

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

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

### چکیده

شیوا نعمتی<sup>۱</sup>

نرگس زارع مهرجردی<sup>۱</sup>

حسین بهاروند<sup>۲\*</sup>

۱- تهران پژوهشکده رویان، مرکز تحقیقات علوم

سلولی، گروه سلول‌های بنیادی

۲- دانشگاه علم و فرهنگ، گروه زیست‌شناسی

تکونی

**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 ایلپاک 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  $90 \pm 2/52$ ٪ مارکر نستین، حدود  $41/1 \pm 1$ ٪ مارکر توبولین و  $67/82 \pm 1/05$ ٪ 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.

\*نویسنده مسئول، تهران، صندوق پستی ۴۶۴۴-۱۹۳۹۵

پژوهشکده رویان، گروه سلول‌های بنیادی

تلفن: ۲۳۳۰۶۴۸۵

email: Baharvand@RoyanInstitute.org

### مقدمه

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.<sup>۱،۲</sup> بنابراین، خصوصیت عدم تحریک پذیری سیستم ایمنی آلورن 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 می‌باشند.<sup>۳</sup> توانایی تمایزی این سلول‌ها به سلول‌های نورونی در طی چند سال اخیر با استفاده از

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 Friedenstien و Petrakova از مغز استخوان رت به‌دست آمدند.<sup>۱</sup> 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.<sup>۲</sup> جداسازی، تکثیر به نسبت

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-phosphate (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 این مطالعه از سلول‌های بنیادی

مزاننشیمی مشتق از مغز استخوان انسان استفاده شد. بعد از آسپیراسیون مغز استخوان از محل استخوان ایلیاک فرد بالغ (که عمل آسپیراسیون در بیمارستان شهید بهشتی تهران و با رضایت فرد اهدا کننده صورت گرفت)، به منظور جداسازی این سلول‌ها نمونه آسپیره شده در آزمایشگاه مطابق روش Fickert و Fiedler<sup>۱</sup> و با استفاده از فایکول (شیب غلظت سوکروز) سلول‌های تک هسته‌ای بافت مغز استخوان جداسازی و در فلاسک‌های مخصوص کشت سلول کشت داده شدند،<sup>۱</sup> سلول‌های جداسازی شده به محیط کشت DMEM حاوی ۱۵٪ سرم و پنی‌سیلین-استرپتومایسین منتقل شدند و بعد از اینکه سلول‌ها سطح ظرف کشت را به صورت یک لایه کاملاً پوشش دادند، 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 قرار گرفت<sup>۱۵،۱۶</sup> و بین پاساژهای ۱۰-۷ برای آنالیزهای سلولی مورد استفاده قرار گرفت. به منظور شناسایی سلول‌های بنیادی مزاننشیمی مورد استفاده در این مطالعه از روش فلوسیتومتری نیز استفاده شد. این سلول‌ها از شاخص‌های سطح سلولی CD73، CD105 را به میزان بالایی بیان می‌کنند و در مقابل شاخص سطح سلولی CD45 در این سلول‌ها بیان نمی‌شود. مراحل فلوسیتومتری برای آنتی‌ژن اختصاصی سلول‌های مزاننشیمی (لازم به ذکر است این آنتی‌ژن‌ها جزء آنتی‌ژن‌های سطح سلولی می‌باشند) به شرح زیر بود:

سلول‌ها پس از شستشو با محلول شستشوی مخصوص فلوسیتومتری (که حاوی PBS، ۱٪ سرم و ۰/۰۵۸٪ EDTA می‌باشد) به مدت ۳۰ دقیقه با فرمالدئید ۴٪ فیکس گردید و در مرحله بعدی با آنتی‌بادی‌های مورد نظر را که شامل CD73، CD45، CD105 بوده و به

روش‌های مختلف القایی مطالعه گردید، تاکنون از مواد مختلف شیمیایی (القا با مرکاپتواتانول و دی‌متیل سولفوکساید) و یا فاکتورهای رشد سلولی (Brain-Derived Neurotrophic Factor (BDNF)، Epidermal Growth Factor (EGF)، Platelet-Derived Growth Factor (PDGF) و غیره استفاده شده است.<sup>۱۱-۱۶</sup> در سال ۲۰۰۰ Sanchez<sup>۱۲</sup> از یک سو و woodbury<sup>۱۳</sup> از سوی دیگر، تمایز سلول‌های مزاننشیمی به سلول‌های عصبی را در محیط آزمایشگاه با استفاده از مواد القایی شیمیایی مذکور نشان دادند، که این پتانسیل تمایزی توسط Xiang با کشت در آزمایشگاه، با روش‌های مولکولی و وسترن بلات تایید شد<sup>۱۴</sup> لازم به ذکر است که این سلول‌ها به صورت خودبه‌خودی برخی از پروتئین‌های اختصاصی سلول‌های عصبی را مثل پروتئین نستین، توپولین III و پروتئین نوروفیلانمنت اختصاصی سلول‌های عصبی را بیان می‌کنند. بنابراین می‌توان از این سلول‌ها برای درمان مبتلایان به ضایعات نخاعی بهره جست، اما این مسئله که چقدر سلول‌های به‌دست آمده از نظر عملکردی فعال می‌باشند و یا اینکه چه عوارضی می‌تواند بعد از پیوند به موجود زنده در پی داشته باشد هنوز در حاله‌ای از ابهام است.<sup>۸</sup>

نکته بعدی اینکه، از آنجایی که پیوند سلول‌های بالغ عصبی به موجود زنده فاقد کارایی لازم برای بهبود ضایعات وارده بوده و این سلول‌های تمایز یافته قادر به هماهنگ شدن و ترمیم نمی‌باشند، در پیوندهای ترمیمی سیستم اعصاب مرکزی سعی می‌شود از سلول‌های پیش‌ساز عصبی که در واقع سلول‌های متعهد شده و در عین حال نابالغ هستند استفاده گردد. در واقع این پیش‌سازها به سمت تولید سلول‌های عصبی بالغ با هدف تمایز به نورن‌های مورد نظر و نیاز برای درمان هدایت شده‌اند و قادر می‌باشند در بدن موجود زنده به سلول‌های مورد نظر تمایز یافته و در عین ترمیم منطقه آسیب دیده مراحل بلوغ خود را طی کرده و جزئی از منطقه مذکور گردند.

## روش بررسی

مطالعه حاضر از نوع مداخله‌ای آینده‌نگر بوده و در آزمایشگاه تمایز سلول‌های بنیادی، پژوهشکده روان‌جهد دانشگاهی از تاریخ ۱۳۸۶ تا ۱۳۸۷ به انجام رسیده است. مواد شیمیایی مورد استفاده عبارت بودند از:

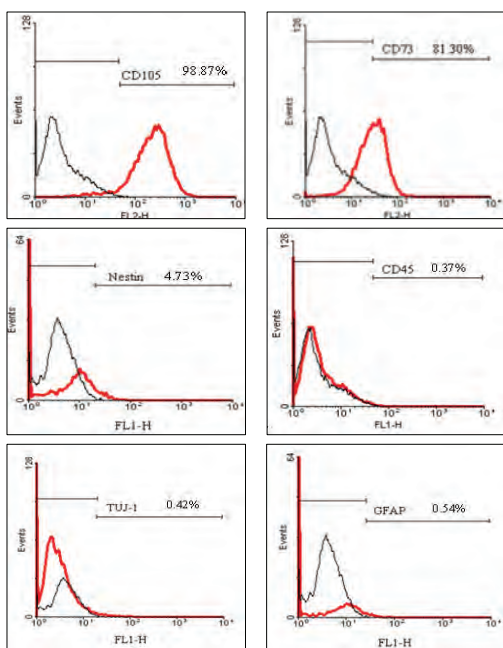
از تریپسینه کردن این سلول‌ها با غلظت  $1.5 \times 10^4 \text{ cell/cm}^2$  به ظرف‌های کشت باکتریایی پوشیده شده با آگارز ۱٪ که حاوی محیط کشت نوروئی، ۱۰٪ سرم بود منتقل شده و به مدت هفت روز تحت تیمار با  $20 \text{ ng/ml}$  bFGF, hEGF و رتینوئیک اسید  $2 \mu\text{M}$  قرار گرفتند. (سلول‌ها چند ساعت بعد از انتقال به ظرف‌های مذکور به صورت جمعیت‌های مجتمعی به نام نورو سفر در می‌آیند). محیط کشت مذکور هر دو روز یک‌بار تعویض گردید. در نهایت به منظور بررسی تمایز سلول‌های القا شده بعد از تیمار نروسفرها با آنزیم تریپسین-EDTA و از هم گسستن ساختارهای مجتمع نروسفری به صورت سلول‌های منفرد، آنها با غلظت  $1 \times 10^5 \text{ cell/cm}^2$  - ۰/۵ به پلیت‌های شش خانه پوشیده شده با پلی-ال-اورنیتین و لایمین منتقل و در محیط کشت نوروئی 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 گلایال (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 پارافمالدئید 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 (نروسفر) انجام شد. بررسی‌های ایمونوفلورسانس در این مطالعه در دو مرحله نروسفر (سلول‌ها بعد از تیمار) و سلول‌های پلیت شده در روز هفتم، صورت گرفت. مراحل ایمونوسیتوشیمی به شرح زیر می‌باشد: سلول‌ها با محلول پارافمالدئید 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 GFAP، Tuj1، رقیق و ۶۰ دقیقه در دمای  $37^\circ\text{C}$  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  $37^\circ\text{C}$  نگهداری گردید.

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 پارافمالدئید یک درصد توسط دستگاه فلوسایتومتری مدل Bectin Dekenson و نرم‌افزار Win MDI ۲/۸ مورد بررسی قرار گرفتند. از آنجایی که سلول‌های بنیادی مزانشیمی توانایی تمایز به بافت استخوان و چربی را دارا می‌باشند، در ادامه به منظور حصول اطمینان از توان تمایز سلول‌های استخراج شده، توانایی تمایز 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  $1 \times 10^4 \text{ cell/cm}^2$  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 زمانی که سطح پلیت به‌طور کامل با سلول پوشیده شد محیط کشت مذکور را با محیط القایی حاوی DMEM محتوی  $50 \mu\text{g/ml}$  آسکوربیک اسید-۲- فسفات،  $10 \text{ nM}$  دکزامتازون،  $10 \text{ nM}$ ، 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  $50 \mu\text{g/ml}$  ایندومتاسین،  $10 \text{ nM}$  دکزامتازون 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 oil red ۰/۵٪ انکوبه شدند. نواحی که به سلول‌های چربی تمایز پیدا کرده بودند به علت واکنش تری‌گلیسیریدهای موجود در سلول‌های تمایز یافته به با رنگ oil red به رنگ قرمز در آمدند.<sup>۱۷</sup> به منظور تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی به سلول‌های عصبی، بعد

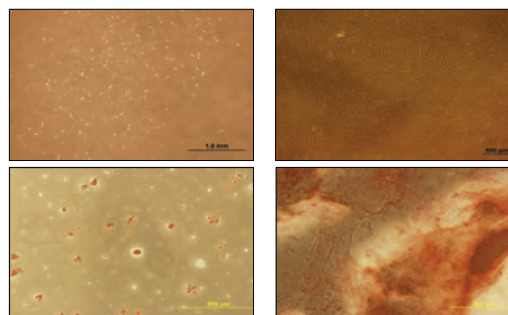
یافته‌ها

در حدود ۴/۷۳٪ و GFAP در حدود ۰/۵۴٪ و توپولین 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 القا یی 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 توپولین III از ۴۲٪ به ۴۱٪) مواجه هستیم (شکل ۳) 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 توپولین و GFAP را در این سلول‌ها نشان داد (شکل ۴). تغییرات مشاهده شده در این سلول‌ها نشان دهنده تغییر ماهیت این سلول‌ها

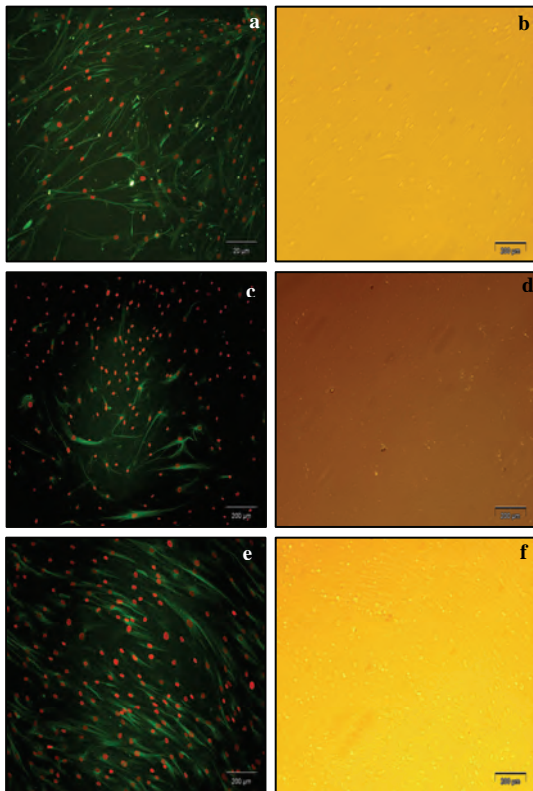
از آنجایی‌که این سلول‌های بنیادی مزانشیمی ۰/۰۰۱ تا ۰/۱ درصد از جمعیت سلول‌های هسته‌دار مغز استخوان انسان را تشکیل می‌دهند،<sup>۲</sup> لذا در کشت‌های اولیه به صورت جمعیت ناخالص می‌باشند و در پاساژهای بعدی به صورت خالص در می‌آیند، در کولنی‌های خالص سلول‌های مزانشیمی از لحاظ مورفولوژیکی شبیه به سلول‌های فیروبیلاست (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). قبلاً 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 نشان 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



شکل - ۲: میزان بیان پروتئین (a) CD105 (۹۸/۸۷٪)، (b) CD45 (۰/۳۷٪)، (c) GFAP (۰/۵۴٪) در سلول‌های مزانشیمی. (d) میزان بیان پروتئین Nestin (۴/۷۳٪) قبل از تیمار، (e) میزان بیان پروتئین TuJ1 (۰/۴۲٪) قبل از تیمار

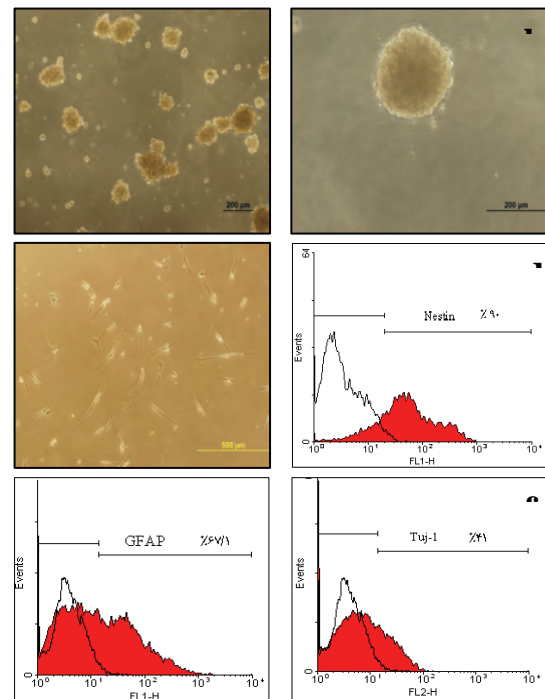


شکل - ۱: سلول‌های بنیادی مزانشیمی و خصوصیات آنها، الف: کشت اولیه سلول‌های تک‌هسته‌ای مغز استخوان (b) پاساژهای بعدی سلول‌ها در محیط آزمایشگاه، با درصد خلوص قابل توجه. (بررسی توان تمایزی). (c) تمایز سلول‌های مزانشیمی به استخوانی (d) تمایز سلول‌های مزانشیمی به چربی.



شکل- ۴: حضور پروتئین‌های 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.<sup>۱۳</sup> 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 کانکاوآلین 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.<sup>۱۴</sup> Andreas herman نیز توانستند با استفاده از محیط فاقد سرم و فاکتورهای رشد bFGF،



شکل- ۳: 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 پروتئین نستین بعد از القا (۹۰٪). (e) بیان پروتئین توبولین بعد از القا (۴۱٪). (f) میزان بیان پروتئین GFAP بعد از القا (۶۷٪).

بعد از قرار گرفتن در معرض تیمار است. تمایز این سلول‌ها بعد از اتمام تیمار القایی به صورت 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.<sup>۱۹</sup> مطالعات مختلفی در زمینه تمایز این سلول‌ها به سلول‌های نورونی صورت گرفته است.<sup>۸-۱۱</sup> اولین تلاش‌ها در زمینه تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی به سلول‌های نورونی توسط woodbury آغاز شد وی این کار را با استفاده از مرکاپتوانول و DMSO روی سلول‌های بنیادی مزانشیمی انسانی

اینکه در مطالعات گذشته استفاده از فاکتورهای رشد bFGF, EGF در راه انداختن مسیرهای آبخاری 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.<sup>۸۹</sup> از دیگر مسائل حائز اهمیت در القا تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی به سلول‌های عصبی، تمایز این سلول‌ها به رده سلول‌های آستروسیتی است.<sup>۳۳</sup> 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 کارآمدتری برای القای این سلول‌ها انتخاب گردد، به طوری که بتوان درصد تولید سلول‌های نورونی را به میزان مناسبی بالا برد. از همین لحاظ با توجه به اینکه ماده رتینویک اسید منجر به هدایت مسیر تولید سلول‌های نورونی از سلول‌های پیش‌ساز عصب می‌گردد و عدم حضور آن موجب به وجود آمدن دودمان‌های آستروسیتی از این سلول‌ها می‌شود<sup>۱۰</sup> لذا رتینویک اسید نیز به عنوان 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 پروتئین‌های 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 EGF, bFGF و رتینویک 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 حدوداً 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

EGF و کشت این سلول‌ها به صورت سوسپانسیون سلول‌های مجتمعی مشابه ساختارهای نوروسفیری را از سلول‌های مزانشیمی به دست آوردند. 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 به دست 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 به صورت ساختارهای کروی (نوروسفیری) در می‌آیند، کشت داد و فنوتیپ این سلول‌ها مشابه سلول‌های پیش‌ساز 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.<sup>۹</sup> 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.<sup>۱۱و۱۰-۲۲</sup> 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 مواجهه 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 به دست 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

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 به نظر 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 پروتئین‌های 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.

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 Tbulin-III را در مراحل پیش‌سازی سلول‌های عصبی به اثبات رسانیده‌اند.<sup>۲۵</sup> در بررسی‌های تمایزی انجام شده تمایز سلول‌ها کاملاً به صورت 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 توپولین III نیز (۴۱٪) افزایش یافته است، البته علاوه بر پروتئین‌های ذکر شده بیان پروتئین شاخص سلول‌های گلیالی مثل GFAP نیز افزایش نشان داده است (میانگین بیان پروتئین

## References

- Friedenstein AJ, Piatetzky-Shapiro II, Petrakova KV. Osteogenesis in transplants of bone marrow cells. *J Embryol Exp Morphol* 1966; 16(3):381-90.
- 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.
- Khodadadi L, Baharvand H. Immunogenicity of stem cells. *Yakhteh J* 2007; 8(32):276-303.
- 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.
- 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.
- Song L, Tuan RS. Transdifferentiation potential of human mesenchymal stem cells derived from bone marrow. *FASEB J* 2004; 18(9):980-2.
- 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.
- 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.
- 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.
- Gregg CT, Shingo T, Weiss S. Neural stem cells of the mammalian forebrain. *Symp Soc Exp Biol* 2001; (53):1-19.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- Friedenstein AJ, Piatetzky-Shapiro II, Petrakova KV. Osteogenesis in transplants of bone marrow cells. *J Embryol Exp Morphol* 1966; 16(3):381-90.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.

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

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

## Abstract

Nemati Sh.<sup>1</sup>  
Zare Mehrjerdi N.<sup>1</sup>  
Baharvand H.<sup>1,2\*</sup>

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

**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:** Flowcytometry 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@RoyanInstitute.org