پژوهنده (مجله پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی)
سال هفدهم، شماره ۳، پی در پی ۸۷، صفحات ۱۰۴ تا ۱۱۳
مرداد و شهریور ۱۳۹۱

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۱/۳/۲۴
تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۱/۸/۲

بررسی بیان مارکرهای گلیالی در سلول‌های شبه الیگودندروسیتی مشتق از مغز استخوان القا شده توسط هورمون تیروئیدی

دکتر حجت‌اله عباس زاده[۱]، دکترتقی طریحی[۲]، دکتر مجید صادقی‌زاده[۳]، دکتر علیرضا عزیززاده دلشاد[۴]*

۱. دانشجوی دکتری تخصصی، گروه علوم تشریح، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس
۲. استاد، گروه علوم تشریح، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس
۳. استاد، گروه ژنتیک، دانشکده علوم پایه، دانشگاه تربیت مدرس
۴. استادیار، گروه علوم تشریح، دانشکده پزشکی، دانشگاه شاهد

چکیده

سابقه و هدف: درمان صدمات ناشی از آسیبهای مخرب وارد به سیستم عصبی، به علت ناتوانی در بازسازی سلول‌های از بین رفته، جایگزین کردن میلین صدمه دیده، و برقراری مجدد ارتباطهای نورونی، به تأخیر افتاده و یا انجام نمی‌شود. در ضایعه نخاعی و دیگر بیماریهای تروماتیک، دمیلینه شدن آکسون سالم یکی از عوامل مؤثر در از دست دادن عملکرد سلول است. مطالعات قبلی پیشنهاد می‌کند بهبود اساسی سلول ممکن است از طریق میلین سازی مجدد صورت پذیرد. این مطالعه به بررسی اثر Triiodothyronine (T3) بر تمایز سلول‌های بنیادی مشتق از مغز استخوان (BMSCs) به سلول‌های شبه الیگودندروسیت می‌پردازد.

مواد و روشها: این تحقیق با روش تجربی انجام شد. تحت شرایط استریل، BMSCs از استخوان ران موشهای صحرایی ماده بالغ استخراج شد و برای بیان مارکرهای فیبرونکتین، CD45, CD90, CD44 و Oct-4 بررسی گردید. ابتدا BMSCs در مرحله پیش القا با استفاده از DMSO+RA به سلول‌های نوروپروژنیتور (NPc) تمایز داده شد. سپس در مرحله القا با استفاده از القا کننده‌های bFGF،PDGF،HRG(heregulin) و T3 به سلول‌های شبه الیگودندروسیت (OLCs) تمایز داده شد. در مراحل پیش القا و القا، بیان پروتئینی با استفاده از مارکرهای فیبرونکتین، nestin، NF68، NF160، GFAP، O4, O1 و Oligo2 با روش ایمونوسیتوشیمی بررسی شد و همچنین بیان ژن‌های NeuroD و Oct-4 با استفاده از RT-PCR بررسی گردید.

یافته‌ها: مطالعات ایمونوسیتوشیمی نشان داد که بیان مارکرهای فیبرونکتین، CD44، CD90 در سلول‌های استرومایی مغز استخوان به ترتیب برابر با ۹۴/۳۲±۰/۴۵٪ و ۹۵/۴۸±۰/۲۴٪ و ۹۷/۱۶±۰/۸۲٪ (p< ۰/۰۵) می‌باشد. بررسی مارکرهای Oligo2, O4 ,O1 نشان داد که در مرحله القا ترکیب HRG، PDGF، bFGF و T3 (۲۵ ng/ml) می‌تواند نقش مؤثری در تمایز سلول‌های BMSCs به OLCs داشته باشد.

نتیجه‌گیری: DMSO و RA موجب تمایز سلول‌های BMSCs به سلول‌های نوروپروژنیتور، و ترکیب HRG، PDGF، bFGF و T3 (۲۵ ng/ml) موجب تمایز سلول‌های نورواپیتلیال به سلول‌های شبه الیگودندروسیت می‌شود.

واژگان کلیدی: سلول‌های بنیادی، تمایز، نوروگلیا

لطفاً به این مقاله به صورت زیر استناد نمایید:
Abbaszadeh H, Tirahi T, Sadeghizade M, Delshad AR. Expression of glial markers in bone marrow-derived oligodendrocyte-like cells induced by thyroid hormone. Pejouhandeh 2012;17(3):104-13.

مقدمه

بیماریهای متعددی شناسایی شده‌اند که در سیستم اعصاب محیطی و مرکزی منجر به از بین رفتن میلین می‌شوند (۱). بهبودی در ضایعات CNS به علت عدم توانایی کامل در بازسازی سلول‌های از دست رفته، جایگزین کردن میلین آسیب دیده، و برقراری مجدد ارتباطات عصبی، یکی از معضلات جدی بیماران می‌باشد (۲). آسیب میلین در آکسون‌های سالم، یک فاکتور مهم در فقدان عملکرد عصب

*نویسنده مسؤول مکاتبات: دکترتقی طریحی؛ تهران، بزرگراه جلال آل احمد، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم پزشکی، گروه علوم تشریح. تلفن: ۹۸-۲۱-۸۸۷۹۰۱۰۹+، نمابر: ۹۸-۲۱-۸۸۶۷۸۱۰۴+؛ پست الکترونیک: ttiraihi@modares.ac.ir

است. مطالعات in vivo و in vitro نشان می‌دهد که در بین این اجزا، وجود سلول‌های الیگودندروسیت برای ترمیم آکسون‌هایی که میلین را از دست داده‌اند و فاقد عملکرد شده‌اند ضروری است (۳). الیگودندروسیت‌ها را می‌توان از منابع مختلفی همچون سلول‌های بنیادی جنینی و سلول‌های پیاز بویایی و سلول‌های بنیادی بالغ استحصال کرد که یکی از منابع سلول‌های بنیادی بالغ، مغز استخوان می‌باشد.

مغز استخوان، ارگانی است که حاوی دو نوع سلول بنیادی بالغ است که شامل سلول‌های بنیادی خونساز یا HSCs و سلول‌های استرومایی مغز استخوان BMSCs می‌باشد. این سلول‌ها علاوه بر تبدیل به سلول‌هایی با منشأ مزودرمی به سلول‌هایی با منشأ غیر مزودرمی مثل سلول‌های عصبی و گلیالی نیز قابل تبدیلند (۴). بنابراین استفاده از آنها جهت درمان بیماریها و ضایعات مختلف سیستم عصبی از جمله تخریب میلین و بازسازی مجدد آن مورد توجه قرار گرفته است (۵).

برخی محققین بیان مارکرهای عصبی را بوسیله βME (β-mercaptoethanol) نشان داده‌اند (۶). در مطالعه‌ای دیگر، القای BMSCs انسانی با βME برای یک روز و سپس RA به مدت سه روز، منجر به ایجاد سلول‌های شبه گلیال میلینی گردید که سطح بسیار پایینی از O4 را بیان کردند. در ادامه پس از القای این سلول‌ها با F، PDGF، bFGF و HRG به مدت سه روز و سپس پیوند آنها در موش صحرایی، میلین‌سازی در شبکیه چشم انجام شد (۷). جایگزینی نواحی دمیلینه شده با سلول‌های میلینه کننده پیوندی عقیده‌ای است که از مدتها پیش مورد بررسی قرار گرفته است. جهت دستیابی به این هدف در مدل‌های دارای ضایعه نخاعی، پیوند سلول‌های مختلف مانند الیگودندروسیت (۸)، شوان سل (۹)، سلول‌های غلاف بویایی (۱۰)، و سلول‌های بنیادی عصبی بزرگسالان مورد بررسی قرار گرفت (۱۱ و ۱۲). مطالعات متعددی بر روی چگونگی تمایز BMSCs به سلول‌های عصبی-گلیالی بر اساس فاکتورهای مختلفی چون انواع القاکننده‌ها، فاکتورهای رشد، محیطهای کشت متفاوت و هم‌کشتی، و تبدیل این سلول‌ها به سلول‌هایی شبیه به رده‌های مختلفی از سلولهای عصبی-گلیالی انجام شده است. با توجه به بهینه نبودن این تحقیقات، در این تحقیق سعی بر آن بود که تمایز سلول‌های استرومایی مغز استخوان به سلول‌های شبه الیگودندروسیت در محیط کشت در گروه علوم تشریح دانشکده پزشکی دانشگاه تربیت مدرس در سال ۹۱ مورد بررسی قرار گرفته و بهینه شود و بیان مارکرهای گلیالی ارزیابی شود.

مواد و روشها

این تحقیق با طراحی تجربی انجام گرفت. در این پژوهش از موش صحرایی ماده و بالغ نژاد اسپراگو-داولی تهیه شده از مؤسسه پاستور با سن ۸-۶ هفته استفاده شد. حیوانات در یک دوره روشنایی و تاریکی ۱۲ ساعته و در شرایط مطلوب و استاندارد حیوانخانه گروه علوم تشریح دانشکده پزشکی دانشگاه تربیت مدرس نگهداری شدند.

برای گرفتن مغز استخوان از یک سرنگ ۵ ml (با سرسوزن مشکی) حاوی ۱ ml محیط کشت DMEM-F12 (UK, Gibco)، استفاده شد. محتوی داخل سرنگ در زیر هود در فلاسک حاوی محیط DMEM-F12 (UK, Gibco) و FBS 15% (UK, Gibco) ریخته شد. پس از گذشت ۲۴ ساعت از زمان تخلیه مغز استخوان در فلاسک، محیط کشت سلولی با محیط تازه تعویض شد. سلول‌های استرومایی چسبیده به کف فلاسک باقی مانده و سلول‌های خونی شناور حذف شدند. هنگامی که تراکم سلول‌های چسبیده به کف فلاسک به ۷۰ تا ۸۰٪ رسید، پاساژ داده شدند. پاساژ سلول‌ها توسط Trypsin 0.25% (Germany, Merck) و EDTA 0.04% (Germany, Merck) انجام شد و این عمل تا پاساژ چهار ادامه یافت، در این شرایط سلول‌ها از یک مورفولوژی یکسان برخوردار شدند (۵). بررسی زنده بودن بر روی سلول‌ها انجام شد و سپس برای بررسی خلوص آنها و همچنین استرومایی بودن آنها از آنتی‌بادی فیبرونکتین و CD45, CD90, CD44 و همچنین بیان mRNA ژن Oct-4 استفاده شد. ضمناً جهت بررسی احتمالی تمایز این سلول‌ها به سلول‌های شبه عصبی و گلیالی، بیان آنتی‌بادی‌های Nestin، NF68، GFAP، O1، و O4 مورد ارزیابی قرار گرفت. به منظور بررسی میزان زنده بودن سلول‌ها تست تریپان بلو انجام شد؛ در این آزمون در حجمی مشخص از سوسپانسیون، سلول‌ها به نسبت مساوی با تریپان بلو رنگ شدند. سلول‌های مرده به رنگ آبی مشخص شده و سلول‌های زنده شفاف نشان داده شدند. تعداد سلول‌های زنده و مرده توسط لام نیوبار به وسیله میکروسکوپ اینورت با بزرگنمایی ۲۰۰ شمارش گردید (۶). پس از تریپسینه کردن BMSCs پاساژ چهار، ۵۰۰۰ سلول به طور مساوی در هر یک از خانه‌های پلیت ۱۲ خانه‌ای لامل گذاری شده ریخته شد. سپس طی دو مرحله، پیش القا و سپس القا انجام شد.

مرحله پیش القا

در مرحله مقدماتی یا پیش القا، از اثر القایی DMSO 2%، βME بر روی BMSCs استفاده گردید (۷). بدین ترتیب که

ابتدا پلیت‌های ۱۲ خانه لامل گذاری و سپس با ژلاتین ۰/۱٪ آغشته شد و پلیت به مدت یک شب در انکوباتور قرار گرفت. پس از تریپسینه کردن سلول‌های پاساژ چهار، تعداد ۵۰۰۰ سلول به طور مساوی در هر یک از خانه‌ها ریخته شد. پس از گذشت ۲۴ ساعت از مرحله پیش القا، شستشو توسط PBS انجام شد و با اضافه نمودن محیط و 15% FBS مرحله القا توسط (Keilhoff 2006) RA (1 µM) به مدت ۳ روز اجرا شد. سپس لامل‌ها برداشت شد و پس از شستشو با PBS برای انجام ایمنوسیتوشیمی آماده گردید. جهت بررسی بیان ژن‌های NeuroD و Oct-4 از تکنیک RT-PCR استفاده شد.

مرحله القا

پس از شستشوی سلول‌ها با PBS، محیط کشت F12-DMEM حاوی 15% FBS و مجموعه‌ای از ۱۰ ng/ml فاکتور رشد فیبروبلاستی (bFGF) (UK, Gibco)، ۵ ng/ml فاکتور رشد مشتق از پلاکت (PDGF-AA) (USA, ICN) و ۲۰۰ ng/ml بتاهرگولین انسانی (Heregulin: HRG) (USA, Chemicon) برای دو روز جایگزین محیط کشت قبلی شد (۸). در پایان این مرحله، یک ارزیابی از آنتی‌بادی‌های اولیه شامل Nestin، NF68، GFAP، O1، Oligo2 و O4 به روش ایمونوسیتوشیمی بر روی سلول‌ها انجام شد. در مرحله دوم القا پس از خارج کردن محیط کشت فوق و شستشوی سلول‌ها با PBS، محیط کشت DMEM -F12 حاوی 15% FBS و مقادیر متفاوتی از هورمون T_3 برای ایجاد سلول‌های شبه الیگودندروسیت برای مدت دو روز استفاده شد. لازم به ذکر است در خصوص میزان دوز T_3 با توجه به منابع، مقادیر ۱۰ ng/ml، ۵۰ و ۹۰ برای تعیین دوز بهینه بررسی می‌شود (۹). در بررسی ایمونوسیتوشیمی مراحل کار مشابه قبل انجام شد. به این ترتیب بالاترین درصد تمایز به سلول‌های شبه الیگودندروسیت توسط دو گروه پیش القا و القا مشخص شد.

ایمنوسیتوشیمی

BMSCs القا نشده و القا شده ابتدا جهت ثبوت در معرض پارافرمالدهید ۴٪ به مدت ۳۰ دقیقه قرار گرفته، سپس شستشوی سلول‌ها با PBS سه بار و هر بار ۵ دقیقه انجام شد. نمونه‌ها به مدت یک ساعت در معرض مخلوط سرم بز ۱۰٪ و Triton X-100 قرار داده شدند. پس از رقیق نمودن ۱:۱۵۰ آنتی‌بادی‌های اولیه فیبرونکتین، Nestin، NF68، GFAP، O1، Oligo2 و O4 که همه از نوع موشی بودند، هر کدام بطور مجزا بر روی یک Cover slip ریخته شد. به منظور جلوگیری از خشک شدن آنتی‌بادی، نمونه با یک قطعه پارافیلم پوشیده شد و در داخل پتری دیش مرطوب قرار گرفت و به مدت یک شب در درجه حرارت ۳۷ انکوبه شد. لام‌ها پس از شستشو با PBS مانند قبل به مدت دو ساعت در دمای محیط در معرض آنتی‌بادی ثانویه ضد موشی (۱:۲۰۰) کونژوگه به FITC قرار گرفتند و سپس شستشو با PBS انجام شد. در ادامه، نمونه‌ها توسط میکروسکوپ فلورسانس مورد بررسی قرار گرفتند. جهت شمارش سلول‌ها از اتیدیوم بروماید ۰/۰۱٪ به مدت یک دقیقه استفاده شد و شستشو توسط PBS انجام گردید (۱۰). در پایان، هر لامل بطور معکوس توسط بافر گلیسرول بر روی لام قرار گرفت. نحوه شمارش بدین ترتیب بود که از هر ۲۰۰ سلول شمارش شده در مناطق مختلف لامل، سلول‌های ایمونوپوزیتیو مشخص هر گروه ثبت می‌شد. این کار روی پنج لامل در یک وهله آزمایش انجام شد و در مجموع آزمایش پنج بار تکرار شد.

RT-PCR

سلول‌های متمایز شده گروههای مختلف و نیز سلول‌های متمایز نشده به صورت جداگانه از کف فلاسک‌های کشت با محلول تریپسین و EDTA کنده شدند. پس از سانتریفیوژ شدن، مایع رویی سلول‌ها دور ریخته شد و توده سلولی بدست آمده برای استخراج RNA آماده شد. پس از لیز نمودن سلول‌ها به کمک محلول RNX Plus. Cinna Gen Inc، استخراج RNA سلولی انجام شد. سپس واکنش رونویسی معکوس انجام شد، که طی آن آنزیم DNA پلی‌مراز وابسته به RNA با کمک پرایمرهایی که به mRNA هیبرید می‌شوند، mRNA را به cDNA تبدیل می‌کند. در مطالعه حاضر، جهت ساخت cDNA از کیت Revert aid H Minus-First Strand cDNA Synthesis (Fermentas, K1632) استفاده شد. پس از پایان ساخت cDNA در حجم بالا، PCR در حجم ۲۵ میکرولیتر با استفاده از کیت 2XPCR Master Mix-Fermentas انجام گرفت که شامل مواد زیر می‌باشد:

reaction buffer، ۰/۰۵ u/µl Taq DNA polymerase، ۴ mM MgCl2، و ۰/۴ mM از هر dNTP (شامل: dATP, dCTP, dGTP and dTTP

سپس مواد لازم طبق دستور کیت برای حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر اضافه شد که شامل مواد زیر می‌باشد:

۱۲/۵ میکرولیتر 2XPCR Master Mix، پرایمرهای فوروارد و ریورس با غلظت ۱۰۰ میکرومولار هرکدام ۰/۵ میکرولیتر، cDNA به میزان یک میکرولیتر، و آب فاقد نوکلئاز به میزان ۱۰/۵ میکرولیتر.

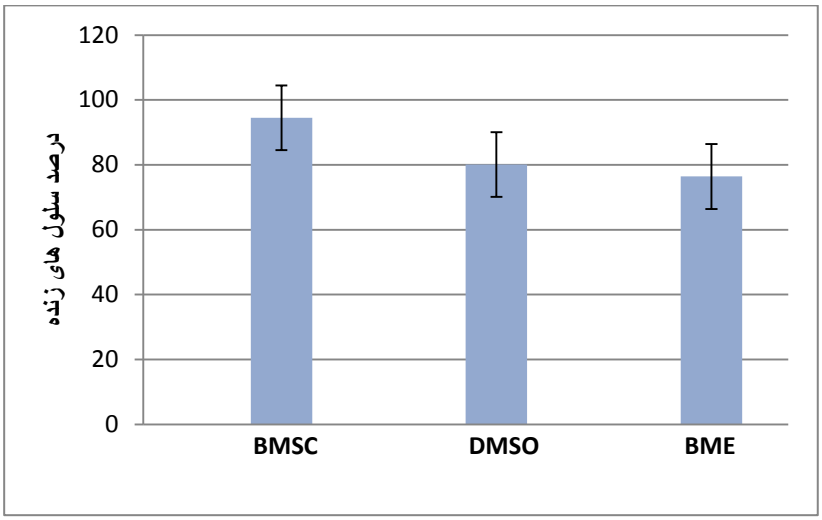
لازم به توضیح است که در هر بار انجام PCR یک کنترل منفی نیز به کار گرفته شد. تیوب کنترل منفی به جای cDNA حاوی ۵ میکرولیتر آب دیونیزه استریل و پرایمرها بود. پس از پایان واکنش PCR، ۱۰ میکرولیتر از محصول واکنش بر روی ژل آگارز ۲٪ الکتروفورز شد.

تجزیه و تحلیل داده‌ها

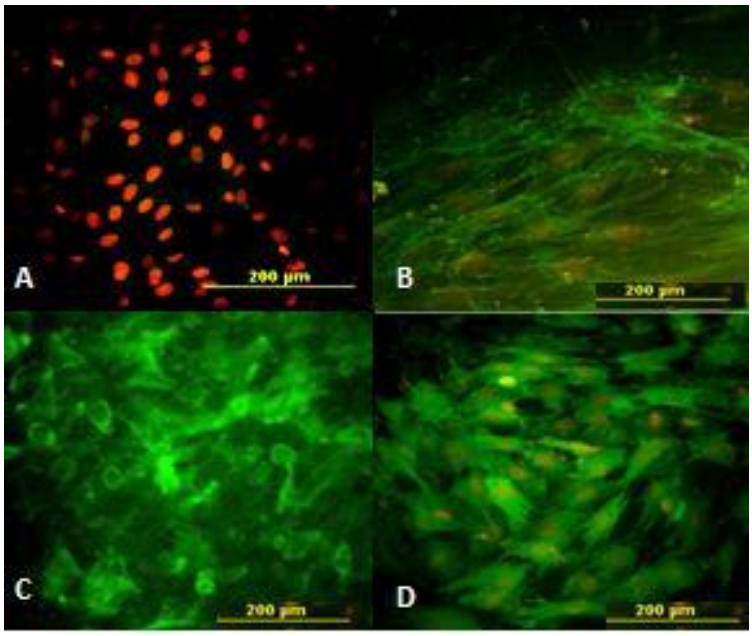
تمام مقادیر برحسب (mean ± SEM) ارائه شد و مقایسه بین گروهها با روش آنالیز واریانس یکطرفه (ANOVA) انجام گردید.

یافته‌ها

بر اساس آزمون حیات سلول‌ها (viability test) تعداد سلول‌های گروه کنترل (BMSCs) بعد از پاساژ چهارم ۹۴/۵۱±۰/۳۲٪ بود که به طور معنی‌داری از سایر گروهها بیشتر بود. همچنین گروه DMSO-RA به طور معنی‌داری دارای تعداد سلول زنده بیشتری نسبت به گروه βME-RA بود (نمودار ۱). برای اثبات استرومایی بودن سلول‌ها و تعیین خلوصشان، آنتی‌بادی فیبرونکتین و آنتی CD44 و آنتی CD90 استفاده شد (شکل ۱). درصد سلول‌های مثبت در آنتی‌بادی فیبرونکتین و آنتی CD44 و آنتی CD 90 به ترتیب ۹۴/۳۲±۰/۴۵٪ و ۹۵/۴۸±۰/۲۴٪ و ۹۷/۱۶±۰/۸۲٪ بود.

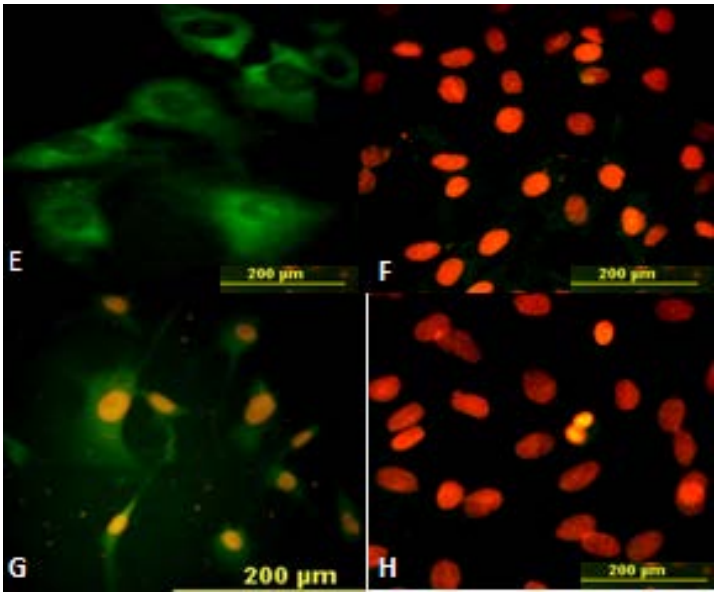


نمودار ۱. مقایسه درصد سلول‌های زنده به کل سلول‌ها در گروه کنترل و دو گروه تحت القا *اختلاف معنی‌دار با گروه کنترل، †اختلاف معنی‌دار با گروه BME-RA



شکل ۱. اشکال A، B، C و D به ترتیب مربوط به رنگ‌آمیزی ایمونوفلورسانس آنتی‌بادی اولیه آنتی CD45، Fibronectin، آنتی CD44 و آنتی CD90 از سلول‌های تمایز نیافته BMSCs در پایان پاساژ چهارم است.

پس از استفاده از القاکننده‌های مرحله اول بر روی سلول‌های تمایز یافته با DMSO-RA، لازم بود تغییرات احتمالی بر میزان تمایز اشاره شده در پایان مراحل پیش القا مجدداً بررسی گردد. به این منظور از آنتی‌بادی‌های Nestin، NF68، GFAP و NF200 استفاده شد. در بررسی ایمونوسیتوشیمی سلول‌های BMSCs القا شده با آنتی‌بادی‌های Nestin، NF68، GFAP و NF200 به ترتیب درصدهای متفاوتی از ایمونوپوزیتیو بودن سلول‌ها بوسیله میکروسکوپ فلورسنت تشخیص داده شد. برای تعیین درصد سلول‌های شبه عصبی و همچنین شبه گلیالی، شمارش سلولی صورت گرفت. بیان قابل توجه مارکر Nestin و NF68 توسط القاکننده‌های DMSO و RA در پایان مراحل پیش القا توانست بطور معنی‌داری درصد سلول‌های شبه نورواپیتلیال (۶۲/۱۲±۳۶) و شبه نورونی (۶/۱۸±۳۲) بیشتری را نسبت به القا کننده دیگر (βME-RA) ایجاد کند (شکل۲).



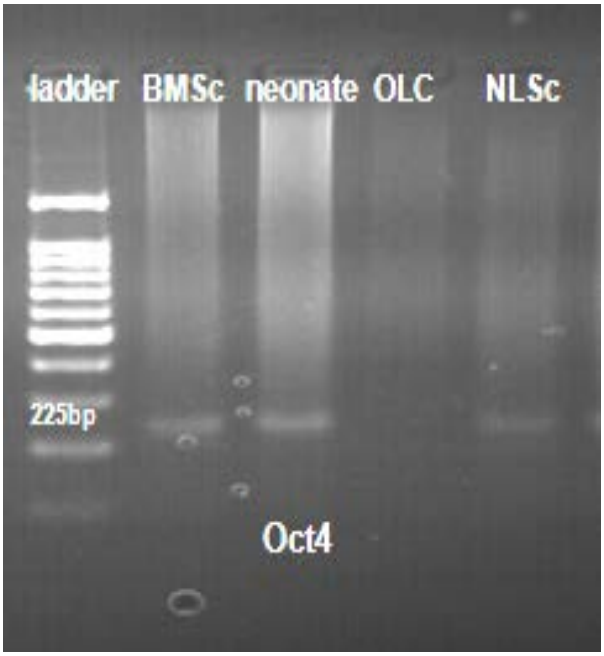
شکل ۲. اشکال E، F، G و H به‌ترتیب مربوط به رنگ‌آمیزی ایمنوفلورسانس آنتی‌بادی‌های NF68، Nestin، NF200 و GFAP از سلول‌های تمایز یافته BMSCs در پایان مرحله پیش‌القا است.

همچنین در بررسی RT-PCR باند مشخص Oct (که ویژگی بنیادین بودن سلول‌های استرومایی مغز استخوان (BMSCs) را نشان می‌دهد) به خوبی بیان شد، در حالی که در مرحله پیش‌القای سلول‌ها بیان آن ضعیف و در مرحله القا در ژل الکتروفورز مشاهده نشد (شکل ۳).

در بررسی نیمه کمی RT-PCR در پایان مراحل پیش القا مشخص شد که گروههای DMSO-RA، βME-RA و Rat Neonate brain توانستند باند مشخصی را از بیان mRNA ژن NeuroD بر روی ژل الکتروفورز نشان دهند. عدم بیان ژن NeuroD درگروه BMSCs نشان‌دهنده عدم تمایز به سلول‌های نورواپیتلیالی است (شکل۴).

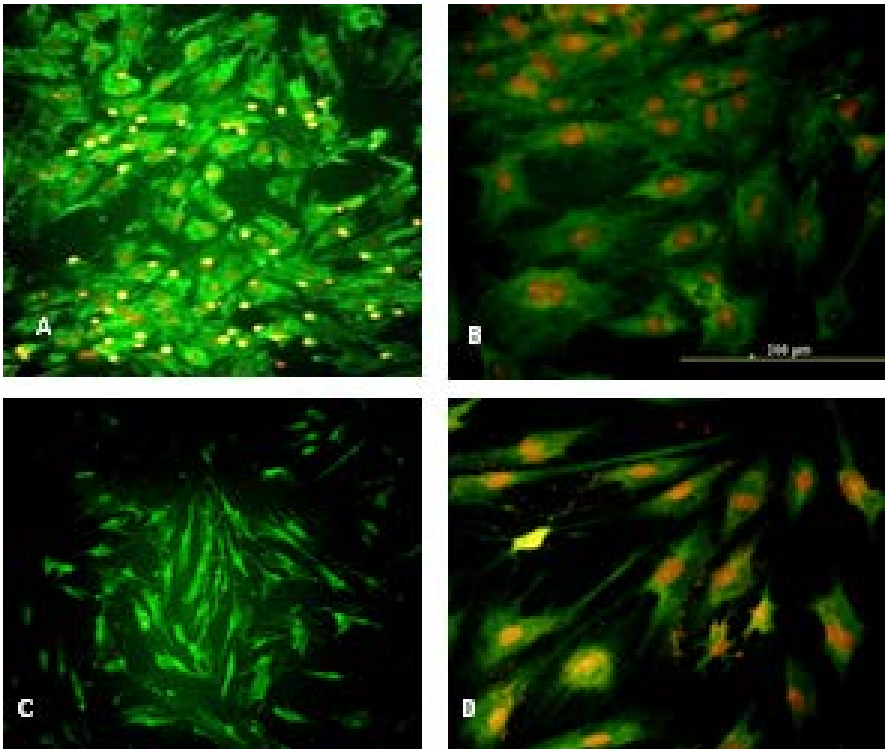
برای تعیین فنوتیپ سلولی لازم است سلول‌های تمایز یافته با استفاده از آنتی‌بادی‌های تخصصی مربوط به سلول‌های عصبی و گلیالی به روش ایمنوسیتوشیمی مورد ارزیابی قرار گیرند. در زمان تعیین شده پس از القا عصبی، سلول‌ها با آنتی‌بادی‌های مربوط بر علیه مارکرهای سلول‌های عصبی و گلیالی O1، OLIGO2، O4، و GFAP ارزیابی شدند (شکل۵).

در بررسی ایمونوسیتوشیمی سلول‌های BMSCs تمایز یافته بعد از پایان مراحل پیش القا و القا بیشترین بیان آنتی‌بادی گلیالی O1، OLIGO2، O4 نسبت به القا کننده‌های دیگر در گروه T25 بود (نمودار ۲). بر اساس viability test درصد BMSCs زنده القا نشده گروه شاهد ۸ روز پس از پاساژ چهارم به بیش از ۹۰٪ رسید که به صورت معنی‌داری بیشتر از تمام گروههای تمایزیافته بود. از مقایسه میزان مرگ و میر در گروههای دیگر می‌توان نتیجه گرفت که گروههای T0، T5 و T12.5 کمترین میزان معنی‌داری مرگ و میر سلولی را نسبت به دیگر گروههای تمایز یافته داشتند. ضمناً این بررسی نشان می‌دهد که بیشترین میزان معنی‌داری در مرگ و میر سلولی در گروههای T100, T200 ایجاد شده است (نمودار۳).

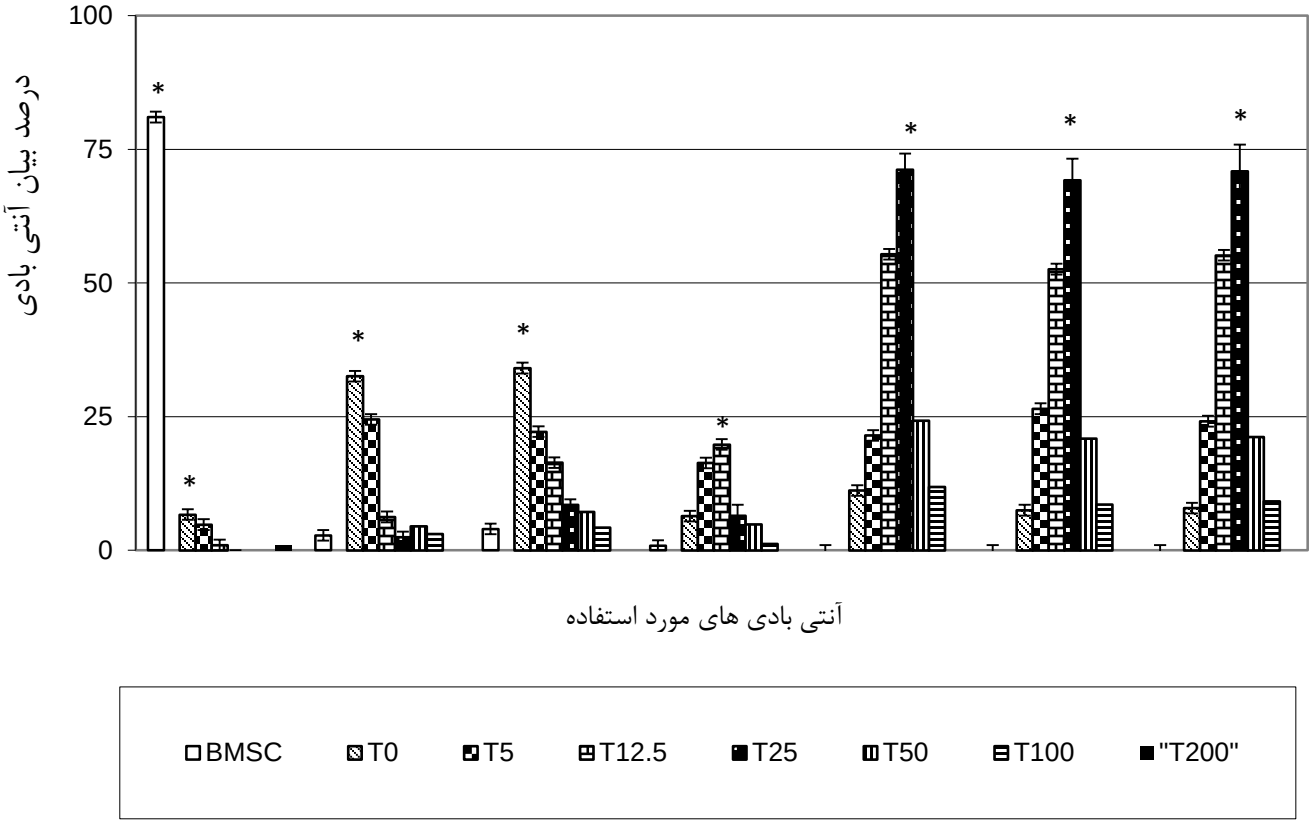


شکل۳. الکتروفوروگرام محصول PCR حاصل از استخراج mRNA ژن OCT4 که شامل گروههای BMSCs پیش از هر گونه تمایز، گروه کنترل و پس از پایان مرحله پیش القا (NPC) در گروه القا کننده (OLC) می‌باشد. ستون سمت چپ DNA Ladder را نشان می‌دهد.

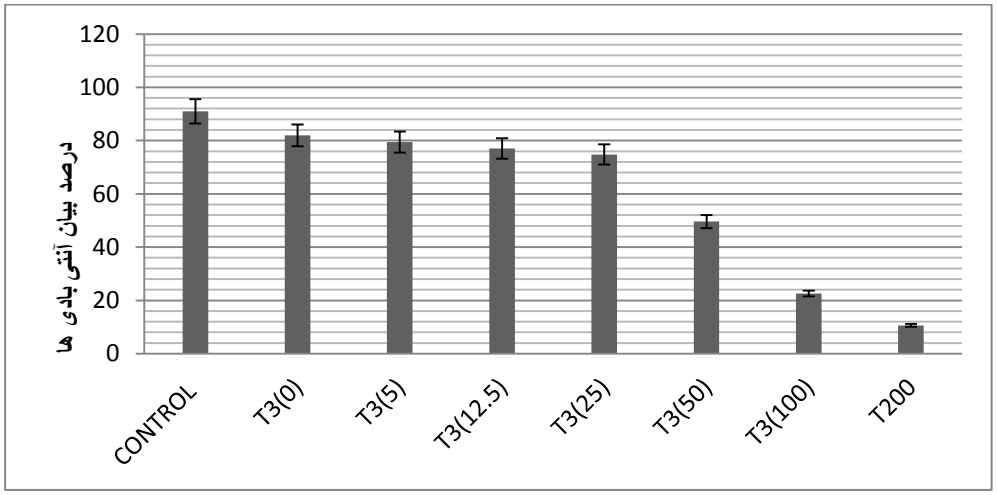
شکل ۴. الکتروفوروگرام حاصل از واکنش PCR برای بیان ژن NeuroD که شامل گروههای BMSCs پیش از هر گونه تمایز، گروه کنترل و پس پایان مرحله پیش القا در هردو گروه القا کننده می‌باشد. ستون سمت چپ DNA Ladder را نشان می‌دهد.



شکل۵. اشکال A، B، C و D به ترتیب مربوط به رنگ‌آمیزی ایمونوفلورسانس آنتی‌بادی اولیه آنتی O1، OLIGO2، O4 و GFAP از سلول‌های شبه الیگودندروسیت است.



نمودار ۲. مقایسه درصد سلول‌های ایمونوپوزیتیو عصبی و گلیالی توسط آنتی‌بادی‌های اولیه در پایان مراحل القا نسبت به سلول‌های تمایز نیافته. در پایان القا سلول‌های تمایز نیافته BMSCs همانند مراحل قبل (شکلهای ۱ و ۲) بیشترین بیان فیبرونکتین را نسبت به تمام گروههای سلول‌های تمایز یافته داشتند. همانطور که مشاهده می‌شود بیان آنتی‌بادی‌های NF68،Nestin و NF160 در سلول‌های تمایز یافته توسط T0 نسبت به تمام گروههای دیگر از افزایش معنی‌داری برخوردار است. بیان Oligo2، O4 و O1 در گروه T25 بیشترین میزان را در بین گروههای دیگر داشت. در مورد بیان GFAP بالاترین بیان این پروتئین در گروههای T10 و T5 نسبت به گروههای دیگر مشاهده شد.



نمودار ۳. نمودار درصد سلول‌های زنده به کل سلول‌ها را در گروه BMSCs بدون اعمال تمایز و گروههای تمایز یافته در پایان مرحله القا نشان می‌دهد. بر اساس بررسی زنده بودن و مرگ و میر سلولی، درصد BMSCs زنده تمایز نیافته به صورت معنی‌داری بیشتر از تمام گروههای تمایز یافته بود. گروههای T0، T5، T12.5 کمترین درصد مرگ و میر سلولی را در بین تمام گروههای تمایز یافته در پایان مرحله القا داشت. بیشترین میزان مرگ و میر سلولی در گروههای T200 و T100 ایجاد شد.

بحث

امروزه سلول‌های BMSCs به عنوان منبع مناسبی از سلول‌های بنیادی بالغ برای درمان بیماریهای عصبی و گلیالی به حساب می‌آیند و تحقیقات در این زمینه دامنه گسترده‌ای را به خود اختصاص داده است (۱۳). این سلول‌ها پس از استخراج و کشت در شرایط محیط آزمایشگاهی و پس از چند پاساژ مورفولوژی یکسانی پیدا کرده و از سرعت تکثیر بالایی برخوردار می‌شوند. در این تحقیق برای تعیین درصد خلوص سلول‌های استرومایی به دلیل وجود فیبرونکتین در سلول‌های با منشأ مزانشیمی، سلول‌های BMSCs بر علیه این گلیکوپروتئین به روش ایمونوسیتوشیمی رنگ شدند، بیان ۹۴ درصدی این پروتئین در سلول‌ها مؤید بنیادی بودن آنها بود. این روش توسط سایر محققین نیز انجام شده است (۱۴). در تأیید خلوص سلول‌های BMSCs از آنتی‌بادی‌های CD44 و CD90 نیز استفاده شد که نتایج آن مشابه آنتی‌بادی فیبرونکتین بود و درصد بالایی از سلول‌ها مثبت بودند ولی بیان آنتی‌بادی CD45 بسیار ناچیز بود. این نتایج بر روی سلول‌های بنیادی مزانشیمی توسط دیگران نیز نشان داده شد (۱۵). تمایز BMSCs به سلول‌های عصبی و گلیال در چندین گونه مثل موش صحرایی، موش سوری و انسان بررسی شده است. در این تحقیقات نشان داده شده است که عوامل متفاوتی مانند سیتوکاین‌های خاص، فاکتورهای رشد، نوروتروفین‌ها و RA، القا عصبی و گلیالی را در هر دو محیط in vitro و in vivo باعث می‌شوند (۱۶).

Deng و همکاران در سال ۲۰۰۱ گزارش کردند که ترکیبات افزایش دهنده سطح آدنوزین مونوفسفات حلقوی داخل سلولی (cAMP) نظیر IBMX می‌توانند BMSCs انسانی را تحریک کرده و مورفولوژی سلول عصبی را ایجاد نمایند (۱۷).

RA یکی از مشتقات ویتامین A بوده و نقشی ضروری در رشد و تکامل سلول دارد. در حقیقت این ماده در بافتهای مختلف جنینی و بالغ حیوانات به ویژه در سیستم عصبی وجود دارد که سبب پیشرفت در تمایز عصبی می‌شود (۱۸). Li جهت بررسی رشد و تمایز BMSC به سلول‌های عصبی، این سلول‌ها را از رت بالغ جدا و آنها را با LIF و bFGF کشت داد و سپس از RA به عنوان القاگر استفاده کرد. کلنی‌های تولید شده و سلول‌های تحت کشت علاوه بر رشد سریع، به سلول‌های شبه عصبی و شبه گلیالی تبدیل گردیدند (۱۹). محقق دیگری، سلول‌های مزانشیمی مغز استخوان موش صحرایی بالغ را برای ۲۴ ساعت در معرض βME قرار داد. سپس RA را به مدت ۳ روز و بعد PDGF، bFGF، F و HRG را به مدت ۲ هفته بر آنها تأثیر داد. او نشان داد این سلول‌ها به سلول‌های شبه گلیال تمایز یافته و مارکرهای گلیال S100 و GFAP را بیان نمودند که این سلول‌ها در ترمیم عصب سیاتیک و میلین‌سازی مؤثر بودند (۲۰).

Zhao برای تمایز BMSC از روش دیگری استفاده کرد، او ابتدا برای ۲۴ ساعت به محیط کشت βME اضافه کرد و در پاساژ دوم سلول‌ها را برای مدت کوتاهی در معرض βME با غلظت بیشتر قرار داد. سپس به طور مجزا از DMSO و BHA استفاده نمود و در هر سه حالت نتایج مشابهی از تمایز به سلول‌های نوروگلیال را به دست آورد (۲۱). در تحقیق دیگری Hung برای تمایز BMSCs به سلول‌های عصبی از بتامرکاپتواتانول به همراه RA در محیط فاقد سرم استفاده کرد که در نتیجه این سلول‌ها پروتئین‌های Tuj-1، NeuN، nestin، tau و NSE را بیان نمودند. در مطالعه او بررسیهای ایمونوسیتوشیمی، بیان ۹۸ درصدی NeuN و tau را نشان دادند (۲۲).

همانگونه که نتایج نشان داد اثر القایی RA-DMSO روی BMSCs در ایجاد تمایز به سلول‌های شبه نورواپیتلیالی به مراتب بیش از BME-RA است. چهار روز پس از این مرحله از القا در تمام گروهها، سلول‌ها با آنتی‌بادی‌های NF68, Nestin و NF160 واکنش دادند که این میزان تمایز در DMSO-RA بیش از گروه دیگر بود.

نتایج این تحقیق گویای آن است که با استفاده از القاکننده‌های DMSO-RA با روش مشخص می‌توان در شرایط محیط کشت، سلول‌های استرومایی مغز استخوان موش صحرایی را عمدتاً به سمت سلول‌های شبه نورواپیتلیال، شبه عصبی و با درصد بسیار کمتر به سلول‌های شبه گلیال تمایز داد. از آنجایی که سلول‌های نورواپیتلیال تحت شرایطی به سلول‌های عصبی، آستروسیتی و الیگودندروسیت‌ها تمایز می‌یابند، تلاش شد با استفاده از القاکننده‌های مختلف و سپس مقادیر مختلفی از هورمون T3 این موضوع بیشتر بررسی شود. در مطالعه حاضر پس از مرحله پیش القا توسط DMSO-RA، این سلول‌ها تحت القا با HRG, bFGF, PDGF و سپس با مقادیر مختلفی از هورمون T3 قرار گرفتند که بیشترین درصد OLCs توسط T3 با مقدار ۲۵ ng/ml به دست آمد. در مطالعات قبلی تمایز سلول‌های بنیادی جنینی موش صحرایی به الیگودندروسیت جهت میلین‌سازی با حضور هورمون T3 نشان داده شده است (۲۳).

در تحقیق دیگری اثر فاکتورهای PDGF، نوروتروفیک سیلیاری با انسولین و T3 بر کشت غنی شده از سلول‌های

گلیال به همراه الیگودندروسیت نشان داده شد (۲۴). مطالعه حاضر نیز مانند مطالعات فوق اثر هورمون T3 در تمایز به سلول‌های شبه الیگودندروسیت را تأیید می‌کند. گروه Sang با قرار دادن سلول‌های بنیادی جنینی انسانی در محیط DMEM و مکمل F12 و تعدادی القاکننده، ابتدا پیش‌سازهای عصبی را به دست آورده و سپس این سلول‌ها را طی یک روش دو مرحله‌ای در معرض فاکتورهای رشد bFGF, PDGF ,EGF و سپس T3 به میزان ۳۰ng/ml قرار داده و توانستند بیش از ۸۱٪ سلول الیگودندروسیت به دست آورند (۲۵). بیشتر این سلول‌ها پروتئین‌های سطحی O4 و O1 را در مرحله پایانی بیان نمودند. درصد بالای تمایز به سلول‌های الیگودندروسیت در مطالعه Sang-Moon و همکاران را شاید بتوان به علت منبع سلولی مورد استفاده دانست، اما در مطالعه حاضر حدود ۷۱٪ سلول الیگودندروسیت از منبع سلولی BMSCs بر اساس روش تمایزی مشخصی برای اولین بار در محیط کشت استحصال شد (۲۵).

نتیجه‌گیری

سلول‌های BMSCs تحت اثر القاکننده‌های DMSO و RA در محیط کشت به میزان قابل ملاحظه‌ای به سلول‌های شبه نوروپروژنیتور تمایز یافتند، در حالی که میزان تمایز به سلول‌های شبه گلیالی بسیار کم بود. این جمعیت سلولی پس از القا توسط bFGF, PDGF, HRG و سپس در پایان T3 با میزان ۲۵ ng/ml درصد قابل ملاحظه‌ای سلول شبه الیگودندروسیت را ایجاد نمود.

تشکر و قدردانی

این مقاله بخشی از رساله دکتری می‌باشد که با حمایت مالی دانشگاه تربیت مدرس انجام شده است. همچنین از مرکز علوم اعصاب شفا بیمارستان خاتم‌الانبیا بابت پرداخت هزینه مواد و استفاده از میکروسکوپ فلورسنت و همچنین آقای علی نوری‌زاده بابت مشاوره بخش مولکولی تقدیر و تشکر می‌شود.

REFERENCES

1. Abdanipour A, Schluesener HJ, Taki T. Effects of valproic acid, a histone deacetylase inhibitor, on improvement of locomotor function in rat spinal cord injury based on epigenetic science. Iran Biomed J 2012;16(2):90-100.
2. Basso DM, Beattie MS, Bresnahan JC. Graded histological and locomotor outcomes after spinal cord contusion using the NYU weight-drop device versus transection. Exp Neurol 1996;139(2):244-56.
3. McDonald JW, Liu XZ, Qu Y, Liu S, Mickey SK, Turetsky D, et al. Transplanted embryonic stem cells survive, differentiate and promote recovery in injured rat spinal cord. Nat Med 1999;5(12):1410-2.
4. Lazarov-Spiegler O, Solomon AS, Zeev-Brann AB, Hirschberg DL, Lavie V, Schwartz M. Transplantation of activated macrophages overcomes central nervous system regrowth failure. FASEB J 1996;10(11):1296-302.
5. Hayase M, Kitada M, Wakao S, Itokazu Y, Nozaki K, Hashimoto N, Takagi Y, Dezawa M. Committed neural progenitor cells derived from genetically modified bone marrow stromal cells ameliorate deficits in a rat model of stroke. J Cereb Blood Flow Metab 2009;29(8):1409-20.
6. Woodbury D, Schwarz Emily J, Ira B. Adult Rat and human bone marrow stromal stem cells differentiate into neurons. J Neurosci Res 2002; 61(2):364-370.
7. Lu L, Chen X, Zhang CW, Yang WL, Wu YJ, Sun L, et al. Morphological and functional characterization of predifferentiation of myelinating glia-like cells from human bone marrow stromal cells through activation of F3/Notch signaling in mouse retina. Stem Cells 2008;26(2):580-90.
8. Ide C, Kitada M, Chakrabortty S, Taketomi M, Matsumoto N, Kikukawa S, et al. Grafting of choroid plexus ependymal cells promotes the growth of regenerating axons in the dorsal funiculus of rat spinal cord: a preliminary report. Exp Neurol. 2001 Feb;167(2):242-51.
9. Sasaki M, Honmou O, Akiyama Y, Uede T, Hashi K, Kocsis JD. Transplantation of an acutely isolated bone marrow fraction repairs demyelinated adult rat spinal cord axons. Glia 2001;35(1):26-34.
10. Lee J, Kuroda S, Shichinohe H, Ikeda J, Seki T, Hida K, et al. Migration and differentiation of nuclear fluorescence-labeled bone marrow stromal cells after transplantation into cerebral infarct and spinal cord injury in mice. Neuropathology 2003;23(3):169-80.
11. Salehi M, Pasbakhsh P, Soleimani M, Abbasi M, Hasanzadeh G, Modaresi MH, et al. Repair of spinal cord injury by co-transplantation of embryonic stem cell-derived motor neuron and olfactory ensheathing cell. Iran Biomed J 2009;13(3):125-35.
12. Ankeny DP, McTigue DM, Jakeman LB. Bone marrow transplants provide tissue protection and directional guidance for axons after contusive spinal cord injury in rats. Exp Neurol 2004;190(1):17-31.
13. García R, Aguiar J, Alberti E, de la Cuétara K, Pavón N. Bone marrow stromal cells produce nerve growth factor and glial cell line-derived neurotrophic factors. Biochem Biophys Res Commun 2004;316(3):753-4.

14. Lamoury FM, Croitoru-Lamoury J, Brew BJ. Undifferentiated mouse mesenchymal stem cells spontaneously express neural and stem cell markers Oct-4 and Rex-1. Cytotherapy 2006;8(3):228-42.

15. Zhao LR, Duan WM, Reyes M, Keene CD, Verfaillie CM, Low WC. Human bone marrow stem cells exhibit neural phenotypes and ameliorate neurological deficits after grafting into the ischemic brain of rats. Exp Neurol 2002;174(1):11-20.

16. Zhang H, Wang JZ, Sun HY, Zhang JN, Yang SY. The effects of GM1 and bFGF synergistically inducing adult rat bone marrow stromal cells to form neural progenitor cells and their differentiation. Chin J Traumatol 2004;7(1):3-6.

17. 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.

18. Takahashi J, Palmer TD, Gage FH. Retinoic acid and neurotrophins collaborate to regulate neurogenesis in adult-derived neural stem cell cultures. J Neurobiol 1999;38(1):65-81.

19. Li WW, Setzu A, Zhao C, Franklin RJ. Minocycline-mediated inhibition of microglia activation impairs oligodendrocyte progenitor cell responses and remyelination in a non-immune model of demyelination. J Neuroimmunol 2005;158(1-2):58-66.

20. Cogle CR, Yachnis AT, Laywell ED, Zander DS, Wingard JR, Steindler DA, Scott EW. Bone marrow transdifferentiation in brain after transplantation: a retrospective study. Lancet 2004;363(9419):1432-7.

21- Yeu IS, Lee HJ, Yi JS, Yang JH, Lee IW, Lee HK. The survival and migration pattern of the bone marrow stromal cells after intracerebra transplantation in rats. J Korean Neurosurg Soc 2004;36:400-4.

22. Hung SC, Cheng H, Pan CY, Tsai MJ, Kao LS, Ma HL. In vitro differentiation of size-sieved stem cells into electrically active neural cells. Stem Cells 2002;20(6):522-9.

23. Bhat NR, Sarlieve LL, Rao GS, Pieringer RA. Investigations on myelination in vitro. Regulation by thyroid hormone in cultures of dissociated brain cells from embryonic mice. J Biol Chem 1979;254(19):9342-4.

24. Almazan G, Honegger P, Matthieu JM. Triiodothyronine stimulation of oligodendroglial differentiation and myelination. A developmental study. Dev Neurosci 1985;7(1):45-54.

25. Kang SM, Cho MS, Seo H, Yoon CJ, Oh SK, Choi YM, Kim DW. Efficient induction of oligodendrocytes from human embryonic stem cells. Stem Cells 2007;25(2):419-24.