

A Study on Transdifferentiation of Bone Marrow Stromal Cells into Neuronal and Glial-Like Cells In Vitro by Different Inducers

Kaka GH., M.Sc., Tiraihi T., Ph.D.* , Aziz zadeh Delshad A., Ph.D.

** P.O.Box: 14115-4838, Department of Anatomical Sciences, School of medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran*

Abstract

Introduction: There are some evidences to suggest that bone marrow stromal cells (BMSCs) not only differentiate into mesodermal cells, but also adopt the fate of endodermal and ectodermal cell types. BMSCs can be a valuable cell source as an autograft for clinical application involving regeneration of the central nervous system. Bone marrow stromal cells can be expanded rapidly in vitro and can be differentiated into neuronal- and glial-like cells. In this study, we attempted to devise a protocol or protocols for the induction of BMSCs into neuroepithelial- and neuroglial-like cells.

Materials and Methods: Bone marrow was extracted from the femur and tibia of adult rat, and then bone marrow stromal cells with 4 passages were proliferated and cultured and then were evaluated with fibronectin by immunocytochemistry and Oct-4 by semi quantitative RT-PCR techniques. Also in this stage expression of Nestin, NF68, GFAP and O4 antibodies respectively markers of neuroepithelial, neuron, astrocytes and oligodendrocytes cells, were assessed. Rat BMSCs were differentiated by two consequent inductors into neuroepithelial, neuronal and glial-like cells. At pre-induction stage dimethyl sulfoxide (DMSO), β -mercaptoethanol (β ME) or biotylated hydroxyanisole (BHA) were separately and without fetal bovine serum (FBS) added to alpha minimal essential medium (α -MEM), and then at induction stage the medium was replaced by retinoic acid (RA) and 15% FBS in α -MEM. Four days later, expressions of neuronal and glial markers were assessed. In addition, expression of NeuroD and Oct-4 mRNA were assessed in these cells.

Results: More than 92% of BMSCs was fibronectin positive at passage 4. A few percent of BMSCs differentiated into neuroepithelial and neuron-like cells but no astrocyte and oligodendrocyte-like cells were detected. Oct-4 mRNA was highly expressed in these cells while NeuroD mRNA expression was not detected. Induction of BMSCs by DMSO-RA differentiated BMSCs into neuroepithelial and neuronal-like cells significantly compare to β ME-RA and BHA-RA. Transdifferentiation of the treated BMSCs into astrocytes and oligodendrocyte-like cells was less than 5 %. Induction of BMSCs by DMSO-RA resulted in expression of NeuroD mRNA but Oct-4 mRNA was not expressed in none of treatment groups.

Conclusion: Induction of BMSCs by different inducers specially DMSO-RA could highly transdifferentiate BMSCs into neuroepithelial and neuronal-like cells, whereas glial-like cells transdifferentiation was very low.

Key words: BMSCs, Neuroepithelial-like cells, Neuroglial-like cells, Transdifferentiation

بررسی روند تمایز سلول‌های استرومایی مغز استخوان به سلول‌های شبه عصبی و گلیالی در شرایط محیط کشت تحت اثر عوامل القایی مختلف

✍ غلامرضا کاکا M.Sc. *، تقی طریحی Ph.D. *، علیرضا عزیززاده دلشاد Ph.D. **

* گروه علوم تشریح دانشکده علوم پزشکی دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

** گروه علوم تشریح دانشکده علوم پزشکی دانشگاه شاهد، تهران، ایران

تاریخ وصول: دی‌ماه ۸۷، تاریخ پذیرش: اسفندماه ۸۷

چکیده

هدف: تمایز (BMSCs) Bone Marrow Stromal Cells به سلول‌های شبه نوروگلیال در محیط کشت تحت روش یا روش‌های معین **مواد و روش‌ها:** در این تحقیق BMSCs از استخوان فمور و تییبای موش صحرایی بالغ تهیه و پس از رسیدن به پاساژ چهارم، بنیادی بودن و خلوصشان با بیان مارکر استرومایی فیبرونکتین توسط روش ایمونوسایتوشیمی و همچنین Oct-4 توسط روش semi-quantitative RT-PCR بررسی شد. ضمناً در این مرحله بیان آنتی‌بادی‌های GFAP، NF68، Nestin و O4 نیز ارزیابی شد. سپس این سلول‌ها در دو مرحله پیش القا و القا به سلول‌های شبه Neuroepithelial، شبه نوروئی و شبه گلیالی تمایز داده شدند. در مرحله پیش القا با کاربرد یکی از محرک‌های dimethylsulfoxide (DMSO)، beta-mercaptoethanol (BME) و butylatedhydroxyanisole (BHA) به‌طور مجزا و بدون حضور fetalbovine serum (FBS) و فقط در محیط alpha minimal essential medium (α-MEM) و سپس در مرحله القا از retinoic acid (RA) به همراه FBS ۱۵ درصد استفاده شد. در بررسی میزان تمایز BMSCs پس از پایان چهار روز از مراحل القا از آنتی‌بادی‌های مذکور استفاده شد. همچنین بیان ژن NeuroD و Oct-4 در سطح mRNA بررسی شد. **یافته‌ها:** سلول‌های BMSCs پس از پاساژ چهارم توانستند پروتیین Fibronectin را به میزان $92/75 \pm 3/86$ درصد بیان کنند. در بررسی ایمونوسایتوشیمی در خصوص تمایز سلول‌ها مشخص شد که درصد ناچیزی به سلول‌های شبه Neuroepithelial و شبه نوروئی تمایز یافته و تمایز به سلول‌های شبه آستروسایت و شبه الیگودندروسایت مشاهده نشد. همچنین در بررسی RT-PCR این سلول‌ها، mRNA ژن Oct-4 به‌خوبی بیان شد، در حالی‌که باند مشخصی در بیان mRNA ژن NeuroD در ژل الکتروفورز مشاهده نشد. بیان قابل توجه مارکر Nestin و NF68 توسط القا کننده‌های DMSO و RA در پایان مراحل پیش القا و القا توانست به‌طور معنی‌داری ($P < 0.05$)، درصد سلول‌های شبه نوروایپیتلیال ($75/03 \pm 4/63$) و شبه نوروئی ($75 \pm 5/62$) بیشتری را نسبت به القا کننده‌های دیگر ایجاد کند درحالی‌که میزان تمایز به سلول‌های شبه آستروسایت و شبه الیگودندروسایت توسط القا کننده‌های فوق در این مرحله کمتر از ۵ درصد بود. لازم به ذکر است از بین سلول‌های در معرض تمایز در هر سه گروه القا فقط ۳ الی ۶/۶ درصد آنتی‌بادی Fibronectin را بیان کردند. همچنین فقط گروه DMSO-RA بیان mRNA ژن NeuroD را به‌خوبی نشان داد اما mRNA ژن Oct-4 در این مرحله در هیچ کدام از سه گروه القا کننده بیان نشد. **نتیجه‌گیری:** BMSCs تحت اثر القا کننده‌های DMSO و RA توانست به میزان قابل ملاحظه‌ای به سلول‌های شبه نوروایپیتلیال و شبه نوروئی متمایز شود در حالی‌که میزان تمایز به سلول‌های شبه گلیالی بسیار کم بود.

کلید واژه‌ها: سلول‌های استرومایی مغز استخوان، سلول‌های شبه نوروایپیتلیال، سلول‌های شبه نوروگلیال، تمایز

مقدمه

سلول‌های بنیادی (Stem cells)، سلول‌های غیرتخصصی هستند که قادر به خود تکثیری (Self-renewal) بوده، در شرایط مناسب می‌تواند در یک محدوده وسیع به انواع سلول‌های بالغ تمایز یابند [۱ و ۲]. براساس منشأ و ظرفیت تمایزی دو نوع سلول بنیادی رویانی (Embryonic) و بالغ (Somatic) تشخیص داده شده است [۲]. سلول‌های استرومایی مغز استخوان (BMSCs) جزء سلول‌های بنیادی بالغ هستند که از مغز استخوان منشأ گرفته و قادرند به رده‌های مزانشیمی و غیرمزانشیمی تبدیل شوند [۳]. مغز استخوان شامل دو گروه سلول چندظرفیتی خون‌ساز (هماتوپوئیتیک) و غیرخون‌ساز است. سلول‌های غیرخون‌ساز، چندظرفیتی و معمولاً به‌عنوان سلول‌های استرومایی مزانشیمی یا BMSCs معرفی می‌شوند که قادرند به سلول‌هایی با منشأ مزانشیمی و غیرمزانشیمی تمایز یابند [۴]. BMSCs با محیطی که فراهم می‌کنند نقش مهمی در شکل‌گیری و تمایز سلول‌های خونی بالغ از سلول‌های خون‌ساز فراهم می‌کند [۵]. BMSCs توانایی خود تکثیری بالایی داشته به ظروف کشت می‌چسبند [۶]. BMSCs به سهولت از مغز استخوان به‌دست آمده و به سرعت در محیط کشت گسترش می‌یابند [۶ و ۷]. این سلول‌های بنیادی، چندظرفیتی بوده و تحت شرایط آزمایشگاهی خاص دارای قدرت تمایز به چندین نوع سلول مختلف، مانند استیوبلاست، ادیپوسیت و کندروسیت هستند [۱، ۲ و ۴]. اخیراً ظرفیت تکوین BMSCs به رده‌های عصبی نظیر نورون، آستروسایت، الیگودندروسایت و سلول‌های شوان در محیط *In vitro* و *In vivo* گزارش شده است [۸-۱۲]. بنابراین می‌توان سلول‌های استرومایی مغز استخوان را منبع سلولی با ارزشی به‌عنوان پیوند اتوگرافت برای استفاده بالینی در زمینه ترمیم سیستم عصبی مرکزی و محیطی در نظر گرفت [۶]. یکی از نکات مهم در تحقیقات اخیر در زمینه تمایز BMSCs،

نوع روش‌های اعمال شده است. به عبارتی تمایز این سلول‌ها مخصوصاً به سلول‌های عصبی بستگی به شرایط محیط کشت و انتخاب نوع تحریک کننده و عوامل رشد یا اثرهای تنظیمی والقای انواع فاکتورهای خارجی در محیط *In vitro* دارد [۱۳].

در ضمن تحقیقات نشان داده‌اند که القا کننده‌هایی نظیر DMSO، BME، BHA و RA دارای آثار القایی تمایزی متفاوتی بوده و قادر به ایجاد شرایط خاص در محیط کشت هستند [۱۴ و ۱۵]. در این تحقیق تلاش شده تا روش یا روش‌های القایی مناسبی برای تمایز BMSCs به سلول‌های شبه نورواپیتلیال و سلول‌های شبه نوروگلیال ارایه شود.

مواد و روش‌ها

جداسازی و کشت سلول‌های BMSCs

BMSCs از استخوانهای فمور و تیبیای موش صحرایی بالغ نژاد Sprague Dawley با سن ۸-۶ هفته تهیه شده از موسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی استخراج شد. بدین ترتیب که پس از جدا کردن عضلات اتصالی، دو انتهای استخوان قطع و با محیط کشت α -MEM (Gibco, UK) کامل شده با سرم FBS ۱۵ درصد (Gibco, UK)، پنی‌سیلین ۱۰۰ IU/ml و استرپتومایسین ۱۰۰ mg/ml توسط سوزن gauge ۲۱ عمل تخلیه و Flash out مغز استخوان صورت گرفت و سلول‌ها در محیط مناسب کشت داده شدند [۲]. پس از گذشت ۲۴ ساعت محیط کشت سلولی با محیط تازه تعویض شد. سلول‌های استرومایی چسبیده به کف فلاسک باقی مانده و سلول‌های خونی شناور حذف شدند. هنگامی که تراکم سلول‌های چسبیده به کف فلاسک به ۷۰ تا ۸۰ درصد رسید، پاساژ داده شدند. پاساژ سلول‌ها توسط تریپسین ۰/۲۵ درصد (Merck, Germany) و اتیلن دی‌آمین تترا استیک اسید (EDTA) ۰/۰۴ درصد (Applichem, Germany) انجام و این عمل

سلول‌ها با PBS سه بار و هر بار ۵ دقیقه انجام شد. نمونه‌ها در معرض مخلوط سرم بز ۱۰ درصد و Triton X-100 ۰/۳ درصد به مدت یک ساعت قرار داده شد. پس از رقیق نمودن ۱:۱۰۰ آنتی‌بادی‌های اولیه Nestin، NF68، Fbronectin، O4 و GFAP (۱:۸۰۰) که همه از نوع موشی بودند (همه از Chemicon)، هر کدام به‌طور مجزا روی یک لامل ریخته شد. به منظور جلوگیری از خشک شدن آنتی‌بادی، نمونه‌ها با یک قطعه پارافیلیم پوشیده شده و در داخل پتری دیش مرطوب قرار گرفته و به مدت یک شب در درجه حرارت ۴ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. لامل‌ها پس از انجام شستشو با PBS مانند قبل مدت دو ساعت در دمای محیط در معرض آنتی‌بادی ثانویه ضد موشی (۱:۲۰۰) کونژوگ به FITC قرار گرفت. سپس شستشو با PBS انجام شد. نمونه‌ها توسط میکروسکوپ فلورسانس ZEISS بررسی شد. میزان شدت نور فلئورسانس مشاهده شده توسط فرد آزمایش کننده در مقایسه با میزان پشت زمینه ایجاد شده معیار مثبت یا منفی بودن سلول است. برای شمارش سلول‌ها از اتیدیوم بروماید ۰/۰۱ درصد به مدت یک دقیقه استفاده و شستشو توسط PBS انجام شد. در پایان هر لامل به‌طور معکوس توسط بافر گلیسرول روی لام قرار گرفت. نحوه شمارش بدین ترتیب بود که از هر ۲۰۰ سلول شمارش شده در مناطق مختلف لامل تعداد سلول‌های ایمونوپوزیتیو مشخص هر گروه ثبت شد. این کار روی پنج لامل در یک وهله آزمایش انجام و در مجموع آزمایش پنج بار تکرار شد.

RT-PCR نیمه کمی

سلول‌های تحت تمایز گروه‌های مختلف و نیز سلول‌های BMSCs تمایز نیافته به‌صورت جداگانه از کف فلاسک‌های کشت با محلول تریپسین و EDTA جدا شده و پس از سانتریفیوژ، مایع رویی خارج و توده سلولی به‌دست آمده

تا چهار پاساژ ادامه یافت. در این شرایط سلول‌ها از مورفولوژی یکسانی برخوردار شدند. برای بررسی خلوص سلول‌ها و همچنین استرومایی بودن آنها از آنتی‌بادی فیبرونکتین و همچنین بیان mRNA ژن Oct-4 استفاده شد. ضمناً جهت بررسی احتمالی تمایز این سلول‌ها به سلول‌های شبه نوروگلیال بیان آنتی‌بادیهای Nestin، NF68، GFAP و O4 ارزیابی شد.

تعیین میزان حیات سلول‌ها با تریپان بلو

برای انجام آزمون Viability، حجمی از سوسپانسیون سلول‌ها به نسبت مساوی با تریپان بلو رنگ شدند. سلول‌های مرده به رنگ آبی مشخص شده که به همراه سلول‌های زنده شفاف توسط لام نیوبار به‌وسیله میکروسکوپ اینورت با بزرگنمایی ۲۰۰ شمارش شدند.

پیش القا و القای سلول‌های BMSCs

پس از تریپسینه کردن BMSCs پاساژ چهار، تعداد ۵۰۰۰ سلول در هر یک از خانه‌های پلیت ۲۴ خانه‌ای لامل گذاری شده ریخته شد. در مرحله پیش القا از BME یک میلی‌مولار، DMSO (محیط ۲ درصد) و BHA ۲۰۰ میکرومولار به‌طور مجزا روی BMSCs حاوی محیط کشت بدون سرم استفاده شد [۱۴]. پس از گذشت ۲۴ ساعت از مرحله پیش القا، شستشو با PBS و با اضافه نمودن محیط و FBS ۱۵ درصد مرحله القا توسط RA یک میکرومولار به‌مدت ۳ روز اجرا شد [۱۵]. سپس لامل‌ها برداشت شده و پس از شستشو با PBS برای انجام ایمونوسایتوشیمی آماده شد.

ایمونوسایتوشیمی سلول‌های BMSCs به

سلول‌های شبه عصبی و گلیالی

BMSCs تمایز نیافته و تمایز یافته ابتدا توسط پارافرمالدید ۴ درصد به مدت ۳۰ دقیقه تثبیت شده، سپس شستشوی

جدول ۱. پرایمرهای forward (F) و reverse (R) ژن‌های استفاده شده به همراه برخی از ویژگی‌های آن‌ها نشان داده شده است.

ژن‌ها	پرایمر (5'→3')	جفت باز	شماره شناسه	دمای اتصال
β_2M	F: CCGTGATCTTTCTGGTGCTT R: TTTTGGGCTCCTTCAGAGTG	۳۰۰	NM-012512	۵۸ °C
NeuroD	F: AAGCACCAGATGGCACTGTC R: CAGGACTTGCAATTCGATACAC	۱۹۹	XM-341822	۵۶ °C
Oct-4	F: AAGCTGCTGAAACAGAAGAGG R: ACACGGTTCTCAATGCTAGTC	۲۱۵	NM-001009178	۵۷ °C

یافته‌ها

جدا سازی و کشت سلول‌های BMSCs

بعد از چهار پاساژ BMSCs از لحاظ مورفولوژی ظاهری نسبتاً یک‌دست و یکنواخت به‌دست می‌آوردند. سلول‌ها معمولاً به دو شکل در محیط نمایان هستند، تعدادی از سلول‌ها که در حال تکثیر هستند ظاهری گرد، کروی و کوچک دارند و مابقی که اکثریت سلول‌ها را به خود اختصاص می‌دهند به شکل دوکی و شبه فیروبلستی مشخص می‌شوند. برخی از سلول‌ها به‌صورت پهن و چسبنده به کف فلاسک و از نظر اندازه بزرگتر از سایر سلول‌ها در محیط کشت دیده می‌شوند.

تعیین میزان حیات سلول‌ها با تریپان بلو

براساس viability test درصد BMSCs زنده القا نشده ۲۴ ساعت پس از پاساژ چهارم بیش از ۹۴ درصد بود که به‌صورت معنی‌داری بیش از گروه‌های القا شده بود. همچنین گروه‌های DMSO-RA و BHA-RA به‌طور معنی‌داری تعداد سلول زنده بیشتری نسبت به گروه BME-RA داشتند (شکل ۱).

برای اثبات استرومایی بودن سلول‌ها و تعیین خلوصشان آنتی‌بادی فیبرونکتین استفاده شد. شکل ۲ مربوط به این آنتی‌بادی، سلول‌ها را با سیتوپلاسم حاوی رشته‌های سبز رنگ فیبرونکتین نشان می‌دهد که برای تعیین درصد سلول‌های مثبت، هسته سلول‌ها توسط اتیدیوم بروماید به رنگ قرمز روشن رنگ شده است که 92.75 ± 3.86 درصد سلول‌ها با

برای استخراج RNA آماده شد. پس از لیز نمودن سلول‌ها به کمک محلول RNX Plus (CinaGen Inc., Tehran, Iran)، استخراج RNA انجام و DNA ژنومیک با کمک آنزیم DNase (Fermentas kit) حذف شد. سپس واکنش رونویسی معکوس با استفاده از RevertAidTM H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas) انجام شد. پس از پایان ساخت آدنوزین مونوفسفات حلقوی (cDNA) مرحله PCR برای ژن‌های جدول ۱ در حجم ۲۵ میکرولیتر با استفاده از دستورالعمل کیت سیناژن اجرا شد. واکنش در دستگاه Thermal cycler (BIO RAD) صورت گرفت. لازم به توضیح است که در هر وهله از انجام PCR یک کنترل منفی نیز به‌کار گرفته شد. میکروپیژر کنترل منفی به جای cDNA حاوی ۵ میکرولیتر آب دیونیزه استریل و پرایمرهای (β_2M) β_2 -microglobulin بود. محصول واکنش PCR روی ژل آگارز ۲ درصد الکتروفورز شد و مابقی محصول PCR در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

تجزیه و تحلیل آماری

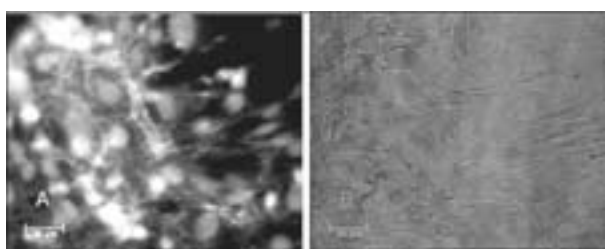
تمام مقادیر برحسب $Mean \pm SD$ ارایه شده است. اطلاعات به‌دست آمده از آزمون زنده بودن سلول‌ها و شمارش سلولی توسط روش آماری آنالیز واریانس یک طرفه (ANOVA) و آزمون TUKEY مقایسه شد. سطح معنی‌داری $P < 0.05$ در نظر گرفته شد.

جدول ۲. این جدول ارزیابی کمی از آنتی‌بادی‌های GFAP، NF68، Nestin، Fibronectin و O4 به ترتیب برای تعیین تعداد سلول‌های BMSCs، شبه Neuroepithelial، شبه نورونی، شبه آستروسایت و شبه الیگودندروسایت توسط روش ایمنوسایتوشیمی در مرحله قبل از تمایز و بعد از ایجاد تمایز توسط القا کننده‌های مختلف را نشان می‌دهد.

BME-RA	DMSO-RA	BHA-RA	BMSC	گروه‌ها
				آنتی‌بادی‌ها
$6/6 \pm 1/84^{* \dagger}$	$3/1 \pm 1/48^*$	$3/8 \pm 1/54^*$	$92/75 \pm 3/86$	Fibronectin
$62/05 \pm 6/45^{* \dagger}$	$75/03 \pm 4/63^*$	$40/1 \pm 7/46^{* \dagger}$	$0/95 \pm 0/75$	Nestin
$57/7 \pm 6/90^*$	$72 \pm 5/62^*$	$39 \pm 6/44^{* \dagger}$	$1/05 \pm 0/75$	NF68
$4/2 \pm 2/76^*$	$4/25 \pm 2/22^*$	$1/25 \pm 1/16^{* \dagger}$	0 ± 0	GFAP
$1/95 \pm 1/98^*$	$4/8 \pm 1/73^*$	$1/2 \pm 1/28^{* \dagger}$	0 ± 0	O4

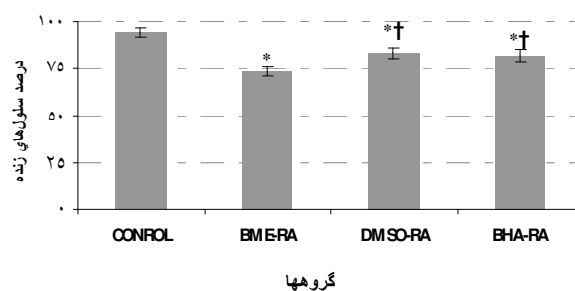
*: نشان دهنده وجود اختلاف معنی‌دار گروه‌های تمایز یافته با گروه BMSCs

†: نشان دهنده وجود اختلاف معنی‌دار گروه القا کننده DMSO-RA با دیگر گروه‌های القا کننده است.



شکل ۲. A میکروگراف مربوط به رنگ آمیزی ایمنوفلورسانس آنتی بادی آنتی Fibronectin از سلول‌های تمایز نیافته BMSCs در پایان پاساژ چهارم است نور فلورسانس مرتبط با آنتی بادی ثانویه کوئزوگه به FITC است که به رنگ سبز دیده می‌شوند. میکروگراف B نیز فازکنتراست مربوط به تصویر سمت چپ با همان میدان دید است. برای شمارش سلول‌ها از رنگ اتیدیوم بروماید استفاده شده که هسته سلول‌ها قرمز شود.

در بررسی مورفولوژی BMSCs قبل از شروع تمایز این سلول‌ها به شکل کاملاً پهن و گسترده با زواید کوتاه و هسته بیضی مسطح دارای یک تا چند هسته بود و به کف فلاسک چسبیده‌اند و دو روز پس از شروع القا جسم سلولی برجسته شده زواید و استتاله‌هایی در سلول ایجاد می‌شود که گاهی چند برابر جسم سلولی شده و با سلول‌های جانبی ارتباط برقرار می‌کند بدین ترتیب ظاهر سلول‌ها در هر سه گروه القا کننده ویژگی‌های یک سلول شبه عصبی را داشتند (شکل ۵).



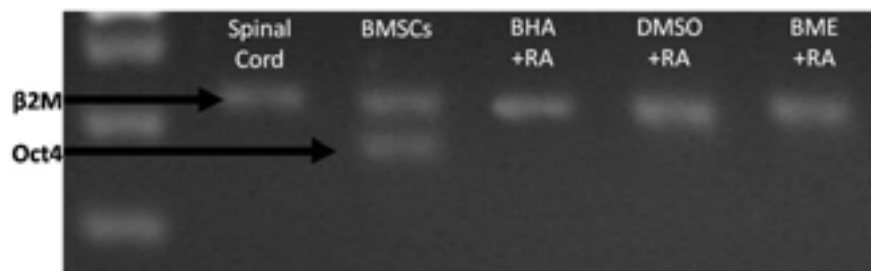
شکل ۱. مقایسه درصد سلول‌های زنده در گروه کنترل سلول‌های BMSCs بدون القا و سه گروه تحت القا را نشان می‌دهد.

*: اختلاف معنی‌دار با گروه کنترل

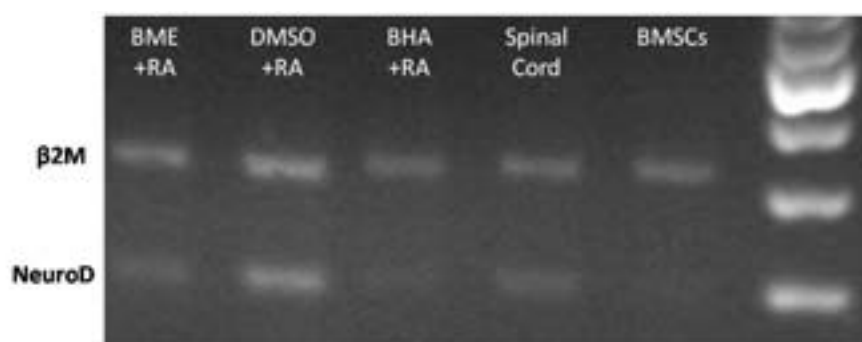
†: اختلاف معنی‌دار با گروه BME-RA

آنتی‌فیبرونکتین واکنش دادند (شکل ۲). در این مرحله بررسی ایمنوسایتوشیمی روی سلول‌های القا نشده BMSCs با استفاده از آنتی‌بادی‌های Nestin و NF68 انجام شد که به ترتیب ۰/۹۵ و ۱/۰۵ درصد بود اما آنتی‌بادی‌های GFAP و O4 بیان نشد (جدول ۲).

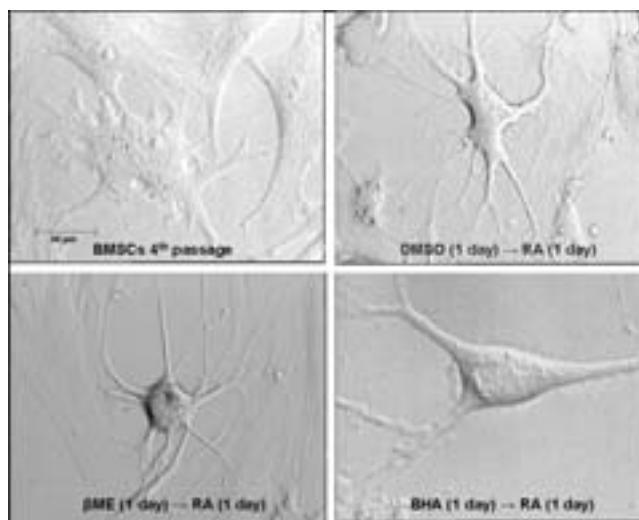
همچنین در بررسی RT-PCR این سلول‌ها (BMSCs) mRNA ژن Oct-4 به خوبی بیان شد، درحالی‌که باند مشخصی در بیان mRNA ژن NeuroD در ژل الکتروفورز مشاهده نشد (شکل‌های ۳ و ۴).



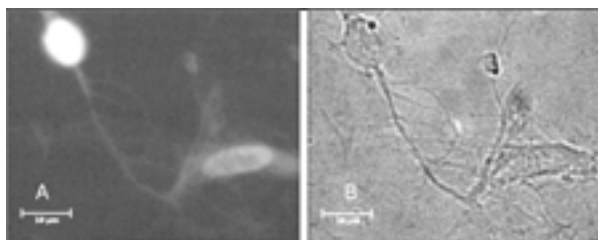
شکل ۳. الکتروفوروگرام از محصول RT-PCR حاصل از استخراج mRNA ژن Oct-4 و β_2M در گروه BMSCs پیش از القا و پس از مرحله القا در هر سه گروه القا کننده و همچنین گروه Spinal cord به عنوان گروه کنترل منفی نشان داده شده است. ژن β_2M به عنوان ژن کنترل داخلی استفاده شد. Lane سمت چپ DNA Lader را نشان می‌دهد.



شکل ۴. یک الکتروفوروگرام از محصول RT-PCR حاصل از استخراج mRNA بیان ژن NeuroD و β_2M در گروه BMSCs پیش از القا و پس از القا در هر سه گروه القا کننده و همچنین گروه Spinal cord نشان داده شده است. ژن β_2M به عنوان ژن کنترل داخلی استفاده شد. Lane سمت راست DNA Lader را نشان می‌دهد.



شکل ۵. مورفولوژی تعدادی از سلول‌های BMSCs ۲۴ ساعت پس از پاساژ چهارم (عکس سمت چپ و بالا) و دو روز پس از شروع پیش القا و القا در سه گروه القا کننده مختلف.



شکل ۷. A میکروگراف مربوط به رنگ آمیزی ایمونوفلورسانس آنتی بادی آنتی GFAP از سلول های تمایز یافته BMSCs در پایان مرحله القا است. میکروگراف B نیز فاز کنتراست مرتبط به تصویر سمت چپ با همان میدان دید است. برای شمارش سلول ها از رنگ اتیدیوم بروماید استفاده شده که هسته سلول ها قرمز شود.

از طرفی تمایز به سلول های شبه الیگودندروسایت توسط القا کننده های DMSO-RA نیز در این مرحله $1/73 \pm 4/8$ درصد بود که به میزان معنی داری بیش از دو گروه القا کننده دیگر بود (جدول ۲). لازم به ذکر است از بین سلول های در معرض تمایز در هر سه گروه القاگر کمترین بیان آنتی بادی Fibronectin در گروه DMSO-RA مشاهده شد که نسبت به گروه BME-RA معنی دار و نسبت به گروه BHA-RA معنی دار نبود.

RT-PCR نیمه کمی

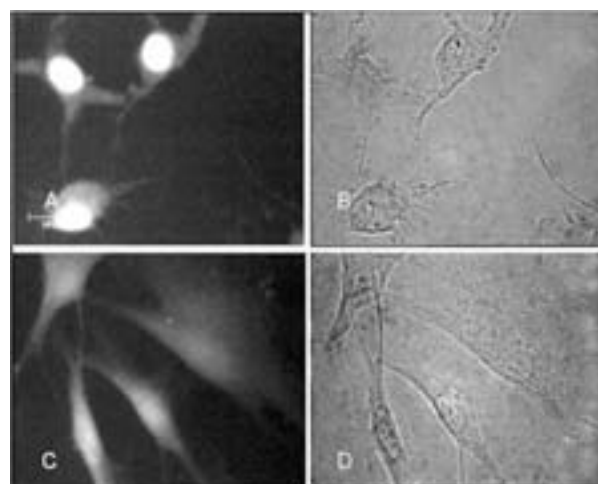
در بررسی نیمه کمی RT-PCR مشخص شد که فقط گروه DMSO-RA توانست باند مشخصی را از بیان mRNA ژن NeuroD روی ژل الکتروفورز به خوبی نشان دهد اما بیان mRNA ژن Oct-4 در این مرحله در هیچ کدام از سه گروه القا کننده مشاهده نشد (شکل های ۳ و ۴ و جدول ۳).

جدول ۳. خلاصه ای از بیان mRNA ژن های β_2M , NeuroD و Oct-4 در گروه BMSCs پیش از القا و پس از القا در هر سه گروه القا کننده و همچنین گروه Spinal cord نشان داده شده است.

گروه های آزمایش	بیان ژن	
	Oct-4	NeuroD
BMSCs	قوی	منفی
β ME-RA	منفی	ضعیف
DMSO-RA	منفی	قوی
BHA-RA	منفی	ضعیف
Spinal cord	منفی	ضعیف

ایمونوسایتو شیمی سلول های BMSCs پس از پیش القا و القا

در بررسی ایمونوسایتو شیمی سلول های BMSCs بعد از مرحله القا با آنتی بادی های Nestin، NF68، GFAP و O4 به ترتیب درصدهای متفاوتی از ایمونوپوزیتیو بودن سلول ها به وسیله میکروسکوپ فلئورسنت تشخیص داده شد. به منظور تعیین درصد سلول های مثبت شبه عصبی و همچنین شبه گلیالی شمارش سلولی صورت گرفت. بیان قابل توجه نشانگر Nestin و NF68 توسط القا کننده های DMSO و RA در پایان مراحل پیش القا و القا به طور معنی داری درصد سلول های شبه نورو اپیتلیال ($4/63 \pm 75/03$) و شبه نورونی ($5/62 \pm 72$) بیشتری را نسبت به القا کننده های دیگر ایجاد کرد (جدول ۲ و شکل ۶). در حالی که میزان تمایز به سلول های شبه آستروسایت توسط القا کننده های DMSO-RA و BME-RA در این مرحله بسیار کم و فقط به ترتیب $2/22 \pm 4/25$ و $2/76 \pm 4/2$ درصد بود که هر دو به طور معنی داری بیشتر از BHA-RA بیان شدند (جدول ۲ و شکل ۷).



شکل ۶. A و C به ترتیب مربوط به رنگ آمیزی ایمونوفلورسانس آنتی - بادی های آنتی Nestin و آنتی NF68 از سلول های تمایز یافته BMSCs در پایان مرحله القا است و سلول های تمایز یافته با نور فلورسانس مرتبط با آنتی بادی ثانویه کونژوگه به FITC است که به رنگ سبز دیده می شوند. میکروگراف های B و D نیز به ترتیب فاز کنتراست مربوط به هر کدام از تصاویر سمت چپ با همان میدان دید است. برای شمارش سلول ها از رنگ اتیدیوم بروماید استفاده شده که هسته سلول ها قرمز شود.

بحث

استفاده بالینی از BMSCs برای پیوند درمانی دارای مزایای متعددی است. کاربرد BMSCs مزایای بیشتری نسبت به سلول‌های بنیادی عصبی و سلول‌های بنیادی جنینی دارد، به عنوان مثال نداشتن مشکل اخلاقی، ایمنی و عدم رد پیوند و تهیه آسان از جمله مزیت‌های به کارگیری این سلول‌هاست [۱۶]. در ضمن داروها و القاکننده‌های BME، DMSO، BHA و RA دارای آثار القایی تمایزی متفاوتی بوده و قادر به ایجاد شرایط خاص در محیط کشت و اثر تمایزی بر روی BMSCs داشته و آن‌ها را به سمت سلول‌های شبه عصبی و شبه گلیالی پیش می‌برد [۱۴ و ۱۵]. همان‌گونه که اشاره شد BMSCs پس از استخراج و کشت در شرایط محیط آزمایشگاهی پس از چند پاساژ مورفولوژی یکسانی پیدا کرده و از سرعت تکثیر بالایی برخوردار هستند. یکی از تفاوت‌های تحقیقات انجام شده روی تمایز این سلول‌ها به سلول‌های نوروگلیال، نوع سرم استفاده شده است که احتمالاً وجود عناصر متعدد و متفاوت در سرم، می‌تواند به عنوان یک مکمل در تمایز محسوب شود. عامل دوم گزارش‌های متفاوت در تمایز BMSCs به سلول‌های شبه عصبی، تفاوت در گونه یا نژاد است [۳، ۴ و ۶]. تا کنون تمایز BMSCs به سلول‌های شبه عصبی و گلیالی در چندین گونه مثل موش صحرایی، موش کوچک و انسان نشان داده شده است. سومین و مهمترین عامل تفاوت در بین گزارش‌ها، اختلاف در استفاده از مواد و القاکننده‌های تمایز به سلول‌های شبه عصبی و گلیالی است. بعضی از این عوامل شامل ترکیبی از RA و فاکتورهای رشد، BME به اضافه BHA یا بدون فاکتورهای رشد است. تحقیقات نشان داده‌اند که عوامل متفاوت مانند سایتوکاین‌های خاص، فاکتورهای رشد، نوروتروفین‌ها و RA، القای عصبی و گلیالی مناسبی را در هر دو محیط *In vitro* و *In vivo* با استفاده از MSC باعث می‌شوند [۱۷]. یسمانچی (Rismanchi) و همکاران در محیط *In vitro* ثابت کرد که MSCs توانایی بیان مارکرهای نورونی و گلیالی را دارد [۴]. سانچز-راموس

(Sanchez-Ramos) و همکاران تأثیر RA و BDNF را بر سلول‌های MSC انسان و موش بررسی کرده و نشان دادند که این سلول‌ها می‌توانند نشانگرهای نورون‌های نابالغ را بیان کنند [۱۸]، پادووان (Padovan) نشان داد که MSCs انسان وقتی که با نوروتروفین‌ها نظیر نوروتروفین ۳ یا فاکتور نوروتروفیک مشتق از مغز (BDNF) تحریک شود. نشانگرسلول عصبی نابالغ (β -tubulin III) را بیان می‌کند [۹]. اخیراً ژانگ (Zhang) و همکاران نشان دادند که ترکیب فاکتور رشد فیبروبلاستی پایه (bFGF) با گانگلوژید ممکن است به طور فزاینده‌ای تبدیل MSCs رت بالغ را به سوی سلول شبه عصبی و شبه آستروسایت پیش برد [۱۷].

از آنجایی که درصد بیان نشانگرهای نورونی در تحقیقات فوق حدود ۱۵ الی ۴۸ درصد بود، تلاش شد تا این میزان بیان افزایش یابد.

در این تحقیق برای تعیین درصد خلوص سلول‌های استرومایی به دلیل وجود گلیکوپروتئین فیرونکتین در سلول‌های با منشأ مزانشیمی، سلول‌های BMSCs علیه این گلیکوپروتئین به روش ایمونوسایتوشیمی رنگ شد که ۹۷ درصد سلول‌ها رنگ گرفتند که این روش توسط سایر محققین نیز انجام شده است [۲ و ۱۹]. همان‌گونه که ذکر شد یکی از عوامل مهم در تمایز سلولی نوع ماده القاکننده محسوب می‌شود، در این تحقیق یکی از داروها و القاکننده‌های BHA، DMSO، BME و RA با دوزهای مشخص برای القای BMSCs استفاده شد. این دوزها در تحقیق‌های انجام شده به منظور تمایز سلول‌های بنیادی نظیر سلول‌های جنینی، عصبی، گلیال بویایی به سلول‌های نورونی و گلیالی استفاده شده است [۱۴ و ۲۰]. ثابت شده است که DMSO و BME می‌توانند در بقا و تمایز سلول‌های عصبی مغز جنین موش مؤثر باشند [۱۵]. دنگ (Deng) و همکارانش در سال ۲۰۰۱ گزارش کردند که ترکیبات افزایش‌دهنده سطح آدنوزین مونوفسفات حلقوی داخل سلولی (cAMP) نظیر isobutylmethylxanthine (IBMX) و dibutyl cAMP می‌تواند MSCs انسانی کشت شده را

تحریک کرده و مورفولوژی سلول عصبی ظاهر نماید [۱۲]. مطالعه دیگری نشان داد که استفاده از BHA موجب افزایش سطح cAMP داخل سلولی شده و این افزایش یکی از نیازهای تمایز سلول‌های عصبی در جنین را فراهم می‌کند [۱۴]. RA یکی از مشتقات ویتامین A بوده و نقشی ضروری در رشد و تکامل سلول دارد. در حقیقت این ماده در بافت‌های مختلف جنینی و بالغ حیوانات به ویژه در سیستم عصبی وجود دارد که سبب پیشرفت در تمایز عصبی می‌شود [۲۱]. در این تحقیق از چهار نوع نشانگر (Nestin ، NF68 ، O4.GFAP) برای شناسایی سلول‌های شبه عصبی و شبه گلیالی استفاده شد. Nestin متعلق به کلاس شش فیلامان‌های بینابینی بوده و بیشترین بیان را در سلول‌های نوروپیتلیال دارد و همچنین در سلول‌های نوروبلاست نیز بیان می‌شود.

نوروفیلامان ۶۸ نیز عضوی از خانواده فیلامان‌های بینابینی است که با تراکم زیاد در طول آکسون نورون‌های مهره‌داران قرار دارد. GFAP (Glial Fibrillary Acidic Protein) فیلامان بینابینی با قطر ۱۰ نانومتر است که به‌طور اختصاصی در سلول‌های آستروسایتی وجود دارد. آنتی بادی مونوکلونال O4 با آنتی‌ژن‌های متفاوتی که در زمان‌های مختلف روی سطح پروژنیوتورهای اولیگودندروسایتی بیان می‌شود واکنش می‌هد [۲۲]. اثر القایی DMSO-RA روی BMSCs در ایجاد تمایز به سلول‌های شبه عصبی به مراتب بیش از BME-RA و BHA-RA بود. توجه به ویژگی‌های مورفولوژیکی سلول‌ها نشان از دستیابی به سلول شبه عصبی با زواید مربوط است که در هر سه روش القایی دیده می‌شود. چهار روز پس از القا در تمام گروه‌های درمانی، سلول‌ها با آنتی‌بادی‌های Nestin و NF68 واکنش دادند که مورفولوژی سلول‌ها و شدت نور فلئورسانس مشاهده شده گویای تمایز شبه عصبی این سلول‌ها بود و این میزان واکنش در DMSO-RA بیش از دو گروه دیگر بود که این یافته در نوع خود جدید است. اخیراً گزارش شده که آستروسایت‌های بالغ می‌توانند فرایند تکوین نورون (نورونیزاس) را تنظیم کرده و سلول‌های بنیادی را در

محیط آزمایشگاهی به سمت سرنوشت عصبی هدایت کنند. به دلیل نقش مهم آستروسایت‌ها در تکوین دستگاه عصبی و همچنین بلوغ سلول‌های عصبی در این تحقیق تمایز BMSCs به آستروسایت نیز بررسی شد. در بررسی ایمونوسایتوشیمی با استفاده از آنتی‌بادی GFAP مشخص شد که DMSO-RA و BME-RA بدون اختلاف معنی‌داری هر دو توانستند حدود ۴/۲ درصد از سلول‌های BMSCs را به آستروسایت تمایز دهند اما BHA-RA فقط ۱/۲ درصد از این تمایز را ایجاد کرد که علت را شاید بتوان با بررسی تغییرات در سطح سلولی و ملکولی جستجو کرد. وودبوری (Woodbury) و همکاران با اضافه نمودن BME در محیط کشت MSCs رت بالغ متوجه شدند این سلول‌ها به سرعت به سلول‌های شبه نورونی تمایز یافتند ولی به سلول‌های گلیالی تمایز نیافتند [۲۳]. اما نتایج بررسی تمایز BMSCs به سلول‌های گلیالی اولیگودندروسایت نشان دهنده واکنش مثبت سلول‌های القا شده به آنتی بادی O4 بود که در (۴/۸ درصد) DMSO-RA به میزان معنی‌داری بیش از (۱/۹ درصد) BME-RA و (۱/۲ درصد) BHA-RA بود. این بیان نه چندان زیاد را شاید بتوان به اثر DMSO نسبت داد که بررسی بیشتری نیاز دارد.

نتایج به دست آمده در این تحقیق گویای این است که با استفاده از القا کننده‌های مختلف از جمله DMSO-RA با پروتکل مشخص می‌توان در شرایط محیط کشت سلول‌های استرومایی مغز استخوان موش صحرایی را اغلب به سمت سلول‌های شبه نوروپیتلیال، شبه عصبی و با درصد بسیار کمتر به شبه گلیالی تمایز داد.

تقدیر و تشکر

از مرکز علوم اعصاب بیمارستان خاتم الانبیا بابت پرداخت هزینه مواد و استفاده از میکروسکوپ فلورسنت و همچنین مسئولان محترم دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله (عج) که شرایط تحصیل اینجانب را فراهم نمودند، تقدیر و تشکر می‌شود.

References

1. **Wislet-Gendebien S, Wautier F, Leprince P, Rogister B.** Astrocytic and neuronal fate of mesenchymal stem cells expressing nestin. *Brain Res Bulletin* 2005; 1.2: 31-8.
2. **Zhao L, Duan W.** Human bone marrow stem cells exhibit neural phenotypes and ameliorate neurological deficits after grafting into the ischemic brain of rats. *Exp Neurol* 2002; 174: 11-20.
3. **Garcia R, Aguiar J, Alberti E, Cuetara K, Pavon N.** Bone marrow stromal cells produce nerve growth factor and glial cell line – derived neurotrophic factors. *BBRC* 2004 ; 316 (3): 753-4.
4. **Rismanchi N.** Floyd CL, Berman RF, Lyeth BG. Cell death and long term maintenance of rat bone marrow stromal cells:a comparison of protocols. *Brain Res*, 2003; 991: 46-55.
5. **Tuszynski MH, Lu P, Blesch A.** Induction of bone marrow stromal cells to neurons: Differentiation, Transdifferentiation, or Artifact? *J Neurosci Res* 2004; 77: 174-91.
6. **Stewart R, Przyborski S.** Non- neural adult stem cells: tools for brain repair. *Bio Essays* 2002; 24: 708-13.
7. **Javazon EH, Colter DC.** Rat marrow stromal cells are more sensitive to plating density and expand more rapidly from single – cell–derived colonies than human marrow stromal cells. *Stem Cell* 2001; 19: 219-25.
8. **Lee JB, Kuroda S, Shichinohe H, Yano S, Kobayashi H, Hida K, et al.** A pre- clinical assessment model of rat autogenic bone marrow stromal cell transplantation into the central nervous system. *Brain Res Protocol* 2004; 14: 37-44.
9. **Padovan CS, Jahn K, Birnbaum T, Reich P, Sostak P, Strupp M, et al.** Expression of neuronal markers in differentiated marrow stromal cells and CD133+ stem-like cells. *Cell Transplant* 2003; 12: 839-48.
10. **Bossolasco P, Cova L, Calzarossa C, Rimoldi SG, Borsotti C, Lambertenghi Delilieri G, et al.** Neuro-glial differentiation of human bone marrow stem cells in vitro. *Exp Neurol* 2005; 193: 312-25.
11. **Brazelton, TR, Rossi FMV, Keshet GI, Blau HM.** From marrow to brain: expression of neuronal phenotypes in adult mice. *Science* 2000; 290: 1775-9.
12. **Deng W, Obrocka M, Fischer I, Prockop DJ.** In vitro differentiation of human marrow stromal cells into early progenitors of neural cells by conditions that increase intracellular cyclic AMP, *Biochem. Biophys Res Commun* 2001; 282: 148-52.
13. **Gritti A, Vescovi AL.** Adult neural stem cells: plasticity and developmental potential, *J physiol* 2002 ; 96: 81-90.
14. **Keilhoff G, Goihi A, Langnase K, Fansa H, Wolf G.** Transdifferentiation of mesenchymal stem cells into Schwann cell-like myelinating cells. *Europ J Cell Biol* 2006; 85: 11-24.
15. **Woodbury D, Schwarz EJ, Prockop DJ, Black IB.** Adult Rat and Human Bone Marrow Stromal Cells Differentiate into Neurons. *J Neurosci Res* 2000; 61: 364-70.
16. **Suzuki H, Taguchi T, Tanaka H, Kataoka H, Li Z, Muramatsu K, et al.** Neurospheres induced from bone marrow stromal cells are multipotent for differentiation into neuron, astrocyte, and oligodendrocyte phenotypes. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; 322: 918-22.
17. **Zhang H, Wang JZ, Sun HY, Zhang JN, Yang SY.** The effects of GM1 and bFGF synergistically inducing adult rat bone marrow stromal cells to form neural progenitor cells and their differentiation. *Chin J Traumatol* 2004; 7: 3-6.
18. **Sanchez- Ramos JR.** Neural cells derived from adult bone marrow and umbilical cord blood. *J Neurosci Res* 2002; 69: 880-93.
19. **Azizi SA, Stokes D, Augelli BJ, Digirolamo C, Prockop DJ.** Engraftment and migration of human bone marrow stromal cells implanted in the brains

- of albino rats – similarities to astrocyte grafts. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 3908-13.
20. **Esmacili F.** Evaluation of gene neurotrophic Factors by deprenile in embryonic stem cells after in vitro differentiation into neuroepithelium. Ph.D. Thesis, Tarbiat modares university Faculty medicine 1383. (Persian)
 21. **Takahashi J, Palmer TD, Gage FH.** Retinoic acid and neurotrophins collaborate to regulate neurogenesis in adult-derived neural stem cell cultures. *J Neurobiol* 1999; 38: 65-81.
 22. **Albert B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Robert K, Walter P.** *Molecular biology of the cell*, 4th ed, Garland science, 2001, pp 926-1125.
 23. **Woodbury D, Schwarz Emily J, Ira B.** Adult Rat and human bone marrow stromal stem cells differentiate into neurons. *J Neurosci Res* 2002; 61: 364-70.