

دانشور

پزشکی

همکشتی سلول‌های شبه‌الیکودندروسیتی مشتق از نوروسفر و نورون‌های حرکتی مشتق از سلول‌های بنیادی مزانشیمی در تولید میلین

نویسندگان: حجت‌اله عباس‌زاده^۱، تقی طریحی*^{۲،۳}، مجید صادقی‌زاده^۴،
محمد رضا دلشاد^۵، طاهر طاهری^۶، هادی کاظمی^۷ و مریم سادات خرمگاه^۶

۱. استادیار گروه بیولوژی و علوم تشریح، دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی،
تهران، ایران

۲. استاد گروه علوم تشریح، دانشکده پزشکی دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

۳. استاد گروه ژنتیک، دانشکده علوم دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

۴. استادیار گروه علوم تشریح، دانشکده پزشکی دانشگاه شاهد، تهران، ایران

۵. دانشیار مرکز علوم اعصاب شفاء بیمارستان خاتم‌الانبیا، تهران، ایران

۶. دکتری تخصصی، گروه بیوتکنولوژی پزشکی، دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی شهید
بهشتی، تهران، ایران

E-mail: ttiraihi@yahoo.com

* نویسنده مسئول: تقی طریحی

چکیده

مقدمه و هدف: یکی از راه‌های درمان بیماری‌های با نقص میلین، سلول‌درمانی است؛ سلول‌های بنیادی
مورد استفاده در این روش به الیکودندروسیت تبدیل خواهند شد. در مطالعات پیشین برای تولید
سلول‌های شبه‌الیکودندروسیت از سلول‌های بنیادی مغز استخوان استفاده می‌شد که در مرحله پیش‌القا
تحت تأثیر DMSO و در مرحله القا، تحت تأثیر T3، heregulin and bFGF، PDGF قرار می‌گرفتند. در
تحقیق اخیر به منظور افزایش تولید این سلول‌ها ابتدا سلول‌های بنیادی مغز استخوان به نوروسفر و
سلول‌های بنیادی عصبی تبدیل شده، سپس سلول، شبه‌الیکودندروسیت شد و در پایان، همکشتی این
سلول‌ها با نورون‌های حرکتی به منظور تولید میلین ارزیابی شد.

مواد و روش‌ها: سلول‌های بنیادی مغز استخوان (BMSCs) از موش‌های صحرایی ماده بالغ استخراج و
تحت اثر B27، EG و BFGF به سلول‌های نوروسفر (NSF) و سلول‌های بنیادی عصبی (NSC) تبدیل و
سپس در مرحله القا، تحت تأثیر (T3، heregulin and bFGF، PDGF) به سلول‌های
شبه‌الیکودندروسیت (OLCs) تمایز داده شدند. سلول‌های سلول‌های NSF، OLC، NSC و BMSC با
استفاده از نشانگرهای (مارکرها) CD44، CD45، CD90، fibronectin، O1، O4، GFAP، MBP، oct-4 و
مورد ارزیابی ایمونوسایتوشیمیایی و ژن‌های oligo2 و MOG با RT-PCR مورد بررسی قرار گرفتند.

نتایج: نتایج مطالعه حاضر، نشان‌دهنده بیان مارکرها CD44، CD45، CD90 fibronectin توسط
سلول‌های BMSCs و مارکرها NESTIN و NF68 توسط سلول‌های NSC و مارکرها O1، O4،
oligo2 در سلول‌های OLCs بود؛ در ضمن، بیان ژن‌های Olig2 و PDGFR توسط روش RT-PCR
تأیید شد.

نتیجه‌گیری: سلول‌های شبه‌الیکودندروسیت با درصدی بالا از سلول‌های بنیادی عصبی استحصال یافته
از BMSCs ایجاد می‌شوند و پس از همکشتی با نورون‌های حرکتی، قابلیت تولید میلین در محیط کشت را
دارا هستند.

واژگان کلیدی: سلول‌های شبه‌الیکودندروسیت، نورون‌های حرکتی، سلول‌های بنیادی مشتق از مغز
استخوان، القا، سلول‌های بنیادی عصبی.

دوماهنامه علمی-پژوهشی
دانشگاه شاهد
سال بیست و دوم-شماره ۱۱۶
اردیبهشت ۱۳۹۴

دریافت: ۱۳۹۳/۱۲/۱۰

آخرین اصلاح‌ها: ۱۳۹۴/۰۱/۱۶

پذیرش: ۱۳۹۴/۰۱/۱۸

مقدمه

سلول‌درمانی از راهکارهایی جدید است که در چند دهه اخیر، بیشتر برای درمان مورد توجه قرار گرفته است؛ این روند، به استفاده از سلول‌هایی با ویژگی‌های خاص از جمله دردسترس بودن و تومورزانبودن نیاز دارد. هم‌اکنون، سلول‌های BMSCs به‌عنوان یکی از منابع سلولی ارزشمند برای درمان تعدادی از بیماری‌های نورودژنراتیو CNS مورد توجه قرار گرفته‌اند (۱). در گزارشی، بیان مارکرهای عصبی، توسط سلول‌های BMSCs وقتی با β ME تیمار شدند، نشان‌داده شده است (۲)؛ همکشتی این سلول‌ها با سلول‌های عصبی و گلیال می‌تواند سبب بیان مارکر عصبی و گلیال در این سلول‌ها شود (۳). با افزایش سطح cAMP توسط موادی مانند IBMX در محیط کشت BMSCs، این سلول‌ها نمادهای فنوتیپی سلول‌های عصبی را از خود نشان می‌دهند و مارکرهای نورون‌های اولیه مانند Nestin را بیان می‌کنند (۴)؛ با توجه به خصوصیات این سلول‌ها در محیط کشت می‌توان از آنها در درمان برخی بیماری‌های نورودژنراتیو سیستم اعصاب مرکزی، همانند ضایعات نخاعی بهره‌برد؛ عده‌ای، تأثیر مثبت این سلول‌ها را در ترمیم ضایعات CNS به دلیل حضور پپتید ناتری‌یوریتیک می‌دانند که مولکولی مشابه ناتری‌یوریتیک پپتید دهلیزی است؛ حضور این مولکول با خاصیت افزایش دفع ادرار و گشادکنندگی عروق، ممکن است سبب کاهش ادم و کاهش فشار داخل کرانیالی و افزایش گردش خون موضعی به دنبال آسیب‌های تروماتیک سیستم عصبی مرکزی شود؛ تحقیق‌ها نشان داده‌اند که تزریق داخل نخاعی، اینتراتکال و ویدی این سلول‌ها نتایجی موفقیت‌آمیز را به همراه داشته است (۵).

به‌منظور میلیون‌سازی مدل‌های دارای ضایعه نخاعی از پیوند سلول‌های مختلف، مانند الیگودندروسیت‌ها یا پیش‌سازهایشان (۶)، شوان سل‌ها (۷)، سلول‌های غلاف‌کننده بویایی (۸)، سلول‌های بنیادی عصبی بزرگسالی یا جنینی و induced pluripotent stem cells استفاده شده است (۹). با توجه به مشکلات موجود

در زمینه تمایز به سلول‌های ناخواسته، «ایجاد تومور، مشکلات اجرایی و اخلاقی، عدم پذیرش اجتماعی (۱۰) و از همه مهم‌تر، احتمال برانگیختن پاسخ‌های التهابی و ایمنولوژیک»، استفاده از این روش‌ها را با محدودیت مواجه کرده‌اند (۱۱). با توجه به ویژگی‌های مثبت سلول‌های BMSCs، برخی محققان، این سلول‌ها را برای بازسازی میلین در فیبرهای عصبی آسیب‌دیده به‌کار برده‌اند (۱۲). Cuevas و همکارانش نشان دادند که در صورت تزریق سلول‌های BMSC تمایز نیافته به محل عصب سیاتیک قطع شده، درصدی از این سلول‌ها به سلول‌های میلین‌ساز تبدیل می‌شوند و به ترمیم بافت آسیب‌دیده کمک می‌کنند (۱۳). در تحقیقی با تابش اشعه-ایکس به ناحیه طناب نخاعی موش، آن قسمت را دمیلینه کرده، سپس سلول‌های BMSCs را به موش‌های دچار ضایعه نخاعی تزریق کردند؛ آنها نتایجی خوب در تسریع میلین‌سازی گزارش کردند (۱۴). Wright (۲۰۱۱) به بررسی سازوکارهای (مکانیسم‌های) بهبود ضایعه نخاعی با استفاده از سلول‌های استرومایی مغز استخوان پرداخت و Nakajima نیز با ترانسپلانت سلول‌های BMSCs در ضایعه نخاعی، روند بهبود حرکتی و فعال‌سازی ماکروفاژی را مورد بحث قرار داد؛ آنها گزارش کردند که میلین‌سازی با بهبودی حرکتی، رابطه‌ای مستقیم دارد (۱۵، ۱۶).

با توجه به دردسترس نبودن سلول‌های میلین‌ساز در محیط آزمایشگاه، در این تحقیق بر آن شدیم، به‌منظور دسترسی به این سلول‌ها آنها را از سلول‌های استرومایی مغز استخوان تهیه کنیم؛ به‌رحال، تأثیر درمانی مثبت این سلول‌ها در بازسازی مجدد میلین، امری انکارناپذیر است و ثابت شده که استفاده از این سلول‌ها می‌تواند سبب تسریع روند ترمیم میلین پس از پیوند این سلول‌ها در بیماری‌های نورودژنراتیو شود.

مواد و روش‌ها

در این پژوهش، موش‌های صحرایی ماده و بالغ نژاد اسپراگو- داوولی با سن شش تا هشت هفته تهیه شده از مؤسسه پاستور، در یک دوره روشنایی و تاریکی ۱۲ ساعته و در شرایط مطلوب و استاندارد حیوان‌خانه مرکز علوم اعصاب شفاء بیمارستان خاتم‌الانبیا نگهداری شدند. با استفاده از یک سرنگ ۵ml (با سرسوزن مشکی) حاوی ۱ میلی‌لیتر محیط کشت DMEM-F12 (UK, Gibco) و با رعایت شرایط استریل، مغز استخوان از داخل کانال استخوان‌های دراز کشیده شد. محتوی داخل سرنگ در زیر هود در فلاسک حاوی محیط DMEM-F12 (UK, Gibco) و 15% FBS (UK, Gibco) ریخته شد و پس از گذشت ۲۴ ساعت از زمان تخلیه مغز استخوان در فلاسک، محیط کشت سلولی با محیط تازه تعویض شد؛ به این ترتیب، سلول‌های استرومایی چسبیده به کف فلاسک باقی ماندند و سلول‌های خونی شناور حذف شدند. هنگامی که تراکم سلول‌های چسبیده به کف فلاسک به ۷۰ تا ۸۰ درصد رسید، با استفاده از Trypsin 0.25% (Germany, Merck) و EDTA 0.04% (Germany, Merck) برای چهار مرحله پاساژ داده شدند. بررسی زنده بودن، روی سلول‌ها انجام شد و سپس برای بررسی خلوص آنها و همچنین استرومایی بودن آنها از آنتی‌بادی‌های فیبرونکتین CD106، Oct-4، CD44، CD45 و همچنین بیان mRNA ژن Oct-4 استفاده شد؛ در ضمن، برای بررسی احتمالی تمایز این سلول‌ها به سلول‌های شبه‌عصبی و گلیالی بیان آنتی‌بادی‌های Nestin، NF68، GFAP، O1 و O4 مورد ارزیابی قرار گرفت. تعیین میزان زنده بودن سلول‌ها با تریپان‌بلو انجام شد که در این آزمون، حجمی از سوسپانسیون سلول‌ها به نسبت مساوی با تریپان‌بلو رنگ شدند. سلول‌های مرده به رنگ آبی مشخص شدند که به همراه سلول‌های زنده شفاف توسط لام نتوبار با میکروسکوپ اینورت با بزرگ‌نمایی ۲۰۰ شمارش شدند؛ پس از تریپسینه کردن BMSCs حاصل از پاساژ چهارم، سلول‌ها به NSF تبدیل شدند.

تولید نوروسفر و سلول‌های بنیادی عصبی

سلول‌های استرومایی ظرف کشت به وسیله Trypsin/EDTA جدا شدند و در فلاسک ۲۵ cm² با غلظت ۱۰۵ سلول در هر سانتی‌متر مربع در محیط DMEM/F12 غنی شده حاوی B27 کشت داده می‌شود. این مواد و عوامل (فاکتورهای) رشد سه بار در هفته با محیط بالا تعویض می‌شوند. پس از یک روز، ساختارهای شبیه‌نوروسفر دیده می‌شوند؛ این نوروسفرها تا پنج روز باید کشت داده شوند؛ سپس نوروسفرها در پلیت‌های معمولی با استفاده از محیط نوروسفر و همچنین 5% FBS به سلول‌های بنیادی عصبی تبدیل می‌شوند.

مرحله القا

پس از شستشوی سلول‌ها با PBS، محیط کشت F12-DMEM حاوی 15% FBS و مجموعه‌ای از ۱۰ng/ml مؤلفه رشد فیروبلاستی (bFGF) (UK, Gibco)، ۵ng/ml فاکتور رشد مشتق از پلاکت (PDGF-AA) (USA, ICN) و ۲۰۰ng/ml بتا هرگولین انسانی (HRG) (USA, Chemicon) برای دو روز، جایگزین محیط کشت پیشین شد؛ در پایان این مرحله، ارزیابی‌ای از آنتی‌بادی‌های اولیه، شامل NF68، Nestin، O4 و GFAP، O1 به روش ایمونوسایتوشیمی، روی سلول‌ها انجام شد؛ در مرحله دوم القا پس از خارج کردن محیط کشت فوق و شستشوی سلول‌ها با PBS، محیط کشت F12-DMEM حاوی 15% FBS و مقادیر متفاوت، از هورمون T3 به منظور ایجاد سلول‌های شبه‌الیکودندروسایت برای مدت دو روز استفاده شد. لازم به یادآوری است در خصوص میزان دوز T3 با توجه به رفرنس مقادیر 10، 50، 90 ng/ml برای تعیین دوز اپتیمم بررسی شد.

در بررسی ایمونوسایتوشیمی، مراحل کار مشابه گذشته انجام شدند؛ فقط علاوه بر آنتی‌بادی‌های یاد شده، GFAP، NF68، Nestin، O4، Fibronectin و همه از نوع موشی بودند، نیز بررسی شدند. تمام مراحل و همچنین نحوه شمارش و تعیین درصد سلول‌ها مانند

رونویسی معکوس انجام شد که طی آن، آنزیم DNA پلی‌مراز وابسته به RNA با کمک پرایمرهایی که به mRNA هیبریدی می‌شوند، mRNA را به cDNA تبدیل می‌کند.

در مطالعه حاضر، برای ساخت cDNA از کیت Revert aid H Minus-First Strand cDNA Synthesis (Fermentas, K1632) استفاده شده است. پس از پایان ساخت cDNA در حجم بالا، PCR در حجم ۲۵ میکرولیتر با dNTPs (Fermentas) به حجم ۱۰ میکرولیتر (۲۰۰ نانومولار)، MgCl₂ به حجم ۳ میکرولیتر (۱/۵ میلی‌مولار) و آنزیم DNA Taq polymerase (Fermentas) به حجم ۲/۵ میکرولیتر و ۱۰۰ پیکومول از پرایمر انجام شد. لازم به توضیح است که طی هر بار انجام PCR، کنترلی 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، حدود ۱۰ میکرولیتر از محصول واکنش، روی ژل آگارز ۲ درصد الکتروفورز شد.

همکشتی سلول‌های شبه‌الیگودندروسیت با سلول‌های نورون حرکتی

به منظور بررسی عملکردی بودن سلول‌های شبه‌الیگودندروسیت، از همکشتی این سلول‌ها با سلول‌های نورون‌های حرکتی استفاده شد و سپس بیان مارکر MBP و ژن MOG ارزیابی شد.

روش تجزیه و تحلیل داده‌ها

تمام مقادیر برحسب (mean ± SEM) ارائه می‌شوند، مقایسه میان گروه‌ها با روش آنالیز واریانس یک طرفه (ANOVA) و Tukey's Test انجام می‌شوند.

نتایج

مورفولوژی سلول‌ها پس از تشکیل نوروسفر و سلول‌های بنیادی عصبی

در بررسی مورفولوژی BMSCs، پیش از آغاز، تمایز این سلول‌ها به شکل به طور کامل پهن و دوکی با زواید کوتاه و هسته بیضی دارای یک تا چند هستک بود؛ پس از تشکیل نوروسفر سلول‌ها به شکل توده‌های

گذشته انجام شدند و به این ترتیب، بالاترین درصد تمایز به سلول‌های شبه‌الیگودندروسیت توسط دو گروه پیش‌القا و القا مشخص شد.

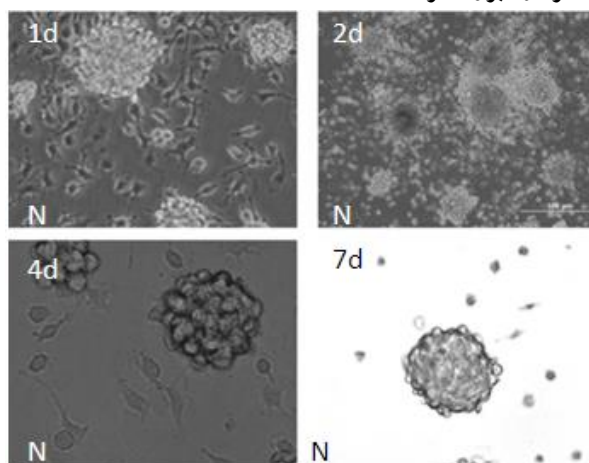
ایمنوسایتوشیمی

BMSCs القاننده و القاشده ابتدا به منظور ثبوت به مدت ۳۰ دقیقه در معرض پارافرمالید ۴ درصد قرار گرفته، سپس سه مرحله شستشو با PBS و هر مرحله ۵ دقیقه انجام شد. نمونه‌ها به مدت ۱ ساعت در معرض مخلوط سرم بز ۱۰ درصد و Triton X-100 ۰/۳ درصد قرار داده شدند. پس از رقیق کردن ۱:۱۵۰ آنتی‌بادی‌های اولیه، Nestin, NF68, Fbronectin, O1, Oligo2, O4، که همه از نوع موشی بودند، هریک به طور مجزا روی یک Cover slip ریخته شدند؛ به منظور جلوگیری از خشک شدن آنتی‌بادی، نمونه با قطعه‌ای پارافیلیم پوشانده شد و داخل پتری‌دیش مرطوب قرار داده، به مدت یک شب در درجه حرارت ۳۷°C انکوبه شد. لام‌ها پس از انجام شستشو با PBS مانند گذشته، به مدت ۲ ساعت در دمای محیط در معرض آنتی‌بادی ثانویه ضد موشی (۱:۲۰۰) کونژوگه به FITC و پس از شستشو با PBS توسط میکروسکوپ فلورسانس مورد بررسی قرار گرفتند؛ برای شمارش سلول‌ها از اتیدیوم بروماید ۰/۰۱ درصد به مدت ۱ دقیقه استفاده و شستشو توسط PBS انجام شد؛ در پایان، هر لامل به طور معکوس توسط بافر گلیسرول، روی لام قرار گرفت.

RT-PCR

سلول‌های متمایز شده گروه‌های مختلف و نیز سلول‌های متمایز نشده، به صورت جداگانه از کف فلاسک‌های کشت با محلول تریسین و EDTA کنده و پس از سانتریفیوژ شدن، مایع رویی سلول‌ها دور ریخته شد و پلت سلولی به دست آمده برای استخراج RNA آماده شد. پس از لیز کردن سلول‌ها به کمک محلول RNX Plus.CinaGen Inc، استخراج RNA سلولی با استفاده از RevertAid TM H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas) انجام شد؛ سپس واکنش

کروی‌شکلی درآمدند که میزان تشکیل این کره‌ها و اندازه آنها با گذشت زمان، بیشتر و بزرگ‌تر شدند (شکل ۱).



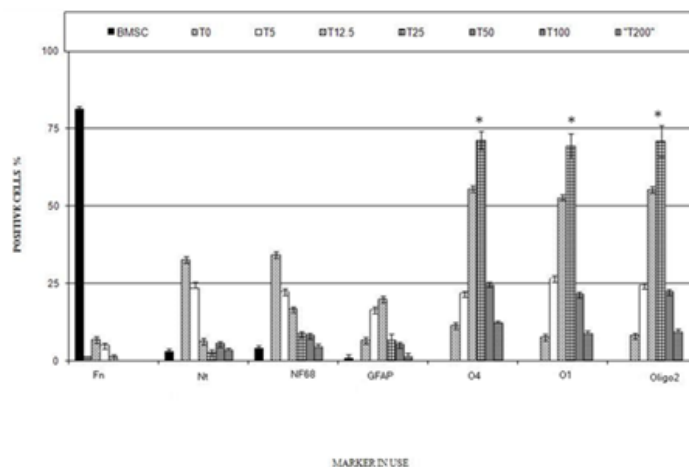
شکل ۱. تصاویر فاز کنتراست از نروسفر که رشد اندازه کلونی‌های نروسفر را نشان می‌دهد؛ نروسفر: NSF

بیان شدند.

بررسی تمایز در پایان مرحله دوم القا به روش ایمونوسایتوشیمی

در بررسی ایمونوسایتوشیمی سلول‌های شبه‌الیگودندروسیت، پس از پایان مرحله القا، بیشترین بیان آنتی‌بادی‌های O1، O4 و Oligo2 نسبت به القاکننده‌های دیگر در گروه T25 و به ترتیب، برابر با $2/4 \pm 81$ و $7/8 \pm 79$ و $2/2 \pm 80$ درصد بود (شکل ۲). آنتی‌بادی‌های Nestin و NF68، بالاترین بیان معنی‌دار نسبت به گروه‌های دیگر در گروه T5 بودند ($P < 0.05$).

برای اثبات استرومایی بودن سلول‌های BMSCs و تعیین خلوصشان از آنتی‌بادی‌های فیبرونکتین، CD44 و CD90 استفاده شد. $98/24 \pm 1/22$ درصد سلول‌ها، با آنتی‌فیبرونکتین و $93/2 \pm 1/11$ درصد سلول‌ها با آنتی CD44 و $94/2 \pm 1/22$ درصد سلول‌ها با آنتی CD106 واکنش دادند؛ در این مرحله، آنتی‌بادی CD45 که خاص سلول‌های خون‌ساز است، تنها در $2/5 \pm 1/44$ سلول‌ها بیان شد. بررسی ایمونوسایتوشیمی سلول‌های BMSCs با استفاده از آنتی‌بادی Nestin از بیان $4/2$ درصدی نشان‌داشت؛ اما آنتی‌بادی‌های اختصاصی سلول‌های الیگودندروسیت، O1، O4 و Oligo2 به مقداری ناچیز

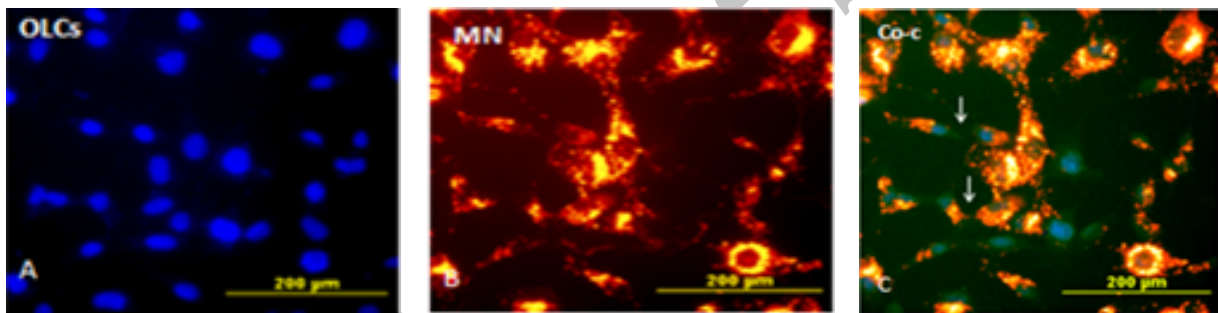


شکل ۲. درصد بیان آنتی‌بادی‌های عصبی و گلیالی اولیه در پایان مرحله القا به وسیله دوزهای مختلف T (ng/ml)

نتایج حاصل از همکشتی سلول‌های شبه‌الیگودندروسیت با سلول‌های نورون‌های حرکتی

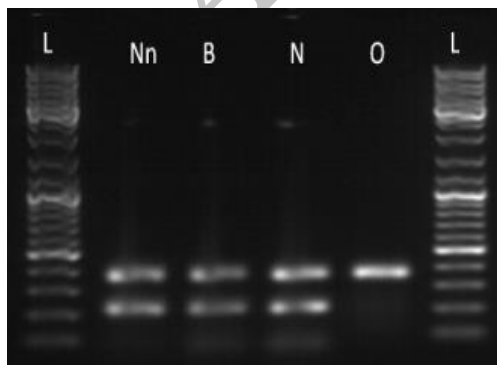
به منظور بررسی عملکرد سلول‌های شبه‌الیگودندروسیت، از همکشتی با نورون‌های حرکتی استفاده شد. سلول‌های شبه‌الیگودندروسیت نشان‌دار شده با DAPI آبی‌رنگ شده، نورون‌های حرکتی نشان‌دار شده با DII، قرمز رنگ شدند؛ پس از همکشتی و ایمونوسیتوشیمی با آنتی‌بادی MBP، حضور این آنتی‌بادی در ناحیه زواید سلول‌های شبه‌الیگودندروسیت با رنگ سبز مشخص شد که از عملکرد فعال این سلول‌ها در تولید میلین حکایت می‌کند.

سلول‌های BMSCs، بیشترین بیان Fibronectin را نسبت به تمام گروه‌های القایی داشتند. همان‌طور که مشاهده می‌شود، بیان آنتی‌بادی‌های Nestin و NF68 در سلول‌های القایی گروه T5 نسبت به تمام گروه‌های دیگر، دارای افزایشی معنی‌دار است. بیان O1، Oligo2 و O4 در گروه T25، بیشترین میزان را در میان گروه‌های دیگر داشت. بیشترین بیان GFAP در گروه‌های T10 و T5 مشاهده شد. گروه T0 در مرحله دوم القا، هیچ القاکننده‌ای دریافت نکرد. * - اختلاف معنی‌دار با گروه‌های دیگر ($P < 0.05$)



شکل ۳. تصاویر همکشتی سلول‌های نورون حرکتی با سلول‌های شبه‌الیگودندروسیت، پس از بررسی ایمونوسیتوشیمی با استفاده از آنتی‌بادی MBP

در تصویر A، سلول‌های شبه‌الیگودندروسیت نشان‌دار شده با DAPI به رنگ آبی و در تصویر B، سلول‌های نورون حرکتی نشان‌دار شده با DII به رنگ قرمز و در تصویر C، آنتی‌بادی MBP با رنگ سبز نشان‌دار شده است (پیکان سفید).



شکل ۴.

تعیین بنیادین بودن BMSCs و سایر سلول‌ها به روش RT-PCR

در بررسی RT-PCR در خصوص سلول‌های BMSCs تمایز نیافته، همان‌گونه که شکل ۴ نشان می‌دهد، ژن Oct-4 در سطح mRNA به خوبی بیان شده است که این موضوع علاوه بر بیان فیرونکتین، تأییدی دیگر بر بنیادین بودن سلول‌های بالاست.

پس از تشکیل نوروسفر و سلول بنیادی عصبی، viability test انجام‌گرفت و مشاهده‌شد که میزان سلول‌های زنده در حدی قابل‌قبول است و دلیل آن را می‌توان به استفاده از مواد غیرسمی B27 و عوامل نوروتروفیک EGF, BFGF نسبت داد. نقدی و همکاران از القاکننده‌هایی مانند DMSO, β ME, BHA و RA استفاده کردند که دارای آثار القایی متفاوت بوده، با متمایز کردن سلول‌های BMSCs، آنها را به سمت سلول‌های شبه‌عصبی و شبه‌گلیال پیش‌برد (۱۹). نتایج بررسی کاکا و همکاران نشان داد که اثر القایی DMSO-R روی BMSCs در ایجاد تمایز به سلول‌های شبه‌نورواپتیلیالی به مراتب بیش از β ME-RA و BHA-RA است در حالی که نقدی و همکاران، اثر القایی β ME-RA را بیشتر از گروه‌های دیگر مطرح کردند (۲۰)؛ در این تحقیق‌ها میزان سلول‌های ایجاد شده پایین بود و درصدی از سلول‌ها از میان‌می‌رفتند در حالی که میزان سلول‌های زنده در این تحقیق، مناسب و بالاتر از تحقیق‌های پیشین بود. در تحقیقی مشخص شد، قطر کلونی‌های نوروسفری با گذشت زمان افزایش می‌یابد که نتایج تحقیق، مؤید این نکته بودند؛ ضمن آنکه کلونی‌ها با گذشت زمان به هم پیوسته، کلونی‌هایی بزرگ‌تر را ایجاد می‌کردند (۲۱).

پس از تشکیل نوروسفر و باقی ماندن این سلول‌ها در محیط القایی فاقد سرم، پس از مدت هفت روز، این سلول‌ها با استفاده از محیط حاوی سرم ۵ درصد، به سلول‌های بنیادی عصبی تبدیل شدند؛ سلول‌های یاد شده، پس از چند پاساژ و با کاهش تدریجی سرم، مورد ارزیابی ایمونوسیتوشیمیایی و بیان mRNA ژن Oct-4 Neuro D, قرار گرفتند تا بنیادی بودن و همچنین عصبی بودن آنها تأیید شود. در مطالعات پیشین اثبات شده است که هرچه سلول‌های بنیادی عصبی، بیانی پایین‌تر از مارکر Nestin داشته باشند، بلوغی کمتر دارند؛ در واقع با بلوغ سلول‌های عصبی، بیان Nestin کاهش می‌یابد (۲۲)؛ ضمن آنکه بیان آنتی‌بادی GFAP که مارکر آستروسیت‌هاست، پایین بوده که نتایج این تحقیق

الکتروفوروگرام از محصول PCR، حاصل از استخراج mRNA ژن Oct4 در گروه سلول‌های استرومایی مغز استخوان (B) و سلول‌های بنیادی عصبی (N) و سلول‌های شبه‌الیگودندروسیت (O) و همچنین گروه نخاع نوزاد تازه تولدیافته موش صحرایی (Nn) است؛ ستون سمت راست و چپ Ladder را نشان می‌دهد.

بحث

در این تحقیق ابتدا با تولید نوروسفر از سلول‌های BMSCs و تبدیل آنها به سلول‌های بنیادی عصبی، سلول‌های شبه‌الیگودندروسیت، ایجاد و سپس همکشتی این سلول‌ها با سلول‌های شبه‌نورون‌های حرکتی ارزیابی شد. برای بررسی خلوص سلول‌های استرومایی مغز استخوان از روش‌های ایمونوسیتوشیمی و RT-PCR استفاده شد. با روش ایمونوسیتوشیمی نشان داده شد که این سلول‌ها فیبرونکتین، CD44 و CD106 (VCAM1) را بیان می‌کنند. در تحقیقی، سلول‌های BMSC در دو محیط جداگانه کشت داده شد و با استفاده از آنتی‌بادی ضد فیبرونکتین، هویت آنها تأیید شدند (۱۷)؛ در این تحقیق، بیان پروتئین Oct-4, GAPDH نیز توسط RT-PCR مورد تأیید قرار گرفت.

چن^۱ (۲۰۰۱) و همکاران، هویت بنیادی بودن سلول‌های جنینی را توسط بیان پروتئین Oct-4 ارزیابی و تأیید کردند (۱۸)؛ در مرحله بعد، سلول‌های استحصال یافته از مغز استخوان را پس از چند پاساژ و پس از اینکه سلول‌ها مورفولوژی یکسانی پیدا کردند به سلول‌های نوروسفر تبدیل کردیم که نوروسفرهای ایجاد شده، کروی شکل بودند و به صورت توده‌های شناور به چشم می‌خوردند که این توده‌ها با گذشت زمان بزرگ‌تر شده، تعداد آنها نیز افزایش یافت. سلول‌های نوروسفری در تحقیق‌های پیشین، به طور عمده از استریاتوم، مشتق می‌شدند؛ هرچند برخی از محققان، آنها را از مغز استخوان نیز ایجاد کردند (۱۹).

¹ - Chen

الیگودندروسایت تمایز یافتند که در مرحله دوم تمایز، از PDGF و T3 با غلظت $50 \mu\text{M}$ استفاده شد (۲۶). محققانی مانند Keilhoff و Dezawa با القای BMSCs موش صحرایی توسط bFGF، HRG و PDGF و Forscolin به مدت هشت روز نشان دادند، سلول‌های تمایز یافته، ضمن بیان پروتئین Oligo2 قادر به عمل میلین‌سازی در عصب سیاتیک هستند؛ هرچند به درصد بیان این سلول‌ها و ظرفیت تولید آنها اشاره‌نشده (۲۷، ۲۸).

به منظور بررسی عملکردی سلول‌های شبه‌الیگودندروسیت، از همکشتی این سلول‌ها با نورون حرکتی استفاده شد و سپس بیان آنتی‌بادی MBP و ژن MOG مورد بررسی قرار گرفت که نتایج از بیان این دو عامل، پس از همکشتی حکایت داشتند. Amur-Umarjee بیان MBP و ژن MOG را از خصوصیات اصلی بلوغ سلول‌های الیگودندروسیت گزارش کرده‌است (۲۹).

نتیجه‌گیری

همکشتی نورون‌های حرکتی مشتق از سلول‌های بنیادی مزانشیمی و سلول‌های شبه‌الیگودندروسیتی مشتق از سلول‌های بنیادی مغز استخوان، سبب تولید میلین در محیط کشت خواهد شد که می‌توان به‌عنوان الگویی مناسب برای استفاده در شرایط *in vivo* از آنها بهره‌برد.

سپاس و قدردانی

این مقاله با حمایت مالی دانشگاه تربیت مدرس انجام شده‌است؛ همچنین از مرکز علوم اعصاب شفاء بیمارستان خاتم‌الانبیا برای پرداخت هزینه مواد و استفاده از میکروسکوپ فلورسنت و همچنین از آقای علی نوری‌زاده بابت مشاوره بخش مولکولی، تقدیر و تشکر می‌شود.

با تحقیق‌های دیگران همخوانی داشت (۲۲). در مطالعه‌ای سلول‌های BMSCs به سلول‌های بنیادی عصبی تبدیل شده، بیان مارکرهای عصبی توسط ایمونوسیتوشیمی بررسی شدند که نتایج از بیان بالای Nestin و عدم بیان GFAP حکایت داشتند (۲۰)؛ پس از این مرحله، سلول‌های بنیادی عصبی تحت اثر القاگرهایی مانند bFGF، HRG، PDGF و غلظت‌هایی متفاوت از T3 به سلول‌های شبه‌الیگودندروسیت تبدیل شدند. که بیشترین درصد OLCs توسط T3 با مقدار 25 ng/ml به دست آمد.

کاکا و همکاران (۲۰۱۲)، غلظت 10 ng/ml را گزارش و از دو روش پیش‌القا و القا استفاده کردند و درصد سلول‌های شبه‌الیگودندروسیت آنها ۵۸ درصد بود (۲۰). T3 سبب افزایش خصوصیات مورفولوژیکی و بلوغ سلول‌های پیش‌ساز شبه‌الیگودندروسیت و همچنین سبب رشد زواید و بیان myelin oligodendrocyte glycoprotein و glutamine synthetase می‌شود ولی افزایش غلظت آن برای سلول‌ها در محیط کشت می‌تواند مضر باشد (۲۳). اثر عوامل T3، PDGF، نوروتروفیک سیلیاری و انسولین بر کشت غنی‌شده از سلول‌های گلیال به همراه الیگودندروسایت در تحقیق‌ها نشان داده شده‌است (۲۴)؛ مطالعه حاضر نیز مانند مطالعات بالا اثر هورمون T3 را در تمایز به سلول‌های شبه‌الیگودندروسایت تأیید می‌کند. گروه Kang با قراردادن سلول‌های بنیادی جنینی انسانی در محیط DMEM/F12 و تعدادی القاکننده ابتدا پیش‌سازهای عصبی را به دست آورده، سپس این سلول‌ها را طی روشی دو مرحله‌ای در معرض عوامل رشد bFGF، PDGF و EGF به میزان 30 ng/ml قرارداد، توانستند بیش از ۸۱ درصد الیگودندروسایت را به دست آورند (۲۵)؛ بیشتر این سلول‌ها پروتئین‌های سطحی O4 و O1 را در مرحله پایانی بیان کردند. در مطالعه حاضر، حدود ۸۰ درصد بیان مثبت مارکرهای الیگودندروسیتی در غلظت 25 ng/ml از T3 به دست آمد؛ در تحقیقی دیگر، سلول‌های بنیادی جنینی طی دو مرحله تمایز ابتدا به NELCs و سپس به سلول‌های

منابع

1. Tohill M, Mantovani C, Wiberg M, Terenghi G. Rat bone marrow mesenchymal stem cells express glial markers and stimulate nerve regeneration. *Neuroscience Letter* 2004, 362(3):200-3.
2. Kopen GC, Prockop DJ, Phinney DG. Marrow Stromal cells migrate throughout forebrain and cerebellum and differentiate into astrocytes after injection into neonatal mouse brains. *Academic Sciences USA* 1999, 96(3):10711-16.
3. Woodbury D, Reynolds K, Black IB. Adult bone marrow stromal stem cells express germline, ectodermal, endodermal and mesodermal genes prior to neurogenesis. *Journal of Neuroscience Res* 2002, 69(6):908-17.
4. Bossolasco P, Cova L, Calzarossa C, Rimoldi SG, Borsotti C, Deliliers GL, et al. Neuroglial differentiation of human bone marrow stem cells in vitro. *Experimental Neurology*. 2005, 193(2):312-25.
5. 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. *Biochemistry Biophysics Resarech* 2001, 282(3):148-152.
6. Silani V, Cova L, Corbo M, Ciammola A, Polli E. Stem cell therapy for amyotrophic lateral sclerosis. *Journal of Lancet* 2004, 364(4):200-202.
7. Isacson O, Bjorklund LM, Schumacher JM. Toward full restoration of synaptic and terminal function of the dopaminergic system in parkinson's disease by stem cells. *Annual Neurology* 2003, 53(1):135-146.
8. Huttman A, Li CL, Duhrsen U. Bone marrow-driven stem cells and plasticity. *Annual Hematology* 2003, 82(4): 599-604.
9. Li Y, Chopp M, Chen J, Wang L, Guatam SC. Intrastratial transplantation of bone marrow nonhematopoietic cells improves functional recovery after stroke in adult mice. *Journal Cerebral Blood Flow Metabolic* 2000, 20(2): 1311-19.
10. Li Y, Chen J, Wang L, Zhang L, Lu M. Intracerebral transplantation of bone marrow stromal cells in a 1-methyl-4-phenyl-1, 2, 3, 6- tetrahydropyridine mouse model of Parkinson's disease. *Neuroscience Letter* 2001, 316(3): 67-70.
11. Abbaszadeh HA, Tiraihi T, Delshad AR, Saghedi Zadeh M, Taheri T. Bone marrow stromal cell transdifferentiation into oligodendrocyte-like cells using triiodothyronine as an inducer with expression of platelet-derived growth factor α as a maturity marker. *Iran Biomed J.* 2013 Apr;17(2):62-70.
12. Abbaszadeh HA, Tiraihi T, Noori-Zadeh A, Delshad AR, Sadeghzade M, Taheri T. Human ciliary neurotrophic factor-overexpressing stable bone marrow stromal cells in the treatment of a rat model of traumatic spinal cord injury. *Cytherapy*. 2015 May 1. pii: S1465-3249(15)00827-0
13. Naghdi M, Tiraihi T, Namin SA, Arabkheradmand J. Transdifferentiation of bone marrow stromal cells into cholinergic neuronal phenotype: a potential source for cell therapy in spinal cord injury. *Cytherapy Journal* 2009,11(2):137-52
14. Hayase M, Kitada M, Wakao S, Itokazu Y, Nozaki K, Hashimoto N, et al. Committed neural progenitor cells derived from genetically modified bone marrow stromal cells ameliorate deficits in a rat model of stroke. *Journal Cerebral Blood Flow Metabolic*. 2009, 29(8):1409-20.
15. Nakajima H, Uchida K, Guerrero AR, Watanabe S, Sugita D, Takeura N, et al. Transplantation of mesenchymal stem cells promotes an alternative pathway of macrophage activation and functional recovery after spinal cord injury. *Journal Neurotrauma* 2012, 20, 29(8):1614-25.
16. Wright KT, El Masri W, Osman A, Chowdhury J, Johnson WE. Bone marrow for the treatment of spinal cord injury: mechanisms and clinical applications. *Stem Cells Journal* 2011, 29(2):169-78
17. Lamoury FM, Croitoru-Lamoury J, Brew BJ. Undifferentiated mouse mesenchymal stem cells spontaneously express neural and stem cell markers Oct-4 and Rex-1. *Cytherapy Journal* 2006, 210(8):228-42.
18. Chen J, Li Y, Wang L. Therapeutic of intravenous administration of bone marrow stromal cells after cerebral ischemia in rats. *Stroke Journal* 2001, 32(3):1005-11.
19. Abbaszadeh HA, Tiraihi T, Delshad A, Saghedizadeh M, Taheri T, Kazemi H, et al. Differentiation of neurosphere-derived rat neural stem cells into oligodendrocyte-like cells by repressing PDGF- α and Olig2 with

- triiodothyronine. *Tissue Cell J.* 2014 Dec;46(6):462-9
20. 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. *Biochemistry Biophysics Research Communicate Journal* 2001, 282(3):148-152.
21. Hung SC. In vitro differentiation of size-sieved stem cells in vitro electrical active neural cells. *Stem Cells Journal* 2002, 20(2):522-529.
22. Gharibani PM, Tiraihi T, Arabkheradmand J. In vitro differentiation of GABAergic cells from bone marrow stromal cells using potassium chloride as inducer. *Restore Neurology Neuroscience Journal* 2010.
23. Jones SA, Jolson DM, Cuta KK, Mariash CN, Anderson GW. Triiodothyronine is a survival factor for developing oligodendrocytes. *Molecular Cell Endocrinology Journal* 2003, 199(1-2):49-60
24. Almazan G, Honegger P, Matthieu JM. Triiodothyronine stimulation of oligodendroglial differentiation and myelination. *Development Neuroscience Journal* 1985, 7(1):45-54.
25. Sang-Moon K, Myung S, Hyemyung S, Chul JY, Sun K. Efficient Induction of Oligodendrocytes from Human Embryonic Stem Cells. *Stem Cells Journal* 2005, 25(2):475-482.
26. Shin S, Mitalipova M, Noggle S, Tibbitts D, Venable A, Alison Venable, et al. Long-term proliferation of human embryonic stem cell-derived neuroepithelial cells using defined adherent culture conditions. *Stem Cell Journal* 2006, 24(1):125-38.
27. Dezawa M, Takahashi I, Esaki M, Takano M, Sawada H. Sciatic nerve regeneration in rats induced by transplantation of in vitro differentiated bone marrow stromal cells. *European Journal Neuroscience* 2001, 14(11):1771-6
28. Keilhoff G, Gohl A, Langnäse K, Fansa H, Wolf G. Transdifferentiation of mesenchymal stem cells into Schwann cell-like myelinating cells. *European Journal Cell Biology* 2006, 85(1):11-24.
29. Amur-Umarjee S, Schonmann V, Campagnoni AT. Neuronal regulation of myelin basic protein mRNA translocation in oligodendrocytes is mediated by platelet-derived growth factor. *Journal Development Neuroscience* 1997, 138(5):1077-87.

Archive

Daneshvar
Medicine

*Scientific-Research
Journal of Shahed
University
22nd Year, No.116
April- May, 2015*

Received: 01/03/2015

Last revised: 05/04/2015

Accepted: 07/04/2015

Co-culturing of neurosphere-derived oligodendrocyte like cells by motorneurons derived from mesenchymal stem cells for production of myelin

Hojjat-Allah Abbaszadeh¹, Taki Tiraihi^{2,3*}, Majid Sadeghizadeh⁴, Ali Reza Delshad⁵, Taher Taheri³, Hadi Kazmi³, Maryam Sadat Khoramgah⁶

1. Assistant professor - Department of Biology and Anatomical Sciences, School of Medicine, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran.
2. Professor - Department of Anatomical Sciences, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran.
3. Shafa Neurosciences Research Center, Khatam Al-Aniba Hospital, Tehran, Iran.
4. Professor - Department of Genetics, Faculty of Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran.
5. Associate Professor- Department of Anatomical Sciences, School of Medicine, Shahed University, Tehran, Iran.
6. Department of Medical Biotechnology, School of Medicine, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

E-mail: ttiraihi@yahoo.com

Abstract

Background and Objective: One of the approaches for treatment of demyelination diseases is cell therapy. Stem cells have been used as a source for generating oligodendrocyte. In a previous communication, the oligodendrocyte-like cells (OLCs) were generated from bone marrow stromal cells (BMSCs) using preinducers (dimethyl sulfoxide and retinoic acid) and induction protocol (PDGF, bFGF, heregulin and T3). In this investigation, we tried to increase the yield of oligodendrocyte-like cells (OLCs) by inducing the neural stem cells generated from neurospheres-derived BMSCs.

Materials and Methods: In this research study, BMSCs of adult female rats were expanded and then induced to form neurospheres (NS) using B27, the epidermal growth factor (EGF) and the basic fibroblast growth factor (bFGF), and subsequent isolation of neural stem cells (NSCs). This was followed by induction of the NSCs into OLCs with heregulin, PDGF-AA, bFGF and T₃. BMSCs, NS, NSCs and OLCs were characterized using immunocytochemistry for fibronectin, CD44, CD90, CD45, Oct-4, O4, Oligo2, O1 and MBP markers. PDGF receptor α (PDGFR- α), Oligo2 and MOG expression were evaluated using RT-PCR.

Results: The BMSCs expressed CD44, CD90, CD106 and Oct-4; the NSCs were immunoreactive to nestin and NF68, while the OLCs were immunoreactive to O4, Oligo2 and O1. In differentiating OLCs, Oligo2 and PDGFR- α mRNA was detected using RT-PCR technique.

Conclusion: Functional OLCs were generated from BMSCs-derived NS with high yield and were able to produce myelin after co-culture by motor neurons.

Key words: Oligodendrocyte-like cells, Bone marrow stromal cells, Motoneurons, Induction, Neural stem cells