تمایز سلول‌های بنیادی اندومتر رحم به سلول‌های عصبی با استفاده از مولکول کوچک LY294002

هما محسنی کوچصفهانی [۱*](Ph.D)، سمیه ابراهیمی باروق [۲](Ph.D)، جعفر آی [۲](Ph.D)، حمیده عنبر [۳](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

سابقه و هدف: سلول‌های بنیادی اندومتریال، برای اولین بار در سال ۲۰۰۴ شناسایی شدند. این سلول‌ها قادر به خودتجدیدی گسترده و دارای پتانسیل تمایز به غضروف، استخوان، چربی، نورون و الیگودندروسیت می‌باشند. مسیر سیگنالینگ PI3K/Akt در عمل‌کردهای متعدد سلولی از جمله تمایز، بقاء و مرگ سلولی نقش دارد و مهار آن می‌تواند منجر به تمایز سلولی شود. هدف از این مطالعه بررسی تمایز سلول‌های بنیادی اندومتریال به سلول‌های عصبی با استفاده از مهار مسیر PI3K/Akt توسط ریز مولکول Ly294002 می‌باشد.

مواد و روش‌ها: بافت اندومتریال رحم بیماران به‌طور آنزیمی تیمار شد و سلول‌های تفکیک شده در محیط کشت DMEM/F۱۲ حاوی ۱۰٪ FBS کشت داده شدند. بعد از پاساژ سوم سلول‌ها برای اثبات بنیادی بودن با مارکرهای CD105, CD90, CD146, CD31 و CD34 مورد آنالیز با فلوسایتومتری قرار گرفتند. سپس قدرت تمایز عصبی سلول‌ها در شرایط تمایزی، به مدت ۲۱ روز مورد بررسی قرار گرفت. به منظور بررسی میزان بیان مارکرهای اختصاصی سلول‌های بنیادی عصبی از روش‌های ایمونوسیتوشیمی وتکنیک Real-time PCR استفاده گردید.

یافته‌ها: نتایج فلوسایتومتری نشان داد که سلول‌ها نسبت به CD105, CD90, CD146 مثبت و نسبت به CD31 و CD34 منفی می‌باشند. بررسی‌های ایمنوسیتوشیمی نشان‌دهنده بیان مارکرهای عصبی NF و Chat در سلول‌های تیمار شده با ریز مولکول Ly294002 بود. بررسی‌های حاصل از Real-time PCR نیز نشان‌دهنده بیان مارکرهای NF و Chat در سطح mRNA بود.

نتیجه‌گیری: این مطالعه نشان داد که سلول‌های بنیادی آندومتر رحم توانایی تمایز به سلول عصبی را در شرایط تمایزی مناسب دارا می‌باشند و استفاده از ریز مولکول Ly294002 می‌تواند با مهار مسیر PI3K/Akt باعث مهار تکثیر سلولی و القا تمایز سلولی شود.

واژه‌های کلیدی: اندومتر، تمایز سلول، سلول های بنیادی، سلول های 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

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۹۱۲۳۸۴۴۸۷۴

Email: kouchesfehani@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۹/۱۲ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۵/۲/۲۶

استخوان، کبد، شبکیه 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 به‌دست آمدند. سلول‌های بنیادی مزانشیمی پلاستیسیته رشد بالایی دارند و می‌توانند به انواع بافت‌ها شامل استخوان، چربی، غضروف، عضله، تاندون [۷]، استرومای مغز [۸]، اپیتلیوم و پروژنیتورهای 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، پریوستئوم، عضله، پوست، غشاء سینوویال، سیستم عصبی، ژل وارتون 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 اندومتریال 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 [۱۲،۱۴]. 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]. فسفاتیدیل 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 ۴و۵ دی‌فسفات (PIP2) را فسفریله کرده و آن را به، فسفاتیدیل اینوزیتول۳ و۴ و۵ تری‌فسفات (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 به طور 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 پروتوکل‌های مختلف استفاده می‌شوند.

توانایی آن‌ها در عمل سریع، القاء بیان ژن‌های تکاملی حیات و نیز امکان حذف آسان از سیستم کشت، از مزایای کاربرد ریزمولکول‌ها در تنظیمات بیولوژیکی و کلینیکی است [۱۹-۲۳]. در حدود سال ۱۹۹۴ محققان ریز مولکول Ly294002 را به عنوان یک ترکیب مصنوعی تولید کردند که به طور گسترده‌ای به عنوان ابزار دارویی درگیر در مسیر PI3K، در سیستم‌های مختلف زیستی استفاده می‌شود [۱۵،۲۴]. این ریزمولکول از Flavonoid querectin، مشتق شده است و قادر به مهار همه‌ی PI3Kها می‌باشد [۱۶،۲۵]. Ly294002 یک ترکیب مصنوعی و یک ریز مولکول است که به عنوان مهارکننده خاص مسیر سیگنالینگ PI3K/Akt شناخته شده است. تحقیقات اخیر نشان داده است که این ماده تمایزی، تکثیر را مهار کرده و تمایز عصبی سلول‌های بنیادی مزانشیمی را بعد از انکوبه کردن آن‌ها با Ly294002 ترویج می‌کند [۱۵]. از آن‌جایی که گزارشات محدودی، مبنی بر اثر این ریز مولکول بر تمایز عصبی سلول‌های بنیادی مزانشیمی ارائه شده است و گزارشی در مورد اثر آن بر روی تمایز عصبی سلول‌های بنیادی آندومتر رحم انسان ارائه نشده است، لذا بر آن شدیم تا بعد از جداسازی و کشت سلول‌های بنیادی آندومتر رحم، اثر این ریزمولکول را بر تمایز عصبی سلول‌های بنیادی آندومتر رحم که به‌واسطه اثر مهاری آن بر مسیر سیگنالینگ PI3K/Akt صورت می‌گیرد، مورد مطالعه قرار دهیم.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه تجربی از مواد شیمیایی زیر استفاده شد:

DMEM/F12 (Dulbecco's Modified Eagle's F12 Medium, Gibco12500062,USA), FBS (Fetal Bovine Serum, Gibco 10270-106,USA), Pen/strep (15070-063 GIBCO,USA 100U/ml), Trypsin/EDTA 0.025% (Gibco, 25300,USA), Hanks (Sigma, USA), PBS Buffer (Gibco, USA), Collagenase I (sigma, USA), Ficol (sigma, USA), DMSO Solution (Sigma, USA), FGF2 (Gibco, USA), N2 (Gibco, 17502048,USA), B27 (Sigma, USA), IBMXI (Sigma, USA), BDNF (Sigma, USA), RA (Sigma, USA), Chat (Abcam, 37390,USA), NF (Abcam, USA), Paraformaldehyde (sigma, 16500,USA), Triton X100 (Sigma,9002-93-1,USA), Tween20 (Sigma, USA), DAPI (Sigma, USA), 2mercaptoethanol (Sigma, USA), ly294002 (Sigma, USA). CD31, CD34, CD105, CD90, CD146 (Abcam, USA)

جداسازی سلول‌های بنیادی اندومتریال رحم و فلوسایتومتری. در این مطالعه، ابتدا نمونه بافت اندومتر از رحم بیماران هیسترکتومی شده که در گروه سنی باروری قرار داشتند و از قبل نیز هیچ داروی هورمونی خاصی استفاده نکرده بودند، با کسب رضایت‌نامه که مطابق دستورالعمل دانشگاه علوم پزشکی تهران آماده شده بود از فرد اهداکننده به‌دست آمد. تکه‌های بافت آندومتر در مایع Hanks قرار گرفتند و سپس به آزمایشگاه کشت سلولی منتقل شده و توسط بافر فسفات سالین PBS حاوی آنتی‌بیوتیک (پنیسیلین، استرپتومایسین ۱٪) شستشو داده شدند. سپس به منظور هضم بافتی، نمونه‌ها در محلول کلاژناز نوع I با غلظت ۲ mg/ml به مدت ۲ ساعت در انکوباتور با دمای ۳۷°c و ۵٪ CO2 نگه داشته شدند. پس از این مرحله، برای حذف تکه‌های بافتی هضم نشده و ناخالصی‌های موجود، فیلتراسیون توسط فیلترهای ۷۰ µm و ۴۰ µm انجام شد. سپس از فایکول برای حذف سلول‌های تک هسته‌ای استفاده گردید. سلول‌های جدا شده به محیط کشت DMEM/F12 حاوی ۱۵٪ سرم و پنی‌سیلین- استرپتومایسین منتقل شدند. بعد از این‌که سلول‌ها، سطح ظرف کشت را به صورت یک لایه پوشش دادند، پاساژ اول با استفاده از Trypsin-EDTA انجام شد. بعد از سومین پاساژ سلول‌ها از نظر ویژگی‌های تمایزی و مارکرهای سطح سلولی مورد بررسی قرار گرفتند. به منظور شناسایی سلول‌های بنیادی اندومتریال رحم از روش فلوسیتومتری برای مارکرهای مزانشیمی CD105, CD90, CD146 و CD31 به عنوان مارکر سلول‌های اندوتلیالی و CD34 مارکر سلول‌های هماتوپوئیتیک استفاده شد. فلوسایتومتری برای آنتی‌ژن‌های اختصاصی سلول‌های اندومتریال به صورت زیر انجام شد. البته لازم به ذکر است این آنتی‌ژن‌ها جزء آنتی‌ژن‌های سطح سلولی می‌باشند. ابتدا حدود یک میلیون سلول با لام نئوبار شمارش شد و سپس با محلول شستشوی مخصوص فلوسایتومتری شامل PBS و سرم ۱٪ به مدت ۳۰ دقیقه با

پارافرمالدئید ٪۴ فیکس شدند. در مرحله بعد ۱۰ میکرولیتر از آنتی‌بادی‌های مورد نظر که شامل CD105, CD90, CD146, CD31و CD34 و به‌صورت 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 توان تمایزی سلول‌های بنیادی اندومتریال رحم به سلول‌های عصبی. سلول‌ها بعد از پاساژ سوم برای بررسی توان تمایزی به سلول‌های عصبی آماده شدند. برای تمایز به سلول‌های عصبی، سلول‌های بنیادی اندومتریال با غلظت ۵×۱۰^{۴}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، IBMXI (۲۵۰mM)، B27(٪۲) ،FGF2 (۱۰ng/ml) 2ME (۲۵۰mM) ، 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، B27 (٪۰/۲) و Ly294002 (۱ mM) بود، به مدت ۳ روز دیگر تعویض گردید. بعد از این دوره، محیط تمایزی سوم شامل DMEM/F12، RA (۱ µM) و Ly294002 (۱ µM) به مدت یک هفته به سلول‌ها اضافه گردید. بعد از این مدت، سلول‌ها در محیط تمایزی چهارم که حاوی DMEM/F12، B27 (٪۰/۲) و BDNF (۱۰ng/ml) روز قرار گرفتند. سپس سلول‌ها برای بررسی ایمنوسیتوشیمی مارکرهای Chat و Nf، با پارافرمالدئید ۴٪ فیکس شدند.

تست ICC یا ایمنوسیتوشیمی. سلول‌ها با محلول پارافرمالدئید ۴٪ به مدت ۱۰ دقیقه تثبیت شدند. سپس با محلول تریتون x۱۰۰، ۰/۲٪ به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق 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 اوّلیه 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 اوّلیه اضافه گردید و به‌مدّت 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 وNF، تکنیکReal time-PCR انجام شد (جدول ۱). بدین منظور استخراج RNA از سلول‌ها با کیت RNeasy Plus Mini (Qiagen) KIT انجام گردید. سپس cDNA مورد نظر از روی RNA استخراج شده با استفاده از کیت First strand cDNA Synthesis kit Fermentas به‌دست آمد و در نهایت cDNA ساخته شده از نظر بیان ژن‌های NF و Chat 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<۰/۰۵) به عنوان داده‌های معنی‌دار گزارش گردید

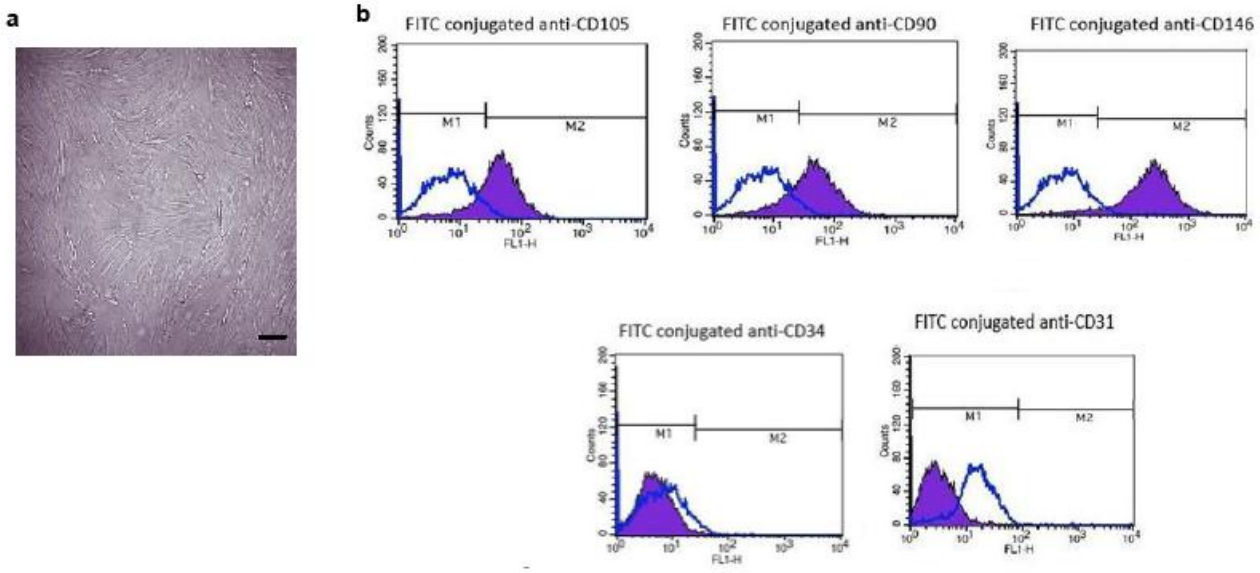
نتایج

نتایج مربوط به جداسازی سلول‌های بنیادی اندومتریال رحم و آنالیزهای فلوسایتومتری. از آن‌جایی که سلول‌های بنیادی، درصد کمی از جمعیت سلول‌های اندومتریال انسان را

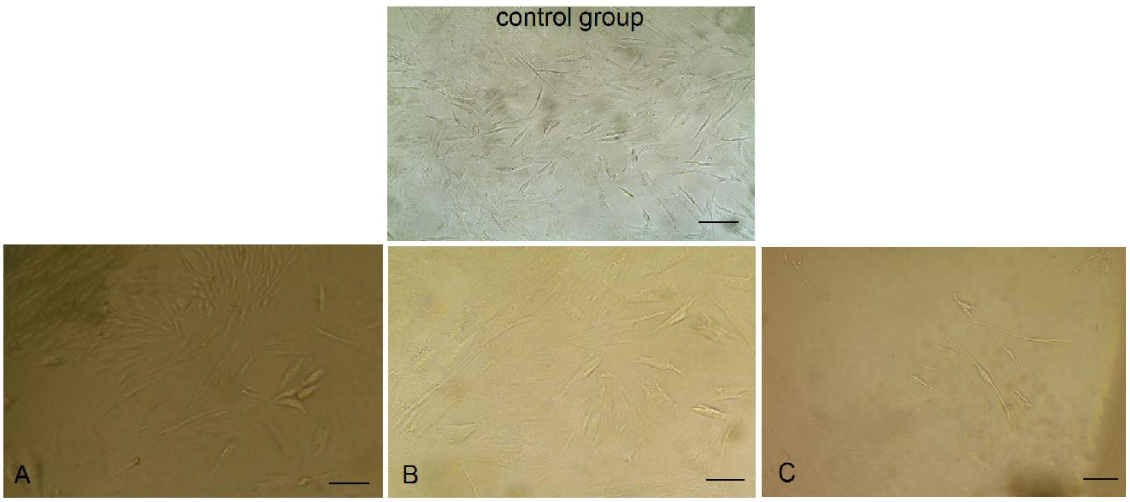
تشکیل می‌دهند لذا این سلول‌ها در کشت‌های اوّلیه به صورت جمعیت ناخالص بوده و سلول‌های اندوتلیال و خونی نیز همراه آن‌ها وجود دارند، اما در پاساژهای بعدی به صورت خالص در می‌آیند. سلول‌های اندومتریال، در کلونی‌های خالص از لحاظ مورفولوژیکی شبیه به سلول‌های فیبروبلاستی ودوکی شکل می‌باشند (شکل a1). نتایج فلوسایتومتری 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 b۱).

نتایج مربوط به تمایز سلول‌های بنیادی اندومتریال رحم 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 طو ل هفته‌ی اوّل، سلول‌های تیمار شده شروع به کشیده شدن کردند و حالت دوقطبی پیدا کردند. در هفته‌ی 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 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.

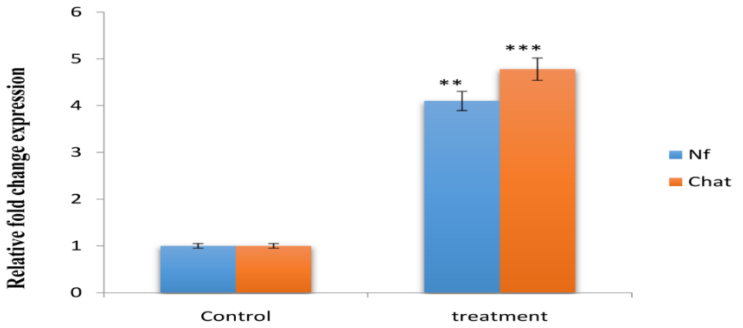
نتایج مربوط به بیان مارکرهای عصبی در سلول‌های تمایز یافته. برای بررسی میزان تمایز، بیان مارکرهای تمایزی سلول‌های عصبی حرکتی شامل NF و Chat ابتدا در سطح mRNA با روش Real time-PCR مورد بررسی قرار گرفت. نتایج حاصل از Real time-PCR نشان‌دهنده افزایش بیان مارکرهای عصبی NF و Chat، بعد از تمایز عصبی hEnSCs 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 ترنسفراز) و Nf (نوروفیلامنت) در سلول‌های تمایز یافته بود. همان‌طور که در شکل ۴ دیده می‌شود تعداد زیادی از سلول‌های تمایزیافته مارکرهای عصبی را بیان کردند که به رنگ سبز دیده می‌شود.



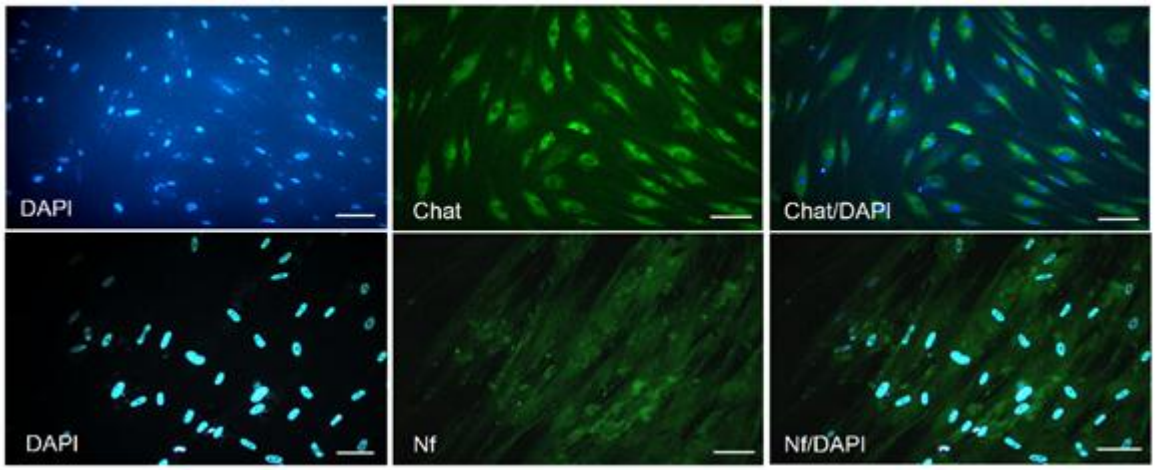
شکل ۱. a) فتومیکروگراف از ظاهر مورفولوژیکی سلول های بنیادی اندومتریال، بعد از پاساژ سوم که سلولها دارای ظاهر دوکی شکل هستند و شبیه سلول های فیبروبلاستی میباشند.(Scale bar: 100µm) b) آنالیز فلوسایتومتری نشان دهنده بیان مثبت مارکرهای CD105,CD90,CD146 و بیان منفی مارکرهای CD34 و CD31 در سلول های بنیادی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



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 Chat و Nf در سلول های عصبی تمایز یافته، نسبت به سلولهای گروه کنترل می باشد. آنالیز آماری میزان معنی 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 اندومتریال بعد از ۱۹ روز تیمار. نتایج نشان داد که سلول های اندومتریال 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 نتیجه‌گیری

سلول‌های بنیادی اندومتریال 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 [۱۳،۱۲]. در مطالعه حاضر، با استفاده از ریزمولکول Ly294002 و با توجه به اثر مهاری 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 می کند [۲۵]. در این مطالعه، علاوه بر بررسی مارکرهای سطحی مربوط به سلول‌های بنیادی اندومتریال 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 اندومتریال رحم انسان، مارکرهای سطحی مزانشیمی CD105، CD90 و نیز مارکر اصلی سلول‌های بنیادی اندومتریال 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 اوّلین 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 اندومتریال رحم و دسترسی آسان به آن‌ها و نیز از دست نرفتن 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 کاریوتیپ نرمالی دارند و نیز سرعت تکثیر بالاتری نسبت به سلول‌های بنیادی مغز استخوان دارند. تلاش برای تمایز سلول‌های بنیادی اندومتریال به سلول‌های عصبی برای اوّلین 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 [۳۵،۱۲]. ابراهیمی و همکاران نیز در سال ۲۰۱۲، علاوه بر این فاکتورهای القایی، از محیط ترشّحی (Condition media) مربوط به سلول‌های نوروبلاستومای 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 آپوپتوز را نیز تحت تاثیر قرار می‌دهند [۲۳]. مطالعات Wang و همکاران در سال ۲۰۱۲ نشان داد که وقتی سلول‌های بنیادی مزانشیمی به مدّت 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 اندومتریال رحم شود. نتایج حاصل از تست فلوسایتومتری نشان داد که سلول‌های اندومتریال رحم، مارکر CD146 را که مارکر سطحی اندومتریال 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 [۳۵،۱۲]. نتایج تحقیق حاضر نشان داد که سلول‌های‌عصبی حاصل از تمایز hEnSCs، مارکرهای سطحی Chat و NF را در هر دو سطح پروتئین و mRNA در مقایسه

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 اندومتریال رحم انسان، بعد از تمایز به سلول عصبی، مارکر Chat را در سطح mRNA بیان کرده اند. از آن‌جایی که آن‌ها در این آزمایش، از Shh در محیط تمایزی استفاده کرده‌اند میزان بیان بالاتری از مارکر Chat را شاهد بوده‌اند. با توجّه 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 توجّه 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 اندومتریال را تحت شرایط مناسب پیش ببرد و می‌توان از این ریزمولکول که دارای هزینه پایین‌تری نسبت به فاکتورهای تمایزی می‌باشد برای تمایز استفاده نمود.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله از گروه علوم جانوری دانشگاه خوارزمی وگروه 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] Lakshmipathy 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 Dermatologi 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, Kouchesfehani 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.

[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 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.

Endometrial stem cells differentiation into neural cells by LY294002 small molecule

Homa Mohseni Kouchesfehani (Ph.D)[*1], Somaye Ebrahimi-Barough (Ph.D)[2], Jafar Ai (Ph.D)[2], Hamideh Anbar (M.Sc)[3]

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 perfomed 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

kouchesfehani@yahoo.com