فصلنامه دانش و تندرستی، دوره ۷، شماره ۲، تابستان ۱۳۹۱
دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی شاهرود

مقاله پژوهشی

القای تمایز بن‌یاخته‌های مزانشیمی خون بندناف انسان به رده یاخته‌های شبه‌هپاتوسیتی در شرایط آزمایشگاهی

معصومه قادری*[۱] (Ph.D.)، عبدالامیر علامه[۲] (Ph.D.)، مسعود سلیمانی[۳] (Ph.D.)، مهدی فروزنده‌مقدم[۴] (Ph.D.)

۱- دانشگاه علوم پزشکی شاهرود- دانشکده پزشکی- استادیار. ۲- دانشگاه تربیت مدرس- دانشکده علوم پزشکی- استاد. ۳- دانشگاه تربیت مدرس- دانشکده علوم پزشکی- دانشیار. ۴- دانشگاه تربیت مدرس- دانشکده علوم پزشکی- دانشیار.

تاریخ دریافت: ۱۳۸۹/۹/۲۸، **تاریخ پذیرش:** ۱۳۹۰/۵/۱۵

چکیده

مقدمه: *بازسازی بافت در محیط آزمایشگاه با استفاده از یاخته‌های بنیادی، یکی از موضوعات مورد علاقه محققان می‌باشد. بافت کبد نیز از این امر مستثنا نیست. هدف از این مطالعه، تولید یاخته‌های شبه‌هپاتوسیتی از بن‌یاخته‌های مزانشیمی خون بندناف می‌باشد.*

مواد و روش‌ها: *بن‌یاخته‌های مزانشیمی، از خون بندناف (با کسب رضایت از مادران) جدا شدند و سپس ایمنوفنوتیپ بن‌یاخته‌های جداشده با فلوسایتومتری و توانایی تمایز آن‌ها با آزمون‌های تمایز در محیط آزمایشگاه بررسی شدند. درنهایت، بیان مارکرهای اختصاصی کبد به‌واسطه واکنش‌های زنجیره‌ای پلیمراز- معکوس (RT-PCR) آنالیز شدند.*

نتایج: *بن‌یاخته‌های مزانشیمی (Mesenchymal Stem Cells) جداشده از خون بندناف، توانایی تمایز به سویه مزودرمی را داشتند. چنانچه این بن‌یاخته‌ها در شرایط مناسب کشت داده شوند، قادر به القای ژن‌های کبدی؛ مانند: آلبومین (Alb)، آلفافیتوپروتئین (AFP)، سیتوکراتین‌های ۱۸ و ۱۹ (CK۱۸، CK۱۹) و آلفا-۱-آنتی‌تریپسین (AA) هستند. همچنین در پی القای تمایز به‌سمت هپاتوسیت‌ها، بن‌یاخته‌های مزانشیمی خون بندناف، پروتئین‌های آلبومین و آلفافیتوپروتئین را تولید می‌کنند.*

نتیجه‌گیری: *بن‌یاخته‌های مزانشیمی خون بندناف، توانایی تمایز به سویه هپاتوسیتی را دارند؛ لذا ابزار مناسبی در درمان‌های یاخته‌ای با هدف بازسازی بافت کبد به‌شمارمی‌روند.*

واژه‌های کلیدی: خون بندناف، بن‌یاخته‌های مزانشیمی، تمایز، هپاتوسیت.

Original Article **Knowledge & Health 2012;7(2):50-55**

In Vitro Hepatocyte-Like Cells Differentiation of Human Umbilical Cord Blood Mesenchymal Stem Cells

Masoumeh Ghaderi[1*], Abdolamir Allameh[2], Masoud Soleimani[3], Mahdi Forozande Moghadam[4]

1- Assistant Professor, Faculty of Medicine, Shahroud University of Medical Sciences, Shahroud, Iran. 2- Professor, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran. 3- Associate Professor, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran. 4- Associate Professor, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran.

Abstract:

Introduction: *Using stem cells for in vitro tissue regeneration is one of the most interesting fields of research. Liver regeneration is not an exceptional area. The main objective of this study was the production of hepatocyte- like cells from the umbilical cord blood mesenchymal stem cells (MSCs).*

Methods: *Cells were isolated from UCB, upon a written informed consent obtained from donor mothers. The stem cells immunophenotype was analyzed using flow cytometry and multi-lineage differentiation potential was evaluated by means of in vitro differentiation assays. Finally, the expression of hepatocyte-specific markers was verified using reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR).*

Results: *The isolated UCB-MSCs had mesodermal differentiation capacity. If UCB-MSCs are cultured in appropriate conditions, they are able to induce hepatic-associated genes, such as albumin (Alb),α-fetoprotein (AFP), cytokeratins 18, 19 (CK18, CK19) and α-1 antitrypsin (AA). Moreover, UCB- MSCs produced albumin and α-fetoprotein upon in vitro induction of hepatocyte differentiation.*

Conclusion: *Mesenchymal stem cells from human umbilical cord blood are capable of tissue-specific commitment along hepatogenic lineage, proposing these cells as suitable tool for cell-based applications aimed at liver regeneration.*

Keywords: Umbilical cord blood, Mesenchymal stem cells, Differentiation, Hepatocyte.

Conflict of Interest: No
Received: 19 December 2010 Accepted: 6 August 2011

***Corresponding author:** M. Ghaderi, **Email:** ghaderim20@gmail.com*

***نویسنده مسئول:** شاهرود، میدان هفت تیر، دانشگاه علوم پزشکی شاهرود، دانشکده پزشکی، **تلفن:** ۳۳۹۵۰۵۴-۰۲۷۳، **E- mail:** ghaderim20@gmail.com

Archive of SID

www.SID.ir

مقدمه

اگرچه پیوند کبد راهکاری مناسب در درمان نقایص کبدی به‌شمار می‌رود، اما به‌دلیل پاره‌ای مسائل، تلاش‌ها در جهت جایگزین‌کردن روش‌های درمانی مؤثرتر ادامه دارد. ازجمله مسائلی که بیماران کبدی با آن مواجه هستند، تعداد کم اهداکنندگان عضو، پس‌زدن پیوند توسط سیستم ایمنی، تداوم سرکوب ایمنی می‌باشد. شاید بتوان گفت که امروزه مهندسی بافت و پیوند هپاتوسیت‌ها ازجمله امیدهای درمانی نوین برای حل این معضل به‌شمارمی‌روند، هرچند که خود نیز در ابتدای راه تحقیق قرار دارند (۱ و ۲). باتوجه به ظرفیت منحصربه‌فرد بن‌یاخته‌ها در نوسازی (Self renewal) و نیز توانایی آن‌ها در تبدیل‌شدن به انواعی از یاخته‌های تخصص‌یافته، استفاده از آن‌ها در ترمیم یا بازسازی بافت‌ها و اندام‌های آسیب‌دیده توجه زیادی را به خود معطوف کرده است (۳، ۴ و ۵). اولین گزارش مبنی‌بر تولید هپاتوسیت‌ها از یاخته‌های مغز استخوان را پترسون و همکاران در سال ۱۹۹۹ ارائه کردند. وی با استفاده از سه راهکار مختلف نشان داد که یاخته‌های مغز استخوان در تولید کبد نقش دارند (۶). بن‌یاخته‌هایی که قادر به تولید هپاتوسیت‌ها می‌باشند، هم در داخل کبد و هم در بافت‌های خارج کبدی وجود دارند (۷). گزارش‌هایی از مشتق‌شدن سلول‌های شبه‌هپاتوسیتی از منابع غیرکبدی وجود دارد (۸، ۹، ۱۰، ۱۱ و ۱۲). به‌طور ایده‌آل، یاخته‌های مورد استفاده در درمان کبد باید در محیط آزمایشگاه به‌طور گسترده تکثیر شوند و به سلول‌های بالغ کبدی تمایز یابند. در محیط بدن، این یاخته‌ها باید کم‌ترین واکنش ایمنی، توانایی جایگزینی بافت کبدی را داشته باشند (۱۳). به‌دلیل طرح مسائل اخلاقی درباره بن‌یاخته‌های رویانی انسان، استفاده از بن‌یاخته‌های بالغ در موارد تحقیقاتی و درمانی در اولویت می‌باشد (۱۴).

در زمان بارداری، جنین ازطریق بندناف به جفت متصل است که در هنگام تولد، بندناف بریده شده و جفت نیز از بدن مادر خارج می‌شود. مقداری از خون جنین در بندناف باقی می‌ماند که معمولاً این خون و جفت، دور انداخته می‌شوند (۱۵). شناسایی یاخته‌های خون‌ساز در خون بندناف به سال ۱۹۷۴ برمی‌گردد که کنادتزون به‌دنبال ارائه گزارشی دالّ بر وجود یاخته‌های خون‌ساز تشکیل‌دهنده کلونی در خون بندناف، در قسمت بحث مقاله خود، پیشنهاد کرد که این یاخته‌های خون‌ساز احتمالاً می‌توانند جایگزین مؤثری برای مغز استخوان به‌شمارروند (۱۶ و ۱۷). اما مطالعاتی که به‌طورقطعی وجود آن‌ها را تأیید کرد در سال ۱۹۸۲ در پی بحث بین بروکس‌میر و بویسه انجام شد. در سال ۱۹۸۹، گلوکمن و همکاران اولین پیوند خون بندناف را به نوزاد مبتلابه سندرم فانکونی انجام دادند (۱۸ و ۱۹). خون بندناف به‌دلیل داشتن قابلیت‌هایی چون جمع‌آوری راحت و بدون درد، امکان انجماد، کم‌بودن میزان واکنش پیوند علیه میزبان (Graft-versus-host disease)، طویل‌تربودن تلومراز بن‌یاخته‌های آن در مقایسه با مغز استخوان، جایگزین مناسبی برای مغز استخوان به‌شمارمی‌رود. امروزه شیوه‌هایی برای انجماد و استفاده آتی از خون بندناف نیز طراحی شده است (۱۶).

انواع مختلفی از بن‌یاخته‌ها را براساس شرایط متفاوت کشت، از خون بندناف جدا کرده‌اند که عبارت‌اند از: بن‌یاخته‌های مزانشیمی (Mesenchymal stem cells)، بن‌یاخته‌های خون‌ساز (Hematopoietic stem cells) بن‌یاخته‌های سوماتیکی نامحدود (Unrestricted somatic stem cells) و بن‌یاخته‌های شبه‌رویانی مشتق از خون بندناف (Cord-blood derived embryonic-like stem cells). در توجیه حضور بن‌یاخته‌های مزانشیمی در خون بندناف عنوان شده است که دلیل آن وجود جریان خون جنینی نارس، بین کبد و مغز استخوان است که در پی آن بن‌یاخته‌های مزانشیمی چنداستعدادی در خون بندناف مشاهده می‌شوند (۲۰). این یاخته‌ها را به غیر از خون بندناف، از بافت‌های مختلف نیز جدا نموده‌اند. تعداد آن‌ها در مغز استخوان افراد بالغ یک عدد MSC به‌ازای هر ۳۴۰۰۰ یاخته هسته‌دار است (۲۱ و ۲۲).

در این مطالعه تلاش می‌شود که از بن‌یاخته‌های مزانشیمی خون بندناف، که نسبت به سایر منابع بن‌یاخته در دسترس‌تر می‌باشند، یاخته‌های شبه‌هپاتوسیتی تولید شود تا بتوان از آن‌ها در مطالعاتی مانند سم‌شناسی و مهندسی بافت استفاده نمود. ضمن جداسازی یاخته‌های مزانشیمی از خون بندناف انسان و تعیین ویژگی یاخته‌های جداشده، ویژگی هپاتوسیت‌های تمایزی به‌دست‌آمده نیز بررسی شده است.

مواد و روش‌ها

کلیه مواد و ترکیبات مورد نیاز این تحقیق از شرکت‌های معتبر خارجی تهیه شد و فقط رده هپاتومای انسانی hepG2 از انستیتو پاستور (ایران) تهیه شد.

جداسازی بن‌یاخته‌های مزانشیمی خون بندناف: خون بندناف مربوط به نوزادان تازه‌متولدشده با بافر PBS رقیق شد. با سانتریفیوژ، لایه یاخته‌های تک‌هسته‌ای به‌دست‌آمد. یاخته‌های تک‌هسته‌ای جداشده با محیط کشت DMEM حاوی FBS ۱۵٪، گلوتامین، استرپتومایسین و پنی‌سیلین مخلوط شدند و در انکوباتور کشت شدند. پس از طی ۲ تا ۳ هفته، بن‌یاخته‌های شبه‌فیبروبلاستی مزانشیمی در کف فلاسک کشت باقی ماندند (۲۳).

آنالیز فلوسایتومتری بن‌یاخته‌های مزانشیمی: ۲×۱۰^{۵} یاخته تریپسینه‌شده در هر کدام از لوله‌های آزمودنی و شاهد منفی تقسیم و سانتریفیوژ گردید. رسوب به‌دست‌آمده، در سرم انسانی حل شد و همراه با آنتی‌بادی‌های منوکلونال موشی ضدّ انسان کنژوگه با فلورسنت ایزوتیوسیانیت CD44، CD105، CD90، CD34 و کنژوگه با فیکواریترین CD166 و CD45 سانتریفیوژ شدند.

Archive of SID

www.SID.ir

جدول ۱- مشخصات پرایمرهای مورد استفاده برای PCR ژن‌های کبدی در بن‌یاخته‌های خون بندناف و هپاتوسیت‌های حاصل از آن‌ها

ژن	توالی پرایمر	دمای هیبریدشدن (°C)	اندازه محصول (bp)
Alb	5′-CTT TGG CAC AAT GAA GTG GGT AAC-3′ (fwd) 5′-GCA GTC AGC CAT TTC ACC ATA GG-3′ (rev)	۶۱	۲۰۸
AFP	5′-GCA GTC AGC CAT TTC ACC ATA GG-3′ (fwd) 5′-CAT AGC GAG CAG CCC AAA GAA GAA-3′ (rev)	۵۸	۲۵۲
CK18	5′-TGG CGA GGA CTT TAA TCT TGG-3′ (fwd) 5′-CTC AGA ACT TTG GTG TCA TTG G-3′ (rev)	۵۵	۱۲۸
CK19	5′-TGC GTG ACA TGC GAA GCC AAT-3′ (fwd) 5′-ACC TCC CGG TTC AAT TCT TCA-3′ (rev)	۶۰	۲۱۴
G6P	5′-TCA TAG ACA AGG TAC GGT TCC-3′ (fwd) 5′-GCC TAA GGT TGT TGA TGT AGC-3′ (rev)	۶۸	۱۴۰
AA	5′-AGA CCC TTT GAA GTC AAG GAC ACC-3′ (fwd) 5′-CCA TTG CTG AAG ACC TTA GTG ATG-3′ (rev)	۵۷	۴۰۰
GAPDH	5′-CTC TCT GCT CCT CCT GTT CG-3′ (fwd) 5′-ACG ACC AAA TCC GTT GAC TC-3′ (rev)	۵۶	۱۱۴

رسوب یاخته‌ها با محلول پارافرمالدئید تثبیت گردید. آنالیز نمونه‌ها با دستگاه فلوسایتومتری انجام گرفت و هیستوگرام‌ها رسم شدند.

القا تمایز بن‌یاخته‌های مزانشیمی به رده استئوبلاست و آدیپوسیت: برای تمایز به استئوبلاست‌ها، یاخته‌ها به‌مدت ۱۴ روز تحت تأثیر محیط کشت تمایزی شامل DMEM- High Glucose حاوی FBS همراه با فاکتورهای القاکننده تمایز، شامل دگزامتازون، آسکوربات- فسفات و بتاگلیسروفسفات قرار گرفت. ته‌نشست‌های کلسیم با رنگ‌آمیزی توسط کیت آلیزارین رد-S و با استفاده از میکروسکوپ فاز کنتراست بررسی شد (۲ و ۲۴). در القای تمایز به رده آدیپوسیتی، از محیط کشت DMEM- High Glucose حاوی FBS دارای فاکتورهای اندومتاسین، انسولین و ایزوبوتیل متیل زانتین استفاده شد. در پایان روز ۱۴، قطرات چربی موجود در یاخته‌ها با کیت رنگ‌آمیزی اویل رد-O رنگ شدند (۲ و ۲۴).

تمایز بن‌یاخته‌های مزانشیمی به یاخته‌های شبه‌هپاتوسیتی: به یاخته‌های مزانشیمی حاصل از پاساژ سوم در چاهک‌های ظرف کشت محیط کشت تمایزی شامل DMEM، FBS، HGF و دگزامتازون اضافه شد. از هفته دوم، ترکیب انکوستاتین M به محیط تهیه‌شده اضافه شد.

جدول ۲- شرایط مورد استفاده برای PCR ژن‌های کبدی

شرایط	دما	زمان
۱- جداشدن ابتدایی دو رشته	۹۴°C	۲ دقیقه
۲- جداشدن دو رشته	۹۴°C	۴۰ ثانیه
۳- هیبرید شدن	بسته به نوع ژن (جدول ۱)	۳۰ ثانیه
۴- پیشروی	۷۲°C	۲ دقیقه
۵- ۳۰ سیکل از مراحل ۲ تا ۴		
۶- پیشروی نهایی	۷۲°C	۱۰ دقیقه

بررسی ایمنوسیتوشیمی: در پایان روز ۱۴، تمایز یاخته‌ها با استفاده از پارافرمالدئید تثبیت شدند. با تریتون X-۱۰۰ نفوذپذیری یاخته‌ها زیاد شد. آنتی‌بادی‌های منوکلونال اولیه اضافه شد و انکوبه گردید. آنتی‌بادی ثانویه کنژوگه‌شده با FITC و PE به یاخته‌ها اضافه شد و نمونه‌ها در یخچال قرار گرفت. رنگ‌آمیزی هسته‌ها با محلول آبی DAPI در تاریکی صورت گرفت و نمونه‌ها با میکروسکوپ فلورسنت معکوس بررسی شدند.

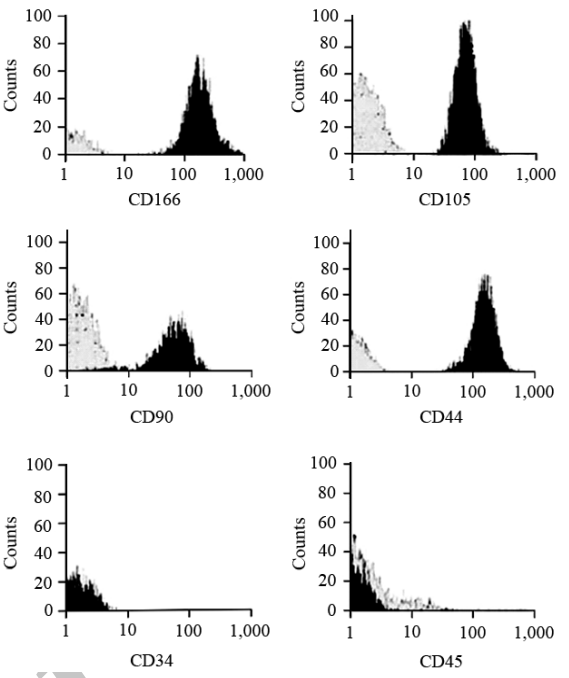
واکنش‌های زنجیره‌ای پلیمراز- معکوس کیفی (RT-PCR): مراحل استخراج RNA براساس دستورالعمل کیت خریداری‌شده انجام شد. سنتز cDNA براساس دستورالعمل کیت RevertAid TM First Strand cDNA Synthesis Kit انجام شد. مشخصات پرایمرهای مورد استفاده در جدول ۱ آورده شده است. PCR نمونه‌ها طبق برنامه مندرج در جدول ۲ انجام شد. نمونه‌های DNA تکثیرشده، روی ژل آگارز الکتروفورز شد و با اتیدیوم برماید رنگ‌آمیزی شد و با استفاده از دستگاه UV ترانس لومیناتور عکس‌برداری شد.

نتایج

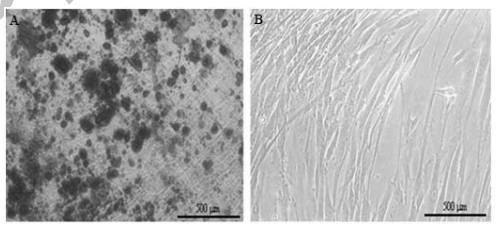
تعیین ویژگی بن‌یاخته‌های مزانشیمی: آنالیز فلوسایتومتری (شکل ۱) بیان مارکرهای اختصاصی شامل CD44، CD105، CD166 و CD90 را در سطح بن‌یاخته‌های مزانشیمی جداشده از خون بندناف انسان نشان داد. درحالی‌که مارکرهای ویژه یاخته‌های خون‌ساز ازجمله CD45 و CD34 در این یاخته‌ها بیان نشدند. رنگ‌آمیزی اختصاصی آلیزارین رد-S، تجمع رسوبات کلسیم را - که مشخصه یاخته‌های استئوبلاستی است- نشان داد (شکل ۲). همان‌گونه که در شکل ۳ مشخص است، وجود رنگ اویل رد- O نیز در یاخته‌های تمایزی، نشانه حضور قطرات

Archive of SID

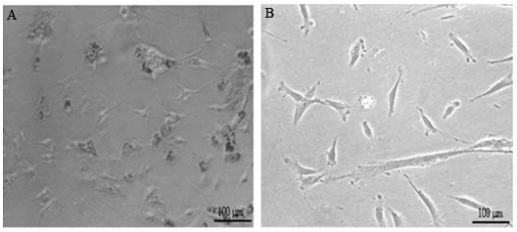
www.SID.ir



شکل ۱- ایموموتایپینگ بن‌یاخته‌های مزانشیمی خون بندناف انسان با فلوسایتومتری



شکل ۲- تمایز یاخته‌های مزانشیمی به رده یاخته‌های استخوانی. بن‌یاخته‌های تمایز یافته به‌سمت استخوان نسبت‌به رنگ‌آمیزی آلیزارین رد-S مثبت هستند (A) و یاخته‌های تمایز نیافته نسبت‌به این رنگ‌آمیزی منفی هستند (B).

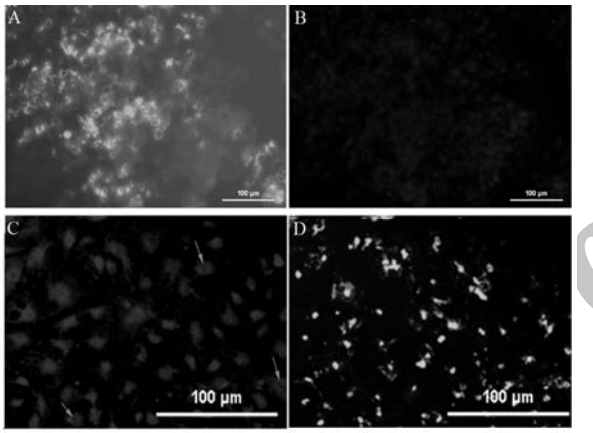


شکل ۳- تمایز یاخته‌های مزانشیمی به رده یاخته‌های چربی. بن‌یاخته‌های تمایزیافته به یاخته چربی نسبت‌به رنگ‌آمیزی اویل رد اُ مثبت هستند (A) و یاخته‌های تمایزنیافته نسبت‌به این رنگ‌آمیزی منفی هستند (B).

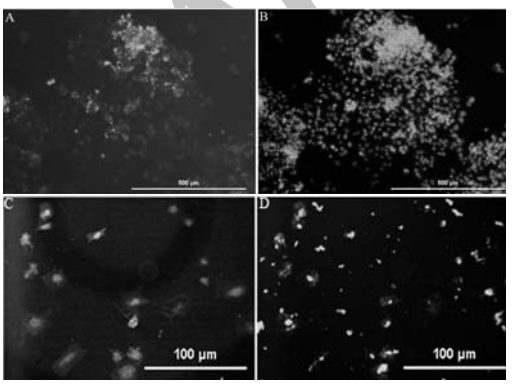
چربی است، این در حالی است که یاخته‌های غیرتمایزیافته نسبت‌به این رنگ‌آمیزی‌ها منفی بودند (شکل‌های ۲ و ۳ بخش B).

رنگ‌آمیزی ایمنوسیتوشیمی: یاخته‌های تمایزیافته در پایان روز ۱۴ تمایز برای مارکرهای آلبومین و آلفافیتوپروتئین رنگ‌آمیزی مثبت شدند (شکل ۴ و ۵ بخش‌های C). بیان این پروتئین‌ها در یاخته‌های HepG2 که به‌عنوان شاهد مثبت انتخاب شده بودند، مشاهده شد (شکل ۴ و ۵ بخش‌های A). یاخته‌های شبه‌هپاتوسیتی به‌دست‌آمده دارای هسته‌های بزرگ و ظاهر چندوجهی بودند و برخی از این یاخته‌ها نیز واجد دو هسته بودند. این مارکرها در یاخته‌های مزانشیمی غیرتمایزی بیان نشدند.

بیان ژن‌های کبدی: داده‌های ما ازطریق RT-PCR ژن‌های شناخته‌شده کبدی تولید یاخته‌های هپاتوسیتی را اثبات نمود. باتوجه به شکل ۶ بن‌یاخته‌های مزانشیمی قبل از قرارگرفتن در محیط واجد فاکتورهای القاکننده تمایز کبدی هیچ‌کدام ژن‌های مارکر هپاتوسیت‌ها را بیان نمی‌کردند. به‌دنبال القای تمایز در یاخته‌های مزانشیمی، این یاخته‌ها توانایی تولید mRNA مارکرهای کبدی را به‌دست‌آوردند. بیان GAPDH به‌عنوان کنترل داخلی، قبل و بعد از تمایز در یاخته‌ها یکسان بود.

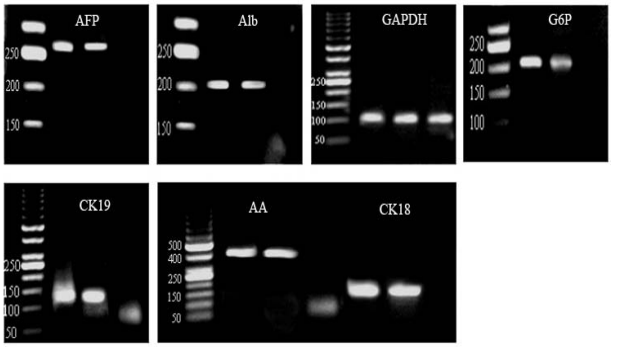


شکل ٤- رنگ‌آمیزی ایمونوفلوئورسنت پروتئین آلبومین در یاخته‌های HepG2 (A) و یاخته‌های شبه‌هپاتوسیتی تمایزی (C). رنگ‌آمیزی ایمونوسیتوشیمی در پایان روز ١٤ تمایز انجام شده است. هسته یاخته‌ها با رنگ DAPI رنگ‌آمیزی شده است (B و D). فلش‌ها یاخته‌های دو هسته‌ای را نشان می‌دهد.



شکل ٥- رنگ‌آمیزی ایمونوفلوئورسنت پروتئین آلفافیتوپروتئین در یاخته‌های HepG2 (A) و یاخته‌های شبه‌هپاتوسیتی تمایزی (C). رنگ‌آمیزی ایمونوسیتوشیمی در پایان روز ١٤ تمایز انجام شده است. هسته یاخته‌ها با رنگ DAPI رنگ‌آمیزی شده است (B و D). فلش یاخته دو هسته‌ای را نشان می‌دهد.

www.SID.ir



شکل ٦- بیان ژن‌های آلفا فیتوپروتئین (AFP)، آلبومین (Alb)، گلوکز ٦- فسفاتاز (G6P)، سیتوکراتین ۱۹ (CK19)، آلفا-۱- آنتی‌تریپسین (AA) و سیتوکراتین ۱۸ (CK18) در یاخته‌های HepG2 (ستون دوم)، یاخته‌های هپاتوسیتی تمایزیافته از بن‌یاخته‌های مزانشیمی (ستون سوم) و بن‌یاخته‌های مزانشیمی غیرتمایزی (ستون چهارم). بیان ژن GAPDH به‌عنوان کنترل مثبت مورد استفاده قرار گرفته است.

بحث

در این مطالعه بن‌یاخته‌های جداشده، مارکرهای سطحی CD44، CD105، CD166 و CD90 را که جزء مارکرهای MSCها هستند (۲۵)، بیان کردند و عدم‌بیان مارکرهای یاخته‌های خون‌ساز در آن‌ها حاکی از خلوص یاخته‌های مزانشیمی جداشده بود. مطالعات قبلی نشان داده است که MSCها مارکرهای اندوتلیال و خون‌ساز ازجمله: CD11b، CD31 و CD45 را ندارند و MSCها در انسان و موش صحرایی CD34- بوده و در موش‌ها CD34 را به میزان مختلف بیان می‌کنند (۲۶ و ۲۷).

بنابه نظر محققان، بیان الگوی ژنی ناهمگن از رده‌های خون‌ساز (رده استخوان‌ساز) و مزانشیمی (رده چربی‌ساز) در این یاخته‌ها نشان‌دهنده قرارنگرفتن این یاخته‌ها در مسیر تمایزی است (۲۸)؛ لذا تشکیل تجمعات کلسیم در یاخته‌های تمایزی استئوبلاست، همچنین تشکیل قطرات چربی در یاخته‌های آدیپوسیت تمایزی، ضمن تأیید ماهیت مزانشیمی و چندظرفیت‌بودن یاخته‌های جداشده از خون بندناف، راه را برای تمایز آن‌ها به‌سوی رده اختصاصی هپاتوسیتی هموار کرد.

در این مطالعه با القای تمایز در یاخته‌های مزانشیمی خون بندناف کشت‌داده‌شده در محیط حاوی HGF، OSM و DEX تغییرات مورفولوژیکی، فنوتیپی و بیان ژن‌ها بررسی شدند. بیان پروتئین‌های اختصاصی کبد شامل آلبومین و آلفافیتوپروتئین، وجود یاخته‌های دوهسته‌ای (که شاخص هپاتوسیت‌های بالغ می‌باشد) (۲۹)، بیانگر تمایز بین یاخته‌های مزانشیمی خون بندناف می‌باشد. هرچند که مکانیسم مولکولی دخیل در تغییر شکل یاخته‌ها از حالت تک‌هسته‌ای به دو هسته‌ای مشخص نمی‌باشد، این امر می‌تواند ناشی از خروج یاخته‌ها از فرایند میتوز به‌دلیل غیاب یا نقص سیتوکین‌ها باشد (۲۹ و ۳۰). در مطالعه‌ای که خرم‌رودی و همکاران انجام دادند، بن‌یاخته‌های مزانشیمی خون بندناف، در محیط تمایزی واجد HGF، فاکتور رشد فیبروبلاستی (FGF) و OSM قرار گرفت و القای تمایز تا ۳۱ روز ادامه داشت. وی تغییرات مورفولوژیکی یاخته‌ها و وجود ذخایر گلیکوژن در آن‌ها را بررسی کرد و در محیط کشت، جمع‌آوری‌شده آلبومین، اوره، آلفافیتوپروتئین و آلکالن فسفاتاز را اندازه‌گیری نمود (۳۱). رئوفی و همکاران نیز با استفاده از جذب ایندوسیانین گرین تمایز هپاتوسیتی را در بن‌یاخته‌های مزانشیمی خون بند ناف القا کردند و تغییرات مورفولوژیکی، بیان، آلبومین و وجود ذخایر گلیکوژن را نشان دادند (۳۲).

ما در این مطالعه بیان مارکرهای مختلف ژنی را در یاخته‌های شبه‌هپاتوسیتی به‌دست‌آمده، نشان دادیم. وجود سیتوکراتین ۱۸، گواهی بر بلوغ و تشکیل هپاتوسیت‌های بالغ است. ازطرف‌دیگر، بیان آلفافیتوپروتئین، آلفا-۱- آنتی‌تریپسین و سیتوکراتین ۱۹ به‌عنوان مارکرهای اولیه تمایز کبدی، حضور یاخته‌های بیضی‌شکل را در بین یاخته‌های تمایزیافته بالغ نشان می‌دهد. این یاخته‌ها واسطهای پیش‌ساز دوظرفیتی هستند که هم توانایی تمایز به هپاتوسیت، و هم توانایی تمایز به یاخته‌های مجاری صفراوی را دارند (۳۳). گلوکز ۶ فسفاتاز به‌عنوان مارکر پیش/ پس جنینی (peri/postnatal) هپاتوسیت‌ها نیز حاکی از توانایی سنتز گلوکز در یاخته‌های تمایز یافته است (۳۴ و ۳۵). همچنین بیان mRNA مارکر آلبومین به‌عنوان مارکر نهایی تشکیل هپاتوسیت تأییدکننده تمایز بن‌یاخته‌ها به‌سمت هپاتوسیت‌های بالغ است (۳۶ و ۳۷).

نتایج ارائه‌شده در این مطالعه این بررسی نشان داد که محیط کشت تمایزی به‌کاررفته، توانایی القای تمایز هپاتوسیتی را در بن‌یاخته‌های مزانشیمی خون بندناف دارد، لذا باتوجه به مزیت‌های خون بندناف نسبت‌به مغز استخوان، می‌توان از بن‌یاخته‌های آن و نیز یاخته‌های تمایزی حاصل از آن در بررسی‌های بالینی و آزمایشگاهی استفاده کرد.

تشکر و قدردانی

این مطالعه با حمایت مالی ستاد توسعه پژوهش و کاربرد سلول‌های بنیادی ایران انجام شده است.

References

1. Kazemnejad S, Allameh A, Soleimani M, Gharehbaghian A, Mohammadi Y, Amirizadeh N, et al. Biochemical and molecular characterization of hepatocyte-like cells derived from human bone marrow mesenchymal stem cells on a novel three-dimensional biocompatible nanofibrous scaffold. J Gastroenterol Hepatol 2009;24:278-87.
2. Kazemnejad S, Allameh A, Soleimani M, Gharehbaghian A, Mohammadi Y, Amirizadeh N, et al. Development of a novel three-dimensional biocompatible nanofibrous scaffold for the expansion and hepatogenic differentiation of human bone marrow mesenchymal stem cells. Iran J Biotech 2007;5:201-11.[Persian].
3. Abdel Aziz MT, Atta HM, Mahfouz S, Fouad HH, Roshdy NK, Ahmed HH, et al. Therapeutic potential of bone marrow-derived mesenchymal stem cells on experimental liver fibrosis. Clin Biochem 2007;40:893-9.

Archive of SID
www.SID.ir

4. Ma N, Ladilov Y, Kaminski A, Piechaczek C, Choi YH, Li W, et al. Umbilical cord blood cell transplantation for myocardial regeneration. Transplant Proc 2006;38:771-3.

5. Sadat S, Gehmert S, Song YH, Yen Y, Bai X, Gaiser S, et al. The cardioprotective effect of mesenchymal stem cells is mediated by IGF-I and VEGF. Biochem Biophys Res Commun 2007;363:674-9.

6. Petersen BE BW, Mars WM, Patrene KD, Boggs SS, Sullivan AK. Bone marrow as a potential source for hepatic oval cells. Science 1999;248:1168-70.

7. Petersen BE. Hepatic "Stem" cells: coming full circle. Blood Cells Mol Dis 2001;27:590-600.

8. Almeida-Porada G, Porada CD, Chamberlain J, Torabi A, Zanjani ED. Formation of human hepatocytes by human hematopoietic stem cells in sheep. Blood 2009;104:2582-90.

9. Hannoun Z, Filippi C, Sullivan G, Hay DC, Iredale JP. Hepatic endoderm differentiation from human embryonic stem cells. Current Stem Cell Research & Therapy 2010;5:233-44.

10. Onga SY, Daia H, Leong KW. Inducing hepatic differentiation of human mesenchymal stem cells in pellet culture. Biomaterials 2006;27:4087-97.

11. Shiraki N, Umeda K, Sakashita N, Takeya M, Kume K, Kume S. Differentiation of mouse and human embryonic stem cells into hepatic lineages. Genes Cells 2008;13:731-46.

12. Tang XP, Zhang M, Yang X, Chen LM, Zeng Y. Differentiation of human umbilical cord blood stem cells into hepatocytes in vivo and in vitro. World J Gastroenterol 2006;12:4014-9.

13. Hengstler JG, Brulport M, Schormann W, Bauer A, Hermes M, Nussler AK, et al. Generation of human hepatocytes by stem cell technology: definition of the hepatocyte. Expert Opin Drug Metab Toxicol 2005;1:61-74.

14. Robertson JA. Human embryonic stem cell research: ethical and legal issues. Nat Rev Genet 2001;2:74-8.

15. Haven R, Lane D. Umbilical cord blood banking. J Obstet Gynecol India 2005;55:502-4.

16. Rubinstein P. Why cord blood. Hum Immunol 2006;67:398-404.

17. Knudtzon S. In vitro growth of granulocytic colonies from circulating cells in human cord blood. blood 1974;3:357-61.

18. Nanae F, Satoshi F, Takashi T, Junya T, Ida Kenji I, Hiroshi S, et al. Microencapsulated feeder cells as a source of soluble factors for expansion of cd34+ hematopoietic stem cells. Biomaterials 2007;28:4795-805.

19. Gluckman E BH, Auerbach AD, Friedman HS, Douglas GW, Devergie A, Esperou H, et al. Hematopoietic reconstitution in a patient with fanconi's anemia by means of umbilical-cord blood from an HLA-identical sibling. N Engl J Med 1984;321:1174-8.

20. Liu CH, Hwang SM. Cytokine interactions in mesenchymal stem cells from cord blood. Cytokine 2005;32:270-9.

21. Nardi NB, SilvaMeirelles Ld. Mesenchymal stem cells: isolation, in vitro expansion and characterization. Handb Exp Pharmacol 2006;174:249-82.

22. Murphy JM FD, Hunziker EB. Mesenchymal stem cells: clinical applications and biological characterization. Int J Biochem Cell Biol 2004;36:568-84.

23. Kim YJ. Culture of umbilical cord- and cord blood-derived stem cells. Culture Of Human Stem Cells: John Wiley & Sons, Inc; 2007. p.156-86.

24. Kazemnejad S, Allameh A, Gharehbaghian A, Soleimani M, Amirizadeh N, Jazayeri M. Efficient replacing of fetal bovine serum with human platelet releasate during propagation and differentiation of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells to functional hepatocytes-like cells. Vox Sang 2008;95:149-58.

25. Haynesworth SE, Baber MA, Caplan AI. Cell surface antigens on human bone marrow-derived mesenchymal stem cells are detected by monoclonal antibodies. Bone 1992;13:69-80.

26. Gang EJ, Hong SH, Jeong JA, Hwang SH, Kim SW, Yang IH, et al. In vitro mesengenic potential of human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells. Biochem Bioph Res Co 2004;321:102-8.

27. Javazon EH, Beggs K, Flake A. Mesenchymal stem cells: paradoxes of passaging. Exp Hematol 2004;32:414-25.

28. Park PC, Selvarajah S, Bayani J, Zielenska M, Squire JA. Stem cell enrichment approaches. Semin Cancer Biol 2007;17:257-64.

29. Gudoitti JE, Bregerie O, Robert A, Debey P, Brechot C, Desdoutes C. Liver cell polyplooidization: a pivotal role for binuclear hepatocytes. J Biol Chem 2003;278:19095-101.

30. Alison MR, Poulsom R, Otto WR, Vig P, Brittan M. Recipies for adult stem cell plasticity:fusion cuisine or readymade. J Clin Pathol 2004;57:113-20.

31. Khoramroudi A, Nasiri S, Amiri I. Avaluating biochemical factors of in vitro differentiated hepatocyte like cells derived from cord blood stem cells. Armaghane Danesh 1998;3:23-34.[Persian].

32. 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. blood 2010;7:33-40.[Persian].

33. Wright N, Samuelson L, Walkup MH, Chandrasekaran P, Gerber DA. Enreachment of a bipotent hepatic progenitor cell from native liver tissue. Biochem Biophys Res Commun 2008;36:367-72.

34. Khuu DN, Najimi M, Sokal EM. Epithelial cells with hepatobiliary phenotype: Is it another stem cell candidate for healthy adult human liver. World J Gastroenterol 2007;13:1554-60.

35. Kinoshita T, Miyajima A. Cytokine regulation of liver development. Biochim Biophys Acta 2002;1592:303-12.

36. Fujino H, Hiramatsu H, Tsuchiya A, Niwa A, Noma H, Shiota M, et al. Human cord blood cd34+ cells develop into hepatocytes in the livers of nod/scid/gc nnull mice through cell fusion. FASEB J 2007;21:3499-510.

37. Ek M, Soderdahl T, Kuppers-Munther B, Edsbagge J, Andersson TB, Bjorquist P, et al. Expression of drug metabolizing enzymesiin hepatocyte-like cells derived from human embryonic stem cells. Biochem Pharmacol 2007;74:496-503.

Archive of SID

www.SID.ir