خون
دوره ۴ شماره ۴ زمستان ۸۶ (۲۸۴-۲۷۵)

بیان ژن‌های خود بازسازی Oct-4 ، Sox-2 ، Nanog ، Nucleostemin ، Bmi-1 و Sox-9 در سلول‌های بنیادین مزانشیمی ورید بند ناف انسان

عباس جعفری کرمانی[۱]، دکتر فردین فتحی[۲]، دکتر سید جواد مولی[۳]، یوسف قیصری[۴]

چکیده

سابقه و هدف

سلول‌های بنیادین با دو ویژگی کلیدی توانایی خودبازسازی و پر توان بودن آن‌ها تعریف می‌شوند. از آن جا که مکانیسم‌های کنترل کننده خودبازسازی در سلول‌های بنیادین مختلف می‌تواند متفاوت باشد، بررسی بیان ژن‌های مسؤول خودبازسازی در سلول‌های مختلف دارای اهمیت بسیار زیادی است. سلول‌های بنیادین بند ناف به تازگی مورد توجه زیادی قرار گرفته‌اند، چرا که این سلول‌ها دارای مزایای زیادی نسبت به سایر سلول‌های بنیادین، برای استفاده در روش‌های سلول درمانی هستند. هدف از انجام مطالعه حاضر، بررسی بیان ژن‌های خودبازسازی Oct-4 ، Sox2 ، Nanog ، Bmi-1 ، Sox-9 و Nucleostemin در سلول‌های بنیادین مزانشیمی جدا شده از ورید بند ناف انسان می‌باشد.

مواد وروش‌ها

مطالعه انجام شده از نوع تجربی بود. بند ناف‌ها در شرایط استریل جداسازی و در بافر HBSS به آزمایشگاه انتقال یافتند. سلول‌های بنیادین مزانشیمی به وسیله تیمار با آنزیم کلاژناز استخراج و بر اساس توانایی چسبیدن به ظروف پلاستیکی و در محیط DMEM حاوی ۱۵٪ FBS کشت داده شدند. سپس مارکرهای سطحی CD105، CD45 ، HLA-DR ، CD166 ، CD54 و CD34 در این سلول‌ها بررسی شد و نهایتاً بیان ژن‌های مسؤول خودبازسازی با استفاده از روش‌های RT-PCR و ایمونوسیتوشیمی مورد مطالعه قرار گرفت.

یافته‌ها

بررسی فلوسایتومتری مارکرهای سطحی سلول‌های جداسازی شده نشان داد که این سلول‌ها برای مارکر CD105(SH2)(۹۸٪) مثبت و برای مارکرهای CD34 (۰٪)، CD54 (۱٪)، CD45 (۰٪)، CD106 (۰٪)، CD166 (۱٪) و HLA-DR (۰٪) منفی هستند. هم چنین بررسی‌های انجام شده، برای اولین بار بیان ژن‌های Oct-4 ، Nanog ، Nucleostemin ،Bmi-1 و Sox-9 و عدم بیان ژن Sox-2 را در سلول‌های بنیادین مزانشیمی ورید بند ناف انسان نشان داد.

نتیجه گیری

نتایج حاصله نشان می‌دهد مکانیسم‌هایی که هم اکنون برای عملکرد ژن‌های Oct-4 ، Sox-2 و Nanog شناخته شده است، تنها مکانیسم ممکن برای تنظیم خودبازسازی از طریق این ژن‌ها نیست، بلکه ترکیبی از ژن‌های دخیل در تنظیم خودبازسازی سلول‌های بنیادین جنینی و بالغ نیز می‌تواند برای تنظیم خودبازسازی سلول‌های بنیادین مورد استفاده قرار بگیرد.

کلمات کلیدی: سلول‌های بنیادین مزانشیمی، بند ناف، ایمونوسیتوشیمی، PCR

تاریخ دریافت : ۸۶/۵/۲۴
تاریخ پذیرش : ۸۶/۱۱/۱۰

۱ـ دانشجوی کارشناسی ارشد ژنتیک ـ دانشکده علوم پایه دانشگاه تربیت مدرس
۲ـ مؤلف مسؤول: PhD آناتومی ـ استادیار دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی کردستان ـ صندوق پستی ۱۳۴۴۶-۶۶۱۷۷
۳- PhD ژنتیک ـ دانشیار دانشکده علوم پایه دانشگاه تربیت مدرس
۴- دانشجوی PhD فرآورده‌های بیولوژیک ـ انستیتو پاستور ایران

Archive of SID
www.SID.ir

مقدمه

در طی سالیان اخیر، پیشرفت‌های شگرفی در زمینه علم سلول‌های بنیادین صورت گرفته است. از جمله مهم‌ترین این پیشرفت‌ها می‌توان به ظهور روش‌های سلول درمانی (Cell therapy) اشاره کرد. در روش‌های سلول درمانی، که تا به امروز به عنوان نقطه عطف پیشرفت‌ها در زمینه پزشکی ترمیمی(Regenerative medicine) محسوب می‌شوند، سلول‌های بنیادین برای درمان طیف وسیعی از بیماری‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرند(۱).

سلول‌های بنیادین در یک تقسیم‌بندی کلی به دو دسته سلول‌های بنیادین جنینی(Embryonic Stem Cells) و سلول‌های بنیادین بالغ(Adult Stem Cells) دسته‌بندی می‌شوند. سلول‌های بنیادین جنینی و بالغ از نظر منشاء، قدرت تمایز به سلول‌های مختلف و مدت زمان حفظ توانایی خودبازسازی متفاوت هستند(۲). سلول‌های بنیادین از نظر تعریف به سلول‌هایی گفته می‌شود که توانایی خودبازسازی و تمایز به سلول‌های مختلف سازنده بدن را دارا می‌باشند. این دو ویژگی بسیار مهم باعث شده است که تحقیقات وسیعی بر روی این سلول‌ها جهت تمایز آن‌ها به سلول‌های مختلف و به کارگیری آن‌ها در درمان بیماری‌ها به عمل آید.

تاکنون سلول‌های بنیادین بالغ در بافت‌های مختلفی از جمله بافت عصبی، مغز استخوان، پوست، کبد، بافت چربی و بند ناف یافت شده‌اند(۲).

از آن جا که مکانیسم‌های کنترل کننده خودبازسازی در سلول‌های بنیادین مختلف می‌تواند متفاوت باشد، بررسی بیان ژن‌های مسؤول خودبازسازی در سلول‌های مختلف دارای اهمیت بسیار زیادی است. در صورت مشخص شدن مکانیسم‌های دخیل در تنظیم پتانسیل خودبازسازی سلول‌های بنیادین، جهش بزرگی در روش‌های سلول درمانی به وقوع خواهد پیوست. چرا که سلول‌های بنیادین مورد استفاده در روش‌های درمانی، تا حد زیادی تحت کنترل واقع شده و در نتیجه، نه تنها از خطر ایجاد تراتوما توسط آن‌ها کاسته می‌شود، بلکه تمایز آن‌ها به سلول‌های مورد نظر نیز به صورت کاملاً کنترل شده انجام خواهد گرفت. علاوه بر این از آن جا که وقوع سرطان در بافت‌های مختلف بدن، حاصل تکثیر کنترل نشده سلول‌ها است، بالطبع شناسایی مکانیسم‌های خودبازسازی، کمک بزرگی برای توسعه روش‌های درمانی هدفمند خواهد بود. اولین قدم در راه شناسایی مکانیسم‌های خودبازسازی در یک نوع سلول بنیادین، مشخص کردن ژن‌های خودبازسازی است که در آن نوعی سلول خاص بیان می‌شود(۳).

سلول‌های بنیادین بند ناف به تازگی مورد توجه زیادی قرار گرفته‌اند، چرا که این سلول‌ها دارای مزایای زیادی نسبت به سایر سلول‌های بنیادین، برای استفاده در روش‌های سلول درمانی هستند. از جمله مهم‌ترین این مزایا می‌توان به در دسترس بودن بند ناف به میزان زیاد و غیر تهاجمی بودن روش‌های تهیه آن‌ها اشاره کرد. در صورت جداسازی سلول‌های بنیادین از بند ناف،روزانه به ازای هر تولد، یک نوع سلول جدید، با یک ترکیب HLA جدید به بانک سلولی اضافه می‌گردد. به علاوه، نشان داده شده که در پیوندهایی که از سلول‌های بنیادین بند ناف استفاده می‌شود، انعطاف‌پذیری در برابر عدم تطابق HLA ، بیشتر از زمانی است که سایر سلول‌ها برای پیوند مورد استفاده قرار می‌گیرند. در نتیجه، استفاده از این سلول‌ها تا حد زیادی باعث افزایش احتمال موفقیت در انجام پیوندهای غیر اتولوگ می‌گردد. از جمله مزایای دیگر سلول‌های بنیادین بند ناف، می‌توان به میزان بلوغ آن‌ها اشاره کرد. به طور کلی سلول‌های بنیادین بند ناف از نظر میزان بلوغ، حد واسط سلول‌های بنیادین بالغ و جنینی هستند. این امر نتایج متعددی را به همراه دارد که از جمله آن‌ها می توان به پتانسیل تکثیر بیشتر و تمایز راحت‌تر این سلول‌ها نسبت به سلول‌های بنیادین بالغ اشاره کرد. از طرفی سلول‌های بنیادین بند ناف مشکلات استفاده از سلول‌های بنیادین جنینی از قبیل خطر ایجاد تراتوما و مسایل اخلاقی را نیز دارا نمی‌باشند(۷-۴).

هدف از انجام مطالعه حاضر، بررسی بیان ژن‌های خودبازسازی Oct-4 ، Sox2 ، Nanog ، Bmi-1 ، Sox-9 و Nucleostemin در سلول‌های بنیادین مزانشیمی جدا شده از ورید بند ناف انسان می‌باشد. ژن‌های نام برده شده، همگی جزو فاکتورهای رونویسی هستند که بیان سایر

Archive of SID
www.SID.ir

ژن‌ها در طول دوران نمو را تنظیم می‌نمایند. کاهش بیان این ژن‌ها، منجر به کاهش پرتوانی و پتانسیل خودبازسازی سلول و ورود به پروسه تمایز می‌گردد(۱۲-۸). تا به امروز هیچ گزارشی مبنی بر بررسی بیان این ژن‌ها در سلول‌های بنیادین مزانشیمی ورید بند ناف انسان ارایه نشده است.

مواد و روش ها

مطالعه انجام شده از نوع تجربی بود. برای جداسازی سلول‌های بنیادین مزانشیمی از ورید بند ناف انسان، بند ناف نوزاد تازه متولد شده در بافر HBSS حاوی آنتی‌بیوتیک و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد از بیمارستان به آزمایشگاه منتقل شد(n =۱۵) و پس از ضد عفونی شدن در الکل ۷۵٪ به مدت ۳۰ ثانیه، دوباره به بافر HBSS منتقل گردید. سپس سلول‌های بنیادین مزانشیمی به وسیله تیمار با آنزیم کلاژناز از ورید بند ناف استخراج گردید. به این صورت که ابتدا یک انتهای بند ناف مسدود شد و پس از تزریق آنزیم کلاژناز به درون ورید، با استفاده از سرنگ، انتهای دوم نیز مسدود گردید و بند ناف به مدت ۲ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. سپس دو انتهای بند ناف باز شد و با تزریق محیط کشت به درون ورید، سلول‌های جدا شده از ورید خارج شده و در محیط کشت DMEM حاوی آنتی‌بیوتیک و ۱۵٪ FBS به فلاسک مخصوص کشت سلول منتقل و در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد حاوی ۵٪ CO_2 قرار داده شدند. پس از گذشت سه روز، سلول‌هایی که به کف فلاسک نچسبیده بودند، با تعویض محیط از فلاسک خارج شدند. محیط کشت سلول‌ها به مدت دو هفته و هر ۳ روز یک مرتبه تعویض شد. پس از گذشت این زمان، سلول‌های باقی مانده در فلاسک، همان سلول‌های بنیادین مزانشیمی ورید بند ناف بودند که در مراحل بعدی تحقیق مورد استفاده قرار گرفتند. کشت این سلول‌ها بدون تغییر قابل توجهی در پتانسیل تکثیر آن‌ها، تا بیش از ۱۵ پاساژ ادامه یافت. بررسی مارکرهای سطحی با استفاده از آنتی‌بادی‌های PE-CD106 ، PE-CD54، FITC-CD45 ، PE-HLA-DR (بیوسینس)، PE-CD166 ، PE-CD105 (R&D سیستم) و PE-CD34 (داکو) انجام شد. لازم به ذکر است که کلیه آنتی‌بادی‌های مورد استفاده، آنتی‌بادی‌های تولید شده توسط موش هستند که آنتی‌ژن انسانی را شناسایی می‌کنند و همگی از یک کلاس IgG می‌باشند. برای بررسی مارکرهای سطحی توسط فلوسایتومتر، سلول‌های پاساژ پنجم با استفاده از تریپسین از کف فلاسک جدا شدند و از سرم ۳٪ رت برای جلوگیری از اتصالات غیر اختصاصی استفاده شد. سلول‌ها با آنتی‌بادی‌های مورد نظر به مدت یک ساعت در ۳٪ PBS-BSA ، در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. برای هر آنتی‌بادی ۱×۱۰^{۶} سلول مورد استفاده قرارگرفت. سپس سلول‌ها با استفاده از پارافرم آلدئید ۱٪ فیکس شده و Gating سلول‌ها بر اساس FSC(Forward Scater) و SSC(Side Scater) با استفاده از دستگاه فلوسایتومتر(Partec PAS) انجام شد. برای حذف اثر اتصال غیر اختصاصی آنتی‌بادی‌ها از آنتی‌بادی‌های کنترل منفی ایزوتایپ(بیوسایینس) استفاده شد. از آن جا که کلیه آنتی‌بادی‌های دارای فلوروکروم(PE) ، از یک کلاس IgG هستند و همگی در موش تولید شده‌اند، برای همه آن‌ها از یک ایزوتایپ کنترل مشترک استفاده شد. از روش RT-PCR برای بررسی بیان ژن‌های مورد مطالعه استفاده شد(جدول ۱). برای این منظور، ابتدا با استفاده از محلول RNX (Plus – سیناژن)، RNA کل را از سلول‌ها استخراج نموده و پس از اطمینان یافتن از کیفیت RNA استخراج شده با انجام الکتروفورز ژل آگارز و اسپکتروفتومتری،جهت تهیه cDNA از آغازگر Oligo dT (بیوتک ـ آلمان) و کیت Rt (بیونیر ـ کره جنوبی) استفاده شد. واکنش RT در حجم نهایی ۵۰ میکرولیتر انجام گرفت. پس از تهیه cDNA ، واکنش PCR جهت تکثیر قطعه مورد نظر انجام گرفت. واکنش PCR درحجم نهایی ۲۰ میکرولیتر انجام شد و جهت تهیه حجم مذکور، علاوه بر DNA الگو(محصول واکنش RT) از کیت PCR (بیونیر ـ کره جنوبی)، آب مقطر استریل و آغازگرهای بالادست(Forward) و پایین دست(Reverse)، با مشخصات مورد اشاره در جدول شماره ۱ استفاده شد.

پس از آماده ساختن حجم مورد نظر جهت انجام واکنش، واکنش PCR با شرایط ۴۵ ثانیه دناتوریشن در دمای ۹۴ درجه سانتیگراد، ۴۵ ثانیه آنیلینگ در دمای

Archive of SID
www.SID.ir

جدول ۱: اسامی ژن‌ها و توالی مربوط به آغازگرهای بالادست(F) و پایین‌دستی(R) که در این پژوهش استفاده شدند.

نام ژن	اندازه(bp)		توالی آغازگر
Oct-4	۴۷۰	F	GAGAATTTGTTCCTGCAGTGC
		R	GTTCCCAATTCCTTCCTTAGTG
Sox-2	۴۲۶	F	ATGGGTTCGGTGGTCAAGTC
		R	GTGGATGGGATTGGTGTTCTC
Nanog	۴۷۰	F	ACCTATGCCTGTGATTTGTGG
		R	AAGAGTAGAGGCTGGGGTAGG
Nucleostemin	۷۴۷	F	CAGAGATCCTCTTGGTTGCAG
		R	AATGAGGCACCTGTCCACTC
Bmi-1	۴۱۳	F	TACTCCAGTGCAGTCTCCTC
		R	TCCCATCTTTCCTAACACAG
Sox-9	۵۵۷	F	CGCGTATGAATCTCCTGGAC
		R	CGTTCTTCACCGACTTCCTC
β_2m	۲۰۰	F	CTACTCTCTCTTTCTGGCCTG
		R	GACAAGTCTGAATGCTCCAC

۶۴-۶۰ درجه سانتی‌گراد(بر اساس نوع آغازگر) و ۱ دقیقه اکستنشن در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد انجام گرفت. تعداد ۳۵ سیکل و یک سیکل اکستنشن نهایی به مدت پنج دقیقه در ۷۲ درجه سانتی‌گراد در نظر گرفته شد. جهت انجام هر دو واکنش RT-PCR از دستگاه ماستر سایکلر(اپندورف) استفاده شد. ژن $beta_2m$ به عنوان کنترل داخلی مورد استفاده قرار گرفت. بعد از اتمام واکنش، ۸ میکرولیتر از محصول واکنش PCR توسط الکتروفورز ژل آگارز ۱ درصد بررسی شد. به منظور حصول اطمینان از صحیح بودن نتایج به دست آمده، هر واکنش RT-PCR سه مرتبه تکرار شد. آغازگرهای مورد استفاده در این مطالعه با کمک نرم‌افزار Gene runner طراحی شدند. کلیه آغازگرها از شرکت MWG آلمان خریداری شدند.

در طول آزمایش از میکروسکوپ معکوس فلورسنت (Nikon-TE ۳۰۰) جهت ارزیابی سلول‌ها استفاده شد. به منظور انجام ارزیابی‌های ایمونوسیتوشیمی، سلول‌ها به مدت ۷ دقیقه با استفاده از پارافرمالدئید ۴ درصد در دمای اتاق فیکس شدند. از بافر بلاک‌کننده حاوی Triton X-۱۰۰ و سرم Donkey جهت نفوذپذیری سلول‌ها و مهار آنتی‌ژن‌های غیر اختصاصی که احتمال اتصال آنتی‌بادی ثانویه به آن‌ها وجود داشت استفاده شد.

آنتی‌بادی اولیه Goat anti human Oct-4 (سانتاکروز بیوتکنولوژی) با غلظت ۱/۵۰۰ و Goat anti human Nucleostemin (سانتاکروز بیوتکنولوژی) با غلظت ۱/۲۵۰ به مدت ۲ ساعت در دمای ۳۷ °C مورد استفاده قرار گرفتند. سپس آنتی‌بادی ثانویه Donkey anti goat (سانتاکروز بیوتکنولوژی) متصل به Texas Red با غلظت ۱/۴۰۰ به مدت یک ساعت در دمای ۳۷°C استفاده شد. پس از شستشوی سلول‌ها با بافر فسفات، از Vector hard set(Vector Laboratories) که همراه آن رنگ داپی هم موجود بود، جهت ماونت کردن سلول‌ها استفاده شد و نهایتاً سلول‌ها به کمک میکروسکوپ فلورسنت مطالعه و

Archive of SID
www.SID.ir

عکسبرداری شدند. هم چنین، یک چاهک به عنوان کنترل در نظر گرفته شد که در آن، آنتی‌بادی اولیه اضافه نگردید. به منظور حصول اطمینان از صحیح بودن نتایج به دست آمده، هر آزمایش ایمونوسیتوشیمی دو مرتبه تکرار شد.

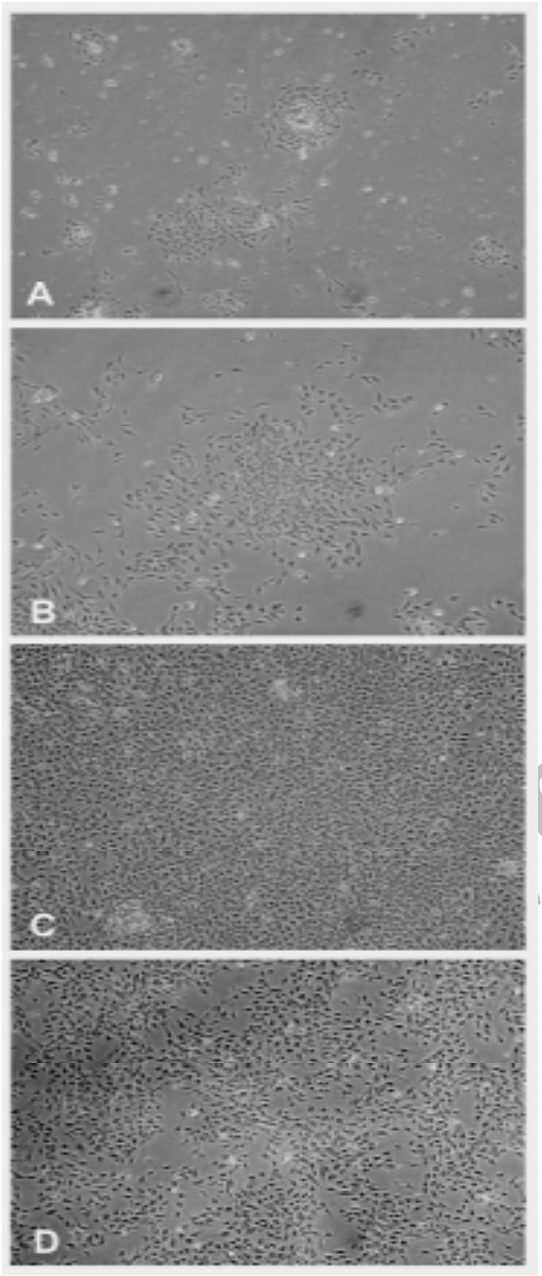
یافته ها

سلول‌های جداسازی شده با روش مورد استفاده در این مطالعه، دارای مورفولوژی شبیه سلول‌های فیبروبلاستی بوده و ابتدا به صورت کلنی‌های مجزا به کف فلاسک می‌چسبند. سپس در اثر تکثیر سلول‌ها، اندازه کلونی‌ها بزرگ‌تر می‌شود، تا جایی که پس از گذشت تقریباً ۶ روز، کل سطح فلاسک با سلول‌ها پوشیده می‌شود(شکل ۱). کشت این سلول‌ها بدون تغییر قابل توجهی در مورفولوژی و پتانسیل تکثیر، تا بیش از ۱۵ پاساژ ادامه یافت که این امر نشان‌دهنده توانایی خودبازسازی و در نتیجه ماهیت بنیادین جمعیت سلولی جداسازی شده بود. بررسی فلوسایتومتری مارکرهای سطحی سلول‌های جداسازی شده نشان داد که این سلول‌ها برای مارکر CD105 (SH2) (۹۸٪) مثبت و برای مارکرهای CD34 (۰٪)، CD54 (۱٪)، CD45 (۰٪)، CD106 (۰٪)، CD166 (۱٪) و HLA-DR (۰٪) منفی بودند(شکل ۲). بررسی‌های RT-PCR نشان‌دهنده بیان ژن‌های Oct-4 ، Nanog ، Nucleostemin ، Bmi-1 و Sox-9 و عدم بیان ژن Sox-2 در سلول‌های بنیادین مزانشیمی ورید بند ناف انسان بود(شکل ۳). از طرفی ارزیابی‌های ایمونوسیتوشیمی نیز بیان ژن‌های Oct-4 و Nucleostemin را در این سلول‌ها تایید کردند(شکل ۴).

بحث

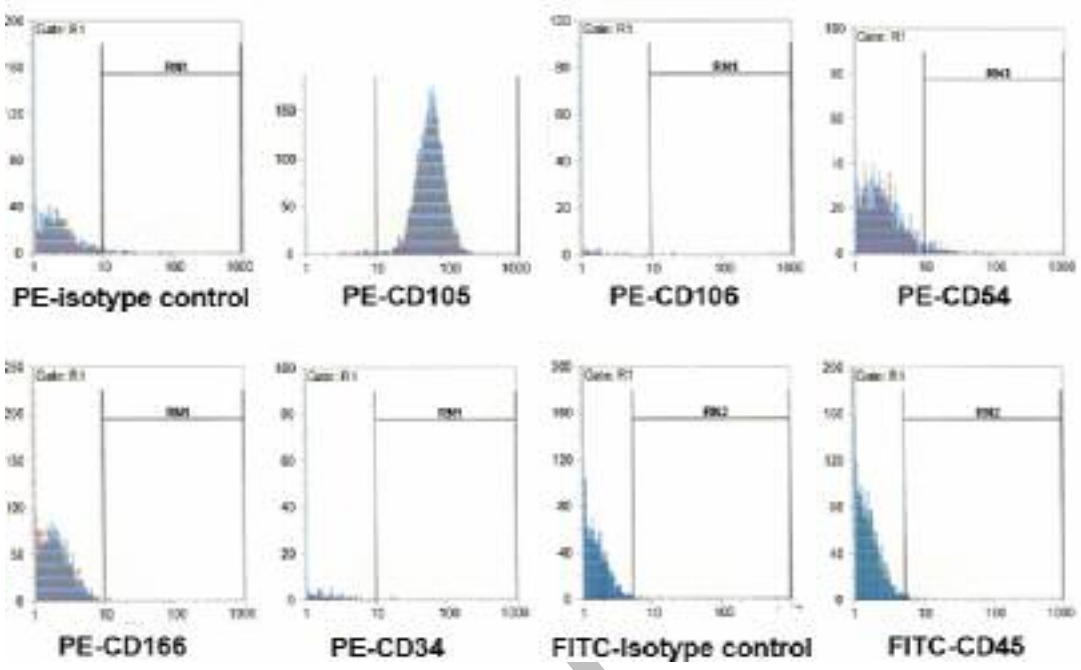
پس از موفقیت کلاکمن و همکارانش(سال ۱۹۸۸) در استفاده از سلول‌های بنیادین خون‌ساز بند ناف در درمان بیماری آنمی فانکونی، توجه بسیاری از محققین به این سلول‌ها جلب شد و بدین ترتیب پنجره تازه‌ای به روی روش‌های سلول درمانی باز گردید(۱۳).

از آن زمان تاکنون، بررسی‌های زیادی بر روی سلول‌های بنیادین بند ناف صورت گرفته است. در نتیجه این بررسی‌ها نشان داده که سلول‌های بنیادین بند ناف، نه تنها محدودیت‌های ذکر شده در استفاده از سایر انواع

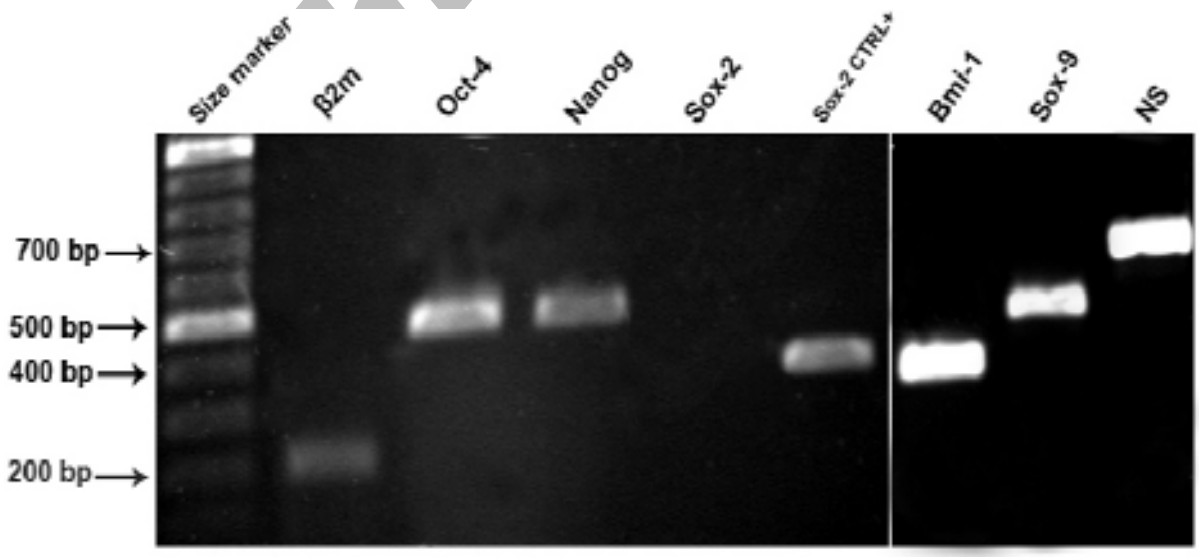


شکل ۱: تصویر سلول‌های بنیادین مزانشیمی جدا شده از بند ناف انسان. همان طور که مشاهده می‌شود، سلول‌های جداسازی شده ابتدا به صورت کلنی‌های مجزا به کف فلاسک می‌چسبند. سپس در اثر تکثیر سلول ها، اندازه کلونی‌ها بزرگ‌تر می‌شود، تا جایی که پس از گذشت تقریباً ۶ روز، کل سطح فلاسک با سلول‌ها پوشیده می‌شود. شکل‌های A ، B و C به ترتیب، سلول‌های بنیادین مزانشیمی ورید بند ناف انسان را پس از گذشت ۲، ۴ و ۶ روز از زمان جداسازی نشان می‌دهند. شکل D نشان‌دهنده سلول‌ها در پاساژ چهارم می‌باشد. همان طور که مشاهده می‌شود، این سلول‌ها از نظر مورفولوژی شبیه سلول‌های تازه جداسازی شده می‌باشند.

www.SID.ir

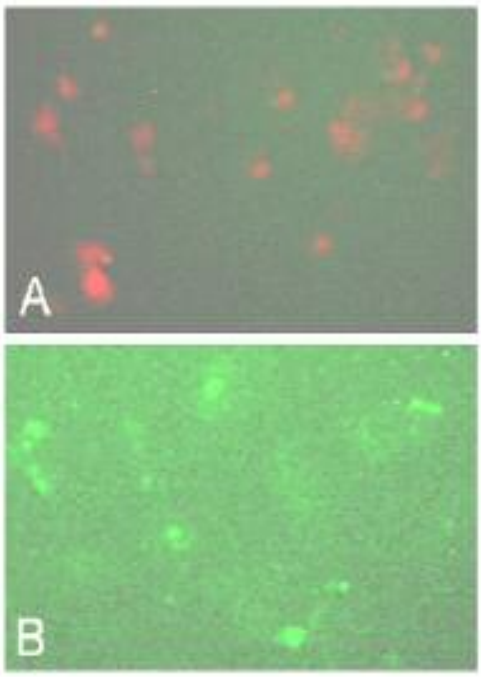


شکل ۲: نتایج فلوسایتومتری نشان داد که سلول‌های جداسازی شده برای مارکر CD105 مثبت و برای مارکرهای CD34، CD106، CD166، CD54، CD45 منفی هستند. از آن جا که کلیه آنتی‌بادی‌های دارای فلروکروم PE، از یک کلاس IgG هستند و همگی در موش تولید شده‌اند، برای همه آن‌ها از یک ایزوتایپ کنترل مشترک استفاده شد.



شکل ۳: بررسی‌های RT-PCR نشان دهنده بیان ژن‌های Oct-4، Nanog، Nucleostemin، Bmi-1 و Sox-9 و عدم بیان ژن Sox-2 در سلول‌های بنیادین مزانشیمی ورید بند ناف انسان بود. برای حصول اطمینان از عملکرد آغازگر ژن Sox-2 ، لاین سلولی گلایوبلاستوما U87MG که ژن Sox-2 را بیان می‌کند، به عنوان کنترل مثبت مورد استفاده قرار گرفت.

www.SID.ir



شکل ۴: ارزیابی ایمونوسیتوشیمی بیان ژن‌های Oct-4 (A) و Nucleostemin (B) را در سلول‌های بنیادین مزانشیمی ورید بند ناف انسان نشان داد.

سلول‌های بنیادین را به همراه ندارند، بلکه نسبت بـه آن‌هـا دارای مزایایی نیز هستند. از جمله این مزایا می‌تـوان بـه در دسترس بودن بند ناف به میزان زیـاد، غیـر تهـاجمی بـودن روش‌های جداسازی این سلول‌ها و عدم وجـود مـشکلات اخلاقی در استفاده از این سلول‌ها اشاره کرد(۷-۴).

اگر چه مدت زمان زیادی است که سلول‌هـای بنیـادین خون‌ساز بند ناف مورد توجه و استفاده قرار گرفتـه‌انـد امـا سلول‌های بنیادین مزانشیمی بند ناف اخیراً جداسـازی شده و تحقیقات انجام شده بر روی آن‌ها بسیار محدود هستند.

رامانو و میشل در سال ۲۰۰۲ برای اولین بار، سلول‌های بنیادین مزانشیمی را از ورید بند ناف انسان جدا نمودند(۶، ۴). سپس توانایی تمایز این سلول‌ها به سلول‌هـای عـصبی، قلبی، ماهیچه‌ای، غضروفی و استخوانی نشان داده شـد(۱۵، ۱۴).

یکی از مهم‌ترین ویژگی‌های سلول‌های بنیادین، توانایی خودبازسازی این سلول‌هاست. بـه ایـن معنـی کـه حـداقل یکی از سلول‌های حاصل از تقسیم آن‌ها، شبیه سلول اولیـه می‌باشـد. مطالعـه مکانیـسم‌هـای دخیـل در خودبازسـازی سلول‌های بنیادین دارای اهمیت بسیار زیادی است. چرا که امروزه مطالعات مختلفی نـشان داده‌انـد کـه منـشاء اصـلی سرطان در بافت‌های مختلف، سلول‌های بنیادین موجود در آن بافت می‌باشند که مکانیسم‌های خودبازسـازی در آن‌هـا دچار اختلال شده و به همین دلیل ایـن سـلول‌هـا ماهیـت سرطانی پیدا کرده و به طور نامتناهی تقسیم می‌شـوند. لـذا در صورت مشخص شدن مکانیـسم‌هـای دخیـل در تنظـیم خودبازسازی سلول‌های بنیادین، می‌توان رشد این سلول‌هـا را کنترل کرد که این مطلب در آینده می‌تواند به عنوان یک روش هدفمند برای درمان سرطان مورد استفاده قرار گیـرد. از آن جا که پتانسیل خودبازسازی در سـلول‌هـای بنیـادین مختلف می‌تواند توسط مکانیسم‌های مختلفی کنتـرل شـود، لذا مطالعـه مکانیـسم‌هـای کنتـرل کننـده خودبازسـازی در سلول‌هـای بنیـادین مختلـف دارای اهمیـت بـسیار زیـادی می‌باشد. اولین قدم در راه شناسایی مکانیسم‌هـای تنظیمـی خودبازسـازی در سـلول‌هـای مختلـف، مـشخص کـردن ژن‌های مشغول خودبازسازی است که در این سلول‌ها بیان می‌شوند.

در این مطالعه سلول‌های بنیادین مزانـشیمی ورید بنـد ناف از نظـر بیـان ژن‌هـای دخیـل در خودبازسـازی مـورد بررسی قرار گرفتند. توانایی تکثیـر تـا بـیش از ۱۵ پاسـاژ، بدون مشاهده تغییر قابل توجهی در مورفولوژی و پتانـسیل تکثیر سلول‌های جداسازی شده از ورید بند نـاف انـسان و هـم چنـین بیـان ژن‌هـای مـسؤول خودبازسـازی در ایـن سلول‌ها نشان‌دهنده ماهیت بنیادین ایـن سـلول‌هـا بـود. از طرفـی چـسبیدن سـلول‌هـای جداسـازی شـده بـه کـف فلاسک‌های کشت سلول پلاستیکی و بیان مـارکر سـطحی CD105 (SH2) که جزو مارکرهایی است که در سلول‌های مزانشیمی بیان می‌شود و هم چنـین عـدم بیـان مارکرهـای سطحی هماتوپویتیک و اندوتلیال توسط سـلول‌هـای جـدا سازی شده، نشان‌دهنده ماهیت مزانشیمی این سلول‌ها بود.

مطالعه حاضـر، اولـین گـزارش مبنـی بـر بررسـی بیـان ژن‌هـای دخیـل در خودبازسـازی در سـلول‌هـای بنیـادین مزانشیمی ورید بند ناف انسان مـی‌باشـد. ژن‌هـای Oct-4 ، Sox-2 و Nanog ژن‌های اصلی تنظیم کننده خودبازسـازی در سلول‌هـای بنیـادین جنینـی هـستند(۱۸-۱۶). از طرفـی ژن‌هـــای Nucleostemin ، Bmi-1 و Sox-9 در تنظـــیم

Archive of SID
www.SID.ir

خودبازسازی انواع مختلفی از سلول‌های بنیادین بالغ از جمله سلول‌های بنیادین مزانشیمی و خون‌ساز مغز استخوان و سلول‌های بنیادین عصبی نقش دارند(۲۰، ۱۹، ۱۲، ۸). مطالعه حاضر برای اولین بار نشان داد که سلول‌های بنیادین مزانشیمی ورید بند ناف انسان، به غیر از ژن Sox-2 ، کلیه ژن‌های نام برده شده را بیان می‌کنند.

نتایج حاصل از این مطالعه از این لحاظ جالب توجه می‌باشند که برای اولین بار نشان می‌دهد سلول‌های مزانشیمی ورید بند ناف انسان، ژن‌های تنظیم کننده خودبازسازی در سلول‌های بنیادین جنینی(Oct-4 و Nanog) و سلول‌های بنیادین بالغ(Nucleostemin ، Bmi-1 و Sox-9) را به طور هم زمان بیان می‌کنند.

یکی دیگر از نکات جالب توجه در نتایج به دست آمده از این مطالعه، عدم بیان ژن Sox-2 ، علی‌رغم بیان شدن ژن‌های Oct-4 و Nanog می‌باشد. چرا که این سه ژن که همگی جزو فاکتورهای رونویسی هستند، معمولاً به صورت یک شبکه مرکزی در تنظیم خودبازسازی سلول‌های بنیادین جنینی دارای نقش می‌باشند. به طوری که هر کدام از این سه ژن در تنظیم دو ژن دیگر دخیل است و مجموع این سه ژن نیز به طور هم زمان، هم به عنوان فعال کننده رونویسی سایر ژن‌های دخیل در خودبازسازی و هم به عنوان مهار کننده ژن‌های دخیل در تمایز عمل می‌کنند(۲۱). عدم بیان ژن Sox-2 از یک طرف و بیان ژن‌های دخیل در خودبازسازی سلول‌های بنیادین بالغ در سلول‌های بنیادین بند ناف از طرف دیگر می‌تواند پیشنهاد کننده این مطلب باشد که مکانیسم‌هایی که هم اکنون برای عملکرد ژن‌های Oct-4 ، Sox-2 و Nanog شناخته شده است، تنها مکانیسم ممکن برای تنظیم خودبازسازی از طریق این ژن‌ها نیست. بلکه ترکیبی از ژن‌های دخیل در تنظیم خودبازسازی سلول‌های بنیادین جنینی و بالغ نیز می‌تواند برای تنظیم خودبازسازی مورد استفاده قرار بگیرد. مشخص شدن نقش دقیق هر کدام از ژن‌های نام برده شده در این مکانیسم ترکیبی تنظیم خودبازسازی در سلول‌های بنیادین مزانشیمی ورید بند ناف انسان، نیازمند انجام مطالعات بیشتر می‌باشد. از آن جا که سلول‌های بنیادین مزانشیمی ورید بند ناف انسان جزو موارد نادری هستند که در یک نوع سلول بنیادین، ژن‌های تنظیم کننده خودبازسازی سلول‌های بنیادین جنینی و بالغ به طور هم زمان بیان می‌شوند، انجام بررسی‌های بیشتر بر روی این سلول‌ها می‌تواند نکات جالبی را در مورد مکانیسم‌های تنظیمی خودبازسازی در سلول‌های بنیادین جنینی و بالغ و چگونگی مشارکت آن‌ها در تنظیم خودبازسازی سلول‌های بنیادین مزانشیمی ورید بند ناف انسان نمایان سازد.

نتیجه‌گیری

در مجموع، نتایج به دست آمده از این مطالعه نشان می‌دهد که ورید بند ناف انسان را می‌توان به عنوان یک منبع بسیار مناسب برای جداسازی سلول‌های بنیادین مزانشیمی، به منظور به کارگیری در روش‌های سلول درمانی در نظر گرفت. از طرفی، بررسی‌های انجام شده نشان داد که مکانیسم‌های تنظیم کننده پتانسیل خودبازسازی در سلول‌های مختلف ممکن است متفاوت باشد. به عنوان مثال، ترکیبی از ژن‌های تنظیم‌کننده خودبازسازی در سلول‌های بنیادین جنینی و بالغ، مسؤول تنظیم پتانسیل خودبازسازی در سلول‌های بنیادین مزانشیمی ورید بند ناف انسان می‌باشند.

Archive of SID

www.SID.ir

References :

1- Lazic SE, Roger AB. Cell-based therapies for disorders of the CNS. Expert Opinion in Therapeutic Patents 2006;15: 1361-76.
2- Ginis I, Rao M. Toward cell replacement therapy: promises and caveats. Experimental Neurology 2003; 184: 61-77.
3- Semil C, Tony S, Torsten B, Karin E, Elzo D, *et al*. Prospero acts as a binary switch between self-renewal and differentiation in drosophila neural stem cells. Developmental Cell 2006;11:775–89.
4- Romanov YA, Svintsttskaya VA, Smirnov VN. Searching for alternative sources of postnatal human mesenchymal stem cells: candidate MSC-like cells from umbilical cord. Stem Cells 2003;21:105-10.
5- Jeong JA , Hong SH, Gang EJ, Ahn C, Hwang SH, *et al*. Differential gene expression profiling of human umbilical cord blood–derived mesenchymal stem cells by DNA microarra. Stem Cells 2005;23:584-93.
6- Gang EJ, Hong SH, Ah JJ, Hwang SH, Kim SW, *et al*. In vitro mesengenic potential of human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells. Biochemical and Biophysical Research Communications 2004; 321: 102–10.
7- Gunning J. Umbilical cord cell banking-implications for the future. Toxicology and Applied Pharmacology 2005;207:538-43.
8- Kafienah W, Mistry S, Williams C, Hollander AP. Nucleostemin is a marker of proliferating stromal stem cells in adult human bone marrow. Stem Cells 2006;24:1113-20.
9- Beekman C, Nichane M, De Clercq S, Maetens M, Floss T, *et al*. Evolutionarily conserved role of nucleostemin (NS): controlling proliferation of stem/progenitor cells during early vertebrate development. Molecular and Cellular Biology 2006: 9291-301.
10- Miyagi S. The Sox-2 regulatory regions display their activities in two distinct types of multipotent stem cells. Molecular and Cellular Biology 2004;10:4207-20.
11- Carlin R, Davis D, Weiss M, Schultz B, Troyer D. Expression of early transcription factors Oct-4, Sox-2 and Nanog by porcine umbilical cord (PUC) matrix cells. Reproductive Biology and Endocrinology 2006;4.
12- Yaghoobi MM, Mowla SJ, Tiraihi T. Nucleostemin, a coordinator of self-renewal, is expressed in rat marrow stromal cells and turns off after induction of neural differentiation. Neuroscience Letters 2005;390:81-6.
13- Gluckman E, Broxmeyer HA, Auerbach AD, Friedman HS, Douglas GW, *et al*. Hematopoietic reconstitution in a patient with Fanconi's anemia by means of umbilical-cord blood from an HLA identical Sibling. National English Journal of Medicine 1989;321:1174-8.
14- Kadivar M, Khatami S, Mortazavi Y, Taghikhani M, Shokrgozar MA. Multilineage differentiation activity by the human umbilical vein-derived mesenchymal stem cells. Iranian Biomedical Journal 2006;10:175-84.
15- Covas DT, Siufi JLC, Silva ARL, Orellana MD. Isolation and culture of umbilical vein mesenchymal stem cells. Brazilian Journal of Medical and Biological Research 2003;36:1179-83.
16- Rodda DJ, Chew JL, Lim LH, Loh YH, Wang B. Transcriptional regulation of Nanog by Oct-4 and Sox-2. The Journal of Biological Chemistry 2005;280: 24731–7.
17- Okumura-Nakanishi S, Saito M, Niwa H, Ishikawa F. Oct-3/4 and Sox-2 Regulate Oct-3/4 Gene in Embryonic Stem Cells. The Journal of Biological Chemistry 2005;280:5307–17.
18- Boiani M, Schöler H. Regulatory networks in embryo-derived pluripotent stem cells. Nature Reviews Molecular Cell Biology 2005;6:872-81.
19- Tanaka S, Kamachi Y, Tanouchi A, Hamada, Jing N, *et al*. Interplay of Sox and Pou factors in regulation of the nestin gene in neural primordial cells. Molecuar and Cellular Biology 2004;20:8834-46.
20- Park IK, Morrison SJ, Clarke MF. Bmi-1, stem cells, and senescence regulation. Journal of Clinical Investigation 2004;113:175-9.
21- Schulz WA, Hoffmann MJ. Transcription factor networks in embryonic stem cells and testicular cancer and the definition of epigenetics. Epigenetics 2007;2: 37-42.

Archive of SID

www.SID.ir

Expression of Oct-4, Sox-2, Nanog, Nucleostemin, Bmi-1 and Sox-9 self renewal genes in human umbilical cord vein mesenchymal stem cells

Jafari Kermani A.[1](MS), Fathi F.[2](PhD), Mowla S.J.[1](PhD), Gheisari Y.[3](PhD)

[1]*Department of Genetics, Faculty of Basic Sciences, Tarbiat Modarres University*
[2]*Kordestan University of Medical Sciences*
[3]*Department of Biotechnology, Iran Pasteur Institute*

Abstract

Background and Objectives

Stem cells are defined with two main characteristics which are self renewal potential and pluripotency. It is of great importance to study expression of self renewal genes in different stem cells, because self renewal regulatory mechanisms may vary among different kinds of stem cell. Human umbilical cord stem cells have recently gained so much attention, because their use in cell therapy methods has several advantages. The main objective of the present study was to evaluate the expression of Oct-4, Sox-2, Nanog, Nucleostemin, Bmi-1 and Sox-9 self renewal genes in human umbilical cord vein mesenchymal stem cells.

Materials and Methods

In this experimental study, umbilical cords were obtained in sterile condition and carried to the laboratory in HBSS buffer. Mesenchymal stem cells were harvested by collagenase treatment and cultured by means of their adhesiveness to plastic surfaces in DMEM medium supplemented with 15% FBS. To confirm the mesenchymal identity of these cells, expression of some surface markers including CD105, CD106, CD54, CD45, HLA-DR, CD166, and CD34 was analysed by means of flowcytometery. Finally, expression of self renewal genes was evaluated by RT-PCR and immunocytochemistry techniques.

Results

Flowcytometry analysis of UBMCs revealed that the cells are positive for CD105 (98%) and negative for CD34 (0%), CD54 (1%), CD45 (0%), CD106 (0%), CD166 (0%), and HLA-DR (0%). Our results also revealed Oct-4, Nanog, Nucleostemin, Bmi-1 and Sox-9 expression in human umbilical cord vein mesenchymal stem cells, but not Sox-2 self renewal gene expression.

Conclusions

The results showed that the mechanism which is known today for Oct-4, Nanog and Sox-2 function is not the only possible mechanism in which these three genes can play role to regulate self renewal potential of stem cells. Obtained results can offer that a combination of regulatory mechanisms which regulate self renewal of adult and embryonic stem cells, may be responsible to regulate self renewal of stem cells.

Key words: Mesenchymal stem cells, Umbilical cord, PCR, Immunocytochemistry
SJIBTO 2008; 4(4): 275-284

Received: 15 Aug 2007
Accepted: 30 Jan 2008

Correspondence: Fathi F., PhD of Anatomy. Cell & Molecular Research Lab, Kordestan University of Medical Sciences.
P.O.Box: 66177-13446, Sanandaj, Iran. Tel: (+98871) 6661830; Fax : (+98871) 6660051
E-mail: *farfath@yahoo.com*

Archive of SID
www.SID.ir