Archive of SID

Expression of Hepatocyte Markers in Wharton's Jelly Mesenchymal Stem Cells Using Mouse Liver Cell Extract

Maryam Borhani-Haghighi[1, 2*], Fatemeh Alipour[1], Arezou Eshaghabadi[1]

[1]Shefa Neuroscience Research Center, Khatam Alanbia Hospital, Tehran, Iran
[2]Department of Anatomy, School of Medicine, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

Article Info:

Received: **24 Jul 2016** ***Accepted*****: 6 Apr 2017**

Downloaded from shefayekhatam.ir at 14:40 +0430 on Tuesday July 4th 2017

ABSTRACT

Introduction: Efforts have been taken to find appropriate sources to replace liver transplantation. Wharton's jelly is an unlimited source of stem cells that can be used in cell therapy and tissue engineering. In this study we investigated whether Wharton's jelly-derived mesenchymal stem cells (WJMSCs) could trans-differentiate into hepatocyte in the presence of mouse liver cell-free extract. ***Materials and Methods:*** Mesenchymal stem cells (MSCs) were isolated from the umbilical cord. The cells were permeabilized by Sterptolysin O in the presence of mouse liver cell-free extract for 21 days. To evaluate differentiation and morphological changes, immunostaining for cytokeratin 18 and 19 were performed for differentiated and control cells. Functional assays were done by periodic acid Schiff (PAS) stain. ***Results:*** The phenotype of treated MSCs in the presence of liver cell-free extract changed into polygonal cells. Immunostaining demonstrated the expression of cytokeratin 18 and 19 in differentiated cells. Glycogen storage in differentiated cells revealed by PAS staining indicated functional property of differentiated cells. ***Conclusion:*** It seems that factors existing in the extract able to trans-differentiate WJMSCs into functional hepatocyte.

Key words:

1. Mesenchymal Stromal Cells
2. Liver Extracts
3. Hepatocytes
4. Wharton Jelly

***Corresponding Author:** Maryam Borhani-Haghighi

E-mail: *borhanihm@gmail.com*

www.SID.ir

Archive of SID

بیان نشانگرهای کبدی در سلول‌های بنیادی مزانشیمی ژله وارتون بند ناف توسط عصارهٔ سلول کبد موش

مریم برهانی حقیقی[۲*۱۰]، فاطمه علی‌پور[۱]، آرزو اسحق آبادی[۱]

[۱]مرکز تحقیقات علوم اعصاب شفا، بیمارستان خاتم‌الانبیاء، تهران، ایران

[۲]گروه آناتومی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران

اطلاعات مقاله:

تاریخ دریافت: ۳ مرداد ۱۳۹۵

تاریخ پذیرش: ۱۷ فروردین ۱۳۹۶

چـــــکیده

مقدمه: برای پیدا کردن منابع مناسب در جایگزینی پیوند کبد تلاش‌هایی صورت گرفته شده است. ژله وارتون یک منبع نامحدود از سلول‌های بنیادی است که می‌تواند در سلول درمانی و مهندسی بافت به کار رود. در این مطالعه بررسی کردیم که آیا سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق شده از ژله وارتون بند ناف می‌توانند در حضور عصارهٔ عاری از سلول کبد موش به سلول‌های کبدی تمایز یابند. ***مواد و روش‌ها:*** سلول‌های بنیادی مزانشیمی از بند ناف جدا شدند. سلول‌ها توسط استرپتولیزین O در حضور عصارهٔ عاری از سلول کبد موش به‌مدت ۲۱ روز نفوذپذیر شدند. به‌منظور ارزیابی تمایز و تغییرات ریخت‌شناسی، ایمونوهیستوشیمی برای سیتوکراتین ۱۸ و ۱۹ برای سلول‌های تمایز یافته و کنترل انجام شد. سنجش عملکرد توسط روش رنگ‌آمیزی PAS انجام شد. ***یافته‌ها:*** فنوتیپ سلول‌های بنیادی مزانشیمی در حضور عصارهٔ عاری از سلول کبدی به سلول‌های چند ضلعی تغییر پیدا کرد. ایمونوهیستوشیمی بیان سیتوکراتین ۱۸ و ۱۹ در سلول‌های تمایز یافته را نشان داد. ذخیره‌سازی گلیکوژن در سلول‌های تمایز یافته توسط رنگ‌آمیزی PAS خاصیت عملکردی سلول‌های تمایز یافته را نشان داد. ***نتیجه‌گیری:*** به نظر می‌رسد که عوامل موجود در عصاره می‌توانند سبب تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی ژله وارتون بند ناف به سلول‌های کبدی عملکردی شوند.

کلید واژه‌ها:

۱. سلول‌های مزانشیمی استرومال
۲. عصاره‌های کبد
۳. هپاتوسیت‌ها
۴. ژله وارتون

* **نویسنده مسئول:** مریم برهانی حقیقی

آدرس الکترونیکی: *borhanihm@gmail.com*

Downloaded from shefayekhatam.ir at 14:40 +0430 on Tuesday July 4th 2017

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from shefayekhatam.ir at 14:40 +0430 on Tuesday July 4th 2017

مقدمه

بـر اسـاس آمارهـای سـازمان بهداشـت جهانـی بیـش از صدها میلیـون نفـر در سراسـر دنیـا مبتـلا بـه بیماری‌هـای کبـدی هسـتند. در حـال حاضـر پیونـد کبـد یکـی از مؤثرتریـن راه‌هـای درمانـی بـرای بیمـاران مبتـلا بـه نارسـایی‌های مزمـن یـا حـاد کبـدی می‌باشـد، امـا متأسـفانه تعـداد کـم اندام‌هـای اهدایـی، نیـاز بـه سـرکوب ایمنـی شـدید شـخص گیرنـده و پیچیدگی‌هـای عمـل جراحـی، ایـن گزینـه را نیـز محـدود سـاخته اسـت. کبدهـای مصنوعـی یـا پیونـد سـلول‌های کبـدی، از ایده‌هـای مطـرح شـده بـرای درمـان اسـت. امـروزه فنـاوری سـلول‌های بنیـادی و قابلیـت تمایـز آن‌هـا بـه انـواع سـلول‌های بالـغ می‌توانـد به‌عنـوان یکـی از گزینه‌هـای مـورد نظـر بـرای تهیـهٔ سـلول‌های کبـدی در نظـر گرفتـه شـود. در سـال‌های اخیـر، انـواع مختلفـی از سـلول‌های بنیـادی جهـت تمایـز بـه سـلول‌های کبـدی مـورد اسـتفاده قرارگرفتـه اسـت (۱).

سـلول‌های بنیـادی بالغیـن[1] سـلول‌های بنیـادی هسـتند کـه تقریبـاً در تمـام بافت‌هـای بـدن موجـود می‌باشـند. سـلول‌های بنیـادی مزانشـیمی (MSCs)[2] بالغیـن به‌عنـوان گـروه بزرگـی از ایـن نـوع سـلول‌ها محسـوب می‌گردنـد. ایـن سـلول‌ها در بافت‌هایـی نظیـر مغـز اسـتخوان، بافـت چربـی، ژلـه وارتـون بنـد نـاف، مایـع آمنیـون و بـه میـزان متفـاوت در سـایر بافت‌هـا یافـت می‌شـوند (۲). از ویژگی‌هـای خـاص در مـورد MSCs، ایمنوژنیـک نبـودن آن‌هـا و یـا ایجـاد کمتریـن واکنـش ایمنـی در میزبـان می‌باشـد (۳). امـروزه توجـه زیـادی بـه سـلول‌های مزانشـیمی اسـتخراج شـده از ژلـه وارتـون بنـد نـاف (WJMSCs)[3] می‌شـود. از جملـه مزایـای ایـن سـلول‌ها نسـبت بـه منابـع دیگـر کـه آن را بـرای ایـن منظـور به‌عنـوان بهتریـن کاندیـدا معرفـی می‌کنـد، می‌تـوان بـه در دسـترس بـودن بنـد نـاف اشـاره کـرد. بنـد نـاف یـک محصـول دور ریـز پـس از زایمـان اسـت و روش تهیـهٔ آن غیـر تهاجمـی و بـدون درد اسـت. بنابرایـن نگرانی‌هـای اخلاقـی در مـورد آن وجـود نـدارد. WJMSCs ابتدایی‌تـر از سـلول‌های مزانشـیمی مشـتق شـده از سـایر بافت‌هـا اسـت. همچنیـن تراتـوم القـاء نمی‌کننـد. سـلول‌های WJMSCs طـی پدیـدهٔ تغییـر تمایـز[4] بـه سـلول‌های کبـدی متمایـز می‌شـوند. تغییـر تمایـز فراینـدی اسـت کـه بـه موجـب آن یـک نـوع سـلول تبدیـل بـه نوعـی متفـاوت از سـلول بـا منشـاء متفـاوت می‌گـردد (۴). تغییـر تمایـز بـه روش‌هـای متفاوتـی انجـام می‌شـود تاکنـون از روش‌هـای مختلفـی جهـت انجـام ایـن کار اسـتفاده شـده اسـت کـه عبارتنـد از:

۱. Cloning Nuclear Transfer: انتقـال هسـتهٔ سـلول سـوماتیک[5] بـه اووسـیتی کـه هسـتهٔ آن قبـلاً خـارج شـده اسـت (۵).

۲. Cell Fusion: ادغـام سـلول سـوماتیک بـا سـلول بنیـادی چنـد ظرفیتـی سـلولی را می‌سـازد بـه نـام هیبریـد[6] کـه خاصیـت هـر دو سـلول در آن وجـود دارد (۶).

۳. Gene Transfection: اسـتفاده از حامل‌هـای مختلـف جهـت انتقـال ژن‌هـای مـورد نظـر بـه سـلول‌های سـوماتیک و القـای بیـان فاکتورهـای نسـخه‌برداری (۷).

۴. Co-Culture: هـم کشـتی سـلول‌های مختلـف بـا هـم شـرایطی را ایجـاد می‌کنـد کـه سـلول‌های سـوماتیک می‌تواننـد مجـدداً برنامـه‌دار شـوند (۸).

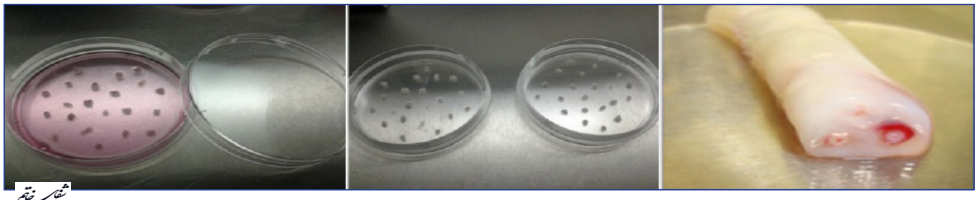
۵. Cell Extract: استفاده از عصاره‌های سلولی (۹).

در ایـن تحقیـق سـعی مـا بر ایـن بود تـا بـا اسـتفاده از عصارهٔ کبـد[7] کـه حـاوی پروتئین‌هـا و فاکتورهـای نسـخه‌برداری فـراوان اسـت و اضافـه نمـودن آن بـه سـلول‌های بنیـادی مزانشـیمی اسـتخراج شـده از ژلـه وارتـون بنـد نـاف کـه بـا کمـک اسـترپتولیزین[8] بـه ایـن فاکتورهـا تـراوا شـده، ایـن سـلول‌ها را بـه سـلول‌های کبـدی متمایـز کنیـم.

مواد و روش‌ها

۱- استخراج WJMSCs

بنـد نـاف نـوزاد تـازه متولـد شـده را بـا PBS شسـته و بـه قطعـات ۰/۵ سـانتی‌متری بریـده شـد. قطعـات بنـد نـاف بـا کمـک پنـس بـه کـف پلیـت ۱۰ سـانتی‌متری منتقـل و پـس از آن کـه قطعـات بـه کـف ظـرف چسـبید، محیـط کشـت MEM-α[9] حـاوی FBS (۱۰ درصـد) را اضافـه کـرده و ظـرف کشـت بـه انکوباتـور بـا دمـای ۳۷ درجـهٔ سـانتی‌گراد منتقـل گردیـد (تصویـر ۱). محیـط کشـت هـر پنـج روز یکبـار تعویـض شـده و بعـد از مـدت حـدود ۱۰ تـا ۱۴ روز سـلول‌های مزانشـیمی توسـط آنزیـم تریپسـین پاسـاژ گردیدنـد.



تصویر ۱- مراحل استخراج WJMSCs از ژله وارتون بند ناف.

[1] Adult stem cell
[2] Mesenchymal stem cells
[3] Wharton's jelly mesenchymal stem cells
[4] Transdifferentiation
[5] Somatic cell
[6] Hybrid
[7] Liver extract
[8] Sterptolysin
[9] Minimum essential medium eagle alpha

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from shefayekhatam.ir at 14:40 +0430 on Tuesday July 4th 2017

۲- فلوسایتومتری جهت بررسی نشانگرهای سطح سلول‌های مزانشیمی ژله وارتون

سلول‌ها بین لوله‌های فلوسایتومتری به گونه‌ای تقسیم شدند که در هر لوله به طور متوسط ۵۰۰۰۰۰ سلول WJMSCs قرار داده شدند. آنتی‌بادی‌های نشاندار، بر طبق جدول ۱ به هر یک از لوله‌های فلوسایتومتری اضافه گردیدند. جهت فیکس کردن سلول‌ها، پارافرمالدئید ۱ درصد به مدت ۱۵ دقیقه به آن‌ها اضافه شد و سپس نمونه‌ها به دستگاه فلوسایتومتری انتقال داده شد.

۳- به دست آوردن عصارهٔ کبد

ابتدا ۶ میلی‌لیتر محلول HBSS[10] حاوی FBS ۳ درصد به درون بطن چپ موش نژاد C57BL/6 تزریق شد در حالی که دهلیز راست جهت خروج خون شکاف داده شده بود. سپس ۶ میلی‌لیتر محلول HBSS حاوی FBS ۳ درصد و collagenase IV ۰/۱ درصد و ۵ میلی‌لیتر محلول HBSS حاوی FBS ۳ درصد و EDTA ۰/۱ درصد به ترتیب تزریق شد. بعد از روشن شدن رنگ کبد، کبد جدا شده و به پلیت کوچک حاوی PBS سرد حاوی پنی‌سیلین / استرپتومایسین ۱ درصد، منتقل شد. سپس کبد به قطعات بسیار کوچک تقسیم شد. قطعات کوچک کبد توسط PBS سرد شستشو داده شد. به قطعات کبد ml ۳ Trypsin / EDTA، به مدت بیست دقیقه در دمای ۳۷ درجهٔ سانتی‌گراد اضافه شد. قطعات بافتی توسط PBS سرد شستشو و به داخل یک کرایوتیوب منتقل شدند. کرایوتیوب‌ها داخل نیتروژن مایع انداخته شد تا منجمد شوند، سپس محتویات تیوب با دور g ۸۰۰، به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۴ درجهٔ سانتی‌گراد سانتریفیوژ شد. به رسوب حاصل Lysis buffer حاوی DTT[11] اضافه و با دور g ۸۰۰، به مدت ۱۰ دقیقه، در دمای ۴ درجهٔ سانتی‌گراد سانتریفیوژ گردید. به اندازهٔ حجم پلیت تشکیل شده،Lysis buffer حاوی Protease Inhibitor ۰/۱ درصد، اضافه شد. سوسپانسیون حاصل به مدت ۴۵ دقیقه روی یخ در یخچال قرار داده شد. نمونه‌ها ۷ بار با ۲۵٪ پالس ۰/۵ ثانیه، ۴۵ ثانیه سونیکیت شده و سوسپانسیون با دور g۱۵۰۰۰ به مدت ۱۵ دقیقه در ۴ درجهٔ سانتی‌گراد سانتریفیوژ شد. محلول رویی برداشته شده Snap Freeze شد و سپس برای استفادهٔ بعدی در دمای ۸۰ - درجهٔ سانتی‌گراد نگهداری شد.

۴- اندازه‌گیری میزان پروتئین موجود در عصاره

پس از ذوب شدن عصاره بر روی یخ، از روش برادفورد[12] استفاده شد. سپس به وسیلهٔ دستگاه اسپکترومتر با طول موج ۵۹۵ نانومتر میزان OD[13] اندازه‌گیری گردید.

[17] Fluorescein isothiocyanate
[18] Adenosine triphosphate (ATP) regenerating system
[19] Phosphocreatine
[20] Guanosine triphosphate
[21] Creatine phosphokinase
[22] Deoxynucleotide

۵- آزمون نفوذپذیری

آزمون نفوذپذیری[14] جهت اطمینان از نفوذپذیر شدن غشاء سلول WJMSC، قبل از شروع، برنامه‌ریزی مجدد[15] انجام می‌گردد. این آزمون در حضور دکستران[16] متصل به FITC[17] با وزن مولکولی ۷۰۰۰۰ کیلو دالتون انجام شد. جهت این آزمون ابتدا سلول‌ها، دکستران متصل به FITC و استرپتولیزین O را دریافت نمودند. در اینجا ذکر این نکته ضروری به نظر می‌رسد که جهت آزمون نفوذپذیری، غلظت استرپتولیزین O ۹۲۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر در نظر گرفته شد. میکروتیوب‌های حاوی سلول، به مدت ۵۰ دقیقه به‌صورت افقی در بن ماری با دمای ۳۷ درجهٔ سانتی‌گراد قرار داده شدند. بعد از گذشت ۵۰ دقیقه، سلول‌ها به پلیت ۲۴ خانه‌ای حاوی لامل گرد منتقل و محیط کشت با دمای ۳۷ درجهٔ سانتی‌گراد حاوی CaCl2 (۲ میلی‌مولار) به هر خانه اضافه شد سپس سلول‌ها به مدت ۴-۲ ساعت درون انکوباتور با دمای ۳۷ درجهٔ سانتی‌گراد قرار داده شدند. بعد از گذشت این زمان محیط کشت از روی سلول‌ها برداشته و نتایج با میکروسکوپ فلورسانس ارزیابی شد.

۶- نفوذپذیر نمودن سلول‌های WJMSCs و تمایز این سلول‌ها توسط عصارهٔ کبدی

نفوذپذیر نمودن سلول‌های WJMSCs توسط استرپتولیزین O انجام شد. عصارهٔ کبد همراه با سیستم بازسازی ATP[18] شامل فسفوکراتین[19]، تری فسفات گوانوزین (GTP)[20]، ATP، کراتین فسفوکیناز[21] و dNTP[22] به سلول‌های WJMSCs اضافه شد. سلول‌ها به مدت ۲۱ روز درون انکوباتور با دمای ۳۷ درجهٔ سانتی‌گراد قرار

جدول ۱- نحوهٔ اضافه نمودن نشانگرها به سلول‌های مزانشیمی ژله وارتون، جهت انجام فلوسایتومتری و بررسی نشانگرهای سطح سلول.

ردیف	لیبل	نشانگر
۱	Percp (Peridinin chlorophyll protein complex) / PE (Phycoerythrin) / FITC	CD 34، CD 44، CD 105
۲	PE / FITC	CD 144، CD 106
۳	FITC	CD 44
۴	PE	CD 106
۵	Percp	CD 105
۶	FITC	CD 90
۷	FITC / PE	CD 106، CD 44
۸	Percp / FITC	CD 44، CD 105
۹	Percp/ PE	CD 34، CD 105

[10] Hanks' balanced salt solution
[11] Dithiothreitol
[12] Bradford
[13] Optical density
[14] Permeabilization assay
[15] Reprogramming
[16] Dextran

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from shefayekhatam.ir at 14:40 +0430 on Tuesday July 4th 2017

داده شـد و در ایـن فاصلـهٔ زمانـی محیـط کشـت بـه طـور مرتـب تعویـض می‌گردیـد.

۷- بررسی عملکرد سلول‌های تمایز یافته

جهـت بررسـی عملکـردی شـدن سـلول‌های تمایـز یافتـه رنگ‌آمیـزی PAS[23] انجـام شـد تـا سـنتز گلیکـوژن در سـلول‌ها بررسـی شـود.

۸- بررسـی بیـان نشـانگرهای کبـدی سـیتوکراتین ۱۸ و ۱۹ توسـط روش پلیمـر دکسـتران

ابتـدا سـلول‌ها توسـط پارافرمالدئیـد ۴ درصـد فیکـس شـدند سـپس در تاریکـی محلـول H_2O_2[24] ۰/۳درصـد بـه مـدت ۲۰ دقیقـه بـر روی سـلول‌ها قـرار داده شـد. آنتی‌بادی‌هـای غیـر اختصاصـی توسـط سـرم بـز ۱۰ درصـد بـه مـدت ۲۰ دقیقـه بـلاک گردیـد. آنتی‌بـادی اولیـه سـیتوکراتین ۱۸ و سـیتوکراتین ۱۹ بـه مـدت ۴۵ دقیقـه روی سـلول هـا اضافـه گردیـد سـپس آنزیـم super enhancer envision بـه مـدت ۱۵ دقیقـه بـر روی سـلول‌ها قـرار داده شـد بعـد از آن آنتی‌بـادی ثانویـهٔ SS label envision: polymer HRP بـه مـدت ۳۰ دقیقـه روی سـلول‌ها ریختـه شـد. در پایـان محلـول DAB[25] را بـه سـلول‌ها اضافـه کـرده تـا کروموژن بـا کمـک آنزیـم نشـاندار کننـده، رسـوب رنگـی را در محـل آنزیـم -کـه بـه آنتی‌بـادی متصـل اسـت- ایجـاد نمایـد.

یافته‌ها

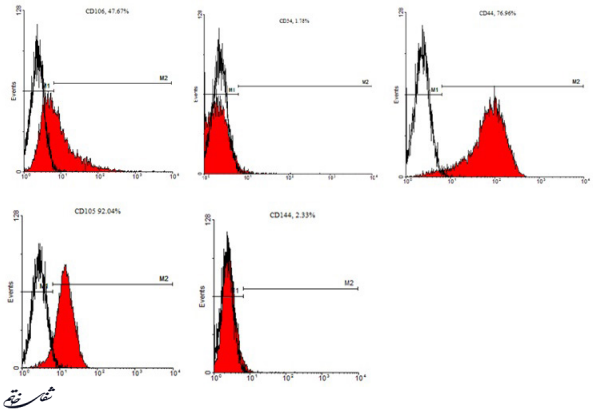
بررسی ریخت‌شناسی سلول‌های WJMSCs

پـس از گذشـت حـدود ۱۰ روز از کشـت سـلول‌ها در محیـط کشـت، سـلول‌های شـبه فیبروبلاسـت بـا ظاهـری دوکـی شـکل، کشـیده و یـا اسـتطاله دار از اطـراف قطعـات بنـد نـاف جوانـه زدنـد (تصویـر ۲).

تصویر ۲- جوانه زدن سلول‌های مزانشیمی از یک قطعه بند ناف.

بررسـی بیـان نشـانگرهای سـطحی سـلول‌های WJMSCs

به‌منظـور بررسـی نشـانگرهای سـطح سـلولی، فلوسـایتومتری انجـام گرفـت. سـلول‌های مزانشـیمی ژلـه وارتـون نشـانگرهای سـلول‌های خونساز (CD34) و سـلول‌های اندوتلیـال (CD144) را بسـیار کـم و بـه ترتیـب ۱/۷۸ درصـد و ۲/۳۳ درصـد بیـان کردنـد، با این حـال، بـا نشـانگرهای CD105، CD106 و CD44 واکنـش دادنـد و بـه ترتیـب ایـن نشـانگرها را بـه میـزان ۹۲/۴ درصـد، ۴۷/۶۷ درصـد و ۹۶/۷۶ درصـد بیـان کردنـد (نمـودار ۱).



نمـودار ۱- بیـان نشـانگرهای سـطحی سـلول‌های بنیـادی مزانشـیمی مشـتق از ژلـه وارتـون. سـلول‌ها نشـانگرهای CD44 ، CD105 و CD106 را بیـان کردنـد، امـا نشـانگرهای CD34, CD144 بـه میـزان بسـیار کمـی بیـان شـدند.

نتایـج بررسـی غلظـت پروتئیـن موجـود در عصـارهٔ کبـدی بـا اسـتفاده از آزمـون برادفـورد

ایـن آزمـون جهـت تعییـن غلظـت پروتئیـن موجـود در عصـارهٔ کبـد انجـام شـد. بعـد از انجـام کار، میـزان پروتئیـن موجـود در عصـاره ۷۵۳۰ میکروگـرم در میلی‌لیتـر بـرآورد شـد.

نتایج آزمون سمی بودن عصارهٔ کبد

بـا اضافـه نمـودن عصـاره بـه سـلول‌های WJMSCs، آن‌هـا در معـرض مقادیـر زیـادی فاکتورهـای نسـخه‌برداری، آنزیـم و پروتئین‌هـای سـاختمانی موجـود در عصـاره قـرار می‌گیرنـد. ایـن مـواد ممکـن اسـت اثـرات کشـنده بـر سـلول‌ها داشـته باشـند. هرچنـد ایـن آنزیم‌هـا توسـط مهارکننـدهٔ پروتئازهـا مهـار می‌شـوند امـا ممکـن اسـت بـه طـور بالقـوه بـه سـلول‌ها آسـیب برسـانند؛ بنابرایـن بایسـتی قبـل از شـروع آزمایـش، میـزان سـمّیت عصـاره ارزیابـی شـود. بررسـی بـا تریپان‌بلـو نشـان داد کـه درصـد سـلول‌های زنـده‌ای کـه در مجـاورت عصـاره قـرار گرفتـه بودنـد ۷۶/۲ درصـد و در گـروه کنتـرل ۹۳ درصـد بـود.

آزمـون نفوذپذیـری بـرای اطمینـان از عملکـرد اسـترپتولیزین O

ایـن آزمـون بـرای اطمینـان از عملکـرد اسـترپتولیزین O، بـا کمـک دکسـتران متصـل بـه FITC انجـام شـد. دکسـتران متصـل بـه FITC انـدازه‌ای شـبیه بـه متوسـط انـدازهٔ پروتئین‌هـای موجـود در عصـاره دارد. کـه در صـورت ورود

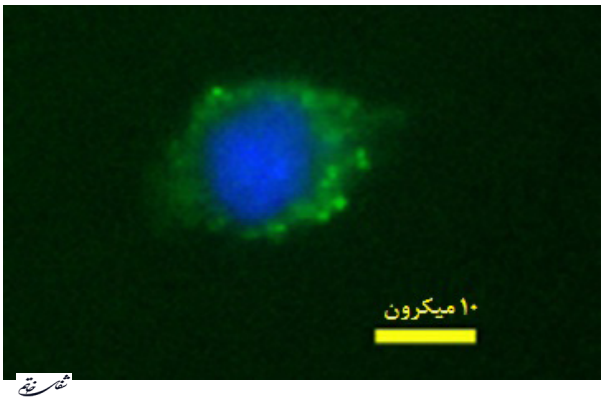
[23] Periodic acid–schiff
[24] Hydrogen peroxide
[25] 3,3'-diaminobenzidine

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from shefayekhatam.ir at 14:40 +0430 on Tuesday July 4th 2017

دکستران متصل به FITC به درون سلول پس از نفوذپذیر کردن غشای آن توسط استرپتولیزین O می‌توان مطمئن شد که پروتئین‌های موجود در عصاره نیز پس از نفوذپذیر شدن وارد سلول می‌شوند. نتایج حاصل از این آزمون نشان داد غلظت ۹۲۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر استرپتولیزین O برای نفوذپذیرکردن غشاء سلول مناسب است. در بررسی با میکروسکوپ فلورسانس، دکستران متصل به FITC درون سلول‌های نفوذپذیر شده با استرپتولیزین O مشاهده شد (تصویر ۳).



تصویر ۳- سلول مزانشیمی ژله وارتون بعد از دریافت دکستران متصل به FITC و استرپتولیزین O. دانه‌های سبز نمایانگر دکستران متصل به FITC است که پس از نفوذپذیری وارد سلول شده است و رنگ آبی مربوط به DAPI است که هسته‌ها را رنگ می‌کند.

بررسی مطالعهٔ ریخت‌شناسی سلول‌های WJMSCs بعد از دریافت عصاره

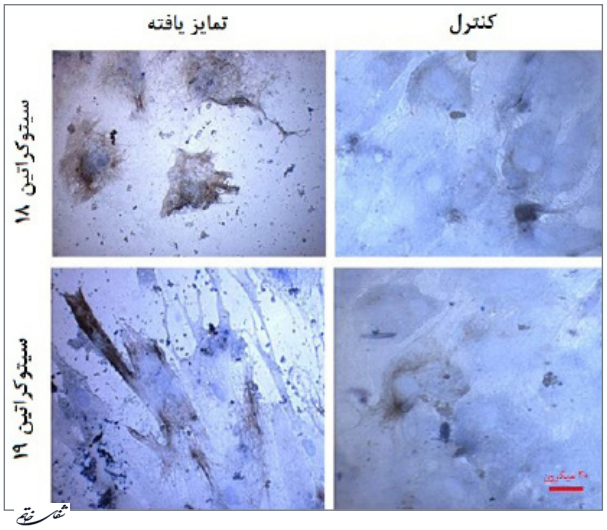
در حالت طبیعی سلول‌های WJMSCs کشیده و استطاله دار می‌باشند. این در حالی است که وقتی سلول‌های مزانشیمی در ظرف مخصوص کشت داده شده و در معرض عصاره قرار داده شدند، تغییر ریخت‌شناسی داده و به صورت سلول‌های چند وجهی تغییر فرم دادند.

بررسی بیان نشانگرهای کبدی در سلول‌های WJMSCs به وسیلهٔ ایمونوسیتوشیمی بعد از دریافت عصاره

به‌منظور ارزیابی تأثیر عصاره بر روی سرنوشت سلول‌ها، بیان ۳ پروتئین درون سلول‌هایی که روی آن‌ها روند تغییر، تمایز و برنامه‌ریزی مجدد انجام شده بود، مورد ارزیابی قرار گرفت. این پروتئین‌ها شامل: سیتوکراتین ۱۸ و ۱۹ بودند. در گروه کنترل به ترتیب ۲ ± ۲۱/۱۳٪ و ۱ ± ۹/۴۳٪ سلول‌ها سیتوکراتین ۱۸ و ۱۹ را بیان کرده بودند. ۲/۷ ± ۸۳/۶٪ سلول‌های تمایز یافته سیتوکراتین ۱۸ را بیان کرده بودند. ۴ ± ۵۷/۳٪ سلول‌های تمایز یافته سیتوکراتین ۱۹ را بیان کرده بودند (تصویر ۴).

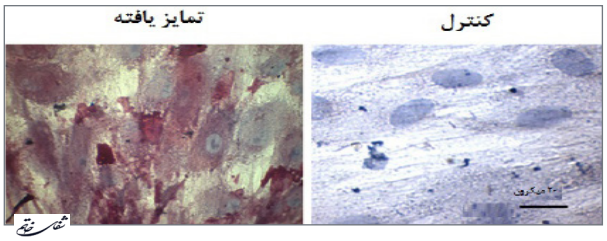
بررسی میزان سنتز گلیکوژن توسط رنگ‌آمیزی PAS در سلول‌های WJMSCs بعد از دریافت عصاره

رنگ‌آمیزی PAS که برای نشان دادن گلیکوژن ذخیره شده در سلول استفاده شد، نشان داد که گروه سلول‌های



تصویر ۴- بیان نشانگرهای کبدی در سلول‌های WJMSCs به وسیلهٔ ایمونوسیتوشیمی بعد از دریافت عصاره. درصد بالاتری از سلول‌های تمایز یافته نسبت به گروه کنترل سیتوکراتین ۱۸ و ۱۹ را بیان کردند.

دریافت کنندهٔ عصاره بسیار شدید با PAS واکنش دادند که نشان دهندهٔ ذخیرهٔ گلیکوژن بیشتر توسط این سلول‌ها پس از تمایز است (تصویر ۵).



تصویر ۵- بررسی سنتز گلیکوژن توسط رنگ‌آمیزی PAS در سلول‌های WJMSCs بعد از دریافت عصاره. سلول‌های تمایز یافته با عصاره با شدت بیشتری نسبت به گروه کنترل با PAS واکنش دادند.

بحث و نتیجه‌گیری

در سال‌های اخیر پژوهش‌های زیادی در مورد سلول‌های بنیادی و کاربرد آن در درمان بیماری‌های مختلف انجام شده است. اگر چه از نظر بعضی محققین مغز استخوان به‌عنوان مهم‌ترین منبع سلول‌های بنیادی مزانشیمی در نظر گرفته شده است، اما از بسیاری از بافت‌های دیگر نیز سلول بنیادی مزانشیمی استخراج گردیده است که یکی از آن‌ها ژله وارتون بند ناف می‌باشد. از سلول‌های مزانشیمی ژله وارتون به‌عنوان ابزاری نویدبخش برای درمان بسیاری از بیماری‌ها انتظار می‌رود. WJMSCs دارای پتانسیل تمایز گسترده به انواع سلول‌ها مانند سلول‌های تولید کنندهٔ انسولین (۱۰)، سلول‌های عصبی (۱۱) و سلول‌های قلبی و همچنین سلول‌های شبه کبدی می‌باشند (۱۲).

روش آسان استخراج سلول‌های مزانشیمی بند ناف، توانایی تکثیر بالای این سلول‌ها (۱۳)، خاصیت تعدیل سیستم ایمنی و داشتن اثر مهاری بر روی سلول‌های T تحریک شده در محیط In vitro می‌تواند یک مزیت

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from shefayekhatam.ir at 14:40 +0430 on Tuesday July 4th 2017

برای پیوندهای آلوژن به حساب آید (۱۴). علاوه بر این مطالعات بالینی نشان داده‌اند که WJMSC ها می‌توانند عملکرد کبد را بهبود بخشیده و فیبروز کبدی را در مدل حیوانی با آسیب کبدی کاهش دهند (۱۵). مزیت‌های ذکر شده برای این سلول‌ها و همچنین بیان نشانگرهای اولیهٔ کبدی توسط این سلول‌ها (۱۶)، آن‌ها را کاندیدای مناسبی برای استفاده در سلول درمانی بیماری‌های کبد می‌گرداند. قابلیت تمایز سلول‌های مزانشیمی ژله وارتون به سلول‌های شبه کبدی قبلاً توسط سایر دانشمندان نشان داده شده است (۱۸، ۱۷، ۱۲).

روش‌ها و پروتکل‌های متفاوتی برای تمایز این سلول‌های بنیادی به سلول‌های شبه کبدی عملکردی وجود دارد (۱۹، ۱۸). برای مثال سلول‌های مزانشیمی ژله وارتون که در معرض محیط کشت حاوی فاکتورهای رشد مناسب قرار داده شدند به سلول‌های شبه کبدی تمایز یافتند (۱۸). نشان داده شده است که اضافه کردن عصارهٔ سلولی (فاقد سلول) به محیط کشت سبب القاء تمایز در سلول‌های بنیادی می‌شود در فرایند تغییر تمایز[۲۶]، سلول‌ها مجدداً برنامه دار می‌شوند. برنامه دار شدن مجدد به پاک کردن نشانگرهای اپی ژنتیک سلول‌ها و ایجاد نشانگرهای جدید اطلاق می‌شود (۲۰). در واقع با استفاده از این روش می‌توان سرنوشت سلول را تغییر داده و سلول‌های خودی[۲۷]، برای درمان انواع مختلفی از بیماری‌ها تولید نمود (۲۱).

طبق اطلاعاتی که از مطالعات گذشته به دست آمده است، روش‌های مختلفی برای تغییر برنامهٔ سلول‌ها وجود دارد که شامل روش انتقال هسته، ادغام سلولی، هم کشتی استفاده از عصاره‌های سلولی و ... می‌باشد. جهت تمایز از عصارهٔ سلولی در تحقیقات متعددی استفاده شده است. شین[۲۸] و همکاران نشان دادند که عصارهٔ جفت می‌تواند به‌عنوان یک ترکیب جدید جهت تمایز سلول‌های بنیادی به سمت سلول‌های شبه کبدی استفاده شود. عصارهٔ جفت دارای تعدادی از سایتوکین و کموکین‌های ضروری برای تمایز سلول‌های بنیادی به سمت سلول‌های شبه کبدی می‌باشد (۲۲). عصارهٔ سلول (فاقد سلول) شامل فاکتورهای رونویسی لازم برای بیان نشانگرهای خاص بافت بالغ است. برخی از محققان سلول‌های نفوذپذیر شده را در معرض عصاره عاری از سلول قرار داده که این کار سبب تمایز سلول‌های بنیادی به سمت سلول‌های تمایز یافته شده است. گوستاد[۲۹] و همکاران توانستند با استفاده از عصارهٔ سلول‌های قلبی، سلول‌های مزانشیمی بافت چربی را به سلول‌های کاردیو میوسیت متمایز کنند (۲۳).

نتایج حاصل از آزمایشات ما نشان داد که سلول‌های مزانشیمی ژله وارتون هنگامی که نفوذپذیر شده و در معرض عصارهٔ کبد قرار بگیرند توانایی تمایز به سلول‌های عملکردی کبدی را دارا می‌باشند. تشخیص پروتئین‌های کبدی در سیتوپلاسم سلول‌های مزانشیمی ژله وارتون بند ناف نمی‌تواند به دلیل باقی ماندن پروتئین‌های موجود در عصاره، در سیتوپلاسم این سلول‌ها باشد، زیرا فاصلهٔ زمانی قرارگیری سلول‌ها در معرض عصاره با بررسی نشانگرهای مورد نظر تقریباً طولانی بوده است (۲۱ روز). همچنین این سلول‌های تمایز یافته قادر به ذخیرهٔ گلیکوژن بودند که نشان دهندهٔ عملکردی بودن این سلول‌های تمایز یافته است (۲۴).

این مطالعه نشان داد که سلول‌های مزانشیمی ژله وارتون بند ناف با استفاده از عصاره، قابل تمایز به سلول‌های کبدی هستند و با توجه به امکان استفاده از کبد افراد دهنده که قابلیت پیوند زدن به افراد متقاضی کبد پیوندی را ندارند می‌توان از این روش به‌عنوان روشی مناسب و قابل دسترس جهت سلول درمانی و نیز تولید سلول‌های هپاتوسیت جهت مطالعات آزمایشگاهی و تحقیقات بر روی تکامل کبد یا Trans differentiation استفاده کرد.

منابع

1. Guettier C. Which stem cells for adult liver? Ann Pathol. 2005; 25(1): 33-44.

2. Klingemann H, Matzilevich D, Marchand J. Mesenchymal stem cells-sources and clinical applications. Transfus Med Hemother. 2008; 35(4): 272-7.

3. Salem HK, Thiemermann C. Mesenchymal stromal cells: current understanding and clinical status. Stem Cells. 2010; 28(3): 585-96.

4. Wells WA. Is transdifferentiation in trouble? J Cell Biol. 2002; 157(1): 15–8.

5. Wilmut I, Beaujean N, De Sousa P, Dinnyes A, King T, Paterson L, et al. Somatic cell nuclear transfer. Nature. 2002; 419(6907): 583-7.

6. Matsumura H, Tada T. Cell fusion-mediated nuclear reprogramming of somatic cells. Reprod Biomed Online. 2008; 16(1): 51-6.

7. Park IH, Zhao R, West JA, Yabuuchi A, Huo H, Ince TA, et al. Reprogramming of human somatic cells to pluripotency with defined factors. Nature. 2007; 451(7175): 141-6.

8. Burguera EF, Bitar M, Bruinink A. Novel in vitro co-culture methodology to investigate heterotypic cell-cell interactions. Eur Cell Mater. 2010; 19: 166-79.

9. Collas P, Taranger CK. Epigenetic reprogramming of

[26] Trans differentiation
[27] Autologous
[28] Shin
[29] Gaustad

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from shefayekhatam.ir at 14:40 +0430 on Tuesday July 4th 2017

nuclei using cell extracts. Stem Cell Rev. 2006; 2(4): 309-17.

10. Chao KC, Chao KF, Fu YS, Liu SH. Islet-like clusters derived from mesenchymal stem cells in Wharton's Jelly of the human umbilical cord for transplantation to control type 1 diabetes. PLoS One. 2008; 3(1): e1451. doi: 10.1371/journal.pone.0001451.

11. Mitchell KE, Weiss ML, Mitchell BM, Martin P, Davis D, Morales L, et al. Matrix cells from Wharton's jelly form neurons and glia. Stem Cells. 2003; 21(1): 50-60.

12. Borhani-Haghighi M, Talaei-Khozani T, Ayatollahi M, Vojdani Z. Wharton's jelly-derived mesenchymal stem cells can differentiate into hepatocyte-like cells by HepG2 cell line extract. Iranian Journal of Medical Sciences. 2015; 40(2): 143-51.

13. Anzalone R, Iacono ML, Corrao S, Magno F, Loria T, Cappello F, et al. New emerging potentials for human Wharton's jelly mesenchymal stem cells: immunological features and hepatocyte-like differentiative capacity. Stem Cells Dev. 2010; 19(4): 423-38.

14. Weiss ML, Anderson C, Medicetty S, Seshareddy KB, Weiss RJ, Vander Werff I, et al. Immune properties of human umbilical cord wharton's jelly-derived cells. Stem Cells. 2008; 26(11): 2865-74.

15. Yan Y, Xu W, Qian H, Si Y, Zhu W, Cao H, et al. Mesenchymal stem cells from human umbilical cords ameliorate mouse hepatic injury in vivo. Liver Int. 2009; 29(3): 356-65.

16. Zhang S, Chen L, Liu T, Zhang B, Xiang D ,Wang Z, et al. Human umbilical cord matrix stem cells efficiently rescue acute liver failure through paracrine effects rather than hepatic differentiation. Tissue Eng Part A. 2012; 18(13-14): 1352-64.

17. Zhao Q, Ren H, Li X, Chen Z, Zhang X, Gong W, et al. Differentiation of human umbilical cord mesenchymal stromal cells into low immunogenic hepatocyte-like cells. Cytotherapy. 2009; 11(4): 414-26.

18. Talaei-Khozani T, Borhani-Haghighi M, Ayatollahi M, Vojdani Z. An in vitro model for hepatocyte-like cell differentiation from Wharton's jelly derived-mesenchymal stem cells by cell-base aggregates. Gastroenterology and Hepatology from Bed to Bench. 2015; 8(3): 188.

19. Ayatollahi M, Soleimani M, Tabei SZ, Salmani MK. Hepatogenic differentiation of mesenchymal stem cells induced by insulin like growth factor-I. World J Stem Cells. 2011; 3(12): 113-21.

20. Hochedlinger K, Jaenisch R. Nuclear reprogramming and pluripotency. Nature. 2006; 441 (7097): 1061-7.

21. Gurdon JB, Melton DA. Nuclear reprogramming in cells. Science. 2008; 322(5909): 1811-5.

22. Shin K, Lee H, Jung J, Cha D, Kim G. Culture and in vitro hepatogenic differentiation of placenta-derived stem cells, using placental extract as an alternative to serum. Cell Prolif. 2010; 43(5): 435-44.

23. Gaustad KG, Boquest AC, Anderson BE, Gerdes AM, Collas P. Differentiation of human adipose tissue stem cells using extracts of rat cardiomyocytes. Biochem Biophys Res Commun. 2004; 314(2): 420-7.

24. Yamada T, Yoshikawa M, Kanda S, Kato Y, Nakajima Y, Ishizaka S, et al. In vitro differentiation of embryonic stem cells into hepatocyte-like cells identified by cellular uptake of indocyanine green. Stem Cells. 2002; 20(2): 146-54.

www.SID.ir