بیان فاکتورهای نوروتروفیک و ژن‌های دوپامینرژیک در سلول‌های بنیادی مزانشیمی قبل و پس از تیمار توسط دی‌متیل سولفوکساید

محمدتقی قربانیان *(Ph.D)، تقی لشکربلوکی (Ph.D)، مریم حاجی‌قاسم کاشانی (Ph.D)، لیلی حسین‌پور (M.Sc)
دانشگاه دامغان، دانشکده زیست‌شناسی، گروه سلولی و مولکولی و پژوهشکده علوم زیستی

چکیده

سابقه و هدف: عوامل نوروتروفیک نقش مهمی در تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی (Mesenchymal stem cells, MSCs) به سلول‌های عصبی دوپامینرژیک ایفا می‌کنند. هدف این تحقیق بررسی بیان فاکتورهای نوروتروفیک BDNF, NGF, CNTF, GDNF, NT3, NT5 و برخی از ژن‌های دوپامینرژیک مانند تیروزین هیدروکسلاز در MSCs قبل و پس از تیمار توسط دمسو(Dimethyl sulfoxide, DMSO) است.

مواد و روش‌ها: MSCs از مغز استخوان‌های فمور و تیبیای موش صحرایی بالغ جدا و در محیط α-MEM کامل شده با سرم کشت داده شدند. سلول‌های پاساژ چهارم در دو محیط کشت داده شدند: ١- محیط α-MEM کامل شده با سرم ١٠ درصد ٢- سلول‌هایی که در محیط α-MEM حاوی ٢ درصد DMSO نگه‌داری شدند. هویت و میزان خلوص سلول‌ها به روش ایمنوسیتوشیمی و بیان ژن‌ها به روش RT-PCR مورد ارزیابی قرار گرفت.

یافته‌ها: نتایج نشان داد که MSCs به رنگ‌آمیزی آلکالین فسفاتاز، آنتی‌فیبرونکتین و آنتی CD90 پاسخ مثبت دادند. نتایج RT-PCR نشان داد که عوامل نوروتروفیک و برخی از ژن‌های دوپامینرژیک در هر دو گروه بیان شدند. مقایسه نیمه کمی بیان ژن‌های نوروتروفیک و دوپامینرژیک در این دو گروه نشان داد که شدت بیان برخی از ژن‌ها نوروتروفیک (BDNF, NGF, CNTF, GDNF) در MSCs تیمار نشده به طور معنی‌داری بیش‌تر از MSCs تیمار شده با DMSO است (P≤٠/٠٥).

نتیجه‌گیری: سلول‌های بنیادی مزانشیمی با بیان عوامل نوروتروفیک و برخی از ژن‌های دوپامینرژیک، می‌توانند برای درمان بیماری پارکینسون مورد استفاده قرار گیرند.

واژه‌های کلیدی: سلول‌های بنیادی مزانشیمی، دی‌متیل سولفوکساید، عوامل نوروتروفیک، ژن‌های دوپامینرژیک

مقدمه

امروزه فناوری سلول‌های بنیادی و قابلیت تمایز آن‌ها به انواع سلول‌های بالغ و هم‌چنین استفاده از آن‌ها برای درمان بیماری‌ها به طور روزافزونی در حال پیش‌رفت بوده که امیدواری‌هایی را برای ایجاد روش‌های مبتنی بر سلول درمانی به عنوان یک روش مناسب ایجاد نموده است [٢،١]. به علت مشکلات تهیه سلول‌های بنیادی عصبی بزرگ‌سال و مشکلات اخلاقی کاربرد سلول‌های بنیادی جنینی، استفاده از سلول‌های بنیادی مزانشیمی جای‌گزین مناسب برای ترمیم سیستم عصبی است. در واقع کشت و استخراج راحت از مغز استخوان، پیوند اتولوگ، عدم نگرانی‌های اخلاقی و دست‌رس بودن این سلول‌ها به هم‌راه قابلیت خودتکثیری و توانایی تمایز به سه

* نویسنده مسئول، تلفن: ٠٩١٢٥٣١٨٧٣٢ نمابر: ٠٢٣٢-٥٢٤٧١٤٦
Email: ghorbanian@du.ac.ir

تاریخ دریافت: ١٣٩٠/٢/١٩ تاریخ پذیرش: ١٣٩١/٦/١١

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-08-04]

رده سلولی جنینی، مزیت کاربرد این سلول‌ها محسوب می‌شود [۳].

پلاستیسیتی سلول‌های بنیادی بالغ ممکن است موجب استفاده‌ی این سلول‌ها در درمان طیف وسیعی از بیماری‌ها، به‌ویژه بیماری‌های نورودژنراتیو و آسیب‌های مغزی شود. پژوهش‌های اخیر نشان می‌دهد، که عوامل نوروتروفیک نقش مهمی در تکوین و پلاستیسیته مغز دارند؛ از جمله ایجاد انشعاب در رشته‌های عصبی، سیناپتوژنز، تقویت طولانی مدت نوروترانسمیشن و افزایش آزادسازی نوروترانسمیتر [۴]. ممکن است آزادسازی عوامل تروفیک و سیتوکین‌ها توسط MSCsبر روی سلول‌های باقی‌مانده میزبانی که دچار استروک شده‌اند، موجب بهبود عمل‌کرد شود [۵-۷].

Dimethylsulfoxide (DMSO) حلالی قوی و قادر به انحلال مواد قطبی و غیر قطبی در خود است. ویژگی‌های خاص این ماده باعث شده است که کاربردهای فراوانی در شاخه‌های مختلف علوم برای آن تعریف گردد [۸]. این حلال مهم‌ترین ماده انجمادی است که در حال حاضر مورد استفاده قرار می‌گیرد [۹-۱۳]. در برخی پژوهش‌ها از DMSO به همراه سایر القاکننده‌های عصبی برای تمایز سلولی استفاده شده است [۱۵،۱۴]. هدف از این پژوهش پاسخ به این سوال است که آیا DMSO به تنهایی می‌تواند به عنوان یک القاگر عصبی استفاده گردد یا خیر؟ هم‌چنین آیا MSCs در حضور و عدم حضور DMSO قادر به بیان عوامل نوروتروفیک و ژن‌های دوپامینرژیک است؟

مواد و روش‌ها

جداسازی و کشت سلولی. MSCs از مغز استخوان‌های فمور و تیبیای موش صحرایی بالغ نژاد ویستار استخراج شد [۱۶]. سپس سلول‌ها در محیط α-MEM (Gibco) غنی شده با ۱۰ درصد FBS (Gibco) و پنی‌سیلین-استرپتومایسین (Gibco)۱ درصد در فلاسک (Falcon) ۲۵ cm^2 کشت شد و در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و CO_2 ۵ درصد و رطوبت ۹۵ درصد نگه‌داری شدند. پس از ۴۸ساعت با تعویض محیط، سلول‌های شناور از سلول‌های چسبیده به کف فلاسک جدا گردیدند. پس از رسیدن سلول‌ها به تراکم (۷۰ تا ۸۰ درصد) به کمک تریپسین ۰/۲۵ درصد به همراه EDTA ۰/۰۴درصد (Merck) از کف فلاسک جدا و با ترکم ۴×۱۰^{۵} subcultureتهیه شد. ارزیابی حیات سلولی MSCs استخراج شده از مغز استخوان به روش هموسایتومتر انجام شد (پنج بار تکرار).

تیمار سلول‌ها توسط DMSO . به منظور تیمار، سلول‌های پاساژ چهارم در فاز لگاریتمی توسط Phosphate buffered saline (PBS)شستشو داده شدند و برای مدت ۱۲ ساعت در معرض محیط حاوی ۲ درصد DMSO (بدون سرم) قرار گرفتند. پس از گذشت این زمان، محیط حاوی DMSO دور ریخته شد. سپس سلول‌ها با PBS شستشو داده و در شرایط محیط بدون سرم به مدت ۵ تا ۱۰ روز در انکوباتور نگه‌داری شده و در ادامه برای بررسی مولکولی مورد استفاده قرار گرفتند.

ایمنوسیتوشیمی. برای تعیین هویت و خلوص MSCs، سلول‌های پاساژ چهارم با تراکم ۵×۱۰^{۴} cm^2 به روی لامل آغشته به ژلاتین منتقل شدند. پس از شستشوی سلول‌ها با PBSبه مدت ۲۰ دقیقه در پارافرمالدهید ۴ درصد (Merck) ثبوت انجام شد. سپس به مدت ۱۵ دقیقه در معرض X-100 Triton ۰/۳ درصد و مدت ۱۵ دقیقه در سرم ۱۰ درصد بز قرار داده شدند. پس از آن نمونه‌ها به مدت یک شب در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد و شرایط مرطوب در معرض آنتی‌بادی اولیه آنتی‌فیبرونکتین با نسبت ۱:۱۰۰ و آنتی‌بادی آنتی CD90 به نسبت ۱:۱۱ انکوبه شدند. در ادامه نمونه ها به مدت یک ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و شرایط مرطوب به ترتیب با آنتی‌بادی ثانویه ضد گوسفند (۱:۲۰) و آنتی‌بادی ثانویه ضد موش (۱:۱۰۰) در تاریکی انکوبه شدند. در پایان نمونه‌ها با میکروسکوپ فلورسنت (Eclipse-E600 Nikon) و دوربین دیجیتال (DXM 1200 Nikon Digital Camera)مطالعه و عکس‌برداری شدند. برای آزمودن درستی روش کار با حذف آنتی‌بادی اولیه، واکنش مثبت کاذب کنترل

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-08-04]

گردید و برای هر گروه سه بار تکرار انجام شد. برای ارزیابی حضور آنزیم آلکالین فسفاتاز بر اساس دستور کار کیت (Alkaline Phosphatase Detection Kit- Millipore- SCR004) انجام گردید.

RT-PCR . RNA کل سلولی با استفاده از RNX-Plus بر اساس دستور کار کیت سیناژن استخراج شد. برای اطمینان از کمیت و کیفیت RNA اسپکتروفوتومتری و الکتروفورز ژل آگارز انجام شد. سپس از ۰/۵میکروگرم RNA، بر اساس دستور کار کیت (Fermentas-K1622) cDNA تهیه شد . سپس با استفاده از ۵ میکرولیتر cDNA به همراه ۲/۵ میکرولیتر بافر ۱x، ۰/۸ میکرولیتر $mM\text{-}MgCl_2$ ۱/۵ (۵۰ میلی‌مولار)، ۰/۸ میکرولیتر mM-dNTP ۰/۲ (۱۰ میلی‌مولار)، پرایمر بالادست و پایین‌دست ۱۰ پیکومولار، ۰/۲۵میکرولیتر آنزیم Taq polymerase (۲/۵Unit) و آب تزریقی تا حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر، طبق برنامه در ۳۴ سیکل توسط دستگاه تکثیر DNA (Mastercycler- eppendrof) انجام شد.

پرایمرهای مورد استفاده، اندازه و شماره دست‌یابی آن‌ها درGenbank در جدول ۱ آمده است. ژن β2M به عنوان ژن کنترل داخلی استفاده شد. برنامه PCR عبارت از: دناتوراسیون اولیه ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲ دقیقه و هر سیکل شامل: دناتوراسیون ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، انلینگ ۵۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، اکستنشن ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه و پس از اتمام ۳۴ سیکل، آخرین مرحله اکستنشن نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه انجام شد. پس از اتمام واکنش، ۸ میکرولیتر از محصولات واکنش PCR بر روی ژل آگارز ۱/۵ درصد و با حضور اتیدیوم بروماید الکتروفورز شد و با دستگاه نمایشگر ژل داک (UVIdoc, UK) مورد مشاهده و بررسی قرار گرفت. برای هر نمونه سه بار تکرار صورت گرفت و در مرحله تهیه cDNAبا حذف نمونه RNA و آنزیم Reverse Transcriptase و در مرحله RT-PCR با حذف آنزیم Taq polymerase و محصول cDNA تمامی مراحل کنترل شد. در سیکل‌های مختلف بیان ژن‌ها بررسی شد. میزان بیان نسبی هر یک از ژن‌های توسط نرم‌افزار UVIdoc اندازه‌گیری شد. به منظور تعیین میزان نسبی بیان ژن‌ها، شدت باند هر یک از ژن‌ها نسبت به شدت باند ژن β2M محاسبه گردید.

جدول ۱. توالی پرایمرهای مورد استفاده، اندازه و شماره دست یابی آن ها در Genbank

کد دسترسی	اندازه bp	°C دمای انلینگ	نام ژن	توالی پرایمر
NM-012610	55	56	NGF	F: 5'-CTCTGAGGTGCATAGCGTAATGTC-3' R: 5'-AAAACGCTGTGAGAGTGTAGAAC-3'
NM-013166	55	70	CNTF	F: 5'-CTG GCT AGC AAG GAA GAT TCG-3' R: 5'-CAG GCC CTG ATG TTT TAC ATA AGA-3'
NM-031073	55	181	NT3	F: 5'-AGG TCA GAA TTC CAG CCG AT-3' R: 5'GTT-TCC-TCC-GTG-GTG-ATG-TT-3'
NM-013184	55	213	NT4	F: 5'-TATGTGCGGCGTTGACTGC-3' R: 5'CACAGTCAGAAGGCACGGTA-3'
NM-019139	55	254	GDNF	F: 5'-GAC TCC AAT ATG CCC GAA GA-3' R: 5'-TAG CCC AAA CCC AAG TCA GT-3'
NM-012512	55	318	β2m	F: 5'-CCG TGA TCT TTC TGG TGC TT-3' R: 5'-TTT TGG GCT TCA GAG TG-3'
D 10938	55	405	BDNF	F: 5'-GCC CAA CGA AGA AAA CCA TA-3' R: 5'-GAT TGG GTA GTT CGG CAT TG-3'
NM_012740	55	276	TH	F: 5′-TGT CAC GTC CCC AAG GTT CAT -3′ R: 5′-CGT GGG ACC AAT GTC TTC AGT G- 3′
U72345	55	683	Nurr1	F: 5′-TCC CGG AGG AAC TGC ACT TCG-3′ R: 5′-GTG TCT TCC TCT GCT CGA TCA-3′
NC-005103	55	173	Shh	F: 5'-TTA AAT GCC TTG GCC ATC TC-3' R: 5'-CGA GCC AGC ATG CCA TAC TT-3'
NC-005116	55	269	PTCH	F: 5'-CCT CCT TTA CGG TGG ACA AA-3' R:5'-ATC AAC TCC TCC TGC CCA TG-3'

آنالیز آماری. تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم‌افزارSPSS, version 16، انجام گرفت. محاسبات آماری جهت بررسی اختلاف بین گروه‌ها با استفاده از آزمون واریانس یک‌طرفه (One Way ANOVA) و به دنبال آن آزمون تکمیلی Tukey انجام شد. مرز استنتاج آماری نتایج

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-08-04]

$P\leq ۰/۰۵$ در نظر گرفته شد. نهایتاً هیستوگرام‌های مربوطه با نرم‌افزار Excel ترسیم گردید.

نتایج

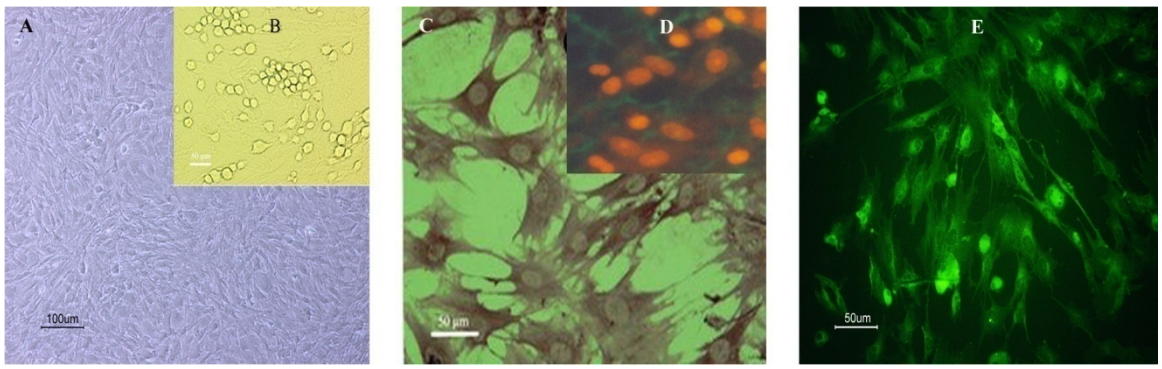
ارزیابی میزان حیات، نشان داد که بیش از ۹۵±۲/۵ درصد سلول‌های زنده بودند. سلول‌ها پس از تیمار توسط DMSO مورفولوژی شبه عصبی (زوائد بلند و متعدد) را نشان دادند (شکل B.۱). برای تعیین میزان خلوص MSCs از رنگ‌آمیزی سیتوشیمی آلکالین فسفاتاز استفاده شد که سیتوپلاسم سلول‌ها به رنگ صورتی، در شکل C.۱ دیده می‌شوند. MSCs به صورت سلول‌های با سیتوپلاسم پهن و گسترده با هسته گرد یا بیضی و نسبتاً درشت در مرکز سلول، مشاهده می‌شوند.

در ارزیابی به روش ایمنوسیتوشیمی، سیتوپلاسم MSCs برای نشانگر فیبرونکتین (رشته‌های)، سبز رنگ (شکل D.۱) و برای CD90 به رنگ سبز دیده می‌شوند (شکل E.۱). برای شمارش سلول‌های فیبرونکتین مثبت، هسته سلول‌ها با اتیدیوم بروماید به رنگ قرمز روشن در آمده‌اند و حدود ۲±۹۷ درصد سلول‌ها به این نشانگرها واکنش دادند.

نتایج RT-PCR:

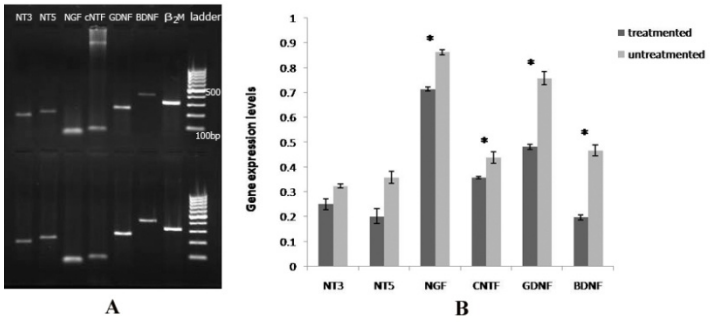
بخش اصلی این پژوهش مربوط به بررسی بیان NTF و برخی از ژن‌های سلول‌های دوپامینرژیک است. نتایج نشان می‌دهد که در سلول‌های تیمار نشده (کنترل) و تیمار شده توسط DMSO (۵ و ۱۰ روز پس از تیمار) تمامی NTF بیان شده است. مقایسه نیمه کمی شدت باندها در دو گروه، نشان می‌دهد که میزان بیان ژن‌های در گروه MSCs تیمار نشده، بیش‌تر از گروه DMSO است، که این اختلاف به لحاظ آماری برای ژن‌های BDNF ,GDNF, CNTF و NGF معنی‌دار است (شکل ۲. A و B).

ژن‌های مربوط به سلول‌های دوپامینرژیک شامل sonic hedgehog، patched، Nurr1 و tyrosinehydroxylase است. مقایسه بیان این ژن‌ها در دو گروه MSCs تیمار نشده و تیمار شده (۵ و ۱۰ روز پس از تیمار) توسط DMSO نشان می‌دهد که همه ژن‌ها به جز Nurr در دو گروه بیان شده و مقایسه نیمه کمی نشان می‌دهد که در گروه تیمار شده بیان ژن Th، معنی‌دار است (شکل۳.A و B). نتایج روز پنجم با دهم پس از تیمار با یک‌دیگر تفاوتی نشان نداد.

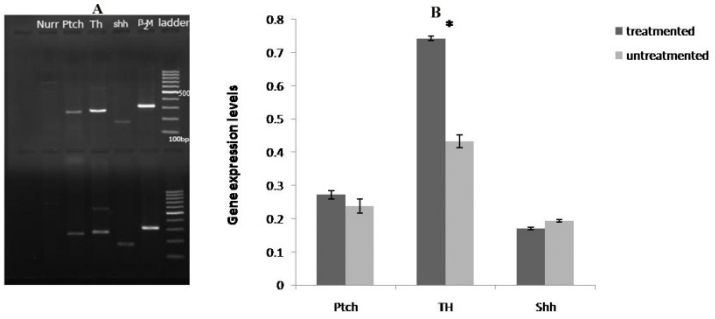


شکل۱. A. مشاهده سلول‌های MSCs تیمار نشده توسط میکروسکوپ اینورت (فازکنتراست) و B. تصویر فازکنتراست MSCs تیمار شده توسط DMSO و C. MSCs تیمار نشده که برای آنزیم آلکالین فسفاتاز رنگ شده‌اند. سلول‌هایی که با سیتوپلاسم صورتی دیده می‌شوند برای این آنزیم مثبت هستند. D. مشاهده MSCs تیمار نشده با میکروسکوپ فلورسانس که به روش ایمنوسیتوشیمی برای نشانگر فیبرونکتین رنگ شده‌اند. در قسمت‌هایی از سیتوپلاسم که گلیکوپروتئین فیبرونکتین قرار دارد، رشته‌های سبز و هسته سلول‌ها با اتیدیوم بروماید به رنگ نارنجی دیده می‌شوند. E. MSCs تیمار نشده که برای نشانگر CD 90 پاسخ مثبت داده. سلول‌هایی که با سیتوپلاسم سبز FITC دیده می‌شوند برای این نشانگر مثبت هستند.

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-08-04]



شکل۲. A. الگوی بیان عوامل نوروتروفیک به روش RT-PCR و مشاهده الکتروفورز ژل آگارز. از راست به چپ: ladder ,β2M NT5 ,NGF, CNTF, GDNF, BDNF و NT3 در گروه تیمار نشده MSCs (پایین) و گروه تیمار شده توسط DMSO (بالا) NT3 181bp, NT4/5 213bp, NGF 56bp, CNTF 70bp, GDNF 254bp, BDNF 405bp, β2M 318bp . B. مقایسه میزان بیان نیمه کمی ژن های NGF, NT5 CNTF, GDNF, BDNF و NT3 در MSCs تیمار نشده و تیمار شده با DMSO نسبت به ژن کنترل(β2M) و نیز علامت ستاره نشانه معنی داری است $P\leq0.05$.



شکل۳. A. الگوی بیان ژنها به روش RT-PCR و مشاهده الکتروفورز ژل آگارز. از راست به چپ: ladder ,β2M ,Shh ,Th, ,Ptch ,Nurr در گروه کنترل MSCs (پایین) و گروه تیمار شده توسط DMSO (بالا). Nurr 683 bp, , Ptch 272 bp ,Th 276bp, Shh 173 bp, β2M 318 bp B. مقایسه شدت بیان نیمه کمی ژن های Th ,Ptch و Shh در MSCs تیمار نشده و تیمار شده با DMSO نسبت به ژن کنترل(β2M) و علامت ستاره نشانه معنی داری است $P\leq0.05$.

بحث و نتیجه‌گیری

نتایج نشان داد که، MSCs قبل و پس از تیمار توسط DMSO قادر به بیان فاکتور های نوروترفیک و برخی از ژن‌های دوپامینرژیک هستند. پژوهش‌های اخیر نشان می‌دهد که این سلول‌ها علاوه بر قدرت تمایز به انواع رده‌های سلولی، به‌خصوص سلول‌های عصبی، می‌توانند با تولید عوامل نوروترفیک و هورمون‌های رشد و انواع سیتوکین‌ها، شرایط را برای القا تمایز سایر سلول‌ها فراهم کنند. می‌توان اثر حفاظت عصبی این سلول‌ها را ناشی از توانایی آن‌ها در تمایز به سلول‌های عصبی و جای‌گزین شدن با سلول‌های آسیب‌دیده دانست. اما پژوهش‌های اخیر امکان تازه‌ای را مطرح کرده است؛ می‌توان این ویژگی را ناشی از توان این سلول‌ها در تولید NTF فرض کرد. چنان که MSCs با تولید این فاکتورها، حیات نورون‌های باقی‌مانده را افزایش داده و موجب تکثیر سلول‌های درون‌زاد (آندوژنوس) و ترمیم آسیب گردید [۱۷-۱۹].

DMSO یک ترکیب با خاصیت دوگانه (آب دوست و چربی دوست) است، که قابلیت آمیختن و اختلاط با آب و انحلال در ترکیبات چربی دوست، بدون از دست دادن خواص خود را دارد و به همین دلیل به عنوان یک حلال در تحقیقات زیست پزشکی مورد استقبال قرار گرفته است. هم‌چنین این ترکیب در غلظت‌های نسبتاً کم به عنوان یک آنتی‌اکسیدانت

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-08-04]

جدید با ویژگی‌های نوروپروتکتیو مورد استفاده قرار می‌گیرد [۲۰].

در صورتی‌که شرایط کشت به گونه‌ای بهبود یابد که امکان فعال‌تر شدن ساخت عوامل رشد و نوروتروفیک توسط سلول‌ها بیش‌تر شود، استفاده از این سلول‌ها را برای درمان مساعدتر می‌نماید. با توجه به کاربرد این ماده به همراه سایر القاکننده‌های عصبی، و مصرف گسترده آن، مطالعه حاضر به نقش آن در شرایط in-vitro پرداخته است. برخی از محققین از آسکوربات، دپرنیل، ویتامین E و DMSO به عنوان آنتی‌اکسیدان‌های مهم محافظت‌کننده آسیب‌های نوروتوکسیک به نورون‌های دوپامینرژیک جسم سیاه، نام می‌برند [۲۱]. Yamaguchi و همکاران (۲۰۰۶) با اثر DMSO, رتینوئیک اسید و فاکتور رشد فیبروبلاستی پایه، نشان دادند که MSCs چندین نوع نشان‌گر سلول‌ها ی عصبی را بیان می‌کنند [۲۲]. Woodbury و همکارانش با استفاده از دی‌متیل سولفوکساید و BHA در حضور bFGF و PDGF موفق به القاء فنوتیپ عصبی MSCs شدند [۲۳،۲۲]. محققین دیگری نیز از این ترکیب در پروتوکل القایی خود برای تمایز نورونی MSCs استفاده کردند [۲۵،۲۴،۱۵].

همان‌گونه که نتایج این پژوهش نشان داد، DMSO با غلظت ۲ درصد موجب بیان NTF و ژن‌های دوپامینرژیک در MSCs می‌شود. بر این اساس، می‌توان فرض نمود که این ماده به تنهایی در شرایط کشت با وجود تغییری که در مورفولوژی سلول‌ها ایجاد می‌کند، در سطح بیان ژن و عملکرد سلول، نسبت به شرایط قبل از تیمار موجب افزایش بیان NTF نشده است. هم‌چنین نتایج بیان ژن‌ها در نمونه DMSO نشان می‌دهد، غلظت استفاده شده در این پژوهش موجب آسیب سلول‌ها نشده و قدرت حیات و رشد سلول‌ها حفظ شده است. از طرفی Tuszynski و همکاران (۲۰۰۴) اثر این قبیل القاکننده‌ها مانند BME و DMSO/BHA را بر تمایز سلول‌ها غیر واقعی و موقت می‌دانند [۲۶].

ضمناً این پژوهش نشان داد که MSCs می‌تواند عوامل نوروترفیک را در سطح mRNA بیان نماید که با توجه به نتایج پژوهش‌های قبلی، بر استفاده از این سلول‌ها برای اهداف درمانی تاکید می‌کند. هم‌چنین این سلول‌ها برخی از ژن‌هایی که توسط سلول‌های دوپامینرژیک تولید می‌شوند را نیز در سطح mRNA بیان نموده است.

NTF پروتئین‌های ترشحی هستند که نقش مهمی در القا تمایز، بقا و بلوغ نورون‌های در حال تکوین دارد. برخی از NTF در مغز بزرگ‌سال حمایت و پشتیبانی از جمعیت‌های نورونی بالغ را به عهده دارند. به عنوان نمونه بیماری پارکینسون عمدتاً ناشی از تخریب یک جمعیت سلولی خاص است که عوامل شناخته شده متعددی نقش تروفیک و محافظتی بر نورون‌های دوپامینرژیک دارد. هدف روش‌های درمانی مختلف استفاده از عواملی است که بتواند موجب توقف و یا بازگشت روند تخریب تدریجی سلول‌های عصبی دوپامینرژیک گردد [۲۷]. در پژوهش‌های متعددی که بر روی تمایز سلول‌های استرومایی مغز استخوان در شرایط in-vitro صورت گرفت، از فاکتورهای رشد برای القای این سلول‌ها استفاده شده است [۲۸،۷]. در پژوهش دیگری، اثر تمایزی MSCs بر روی سلول‌های بنیادی عصبی بررسی شد و مشاهده گردید که MSCs نه تنها تمایز نورونی را در NSC القا می‌کند، بلکه بقاء آن‌ها را نیز افزایش می‌دهد که این اثر را با ترشح NGF و BDNF توسط MSCs مرتبط می‌دانند [۳۳-۲۹]. بهبود عملکرد ناشی از پیوند MSCs به دلیل توانایی این سلول‌ها بر کاهش آپوپتوز، تمایز عصبی و پیش‌برد نوروژنز، آنژیوژنز و سیناپتوژنز در نواحی آسیب دیده است. MSCs با ترشح فاکتورهای تروفیک و القا سلول‌های میزبان به تولید مولکول‌های ضروری و یا فعال نمودن مکانیسم‌های ترمیمی آندوژنوس موجب بهبود سریع و موثر عملکرد عصبی می‌گردد [۳۳-۳۵]. هم‌چنین نشان داده شد که تولید NTF موجب حفاظت از نورون‌های دوپامینرژیک و افزایش بقا و تمایز آندوژنوس جمعیت سلول‌های زاینده به نورون‌های

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-08-04]

دوپامینرژیک می‌گردد. در بین این فاکتورها احتمال اثر حفاظتی NGF، BDNF و GDNF بر نورون‌های دوپامینرژیک بیش‌تر است [۳۶]. بیان این گروه از ژن‌ها در کنار بیان فاکتور نوروتروفیک GDNF فرضیه استفاده از این سلول‌ها برای درمان بیماری پارکینسون را تقویت می‌نماید [۳۸،۳۷].

دیگران نیز نشان دادند که سلول‌های استرومایی مغز استخوان، ژن‌های دوپامینرژیک شامل GFRα1، Nurr1، Shh، Ptch و smt را بیان می‌کنند. MSCs انسانی تمایز یافته، علاوه بر بیان TH در سطح mRNA و پروتئین، دوپامین را نظیر نورون‌های عمل‌کردی دوپامینرژیک تولید و ترشح می‌کنند [۳۹]. Shh یک مولکول پیام‌رسان مورفوژنیک است و Nurr1 نیز گیرنده orphan بوده که برای تکوین نورون‌های دوپامینرژیک ضروری است [۴۰].

همان‌طوری‌که اشاره شد برخی از پژوهش‌ها به نقش موثر این قبیل القاکننده‌ها در پروتوکل‌های تمایزی اشاره دارند [۴۲،۴۱،۲۴،۲۰،۱۵] و برخی دیگر، مواد شیمیایی نظیر DMSO را برای سلول سمی و تغییر مورفولوژی ناشی از آن را تغییر ساختار اسکلت سلولی و نه تمایز سلولی می‌دانند [۴۴،۴۳،۲۶]. این پژوهش نشان داد که DMSO با غلظت ۲ درصد اثر سمی نداشته و NTF و برخی از ژن‌های دوپامینرژیک با حضور این ماده بیان شده و این بیان با تغییر نیز همراه بوده است. اما نتیجه‌گیری قطعی بر اثر تمایزی DMSO در سطح بیان ژن، نیاز به بررسی کمی به روش real time-PRC دارد.

آن‌چه که این تحقیق را از سایر پژوهش‌ها متمایز می‌نماید، بررسی بیان هم‌زمان فاکتورهای نوروتروفیک و ژن‌های دوپامینرژیک (در سطح mRNA) توسط MSCs در شرایط کشت قبل و پس از تیمار با DMSO می‌باشد. MSCs قبل و پس از تیمار، برخی از ژن‌های دوپامینرژیک (TH, Ptch, Shh) را بیان کرده که نشان‌دهنده ظرفیت تمایزی این سلول‌ها به نورون‌های دوپامینرژیک است. سلول‌های بنیادی مزانشیمی به دلیل بیان عوامل نوروتروفیک و ژن‌های دوپامینرژیک می‌تواند برای درمان بیماری پارکینسون مورد استفاده قرار گیرد.

تشکر و قدردانی

هزینه این پژوهش از محل طرح مصوب معاونت پژوهش و فناوری دانشگاه دامغان تامین شده است. از دانشکده زیست‌شناسی و پژوهشکده علوم زیستی دانشگاه دامغان به خاطر در اختیار گذاشتن امکانات آزمایشگاهی تشکر و قدردانی می‌گردد.

منابع

[1] Armesilla-Diaz A, Elvira G, Silva A. p53 regulates the proliferation, differentiation and spontaneous transformation of mesenchymal stem cells. Exp Cell Res 2009; 315: 3598-3610.

[2] Kim DH, Yoo KH, Choi KS, Choi J, Choi SY, Yang SE, et al. Gene expression profile of cytokine and growth factor during differentiation of bone marrow-derived mesenchymal stem cell. Cytokine 2005; 31: 119-126.

[3] Delcroix GJ, Garbayo E, Sindji L, Thomas O, Vanpouille-Box C, Schiller PC, Montero-Menei CN. The therapeutic potential of human multipotent mesenchymal st romal cells combined with pharmacologically active microcarriers transplantedin hemi-parkinsoni an rats. Biomaterials 2011; 32: 1560-1573.

[4] Zhao LR, Duan WM, Reyes M, Keene CD, Verfaillie CM, Low WC. 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.

[5] Lu J, Moochhala S, Moore XL, Ng KC, Tan MH , Lee LK et al. Adult bone marrow cells differentiate into neural phenotypes and improve functional recovery in rats following traumatic brain injury. Neurosci Lett 2006; 398: 12-17.

[6] Li Y, Chen J, Chen XG, Wang L, Gautam SC, Xu YX, et al. Human marrow stromal cell therapy for stroke in rat Neurotrophins and functional recovery. Neurology 2002; 59: 514-523.

[7] Kang SK, Jun ES, Bae YC, Jung JS. Interactions between human adipose stromal cells and mouse neural stem cells in vitro. Brain Res Dev Brain Res 2003; 145: 141-149.

[8] MacGregor WS. The chemical and physical properties of DMSO. Ann N Y Acad Sci 1967; 141: 3-12.

[9] J M Davis. Basic cell culture. Second Edition Oxford 2002 .

[10] Miyamoto Y, Oishi K, Yukawa H, Noguchi H, Sasaki M, Iwata H, Hayashi S. Cryopreservation of human adipose tissue-derived stem/progenitor cells using the silk protein sericin. Cell Transplant 2012; 21: 617-622.

[11] de Lima Prata K, de Santis GC, Orellana MD, Palma PV, Brassesco MS, Covas DT. Cryopreservation of umbilical cord mesenchymal cells in xenofree conditions. Cytotherapy 2012 ; 14: 694-700.

[12] Miranda-Sayago JM, Fernandez-Arcas N, Benito C, Reyes-Engel A, Herrero JR, Alonso A. Evaluation of a low cost cryopreservation system on the biology of human amniotic fluid-derived mesenchymal stromal cells. Cryobiology 2012; 64: 160-166.

[13] Yu ZW, Quinn PJ. The modulation of membrane structure and stability by dimethyl sulphoxide [review]. Mol Membr Biol 1998; 15: 59-68.

[14] Qian DX, Zhang HT, Ma X, Jiang XD, Xu RX. Comparison of the efficiencies of three neural induction protocols

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-08-04]

in human adipose stromal cells. Neurochem Res 2010; 35: 572-579.

[15] Jiang J, Lv Z, Gu Y, Li J, Xu L, Xu W, et al. Adult rat mesenchymal stem cells differentiate into neuronal-like phenotype and express a variety of neuro-regulatory molecules in vitro. Neurosci Res 2010; 66: 46-52.

[16] 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: 3908-3913.

[17] 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: 918-922.

[18] Maltman DJ, Hardy SA, Przyborski SA. Role of mesenchymal stem cells in neurogenesis and nervous system repair. Neurochem Int 2011; 59: 347-356.

[19] Croft AP, Przyborski SA. Mesenchymal stem cells expressing neural antigens instruct a neurogenic cell fate on neural stem cells. Exp Neurol 2009; 216: 329-341.

[20] Sanmartín-Suárez C, Soto-Otero R, Sánchez-Sellero I, Méndez-Álvarez E. Antioxidant properties of dimethyl sulfoxide and its viability as a solvent in the evaluation of neuroprotective antioxidants. J Pharmacol Toxicol Methods 2011; 63: 209-215.

[21] Iacovitti L, Stull ND, Johnston K. Melatonin rescues dopamine neurons from cell death in tissue culture models of oxidative stress. Brain Res 1997; 768: 317-326.

[22] Yamaguchi Y. Heparin sulfate proteoglycans in the nervous system: their diverse roles in neurogenesis, axon guidance, and synaptogenesis. Semin Cell Dev Biol 2001; 12: 99-106.

[23] Muñoz-Elías G, Woodbury D, Black IB. Marrow stromal cells, mitosis, and neuronal differentiation: stem cell and precursor functions. Stem Cells 2003; 21: 437-448.

[24] 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.

[25] Yamaguchi S, Kuroda S, Kobayashi H, Shichinohe H, Yano S, Hida K, et al. The effects of neuronal induction on gene expression profile in bone marrow stromal cells (BMSCS)--a preliminary study using microarray analysis. Brain Res 2006; 1087: 15-27.

[26] Lu P, Blesch A, Tuszynski MH. Induction of bone marrow stromal cells to neurons: differentiation, transdifferentiation, or artifact? J Neurosci Res 2004; 77: 174-191.

[27] Sullivan AM, Toulouse A. Neurotrophic factors for the treatment of Parkinson's disease. Cytokine Growth Factor Rev 2011; 22: 157-165.

[28] Sanchez-Ramos J, Song S, Cardozo-Pelaez F, Hazzi C, Stedeford T, Willing A, et al. Adult bone marrow stromal cells differentiate into neural cells in vitro. Exp Neurol 2000; 164: 247-256.

[29] Crigler L, Robey RC, Asawachaicharn A, Gaupp D, Phinney DG. Human mesenchymal stem cell subpopulation express a variety of neuro-regulatory molecules and promote neural cell survival and neuritogenesis. Exp Neurol 2006; 198: 54-64.

[30] Lou S, Gu P, Chen F, He C, Wang M, Lu C. The effect of bone marrow stromal cells on neuronal differentiation of mesencephalic neural stem cell in Sprague-Dawley rats. Brain Res 2003; 968: 114-121.

[31] Song S, Kamath S, Mosquera D, Zigova T, Sanberg P, Vesely DL, Sanchez-Ramos J. Expression of brain natriuretic peptide by human bone marrow stromal cells. Exp Neurol 2004; 185: 191-197.

[32] Garcia R, Guiar J, Alberti E, Cuetara K, Pavon N. Bone marrow stromal cells produce nerve growth factor and glial cell line-derived neurotrophic factors. Biochem Biophys Res Commun 2004; 316: 753-754.

[33] van Velthoven CT, Kavelaars A, van Bel F, Heijnen CJ. Regeneration of the ischemic brain by engineered stem cells: fuelling endogenous repair processes. Brain Res Rev 2009; 6: 1-13.

[34] Dharmasaroja P. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells for the treatment of ischemic stroke. J Clin Neurosci 2009; 16: 12-20.

[35] Delcroix GJ, Schiller PC, Benoit JP, Montero-Menei CN. Adult cell therapy for brain neuronal damages and the role of tissue engineering. Biomaterials 2010; 31: 2105-2120.

[36] McCoy MK, Martinez TN, Ruhn KA, Wrage PC, Keefer EW, Botterman BR, et al. Autologous transplants of adipose-derived adult stromal (ADAS) cells afford dopaminergic neuroprotection in a model of Parkinson's disease. Exp Neurol 2008; 210: 14-29.

[37] Shintani A, Nakao N, Kakishita K, Itakura T. Protection of dopamine neurons by bone marrow stromal cells. Brain Res 2007; 1186: 48-55.

[38] Rodrigues Hell RC, Silva Costa MM, Goes AM, Oliveira AL. Local injection of BDNF producing mesenchymal stem cells increases neuronal survival and synaptic stability following ventral root avulsion. Neurobiol Dis 2009; 33: 290-300.

[39] Hermann A, Gastl R, Liebau S, Popa MO, Fiedler J, Boehm BO, et al. Efficient generation of neural stem cell-like cells from adult human bone marrow stromal cells. J Cell Sci 2004; 117: 4411-4422.

[40] Kramer BC, Woodbury D, Black IB. Adult rat bone marrow stromal cells express genes associated with dopamine neurons. Biochem Biophys Res Commun 2006; 343: 1045-1052.

[41] Kaka GHR, Tiraihi T, Arab Kheradmand J, Azizzadeh Delshad AR. A study on in-vitro transdifferentiation of rat bone marrow stromal cells into neuroepithelial-like cells. Iran Red Crescent Med J 2009; 11: 133-139. (Persian).

[42] Gomez-Angelats M, Bortner CD, Cidlowski JA. Cell volume reg-ulation in immune cell apoptosis. Cell Tissue Res 2000; 301: 33-42.

[43] Arechabala B, Coiffard C, Rivalland P, Coiffard LJ, de Roeck-Holtzhauer Y. Comparison of cytotoxicity of various surfactants tested on normal human fibroblast cultures using the neutral red test, MTT assay and LDH release. J Appl Toxicol 1999; 19: 163-165.

[44] Yu R, Mandlekar S, Kong AT. Molecular mechanisms of butylated hydroxylanisole-induced toxicity: induction of apoptosis through direct release of cytochrome c. Mol Pharmacol 2000; 58: 431-437.

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-08-04]

Effects of dimethyl sulfoxide on expression of neurotrophic factors and dopaminergic genes by mesenchymal stem cells

Mohammad Taghi Ghorbanian (Ph.D)*, Taghi Lashkarbolouki (Ph.D), Maryam Haji Ghasem Kashani (Ph.D), leyli Hosseinpour (M.Sc)
Depat. of Cellular and Molecular Biology, School of Biology and Institute of Biological Sciences, Damghan University, Damghan, Iran

(Received: 22 Apr 2011Accepted: 01 Sep 2012)

Introduction: Neurotrophic factors play an important role in differentiation of mesenchymal stem cells (MSCs) into dopaminergic neurons. The objective of this work was to determine the expression of brain derived neurotrophic factor (BDNF), nerve growth factor (NGF), ciliary neurotrophic factor (CNTF), glial cell derived neurotrophic factor (GDNF), NT3 and NT5 and dopaminergic genes such as tyrosine hydroxylase in MSCs before and after dimethyl sulfoxide (DMSO) induction. The aim of this study was to evaluate the differentiation of MSCs induced by DMSO.

Materials and Methods: MSCs obtained from the femur and tibia of adult rats were cultured in α-MEM mediums supplemented with serum. Fourth passage of MSCs were cultured in two different types of medium: 1- α-MEM containing 10% serum as control group (untreated cells) and 2- α-MEM containing 2% DMSO as treated cells. Identification and determination of the purity of MSCs were examined by immunocytochemistry staining. Reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) was used to study mentioned genes expression of the MSCs.

Results: These results represented that MSCs were immunopositive for alkaline phosphatase, anti-fibronectine and anti- CD90. In addition the semiquantative study of PCR method showed that some neurotrophic factors (BDNF, NGF, CNTF, GDNF) expression in the untreated MSCs increased significantly compared with that of DMSO-treated group ($P<0.05$).

Conclusion: MSCs play an important role in the treatment of Parkinson's disease by expression of neurotrophic factors and some dopaminergic genes.

Keywords: Mesenchymal stem cells, Dimethyl sulfoxide, Neurotrophic factors, Dopaminergic genes

* Corresponding author: Fax: +982325247146; Tel: +98 9125318732
ghorbanian@du.ac.ir

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-08-04]