

# تمایز سلول‌های بنیادی از سلول‌های عصبی LY294002 با استفاده از مولکول چک

هما محسنی کوچصفهانی<sup>۱\*</sup> (Ph.D)، سمیه ابراهیمی باروق<sup>۲</sup> (Ph.D)، جعفر آی<sup>۳</sup> (Ph.D)، حمیده عنبر<sup>۳</sup> (M.Sc)

۱- گروه علوم جانوری، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه خوارزمی، تهران، ایران

۲- گروه مهندسی بافت و علوم سلولی کاربردی، دانشکده فناوری های نوین پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران

۳- گروه سلولی تکوینی جانوری، دانشگاه خوارزمی، تهران، ایران

## چکیده

هدف و هدف: سلول‌های بنیادی اندومترئال، رای اولین سال ۲۰۰۶ شناسایی شدند. این سلول‌ها در به دست آوردن تمایز و دارای آنسپیل تمایز هستند. استخوان، چربی، غضروف و الیگاندروسیت می‌باشند. مسیر سیگنالینگ PI3K/Akt عمل‌دهای سلول‌ها را به تمایز، نمو و مرگ سلولی تنظیم می‌کند و مهار آن می‌تواند به تمایز سلولی کمک کند. هدف از این مطالعه بررسی تمایز سلول‌های بنیادی اندومترئال از سلول‌های عصبی با استفاده از مهار مسیر PI3K/Akt توسط ریز-اگول LY294002 می‌باشد.

روش‌ها: اندومترئال‌ها به بی-اران به‌طور آزمایشی تیمار شدند. سلول‌های تفکیک شده در محیط کشت DMEM/F12 حاوی ۱۰٪ FBS کشت داده شدند. پاساژ سوم سلول‌ها برای اثبات بنیادیت با مارکرهای CD34، CD105، CD90، CD146، CD31 و آنالیز فلوسایتومتری استفاده شد. پس قدرت تمایز نسبی سلول‌ها در شرایط تمایزی، مدت ۲۴ ساعه در بررسی استفاده شد. میزان بیان مارکرهای اختصاصی سلول‌ها در روش‌های این-نوسیت و شیمی-تکنیک Real-time PCR استفاده گردید.

افته‌ها: نتایج فلوسایتومتری نشان داد که سلول‌ها نسبت به CD105، CD90، CD146 و نسبت به CD31 و CD34 منفی می‌باشند. بررسی‌های این-نوسیت و شیمی نشان‌دهنده بیان مارکرهای عصبی NF و Chat در سلول‌های تیمار شده با ریز-اگول LY294002 در بررسی‌های Real-time PCR نیز نشان‌دهنده بیان مارکرهای NF و Chat در سطح mRNA بود.

نتیجه‌گیری: این مطالعه نشان داد که سلول‌های بنیادی اندومترئال در محیط عصبی در شرایط تمایزی قادر به تمایز و دارا می‌باشند. استفاده از ریز-اگول LY294002 می‌تواند از مسیر PI3K/Akt مهار کننده تمایز سلولی با استفاده از تمایز سلولی شود.

کلمات کلیدی: اندومترئال، سلول‌های بنیادی، سلول‌های عصبی، PI3K/Akt

## مقدمه

سلول‌های بنیادی، سلول‌های تمایز نیافته‌ای هستند که با سه معیار اصلی خودتجدیدی، توانایی تمایز به انواع مختلف سلولی و توانایی بازسازی یک بافت مشخص در بدن تعریف شده [۱-۳] و از نظر منشاء به انواع سلول‌های بنیادی جنینی

و سلول‌های بنیادی بالغین تقسیم می‌شوند [۴]. سلول‌های بنیادی بالغین، سلول‌های تمایز نیافته موجود در سراسر بدن هستند و برای جایگزین کردن سلول‌های در حال مرگ و بازسازی بافت آسیب‌دیده تقسیم می‌شوند. اعتقاد بر این است که اکثر بافت‌های بالغ، دارای سلول‌های بنیادی بالغین هستند که در بسیاری از بافت‌های تخصصی بدن از جمله مغز

استخوان، کبد، شبکه‌ی و قرنیه چشم، پالپ دندان، فولیکول مو و غیره وجود دارند [۵،۶]. از مهم‌ترین سلول‌های بنیادی بزرگسالان که امروزه توجه اکثر محققین را به خود جلب کرده است، می‌توان به سلول‌های بنیادی مزانشیمی اشاره کرد که برای اولین بار در سال ۱۹۶۶ توسط Friedenstein و همکارانش از مغز استخوان رت به دست آمدند. سلول‌های بنیادی مزانشیمی پلاستیسته رشد بالایی دارند و می‌توانند به انواع بافت‌ها شامل استخوان، چربی، غضروف، عضله، تاندون [۷]، استرومای مغز [۸]، اپیتلیوم و پروژنیوتورهای عصبی اولیه [۹] تمایز یابند. علاوه بر مغز استخوان که از قدیمی‌ترین و اصلی‌ترین منابع سلول‌های بنیادی مزانشیمی است، سلول‌های بنیادی مزانشیمی را از منابع دیگری مثل بافت چربی، تاندون، پرپوستوم، عضله، پوست، غشاء سینوویال، سیستم عصبی، ژل و ارتون و خون بند ناف نیز جداسازی کرده‌اند [۱۰]. یکی از منابع دیگر سلول‌های بنیادی مزانشیمی که اخیراً مورد توجه قرار گرفته است، سلول‌های مزانشیمی مشتق از بافت اندومتريال رحم است. این سلول‌ها قادر به خودتجدیدی گسترده و پتانسیل تمایز به غضروف، چربی، استخوان، الیگودندروسیت و نورون هستند [۱۱-۱۳]. سلول‌های بنیادی آندومتر رحم، با داشتن ویژگی‌هایی از قبیل جداسازی آسان، بدون ایجاد مشکلات جدی اخلاقی، گسترش سریع در محیط کشت و نیز پتانسیل تمایزی منحصر به فرد، به عنوان عوامل درمانی اتولوگ، دارای برتری نسبت به سلول‌های بنیادی سایر منابع مزانشیمی هستند [۱۴، ۱۲]. یکی از مسیرهای دخیل در تمایز، رشد و آپوپتوز، مسیر سیگنالینگ PI3K/Akt است که اختلال در آن به‌طور مستقیم منجر به بیماری‌های مختلف به‌ویژه سرطان، اختلالات سیستم ایمنی، بیماری‌های التهابی و دیابت می‌شود. PI3K یا فسفاتیدیل اینوزیتول تری کیناز، یک آنزیم دخیل در انتقال سیگنال‌های مرتبط با گیرنده‌های تیروزین کینازی و غیر تیروزین کینازی است. این آنزیم، شبکه‌های سیگنالینگ سلولی را که با فرایندهای مرتبط با بقاء، رشد، تکثیر، سوخت و ساز و عمل‌کردهای تخصصی متفاوت سلول‌ها درگیر هستند، تنظیم می‌کند [۱۵-۱۷].

اینوزیتول تری کینازها (PI3Ks)، کینازهای لیپیدی و آنزیم‌های موثر دخیل در کنترل فرایندهای مختلف سلولی می‌باشند. این خانواده از ۱۴ آنزیم تشکیل شده است که حداقل ۱۲ عضو از این خانواده در ژنوم انسان وجود دارد. خانواده PI3K در ۳ گروه اصلی کلاس I و II و III و چندین زیر گروه تقسیم‌بندی می‌شوند [۱۶]. مسیرهای سیگنالینگ پائین دست PI3K، با فعال شدن گیرنده تیروزین کینازی فاکتور رشد آغاز می‌شود و PI3K بعد از فعال شدن، به غشاء آورده شده و فسفولیپیدهای اینوزیتول غشاء مثل، فسفاتیدیل اینوزیتول ۴ و ۵ دی فسفات (PIP2) را فسفریله کرده و آن را به، فسفاتیدیل اینوزیتول ۳ و ۴ و ۵ تری فسفات (PIP3)، که محل قرارگیری پروتئین‌های پیام‌رسان داخلی است، تبدیل می‌کند. PIP3 زیر مجموعه‌ای از پروتئین‌های سیگنالینگ، با دومین‌های PH را به خدمت می‌گیرد. این پروتئین کینازها شامل پروتئین کینازهای سرین-ترئونین (AKT و PDK1)، پروتئین کینازهای تیروزین (خانواده Tec)، فاکتورهای تبادل پروتئین‌های متصل‌شونده به GTP (فاکتورهای تبادل Rac و Grp1) و پروتئین‌های تعدیل‌کننده (آداپتور) (GAB-1) هستند. با کشف سهم قوی پروتئین کینازهای Akt و mTOR به عنوان تنظیم‌کننده‌های کلیدی رشد و با توجه به محوری بودن نقش این مسیر در فیزیولوژی سلولی، اختلال آن به‌طور مستقیم منجر به بیماری‌های مختلفی از جمله، سرطان، اختلالات ایمنی، بیماری‌های التهابی و دیابت می‌شود [۱۸]. عوامل متعددی می‌توانند مسیرهای سیگنالینگ را تحت تاثیر قرار دهند و از جمله این عوامل، ریز مولکول‌ها (Small molecules) هستند. ریز مولکول‌ها ترکیبات فعال بیولوژیکی هستند که به عنوان ابزار شیمیایی مفید، در تحقیقات زیست پزشکی و برنامه‌های کاربردی به کار می‌روند. این ترکیبات، مسیرهای انتقال سیگنالی را هدف قرار داده و تکثیر DNA، تمایز سلولی و آپوپتوز را تحت تاثیر قرار می‌دهند. از آن جایی که ریز مولکول‌ها، تعدیل‌کننده‌های کلیدی در کنترل سرنوشت و عمل‌کرد سلول‌های بنیادی هستند، برای تسهیل هدایت تمایز، در پروتوکول‌های مختلف استفاده می‌شوند.



نفوذپذیر شدند. بعد از این مرحله، محلول بلاک‌کننده حاوی ۵BSA% در محلول بافرسالین به مدت ۴۵ دقیقه به سلول‌ها اضافه گردید. در مرحله بعد، آنتی‌بادی اولیه Chat و NF (با غلظت ۱:۲۰۰)، به مدت یک شبانه روز و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به سلول‌ها اضافه گردید. بعد از ۲۴ ساعت، آنتی‌بادی ثانویه (Goat anti - mouse IgG FITC) با غلظت ۱:۷۰۰ بر علیه آنتی‌بادی‌های اولیه اضافه گردید و به مدت یک ساعت در دمای اتاق نگهداری شد. در نهایت از DAPI برای رنگ‌آمیزی هسته سلول‌ها استفاده گردید.

تکنیک **Real time-PCR** به منظور بررسی میزان بیان ژن‌های Chat و NF، تکنیک Real time-PCR انجام شد (جدول ۱). بدین منظور استخراج RNA از سلول‌ها با کیت RNeasy Plus Mini (Qiagen) انجام گردید. سپس cDNA مورد نظر از روی RNA استخراج شده با استفاده از کیت First strand cDNA Synthesis kit Fermentas به دست آمد و در نهایت cDNA ساخته شده از نظر بیان ژن‌های Chat و NF در گروه کنترل و تیمار شده مورد آنالیز real time-PCR قرار گرفتند. ژن GAPDH به عنوان کنترل درونی در نظر گرفته شد و میزان بیان ژن‌های تمایزی در گروه تمایز یافته نسبت به گروه کنترل، آنالیز گردید.

آنالیزهای آماری همه آزمایش‌ها حداقل با سه بار تکرار مجزای بیولوژیک (three separate biological replication) انجام پذیرفتند. برای تجزیه و تحلیل آماری جهت مقایسه گروه کنترل و گروه‌های تجربی، نرم‌افزار SPSS و تست آنالیز واریانس یک طرفه ANOVA، به کار گرفته شد. P-value به میزان ۰/۰۵ درصد ( $P < 0/05$ ) به عنوان داده‌های معنی‌دار گزارش گردید

## نتایج

نتایج به دست آمده از جداسازی سلول‌های بنیادی اندومترال و آنالیزهای فایسایتی متری از آنجایی که سلول‌های بنیادی، درصد کمی از جمعیت سلول‌های اندومترال انسان را

پارافرمالدئید ۴٪ فیکس شدند. در مرحله بعد ۱۰ میکرولیتر از آنتی‌بادی‌های مورد نظر که شامل CD105, CD90, CD146, CD31 و CD34 و به صورت مستقیم به یک آنتی‌بادی ثانویه فلورسانس متصل بودند به مدت ۱ ساعت انکوبه شدند (همه آنتی‌بادی‌ها از شرکت abcam خریداری شد). سپس فیکس کردن مجدد سلول‌ها با پارافرمالدئید یک درصد، انجام شد و نمونه‌ها برای بررسی بیان مارکرهای سطحی مورد بررسی قرار گرفتند.

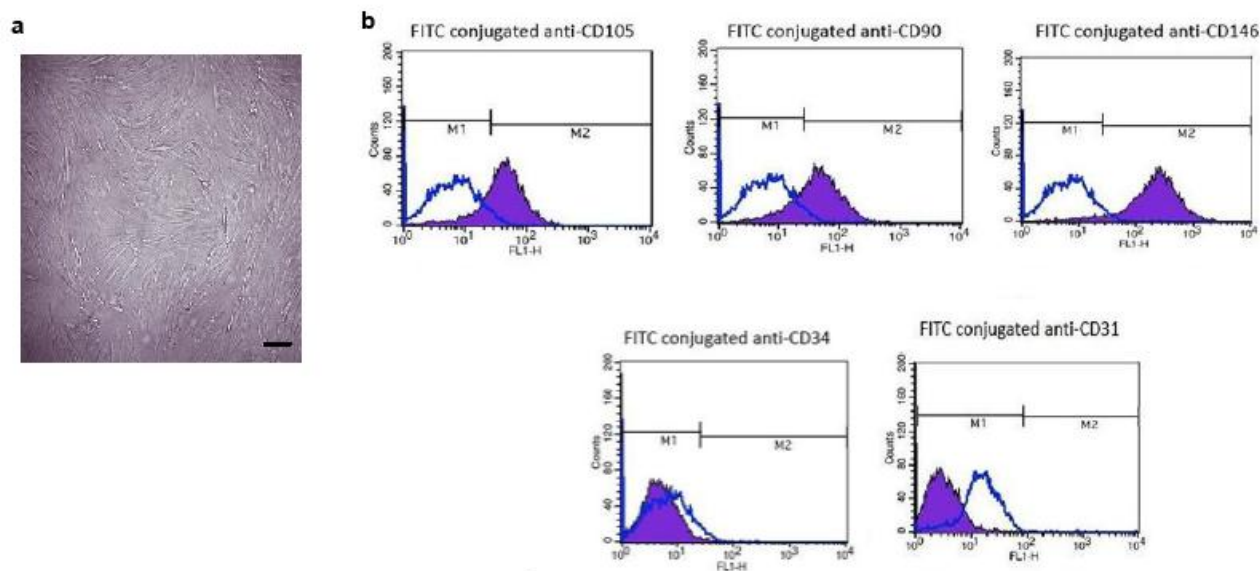
بررسی تمایزی سلول‌های بنیادی اندومترال به سلول‌های عصبی سلول‌ها بعد از پاساژ سوم برای بررسی توان تمایزی به سلول‌های عصبی آماده شدند. برای تمایز به سلول‌های عصبی، سلول‌های بنیادی اندومترال با غلظت  $5 \times 10^4$  cell/m در ظرف ۲۴ خانه‌ای پوشیده شده با پلی-ال-اورنیتین منتقل شدند. بعد از ۲۴ ساعت، تعدادی از خانه‌های ظرف به گروه تمایزی و تعدادی هم به گروه کنترل اختصاص داده شد. سپس به گروه تمایزی، محیط تمایزی ۱ و به گروه کنترل محیط DMEM/F12 حاوی ۱۰٪ FBS اضافه گردید. محیط تمایزی ۱ حاوی محیط DMEM/F12، ۲۰٪ FBS، ۱۰ ng/ml FGF2 (۲٪)، ۲۵۰ mM IBMXI، ۲۵۰ mM 2ME، بوده و سلول‌ها گروه تمایزی به مدت ۲۴ ساعت در این محیط قرار گرفتند. بعد از این مدت زمان، محیط سلول‌ها با محیط تمایزی دوم که حاوی DMEM/F12، ۲٪ B27 و ۱ mM Ly294002 بود، به مدت ۳ روز دیگر تعویض گردید. بعد از این دوره، محیط تمایزی سوم شامل DMEM/F12، ۱ μM RA و ۱ μM Ly294002 به مدت یک هفته به سلول‌ها اضافه گردید. بعد از این مدت، سلول‌ها در محیط تمایزی چهارم که حاوی DMEM/F12، ۲٪ B27 و ۱۰ ng/ml BDNF روز قرار گرفتند. سپس سلول‌ها برای بررسی ایمنوسیتوشیمی مارکرهای Chat و NF، با پارافرمالدئید ۴٪ فیکس شدند.

تست ICC با ایترسیته شیمی سلول‌ها با محلول پارافرمالدئید ۴٪ به مدت ۱۰ دقیقه تثبیت شدند. سپس با محلول تریتون ۱۰۰، ۰/۲٪ به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق

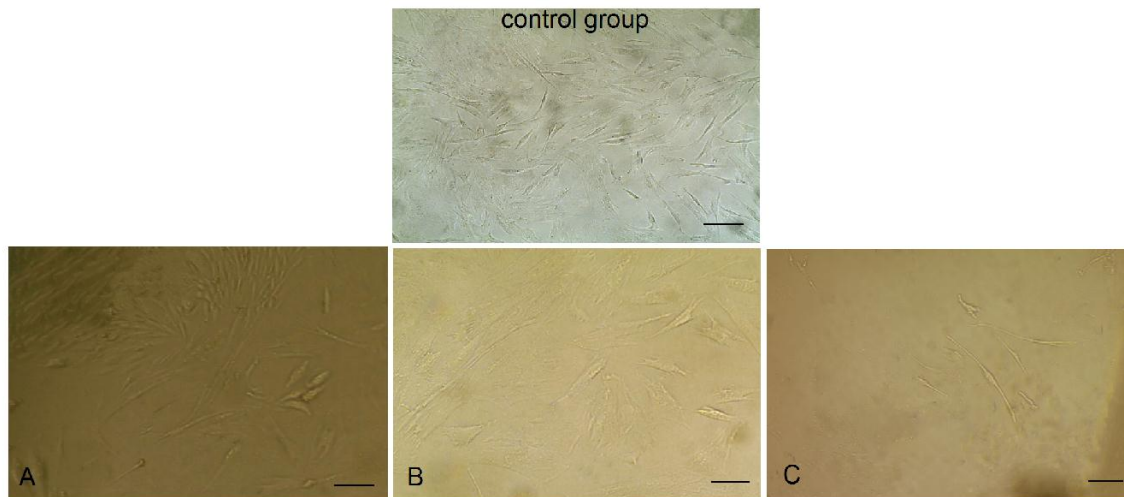
سلول‌های عصبی مشاهده شد (شکل ۲). در سلول‌های گروه کنترل، تغییری مشاهده نشد و این سلول‌ها خصوصیات سلول‌های تمایز نیافته یعنی سیتوپلاسم فراوان را حفظ کردند. نتایج  $\beta$ -tubulin به بیان  $\alpha$ -keratins عصبی سلول‌های تمایز یافته برای بررسی میزان تمایز، بیان مارکرهای تمایزی سلول‌های عصبی حرکتی شامل NF و Chat ابتدا در سطح mRNA با روش Real time-PCR مورد بررسی قرار گرفت. نتایج حاصل از Real time-PCR نشان‌دهنده افزایش بیان مارکرهای عصبی NF و Chat، بعد از تمایز عصبی hEnSCs نسبت به گروه کنترل می‌باشد. نتایج در شکل ۳ دیده می‌شود. سپس بیان مارکرهای تمایزی در سطح پروتئین با روش ایمنوسیتوشیمی مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج تست ایمنوسیتوشیمی نشان‌دهنده بیان مارکرهای عصبی Chat (استیل کولین ترنسفرز) و NF (نوروفیلانت) در سلول‌های تمایز یافته بود. همان‌طور که در شکل ۴ دیده می‌شود تعداد زیادی از سلول‌های تمایز یافته مارکرهای عصبی را بیان کردند که به رنگ سبز دیده می‌شود.

تشکیل می‌دهند لذا این سلول‌ها در کشت‌های اولیه به صورت جمعیت ناخالص بوده و سلول‌های اندوتلیال و خونی نیز همراه آن‌ها وجود دارند، اما در پاساژهای بعدی به صورت خالص در می‌آیند. سلول‌های اندومتريال، در کلون‌های خالص از لحاظ مورفولوژیکی شبیه به سلول‌های فیبروبلاستی و دوکی شکل می‌باشند (شکل a1). نتایج فلوسایتومتری نشان داد که این سلول‌ها بعد از پاساژ سوم، نسبت به مارکرهای مزانشیمی CD105 (80+%), CD90 (80+%), CD146 (97+%) مثبت و نسبت به مارکر هماتوپوئیتیک CD34 و اندوتلیالی CD31 منفی می‌باشند (شکل b).

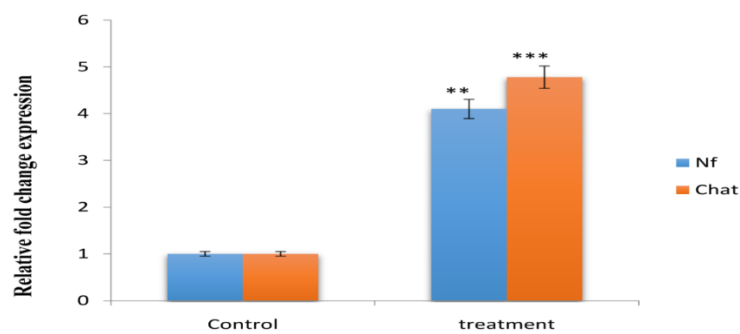
نتایج  $\beta$ -tubulin به تمایز سلول‌های بنیادی اندومتريال  $\alpha$ -keratin به سلول‌های عصبی بررسی مورفولوژیکی در طول مطالعه نشان داد که ۵ روز پس از القاء با محیط تمایزی عصب، مورفولوژی سلول‌های تیمار شده کم کم شروع به تغییر کرد. در طول هفته اول، سلول‌های تیمار شده شروع به کشیده شدن کردند و حالت دوقطبی پیدا کردند. در هفته دوم نیز سلول‌ها فرم چند شاخه‌ای و چند قطبی شدن به خود گرفتند و در نهایت در هفته پایانی، زوائد سلول‌ها افزایش یافت و مورفولوژی



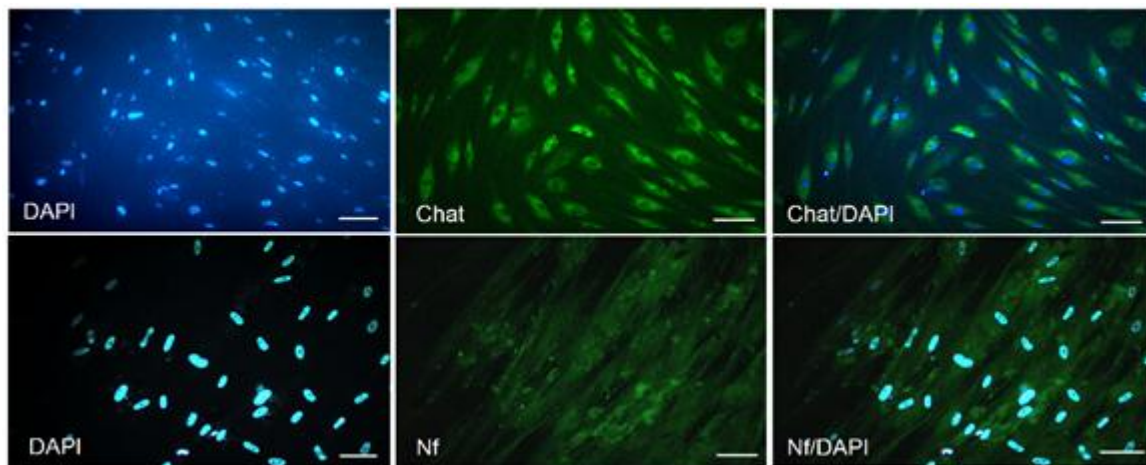
شکل ۱. (a) فتومیکروگراف از ظاهر مورفولوژیکی سلول‌های بنیادی اندومتريال، بعد از پاساژ سوم که سلول‌ها دارای ظاهر دوکی شکل هستند و شبیه سلول‌های فیبروبلاستی می‌باشند. (b) آنالیز فلوسایتومتری نشان دهنده بیان مثبت مارکرهای CD105, CD90, CD146 و بیان منفی مارکرهای CD34 و CD31 در سلول‌های بنیادی اندومتر رحم است. (Scale bar: 100µm)



شکل ۲. پتانسیل تمایز سلول های بنیادی اندومتر رحم به سلول عصبی بعد از (A) ۵ روز، (B) ۱۲ روز، (C) ۲۱ روز.



شکل ۳. بیان نسبی ژن ها با استفاده از تکنیک Real time-PCR. نتایج بیانگر افزایش بیان ژن Nf و Chat در سلول های عصبی تمایز یافته، نسبت به سلولهای گروه کنترل می باشد. آنالیز آماری میزان داری توسط آزمون ANOVA انجام شده است تعداد تکرار = ۳ (p<0.05).



شکل ۴. نتایج مربوط به بررسی های ایمونوسیتوشیمی برای مارکر نورون حرکتی (Chat) و مارکر عصبی (Nf) در سلول های بنیادی اندومتريال بعد از ۱۹ روز تیمار. نتایج نشان داد که سلول های اندومتريال بعد از ۲۱ روز تیمار مارکر نورون حرکتی (Chat) و مارکر عصبی Nf را بیان کردند.

جدول ۱. لیست پرایمرهای استفاده شده

Gene	Primer Sequence (5'-3')	Annealing (C°)
Chat	F GCAGGAGAAGACAGCCAACT	55
	R AAACCTCAGCTGGTCAT	
NF	F CAGAGCTGGAGGCACTGAAA	55
	R TGCTGAATGGCTTCCTGGT	
GAPDH	F TCGCCAGCCGAGCCA	55
	R CCTTGACGGTGCCATGGAAT	

## بحث و نتیجه گیری

سلول‌های بنیادی اندومتريال انسان، به عنوان منبع جدیدی از سلول‌های بنیادی مزانشیمی، پتانسیل تمایز به انواع رده‌های سلولی از جمله غضروف، استخوان، چربی، نورون و الیگودندروسیت را دارا می‌باشند [۱۲، ۱۳]. در مطالعه حاضر، با استفاده از ریزمولکول Ly294002 و با توجه به اثر مهارى آن بر مسیر سیگنالینگ PI3K/AKT سلول‌های ENSC به سلول‌های عصبی تمایز داده شدند. شناسایی مسیر سیگنالینگ PI3K-PKB/Akt و فعال‌سازی رسپتور تیروزین کینازی، به صورت جدی در سال ۱۹۸۰، برای توصیف سیگنالینگ گیرنده انسولین آغاز شد. این مسیر بسیار حفاظت شده بوده و فعال‌سازی آن توسط فرایندی چندمرحله‌ای کنترل می‌شود [۲۶]. مسیر PI3K/AKT/mTOR نقش‌های مختلفی در فرایندهای فیزیولوژیک از جمله، تکثیر، بقاء و تمایز سلولی ایفا می‌کند [۲۵]. در این مطالعه، علاوه بر بررسی مارکرهای سطحی مربوط به سلول‌های بنیادی اندومتريال رحم انسان، تمایز hEnSCs به سلول عصبی با استفاده از ریزمولکول Ly294002 مورد بررسی قرار گرفت. نتایج مطالعه اخیر نشان داد که، سلول‌های به دست آمده از بافت اندومتريال رحم انسان، مارکرهای سطحی مزانشیمی CD105، CD90 و نیز مارکر اصلی سلول‌های بنیادی اندومتريال رحم یعنی CD146 را بیان کردند. نتایج مربوط به بیان این مارکرها مطابق با مطالعات انجام شده توسط Gargett و Masuda در سال ۲۰۱۰ و نیز مطالعات ابراهیمی باروق و همکاران در سال ۲۰۱۲ می‌باشد. در سال ۲۰۰۰، Woodbury و همکاران برای اولین بار نشان دادند که MSCs انسان و موش، ظرفیت تمایز به مشتقات غیر مزانشیمی و به طور خاص نورون‌ها را حفظ می‌کنند [۲۷]. از جمله سلول‌های مزانشیمی که توانایی تمایز به نورون را دارا می‌باشند، سلول‌های مغز استخوان، مایع آمنیوتیک و بافت چربی هستند [۲۸-۳۴]. یکی از چالش‌های بزرگ در سلول درمانی، پیدا نمودن منبع مناسبی از سلول‌های بنیادی است که امکان استفاده از آن در کلینیک وجود داشته باشد. با توجه به عدم تهاجمی بودن جداسازی سلول‌های

بنیادی اندومتريال رحم و دسترسی آسان به آن‌ها و نیز از دست رفتن خاصیت تمایز این سلول‌ها در سنین بالا، می‌توان این سلول‌ها را به عنوان منبعی مناسب برای تمایز عصبی در نظر گرفته و مورد استفاده قرار داد. این سلول‌ها، بعد از ۳۴ بار پاساژ متوالی همچنان کاربوتیپ نرمالی دارند و نیز سرعت تکثیر بالاتری نسبت به سلول‌های بنیادی مغز استخوان دارند. تلاش برای تمایز سلول‌های بنیادی اندومتريال به سلول‌های عصبی برای اولین بار توسط Wolff و همکارانش در سال ۲۰۱۰ و Mobarakeh و همکارانش در سال ۲۰۱۲ انجام گرفت. که در این مطالعات، از فاکتورهای القایی مثل FGF2، EGF، PDGF-AA و یا RA استفاده شده بود [۱۲، ۳۵]. ابراهیمی و همکاران نیز در سال ۲۰۱۲، علاوه بر این فاکتورهای القایی، از محیط ترشّی (Condition media) مربوط به سلول‌های نوروبلاستوماى انسانی BE(2)-C استفاده کردند. در مطالعه حاضر نیز، علاوه بر فاکتور رشد FGF2، از مکمل‌های N2 و B27 استفاده گردید. علاوه بر تاثیر بر مسیرهای سیگنالینگ سلولی، ریزمولکول‌ها، همانندسازی DNA، تمایز سلولی و آپتوز را نیز تحت تاثیر قرار می‌دهند [۲۳]. مطالعات Wang و همکاران در سال ۲۰۱۲ نشان داد که وقتی سلول‌های بنیادی مزانشیمی به مدت ۱۲ ساعت، تحت درمان با LY294002 قرار گرفتند، سلول‌ها خاصیت مورفولوژیکی عصبی را نشان دادند [۱۵]. در همین راستا مطالعات ما نیز نشان داد که ریزمولکول LY294002 می‌تواند باعث القاء تمایز عصبی سلول‌های بنیادی اندومتريال رحم شود. نتایج حاصل از تست فلوسایتومتري نشان داد که سلول‌های اندومتريال رحم، مارکر CD146 را که مارکر سطحی اندومتريال می‌باشد و نیز مارکرهای سطحی CD105 و CD90 را که مربوط به سلول‌های بنیادی مزانشیمی است را بیان کردند. این سلول‌ها همچنین نسبت به بیان مارکرهای CD31 و CD34 منفی هستند که این نتایج با مطالعات قبلی مطابقت دارد [۱۲، ۳۵]. نتایج تحقیق حاضر نشان داد که سلول‌های عصبی حاصل از تمایز hEnSCs، مارکرهای سطحی Chat و NF را در هر دو سطح پروتئین و mRNA در مقایسه

## تشکر و قدردانی

بدین وسیله از گروه علوم جانوری دانشگاه خوارزمی و گروه مهندسی بافت دانشکده فناوری‌های نوین پزشکی دانشگاه علوم پزشکی تهران در اجرا و تامین مالی این تحقیق تشکر و قدردانی می‌گردد.

## منابع

- [1] Sakaki-Yumoto M, Katsuno Y, Derynck R. TGF-beta family signaling in stem cells. *Biochim Biophys Acta* 2013; 1830: 2280-96
- [2] Hombach-Klonisch S, Panigrahi S, Rashedi I, Seifert A, Alberti E, Pocar P, et al. Adult stem cells and their trans-differentiation potential--perspectives and therapeutic applications. *J Mol Med (Berl)* 2008; 86: 1301-1314.
- [3] Lakshmiopathy U, Verfaillie C. Stem cell plasticity. *Blood reviews* 2005; 19: 29-38.
- [4] Ding S, Schultz PG. A role for chemistry in stem cell biology. *Nature Biotechnol* 2004; 22: 833-840.
- [5] Henningson CT Jr, Stanislaus MA, Gewirtz AM. 28. Embryonic and adult stem cell therapy. *J Allergy Clin Immunol* 2003; 111: S745-53.
- [6] Amoh Y, Katsuoka K, Hoffman RM. The advantages of hair follicle pluripotent stem cells over embryonic stem cells and induced pluripotent stem cells for regenerative medicine. *J Dermatol Sci* 2010; 60: 131-137.
- [7] Barry FP, Murphy JM. Mesenchymal stem cells: clinical applications and biological characterization. *Int J Biochem Cell Biol* 2004; 36: 568-584.
- [8] Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S, Marshak DR. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 1999; 284: 143-147.
- [9] Peister A, Mellad JA, Larson BL, Hall BM, Gibson LF, Prockop DJ. Adult stem cells from bone marrow (MSCs) isolated from different strains of inbred mice vary in surface epitopes, rates of proliferation, and differentiation potential. *Blood* 2004; 103: 1662-1668.
- [10] Orbay H, Tobita M, Mizuno H. Mesenchymal stem cells isolated from adipose and other tissues: basic biological properties and clinical applications. *Stem cells Int* 2012; 2012: 461-718.
- [11] Wolff EF, Wolff AB, Hongling D, Taylor HS. Demonstration of multipotent stem cells in the adult human endometrium by in vitro chondrogenesis. *Reprod Sci* 2007; 14: 524-533.
- [12] Mobarakeh ZT, Ai J, Yazdani F, Sorkhabadi SM, Ghanbari Z, Javidan AN, et al. Human endometrial stem cells as a new source for programming to neural cells. *Cell Biol Intern Report* 2012; 19: e00015.
- [13] Ebrahimi-Barough S, Kouchesfahani HM, Ai J, Massumi M. Differentiation of human endometrial stromal cells into oligodendrocyte progenitor cells (OPCs). *J Mol Neurosci* 2013; 51: 265-273.
- [14] Ai J, Shahverdi AR, Barough SE, Kouchesfahani HM, Heidari S, Roozafzoon R, Verdi J, Khoshzaban A. Derivation of adipocytes from human endometrial stem cells (EnSCs). *J Reprod Infertil* 2012; 13: 151-157.

با گروه کنترل بیان کرده‌اند که یافته‌های قبلی را تایید می‌کند [۳۶،۱۳،۱۲]. مطالعات ابراهیمی و همکاران نیز در سال ۲۰۱۵ نشان می‌دهد که سلول‌های بنیادی اندومتر را رحم انسان، بعد از تمایز به سلول عصبی، مارکر Chat را در سطح mRNA بیان کرده‌اند. از آنجایی که آن‌ها در این آزمایش، از Shh در محیط تمایزی استفاده کرده‌اند میزان بیان بالاتری از مارکر Chat را شاهد بوده‌اند. با توجه به میزان اختلاف پائین بیان این مارکر در سلول‌های عصبی که با استفاده از ریزمولکول LY294002 تمایز یافته‌اند و سلول‌های عصبی تمایز یافته در محیط عصبی حاوی Shh، ریزمولکول مذکور می‌تواند با صرف هزینه کم‌تر، به عنوان یک عامل موثر در تمایز عصبی و به‌طور خاص در تمایز به نورون حرکتی، در تحقیقات و آزمایشات مورد استفاده قرار گیرد [۳۶].

همچنین، در مطالعات قبلی نشان داده شده است که محیط تمایزی عصبی مورد استفاده در تحقیق حاضر، بدون استفاده از ریزمولکول LY294002، می‌تواند منجر به تمایز سلول‌های بنیادی آندومتر رحم انسان به سلول‌های عصبی و نیز سلول‌های پیش‌ساز عصبی شود. در نتیجه با استناد به نتایج به‌دست آمده در این مطالعه، استفاده از ریزمولکول مذکور باعث تمایز hEnSCs به نورون حرکتی شده است [۳۷].

تحقیق در مورد سلول‌های بنیادی، در سال‌های اخیر رونق بسیاری گرفته است و این سلول‌ها به عنوان ابزار دارویی مفید، برای درمان احتمالی بیماری‌های عصبی مورد استفاده قرار گرفته‌اند. با توجه به محدودیت‌های سایر منابع سلول‌های بنیادی مزانشیمی، سلول‌های بنیادی آندومتر رحم می‌توانند به عنوان یک منبع مفید از سلول‌های بنیادی مزانشیمی، در تمایز سلولی مورد استفاده قرار گیرند. با توجه به استفاده از ریزمولکول‌ها برای تمایز و طبق نتایج به دست آمده در این مطالعه، ریزمولکول LY294002 می‌تواند تمایز عصبی سلول‌های بنیادی اندومتر را تحت شرایط مناسب پیش برد و می‌توان از این ریزمولکول که دارای هزینه پایین‌تری نسبت به فاکتورهای تمایزی می‌باشد برای تمایز استفاده نمود.



and mesenchymal stem cells in a simple medium containing synthetic serum replacement. *J Biotechnol* 2014; 172: 1-10.

[29] Choi YK, Cho H, Seo YK, Yoon HH, Park JK. Stimulation of sub-sonic vibration promotes the differentiation of adipose tissue-derived mesenchymal stem cells into neural cells. *Life Sci* 2012; 91: 329-337.

[30] Yan ZJ, Hu YQ, Zhang HT, Zhang P, Xiao ZY, Sun XL, et al. Comparison of the neural differentiation potential of human mesenchymal stem cells from amniotic fluid and adult bone marrow. *Cell Mol Neurobiol* 2013; 33: 465-475.

[31] Zhao P, Ise H, Hongo M, Ota M, Konishi I, Nikaido T. Human amniotic mesenchymal cells have some characteristics of cardiomyocytes. *Transplantation* 2005; 79: 528-535.

[32] Kim EY, Lee KB, Kim MK. The potential of mesenchymal stem cells derived from amniotic membrane and amniotic fluid for neuronal regenerative therapy. *BMB Report* 2014; 47: 135-140.

[33] Kadivar M, Piryaei F, Ramezani M. Comparison of the differentiation potential of human mesenchymal stem cells and several animal species. *Koomesh* 2010; 11: 270-278. (Persian).

[34] Hoveizi E, Nabiuni M, Massumi M, Parivar K. Derivation of definitive endoderm from human induced pluripotent stem cells using signaling molecules. *Koomesh* 2014; 15: 212-219. (Persian).

[35] Wolff EF, Gao XB, Yao KV, Andrews ZB, Du H, Elsworth JD, Taylor HS. Endometrial stem cell transplantation restores dopamine production in a Parkinson's disease model. *J Cell Mol Med* 2011; 15: 747-755.

[36] Ebrahimi-Barough S, Norouzi Javidan A, Saberi H, Joghataei MT, Rahbarghazi R, Mirzaei E, et al. Evaluation of motor neuron-Like cell differentiation of hEnSCs on biodegradable PLGA nanofiber scaffolds. *Mol Neurobiol* 2015; 52: 1704-1713.

[37] Navaei-Nigjeh M, Amoabedini G, Noroozi A, Azami M, Asmani MN, Ebrahimi-Barough S, et al. Enhancing neuronal growth from human endometrial stem cells derived neuron-like cells in three-dimensional fibrin gel for nerve tissue engineering. *J Biomed Mater Res A* 2014; 102: 2533-2543.

[15] Wang Y, He W, Bian H, Liu C, Li S. Small molecule induction of neural-like cells from bone marrow-mesenchymal stem cells. *J Cell Biochem* 2012; 113: 1527-1536.

[16] Gharbi SI, Zvelebil MJ, Shuttleworth SJ, Hancox T, Saghir N, Timms JF, Waterfield MD. Exploring the specificity of the PI3K family inhibitor LY294002. *Biochem J* 2007; 404: 15-21.

[17] Li W, Ding S. Small molecules that modulate embryonic stem cell fate and somatic cell reprogramming. *Trends Pharmacol Sci* 2010; 31: 36-45.

[18] Cantley LC. The phosphoinositide 3-kinase pathway. *Science* 2002; 296: 1655-1657.

[19] Wu B, Li W, Wang L, Liu ZH, Zhao XY. Stem cells and small molecule screening: haploid embryonic stem cells as a new tool. *Acta Pharmacol Sin* 2013; 34: 725-731.

[20] Schugar RC, Robbins PD, Deasy BM. Small molecules in stem cell self-renewal and differentiation. *Gene Ther* 2008; 15: 126-135.

[21] Faghihi F, Baghaban Eslaminejad M, Nekookar A, Najar M, Salekdeh GH. The effect of purmorphamine and sirolimus on osteogenic differentiation of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Biomed Pharmacother* 2013; 67: 31-38.

[22] Lu B, Atala A. Small molecules and small molecule drugs in regenerative medicine. *Drug Discov today* 2014; 19: 801-808.

[23] Song H, Chang W, Song BW, Hwang KC. Specific differentiation of mesenchymal stem cells by small molecules. *Am J Stem Cells* 2012; 1: 22-30.

[24] Vanhaesebroeck B, Stephens L, Hawkins P. PI3K signalling: the path to discovery and understanding. *Nature Rev Mol Cell Biol* 2012; 13: 195-203.

[25] Foster FM, Traer CJ, Abraham SM, Fry MJ. The phosphoinositide (PI) 3-kinase family. *J Cell Sci* 2003; 116: 3037-3040.

[26] Hemmings BA, Restuccia DF. PI3K-PKB/Akt pathway. *Cold Spring Har Perspect Biol* 2012; 4: a011189.

[27] Woodbury D, Schwarz EJ, Prockop DJ, Black IB. Adult rat and human bone marrow stromal cells differentiate into neurons. *J Neurosci Res* 2000; 61: 364-370.

[28] Taha MF, Javeri A, Kheirkhah O, Majidizadeh T, Khalatbary AR. Neural differentiation of mouse embryonic

## Endometrial stem cells differentiation into neural cells by LY294002 small molecule

Homa Mohseni Kouchesfehaneh (Ph.D)<sup>\*1</sup>, Somaye Ebrahimi-Barough (Ph.D)<sup>2</sup>, Jafar Ai (Ph.D)<sup>2</sup>, Hamideh Anbar (M.Sc)<sup>3</sup>

1- Dept. of Animal Biology, Faculty of Biological Sciences, Kharazmi University, Tehran, Iran

2 – Dept. of Tissue Engineering and Applied Cell Sciences, School of Advanced Technologies in Medicine, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

3 – Dept. of Animal Biology, Faculty of Biological Sciences, Kharazmi University, Tehran, Iran

(Received: 3 Dec 2015; Accepted: 15 May 2016)

**Introduction:** Endometrial stem cells (EnSCs) were identified for the first time in 2004. These cells are capable of extensive self-renewal and have the potency to differentiate into chondrocyte, osteocyte, adipocyte, neuron and oligodendrocyte. PI3K/Akt signaling has been implicated in multiple cellular and organ functions, including differentiation, survival and cell death and its inhibition leads to cell differentiation. The purpose of this study was to investigate the differentiation of endometrial stem cells into neural cells by inhibition of PI3K/Akt pathway using small molecule Ly294002.

**Materials and Methods:** Endometrial tissues were treated enzymatically and segregated cells were cultured in DMEM/F12 with 10% FBS. The flow cytometry analysis was performed for CD105, CD90, CD146, CD31 and CD34 at the third passage. Then the neurogenic differentiation was evaluated at the third passage, 21 days after induction with differentiation media. Immunocytochemistry and Real-time PCR were performed to investigate the expression of specific neural stem cells markers.

**Results:** The flow cytometry analysis showed that EnSCs were positive for CD90, CD105 and CD146 and negative for CD31 and CD34. Immunocytochemistry showed that the expression of nestin, NF and Chat neuronal markers in the cells treated with small molecule Ly294002. Real-time PCR also indicated expression of NF and Chat neuronal markers at the mRNA level.

**Conclusion:** According to the findings of this study it can be concluded that the EnSCs have neural differentiation potency in the suitable differentiation milieu. Ly294002 small molecules by inhibiting PI3K / Akt pathway possibly can prevent cell proliferation and induce cell differentiation.

**Keywords:** Endometrium, Cell Differentiation, Stem Cells, Neural Cells, Phosphatidylinositol 3-Kinases

---

\* Corresponding author. Tel: ++98 9123844874  
kouchesfehaneh@yahoo.com