خون
فصلنامه پژوهشی
دوره ۷ شماره ۱ بهار ۸۹ (۴۰-۳۴)

مقاله پژوهشی

توانایی سلول‌های بنیادی مزانشیمی ورید بند ناف انسان در تمایز به سلول‌های کبدی از طریق جذب سلولی ایندوسیانین گرین

آزاده رئوفی[۱]، علی امینی[۲]، مهری آزادبخت[۲]، مرتضی ابوذری[۳]، فردین فتحی[۴]

چکیده

سابقه و هدف

بند ناف یکی از منابع مناسب جهت جداسازی سلول‌های بنیادی مزانشیمی است. در مطالعه حاضر، پتانسیل تمایزی سلول‌های بنیادی مزانشیمی ورید بند ناف انسانی به سلول‌های کبدی از طریق جذب سلولی ایندوسیانین گرین مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

مطالعه انجام شده از نوع تجربی بود. پس از القای تمایز کبدی در سلول‌های بنیادی مزانشیمی ورید بند ناف انسانی، سلول‌های تمایز یافته از طریق روش‌هایی هم چون جذب سلولی ایندوسیانین گرین، ایمونوسیتوشیمی و رنگ‌آمیزی پریودیک اسید شیف مورد بررسی قرار گرفتند.

یافته‌ها

تغییر شکل سلول‌های تحت تمایز از حالت دوکی شکل به چند وجهی مشاهده گردید. سلول‌های تمایز یافته قادر به جذب ایندوسیانین گرین بوده و نتیجه واکنش ایمونوسیتوشیمی جهت بررسی بیان آلبومین در آن‌ها مثبت بود. هم چنین رنگ‌آمیزی پریودیک اسید شیف، تجمع ذرات گلیکوژن در سلول‌های مذکور را تایید کرد.

نتیجه گیری

از این مطالعه می‌توان نتیجه گرفت که سلول‌های بنیادی مزانشیمی ورید بند ناف انسانی، قادرند در محیط آزمایشگاهی به سلول‌های کبدی تمایز یابند و جذب سلولی ایندوسیانین گرین نیز به عنوان یک روش ساده و مناسب جهت تایید ماهیت عملکردی سلول‌های کبدی حاصل از تمایز قابل استفاده می‌باشد.

کلمات کلیدی: تمایز سلولی، وریدهای بند ناف، سلول‌های بنیادی مزانشیمی، سلول کبدی، ایندوسیانین گرین

تاریخ دریافت : ۸۸/ ۴/۳۰
تاریخ پذیرش : ۸۸/۱۲/۸

۱ـ دانشجوی کارشناسی ارشد بیولوژی ـ دانشکده علوم دانشگاه رازی کرمانشاه
۲ـ PhD آناتومی ـ دانشیار دانشکده علوم دانشگاه رازی کرمانشاه
۳ـ دانشجوی PhD آناتومی ـ مرکز تحقیقات گوارش و کبد دانشگاه علوم پزشکی کردستان
۴- مؤلف مسؤول: PhD آناتومی ـ دانشیار مرکز تحقیقات گوارش و کبد و مرکز تحقیقات علوم سلولی و مولکولی دانشگاه علوم پزشکی کردستان ـ صندوق پستی: ۶۶۱۷۷-۱۳۴۴۶

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2025-07-02]

مقدمه

سلول‌های بنیادی مزانشیمی، سلول‌هایی با خاصیت تکثیری بالا و بیان منحصر به فرد از مولکول‌های سطح سلولی می‌باشند(۱). این دسته از سلول‌ها، تحت شرایط القایی مناسب قادر به تمایز به سلول‌هایی با منشا مزودرمی، اکتودرمی و آندودرمی هستند(۴-۲).

اخیراً رومانو و کواس موفق به جداسازی سلول‌های بنیادی مزانشیمی از جدار ورید انسانی شده و آن‌ها را به سلول‌های چربی و استخوانی تمایز دادند(۶، ۵). در مقایسه با سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان، نحوه جداسازی این سلول‌ها بسیار ساده است(۷). در یک مطالعه، کاداویر و همکاران، ظرفیت تمایزی این دسته از سلول‌ها را مورد بررسی قرار دادند. این گروه از محققان موفق به تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی ورید بند ناف انسانی به سلول‌های چربی، استخوانی، غضروفی و عصبی گردیدند(۸). هم چنین جعفری و همکاران پس از جداسازی سلول‌های مذکور و تایید ماهیت مزانشیمی آن‌ها، نشان دادند که این سلول‌ها قادر به بیان ژن‌های خودبازسازی نظیر Oct-4، Nanog، Nucleostemin، Bmi-1 و Sox-9 می‌باشند(۹). آن‌ها در طی مطالعه دیگری نشان دادند که این سلول‌ها، حامل مناسبی جهت انتقال ژن‌هایی هم چون GFP و BDNF محسوب می‌شوند(۱۰).

در مطالعه‌های درمانی مبتنی بر انتقال سلول‌های بنیادی، کبد به عنوان یکی از ارگان‌های هدف، مد نظر است. برای کسب سلول‌های کبدی بالغ از سلول‌های بنیادی، علاوه بر نیاز به فراهم آوردن یک سیستم مناسب جهت تمایز آن‌ها، احتیاج به روش‌های مناسبی برای تشخیص سلول‌های تمایز یافته نیز می‌باشد. یکی از عملکردهای مهم کبد، حذف مواد اگزوژن و آندوژن از جریان خون است. این عملکرد سلول کبدی، مربوط به سیستم‌های انتقالی موجود در غشاهای جانبی و سینوزوئیدی آن می‌باشد(۱۲، ۱۱). ایندوسیانین گرین، یک آنیون ارگانیک است که به صورت کلینیکی جهت بررسی عملکرد کبدی مورد استفاده قرار می‌گیرد. این ماده غیر سمی بوده و توسط سلول‌های کبدی حذف می‌گردد(۱۷-۱۳). از آن جایی که توانایی تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی ورید بند ناف انسان به سلول‌های کبدی تا زمان شروع این تحقیق گزارش نشده بود، در مطالعه حاضر سلول‌های بنیادی مزانشیمی ورید بند ناف انسانی به سلول‌های کبدی القا شده و هم زمان با استفاده از ارزیابی ایمونوسیتوشیمی و واکنش پریودیک اسید شیف، از توانایی سلول‌ها در جذب ایندوسیانین گرین به عنوان روشی جهت تایید ماهیت کبدی سلول‌های تمایز یافته استفاده شد.

مواد و روش ها

کشت و تمایز کبدی سلول‌های بنیادی مزانشیمی ورید بند ناف انسانی:

این مطالعه از نوع تجربی بود. در این مطالعه، سلول‌های بنیادی مزانشیمی ورید بند ناف انسانی که از قبل جداسازی شده و ماهیت بنیادی آن‌ها تایید شده بود، مورد استفاده قرار گرفتند(۱۰). به طور خلاصه بند ناف نوزاد تازه متولد شده در بافر HBSS حاوی آنتی‌بیوتیک و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد از بیمارستان به آزمایشگاه منتقل شد. ابتدا یک انتهای بند ناف مسدود شد و پس از تزریق آنزیم کلاژناز به درون ورید، انتهای دوم نیز مسدود گردید. بند ناف به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد و با تزریق محیط کشت به درون ورید، سلول‌های بنیادی مزانشیمی از ورید بند ناف استخراج گردیدند(۱۰). سلول‌های استخراج شده، در محیط کشت DMEM-LG (گیبکو) حاوی ۱۵٪ از FBS (گیبکو)، ۱۰ng/ml از EGF (سیگما- آلدریچ) و ۲۰ ng/ml از bFGF (سیگما- آلدریچ) در یک اتمسفر مرطوب (محتوی ۹۵٪ هوا، ۵٪ دی اکسید کربن، رطوبت نسبی ۱۰۰٪ و درجه حرارت ۳۷ درجه سانتی‌گراد) انکوبه شدند. محیط کشت سلول‌ها، هر ۴۸ ساعت یک بار تعویض شد. برای القای تمایز کبدی در سلول‌های بنیادی مزانشیمی ورید بند ناف انسانی، از یک پروتکل دو مرحله‌ای به مدت ۴ هفته استفاده گردید. سلول‌ها در ظروف چهار خانه پوشش داده شده با فیبرونکتین کشت داده شدند و پس از رسیدن تراکم آن‌ها به حدود ۷۰٪، تحت تمایز قرار گرفتند. برای دو هفته نخست، سلول‌ها تحت تیمار با محیط تمایزی شامل DMEM-LG حاوی FBS (۱۵٪) ، دگزامتازون (۰/۵ µm ،

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2025-07-02]

سیگما)، EGF (۱۰ ng/ml ،سیگما)، bFGF (۲۰ ng/ml ، سیگما)، ITS (سیگما) و فاکتور رشد کبدی (HGF) با غلظت۵۰ ng/ml (R&D) قرار گرفتند. تیمار سلول‌ها برای دو هفته دوم مثل دوره آغازین ادامه یافت، با این تفاوت که به جای HGF از انکوستاتین M (سیگما- آلدریچ) با غلظت ۵۰ ng/ml استفاده گردید. تعویض محیط کشت سلول‌ها هر ۳ روز یک بار صورت گرفت.

جذب سلولی ایندوسیانین گرین (ICG):

پس از اتمام دوره تمایزی، برای تایید جذب سلولی ایندوسیانین گرین، از محیط کشت حاوی ICG (آکروز) با غلظت ۱ mg/ml استفاده شد به طوری که سلول‌ها به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در محیط کشت مذکور انکوبه شدند. به دنبال آن سلول‌ها سه بار با PBS ، مورد شستشو قرار گرفته و جذب سلولی ICG در آن‌ها با استفاده از میکروسکوپ معکوس مورد بررسی قرار گرفت(۱۷).

ارزیابی ایمونوفلورسنت (IF):

سلول‌ها پس از اتمام دوره القا، با محلول پارافرمالدئید ۴٪ در دمای اتاق به مدت ۲۰ دقیقه ثابت شدند. پس از مرحله مسدود کردن، توسط محلول حاوی ۰/۱٪ حجمی از تریتون X.۱۰۰ و ۱۰٪ حجمی از سرم بز به مدت ۴۵ دقیقه در دمای اتاق، انکوباسیون با آنتی‌بادی اولیه بر علیه آلبومین (R&D سیستم) صورت گرفت. سپس انکوباسیون سلول‌ها با آنتی‌بادی ثانویه کونژوگه با FITC (سانتاکروز) دنبال شد. در بین مراحل مختلف، سلول‌ها توسط PBS شستشو داده شدند. رده سلولی HepG2 که از بانک سلولی مؤسسه پاستور تهیه شده بود، به عنوان کنترل مثبت مورد استفاده قرار گرفت. پس از اتمام مراحل بالا، سلول‌ها با استفاده از میکروسکوپ معکوس فلورسنت مورد مطالعه قرار گرفتند.

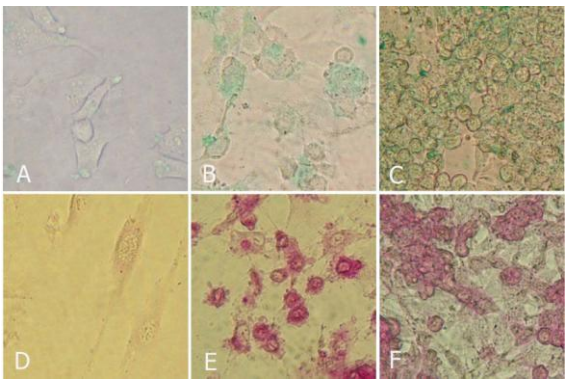
رنگ‌آمیزی پریودیک اسید شیف (PAS):

پس از اتمام دوره القا، سلول‌های فیکس شده با پریودیک اسید شیف ۱٪ به مدت ۵ دقیقه انکوبه شدند. سپس سلول‌ها با آب دیونیزه شستشو داده شده و با محلول شیف به مدت ۱۵ دقیقه انکوبه شدند. در نهایت شستشو با آب دیونیزه به مدت ۱۰ دقیقه انجام گرفت و نهایتاً با استفاده از میکروسکوپ، سلول‌ها مورد بررسی قرار گرفتند.

یافته ها

جذب سلولی ایندوسیانین گرین:

ابتدا میزان جذب ICG در رده سلولی HepG2 مورد بررسی قرار گرفت. واکنش بیشتر این سلول‌ها به این رنگ‌آمیزی مثبت بود ، در حالی که سلول‌های تمایز نیافته که به عنوان کنترل منفی به کار گرفته شدند واکنشی به این نوع از رنگ‌آمیزی نشان ندادند. پس از اتمام دوره تمایزی، بسیاری از سلول‌ها نسبت به این رنگ‌آمیزی واکنش مثبت نشان دادند(شکل ۱).



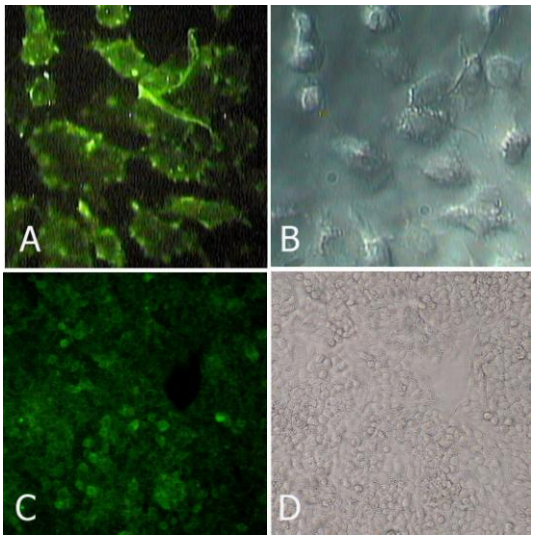
شکل ۱: عملکرد سلول‌های کبدی حاصل از تمایز با استفاده از روش رنگ‌آمیزی ایندوسیانین‌گرین مورد بررسی قرار گرفت(A-C). ذخیره گلیکوژن از طریق رنگ‌آمیزی پریودیک اسید شیف ارزیابی شد (D-F). ستون سمت چپ: سلول‌های تمایز نیافته (کنترل منفی)، ستون میانی: سلول‌های تمایز یافته، ستون سمت راست: HepG2 (کنترل مثبت).

رنگ‌آمیزی ایمونوفلورسنت برای آلبومین:

بیان مارکر آلبومین در سلول‌های تمایز یافته از طریق روش ایمونوفلورسنت به اثبات رسید. از سلول‌های HepG2 به عنوان کنترل مثبت استفاده گردید. پس از بررسی توسط میکروسکوپ فلورسنت، سیگنال‌های فلورسنت سبزی که دال بر مثبت بودن نتیجه آزمایش بود

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2025-07-02]

مشاهده گردید به طوری که مشابه نمونه کنترل مثبت، اکثر سلول‌ها به رنگ‌آمیزی ایمونوفلورسنت، واکنش مثبت نشان دادند(شکل ۲).



شکل ۲: بیان آلبومین از طریق انجام ایمونوسیتوشیمی در سلول‌های HepG2 و سلول‌های تمایز یافته تایید شد. تصاویر A و B مربوط به سلول‌های تمایز یافته و تصاویر C و D مربوط به سلول‌های کنترل مثبت HepG2 می‌باشند. ستون سمت چپ تصاویر فلورسنت و ستون سمت راست همان تصاویر را به صورت فاز کنتراست نشان می‌دهند.

بررسی ذخیره گلیکوژن از طریق رنگ‌آمیزی پریودیک اسید شیف:

نتایج حاصل از این رنگ‌آمیزی حاکی از ذخیره گلیکوژن در سلول‌های تمایز یافته بود. پس از گذشت ۱۰ دقیقه از اضافه کردن محلول شیف(بی‌رنگ) به سلول‌های کنترل مثبت و سلول‌های تمایز یافته، این محلول به رنگ ارغوانی در آمده و این در حالی است که در سلول‌های تمایز نیافته چنین واکنشی مشاهده نشد.

بحث

اگر چه از نظر بعضی از محققین، مغز استخوان به عنوان مهم‌ترین منبع سلول‌های بنیادی بالغ و مزانشیمی در نظر گرفته شده است، اما از بسیاری از بافت‌های دیگر نیز سلول‌های بنیادی مزانشیمی جداسازی شده‌اند که یکی از آن‌ها ورید بند ناف است(۱۸). اخیراً جداسازی سلول‌های بنیادی از دیواره این ورید با موفقیت انجام گرفته و بدین ترتیب مشخص شده که علاوه بر خون و ژله وارتون، یکی دیگر از منابع استخراج سلول‌های بنیادی از بند ناف انسان، دیواره ورید بند ناف است(۶، ۵). دسترسی به این گروه از سلول‌ها در مقایسه با مغز استخوان بسیار آسان‌تر است(۷). سلول‌های کبدی یکی از رده‌های سلولی مهم با کاربرد بالینی بالا بوده و مروری بر مطالعه‌های انجام شده نشان می‌دهد که تاکنون القای تمایز کبدی در رده‌های مختلفی از سلول‌های بنیادی از جمله سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از مغز استخوان، خون بندناف و هم چنین سلول‌های بنیادی جنینی انجام گرفته است(۲۱-۱۹). از آن جایی که سلول‌های مزانشیمی مشتق از جدار ورید بند ناف، یکی از منابع جدید سلول‌های بنیادی بوده و تا به حال گزارشی از ارزیابی توانایی این سلول‌ها به سلول‌های کبدی منتشر نشده است، در این مطالعه از سلول‌های بنیادی مذکور به عنوان منبعی جدید برای تمایز کبدی استفاده شد. در مطالعه حاضر علاوه بر تایید بیان آلبومین و تجمع گلیکوژن در سلول‌های کبدی حاصل از تمایز، ماهیت عملکردی این سلول‌ها نیز با استفاده از تایید توانایی آن‌ها در جذب سلولی ایندوسیانین گرین تایید شد.

ایندوسیانین گرین، یک آنیون ارگانیک است و چون یک ماده رنگی غیر سمی بوده و انحصاراً به وسیله سلول‌های کبدی جذب و حذف می‌شود، از نظر بالینی حایز اهمیت بوده و از توانایی جذب آن به وسیله سلول‌های کبدی، به عنوان یک روش تشخیصی مهم جهت ارزیابی عملکرد کبد استفاده می‌شود(۱۷). جذب سلولی ICG توسط سیستم انتقالی غیر وابسته به سدیم که در غشای باز ولترال سلول‌های کبدی واقع شده‌اند، صورت می‌گیرد(۱۲، ۱۱). اگرچه در ابتدا به نظر می‌رسید که پلی‌پپتید انتقال‌دهنده این آنیون ارگانیک، فقط منحصر به سلول‌های کبدی باشد، اما اخیراً مشخص شده که این پلی‌پپتید در سلول‌های مغز و کلیه نیز بیان می‌شود(۲۶-۲۲). یامادا و همکارانش در سال ۲۰۰۸ با انجام مطالعه‌ای که هدف اصلی آن ارزیابی جذب سلولی ایندوسیانین گرین در سلول‌های کبدی مشتق از سلول‌های بنیادی جنینی موش بود، نشان دادند که رنگ‌آمیزی ICG، روشی ساده و

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2025-07-02]

با کارآیی مناسب جهت تشخیص سلول‌های کبدی عملکردی می‌باشد(۱۷). آن‌ها برای اثبات تمایز کبدی در سلول‌های تحت تمایز، بیان شاخص‌های دیگر سلول‌های کبدی نظیر آلبومین را نیز بررسی و تایید کردند، سپس سلول‌های ICG مثبت را از طریق ورید پورت به کبد موش پیوند زده و توانستند که این سلول‌ها را در بافت کبد ردیابی کنند. به گونه‌ای که از نظر مورفولوژی کاملاً مشابه سلول‌های بافت میزبان بوده و به دلیل نشاندار بودن با پروتئین فلورسنت سبز، با استفاده از میکروسکوپ فلورسنت قابل تشخیص بودند. لذا از نقطه نظر عملکردی، نتایج آن‌ها بیانگر این بود که سلول‌های ICG مثبت و به تبع آن جذب سلولی ایندوسیانین گرین، روش مناسبی جهت ارزیابی عملکرد سلول‌های کبدی می‌باشد. بهاروند و همکاران نیز نشان دادند که سلول‌های شبه کبدی حاصل از تمایز سلول‌های بنیادی جنینی انسان در حالی که قادر به بیان مارکرهای اختصاصی متعدد سلول‌های کبدی می‌باشند، به میزان بالایی نیز قادر به جذب سلولی ایندوسیانین گرین هستند(۲۱). در این مطالعه؛ علاوه بر ارزیابی توانایی سلول‌ها در جذب ایندوسیانین گرین، جهت تایید بیشتر تمایز کبدی در آن‌ها، ذخیره گلیکوژن و نیز بیان پروتئین آلبومین مورد مطالعه قرار گرفت و نتایج این ارزیابی‌ها نیز مثبت بود. لذا نتایج این مطالعه از نقطه نظر جذب سلولی ایندوسیانین گرین، بیان آلبومین و تجمع گلیکوژن با مطالعه‌های قبلی هم‌خوانی دارد.

نتیجه‌گیری

آن چه از یافته‌های مطالعه حاضر می‌توان نتیجه گرفت این است که سلول‌های بنیادی مزانشیمی ورید بند ناف انسان تحت شرایط تمایزی مناسب، قادر به تمایز به سلول‌های کبدی بوده و از طرف دیگر جذب سلولی ایندوسیانین گرین به عنوان یک روش ساده و ارزان جهت تایید ماهیت کبدی سلول‌های حاصل از تمایز مناسب می‌باشد.

تشکر و قدردانی

این پژوهش در قالب پایان‌نامه دانشجویی و با مساعدت مالی دانشگاه‌های علوم پزشکی کردستان و رازی کرمانشاه انجام شد که بدین‌وسیله از حوزه معاونت پژوهشی این دو دانشگاه قدردانی می‌شود.

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2025-07-02]

References :

1- Tocci A, Forte L. Mesenchymal stem cells: use and perspectives. Hematol J 2003; 4(2): 92-6.
2- Minguell JJ, Erices A, Conget P. Mesenchymal stem cells. Exp Biol Med (Maywood) 2001; 226(6): 507-20.
3- Sanchez-Ramos JR. Neural cells derived from adult bone marrow and umbilical cord blood. J Neurosci Res 2002; 699(6): 880-93.
4- 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.
5- Romanov YA, Svintsitskaya VA, Smirnov VN. Searching for alternative sources of postnatal human mesenchymal stem cells: Candidate MSC-like cells from umbilical cord. Stem Cells 2003; 21(1): 105-10.
6- Covas DT, Siufi JL, Silva AR, Orellana MD. Isolation and culture of umbilical vein mesenchymal stem cells. Braz J Med Biol Res 2003; 36(9): 1179-83.
7- Panepucci RA, Siufi JL, Silva WA Jr, Proto-Siquiera R, Neder L, Orellana M, *et al*. Comparison of gene expression of umbilical cord vein and bone marrow-derived mesenchymal stem cells. Stem Cells 2004; 22(7): 1263-78.
8- 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(4): 175-84.
9- Jafari A, Fathi F, Mowla SJ, Gheisari Y. Expression of self renewal genes: Oct-4, Sox-2, Nanog, Nucleostemin, Bmi-1, Sox-9 of human umbilical cord vein mesenchymal stem cell. Sci J Iran Blood Transfus Org 2008; 4(4): 275-86.
10- Kermani AJ, Fathi F, Mowla SJ. Characterization and genetic manipulation of human umbilical cord vein mesenchymal stem cells: potential application in cell-based gene therapy. Rejuvenation Res 2008; 11(2): 379-86.
11- Meier PJ, Eckhardt U, Schroeder A, Hagenbuch B, Stieger B. Substrate specificity of sinusoidal bile acid and organic anion uptake systems in rat and human liver. Hepatology 1997; 26(6): 1667-77.
12- Müller M, Jansen PL. The secretory function of the liver: new aspects of hepatobiliary transport. J Hepatol 1998; 28(2): 344-54.
13- Branch RA. Drugs as indicators of hepatic function. Hepatology 1982; 2(1): 97-105.
14- Berk PD, Stremmel W. Hepatocellular uptake of organic anions. Prog Liver Dis 1986; 8: 125-44.
15- Meijer DK, Weert B, Vermeer GA. Pharmacokinetics of biliary excretion in man. VI. Indocyanine green. Eur J Clin Pharmacol 1988; 35(3): 295-303.
16- Shinohara H, Tanaka A, Kitai T, Yanabu N, Inomoto T, Satoh S, *et al*. Direct measurement of hepatic indocyanine green clearance with near-infrared spectroscopy: separate evaluation of uptake and removal. Hepatology 1996; 23(1): 137-44.
17- Yamada T, Yoshikawa M, Kanda S, Kato Y, Nakajima Y, Ishizaka S, *et al. In Vitro* Differentiation of Embryonic Stem Cells into Hepatocyte-Like Cells Identified by Cellular Uptake of Indocyanine Green. Stem Cells 2002; 20(2): 146-54.
18- Friedenstein AJ, Deriglasova UF, Kulagina NN, Panasuk AF, Rudakowa SF, Luriá EA, *et al.* Precursors for fibroblast in different populations of hematopoietic cells as detected by the *in vitro* colony assay method. Exp Hematol 1974; 2(2): 83-92.
19- Lee KD, Kuo TK, Whang-Peng J, Chung YF, Lin CT, Chou SH, *et al*. *In vitro* hepatic differentiation of human mesenchymal stem cells. Hepatology 2004; 40(6): 1275-84.
20- Hong SH, Gang EJ, Jeong JA, Ahn C, Hwang SH, Yang IH, *et al*. *In vitro* differentiation of human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells into hepatocyte-like cells. Biochem Biophys Res Commun 2005; 330(4): 1153-61.
21- Baharvand H, Hashemi SM, Kazemi Ashtiani S, Farrokhi A. Differentiation of human embryonic stem cells into hepatocytes in 2D and 3D culture systems *in vitro*. Int J Dev Biol 2006; 50(7): 645-52.
22- Kullak-Ublick GA, Hagenbuch B, Stieger B, Wolkoff AW, Meier PJ. Functional characterization of the basolateral rat liver organic anion transporting polypeptide. Hepatology 1994; 20(2): 411-6.
23- Jacquemin E, Hagenbuch B, Stieger B, Wolkoff AW, Meier PJ. Expression cloning of a rat liver Na(+)-independent organic anion transporter. Proc Natl Acad Sci U S A 1994; 91(1): 133-7.
24- Kullak-Ublick GA, Hagenbuch B, Stieger B, Schteingart CD, Hofmann AF, Wolkoff AW, *et al*. Molecular and functional characterization of an organic anion transporting polypeptide cloned from human liver. Gastroenterology 1995; 109(4): 1274-82.
25- Noé B, Hagenbuch B, Stieger B, Meier PJ. Isolation of a multispecific organic anion and cardiac glycoside transporter from rat brain. Proc Natl Acad Sci U S A 1997; 94(19): 10346-50.
26- Abe T, Kakyo M, Sakagami H, Tokui T, Nishio T, Tanemoto M, *et al*. Molecular characterization and tissue distribution of a new organic anion transporter subtype (oatp3) that transports thyroid hormones and taurocholate and comparison with oatp2. J Biol Chem 1998; 273(35): 22395-401.

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2025-07-02]

Original Article

In vitro differentiation of human umbilical vein mesenchymal stem cells into hepatocyte-like cells identified by cellular uptake of indocyanine green

Raufi A.[1], Amini A.[1], Azadbakht M.[1], Aboozari M.[2], Fathi F.[3]

[1]The Faculty of Sciences, Razi University, Kermanshah, Iran
[2]Kurdistan Digestive Research Center, Faculty of Medicine, Kurdistan University of Medical Sciences, Sanandaj, Iran
[3]Kurdistan Center for Cellular and Molecular Research, Faculty of Medicine, Kurdistan University of Medical Sciences, Sanandaj, Iran

Abstract

Background and Objectives

Umbilical cord is one of the major sources of mesenchymal stem cells. In this study, the differentiative potential of human umbilical vein mesenchymal stem cells into hepatocyte-like cells has been investigated by cellular uptake of indocyanine green.

Materials and Methods

Human umbilical vein mesenchymal stem cells (UVMSCs) were incubated for 2 weeks in the medium containing hepatocyte growth factor; they were also treated with the medium containing oncostatin M for another 2 weeks. The differentiated cells were analyzed by uptake of indocyanine green (ICG), immunofluorescence analysis, and periodic acid-Schiff (PAS) staining.

Results

The differentiating cells showed transition from bipolar fibroblast-like morphology to round or oval shape. Cellular uptake of ICG was detected in differentiated cells. Glycogen storage was determined by PAS staining in differentiated cells which were immunoreactive to albumin.

Conclusions

Based on these observations, we can conclude that UVMSCs are able to differentiate into hepatocyte-like cells *in vitro* and ICG-staining is a useful marker to identify differentiated hepatocytes from human umbilical vein mesenchymal stem cells.

Keywords: Cell Differentiation, Umbilical Veins, Mesenchymal Stem Cells, Hepatocytes, Indocyanine Green
Sci J Iran Blood Transfus Org 2010; 7(1): 34-40

Received: 21 Jul 2009
Accepted: 27 Feb 2010

Correspondence: Fathi F., PhD of Anatomy. Associate Professor of Cellular and Molecular Research Center, Kurdistan University of Medical Sciences.
P.O.Box: 66177-13446, Sanandaj, Iran. Tel: (+98871) 6661830; Fax : (+98871) 6660051
E-mail: *farfath@yahoo.com*

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2025-07-02]