تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی انسانی به سلول‌های شبه عصبی در محیط آزمایشگاهی

شیوا نعمتی[۱]
نرگس زارع مهرجردی[۱]
حسین بهاروند[۲و۱*]

۱- تهران پژوهشکده رویان، مرکز تحقیقات علوم سلولی، گروه سلول‌های بنیادی
۲- دانشگاه علم و فرهنگ، گروه زیست‌شناسی تکوینی

*نویسنده مسئول، تهران، صندوق پستی ۴۶۴۴-۱۹۳۹۵، پژوهشکده رویان، گروه سلول‌های بنیادی
تلفن: ۲۲۳۰۶۴۸۵
email: Baharvand@RoyanInstitue.org

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۸۸/۰۲/۲۷ تاریخ پذیرش: ۱۳۸۸/۰۶/۰۱

چکیده

زمینه و هدف: سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از مغز استخوان انسانی توانایی تبدیل به انواع مختلف سلول‌ها از جمله سلول‌های چربی، استخوان و غضروف را دارند. به‌علاوه، این سلول‌ها را می‌توان به انواع سلول‌ها مثل سلول‌های نورونی تمایز داد. روش‌های مختلفی برای تمایز دادن این سلول‌ها به نورون‌ها گزارش شده است. با استفاده از یک روش جدید در صدد تولید پیش‌سازهایی هستیم که در آنها میزان بیان مارکرهای نورونی بیش از مطالعات انجام شده باشد. ***روش بررسی:*** آسپیراسیون مغز استخوان، از استخوان ایلیاک یک مرد بالغ سالم انجام شد. سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان در محیط کشت DMEM حاوی ۱۵٪ سرم جداسازی و کشت شدند. سلول‌های بنیادی مزانشیمی بین پاساژهای ۸-۴ به حالت نوروسفر به مدت هفت روز کشت و با فاکتورهای رشد bFGF, EGF, RA القا شدند و هفت تا ۱۴ روز بر روی پلیت‌های پوشیده شده با لامینین و پلی-L- اورنیتین کشت داده شدند. به‌منظور بررسی میزان بیان مارکرهای اختصاصی سلول‌های بنیادی عصبی از روش‌های فلوسیتومتری و ایمونوسیتوشیمی استفاده گردید. ***یافته‌ها:*** فلوسیتومتری نشان داد که سلول‌ها بعد از القا حدود ۲/۵۲±۹۰٪ مارکر نستین، حدود ۱±۴۱/۱٪ مارکر توبولین و ۱/۰۵±۶۷/۸۲٪ مارکر GFAP را بیان می‌کنند. مطالعات ایمونوسیتوشیمی و تغییرات مورفولوژیکی نیز در راستای نتایج حاصل از آنالیزهای فلوسیتومتری بودند. ***نتیجه‌گیری:*** تیمار سلول‌های مزانشیمی با bFGF, EGF, RA تعداد نورون‌های Tuj1 مثبت را افزایش می‌دهد. این مطالعه نشان داد که سلول‌های مزانشیمی توانایی تمایز به نورون‌ها را در in vitro دارند و این مسئله به نوع روش القا بستگی دارد.

کلمات کلیدی: سلول‌های بنیادی مزانشیمی، سلول‌های نورونی، مارکرهای نورونی، القا، تمایز.

مقدمه

از مهمترین سلول‌های بنیادی (Stem cells) بزرگسالان که امروزه توجه اکثر محققین را به خود جلب کرده است می‌توان به سلول‌های بنیادی مزانشیمی (Mesenchymal stem cells) اشاره کرد. سلول‌های بنیادی مزانشیم در ترمیم بافت‌هایی با منشاء مزانشیمی شرکت می‌کنند و البته این سلول‌ها به عنوان سلول‌های حمایت‌کننده برای سلول‌های هماتوپویتیک در مغز استخوان نیز هستند. این سلول‌ها برای اولین بار توسط Friedenstein و Petrakova از مغز استخوان رت به‌دست آمدند.[۱] در دسترس‌ترین منبعی که برای استفاده از این سلول‌ها پیشنهاد می‌گردد همان مغز استخوان است، گرچه این سلول‌ها از منابع دیگری نیز قابل جداسازی هستند.[۲] جداسازی، تکثیر به نسبت راحت آنها از مزایای استفاده از این نوع سلول‌هاست. علاوه بر این، اکثر مطالعات آزمایشگاهی نشان داده‌اند که این سلول‌ها توانایی گریز از سیستم ایمنی را دارند و پاسخ ایمنی را مهار می‌کنند که هر دوی این ویژگی‌ها از نکات مهم در پیوند و سلول درمانی هستند.[۳و۴] بنابراین، خصوصیت عدم تحریک پذیری سیستم ایمنی آلوژن توسط سلول‌های بنیادی مزانشیمی و دسترسی آسان سلول درمانی توسط این دسته از سلول‌ها را توسعه داده است. تحقیقات اخیر نشان داده است که سلول‌های بنیادی مزانشیمی علاوه بر تمایز به سمت سلول‌های رده مزودرمی توانایی تبدیل به سلول‌های اکتودرم و اندودرم را نیز در محیط آزمایشگاه دارا می باشند.[۵] توانایی تمایزی این سلول‌ها به سلول‌های نورونی در طی چند سال اخیر با استفاده از

روش‌های مختلف القـایی مطالعـه گردیـد، تـاکنون از مـواد مختلـف شیمیایی (القا با مرکاپتواتانول و دی‌متیل‌سولفوکساید) و یا فاکتورهای رشـد سـلولی (BDNF) Brain-Derived Neurotrophic Factor، (BFGF) Basic Fibroblast Growth Factor، Epidermal Growth Factor (EGF)، Platelet-Derived Growth Factor (PDGF) و غیـره استفاده شـده اسـت.[۶و۸-۱۱] در سـال ۲۰۰۰ Sanchez[۱۲] از یـک سـو و woodbury[۱۳] از سویی دیگر، تمایز سلول‌های مزانشیمی به سلول‌های عصبی را در محیط آزمایـشگاه بـا اسـتفاده از مـواد القـایی شـیمیایی مذکور نشان دادند، که این پتانسیل تمایزی توسط Xiang با کشت در آزمایشگاه، با روش‌های مولکولی و وسترن بلات تایید شد[۱۴]

لازم به ذکر است که این سلول‌ها به صورت خودبه‌خودی برخـی از پروتئین‌های اختصاصی سلول‌های عصبی را مثـل پـروتئین نـستین، توبولین III و پروتئین نوروفیلامنت اختصاصی سـلول‌هـای عـصبی را بیان می‌کنند. بنابراین می‌توان از این سلول‌ها برای درمان مبتلایـان بـه ضایعات نخاعی بهره جست، اما ایـن مـسئله کـه چقـدر سـلول‌هـای به‌دست آمده از نظر عملکردی فعال می‌باشند و یا اینکه چه عوارضـی می‌تواند بعد از پیوند به موجود زنـده در پـی داشـته باشـد هنـوز در هاله‌ای از ابهام است.[۸]

نکته بعدی اینکه، از آنجایی‌که پیوند سلول‌هـای بـالغ عـصبی بـه موجود زنده فاقد کارایی لازم برای بهبود ضایعات وارده بـوده و ایـن سلول‌های تمایز یافته قادر به هماهنگ شدن و تـرمیم نمـی‌باشـند، در پیوندهای ترمیمی سیستم اعصاب مرکزی سعی می‌شود از سلول‌هـای پیش‌ساز عصبی که در واقع سلول‌های متعهـد شـده و در عـین حـال نابالغ هستند استفاده گردد. در واقع این پیش‌سـازها بـه سـمت تولیـد سلول‌های عصبی بالغ با هدف تمایز به نورن‌هـای مـورد نظـر و نیـاز برای درمان هدایت شده‌اند و قادر می‌باشند در بدن موجـود زنـده بـه سلول‌های مورد نظر تمایز یافته و در عین ترمیم منطقـه آسـیب دیـده مراحل بلوغ خود را طی کرده و جزیی از منطقه مذکور گردند.

روش بررسی

مطالعه حاضر از نوع مداخله‌ای آینده‌نگـر بـوده و در آزمایـشگاه تمایز سلول‌های بنیادی، پژوهشکده رویان جهاد دانـشگاهی از تـاریخ ۱۳۸۶ تا ۱۳۸۷ به انجام رسیده اسـت. مـواد شـیمیایی مـورد اسـتفاده عبارت بودند از:

DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium, Gibco12800-116), FBS (Fetal Bovine Serum, Gibco 10270-106), Pen/strep (15070-063 GIBCO, 100U/ml), Trypsin/EDTA 0.025% (Gibco, 25300), Ascorbic acid-2-phosphate (sigma, A8960), Dexamethazone (sigma, D4902), Glycerol-2-phsphate (sigma, G9891), Formalin (Sigma, 11-0705), Alizarin red (sigma, A5533), Indomethacin (Sigma, I7378), Oil Red (Sigma.O0625), Neurobasal medium (Gibco, 21103), B27 (Gibco, 17504-044), Insulin-Transferrin-Selenium (Gibco, 51300-044), L-Glutamine (Gibco, 25030), MEM NEAA (Gibco, 11140), Poly-L-Ornithine (sigma, P4957), Laminin (sigma, L2020), para-formaldehyde (sigma, 16500), bFGF (sigma, F0291), EGF (sigma, E9642), Retinoic acid (Sigma, R4643), CD 73 (BD pharmgen 550257), CD45 (MACS 130-080-202), CD105 (R&D, FAB10971P), GFAP (Chemicon MAB3402), Tuj1 (Sigma, T5293), Goat anti-mouse IgG FITC (chemicon AP308F), Triton X100 (9002-93-1) Nestin (chemicon, 92590) در ایـن مطالعـه از سـلول‌هـای بنیـادی مزانـشیمی مـشتق از مغـز اسـتخوان انـسان اسـتفاده شـد. بعـد از آسپیراسیون مغز استخوان از محل استخوان ایلیاک فرد بالغ (که عمـل آسپیراسیون در بیمارستان شهید بهشتی تهران و با رضـایت فـرد اهـدا کننده صورت گرفت)، به منظور جداسازی این سلول‌ها نمونه آسـپیره شده در آزمایشگاه مطـابق روش Fickert و Fiedler[۱] و بـا اسـتفاده از فایکول (شیب غلظت سوکروز) سلول‌های تـک هـسته‌ای بافـت مغـز استخوان جداسازی و در فلاسک‌های مخصوص کشت سلول کـشت داده شدند،[۱] سلول‌های جداسازی شده به محیط کشت DMEM حاوی ۱۵٪ سرم و پنی‌سیلین- استرپتومایسین منتقل شـدند و بعـد از اینکـه سلول‌ها سطح ظرف کشت را به‌صورت یک لایه کاملا پوشش دادنـد، با آنزیم تریپسین- EDTA پاساژ داده شد و بعد از حدود سه پاساژ که جمعیت سلولی یک‌دست شد برای کشت در مقیاس بالا مورد استفاده قرارگرفت[۱و۱۵و۱۶] و بین پاساژهای ۱۰-۷ برای آنالیزهای سلولی مـورد استفاده قرار گرفت. به منظور شناسایی سلول‌هـای بنیـادی مزانـشیمی مورد استفاده در این مطالعه از روش فلوسیتومتری نیـز اسـتفاده شـد. این سلول‌ها از شاخص‌های سطح سلولی CD73, CD105 را بـه میـزان بالایی بیان می‌کنند و در مقابل شاخص سـطح سـلولی CD45 در ایـن سلول‌ها بیان نمی‌شود. مراحل فلوسایتومتری برای آنتی‌ژن اختـصاصی سـلول‌هـای مزانـشیمی (لازم بـه ذکـر اسـت ایـن آنتـی‌ژن‌هـا جـزء آنتی‌ژن‌های سطح سلولی می‌باشند) به شرح زیر بود:

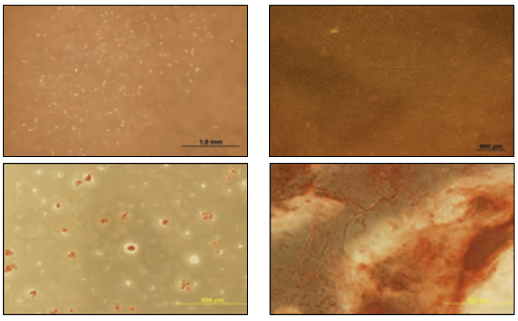
سـلول‌هـا پـس از شستـشو بـا محلـول شستـشوی مخـصوص فلوسیتومتری (که حاوی PBS، ۱٪ سرم و EDTA ۰/۰۵۸٪ می‌باشد) به مدت ۳۰ دقیقه با فرمالدیید ۴٪ فیکس گردید و در مرحلـه بعـدی بـا آنتی‌بادی‌های مورد نظر را که شامل CD73, CD45, CD105 بـوده و بـه

صورت مستقیم به یک آنتی‌بادی ثانویه فلورسانس متصل بودند انکوبه شدند. انکوباسیون آنتی‌بادی CD45 به مدت ۱۰ و آنتی‌بادی‌های CD105, CD73 به مدت ۴۰ دقیقه بود و بعد از فیکس مجدد سلول‌ها با پارافرمالدئید یک درصد توسط دستگاه فلوسایتومتری مدل Bectin Dekenson و نرم‌افزار Win MDI۲/۸ مورد بررسی قرار گرفتند. از آنجایی‌که سلول‌های بنیادی مزانشیمی توانایی تمایز به بافت استخوان و چربی را دارا می‌باشند، در ادامه به منظور حصول اطمینان از توان تمایزی سلول‌های استخراج شده، توانایی تمایزی آنها به سلول‌های استخوانی و چربی مورد بررسی قرار گرفت. برای بررسی تمایز به سلول‌های استخوانی، سلول‌های بنیادی مزانشیمی بعد از تیمار آنزیمی با غلظت $۱۰۰cell/cm^۲$ به پلیت‌های شش خانه منتقل شدند، بعد از هفت روز کشت در محیط معمول کشت سلول‌های بنیادی مزانشیمی که در بالا به آن اشاره شد و زمانی‌که سطح پلیت به‌طور کامل با سلول پوشیده شد محیط کشت مذکور را با محیط القایی حاوی DMEM محتوی ۵۰µg/ml آسکوربیک اسید-۲- فسفات، ۱۰nM دکزامتازون، ۱۰nM، ۲- گلیسرو فسفات بود تعویض گردید و سلول‌ها به مدت ۲۱ روز در این محیط نگهداری شدند، محیط القایی مذکور سه بار در هفته تعویض شد. بعد از اتمام دوره القایی برای اثبات تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی به سلول‌های استخوانی از رنگ‌آمیزی آلزارین رد استفاده گردید که برای این کار سلول‌ها به مدت ۱۰ دقیقه در فرمالین ۱۰٪ فیکس و بعد به مدت ۱۵ دقیقه با رنگ آلزارین رد در دمای اتاق انکوبه شدند. بدین ترتیب سلول‌های تمایز یافته به استخوان به علت وجود رسوبات کلسیمی در حضور این رنگ به رنگ قرمز در می‌آیند. برای بررسی تمایز به سلول‌های چربی، مطابق بالا سلول‌ها آماده‌سازی و بعد از هفت روز کشت در محیط معمول سلول‌های بنیادی مزانشیمی به محیط القایی حاوی DMEM غنی شده با ۵۰µg/ml ایندومتاسین، ۱۰۰nM دگزامتازون منتقل شدند و بعد از سه هفته به سلول‌های چربی تمایز پیدا کردند. به منظور نشان دادن نواحی تمایز یافته به سلول‌های چربی از رنگ‌آمیزی Oil Red استفاده شد در این رنگ‌آمیزی سلول‌ها به مدت ۱۵ دقیقه با رنگ ۰/۵٪ oil red انکوبه شدند. نواحی که به سلول‌های چربی تمایز پیدا کرده بودند به‌علت واکنش تری‌گلیسیریدهای موجود در سلول‌های تمایز یافته به با رنگ oil red به رنگ قرمز در آمدند.[۱۷]

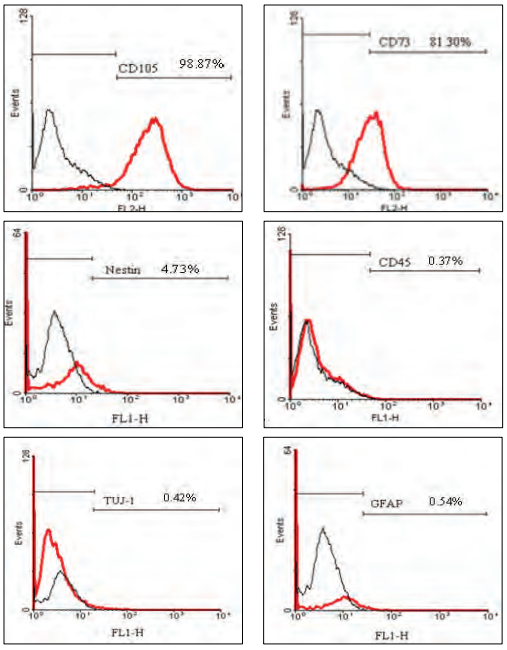
به منظور تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی به سلول‌های عصبی، بعد از تریپسینه کردن این سلول‌ها با غلظت $۱۵×۱۰^۴cell/cm^۲$ به ظرف‌های کشت باکتریایی پوشیده شده با آگارز ۱٪ که حاوی محیط کشت نورونی، ۱۰٪ سرم بود منتقل شده و به مدت هفت روز تحت تیمار با bFGF, hEGF ۲۰ng/ml و رتینوئیک اسید ۲µM قرار گرفتند. (سلول‌ها چند ساعت بعد از انتقال به ظرف‌های مذکور به صورت جمعیت‌های مجتمعی به نام نوروسفر در می‌آیند). محیط کشت مذکور هر دو روز یک‌بار تعویض گردید. در نهایت به منظور بررسی تمایز سلول‌های القا شده بعد از تیمار نوروسفرها با آنزیم تریپسین-EDTA و از هم گسستن ساختارهای مجتمع نوروسفری به صورت سلول‌های منفرد، آنها با غلظت $۱×۱۰^۵cell/cm^۲$-۰/۵ به پلیت‌های شش خانه پوشیده شده با پلی- ال- اورنیتین و لامینین منتقل و در محیط کشت نورونی فاقد فاکتورهای القایی به مدت هفت روز نگهداری گردیدند. مراحل فلوسایتومتری برای آنتی‌ژن اختصاصی سلول‌های عصبی به شرح زیر بود: مراحل آماده‌سازی و فیکس اولیه مشابه پروتکل شناسایی شاخص‌های سطح سلولی می‌باشد با این تفاوت که به دلیل سیتوپلاسمی بودن مارکرهای تحت بررسی نیازمند مراحل بیشتری است، بدین ترتیب بعد از فیکس سلول‌ها به مدت ۱۵ دقیقه با تریتون X-۱۰۰ نفوذپذیر شده و به مدت ۱۵ دقیقه با سرم ۱۰٪ انکوبه شدند. آنتی‌بادهای اولیه شامل پروتئین اسیدی رشته‌ای گلیال (GFAP) و Tuj1 با غلظت ۱/۲۰۰، Nestin با غلظت ۱:۵۰ اضافه شده و بعد از ۶۰ دقیقه نگهداری و شستشو، آنتی‌بادی ثانویه Goat anti-mouse IgG FITC با غلظت ۱/۱۰۰ اضافه و ۳۰ دقیقه نگهداری شد. بعد از تثبیت با پارافرمالدئید یک درصد با دستگاه فلوسایتومتری مدل Bectin Dekenson و نرم‌افزار Win MDI ۲/۸ بررسی شد. فلوسایتومتری سلول‌ها در دو مرحله قبل از القا و بعد از تیمار (نوروسفر) انجام شد. بررسی‌های ایمونوفلورسانس در این مطالعه در دو مرحله نوروسفر (سلول‌ها بعد از تیمار) و سلول‌های پلیت شده در روز هفتم، صورت گرفت. مراحل ایمونوسیتوشیمی به شرح زیر می‌باشد: سلول‌ها با محلول پارافرماالدئید ۴٪ به مدت ۱۰ دقیقه تثبیت شد و با محلول تریتون X-۱۰۰، ۰/۲٪ به مدت پنج دقیقه در دمای اتاق نفوذپذیر و سپس با آنتی‌بادی اولیه Tuj1، GFAP رقیق و ۶۰ دقیقه در دمای $۳۷^{°c}$ انکوبه شد. بعد از شستشو آنتی‌بادی ثانویه Goat anti-mouse IgG FITC با غلظت ۱/۲۰۰ بر علیه آنتی‌بادی‌های اولیه اضافه شده و به مدت یک ساعت در دمای $۳۷^{°c}$ نگهداری گردید.

یافته‌ها

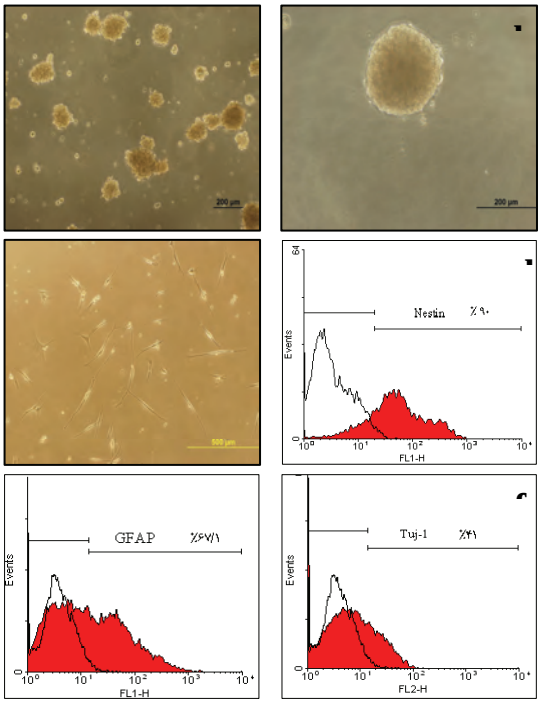
از آنجایی‌که این سلول‌های بنیادی مزانشیمی ۰/۰۰۱ تا ۰/۱ درصد از جمعیت سلول‌های هسته‌دار مغز استخوان انسان را تشکیل می‌دهند،[۲] لذا در کشت‌های اولیه به صورت جمعیت ناخالص می‌باشند و در پاساژهای بعدی به صورت خالص در می‌آیند، در کلونی‌های خالص سلول‌های مزانشیمی از لحاظ مورفولوژیکی شبیه به سلول‌های فیبروبلاست (دوکی شکل) می‌باشند (شکل ۱). در این مطالعه به منظور حصول اطمینان از توان تمایز به رده‌های مزودرمی سلول‌های کشت شده در آزمایشگاه این سلول‌ها به سلول‌های بافت استخوان و چربی تمایز داده شدند و بعد با رنگ‌آمیزی‌های اختصاصی درستی این ادعا به اثبات رسید (شکل ۱). قبلا گفته شد که این سلول‌ها شاخص‌های سطح سلولی CD73, CD105 را به میزان بالایی بیان می‌کنند و در مقابل شاخص سطح سلولی CD45 در این سلول‌ها بیان نمی‌شود. بنابراین در ابتدای کار برای اطمینان از درصد خلوص سلول‌های بنیادی مزانشیمی فلوسیتومتری مارکرهای مذکور انجام گرفت نتایج حاصل نشان داد که آنتی‌بادی CD105 در حدود ۹۸/۸۷٪، CD73 در حدود ۸۱/۳۰٪ سلول‌های مورد آنالیز دارای بیان می‌باشد و این درحالی است که آنتی‌بادی CD45 تنها در ۰/۳۷٪ این سلول‌ها بیان می‌گردد، علاوه بر این بررسی‌های انجام می‌دهند که این سلول‌ها به صورت ذاتی توانایی بیان برخی از مارکرهای اختصاصی سلول‌های عصبی را در حد پائین دارا می‌باشند، که نتایج حاصل در مطالعه حاضر هم نشان داد که مارکرهای اختصاصی نستین در حدود ۴/۷۳٪ و GFAP در حدود ۰/۵۴٪ و توبولین در حدود ۰/۴۲٪ در این سلول‌ها بیان می‌گردند. (شکل ۲) این نتایج می‌تواند نشان‌دهنده آن باشد که سلول‌های تخلیص شده، سلول‌های بنیادی مزانشیمی می‌باشند، نتایج به صورت میانگین تکرارها ارائه شده است. در ادامه بررسی‌های فلوسیتومتری روی ساختارهای نوروسفری بعد از اتمام دوره القایی هفت روزه با bFGF، EGF و رتینوئیک اسید نشان می‌دهد که با افزایش قابل توجه بیان مارکرهای اختصاصی سلول‌های نورونی (مارکر نستین از ۴٪ به ۹۰٪ و توبولین III از ۰/۴۲٪ به ۴۱٪) مواجه هستیم (شکل۳) و بعد از پلیت کردن این ساختارها در ظروف پوشیده شده با لامینین و L- اورنیتین به مدت هفت روز با تغییرات مورفولوژیکی فاحشی از جمله کشیده شدن سیتوپلاسم سلولی و کوچک شدن جسم سلول‌ها مشابه آنچه که در سلول‌ها نورونی اتفاق می‌افتد، مواجه هستیم و در ادامه رنگ‌آمیزی‌های ایمونوفلورسانس، حضور پروتیین‌های اختصاصی سلول‌های نورونی مثل نستین و توبولین و GFAP را در این سلول‌ها نشان داد (شکل ۴). تغییرات مشاهده شده در این سلول‌ها نشان دهنده تغییر ماهیت این سلول‌ها



شکل- ۱: سلول‌های بنیادی مزانشیمی و خصوصیات آنها، الف: a): کشت اولیه سلول‌های تک‌هسته‌ای مغز استخوان b) پاساژهای بعدی سلول‌ها در محیط آزمایشگاه، با درصد خلوص قابل توجه. (بررسی توان تمایزی). c) تمایز سلول‌های مزانشیمی به استخوانی d) تمایز سلول‌های مزانشیمی به چربی.



شکل- ۲: میزان بیان پروتیین a) CD45(۰/۳۷٪)، b) CD105(۹۸/۸۷٪)، c) CD73(۸۱/۳۰٪) در سلول‌های مزانشیمی. d) میزان بیان پروتیین GFAP(۰/۵۴٪) قبل از تیمار، e) میزان بیان پروتیین Nestin(۴/۷۳٪) قبل از تیمار، f) میزان بیان پروتیین Tuj1(۰/۴۲٪) قبل از تیمار

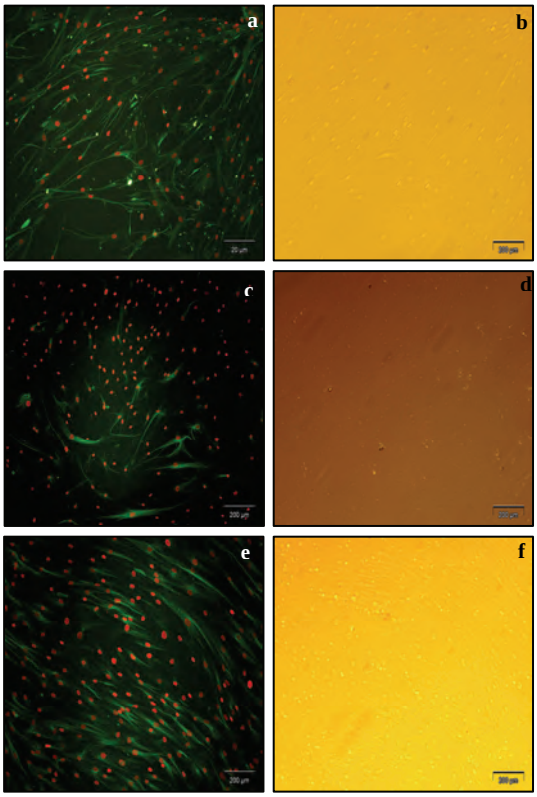


شکل- ۳: a) سلول شبه‌نورونی حاصل از القا سلول بنیادی مزانشیمی b) ساختار نوروسفری حاصل از سلول بنیادی مزانشیمی القا شده در آزمایشگاه. c) سلول شبه‌عصبی مشتق از سلول بنیادی مزانشیمی در حال تمایز به سلول عصبی، هفت روز بعد از تیمار سلولی. d) میزان بیان پروتیین نستین بعد از القا (٪۹۰). e) بیان پروتیین توبولین بعد از القا (٪۴۱). f) میزان بیان پروتیین GFAP بعد از القا (٪۶۷/۱).

بعد از قرار گرفتن در معرض تیمار است. تمایز این سلول‌ها بعد از اتمام تیمار القایی به‌صورت خودبه‌خودی بوده و از هیچ ماده القایی خاصی به‌منظور داشتن جمعیت عصبی بالغ استفاده نگردیده است.

بحث

سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان (hMSC) بسیاری از ویژگی‌های سلول‌های بنیادی را نشان می‌دهند. این سلول‌ها قادرند که در شرایط آزمایشگاهی به انواع دودمان‌های مختلف مزانشیمی همچون سلول‌های چربی، غضروفی، ماهیچه‌ای و غیرمزانشیمی مانند سلول‌های نورونی تمایز یابند.[۱۹] مطالعات مختلفی در زمینه تمایز این سلول‌ها به سلول‌های نورونی صورت گرفته است.[۶و۸-۱۱] اولین تلاش‌ها در زمینه تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی به سلول‌های نورونی توسط woodbury آغاز شد وی این کار را با استفاده از مرکاپتواتانول و DMSO روی سلول‌های بنیادی مزانشیمی انسانی



شکل- ۴: حضور پروتیین‌های اختصاصی سلول نورونی در سلول شبه نورونی مشتق از سلول بنیادی مزانشیمی القا شده: IHC مارکرهای اختصاصی سلول عصبی در حال بلوغ بعد از هفت روز. a) ایمونوفلورسنت مارکرنستین، b) فاز کنتراست همان نمونه، c) ایمونوفلورسنت برای مارکرتوبولین، d) فاز کنتراست همان نمونه، e) ایمونوفلورسنت برای مارکر GFAP، f) فاز کنتراست همان نمونه.

انجام داد و مشاهده کرد که اگر چه تغییرات مورفولوژیکی محسوسی در این سلول‌ها اتفاق می‌افتد ولی این القا روش کارآمدی نمی‌باشد زیرا سلول‌های حاصل از نظر عملکردی غیرفعال بودند.[۱۳] به هر حال با این گزارش اولین نوید در زمینه کاربردی کردن این نوع از سلول‌های بنیادی در درمان ضایعات نخاعی داده شد. در ادامه Guillermo با استفاده از فاکتورهای رشد bFGF, forskolin و تهیه بستر مناسبی از پروتئین‌های L- لیزین و کانکاوالین A و ترکیبی از القاکننده‌های شیمیایی توانست سلول‌های بنیادی مزانشیمی موش صحرایی (Rat) را تا حدود ۶۰٪ به سلول‌های عصبی تمایز دهد. وی مکانیسم مولکولی این تمایز را خاموش شدن بیان ژن‌های مزانشیمی در مقابل شروع بیان ژن‌های نورونی عنوان کرد.[۸] Andreas herman نیز توانستند با استفاده از محیط فاقد سرم و فاکتورهای رشد bFGF,

EGF و کشت این سلول‌ها به صورت سوسپانسیون سلول‌های مجتمعی مشابه ساختارهای نوروسفیری را از سلول‌های مزانشیمی به‌دست آورند. آنها متوجه شد که MSC ها به‌طور عادی ۳-۴٪ پروتئین نستین را در خود بیان می‌کنند و بعد از القایی که با استفاده از فاکتورهای رشد بر روی این سلول‌ها انجام دادند توانستند درصد بیان این پروتئین را به حدود ۸۷٪ افزایش دهند. این در حالی بود که سلول‌های پیش‌ساز به‌دست آمده (که به صورت مجتمع کشت شده بودند) هیچ کدام از پروتئین‌های اختصاصی سلول‌های بالغ نورونی را بیان نمی‌کردند. بعد از این القا سلول‌ها را که به حالت نوروسفیر درآمده بودند به صورت تک لایه کشت دادند و بعد از حدود ۱۰-۲ هفته پاساژ این سلول‌ها و اعمال فاکتورهای تمایزی خاص مثل BDNF و GDNF توانستند تا ۴۵٪ مورفولوژی آستروسیتی و ۴۲٪ نورونی را ایجاد کنند. آنچه به عنوان نکته شاخص این مطالعه اعلام شد این بود که سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از مغز استخوان به مانند سلول‌های بنیادی جنینی قابلیت تبدیل به سلول‌های عصبی را دارند. این گروه از سلول‌های مغز استخوانی را می‌توان مشابه سلول‌های بنیادی عصبی که به‌صورت ساختارهای کروی (نوروسفیری) در می‌آیند، کشت داد و فنوتیپ این سلولها مشابه سلولهای پیش ساز نورونی مشتق از forebrain است که متفاوت از ماهیت اولیه سلول‌های بنیادی مزانشیمی بوده و می‌توان امیدوار بود که نورون‌های حاصل از این روش القایی فعال و عملکردی باشند.[۹] به همین ترتیب مطالعه بر روی روش‌های مختلف القا این دسته از سلول‌های بنیادی به منظور استفاده از آنها در درمان ضایعات نخاعی ادامه پیدا کرد.[۲۲-۲۰و۱۱] با توجه به مطالب ارائه شده و تاریخچه موجود در زمینه تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی به سلول‌های نورونی می‌توان به این نتیجه رسید که در واقع دو نوع القا سریع و طولانی مدت برای القا چنین تمایزی وجود دارد که دسته اول با استفاده از در معرض قرار دادن این سلول‌ها به مدت چند ساعت در مواجه با مواد شیمیایی خاص صورت می‌گیرد و نوع دوم القا که به مدت زمان بیشتری نیاز داشته و با دوامتر هم بوده و سلول را کمتر در معرض استرس قرار می‌دهد روش القا با استفاده از فاکتورهای رشد می‌باشد. نتایج حاصل از بررسی‌های مختلف نشان داد که به‌منظور به‌دست آوردن نتیجه مناسب لازم است که از ترکیبی از فاکتورهای رشد و عوامل شیمیایی برای نیل به این هدف استفاده کرد. لذا با توجه به اینکه در مطالعات گذشته استفاده از فاکتورهای رشد bFGF, EGF در به راه انداختن مسیرهای آبشاری درون سلولی این سلول‌ها در تمایزشان به سلول‌های نورونی به اثبات رسیده بود، این دو فاکتور در روش القایی ذکر شده در مطالعه ما نیز مورد استفاده قرار گرفتند.[۸و۹] از دیگر مسائل حائذ اهمیت در القا تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی به سلول‌های عصبی، تمایز این سلول‌ها به رده سلول‌های آستروسیتی است.[۲۳] با توجه به نتایج حاصل از تحقیقات گزارش شده در زمینه القای سلولهای بنیادی مزانشیمی مشتق از مغز استخوان به سلولهای عصبی و تجربیات موجود در آزمایشگاه، در بررسی حاضر سعی شد تا روش کارامدتری برای القای این سلول‌ها انتخاب گردد، به‌طوری‌که بتوان درصد تولید سلول‌های نورونی را به میزان مناسبی بالا برد. از همین لحاظ با توجه به اینکه ماده رتینوییک اسید منجر به هدایت مسیر تولید سلول‌های نورونی از سلول‌های پیش‌ساز عصب می‌گردد و عدم حضور آن موجب به‌وجود آمدن دودمان‌های آستروسیتی از این سلول‌ها می‌شود[۱۰] لذا رتینوییک اسید نیز به‌عنوان یک ماده القایی به منظور افزایش تولید سلول‌های نورونی در این القا مورد استفاده قرار گرفت. این سلول‌ها علاوه بر اینکه، باید به لحاظ مورفولوژیکی و بیان پروتیین‌های اختصاصی خصوصیات سلول‌های نورونی را داشته باشند در عین حال، فعال بودن آنها هم مسئله قابل تاملی است. این توانایی سلول‌های بنیادی مزانشیمی سبب کاربرد آنها در درمان بیماری‌ها از جمله بیماری‌های تخریب‌کننده سیستم عصبی مرکزی مانند جراحات مغزی یا نخاعی شده است. در مطالعه حاضر، سلول‌های بنیادی مزانشیمی انسانی به منظور به دست آوردن سلول‌های نورونی با استفاده از فاکتورهای رشد bFGF، EGF و رتینوئیک اسید به مدت هفت روز تحت تیمار القایی قرار گرفتند، لازم به ذکر است که سلول‌های مزانشیمی مورد مطالعه بعد از تیمار آنزیمی با غلظت سلولی ذکر شده در بخش مواد و روش‌ها به پلیت‌هایی که سطح چسبنده آنها با آگارز پوشیده شده بود منتقل شدند و در نتیجه بعد از گذشت حدودا دو ساعت ساختارهای اسفیری شکل گرفتند که این ساختارها به مدت هفت روز تحت تیمار القایی ذکر شده قرار داشته‌اند، یکی دیگر از تفاوت‌های شاخص این مطالعه در مقایسه با مطالعات قبلی حذف مرحله آغازین برای تشکیل ساختارهای اسفیری می‌باشد که منجر به انجام سریع‌تر القا شده و در ضمن به جلو انداختن مراحل تمایزی می‌گردد از اینرو می‌توان بیان

فاکتورهای اختصاصی سلول‌های عصبی در آنالیزهای بعد از روز هفتم تیمار با فاکتورهای رشد مورد مشاهده قرار داد. برخی از تحقیقات اخیر بیان فاکتورهایی مثل GFAP و Tubulin-III را در مراحل پیش‌سازی سلول‌های عصبی به اثبات رسانیده‌اند.[۲۵] در بررسی‌های تمایزی انجام شده تمایز سلول‌ها کاملا به‌صورت خودبه‌خودی و بدون دخالت هیچ فاکتور القایی دیگری بوده است. نتایج حاصل از بررسی‌های انجام شده از طریق فلوسیتومتری در مرحله نورسفری نشان داد که با استفاده از این روش القایی میزان بیان مارکرهای پیش‌ساز عصبی مثل نستین به میزان قابل توجهی (از ۴٪ به ۹۰٪) افزایش داشته است و علاوه بر این مسئله، میزان بیان پروتئین‌های شاخص سلول‌های نورونی که آغاز بیان آنها از مراحل پیش‌سازی هم قابل مشاهده است مثل توبولین III نیز (۴۱٪) افزایش یافته است، البته علاوه بر پروتیین‌های ذکر شده بیان پروتیین شاخص سلول‌های گلیالی مثل GFAP نیز افزایش نشان داده است (میانگین بیان پروتیین GFAP در این مطالعه حدود ۶۷٪ بود). بررسی‌های آماری انجام شده نیز نشان داد که در بین نورسفرهای القا شده و پلیت شده تحت بررسی، از نظر بیان مارکرهای اختصاصی سلول‌های عصبی تفاوت معنی‌داری وجود ندارد. این امر نشان می‌دهد که افزایش بیان مارکرهای عصبی در سلول‌ها تصادفی نبوده و دارای روند منطقی است. انجام بررسی‌های بیشتر در شناسایی هویت واقعی سلول‌های القا شده و توانمندی‌های آنها ضروری به‌نظر می‌رسد. این امر با ارزیابی الکتروفیزیولوژی سلول‌ها، بررسی خصوصیات غشا، مشخص کردن درصد تشابه با نورون واقعی و یا روش‌های وسترن‌بلات و سایر روش‌های مولکولی در ارزیابی بیان پروتیین‌های اختصاصی صورت می‌گیرد. در نهایت با پیوند این سلول‌ها به حیوانات آزمایشگاهی مدل‌سازی شده و ردیابی آنها بعد از پیوند به درک مناسبی از کارا بودن این روش القایی و استفاده از سلول‌های حاصل از آن در درمان ضایعات نخاعی دست پیدا کرد.

References

1. Friedenstein AJ, Piatetzky-Shapiro II, Petrakova KV. Osteogenesis in transplants of bone marrow cells. *J Embryol Exp Morphol* 1966; 16(3):381-90.
2. Baksh D, Song L, Tuan RS. Adult mesenchymal stem cells: characterization, differentiation, and application in cell and gene therapy. *J Cell Mol Med* 2004; 8(3):301-16.
3. Khodadadi L, Baharvand H. Immunogenicity of stem cells. *Yakhteh J* 2007; 8(32):276-303.
4. Le Blanc K, Tammik C, Rosendahl K, Zetterberg E, Ringdén O. HLA expression and immunologic properties of differentiated and undifferentiated mesenchymal stem cells. *Exp Hematol* 2003;31(10):890-6.
5. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 1999; 284(5411):143-7.
6. Song L, Tuan RS. Transdifferentiation potential of human mesenchymal stem cells derived from bone marrow. *FASEB J* 2004; 18(9):980-2.
7. Ringe J, Kaps C, Schmitt B, Büscher K, Bartel J, Smolian H, et al. Porcine mesenchymal stem cells. Induction of distinct mesenchymal cell lineages. *Cell Tissue Res* 2002;307(3):321-7.
8. Muñoz-Elías G, Woodbury D, Black IB. Marrow stromal cells, mitosis, and neuronal differentiation: stem cell and precursor functions. *Stem Cells* 2003; 21(4):437-48.
9. Hermann A, Gastl R, Liebau S, Popa MO, Fiedler J, Boehm BO, et al. Efficient generation of neural stem cell-like cells from adult human bone marrow stromal cells. *J Cell Sci* 2004; 117(Pt 19):4411-22.
10. Gregg CT, Shingo T, Weiss S. Neural stem cells of the mammalian forebrain. *Symp Soc Exp Biol* 2001; (53):1-19.
11. Lei Z, Yongda L, Jun M, Yingyu S, Shaoju Z, Xinwen Z, et al. Culture and neural differentiation of rat bone marrow mesenchymal stem cells in vitro. *Cell Biol Int* 2007; 31(9):916-23.
12. Sanchez-Ramos J, Song S, Cardozo-Pelaez F, Hazzi C, Stedeford T, Willing A, et al. Adult bone marrow stromal cells differentiate into neural cells in vitro. *Exp Neurol* 2000; 164(2):247-56.
13. Woodbury D, Schwarz EJ, Prockop DJ, Black IB. Adult rat and human bone marrow stromal cells differentiate into neurons. *J Neurosci Res* 2000; 61(4):364-70.
14. Zhang ZX, Guan LX, Zhang K, Wang S, Cao PC, Wang YH, et al. Cytogenetic analysis of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells passaged in vitro. *Cell Biol Int* 2007; 31(6):645-8.
15. Phinney DG, Baddoo M, Dutreil M, Gaupp D, Lai WT, Isakova IA. Murine mesenchymal stem cells transplanted to the central nervous system of neonatal versus adult mice exhibit distinct engraftment kinetics and express receptors that guide neuronal cell migration. *Stem Cells Dev* 2006; 15(3):437-47.
16. Friedenstein AJ, Piatetzky-Shapiro II, Petrakova KV. Osteogenesis in transplants of bone marrow cells. *J Embryol Exp Morphol* 1966; 16(3):381-90.
17. Eslaminejad MB, Nikmahzar A, Taghiyar L, Nadri S, Massumi M. Murine mesenchymal stem cells isolated by low density primary culture system. *Dev Growth Differ* 2006; 48(6):361-70.
18. Lu P, Blesch A, Tuszynski MH. Induction of bone marrow stromal cells to neurons: differentiation, transdifferentiation, or artifact? *J Neurosci Res* 2004; 77(2):174-91.
19. Deng J, Petersen BE, Steindler DA, Jorgensen ML, Laywell ED. Mesenchymal stem cells spontaneously express neural proteins in culture and are neurogenic after transplantation. *Stem Cells* 2006; 24(4):1054-64.
20. Cízková D, Rosocha J, Vanický I, Jergová S, Cízek M. Transplants of human mesenchymal stem cells improve functional recovery after spinal cord injury in the rat. *Cell Mol Neurobiol* 2006; 26(7-8):1167-80.
21. Lee KH, Suh-Kim H, Choi JS, Jeun SS, Kim EJ, Kim SS, et al. Human mesenchymal stem cell transplantation promotes functional recovery following acute spinal cord injury in rats. *Acta Neurobiol Exp (Wars)* 2007; 67(1):13-22.
22. Vawda R, Woodbury J, Covey M, Levison SW, Mehmet H. Stem cell therapies for perinatal brain injuries. *Semin Fetal Neonatal Med* 2007; 12(4):259-72.
23. Cízková D, Rosocha J, Vanický I, Jergová S, Cízek M. Transplants of human mesenchymal stem cells improve functional recovery after spinal cord injury in the rat. *Cell Mol Neurobiol* 2006;26(7-8):1167-80.
24. Cipriani S, Bonini D, Marchina E, Balgkouranidou I, Caimi L, Grassi Zucconi G, et al. Mesenchymal cells from human amniotic fluid survive and migrate after transplantation into adult rat brain. *Cell Biol Int* 2007; 31(8):845-50.
25. Bajpai R, Coppola G, Kaul M, Talantova M, Cimadamore F, Nilbratt M, et al. Molecular stages of rapid and uniform neuralization of human embryonic stem cells. *Cell Death Differ* 2009; 16(6):807-25.

Tehran University Medical Journal; Vol. 67, No. 8, Nov 2009: 527-534

Differentiation of human bone marrow mesenchymal stem cells to neural- like cells in vitro

Nemati Sh.[1]
Zare Mehrjerdi N.[1]
Baharvand H.[1,2*]

1- Department of Stem cells, Cell Science Research Center, Royan Institute (ACECR)
2- Department of Developmental Biology, University of Science and Culture (ACECR)

Received: May 17, 2009 Accepted: August 28, 2009

Abstract

***Background*:** Human bone marrow mesenchymal stem cells (hMSCs) can differentiate into several types of mesenchymal cells, including osteocytes, chondrocytes, and adipocytes, but can also differentiate into non-mesenchymal cells, such as neural cells, under appropriate experimental conditions. Until now, many protocols for inducing neuro-differentiation in MSCs in vitro have been reported. In this study, we induced differentiation into neural phenotype in the hMSCs population by new protocol. In this treatment, hMSCs could express neural markers more than other reports, associating with remarkable morphological modifications.

***Methods*:** The Bone marrow specimens were aspirated from the iliac crest of normal men. hMSCs were isolated and cultured in DMEM containing 15% FBS. Between 4-8 passages conversion of hMSCs into neurosphere-like structures and induction this cells to nerve precursors in the low-attachment plastic bacterial dishes with bFGF, EGF & RA were initiated. After seven days terminal neural differentiation was initiated by plating the cells on poly-L-ornithin and Laminin coated dishes. Cells were differentiated for 7-14 days. We used flowcytometry and immunocytochemistry analysis for assessment of specific neural stem cell markers in induced cells.

***Results*:** Flowcytometery analysis showed that after induction, 90±2.52 percent of the cells will express neuronal marker Nestin and about 41±1 percent of the cells will express Tuj-1 and about 67±1.05 percent of the cells will express GFAP. Immunocytochemistry and morphologically modifications revealed the same results.

Conclusion: Results showed that hMSCs treatment with bFGF, EGF & RA the number of Tuj1 neurons. These data confirmed that hMSCs can exhibit neuronal differentiation potential in vitro, depending on the protocols of inducement.

Keywords: Mesenchymal stem cells, neural cells, markers, induction, differentiation.

*Corresponding author: Royan Institute (ACECR), P.O.Box:19395-4644, Tehran, Iran.
Tel: +98-21-22306485
email: Baharvand@RoyanInstitue.org