خون
فصلنامه پژوهشی
دوره ۸ شماره ۲ تابستان ۹۰ (۸۷-۷۹)
مقاله پژوهشی

تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی ورید بند ناف انسانی به سلول‌های شبه کبدی در محیط آزمایشگاهی

آزاده رئوفی[۱]، علی امینی[۲]، مهری آزادبخت[۳]، بهرام نیکخو[۴]، مرتضی ابوذری[۵]، فردین فتحی[۶]

چکیده

سابقه و هدف

سلول‌های بنیادی مزانشیمی جدار ورید بند ناف انسانی، به عنوان سلول‌های چند توان، اخیراً جداسازی شده و پتانسیل تمایزی آن‌ها به سلول‌های مختلفی نظیر سلول‌های عصبی و قلبی بررسی شده است. در این مطالعه، توانایی سلول‌های بنیادی مزانشیمی ورید بند ناف در تمایز به سلول‌های کبدی با تمرکز بر پروفایل بیان ژن‌های اختصاصی کبد ارزیابی شد.

مواد و روش‌ها

در یک مطالعه تجربی، سلول‌های بنیادی مزانشیمی جدار ورید بندناف انسان پس از جداسازی به مدت یک ماه با استفاده از یک روش دو مرحله‌ای‌تحت تیمار با فاکتورهای القایی نظیر فاکتور رشد کبدی و انکوستاتین M قرار گرفتند. سپس بیان ژن‌های اختصاصی سلول‌های کبدی از طریق روش RT-PCR و ایمونوسیتوشیمی مورد بررسی قرار گرفت.

یافته‌ها

پس از تیمار سلول‌ها با فاکتورهای القایی، تغییر شکل سلول‌ها از حالت فیبروبلاستی و دو قطبی به فرم اپیتلیال و چند وجهی مشاهده گردید. بیان یا افزایش بیان ژن‌های اختصاصی سلول‌های کبدی نظیر CK8 ، CK18 ، HNF3β ، c-Met ، AFP، TTR ، G6P، Transthyretin و ALB در طول دوره القایی تایید شد. هم چنین واکنش سلول‌ها به آنتی‌بادی بر علیه آنتی‌ژن سیتوکراتین ۱۸ در سلول‌های تمایز یافته مثبت بود.

نتیجه گیری

با توجه به داده‌های کسب شده، می‌توان نتیجه گرفت که سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از جدار ورید بند-ناف، توانایی تمایز به سلول‌های شبه کبدی را دارا می‌باشند.

کلمات کلیدی: وریدهای بند ناف، سلول‌های بنیادی مزانشیمی، فاکتور رشد کبدی، انکوستاتین M

تاریخ دریافت: ۸۹/۹/۸
تاریخ پذیرش: ۸۹/۱۱/۲۶

۱ـ کارشناس ارشد بیولوژی ـ دانشکده علوم پایه ـ دانشگاه رازی کرمانشاه
۲- PhD آناتومی ـ دانشیار دانشکده علوم پایه ـ دانشگاه رازی کرمانشاه
۳ـ PhD آناتومی ـ استادیار دانشکده علوم پایه ـ دانشگاه رازی کرمانشاه
۴ـ متخصص پاتولوژی ـ استادیار مرکز تحقیقات علوم سلولی و مولکولی ـ دانشگاه علوم پزشکی کردستان ـ سنندج
۵ـ دانشجوی PhD آناتومی ـ دانشگاه علوم پزشکی کردستان ـ سنندج
۶ـ مؤلف مسؤول: PhD آناتومی ـ دانشیار مرکز تحقیقات علوم سلولی و مولکولی دانشگاه علوم پزشکی کردستان ـ سنندج ـ صندوق پستی: ۱۳۴۴۶-۶۶۱۷۷

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-11-21]

مقدمه

علاوه بر مغز استخوان، بسیاری از ارگان‌ها با منشاء مزودرمی نظیر خون جنین نیز حاوی سلول‌های مزانشیمی می‌باشند. این سلول‌ها همراه با سلول‌های بنیادی خون‌ساز، در حال گردش هستند(۱). خون بند ناف در اواسط حاملگی سرشار از سلول‌های مزانشیمی پرتوان می‌باشد. این سلول‌ها پس از ترک جریان خون، لانه‌گزینی کرده و بسیاری از آن‌ها در استرومای جفت و بندناف جای می‌گیرند(۲).

هم چنین نتایج مطالعه‌ها وجود سلول‌های مزانشیمی در خون بند ناف نوزاد تولد یافته را به یک موضوع بحث انگیز بدل کرده است. وکسلر و همکاران نشان دادند که خون بند ناف و خون محیطی فاقد سلول‌های مزانشیمی هستند(۳).از طرف دیگر تکثیر سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از مغز استخوان و پیوند آن به بافت‌های بدن با محدودیت‌هایی هم چون ابتلا به عفونت‌های ویروسی، کاهش قدرت تکثیری و کاهش قدرت تمایزی با افزایش سن، همراه می‌باشد(۲).

وجود این مشکلات، استفاده از مغز استخوان را به عنوان یک منبع ایده‌آل از سلول‌های بنیادی برای درمان محدود می‌کند. بنابراین محققان همواره به دنبال منابع مناسب‌تری جهت جداسازی سلول‌های بنیادی مزانشیمی می‌باشند. در همین راستا، رومانوف و همکاران و نیز کواس و همکاران در سال ۲۰۰۳، موفق به تخلیص سلول‌های مزانشیمی از لایه اندوتلیال و ساب‌اندوتلیال سیاهرگ بند ناف نوزاد تازه تولد یافته شدند(۴، ۲). این سلول‌ها همان ویژگی‌های سلول‌های مزانشیمی استخراج شده از مغز استخوان را نشان دادند. تاکنون تمایز این سلول‌ها به سلول‌های چربی، استخوانی، غضروفی و عصبی و نیز بررسی پروفایل بیان ژن‌های خودبازسازی در آن‌ها بررسی شده است(۶، ۵).

در مطالعه‌های درمان بر پایه انتقال سلول‌های بنیادی، کبد به عنوان یک ارگان هدف همواره مطرح بوده است. اگر چه کبد اندامی با خاصیت تکثیری بالا است ولی بسیاری از بیماری‌ها منجر به حذف این توانایی در کبد می‌شوند. اخیراً تمایل زیادی برای ایجاد هپاتوسیت‌های بالغ از سلول‌های بنیادی و به کارگیری آن‌ها در درمان بیماری‌های متابولیک کبدی ایجاد شده است(۷). بر این اساس، تمایز کبدی در انواعی از سلول‌های بنیادی از جمله سلول‌های بنیادی جنینی، سلول‌های بنیادی خون بند ناف و مغز استخوان و سلول‌های بنیادی خونساز مورد بررسی قرار گرفته است(۱۱-۸). در این مطالعه فرآیند تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی ورید بند ناف انسانی به سلول‌های کبدی با انجام ارزیابی‌های ایمونوسیتوشیمی و PCR بررسی شد.

مواد و روش‌ها

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

مطالعه انجام شده 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(۶). به طور خلاصه بند ناف نوزاد تازه متولد شده در بافر HBSS (Hank's Buffered Salt Solution) 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 و بند ناف به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. با تزریق محیط کشت به درون ورید، سلول‌های بنیادی مزانشیمی از ورید بندناف استخراج گردیدند(۶). سلول‌های استخراج شده، در محیط کشت DMEM-LG (Dulbecco's modified Eagle's medium – Low Glucose)(گیبکو) حاوی ۱۵٪ از FBS (Fetal Bovine Serum)(گیبکو) ، ۱۰ng/ml از EGF (Epidermal Growth Factor)(سیگما-آلدریچ) و ۲۰ ng/ml از bFGF (Basic Fibroblast Growth Factor)(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 مورد تعویض قرار گرفت. برای القای تمایز کبدی در سلول‌های بنیادی مزانشیمی ورید بند ناف انسانی، از یک دستور عمل

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-11-21]

دو مرحله‌ای به مدت ۴ هفته استفاده شد. تعداد ۳۰۰۰۰ سلول به هر کدام از خانه‌های پلیت ۴ خانه پوشش داده شده با فیبرونکتین، اضافه شده و پس از رسیدن تراکم آن‌ها به حدود ۷۰٪، تحت فرآیند القای تمایز قرار گرفتند. برای دو هفته نخست، سلول‌ها در محیط کشت DMEM-LG حاوی ۱۵٪ از FBS ، تحت تیمار با ۰/۵ میکرو مولار از دگزامتازون(سیگما- آلدریچ)، (Insulin, transferrin, ITS (sodium-selenite (سیگما) و فاکتور رشد کبدی(HGF) با غلظت ng/ml ۵۰ (R&D سیستم) واقع شدند. تیمار سلول‌ها برای دو هفته دوم مثل دوره آغازین ادامه یافت با این تفاوت که به منظور بلوغ سلول‌های در حال تمایز، به جای HGF (Hepatocyte Growth Factor) از OSM (Oncostatin M)(سیگما) با غلظت ng/ml ۵۰ استفاده گردید. تعویض محیط سلول‌ها هر ۳ روز یک بار صورت گرفت.

استخراج RNA کل و RT-PCR:

RNA کل از سلول‌های تحت القا در هفته‌های تمایزی اول، دوم، سوم، چهارم و رده سلولی HepG2 ، به عنوان کنترل مثبت، طبق دستورالعمل پیشنهادی شرکت سیناژن استخراج گردید. پس از بررسی کمی و کیفی RNA استخراج شده از طریق دو روش UV اسپکتروفتومتری و ژل الکتروفورز، cDNA مورد نیاز برای واکنش PCR با استفاده از کیت مخصوص (کیت بیونیر) تهیه گردید.

شرایط واکنش PCR طبق دستورالعمل زیر انجام گرفت:

دناتوراسیون	۹۴ ºC	۴۵ ثانیه
آنیلینگ	۵۸ ºC	۴۵ ثانیه
اکستنشن	۷۲ ºC	۵۸ ثانیه
اکستنشن نهایی	۷۲ ºC	۱۰ دقیقه

از ژن β2m به عنوان کنترل داخلی استفاده شد. آغازگرهای مورد استفاده برای این واکنش به وسیله نرم‌افزار Gene Runer طراحی شده و از شرکت سیناژن تهیه شد(جدول ۱). محصولات واکنش PCR بر روی ژل آگارز ۱٪ از هم جدا شده و به دنبال آن رنگ‌آمیزی با اتیدیوم بروماید و عکسبرداری از ژل با استفاده از ترانس لومیناسیون ماوراء بنفش(Uvidoc, UK) انجام گرفت.

ارزیابی ایمونوفلورسنت:

سلول‌ها پس از اتمام دوره القا، در آخر هفته چهارم 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.100 و ۱۰٪ حجمی از

جدول ۱: مشخصات آغازگرهای طراحی شده برای بررسی بیان ژن‌های خاص سلول‌های کبدی

ردیف	نام آغازگر	توالی آغازگر	طول قطعه حاصل (bp)
۱	Alpha-fetoprotein	R: GCCAAAGTGAAGAGGGAAGAC F: GCAGACAATCCAGCACATCTC	۴۹۴
۲	Albumin	R: TCAAGTGTGCCAGTCTCCAA F: TGGCAAGTCTCAGCAGCA	۴۵۹
۳	Cytokeratin-18	R: ACAGTCTGCTGAGGTTGGA CAGACACCACTTTGCCATC F:	۴۱۲
۴	Beta-2 microglobulin	R:CACGGCAGGCATACTCATC F:GTTTCATCCATCCGACATTG	۱۹۹
۵	Mesenchymal-epithelial transition factor (c-met)	R:TGTGTTGTCCCGTGGCCATTTG F:TGCGATCGGAGGAATGCCTGAG	۳۰۷
۶	Hepatocyte nuclear factor 3 β	R:TGCAACACCGTCTCCCCAAAGT F:CCACCACCAACCCCACAAAATG	۲۹۴
۷	Transthyretin	R:GTGACGACAGCCGTGGTGGAA F:GGTGAATCCAAGTGTCCTCTGAT	۳۵۲
۸	Glucose-6-phosphatase	R:GCAGAAGGACAAGACGTAGAA GA F: GCTGAATGTCTGTCTGTCACGAA	۴۹۴
۹	Cytokeratin-8	R: TGCCTCTACCATGTCCATCA F: TGGTCTCCAGCATCTTGTTCT	۳۷۴

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-11-21]

سرم بز در دمای اتاق به مدت ۴۵ دقیقه، انکوباسیون با آنتی‌بادی اولیه بر علیه سیتوکراتین ۱۸ (۱:۵۰، سانتاکروز بیوتکنولوژی) صورت گرفت. مرحله بعدی از این رنگ‌آمیزی با انکوباسیون سلول‌ها توسط آنتی‌بادی ثانویه کونژوگه با تگزاس رد (۱:۱۰۰، سانتاکروز بیوتکنولوژی) دنبال شد. در بین مراحل مختلف، سلول‌ها توسط PBS (Phosphate Buffer Saline) تحت شستشو قرار گرفتند. رده سلولی HepG2 به عنوان کنترل مثبت مورد استفاده قرار گرفت. پس از اتمام مراحل بالا، سلول‌ها به وسیله میکروسکوپ فلورسنت معکوس (Nikon-TE300) مورد مطالعه قرار گرفتند.

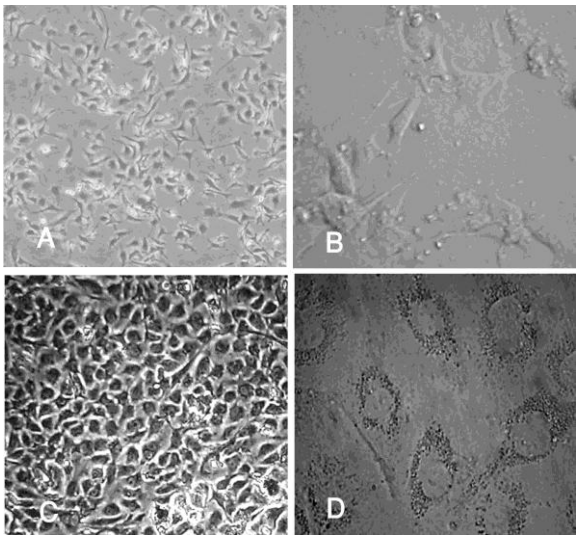
یافته‌ها

ارزیابی مورفولوژیک سلول‌های تمایزیافته:

به تدریج تغییر در فنوتیپ سلول‌ها مشاهده گردید و این تغییر با گذشت زمان افزایش یافت. سلول‌ها شروع به جمع کردن زوائد خود کرده و حالت چند وجهی در آن‌ها نمایان شد. به عبارت دیگر می‌توان گفت که سلول‌ها یک تغییر مورفولوژیک را از حالت فیبروبلاستی به حالت اپیتلیالی نشان دادند. این حالت بیشتر در مکان‌هایی با تراکم بالای سلولی قابل مشاهده بود. بررسی با بزرگ‌نمایی بیشتر، نشان داد که هسته سلول‌ها بزرگتر و سیتوپلاسم آن‌ها سرشار از واکوئل‌های کوچک، شده است(شکل ۱).

بررسی بیان ژن‌های خاص سلول کبدی از طریق روش RT-PCR:

در مطالعه حاضر، نمونه‌های RNA از سلول‌های تحت تیمار در هفته‌های اول، دوم، سوم و چهارم، رده سلولی HepG2 و سلول‌های بنیادی مزانشیمی ورید بند ناف انسانی استخراج گردید. تعداد سلول‌ها و به دنبال آن میزان RNA تخلیص شده از آن‌ها در نمونه‌های کنترل مثبت، تمایز نیافته و تمایز یافته به طور تقریبی برابر در نظر گرفته شد. پس از بررسی‌های کمی و کیفی روی RNA استخراج شده، واکنش رونویسی معکوس و به دنبال آن واکنش PCR با استفاده از آغازگرهای طراحی شده برای هر ژن صورت گرفت. بررسی‌های انجام شده نشان داد که ژن‌های CK8 ، CK18 و HNF3β علاوه بر سلول‌های تمایز



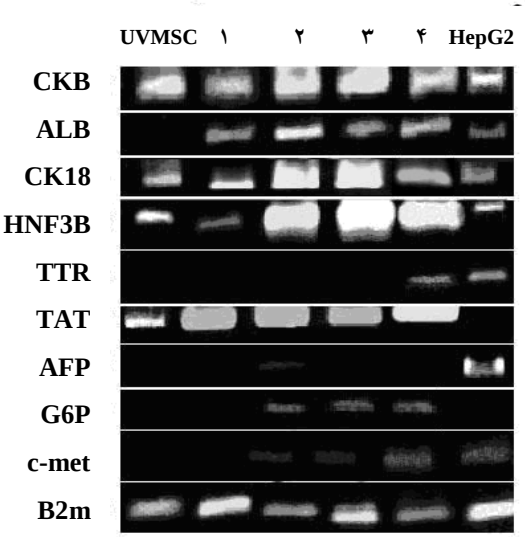
شکل ۱ : ظهور فنوتیپ شبه کبدی در اثر اضافه کردن فاکتورهای القایی قابل مشاهده است. شکل A وB نشان‌دهنده سلول‌های بنیادی مزانشیمی ورید بند ناف قبل از القای تمایز کبدی است. شکل C و D سلول‌ها را ۴۸ ساعت بعد از شروع القای تمایزکبدی نشان می‌دهد. ستون سمت راست با بزرگ‌نمایی(X ۴۰۰) و ستون سمت چپ با بزرگ‌نمایی(X ۱۰۰).

یافته، در سلول‌های بنیادی مزانشیمی ورید بند ناف انسانی تمایز نیافته نیز بیان می‌شوند در حالی که ژن‌های Met ، AFP ، TTR و ALB در سلول‌های تمایز نیافته بیان نشده و فقط در سلول‌های تحت تیمار در هفته‌های مختلف تمایزی بیان می‌شوند(شکل ۲). بیان ژن B2m که به عنوان کنترل داخلی استفاده شده بود در تمام سلول‌ها و روزهای مختلف آزمایش مشاهده گردید.

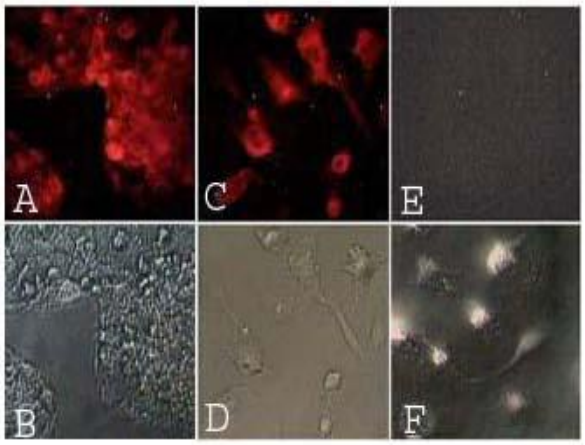
بررسی بیان مارکر CK18 از طریق روش ایمونوفلورسنت :

بیان مارکر CK18 در سلول‌های تمایز یافته از طریق روش ایمونوفلورسنت نیز به اثبات رسید. از رده سلولی HepG2 به عنوان کنترل مثبت استفاده گردید. برای نمونه‌های کنترل منفی، کلیه شرایط مشابه نمونه اصلی بوده با این تفاوت که آنتی‌بادی اولیه استفاده نگردید. پس از بررسی توسط میکروسکوپ فلورسنت در نمونه‌های اصلی و نمونه‌های کنترل مثبت، مشخص شد که واکنش این سلول‌ها به آنتی‌بادی بر علیه مارکر CK18 مثبت است.

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-11-21]



شکل ۲: بیان ژن‌های خاص سلول کبدی در سلول‌های تحت تیمار[هفته‌های اول(۱)، دوم(۲)، سوم(۳) و چهارم(۴)] با استفاده از روش RT-PCR مورد بررسی قرار گرفت. سلول‌های تمایز نیافته (UVMSC) به عنوان کنترل منفی در نظر گرفته شدند. سلول‌های HepG2 به عنوان کنترل مثبت مورد استفاده قرار گرفتند.



شکل۳: بیان مارکر CK18 از طریق روش ایمونوفلورسنت در سلول‌های HepG2 و سلول‌های تمایز یافته مورد بررسی قرار گرفت. تصاویر A, C, E تصاویر فلورسنت و به ترتیب مربوط به سلول‌های کنترل مثبت، سلول‌های تمایز یافته و نمونه کنترل منفی واکنش ایمونوفلورسنت می‌باشند. به نمونه کنترل منفی آنتی‌بادی اولیه اضافه نشد و لذا فاقد سیگنال فلورسنت است. تصاویر B, D, F به ترتیب تصاویر فازکنتراست مربوط به تصاویر A, C, E می‌باشند.

قابل ذکر است که نتیجه واکنش ایمونوفلورسنت در نمونه‌های کنترل منفی، منفی بود (شکل ۳).

بحث

جعفری و همکاران اخیراً سلول‌های بنیادی مزانشیمی را از جدار ورید بند ناف جداسازی و علاوه بر تمایز آن‌ها به سلول‌های عصبی، پروفایل بیان ژن‌های خود بازسازی متعددی نظیر Nucleostemin، Nanog،Oct-4 و Bmi-1 را در آن‌ها بررسی کرده‌اند(۱۲، ۶). در این مطالعه توانایی تمایزی سلول‌های مذکور به سلول‌های کبدی بررسی شده و ماهیت کبدی سلول‌های تمایز یافته با انجام ارزیابی‌های سلولی و مولکولی تایید شد. در طی یک بررسی اولیه، روش‌های مختلفی جهت القای تمایز کبدی در سلول‌ها به کار گرفته شدند و نهایتاً روش تمایزی دو مرحله‌ای هُنگ و همکاران، با کمی تغییر به عنوان مناسب‌ترین روش انتخاب گردید(۹). در مورد فاکتور رشد کبدی که شاید مهم‌ترین عامل القایی در تمایز سلول‌های کبدی باشد، غلظت مورد استفاده مشابه مطالعه هنگ و همکاران ۵۰ نانوگرم بود. اگر چه در سایر مطالعه‌ها معمولاً از غلظت‌های پایین‌تری نظیر۲۰ و ۳۰ نانوگرم جهت تمایز سلول‌های کبدی استفاده شده است اما ارزیابی‌های اولیه ما در استفاده از غلظت‌های مذکور جهت تمایز، بیانگر ناکافی بودن این غلظت‌ها در القای تمایز بود. اوکوموتو و همکاران نشان دادند که با افزایش غلظت فاکتور رشد کبدی از ۲۰ نانوگرم به حدود ۱۰۰۰ نانوگرم در میلی‌لیتر، درصد سلول‌های کبدی حاصل از تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی رت افزایش می‌یابد(۱۳). در این مطالعه ابتدا سعی شد سلول‌ها بر روی ظروف مخصوص کشت سلول و عاری از هر نوع پوششی، مانند فیبرونکتین، کشت داده شوند و سپس تحت القای تمایز کبدی قرار گیرند اما بعد از گذشت چند روز، سلول‌ها از کف دیش‌ها کنده شده به طوری که ادامه فرآیند القای تمایز ناممکن می‌نمود، این مشکل بعد از انتقال سلول‌ها به ظروف پوشش داده شده با فیبرونکتین مرتفع شد. نقش ماتریکس برون سلولی که یکی از اجزای آن فیبرونکتین می‌باشد در چسبندگی، القای تمایز و نیز حفظ وضعیت تمایز یافتگی هپاتوسیت‌ها قبلاً گزارش شده است(۱۶-۱۴). ژن‌های مورد بررسی در این

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-11-21]

مطالعه از جمله مهم‌ترین ژن‌های درگیر در فرآیند تکوین کبد می‌باشند. در میان فاکتورهای درگیر در تکوین کبدی، فاکتور رشد فیبروبلاستی از مزودرم قلبی، در مرحله نخستین تکوین کبد نقش دارد(۱۸، ۱۷). در مرحله بعدی، انکوستاتین M یکی از اعضای سیتوکینی خانواده اینترلوکین-۶، باعث گذر از مرحله میدفتال به مرحله نئوناتال می‌شود(۱۹). در این مرحله از تکوین کبدی، این سیتوکین توسط سلول‌های خونساز ساخته می‌شود(۲۰).

در بسیاری از مطالعه‌های انجام شده در زمینه تمایز هپاتوژنیک سلول‌های بنیادی، بررسی بیان ژن آلبومین بسیار مورد توجه قرار گرفته است(۱۰-۸). در مطالعه حاضر نیز بیان این ژن در طول دوره القایی، مورد بررسی قرار گرفت و مشاهده بیان آن یکی از دلایل تایید تمایز کبدی سلول‌های مورد استفاده در این مطالعه است.

سیتوکراتین(CK) از نوع فیلامنت‌های حد واسط بوده که در اسکلت سلولی بافت‌های اپیتلیال یافت می‌گردد(۲۱). CK-18 در سلول های کبدی بالغ تولید می‌شود. در این مطالعه، بیان ژن سیتوکراتین به عنوان یکی از مارکرهای تمایز کبدی مورد بررسی قرار گرفت. بیان این ژن در سلول‌های تمایز نیافته بنیادی ورید بندناف به مقدار کمی مشاهده شد اما در طی دوره تمایز، بیان آن به تدریج افزایش یافت. این افزایش می‌تواند بیانگر اثر تمایزی فاکتورهای القایی به کار گرفته شده در این مطالعه باشد.

AFP (Alpha Fetoprotein) یک مارکر کبدی جنینی بوده و میزان بیان آن با تکوین کبد کاهش می‌یابد(۲۲). تکثیر و تمایز هپاتوسیت‌ها تحت تاثیر بسیاری از سیگنال‌های خارج سلولی هم چون هورمون‌ها و سیتوکین‌ها قرار دارد. در کبد جنین، غلظت فیزیولوژیکی دگزامتازون(یک گلوکوکورتیکوئید سنتزی)، تولید AFP و ساخت DNA را سرکوب می‌کند(۲۴، ۲۳). در بسیاری از مطالعه‌های انجام شده برای تمایز انواع سلول‌های بنیادی به دودمان سلول کبدی، AFP به عنوان یک مارکر ابتدایی کبدی مد نظر بوده است. در این پژوهش، بررسی‌های انجام شده توسط روش RT-PCR نشان داد که میزان بیان AFP در طول تمایز تغییر چندانی نداشته است و حتی پس از انجام PCR مجدد با استفاده از محصول PCR ، بیانی از این ژن مشاهده نگردید. تنها پاسخ مشاهده شده برای بیان این ژن، در هفته دوم از شروع دوره تیمار سلول‌ها با غلظت ۲۵ ng/ml از فاکتورهای القایی بود.

در پژوهش حاضر، بیان ژن TTR نیز مورد بررسی قرار گرفت. پس از گذشت چهار هفته از شروع تمایز، بیان آن به صورت بسیار ضعیف مشاهده گردید. این ژن دارای نقاط اتصالی برای بسیاری از فاکتورهای رونویسی هم چون HNF-1 و C/EBP می‌باشد(۲۶، ۲۵). در این پژوهش، بیان فاکتور رونویسی HNF3β به عنوان یکی از فاکتورهای تمایزی که در تمام انواع پیش‌سازهای کبدی بیان می‌شود، مشاهده شد و هم چنین بیان کم آن در سلول‌های تمایز نیافته و بیان آن در دودمان سلولی HepG2 تایید شد(۲۷). HNF3β در بسیاری از بافت‌ها بیان گشته و به ناحیه تنظیمی ژن‌هایی هم چون آلبومین متصل می‌گردد ولی به تنهایی قادر به القای بیان این ژن نمی‌باشد.

از دیگر ژن‌های مورد بررسی G6P است. فعالیت این ژن، در هنگام تولد افزایش یافته و در واقع این رویداد هم زمان با استقلال موجود از نظر تولید گلوکز می‌باشد(۲۸). افزایش در فعالیت G6P، هم‌زمان با افزایش در غلظت mRNA آن است(۲۹). بیان این ژن در طول دوره القا، نشان‌دهنده اثر تمایزی فاکتورهای HGF و OSM به همراه Dex و ITS ، بر روی سلول‌های بنیادی مزانشیمی ورید بندناف انسانی است. اولین گام در شروع اثرات فاکتور رشد کبدی، وابسته به اتصال آن به یک گیرنده سطح سلولی به نام MET است. این پروتئین توسط پروتوانکوژن c-met کد می‌شود(۳۰). با توجه به این که HGF اثر تمایزی خود را از طریق مولکول گیرنده خود به انجام می‌رساند، لذا بیان c-met به عنوان یکی از مارکرهای تمایز کبدی محسوب می‌گردد. در این پژوهش، بررسی بیان ژن met به عنوان یکی از مارکرهای خاص سلول کبدی در نظر گرفته شد. این ژن در هفته‌های سوم و چهارم بیان بسیار ضعیفی نشان داد. بیان این ژن در سلول‌های کنترل مثبت نیز به صورت بسیار ضعیفی مشاهده گردید.

مقایسه پروفایل بیان بعضی از ژن‌های مورد بررسی در این مطالعه با مطالعه انجام شده توسط هنگ و همکاران

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-11-21]

که سلول‌های مشتق از خون بند ناف را با روش تقریباً مشابهی به سلول‌های کبدی تمایز دادند، نشان می‌دهد که در این مطالعه نیز همانند مطالعه مذکور، بیان ژن‌های آلبومین و سیتوکراتین ۱۸ در هفته‌های اول تا چهارم به شکل افزایشی دیده می‌شود. بیان ژن TAT در این مطالعه در کل دوره آزمایش و حتی به میزان کمتری در سلول‌های تمایز نیافته مشاهده شد در حالی که در مطالعه محققین مذکور، فقط در هفته‌های سوم و چهارم مشاهده گردید. بیان ژن c-met در این مطالعه در هفته‌های دوم تا چهارم مشاهده شد در حالی که در مطالعه هنگ و همکاران، فقط در هفته‌های سوم و چهارم مشاهده گردید(۹). در این مطالعه بیان ژن AFP فقط در هفته دوم(روز چهارم) دیده شد در حالی که در مطالعه ایشان در پایان هر چهار هفته آزمایش مشاهده گردید. ژن‌های TAT ، CK-8 و G6P که در این مطالعه بررسی شدند، توسط محققین مذکور بررسی نشدند. هم چنین لی و همکاران، سلول‌های مزانشیمی مغز استخوان انسان را به سلول‌های کبدی تمایز دادند و در روزهای ۱۴ و ۲۸ از انجام آزمایش، بیان بعضی از ژن‌های کبدی را بررسی کردند، مقایسه نتایج این مطالعه با مطالعه ایشان نشان می‌دهد که بیان ALB ، سیتوکراتین ۱۸ و G6P در روزهای ۱۴ و ۲۸ در هر دو مطالعه دیده می‌شود در حالی که بیان ژن TAT در مطالعه ایشان در روز ۲۸ اما در این مطالعه در پایان هر چهار هفته از آزمایش دیده شد و نیز ژن AFP در این مطالعه فقط در روز ۱۴ اما در مطالعه ایشان در هر دو روزهای ۱۴ و ۲۸ دیده شد. لی و همکاران هم از یک روش دو مرحله‌ای و غلظت ۲۰ نانوگرم از HGF استفاده کردند و محیط تمایزی آن‌ها فاقد سرم بود در حالی که در این مطالعه همانند مطالعه هنگ و همکاران، از غلظت ۵۰ نانوگرم از HGF و ۱۰ درصد سرم در محیط تمایزی استفاده شد(۱۰). لذا تفاوتی که در نتایج حاصل از این مطالعه با دو مطالعه مذکور وجود دارد، ممکن است علاوه بر منشاء جداسازی سلول‌های بنیادی، به تفاوت در شرایط تمایزی آن‌ها نیز مرتبط باشد.

یافته‌های این مطالعه، به نوعی تکمیل کننده یافته‌های مطالعه قبلی رئوفی و همکاران بوده که در طی آن توانایی سلول‌های کبدی حاصل از تمایز سلول‌های مزانشیمی ورید بند ناف در جذب رنگ ایندوسیانین گرین تایید شد و لذا می‌توان نتیجه گرفت که سلول‌های بنیادی مزانشیمی ورید بند ناف انسانی تحت شرایط مناسب آزمایشگاهی قادر به تمایز به سلول‌های کبدی می‌باشند اگر چه مقایسه پروفایل بیانی ژن‌های مورد مطالعه با مطالعه‌های قبلی بیانگر این است که پروفایل بیان در مورد بعضی از ژن‌های اختصاصی سلول‌های شبه کبدی مشابه و در مورد بعضی از ژن‌ها نیز متفاوت است(۳۱).

نتیجه‌گیری

با توجه به داده‌های کسب شده، می‌توان نتیجه گرفت که سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از جدار ورید بند-ناف، توانایی تمایز به سلول‌های شبه کبدی را دارا می‌باشند.

تشکر و قدردانی

این پژوهش در قالب پایان نامه دانشجویی و با مساعدت‌های مالی دانشگاه علوم پزشکی کردستان و دانشگاه رازی کرمانشاه انجام شده است که بدین‌وسیله از این دو دانشگاه قدردانی می‌شود.

References :

1- Campagnoli C, Roberts IA, Kumar S, Bennett PR, Bellantuono I, Fisk NM .Identification of mesenchymal stem/progenitor cells in human first-trimester fetal blood, liver and bone marrow. Blood 2001; 98(8): 2396-402.
2- 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.
3- Wexler SA, Donaldson C, Denning-Kendall P, Rice C, Bradley B, Hows JM . Adult bone marrow is a rich source of human mesenchymal stem cells but umbilical cord and mobilized adult blood are not. Br J Haematol 2003; 121(2): 368-74.
4- 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.
5- Kadivar M, Khatami S, Mortazavi Y, Taghikhani M, Shokrgozar MA. Multilineage differentiation activity by the human umbilical vein-derived mesenchymal stem cells. Iran Biomed J 2006; 10(4): 175-184.
6- Kermani AJ, Fathi F, Mowla SJ. Characterization and genetic manipulation of human umblical cord vein mesenchymal stem cell: Potential application in cell-

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-11-21]

based gene therapy. Rejuvenation Res 2008; 11(2): 379-86.
7- Fox IJ, Chowdhury JR, Kaufman SS, Goertzen TC, Chowdhury NR, Warkentin PL, *et al.* Treatment of the crigler-najjar syndrome type I with hepatocyte transplantation. N Engl J Med 1998; 338(20): 1422-6.
8- 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.
9- 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.
10- 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.
11- Lagasse E, Connors H, Al-Dhalimy M, Reitsma M, Dohse M, Osborne L, *et al*. Purified hematopoietic stem cells can differentiate into hepatocytes *in vivo*. Nat Med 2000; 6(11): 1229-34.
12- Jafari Kermani 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):275-84. [Article in Farsi].
13- Okumoto K, Saito T, Hattori E, Ito JI, Suzuki A, Misawa K, *et al.* Differentiation of rat bone marrow cells cultured on artificial basement membrane containing extrcellular matrix into a liver cell lineage. J Hepatol 2005; 43(1): 110-6.
14- Schindler M, Nur-E-Kamal A, Ahmed I, Kamal J, Liu HY, Amor N, *et al*. Living in three dimension: 3D nanostructured environments for cell culture and regenerative medicine. Cell Biochem Biophys 2006; 45(2): 215-27.
15- Brophy CM, Luebke-Wheeler JL,Amiot BP, Remmel RP, Rinaldo P, Nyberg SL. Gene expression and fumctional analyses of primary rat hepatocytes on nanofiber matrices. Cells Tissues Organs 2010; 191(2): 129-40.
16- Ng S, Wu YN, Zhou Y, Toh YE, Ho ZZ, Chia SM, *et al.* Optimization of 3-D hepatocyte culture by controlling the physical and chemical properties of the extracellular matices. Biomaterials 2005; 26(16): 3153-63.
17- Jung J, Zheng M, Goldfarb M, Zaret KS. Initiation of mammalian liver development from endoderm by fibroblastgrowth factors. Science 1999; 284(5422): 1998-2003.
18- Wells JM, Melton DA. Early mouse endoderm is patterned by soluble factors from adjacent germ layers. Development 2000; 127(8): 1563-1572.
19- Kamiya A, Kinoshita T, Ito Y, Matsui T, Morikawa Y, Senba E, *et al.* Fetal liver development requires a paracrine action of oncostatin M through the gp130 signal transducer. EMBO J 1999; 18(8): 2127-36.
20- Hamazaki T, Iiboshi Y, Oka M, Papst PJ, Meacham AM, Zon LI, *et al*. Hepatic maturation in differentiating embryonic stem cells *in vitro*. FEBS Lett 2001; 497(1): 15-19.
21- Moll R, Franke WW, Schiller DL, Geiger B, Krepler, R. The catalog of human cytokeratins: patterns of expression in normal epithelia, tumors and cultured cells. Cell 1982; 31(1): 11-24.
22- Shiojiri N, Lemire JM, Fausto N. Cell lineages and oval cell progenitors in rat liver development. Cancer Res 1991; 51(10): 2611–20.
23- Belanger L, Frain M, Baril P, Gingras MC, Bartkowiak J, Sala-Trepat JM. Glucocorticosteroid suppression of alpha1- fetoprotein synthesis in developing rat liver. Evidence for selective gene repression at the transcriptional level. Biochemistry 1981; 20(23): 6665–72.
24- Nawa K, Nakamura T, Kumatori A, Noda C, Ichihara A. Glucocorticoid-dependent expression of the albumin gene in adult rat hepatocytes. J Biol Chem 1986; 261(36): 16883–8.
25- Courtois G, Baumhueter S, Crabtree GR. Purified hepatocyte nuclear factor 1 interacts with a family of hepatocyte-specific promoters. Proc Natl Acad Sci U S A 1988; 85(21): 7937- 41.
26- Costa RH, Lai E, Grayson DR, Darnell JE. The cell-specific enhancer of the mouse transthyretin (prealbumin) gene binds a common factor at one site and a liver-specific factor(s) at two other sites. Mol Cell Biol 1988; 8(1): 81-90.
27- Kheolamai P, Dickson AJ. Liver-enriched transcription factors are critical for the expression of hepatocyte marker genes in mES-derived hepatocyte-lineage cells. BMC Mol Biol 2009; 10: 35.
28- Greengard O. The hormonal regulation of enzymes in prenatal and postnatal rat liver. Effects of adenosine 3',5'-(cyclic)-monophosphate. Biochem J 1969; 115(1): 19-24.
29- Pan CJ, Lei KJ, Chen H, Ward JM, Chou JY. Ontogeny of the murine glucose-6-phosphatase system. Arch Biochem Biophys 1998; 358(1): 17-24.
30- Cooper CS, Park M, Blair DG, Tainsky MA, Huebner K, Cmos CM, *et al*. Molecular cloning of a new transforming gene from a chemically transformed human cell line. Nature 1984; 311(5981): 29-33.
31- Raufi A, Amini A, Azadbakht M, Aboozari M, Fathi F. *In vitro* differentiation of human umbilical vein mesenchymal stem cells into hepatocyte-like cells identified by cellular uptake of indocyanine green. Sci J Iran Blood Transfus Org 2010; 7(1): 34-40. [Article in Farsi].

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-11-21]

فصلنامه پژوهشی خون

Original Article

In vitro differentiation of human umbilical vein mesenchymal stem cells into hepatocyte-like cells

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

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

Abstract

Background and Objectives

Umbilical vein mesenchymal stem cells (UVMSC) which are multipotent precursors have been recently isolated. They are capable of differentiating into various cell types including neural and cardiac cells. In this study, the differentiation ability of human UVMSC into hepatocyte cells has investigated with concentration on hepatic genes expression profile.

Materials and Methods

The UVMSC were isolated and cultured in differentiation medium containing hepatocyte growth factor (HGF) and oncostatin M (OSM) using two step protocol. Differentiation of UVMSCs into cells expressing liver-specific genes was investigated by RT-PCR and immunocytochemistry.

Results

The cells showed the remarkable transition from bipolar fibroblast-like morphology to epithelial and polygonal shapes. The temporal gene expression pattern of hepatocyte-specific genes such as CK8, CK18, HNF3β, c-Met, AFP, TTR, G6P, Transthyretin, and ALB were detected during differentiation. The immunoflourescent analysis also showed that the differentiated cells were stained positively for CK-18 protein.

Conclusions

Findings indicate that UVMSC has a potential for differentiation into the hepatic like cells.

Key words: Umbilical Veins, Mesenchymal Stem Cells, Hepatocyte Growth Factor, Oncostatin M

Sci J Iran Blood Transfus Org 2011; 8(2): 79-87

Received: 29 Nov 2010
Accepted: 15 Feb 2011

Correspondence: Fathi F., PhD of Anatomy. Associate Professor, 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@gmail.com*

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-11-21]