مجله تازه های بیوتکنولوژی سلولی- مولکولی
دوره دوم، شماره هشتم، پاییز ۱۳۹۱

NCMBJ
Research Article
مقاله تحقیقی

تمایز سلول های بنیادی ژله وارتون بند ناف انسانی به سلول های خونساز

کاظم پریور[۱]، رقیه آل جعفر[۲*]، اسداله اسدی[۳و۵]، مسعود ملکی[۴و۵]

[۱] استاد، گروه زیست شناسی،دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات، تهران، ایران
[۲] دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه،دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات، تهران، ایران
[۳] استادیار، گروه زیست شناسی،دانشکده علوم پایه، دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل، ایران
[۴] استادیار، گروه زیست شناسی،دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات آذربایجان شرقی،تبریز، ایران
[۵] مرکز درمان ناباروری و تحقیقات سلول درمانی جهاد دانشگاهی، واحد اردبیل، ایران

چکیده

سابقه و هدف : سلول های بنیادی، قدرت خودنوسازی و تمایز به انواع سلول های بالغ بدن را دارند. در این کار سلول های بنیادی مزانشیمی ژله وارتون بند ناف انسانی تحت تأثیر عصاره ریه موش به سمت سلول های خونی هدایت شدند عصاره ریه موش حاوی سیتوکین های نظیر: G-CSF,M-CSF,IL-6 و GM-CSF است که نقش فاکتور رشد در طول مراحل مختلف تمایز را دارند.

مواد و روش ها : در این پژوهش ژله وارتون بند ناف انسان به قطعات نیم سانتی متر برش و در فلاسک کشت T25 کشت داده شدند. بعد از پاساژ دوم، سلول های بنیادی مزانشیمی با نسبت های ۳:۱ ، ۱:۱ و۱:۳ محیط کشت: عصاره ریه موش تیمار شدند.

یافته ها : سلول های خونی در نسبت های ۳ :۱، ۳:۱ و۱:۱ محیط کشت: عصاره ریه موش در روز هفتم مشاهده گردید. با آزمایش فلوسایتومتری، بیان مارکرهای (CD90, CD105) در سطح سلول های بنیادی مزانشیمی ژله وارتون بند ناف انسانی به اثبات رسید. بررسی شکل ظاهری سلول ها با رنگ آمیزی گیمسا نشان دهنده حضور سلول های خونی بود.

نتیجه گیری : سلول های بنیادی ژله وارتون بند ناف انسانی با روش کشت بافت جداسازی شدند. سیتوکین های موش بر سلول های بنیادی انسانی تأثیر گذاشته و باعث تمایز این سلول ها شده است.

کلمات کلیدی : ژله وارتون انسان، سلول های بنیادی مزانشیمی، سلول های خونی، سیتوکین های ریه موش

مقدمه

سلول های بنیادی[۱]، سلول های تمایز نیافته ای هستند که خاصیت خودنوزایی[۲] و تمایز به انواع دودمان های سلولی را دارند سلول های بنیادی از لحاظ ویژگی توان تمایزی و تکثیر به چهار نوع سلول های بنیادی همه توان[۳]، سلول های بنیادی پرتوان[۴]، سلول های بنیادی چندتوان[۵] و سلول های بنیادی تک توان[۶] تقسیم شده اند (۱۴). ژله وارتون بافت همبندی است که غنی از پروتئوگلیکان و هیالورونیک اسید و کلاژن است این بافت به جز پروتوگلیکان و کلاژن از میوفیبروبلاست ها (سلول های مزانشیمی) تشکیل شده است. میوفیبروبلاست ها، کلاژن نوع ۵،۱،۲ را در دوران بارداری تولید می کنند که به ژله وارتون ویژگی انقباضی و کشسانی می دهد (۴) و باعث تنظیم قطر رگ های بندناف و میزان جریان خون عروق می شود. سلول های بنیادی مزانشیمی، مولکول های چسبنده (CD44, CD105) مارکرهای اینتگرین (CD29, CD51) و مارکرهای سلول های بنیادی مزانشیمی (SH2, SH3) را بیان می کنند اما مارکرهای خونی (CD34, CD45) را بیان نمی کنند (۲۰) و همچنین این سلول ها Nestin, CD54(ICAM-1), SSEA-4, OCT-4 را به

آدرس نویسنده مسئول: ، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه،دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات، تهران، ایران
Email:R_rogayeh@yahoo.com
تاریخ دریافت مقاله: ۹۱/۰۱/۲۰
تاریخ پذیرش:۹۱/۰۶/۲۶

1-Stem cells
2-Self-renew
3-Totipotent
4-Pluripotent
5-Multipotent
6-Unipotent

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2025-09-16]
[DOR: 20.1001.1.22285458.1391.2.8.2.1]

میزان کمی بیان می کنند (۲). سلول های ژله وارتون نیز از سه ناحیه تشکیل شده اند. ناحیه دور عروق[1] ، ناحیه بین عروق[2] و ناحیه ساب آمنیون[3] جداسازی می شود (۹). که در این تحقیق از ناحیه ساب آمنیون استفاده گردید.

ویژگی سلول های بنیادی مزانشیمی بند ناف

سلول های بنیادی مزانشیمی بند ناف چندین ویژگی دارند که آن ها را از سایر منابع متمایز کرده است از جمله اینکه ۱) با حجم زیادی جداسازی می شوند، ۲) نسبت به CD34,CD45 منفی هستند، ۳) رشد سریعی دارند و می توان آن ها را در فریزر منجمد و ذخیره کرد و دوباره ذوب کرد، ۴) بصورت کلنی گسترش می یابند، ۵) به راحتی پروتئین های میزبان را بیان می کنند (۱۸ ، ۲۱) ، ۶) HLA-DR , HLA-ABC و CD106 را به مقدار خیلی کم بیان می کنند (سیستم ایمنی ضعیفی دارند) (۸ ،۱۶) و ۷) سلول های بنیادی رویانی به خاطر فعالیت آنزیم تلومراز بعد از پیوند به تومور تبدیل می شوند اما سلول های بنیادی ژله وارتون سرطان زا نمی باشند (۱۳) .سیتوکین ها[4] : خونسازی یعنی تکوین سلول های خونی بالغ در نتیجه تکثیر پیش سازهای متعهد[5] و تمایز پیش سازهای اولیه به سلول های خونی می باشد که سیتوکین های فراوانی به تمایز این سلول ها تأثیر می گذارند (۳ ،۱۲). بیش از ۲۰ محلول تنظیم کننده خونی در گردش خون محیطی وجود دارد(۵ ،۶) . فاکتورهای تحریک کننده کلنی نظیر فاکتور تحریک کننده کلنی ماکروفاژ (M-CSF) [6]، فاکتور تحریک کننده کلنی گرانولوسیت (G-CSF)[7] فاکتور تحریک کننده ماکروفاژ-گرانولوسیت -MG) (CSF [8]و فاکتور تحریک کننده کلنی چندگانه[9] یا اینترلوکین ۳ (multi-CSF or IL-3) است (۱۵)که این سیتوکین به فراوانی در بافت ریه وجود دارد و توسط سلول های اندوتلیالی ریه و سلول آلوئولی نوع II تولید و ترشح می شود (۱۱). در این پژوهش نحوه جداسازی و چگونگی به دست آوردن سلول های بنیادی بند ناف بعد از زایمان با تأیید فرم رضایت نامه والدین مورد استفاده قرار گرفته است.

مواد و روش ها

روش جداسازی سلول بنیادی مزانشیمی اززله وارتون بندناف انسانی

بند ناف داخل سرم فیزیولوژیکی از بیمارستان (بیمارستان علوی اردبیل) به آزمایشگاه (مرکز سلول درمانی و درمان ناباروری اردبیل) انتقال داده شد. سپس برای ضدعفونی درون الکل ۷۰٪ بمدت ۳۰ ثانیه قرار گرفت و زیر هود به بشر حاوی سرم فیزیولوژیکی انتقال داده شد. بند ناف ها به قطعات دو سانتیمتری بریده شد و داخل پتری دیش حاوی Hanks Balanced Salt Solution (HBSS) گذاشته شد. اپیتلیوم بندناف بریده شده و به آرامی رگ ها از بند ناف جدا گردیدند. تکه های ژله وارتون به آرامی برداشته شدند و به ظرف HBSS منتقل شدند. قطعات ژله وارتون با اسکالپل قطعه قطعه و ریز شدند. قطعات در فلاسک T25 حاوی DMEM(GIBCO,UK) (Dulbecco's Modified Eagle´s Medium) و ۱۵٪ Fatal) (bovine serum) FBS(SIGMA-Aldrich) ، ۱٪ آنتی بیوتیک (پنی سیلین/استرپتومایسین) کشت داده شدند. فلاسک به انکوباتور با دمای ۳۷°C رطوبت ۹۵٪ و co_2 ۵٪ منتقل و بعد از ۳ روز محیط کشت فلاسک تعویض شد.

فلوسایتومتری سلول های بنیادی ژله وارتون

سلول های بنیادی ژله وارتون بعد از پاساژ اول به دانشگاه علوم پزشکی انتقال و بر اساس مراحل زیر مورد آزمایش قرار گرفتند. سوسپانسیون از سلول با حجم ۵۰ مایکرولیتر و ۱۰ مایکرولیتر آنتی بادی کونژوگه باFITC (CD90 and CD105) را به لوله مخصوص فلوسایتومتری انتقال داده و میزان بیان این مارکر ها بررسی شد. از آنجایی که دو آنتی بادی مذکور با FITC کونژوگه بوده اند، میزان بیان این مارکرها بطور جداگانه بررسی گردید.

1-Perivascular space
2-Intravascular space
3-Subamnion
4-Cytokine
5-Commitment progenitors
6-Macrophage colony-stimulating factor
7-Granulacyte colony-stimulating factor
8-Granulocyte-Macrophage colony-stimulating factor
9-Multi colony-stimulating factor

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2025-09-16]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1391.2.8.2.1]

روش تهیه عصاره ریه موش

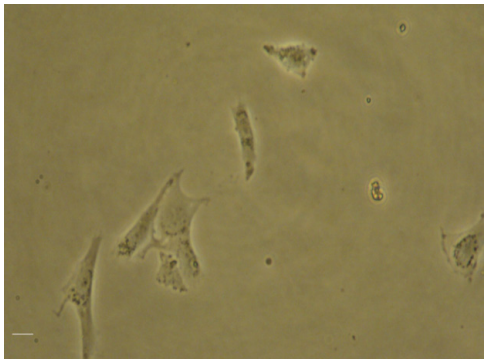
در این تحقیق از ۲۰ موش صحرایی ۱۲۰ گرمی تهیه شده از دانشگاه تربیت معلم کرج استفاده شد. بافت ریه جدا شده در سرم فیزیولوژیی استریل شستشو داده شد و به مدت ۲۰ دقیقه در محلول ضدعفونی کننده قرارگرفتند و در زیر هود به پتری دیش حاوی محیط کشت DMEM انتقال داده شدند. بافت به خوبی خرد شد و در داخل هاون خوب له شد (برای هر ریه، ۱۰ میلی لیتر محیط) بعد سانتریفوژ با دور ۶۰۰۰g در ۱۵ دقیقه دمای ۴- درجه سانتی گراد انجام گردید و در نهایت عصاره ریه در دمای ۸۵- درجه سانتی گراد نگهداری شد (۱).

بررسی تأثیر عصاره ریه موش بر روی تمایز سلول های بنیادی ژله وارتون بند ناف

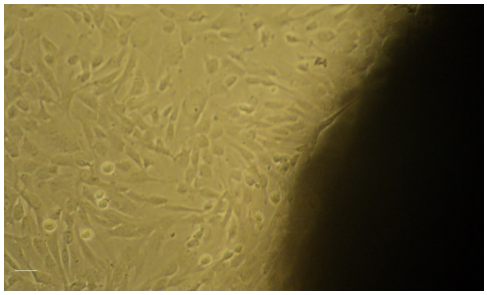
گروه شاهد از سلول های خونی انسانی تهیه شد. درگروه تجربی اول، دوم و سوم لاین سلولی در معرض DMEM به همراه FBS و عصاره ریه (القاء کننده) به نسبت ۱:۱ ، ۱:۳ و۱:۳ قرار گرفتند.

یافته ها

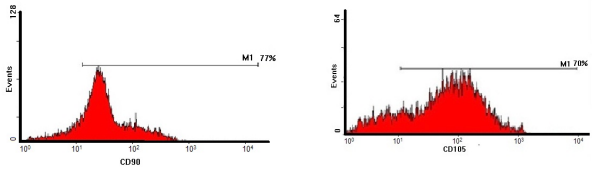
بعد از گذشت یک هفته سلول های بنیادی مزانشیمی به صورت هاله ای اطراف بافت ژله وارتون انسان دیده شدند و چسبیده به کف فلاسک بودند. (شکل ۲و۱) برای اثبات بنیادی بودن سلول ها فلوسایتومتری انجام گرفت و نتایج حاصل از فلوسایتومتری نشان دهنده بیان دو مارکر CD90 و CD105 در سلول های بنیادی مزانشیمی ژله وارتون بند ناف انسانی بود (شکل ۳). دو روز بعد از پاساژ دوم وقتی که ۸۰٪ کف فلاسک پر از سلول شد، عصاره ریه موش روی سلول های بنیادی ژله وارتون انسانی تأثیر داده شدند که در روز سوم تیمار اطراف هسته سلول گرانول های تیره رنگی جمع شدند (شکل ۴). در هر سه گروه تجربی سلول های خونی در روز هفتم قابل مشاهده بودند. در این پژوهش وجود سلول های خونی با رنگ آمیزی گیمسا نیز اثبات گردید (شکل ۵). بر اساس آنالیز آماری Tukey میزان ائوزینوفیل در نمونه های تجربی ۲۵٪ ($P<0.05$) اختلاف معنی داری را در مقایسه با هر سه نمونه ۵۰٪ ، ۷۵٪ و کنترل نشان داد و همچنین نمونه های ۵۰٪ و ۷۵٪ ($P<0.05$) اختلاف معنی داری با نمونه کنترل داشت. میزان نوتروفیل، بازوفیل و لوکوسیت در هر چهارگروه یکسان و اختلاف معنی داری مشاهده نگردید. لنفوسیت و مونوسیت هم تغییر معنی داری نداشتند.



شکل ۱- سلول های بنیادی مزانشیمی در هفته اول (بزرگنمایی ۲۰۰): این سلول ها در روز ۷ بعد از کشت در فلاسک کشت قابل مشاهده بودند که در هفته اول اندازه بزرگ و گسترده اما تراکم کمی داشتند. نوار مقایسه:۵۰μm .



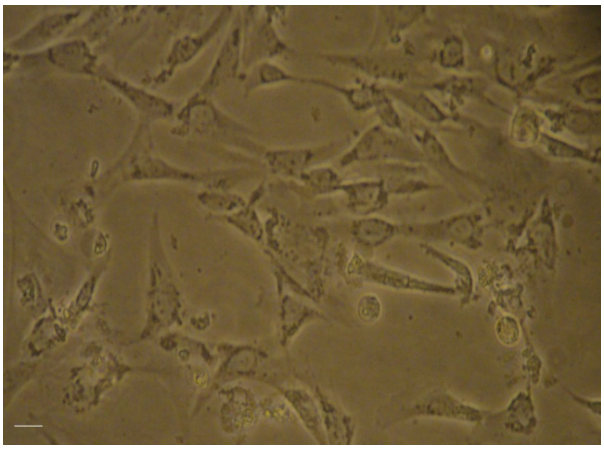
شکل ۲- سلول های بنیادی مزانشیمی ژله وارتون انسانی روز ۱۴ (بزرگنمایی۱۰۰): بافت ژله وارتون با پیکان بزرگ و سلول های بنیادی مزانشیمی با پیکان کوچک نشان داده می شود. در هفته دوم تراکم سلول ها افزایش یافته و اندازه آن ها کوچک و فشرده به هم می شود. نوار مقایسه:۱۰۰μm .



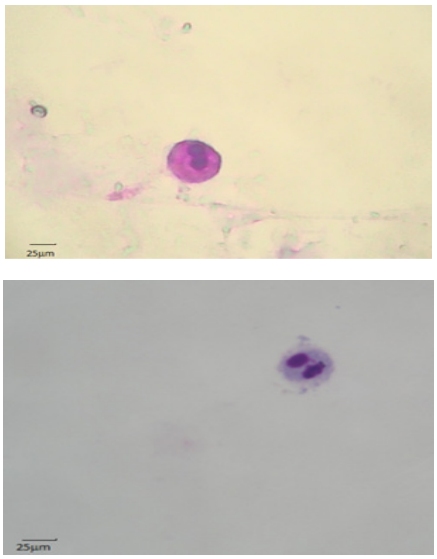
شکل ۳- سلول های ژله وارتون در پاساژ اول توسط فلوسایتومتری مورد آزمایش قرار گرفتند که ۷۷٪ از سلول ها CD90 و ۷۰٪ از سلول ها CD105 را بیان می کنند.

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2025-09-16]

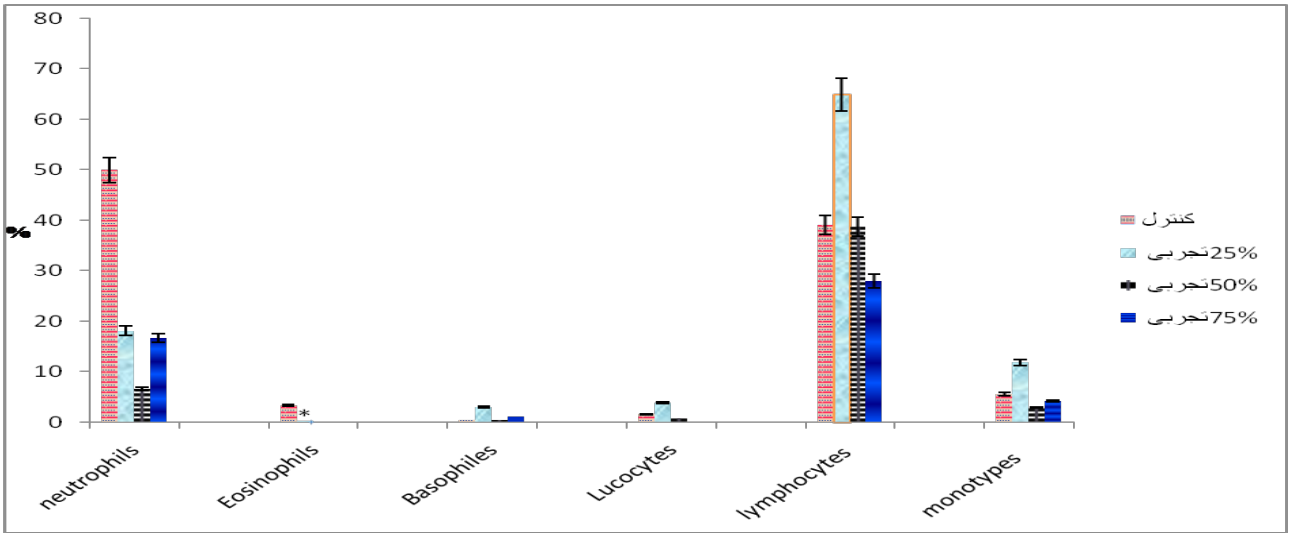
[DOR: 20.1001.1.22285458.1391.2.8.2.1]



شکل ۴- سلول های بنیادی مزانشیمی روز سوم تیمار (بزرگنمایی ۲۰۰): در روز سوم اندازه سلول مزانشیمی کاهش یافته و گرانول های تیره رنگی اطراف هسته تجمع یافته اند. نوار مقایسه:۵۰µm .



شکل ۵ - رنگ آمیزی گیمسا گروه تجربی ۱ :۳ (400X): سلول خونی در گروه تجربی ۲۵٪ (غلظت ۲۵٪ عصاره ریه) قابل مشاهده هستند. سمت راست بازوفیل و سمت چپ پلاسماسل را نشان می دهد.



نمودار ۱- مقایسه نوتروفیل، ائوزینوفیل، بازوفیل، لوکوسیت، لنفوسیت و مونوسیت در نمونه های کنترل، تجربی ۱ (غلظت ۲۵٪ عصاره ریه)، تجربی ۲ (غلظت ۵۰٪ عصاره ریه) و تجربی ۳ (غلظت ۷۵٪ عصاره ریه) (*P<0.05, **P< 0.01, ***P< 0.001) ($\bar{X}$ ± SE).

بحث

در سال ۲۰۱۱، Venugopal و همکارانش طی آزمایشات خود سلول های بنیادی ژله وارتون را با روش کشت بافت جداسازی کردند. در مطالعه حاضر نیز از روش کشت بافت برای جداسازی سلول های بنیادی ژله وارتون استفاده شد. سلول های بنیادی ژله وارتون به کف فلاسک می چسبند و شکل کلنی شبه فیبروبلاستی تشکیل می دهند که در شرایط آزمایشگاهی در سرم جنین گاوی رشد می یابند و ممکن است در حضور فاکتورهای رشد مختلفی ویژگی های خاصی را هم بیان کنند (۷، ۱۰). در این پژوهش سلول های بنیادی ژله وارتون در هفته اول کشت مشاهده شدند که تعدادشان خیلی کم بود و بر اساس یافته های Gronthos و همکارانش در سال ۱۹۹۵ و Kuznetsov و همکارانش در سال ۱۹۹۷ این سلول ها بصورت کلنی شکل، کشیده و پهن دیده شدند و در پژوهش حاضر نیز سلول ها به سرعت تکثیر شدند و با گذشت زمان به تعداد سلول ها افزوده شد و اندازه آن ها کوچک و بهم فشرده شد. Weiss و Troyer در سال ۲۰۰۶ بیان

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2025-09-16]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1391.2.8.2.1]

CD90 و CD105 را روی سطح سلول های بنیادی ژله وارتون اثبات کردند و همچنین گزارش دادند که مارکرهای سطحی سلول های بنیادی ژله وارتون در پاساژ اول بیان بیشتری دارند و با گذشت زمان در پاساژهای بعدی میزان بیان این مارکرها کاهش می یابد. در این مطالعه نیز بنیادی بودن سلول ها با آزمایش فلوسایتومتری دو مارکر CD90 و CD105 مورد بررسی قرار گرفت و سلول ها نسبت به این مارکرها مثبت بودند. Burg و همکارانش در سال ۲۰۰۱ نشان دادند که سیتوکین ها یا فاکتورهای تحریک کننده خون به فراوانی در بافت ریه یافت می شوند و توسط سلول های اندوتلیالی ریه و سلول های آلوئلی نوع II تولید و ترشح می گردند. در پی کارهای گذشته دکتر حیاتی و همکارانش در سال ۸۸، سلول های بنیادی مزانشیمی بند ناف موش با تأثیر عصاره ریه موش به سلول های خونساز تمایز یافتند. در این پژوهش نیز بر اساس کارهای گذشته از بافت ریه موش که حاوی سیتوکین هایی مثل GM-CSF است استفاده شد و چون منبع سلول های بنیادی از ژله وارتون انسانی بود احتمال می رفت که این سلول ها در برابر سیتوکین های موش عکس العملی نشان ندهند اما در طول این پژوهش مشاهده شد که سلول های انسانی دارای گیرنده های برای سیتوکین های موش هستند و نتیجه گیری شد که به احتمال زیاد رسپتورهای موش و انسان هیچ گونه اختلافی باهم نداشته باشند.

نتیجه گیری

روش کشت بافتی برای جداسازی سلول های بنیادی ژله وارتون انسانی مناسب می باشد و تمایز آن ها تحت تأثیر فاکتورهای رشدی عصاره بافت ریه موش به سلول های خونی امکان پذیر می باشد به عبارت دیگر در آینده می توان با تأثیر عصاره بافت ریه اهدایی انسان یا سایتوکاین های تجاری با منشا انسانی، سلول خونی صددرصد انسانی ایجاد کرد که برای بسیاری از بیماری های خونی در کلینیک ها مورد استفاده قرار گیرد.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله از کلیه پرسنل مرکز سلول درمانی و درمان ناباروری استان اردبیل و همچنین بخش زنان زایمان بیمارستان علوی اردبیل و کارشناسان مرکز بهداشت اردبیل که ما را در این پژوهش یاری نمودند، سپاسگزاری می نماییم و از دانشگاه علوم تحقیقات تهران بابت تامین بودجه پژوهش کمال تشکر را داریم.

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2025-09-16]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1391.2.8.2.1]

منابع

(۱)حیاتی رودباری ن، پریور ک، محسنی کوچ اصفهانی ه، یغمایی پ. مطالعه تأثیر فاکتورهای رشد عصاره شش موش بالغ بر تمایز سلول های بنیادی بند ناف جنین به سلول های خونی در شرایط In vitro . مجله علوم پزشکی دانشگاه آزاد اسلامی. بهار ۸۸؛ شماره ۱: ۴۷-۴۱.

(2)Chen K, Wang D, Yang ShG, Zhu D, Bayard F, Han ZhCh . Human Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cells hUC-MSCs exert Immunosuppressive Activities Through a PGE2-Dependent Mechanism. Clinical Immunology, 2010; 135: 448–458

(3)Evans T. Developmental Biology of Hematopoiesis. Hematol Oncol Clin North Am, 1997;11(6):1115–47.

(4)Filiz AA, Rahime B, Levent Keskin H, Esra AK . Positive Correlation Between the Quantity of Wharton's Jelly in the Umbilical Cord and Birth Weight. Taiwanese Journal of Obstetrics & Gynecology, 2011; 50: 33-36.

(5)Garland JM, Editor. The Cytokine Handbook. London:Academic Press, 1994; 30:p. 615.

(6)Garland JM, Quesenberry PJ, Hilton DJ, Editors. Colony-Stimulating Factors: Molecular and Cellular Biology. Marcell Dekker, 1997; 2nd ed.

(7)Gronthos S, Simmons PJ. The Growth Factor Requirements of STRO-1-Positive Human Bone Marrow Stromal Precursors under Serum-Deprived Conditions in Vitro. Blood 1995;85:929–40.

(8)Kadner A, Hoerstrup SP, Tracy J. Human Umbilical Cord Cells: a New Cell Source for Cardiovascular Tissue Engineering. Ann Thorac Surg , 2002;74:S1422–8.

(9)Karahuseyinoglu S, Cinar O, Kilic E. Biology of the Stem Cells in Human Umbilical Cord Stroma: in Situ and in Vitro Surveys. STEM CELLS, 2007;25:319–331.

(10)Koyama S, Sato E, Masubuchi T, Takamizawa A, NomuraH, Kubo K, Nagai S, and Izumi T. Human lung Fibroblasts Release Chemokinetic Activity for Monocytes Constitutively. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 1998; 275: L223–L230.

(11)Kuznetsov SA, Friedenstein AJ, Robey PG. Factors Required for Bone Marrow Stromal Fibroblast Colony Formation in Vitro. Br J Haematol 1997;97:561–70.

(12)Metcalf D, Nicola NA. The Hemopoietic Colony-Stimulating Factors: from Biological to Clinical Applications. NY: Cambridge University Press; 1995.

(13)Mitchell KM, Weiss ML, Mitchell BM, Martin Ph, Davis D, Morales L, Helwig B, Beerenstrauch M, Abou-Easa Kh, Hildreth T, Troyer D . Matrix Cells from Wharton's Jelly Form Neurons and Glia. Stem Cells 2003;21:50-60

(14)Rao MS . Stem Sense: a Proposal for the Classification of Stem Cells. Stem Cells Dev, 2004; 13(5):452–455.

(15)Reddy EP, Korapati A, Chaturvedi P . IL-3 Signaling and the Role of Src Kinases, JAKs and STATs: a Covert Liaison Unveiled. Oncogene, 2000;19(21):2532–47.

(16)Sarugaser R, Lickorish D, Baksh D,Hosseini MM, Davies JE. Human Umbilical Cord Perivascular (HUCPV) Cells: a Source of Mesenchymal Pro-Genitors. Stem Cells, 2005;23:220-9.

(17)Steven M. Hoynowski, Madeline M. Fry , Bryn M. Gardner, Matthew T. Leming ,Jeanell R. Tucker, Linda Black , Theodore Sand , Kathy E. Mitchell. Characterization and Diferentiation of Equine Umbilical Cord-Derived Matrix Cells. Biochemical and Biophysical Research Communications 2007; 362: 347–353.

(18)Troyer DL, Weiss ML. Wharton's Jelly-Derived Cells are a Primitive Stromal Cell Population. Stem Cells. 2008; 26: 591.

(19)Venugopal P, Balasubramanian S, Majumdar AS, Ta M. Isolation, Characterization, and Gene Expression Analysis of Wharton's Jelly-Derived Mesenchymal Stem Cells Under Xeno-Free Culture Conditions. Stem Cells and Cloning: Advances and Applications. 2011;4: 39–50.

(20)Wang HSh, Hung ShCh, Peng ShT, Lai MCh, Chena ChCh . Mesenchymal Stem Cells in the Wharton's Jelly of the Human Umbilical Cord.Stem Cells, 2004;22:1330–1337.

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2025-09-16]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1391.2.8.2.1]