشیمی ورید بند ناف انسان نشان داد.

سلول‌های بنیادین را به همراه ندارند، بلکه نسبت به آن‌ها دارای مزایایی نیز هستند. از جمله این مزایا می‌توان به در دسترس بودن بند ناف به میزان زیاد، غیر تهاجمی بودن روش‌های جداسازی این سلول‌ها و عدم وجود مشکلات اخلاقی در استفاده از این سلول‌ها اشاره کرد (۷-۴).

اگر چه مدت زمان زیادی است که سلول‌های بنیادین خون‌ساز بند ناف مورد توجه و استفاده قرار گرفته‌اند اما سلول‌های بنیادین مزانشیمی بند ناف اخیراً جداسازی شده و تحقیقات انجام شده بر روی آن‌ها بسیار محدود هستند. رامانو و میشل در سال ۲۰۰۲ برای اولین بار، سلول‌های بنیادین مزانشیمی را از ورید بند ناف انسان جدا نمودند (۶)، سپس توانایی تمایز این سلول‌ها به سلول‌های عصبی، قلبی، ماهیچه‌ای، غضروفی و استخوانی نشان داده شد (۱۵، ۱۴).

یکی از مهم‌ترین ویژگی‌های سلول‌های بنیادین، توانایی خودبازسازی این سلول‌هاست. به این معنی که حداقل یکی از سلول‌های حاصل از تقسیم آن‌ها، شبیه سلول اولیه می‌باشد. مطالعه مکانیسم‌های دخیل در خودبازسازی سلول‌های بنیادین دارای اهمیت بسیار زیادی است. چرا که

خودبازسازی انواع مختلفی از سلول‌های بنیادین بالغ از جمله سلول‌های بنیادین مزانشیمی و خون‌ساز مغز استخوان و سلول‌های بنیادین عصبی نقش دارند (۲۰، ۱۹، ۱۲، ۸). مطالعه حاضر برای اولین بار نشان داد که سلول‌های بنیادین مزانشیمی ورید بند ناف انسان، به غیر از ژن Sox-2، کلیه ژن‌های نام برده شده را بیان می‌کنند.

نتایج حاصل از این مطالعه از این لحاظ جالب توجه می‌باشند که برای اولین بار نشان می‌دهد سلول‌های مزانشیمی ورید بند ناف انسان، ژن‌های تنظیم‌کننده خودبازسازی در سلول‌های بنیادین جنینی (Oct-4 و Nanog) و سلول‌های بنیادین بالغ (Nucleostemin، Bmi-1 و Sox-9) را به طور هم زمان بیان می‌کنند.

یکی دیگر از نکات جالب توجه در نتایج به دست آمده از این مطالعه، عدم بیان ژن Sox-2، علی‌رغم بیان شدن ژن‌های Oct-4 و Nanog می‌باشد. چرا که این سه ژن که همگی جزو فاکتورهای رونویسی هستند، معمولاً به صورت یک شبکه مرکزی در تنظیم خودبازسازی سلول‌های بنیادین جنینی دارای نقش می‌باشند. به طوری که هر کدام از این سه ژن در تنظیم دو ژن دیگر دخیل است و مجموع این سه ژن نیز به طور هم زمان، هم به عنوان فعال‌کننده رونویسی سایر ژن‌های دخیل در خودبازسازی و هم به عنوان مهارکننده ژن‌های دخیل در تمایز عمل می‌کنند (۲۱). عدم بیان ژن Sox-2 از یک طرف و بیان ژن‌های دخیل در خودبازسازی سلول‌های بنیادین بالغ در سلول‌های بنیادین بند ناف از طرف دیگر می‌تواند پیشنهادکننده این مطلب باشد که مکانیسم‌هایی که هم اکنون برای عملکرد ژن‌های Oct-4، Sox-2 و Nanog شناخته شده است، تنها مکانیسم ممکن برای تنظیم خودبازسازی از طریق این ژن‌ها نیست. بلکه ترکیبی از

ژن‌های دخیل در تنظیم خودبازسازی سلول‌های بنیادین جنینی و بالغ نیز می‌تواند برای تنظیم خودبازسازی مورد استفاده قرار بگیرد. مشخص شدن نقش دقیق هر کدام از ژن‌های نام برده شده در این مکانیسم ترکیبی تنظیم خودبازسازی در سلول‌های بنیادین مزانشیمی ورید بند ناف انسان، نیازمند انجام مطالعات بیشتر می‌باشد. از آن جا که سلول‌های بنیادین مزانشیمی ورید بند ناف انسان جزو موارد نادری هستند که در یک نوع سلول بنیادین، ژن‌های تنظیم‌کننده خودبازسازی سلول‌های بنیادین جنینی و بالغ به طور هم زمان بیان می‌شوند، انجام بررسی‌های بیشتر بر روی این سلول‌ها می‌تواند نکات جالبی را در مورد مکانیسم‌های تنظیمی خودبازسازی در سلول‌های بنیادین جنینی و بالغ و چگونگی مشارکت آن‌ها در تنظیم خودبازسازی سلول‌های بنیادین مزانشیمی ورید بند ناف انسان نمایان سازد.

نتیجه‌گیری

در مجموع، نتایج به دست آمده از این مطالعه نشان می‌دهد که ورید بند ناف انسان را می‌توان به عنوان یک منبع بسیار مناسب برای جداسازی سلول‌های بنیادین مزانشیمی، به منظور به کارگیری در روش‌های سلول درمانی در نظر گرفت. از طرفی، بررسی‌های انجام شده نشان داد که مکانیسم‌های تنظیم‌کننده پتانسیل خودبازسازی در سلول‌های مختلف ممکن است متفاوت باشد. به عنوان مثال، ترکیبی از ژن‌های تنظیم‌کننده خودبازسازی در سلول‌های بنیادین جنینی و بالغ، مسئول تنظیم پتانسیل خودبازسازی در سلول‌های بنیادین مزانشیمی ورید بند ناف انسان می‌باشند.

References :

- 1- Lazic SE, Roger AB. Cell-based therapies for disorders of the CNS. *Expert Opinion in Therapeutic Patents* 2006;15: 1361-76.
- 2- Ginis I, Rao M. Toward cell replacement therapy: promises and caveats. *Experimental Neurology* 2003; 184: 61-77.
- 3- Semil C, Tony S, Torsten B, Karin E, Elzo D, *et al.* Prospero acts as a binary switch between self-renewal and differentiation in drosophila neural stem cells. *Developmental Cell* 2006;11:775-89.
- 4- Romanov YA, Svintstskaya VA, Smirnov VN. Searching for alternative sources of postnatal human mesenchymal stem cells: candidate MSC-like cells from umbilical cord. *Stem Cells* 2003;21:105-10.
- 5- Jeong JA, Hong SH, Gang EJ, Ahn C, Hwang SH, *et al.* Differential gene expression profiling of human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells by DNA microarra. *Stem Cells* 2005;23:584-93.
- 6- Gang EJ, Hong SH, Ah JJ, Hwang SH, Kim SW, *et al.* In vitro mesengenic potential of human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2004; 321: 102-10.
- 7- Gunning J. Umbilical cord cell banking-implications for the future. *Toxicology and Applied Pharmacology* 2005;207:538-43.
- 8- Kafienah W, Mistry S, Williams C, Hollander AP. Nucleostemin is a marker of proliferating stromal stem cells in adult human bone marrow. *Stem Cells* 2006;24:1113-20.
- 9- Beekman C, Nichane M, De Clercq S, Maetens M, Floss T, *et al.* Evolutionarily conserved role of nucleostemin (NS): controlling proliferation of stem/progenitor cells during early vertebrate development. *Molecular and Cellular Biology* 2006: 9291-301.
- 10- Miyagi S. The Sox-2 regulatory regions display their activities in two distinct types of multipotent stem cells. *Molecular and Cellular Biology* 2004;10:4207-20.
- 11- Carlin R, Davis D, Weiss M, Schultz B, Troyer D. Expression of early transcription factors Oct-4, Sox-2 and Nanog by porcine umbilical cord (PUC) matrix cells. *Reproductive Biology and Endocrinology* 2006;4.
- 12- Yaghoobi MM, Mowla SJ, Tiraihi T. Nucleostemin, a coordinator of self-renewal, is expressed in rat marrow stromal cells and turns off after induction of neural differentiation. *Neuroscience Letters* 2005;390:81-6.
- 13- Gluckman E, Broxmeyer HA, Auerbach AD, Friedman HS, Douglas GW, *et al.* Hematopoietic reconstitution in a patient with Fanconi's anemia by means of umbilical-cord blood from an HLA identical Sibling. *National English Journal of Medicine* 1989;321:1174-8.
- 14- Kadivar M, Khatami S, Mortazavi Y, Taghikhani M, Shokrgozar MA. Multilineage differentiation activity by the human umbilical vein-derived mesenchymal stem cells. *Iranian Biomedical Journal* 2006;10:175-84.
- 15- Covas DT, Siufi JLC, Silva ARL, Orellana MD. Isolation and culture of umbilical vein mesenchymal stem cells. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 2003;36:1179-83.
- 16- Rodda DJ, Chew JL, Lim LH, Loh YH, Wang B. Transcriptional regulation of Nanog by Oct-4 and Sox-2. *The Journal of Biological Chemistry* 2005;280: 24731-7.
- 17- Okumura-Nakanishi S, Saito M, Niwa H, Ishikawa F. Oct-3/4 and Sox-2 Regulate Oct-3/4 Gene in Embryonic Stem Cells. *The Journal of Biological Chemistry* 2005;280:5307-17.
- 18- Boiani M, Schöler H. Regulatory networks in embryo-derived pluripotent stem cells. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2005;6:872-81.
- 19- Tanaka S, Kamachi Y, Tanouchi A, Hamada, Jing N, *et al.* Interplay of Sox and Pou factors in regulation of the nestin gene in neural primordial cells. *Molecular and Cellular Biology* 2004;20:8834-46.
- 20- Park IK, Morrison SJ, Clarke MF. Bmi-1, stem cells, and senescence regulation. *Journal of Clinical Investigation* 2004;113:175-9.
- 21- Schulz WA, Hoffmann MJ. Transcription factor networks in embryonic stem cells and testicular cancer and the definition of epigenetics. *Epigenetics* 2007;2: 37-42.

Expression of Oct-4, Sox-2, Nanog, Nucleostemin, Bmi-1 and Sox-9 self renewal genes in human umbilical cord vein mesenchymal stem cells

Jafari Kermani A.¹(MS), Fathi F.²(PhD), Mowla S.J.¹(PhD), Gheisari Y.³(PhD)

¹Department of Genetics, Faculty of Basic Sciences, Tarbiat Modarres University

²Kordestan University of Medical Sciences

³Department of Biotechnology, Iran Pasteur Institute

Abstract

Background and Objectives

Stem cells are defined with two main characteristics which are self renewal potential and pluripotency. It is of great importance to study expression of self renewal genes in different stem cells, because self renewal regulatory mechanisms may vary among different kinds of stem cell. Human umbilical cord stem cells have recently gained so much attention, because their use in cell therapy methods has several advantages. The main objective of the present study was to evaluate the expression of Oct-4, Sox-2, Nanog, Nucleostemin, Bmi-1 and Sox-9 self renewal genes in human umbilical cord vein mesenchymal stem cells.

Materials and Methods

In this experimental study, umbilical cords were obtained in sterile condition and carried to the laboratory in HBSS buffer. Mesenchymal stem cells were harvested by collagenase treatment and cultured by means of their adhesiveness to plastic surfaces in DMEM medium supplemented with 15% FBS. To confirm the mesenchymal identity of these cells, expression of some surface markers including CD105, CD106, CD54, CD45, HLA-DR, CD166, and CD34 was analysed by means of flowcytometry. Finally, expression of self renewal genes was evaluated by RT-PCR and immunocytochemistry techniques.

Results

Flowcytometry analysis of UBMCs revealed that the cells are positive for CD105 (98%) and negative for CD34 (0%), CD54 (1%), CD45 (0%), CD106 (0%), CD166 (0%), and HLA-DR (0%). Our results also revealed Oct-4, Nanog, Nucleostemin, Bmi-1 and Sox-9 expression in human umbilical cord vein mesenchymal stem cells, but not Sox-2 self renewal gene expression.

Conclusions

The results showed that the mechanism which is known today for Oct-4, Nanog and Sox-2 function is not the only possible mechanism in which these three genes can play role to regulate self renewal potential of stem cells. Obtained results can offer that a combination of regulatory mechanisms which regulate self renewal of adult and embryonic stem cells, may be responsible to regulate self renewal of stem cells.

Key words: Mesenchymal stem cells, Umbilical cord, PCR, Immunocytochemistry
SJIBTO 2008; 4(4): 275-284

Received: 15 Aug 2007

Accepted: 30 Jan 2008

Correspondence: Fathi F., PhD of Anatomy. Cell & Molecular Research Lab, Kordestan University of Medical Sciences.

P.O.Box: 66177-13446, Sanandaj, Iran. Tel: (+98871) 6661830; Fax : (+98871) 6660051

E-mail: farfath@yahoo.com