مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی کردستان/ دوره چهاردهم/ بهار ۱۳۸۸/ ۲۲-۹

القای تمایز سلول‌های بنیادی مغز استخوان موش صحرایی به سمت سلول‌های کبدی و بررسی فاکتورهای بیوشیمیایی آنها

محمد عبدی[۱]، دکتر نسرین شیخ[۲]، دکتر ایرج امیری[۳]، دکتر فردین فتحی[۴]، دکتر مسعود سعیدی جم[۵]

۱- مربی، گروه علوم آزمایشگاهی، دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی کردستان، سنندج، ایران تلفکس: ۶۶۶۴۶۷۲-۰۸۷۱ m_abdi355@yahoo.com

۲- استادیار گروه بیوشیمی و تغذیه، دانشگاه علوم پزشکی همدان، همدان، ایران

۳- استادیار گروه علوم تشریح، دانشگاه علوم پزشکی همدان، همدان، ایران

۴- دانشیار گروه علوم تشریح، مرکز تحقیقات گوارش و کبد، دانشگاه علوم پزشکی کردستان، سنندج، ایران

۵- استادیار گروه پاتولوژی و ژنتیک، دانشگاه علوم پزشکی همدان، همدان، ایران

چکیده

زمینه و هدف: سلول‌های مزانشیمی مغز استخوان (MSCs) چند استعدادی بوده و می‌توانند در شرایط مختلف به بافت‌های تخصص یافته‌ای تمایز یابند. هدف از این مطالعه القای تمایز سلول‌های بنیادی مغز استخوان موش صحرایی به سمت هپاتوسیت‌ها توسط فاکتور رشد فیبروبلاستی پایه (bFGF) و فاکتور رشد کبدی (HGF) و انکوستاتین M (OSM) می‌باشد، تا اینکه بتوان از این سلول‌ها برای تولید کبدهای مصنوعی و پیوند کبد بهره گرفت.

روش بررسی: در این تحقیق MSC ها از مغز استخوان موش‌های صحرایی جدا شده و در محیط کشت سلولی DMEM-LG+15%FBS کشت داده شد. این سلول‌ها با محیط تمایزی حاوی HGF، bFGF و انکوستاتین M (OSM) به مدت ۲۴ روز تیمار شدند. بررسی‌های مورفولوژیکی، بیوشیمیایی و RT-PCR برای تشخیص تمایز به سلول‌های کبدی به کار گرفته شد.

یافته‌ها: پس از تمایز MSC ها به صورت گرد درآمده بودند، در حالیکه سلول‌های تمایز نیافته ظاهری فیبروبلاستیک داشتند. تولید آلبومین، اوره و آلفا فیتو پروتئین در سلول‌های تمایز یافته انجام شده بود. فعالیت آنزیمی آلکالن فسفاتاز به وسیله روش‌های بیوشیمیایی مورد تائید قرار گرفت. تولید mRNA مربوط به ژن‌های ویژه کبدی، CK-18 و تیروزین آمینو ترانسفراز (TAT)، در سلول‌های تمایز یافته توسط روش RT-PCR، پس از القاء شرایط تمایزی ثابت گردید.

نتیجه‌گیری: MSC های حاصل از مغز استخوان موش صحرایی قابلیت تمایز به سلول‌های کبدی را در حضور HGF، bFGF و OSM و در محیط In vitro دارا هستند. سیتوکین‌ها ممکن است نقش مهمی در تمایز MSC های موش صحرایی به سلول‌های کبدی ایفا کنند. MSC های مشتق از مغز استخوان به عنوان منبع جدیدی در سلول درمانی برای درمان بیماری‌های کبدی در نظر گرفته می‌شوند.

کلید واژه‌ها: سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان، سلول‌های کبدی، تمایز سلولی، سلول‌های بنیادی

وصول مقاله: ۸۷/۱۰/۱۹ اصلاح نهایی: ۸۷/۱۲/۵ پذیرش مقاله: ۸۷/۱۲/۱۷

مقدمه

پیوند کبد یکی از موثرترین راههای درمانی برای افراد مبتلا به نارسائی‌های مزمن یا حاد کبدی می‌باشد (۱)، با این حال تعداد کمی از بیماران توانائی دریافت کبد را خواهند داشت. از این رو نیاز به جایگزینی راههای درمانی بهتر با پیوند کبد ضروری به نظر می‌رسد. کبدهای مصنوعی یا پیوند سلول‌های کبد، از

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-11-01]

ایده‌های مطرح شده‌ای می‌باشند که کارهایی بر روی آنها صورت گرفته است (۲,۳). به دلیل کمبود اهداکنندگان سلول‌های کبدی بایستی راههای دیگری برای به دست آوردن سلول‌های کبدی پیدا کرد. سلول‌های بنیادی که دارای قابلیت خودسازی بوده و می‌توانند به انواع گوناگون سلول‌ها تمایز یابند به عنوان یکی از گزینه‌های مورد نظر برای تهیه سلول‌های کبدی مورد بررسی قرار گرفتند (۴). در مغز استخوان دو نوع سلول بنیادی وجود دارد: سلول‌های بنیادی خونساز[1] و سلول‌های بنیادی مزانشیمی[2]. MSC های مشتق از بافت بالغین نظیر مغز استخوان منبعی از سلول‌های پیش ساز را ارائه می‌دهند که جهت کاربردهای مهندسی بافت و پزشکی ترمیمی حائز اهمیت می‌باشند. برخی از مطالعات تمایز سلول‌های MSC به رده‌های سلولی مزودرمی همچون استئوبلاست‌ها (۷-۵)، آدیپوسیت‌ها (۱۰-۸)، سلول‌های مغزی و نورون‌ها (۱۴-۱۱) و کاردیومیوسیت‌ها (۱۷-۱۵) را در محیط in vitro و محیط in vivo گزارش کرده‌اند. مطالعات اخیر نیز ثابت کرده‌اند که مغز استخوان بالغ، دارای سلول‌هایی است که قابلیت تمایز به سلول‌های اپیتلیال کبدی را در محیط in vitro دارند (۲۱-۱۸). نقش فاکتور رشد کبدی، Hepatocyte Growth Factor (HGF)، به عنوان یک عامل مهم در رشد و نمو کبد ثابت شده است. HGF سبب تحریک رشد هپاتوسیت‌ها، سلول‌های اپیتلیال توبول‌های کلیوی، کراتینوسیت‌های اپیدرم و ملانوسیت‌ها می‌گردد (۲۲). سیتوکین‌های دیگر نیز مانند; فاکتور رشد اپیدرمی Epidermal Growth Factor (EGF) و انسولین نقش مهمی در نمو و باز تولید کبد ایفا می‌کنند (۲۳). سؤالی که در اینجا مطرح می‌شود این است که در محیط In vitro کدام عامل سبب القای تمایز سلول‌های بنیادی به سلول‌های کبدی می‌گردد. برخی از پاسخ‌هایی که در این زمینه مطرح شده عبارتند از: HGF (۲۶-۲۴)، HGF و EGF (۲۷) و در نهایت HGF و فاکتور رشد فیبروبلاستی Fibroblast Growth Factor (FGF) (۲۵). یکی از محل‌های اصلی سنتز آنزیم آلکالن فسفاتاز (Alkaline Phosphatase ALP, EC 3.1.3.1) سلول‌های کبدی می‌باشد. این سلولها ALP کبدی را تولید می‌کنند، که معلوم شده در کبد به سطح کانالیکولار سلول‌ها متصل می‌شود. به نظر می‌رسد مکانیسم‌های مختلفی برای آزاد شدن ALP از سلول‌ها وجود داشته باشد که منجر به فرم‌های مختلف ALP در پلاسما می‌شود. هیچگونه مطالعه‌ای که قبلاً میزان فعالیت آنزیم آلکالن فسفاتاز را در سلول‌های کبدی حاصله از تمایز سلول‌های بنیاد مورد بررسی قرار داده باشد وجود ندارد. این در حالیست که این آنزیم به عنوان یکی از مشخصه‌های اصلی سلول‌های کبدی و استئوبلاست‌ها مد نظر می‌باشد و اعمال آن در کبد برای حفظ هموستاز بدن بسیار با اهمیت می‌باشد. به همین دلیل در این مطالعه ما بر آن شدیم تا فعالیت این آنزیم را در سلول‌های کبدی تولیدی مورد بررسی قرار دهیم. صرف نظر از این مطلب که MSC ها دارای انعطاف پذیری خاص سلول‌های بنیادی هستند، این حقیقت که این سلول‌ها توانایی تبدیل شدن به سلول‌های کبدی را در محیط In vitro دارا هستند، می‌تواند به عنوان یک راه درمانی برای درمان بیماری‌های وراثتی یا از بین برنده کبدی مورد نظر قرار گیرد. MSC ها ممکن است همچنین جهت کاربردهای ژن درمانی مورد توجه باشند که در این صورت برای استخراج محصولات ژن یا

1. Hematopoietic stem cells (HSCs)
2. Mesenchymal stem cells (MSCs)

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-11-01]

ژن‌هایی مورد استفاده واقع می‌شوند. سلول‌های مزانشیمی مغز استخوان چند استعدادی[1] بوده و لذا می‌توانند در شرایط مختلف به سلولهای بالغ تخصص یافته تمایز پیدا کنند. هدف از این مطالعه تمایز سلول‌های بنیادی مغز استخوان موش صحرایی به سلولهای کبدی و ارزیابی فعالیت آلکالن فسفاتازی سلولهای حاصل از تمایز از طریق روشهای بیوشیمیایی می‌باشد.

روش بررسی

این مطالعه در مرکز تحقیقات پزشکی مولکولی دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی استان همدان به انجام رسید.

مواد: رت‌های سفید نرمال (+/+) ۳ تا ۴ هفته‌ای نژاد Sprague-Dawley (SD) از مؤسسه تحقیقاتی سرم سازی رازی تهیه و در حیوان خانه دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی همدان نگهداری می‌شدند. این جانوران در قفس‌هایی با طول، عرض و ارتفاع به ترتیب ۴۵×۳۰×۱۵ سانتیمتر نگهداری شده و از زمان تولد تا انجام مراحل آزمایش از نظر دما، نور، تغذیه و سایر عوامل محیطی تحت کنترل بودند.

Dulbecco's Modified Eagle Medium-Low Glucose (DMEM-LG) و سرم FBS (Fetal Bovine Serum) از شرکت Gibco-BRL (Life Technology, Paisley, United Kingdom) خریداری گردید. Trypsin-EDTA 0.25%، پنی‌سیلین-استرپتومایسین (Pen-Strep)، PBS (Phosphate buffered saline)، BSA (Bovine Serum Albumin)، اسید آسکوربیک، دگزامتازون، انسولین - ترانسفرین - سلنیوم (ITS)، انکوستاتین M (OSM) و فاکتور رشد کبدی (HGF) از شرکت سیگما (Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri 63103 USA) تهیه شدند. فاکتور رشد فیبروبلاستی بازی (bFGF) از شرکت R&D (R&D System, Inc, USA) برای انجام کار فراهم شد. کیت تشخیصی آلبومین از شرکت زیست شیمی (زیست شیمی، تهران، ایران) و کیت تشخیصی اوره و آلکالن فسفاتاز به روش رنگ سنجی از شرکت پارس آزمون ایران (پارس آزمون، تهران، ایران) خریداری شد. کیت تشخیصی آلفا فیتوپروتئین به روش ایمنواسی (ELISA) از شرکت پیشتاز طب ایران (Pishtaz Teb Diagnostics, Tehran-Iran) تهیه شد. کیت استخراج RNA (RNXTM (-Plus) ISOLATION OF RNA) از شرکت سیناژن (سیناژن، تهران-ایران) خریداری شد.

جدا سازی و تمایز سلولهای بنیادی مزانشیمی به سلول‌های کبدی: جهت جداسازی سلول‌های بنیادی مزانشیمی از مغز استخوان رت، انتهای پروگزیمال ودیستال استخوان‌های فمور و تیبیا، توسط استخوان بر ظریف قطع شد و مغز استخوان آنها از طریق تزریق محیط کشت به داخل کانال مرکزی استخوان تخلیه شده و پس از سانتریفیوژ نمونه‌ها با دور ۱۰۰۰ rpm، محیط کشت روئی دور ریخته شد و ته نشت سلولی در محیط کشت DMEM حاوی سرم جنین گاوی ۱۰٪ معلق شده و به فلاسک‌های کشت ۲۵ cm^2 (NUNC) منتقل شدند. سپس در انکوباتور حاوی Co_2 به میزان ۵٪ کشت داده شدند، سلولهای مزانشیمی از طریق اتصال به کف ظروف پلاستیکی رشد کردند، بتدریج در طی تعویض محیط کشت (دو الی سه روز یکبار) سلول‌های خونی و خونساز به دلیل عدم توانائی در اتصال به کف ظروف کشت از سلول‌های مزانشیمی جدا و حذف شدند. سلول‌های مزانشیمی باقیمانده هر دو الی سه روز یکبار پاساژ داده شدند (۲۸,۲۹).

1. Multipotent

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-11-01]

برای تمایز سلول‌های MSC به سلول‌های کبدی از پاساژ سوم سلول‌های بنیادی بهره گرفته شد. بدین صورت که پس از انجام پاساژ سلولی، هنگامی که تراکم سلولی در پلیت‌ها به ۶۰ تا ۷۰ درصد رسید، محیط کشت عادی را از ظرف‌های کشت خارج ساخته و با محیط کشت تمایزی تعویض کردیم. محیط کشت مخصوص جهت هدایت سلول‌های بنیادی به سمت تبدیل شدن آنها به سلول‌های کبدی از قبل تهیه شده بود. با توجه به مطالعاتی که قبلاً در زمینه تمایز سلولی انجام گرفته (۳۵)، برای تهیه این محیط از فاکتور رشد کبدی به غلظت ۲۰ ng/µl، فاکتور رشد فیبروبلاستی بازی به غلظت ۱۰ ng/µl و انکوستاتین M به غلظت ۲۰ ng/µl استفاده گردید. فرایند القای تمایز تا روز ۲۴ ادامه یافت.

سنجش اوره، آلبومین و فعالیت آنزیمی آلکالن فسفاتاز به کمک روش رنگ سنجی: نمونه‌های محیط کشت نگهداری شده در فریزر برای اندازه‌گیری میزان آلبومین و اوره تولیدی توسط سلول‌های کبدی و بررسی فعالیت آنزیم آلکالن فسفاتاز در آنها مورد استفاده قرار گرفت. گروه کنترل که به عنوان کنترل منفی به کار گرفته شد، شامل سلول‌های کشت داده شده در محیط کشت عادی (DMEM-LG 10% FBS) بودند. برای سنجش‌های فوق از کیت‌های رنگ سنجی استفاده گردید.

سنجش آلفا فیتوپروتئین به کمک ایمنو اسی: برای انجام آزمایش از دستگاه ریدر الیزا با طول موج ۴۵۰ نانومتر بهره گرفته شد. غلظت AFP در محیط‌های تعویضی در روزهای ۳، ۶، ۹،۱۲،۱۵، ۱۸، ۲۱ و ۲۴ تعیین گردید. مراحل انجام آزمایش مطابق دستورالعمل کیت انجام گرفت.

استخراج Total RNA و آنالیز RT-PCR: RNA تمام سلول‌های مورد بررسی با استفاده از کیت استخراج RNA شرکت سیناژن و با توجه به دستورالعمل کیت استخراج گردید. برای اطمینان یافتن از کیفیت RNA استخراج شده از الکتروفورز روی ژل آگارز و اسپکتروفوتومتری استفاده شد. کیت انجام PCR (PCR SET System) از شرکت سیناژن (CinnaGen Inc, Tehran, Iran)، کیت سنتز cDNA (RevertAidTM First Strand cDNA Synthesis Kit از شرکت فرمنتاز (Fermentas International Inc, Harrington Court, Canada) خریداری شدند. واکنش RT در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر و به مدت ۶۰ دقیقه در دمای۴۲ درجه انجام گرفت. پس از تهیه cDNA، واکنش PCR جهت تکثیر قطعه مورد نظر انجام گرفت. واکنش PCR در حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر انجام شد. برای انجام کار، با توجه به مطالعات قبلی انجام شده در این زمینه دو جفت پرایمر برای ژنهای Cytokeratin-18 (CK-18) بر اساس کار گروه Sai-Nan Shu و همکاران (۳۰) و تیروزین آمینو ترانسفراز (TAT) بر اساس کار گروه Xiao-Lei SHI و همکاران (۳۱) انتخاب و برای سنتز به شرکت طوبی نگین تهران سفارش داده شد. پرایمرها توسط شرکت Metabion کشور آلمان سنتز شدند. مشخصات پرایمرهای مورد استفاده در جدول ۱ ذکر شده است.

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-11-01]

جدول ۱: مشخصات پرایمرهای مورد استفاده برای انجام PCR

نام ژن	طول محصول	مشخصات پرایمرها	جفت باز	Tm
TAT	۲۰۶ Bp	F: 5'-ACCTTCAATCCCATCCGA-3' R: 5'-TCCCGACTGGATAGGTAG-3'	۱۸ ۱۸	54 °C 56 °C
CK-18	۵۱۵ Bp	F: 5'-GGACCTCAGCAAGATCATGGC-3' R: 5'-CCACGATCTTACGGGTAGTTG-3'	۲۱ ۲۱	62 °C 60 °C

واکنش PCR برای ژن CK-18 تا ۳۵ سیکل، Denaturation در °C ۹۴ به مدت ۱ دقیقه، Annealing در °C ۶۰ به مدت ۱ دقیقه، Extension در °C ۷۲ به مدت ۱ دقیقه و Extension نهایی در °C ۷۲ به مدت ۵ دقیقه صورت گرفت. واکنش PCR برای ژن TAT تا ۳۰ سیکل، Denaturation در °C ۹۴ به مدت ۱ دقیقه، Annealing در °C ۵۵ به مدت ۱ دقیقه، Extension در °C ۷۲ به مدت ۱ دقیقه و Extension نهایی در °C ۷۲ به مدت ۵ دقیقه صورت گرفت.

یافته‌ها

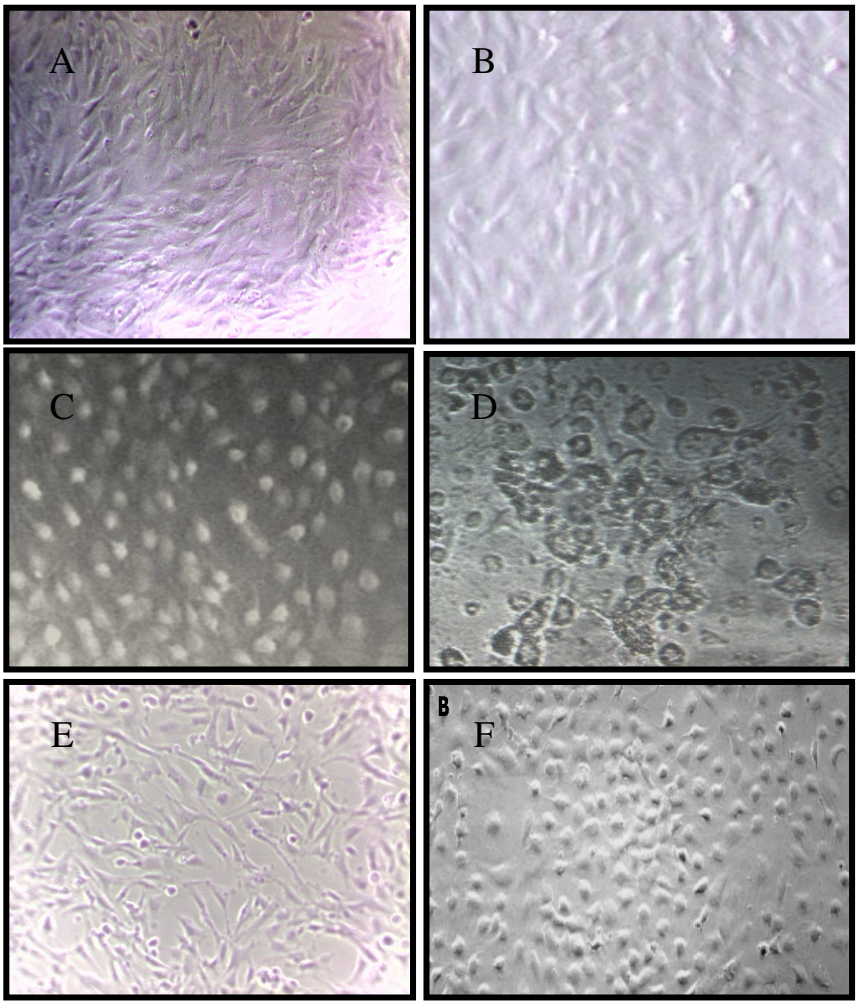
تغییر در مورفولوژی سلولی: در حضور فاکتور رشد کبدی و فاکتور رشد فیبروبلاستی پایه، تکثیر سلول‌های MSC متوقف شده و به تدریج و در طول دوره تمایزی ظاهر دوکی شکل سلول‌های MSC از بین رفته و سلول‌ها به لحاظ مورفولوژی به تدریج ظاهری پهن و مکعبی پیدا کردند (شکل ۱).

مشاهدات مربوط به فعالیت‌های عملکردی سلول‌های کبدی تمایز یافته: سنتز اوره، آلبومین و آلفا فیتوپروتئین و فعالیت آنزیمی آلکالن فسفاتاز در دیش‌هایی که تیمار روی آنها انجام گرفته بود و همچنین دیش‌های کنترل، در روزهای مختلف مورد بررسی قرار گرفت. غلظت اوره در سلول‌های تمایز نیافته در حد صفر بود. در حالیکه در دیش‌های تیمار یافته در روز سوم اوره ترشح شده بود و میزان آن به تدریج در طی تمایز افزایش یافته بود، بطوریکه در روز هجدهم به بیشترین میزان خود رسیده بود (نمودار ۱). در دیش‌های تیمار یافته از روز دوازدهم آلبومین ترشح شده و میزان آن به تدریج در طی تمایز افزایش یافته بود، بطوریکه در روز بیست وچهارم به بیشترین میزان خود رسیده بود (نمودار ۲). فعالیت آنزیمی ALP نیز از روز ۹ تمایز به بعد قابل پایش بود و در روز ۲۴ به حداکثر میزان خود رسیده بود (نمودار ۳). در مورد آلفا فیتوپروتئین، تنها از روز بیست و یکم تمایز به بعد بود که توانستیم تولید این پروتئین را در نمونه‌های تیمار یافته پایش نمائیم. به عبارتی احتمالاً تولید آلفا پروتئین در طول روزهای هجدهم تا بیست و یکم از تمایز صورت گرفته است. در روز بیست و چهارم نیز غلظت AFP به میزان کمی افزایش یافته بود (نمودار ۴).

مشاهدات مربوط به بیان ژن‌های ویژه کبدی در سلول‌های کبدی تمایز یافته: سلول‌های تمایز نیافته موجود در محیط کشت پس از گذشت ۲۴ روز برای

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-11-01]

بیان ژن‌های CK-18 و TAT مورد بررسی قرار گرفتند، این سلول‌ها ژنهای CK-18 و TAT را بیان نکرده بودند. قبل از اینکه سلول‌های مورد آزمایش را تحت شرایط تمایزی قرار دهیم، آنها را از نظر بیان ژنهای CK-18 و TAT مورد بررسی قرار دادیم. این سلول‌ها دو ژن مذکور را بیان نکرده بودند. پس از گذشت ۲۴ روز مجدداً این سلول‌ها را از لحاظ بیان ژن‌های نامبرده بررسی کردیم و توانستیم بیان ژن‌های CK-18 و TAT را در این سلول‌ها تشخیص دهیم. طول قطعه تولیدی در مورد ژن TAT، ۲۰۶ و در مورد ژن CK-18، ۵۱۵ جفت باز بود (شکل‌های ۲ و۳).



شکل ۱. تغییر در مورفولوژی سلولی در طی ۲۴ روز تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی به سلول‌های کبدی؛ A) سلول‌های تیمار یافته پس از ۶ روز. B) سلول‌های تیمار یافته پس از ۱۲ روز. C) سلول‌های تیمار یافته پس از ۱۸ روز. D) سلول‌های تیمار یافته پس از ۲۴ روز. E) سلول‌های تیمار نیافته. F) سلول‌های کبدی (۳۰). (بزرگنمایی تمامی اشکال ۲۰۰X می‌باشد)

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-11-01]

مشاهدات مربوط به فعالیت‌های عملکردی سلول‌های کبدی تمایز یافته: سنتز اوره، آلبومین و آلفا فیتوپروتئین و فعالیت آنزیمی آلکالن فسفاتاز در دیش‌هایی که تیمار روی آنها انجام گرفته بود و همچنین دیش‌های کنترل، در روزهای مختلف مورد بررسی قرار گرفت. غلظت اوره در سلول‌های تمایز نیافته در حد صفر بود. در حالیکه در دیش‌های تیمار یافته در روز سوم اوره ترشح شده بود و میزان آن به تدریج در طی تمایز افزایش یافته بود، بطوریکه در روز هجدهم به بیشترین میزان خود رسیده بود (نمودار ۱).

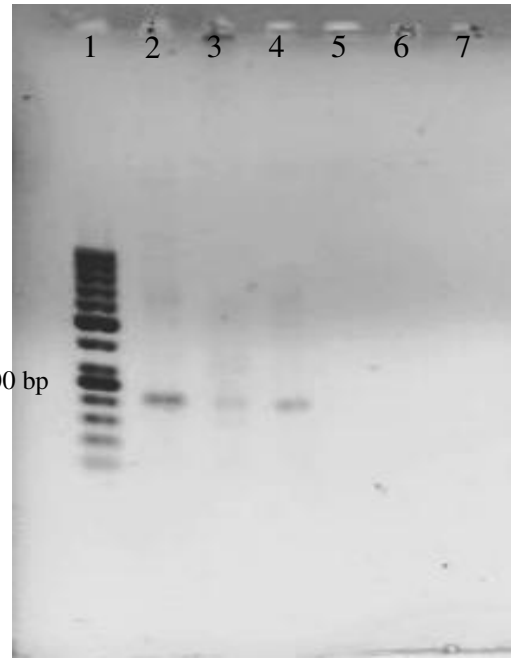
در دیش‌های تیمار یافته از روز دوازدهم آلبومین ترشح شده و میزان آن به تدریج در طی تمایز افزایش یافته بود، بطوریکه در روز بیست وچهارم به بیشترین میزان خود رسیده بود (نمودار ۲).

فعالیت آنزیمی ALP نیز از روز ۹ تمایز به بعد قابل پایش بود و در روز ۲۴ به حداکثر میزان خود رسیده بود (نمودار ۳).

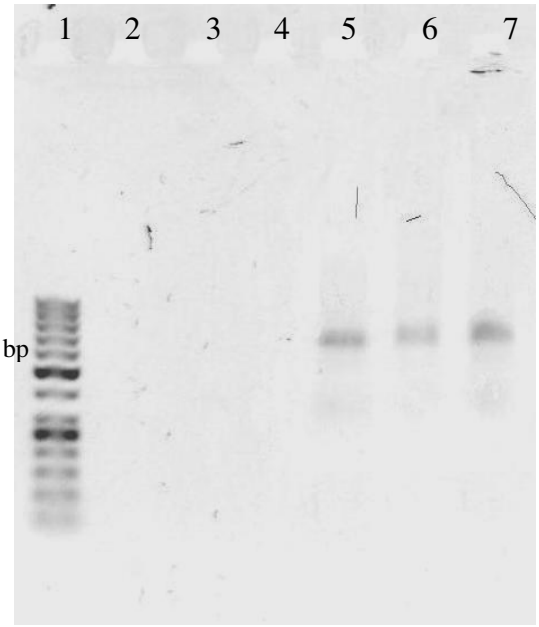
در مورد آلفا فیتوپروتئین، تنها از روز بیست و یکم تمایز به بعد بود که توانستیم تولید این پروتئین را در نمونه‌های تیمار یافته پایش نمائیم. به عبارتی احتمالاً تولید آلفا پروتئین در طول روزهای هجدهم تا بیست و یکم از تمایز صورت گرفته است. در روز بیست و چهارم نیز غلظت AFP به میزان کمی افزایش یافته بود (نمودار ۴).

مشاهدات مربوط به بیان ژن‌های ویژه کبدی در سلول‌های کبدی تمایز یافته: سلول‌های تمایز نیافته موجود در محیط کشت پس از گذشت ۲۴ روز برای بیان ژن‌های CK-18 و TAT مورد بررسی قرار گرفتند، این سلول‌ها ژنهای CK-18 و TAT را بیان نکرده بودند. قبل از اینکه سلول‌های مورد آزمایش را تحت شرایط تمایزی قرار دهیم، آنها را از نظر بیان ژنهای CK-18 و TAT مورد بررسی قرار دادیم. این سلول‌ها دو ژن مذکور را بیان نکرده بودند. پس از گذشت ۲۴ روز مجدداً این سلول‌ها را از لحاظ بیان ژن‌های نامبرده بررسی کردیم و توانستیم بیان ژن‌های CK-18 و TAT را در این سلول‌ها تشخیص دهیم. طول قطعه تولیدی در مورد ژن TAT، ۲۰۶ و در مورد ژن CK-18، ۵۱۵ جفت باز بود (شکل‌های ۲ و۳).

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-11-01]



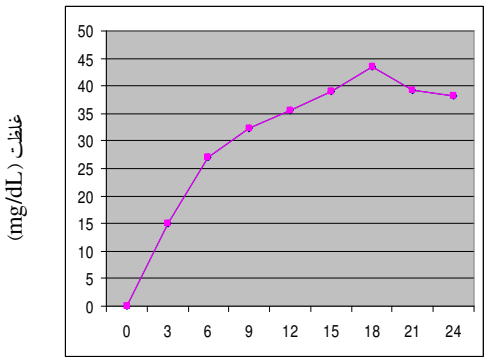
شکل ۲: بیان ژن TAT در نمونه‌های کنترل و تست؛
۱-Ladder ۵۰ جفت بازی. ۲- سلول کبدی (کنترل مثبت).
۳و ۴- سلول‌های کبدی تولیدی پس از القای شرایط تمایزی.
۵- سلول قلبی بالغ (کنترل منفی). ۶- سلول‌های تیمار نشده پس از ۲۴ روز.
۷- سلول‌های MSC تازه آسپیره شده.



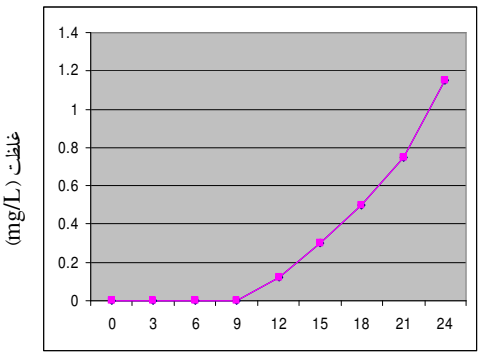
شکل ۳: بیان ژن CK-18 در نمونه‌های کنترل و تست؛
۱- Ladder ۵۰ جفت بازی. ۲- سلول قلبی بالغ (کنترل منفی).
۳- سلول‌های تیمار نشده پس از ۲۴ روز. ۴- سلول‌های MSC تازه آسپیره شده.
۵- سلول کبدی (کنترل مثبت).
۶ و ۷- سلول‌های کبدی تولیدی پس از القای شرایط تمایزی.

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-11-01]

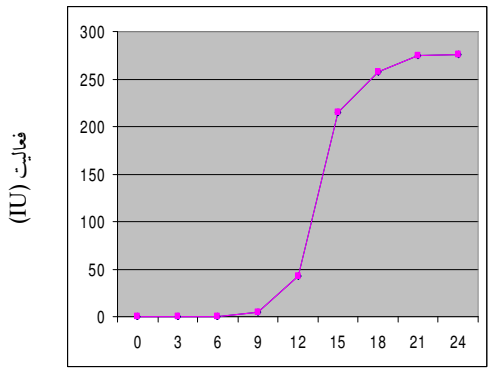
نمودار ۱: غلظت اوره



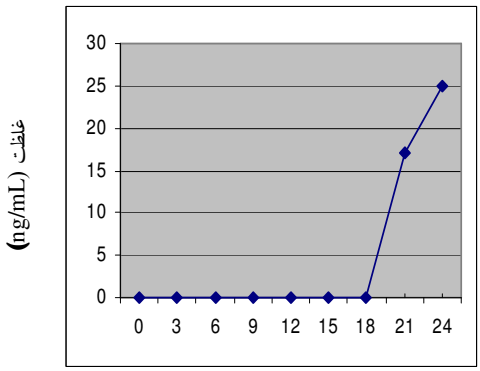
نمودار۲: غلظت آلبومین



نمودار ۳: فعالیت آلکالن فسفاتاز



نمودار ۴: غلظت آلفا فیتو پروتئین



بحث

در این پژوهش تلاش گردید تا سلول‌های مزانشیمی مغز استخوان موش صحرایی تخلیص شده و پس از تمایز آنها به سلول‌های کبدی، فنوتیپ و ژنوتیپ این سلول‌ها با انجام ارزیابی‌های بیوشیمیایی و مولکولی (RT-PCR) تائید گردد. در این مطالعه برای جداسازی و خالص سازی سلول‌های MSC از تعویض محیط و پاساژ سریع برای تهیه خلوص بهتر و مناسب‌تر از MSC ها استفاده گردید، برای تمایز سلول‌های ذکر شده به سلول‌های کبدی محیط تمایزی متشکل از HGF، FGF-2 و OSM مورد استفاده واقع شد که در آن سلول‌های کبدی در حضور HGF، FGF-2 و OSM در محیط کشت به وجود آمده بودند. برای تایید تولید سلول‌های کبدی مجموعه‌ایی از تست‌های تشخیصی به کار رفت.

Xiao-lei SHI و همکاران (۳۱) و Xin-Qin Kang و همکاران (۳۲) که تولید آلبومین را در سلول‌های کبدی مشتق از سلول‌های مغز استخوان مطالعه می‌کردند، دریافتند که آلبومین در سلول‌های تازه آسپیره شده از مغز استخوان و سلول‌های کشت داده شده در محیط عادی تولید نمی‌شود، اما آنها توانستند به ترتیب تولید آلبومین را پس از گذشت ۶ و ۱۲ روز از

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-11-01]

آغاز تمایز در سلول‌های تمایز یافته موش تشخیص دهند. تولید آلبومین به ترتیب در روز ۱۵ و ۲۴ پس از القای شرایط تمایزی به حداکثر میزان خود رسید، پس از آن از غلظت آلبومین در محیط کشت کاسته شد. ما در این تحقیق توانستیم تولید آلبومین را در سلول‌های شبه کبدی مشتق از سلول‌های MSC مغز استخوان رت پس از گذشت ۱۲ روز از آغاز القای شرایط تمایزی به اثبات برسانیم. بایستی یادآوری کرد میزان این پروتئین از روز اول کشت مورد بررسی قرار گرفت، از روز ۱۲ به بعد میزان این ماده در محیط کشت تمایزی به تدریج افزایش پیدا کرد، بطوریکه در روز ۲۴ به حداکثر میزان خود رسید. در محیط کشت سلول‌هایی که مورد تیمار قرار نگرفته بودند پس از گذشت ۱۲ روز آلبومین به میزان کمی قابل تشخیص بودند، اما این میزان بسیار کم بوده و در حد صفر در نظر گرفته شد.

Xiao-lei SHI و همکاران (۳۱) توانستند تولید اوره را پس از گذشت ۳ روز از آغاز تمایز در سلول‌های تمایز یافته حاصل از MSC های موش تشخیص دهند. میزان تولید اوره در روز ۱۵ به حداکثر میزان خود رسید. در مطالعه‌ای که توسط Xin-Qin Kang و همکاران (۳۳) روی هپاتوسیت‌های تمایز یافته از سلول‌های مغز استخوان صورت گرفت، ترشح اوره در محیط کشت تمایزی از روز ۲۱ پس از آغاز القای شرایط تمایز آغاز گردید، میزان غلظت این ماده در روز ۲۴ افزایش جزیی پیدا کرد که البته در مقایسه با گروه کنترل دارای اختلاف معنی‌داری بود. بایستی ذکر شود که مقادیری که این گروه تحقیقاتی به دست آورد چه در مورد گروه‌های کنترل و چه در مورد گروه‌های تست، از روز ۲۱ به بعد قابل پایش بود. در مطالعه دیگری که توسط Xin-Qin Kang (۳۳) روی MSC های خون بند ناف انسان انجام گرفت، تولید اوره از روز ۲۰ پس از القای شرایط تمایزی تشخیص داده شد. ما در این مطالعه تولید اوره را پس از گذشت ۳ روز تشخیص دادیم. میزان این ماده از روز اول کشت مورد بررسی قرار گرفت، از روز ۳ به بعد میزان این ماده در محیط کشت تمایزی به تدریج افزایش پیدا کرد، بطوریکه در روز ۱۸ به حداکثر میزان خود رسید و از آن به بعد به میزان کمی کاهش پیدا کرد، که این نتیجه تقریباً با تمامی مطالعات قبلی که در این زمینه انجام شده متفاوت است. در محیط کشت سلول‌هایی که مورد تیمار قرار نگرفته بودند پس از گذشت ۱۸ روز تولید اوره به میزان کمی صورت گرفته بود و با نسبت مشخصی افزایش یافته بود، اما این میزان بسیار کم بوده و به این دلیل صفر در نظر گرفته شد، بین دو گروه مورد مطالعه اختلاف معنی‌داری وجود داشت ($P<0.01$). دلیل کاهش تولید اوره پس از روز ۱۸ از آغاز القای شرایط تمایزی را می‌توان به متابولیسم خاص سلول‌های کبدی ربط داد. احتمالاً تا روز ۱۸ بیان ژن به حداکثر رسیده و در روزهای آتی کاهش یافته است.

در مطالعه Xin-Qin Kang و همکاران (۳۳) میزان AFP در محیط کشت تمایزی از روز ۱۲ پس از آغاز تمایز افزایش یافت، غلظت این ماده در این روز در مقایسه با گروه کنترل از اختلاف قابل توجهی برخوردار بود. این میزان در روز ۲۱ به حداکثر میزان خود رسید و پس از آن، از میزان این پروتئین کاسته شد. در مطالعه‌ای که توسط Sai-Nan Shu و همکارانش انجام گرفت (۳۰) بیان AFP هم در سلول‌های Thy-1.1+ و هم در سلول‌های MSC به طور مداوم مورد پایش قرار گرفت. این دو نوع سلول ژن AFP را بیان می‌کردند. Wei Li و همکارانش (۳۴) توانستند تولید AFP را در روز ۱۴ پس

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-11-01]

از القای شرایط تمایزی در محیط کشت تشخیص دهند. Raquel Talens-Visconti (۳۵) ثابت کردند که میزان بیان ژن پروتئین AFP در نمونه‌های تیمار یافته دارای اختلاف قابل توجهی با گروه کنترل می‌باشد ($P<0.01$). در مطالعه‌ای که توسط حسین بهاروند و همکاران (۳۶) بیان ژن AFP در کشت‌های دو بعدی و سه بعدی سلول‌های کبدی حاصل از سلول‌های بنیادی جنین انسان مورد بررسی قرار گرفت، سلول‌های مورد بحث توانایی بیان ژن AFP را از روز ۸ به بعد دارا بوده‌اند. در مطالعه ما با استفاده از تکنیک ایمنواسی مشخص شد، تولید AFP در سلول‌های شبه کبدی مشتق از سلول‌های MSC مغز استخوان رت پس از گذشت ۲۱ روز انجام شده است. سلول‌هایی که مورد تیمار قرار نگرفته بودند پس از گذشت ۲۴ روز توانایی تولید این پروتئین را نداشتند، اختلاف بین دو گروه معنی‌دار بود ($P<0.01$). این مسأله در مورد سلول‌های تازه آسپیره شده مغز استخوان رت و همچنین سلول‌های بافت قلبی نیز که به عنوان کنترل منفی به کار گرفته شده بودند، صدق می‌کرد.

تاکنون هیچگونه مطالعه‌ای که قبلاً میزان فعالیت آنزیم آلکالن فسفاتاز را در سلول‌های کبدی حاصله از تمایز سلول‌های بنیادی مورد بررسی قرار داده باشد وجود ندارد. پس از روز ۱۲ فعالیت ناچیزی از آنزیم مشاهده گردید. این فعالیت همچنان در طول دوران تمایز ادامه یافت، بطوریکه در روز ۲۴ به نهایت فعالیت خویش رسید. در محیط کشت سلول‌هایی که مورد تیمار قرار نگرفته بودند پس از گذشت ۲۴ روز هیچگونه فعالیت آنزیمی در مورد آلکالن فسفاتاز مشاهده نگردید.

Xiao-lei SHI و همکاران (۳۱) توانستند بیان ژن TAT را پس از ۱۲ روز از آغاز تمایز در سلول‌های تمایز یافته حاصل از MSC های موش تشخیص دهند. در مطالعه حسین بهاروند و همکاران (۳۶) بیان ژن TAT در سلول‌های کبدی حاصل از سلول‌های بنیادی جنین انسان، از روز ۱۲ به بعد رخ داده بود. ما در این تحقیق توانستیم بیان ژن TAT را در سلول های شبه کبدی مشتق از سلول‌های MSC مغز استخوان رت پس از گذشت ۲۴ روز از آغاز القای شرایط تمایزی به اثبات برسانیم. سلول‌هایی که مورد تیمار قرار نگرفته بودند، سلول‌های قلبی و سلول‌های تازه آسپیره شده مغز استخوان توانایی بیان این ژن را نداشتند. لازم به ذکر است با توجه به اینکه نتایج بیان ژن در این مطالعه مربوط به سلول های روز ۲۴ می‌باشد، نمی‌توان عنوان کرد که نتایج حاصله با نتایج گروه‌های دیگر در تناقض است، زیرا ممکن است در صورت بررسی سلول‌ها در روز ۱۲ نیز بتوان بیان ژن را پایش کرد.

Xiao-lei SHI و همکاران (۳۱) دریافتند که CK-18 در سلول های تازه آسپیره شده از مغز استخوان و سلول‌های کشت داده شده در محیط عادی در روز بیست و یکم بیان نمی‌شود، اما آنها توانستند تولید این پروتئین را پس از ۶ روز از آغاز القای شرایط تمایزی در سلول‌های تمایز یافته حاصل از MSC های موش تشخیص دهند. در مطالعه‌ای که توسط Sai-Nan Shu و همکارانش انجام گرفت (۳۰) بیان CK-18 هم در سلول‌های Thy-1.1+ و هم در سلول‌های MSC به طور مداوم مورد پایش قرار گرفت. این دو نوع سلول ژن CK-18 را بیان می‌کردند. Wei Li و همکارانش (۳۴) توانستند تولید CK-18 را در روز ۲۱ پس از القای شرایط تمایزی در محیط کشت تشخیص دهند. Xin-Qin Kang (۳۳) و همکاران نیز، تولید CK-18 را در سلول‌های کبدی مشتق از MSC های خون بند ناف انسان در روز ۱۶ پس از القای شرایط تمایزی تشخیص

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-11-01]

دادند. حسین بهاروند و همکاران (۳۶) بیان ژن CK-18 در کشت‌های دو بعدی و سه بعدی سلول‌های کبدی حاصل از سلول‌های بنیادی جنین انسان مورد بررسی قرار دادند. این گروه دریافتند که سلول‌های مورد بحث توانایی بیان ژن CK-18 را از روز ۸ به بعد دارا هستند. ما در این تحقیق توانستیم بیان ژن CK-18 را در سلول‌های شبه کبدی مشتق از سلول‌های MSC مغز استخوان رت پس از گذشت ۲۴ روز از آغاز القای شرایط تمایزی به اثبات برسانیم. سلول‌هایی که مورد تیمار قرار نگرفته بودند پس از گذشت ۲۴ روز توانایی بیان این ژن را نداشتند. این مسئله در مورد سلول‌های تازه آسپیره شده مغز استخوان رت و همچنین سلول‌های بافت قلبی نیز که به عنوان کنترل منفی به کار گرفته شده بودند، صدق می‌کرد.

نتیجه‌گیری

در مجموع نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که، محیط کشت تمایزی حاوی فاکتورهای رشد (bFGF)، سیتوکین‌ها (HGF و OSM)، هورمون‌ها (دگزامتازون و انسولین) و در نهایت اسید آسکوربیک توانایی تولید سلول‌های کبدی را از سلول‌های بنیادی مزاشیمی مغز استخوان‌داراست. با توجه به اینکه این سلول‌ها بسیار سهل‌الوصول بوده و به میزان زیاد وجود دارند، می‌توان از آنها برای دستیابی به سلول‌های کبدی با مورفولوژی صحیح و عملکرد درست در محیط In vitro و بعدها در محیط In vivo بهره گرفت.

تشکر و قدردانی

از پرسنل مرکز تحقیقات پزشکی مولکولی دانشگاه علوم پزشکی همدان به خاطر همکاری در اجرای مطالعه قدردانی و تشکر می‌گردد.

References

1. Everhart JE, Lombardero M, Detre KM, Zetterman RK, Wiesner RH, Lake JR, et al. Increased waiting time for liver transplantation results in higher mortality. Transplantation 1997; 64: 1300-6.
2. Suh KS, Lilja H, Kamohara Y, Eguchi S, Arkadopoulos N, Neuman T, et al. Bioartifical liver treatment in rats with fulminant hepatic failure: effect on DNA-binding activity of liver-enriched and growth-associated transcription factors. J Surg Res 1999; 85: 243-50.
3. Malhi H, Gupta S. Hepatocyte transplantation: new horizons and challenges. J Hepatobiliary Pancreat Surg 2001; 8: 40-50.
4. Weissman IL. Stem cells: units of development, units of regeneration, and units in evolution. Cell 2000; 100: 157-68.
5. Chen TL, Shen WJ, Kraemer FB. Human BMP-7/OP-1 induces the growth and differentiation of adipocytes and osteoblasts in bone marrow stromal cell cultures. J Cell Biochem 2001; 2: 187-199.
6. Ahdjoudj S, Lasmoles F, Oyajobi BO, Lomri A, Delannoy P, Marie PJ. Reciprocal control of osteoblast/chondroblast and osteoblast/adipocyte differentiation of multipotential clonal human marrow stromal F/STRO-1(+) cells. J Cell Biochem 2001; 1: 23-38.
7. Atmani H, Chappard D, Basle MF. Proliferation and differentiation of osteoblasts and adipocytes in rat bone marrow stromal cell cultures: effects of dexamethasone and calcitriol. J Cell Biochem 2003; 2: 364-372.
8. Allan EH, Ho PW, Umezawa A, Hata J, Makishima F, Gillespie MT, Martin TJ. Differentiation potential of a mouse bone marrow stromal cell line. J Cell Biochem 2003; 1: 158-169.

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-11-01]

9. Atmani H, Audrain C, Mercier L, Chappard D, Basle MF. Phenotypic effects of continuous or discontinuous treatment with dexamethasone and/or calcitriol on osteoblasts differentiated from rat bone marrow stromal cells. J Cell Biochem 2002; 3: 640-650.
10. orter RM, Huckle WR, Goldstein AS. Effect of dexamethasone withdrawal on osteoblastic differentiation of bone marrow stromal cells. J Cell Biochem 2003; 1: 13-22.
11. Wislet-Gendebien S, Leprince P, Moonen G, Rogister B. Regulation of neural markers nestin and GFAP expression by cultivated bone marrow stromal cells. J Cell Sci 2003; 16: 3295-3302.
12. 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; 1: 191-197
13. Rismanchi N, Floyd CL, Berman RF, Lyeth BG. Cell death and long-term maintenance of neuron-like state after differentiation of rat bone marrow stromal cells: a comparison of protocols. Brain Res 2003; 1-2: 46-55.
14. 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 cells in Sprague-Dawley rats. Brain Res 2003; 1: 114-121.
15. Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, Jakoniuk I, Anderson SM, Li B, Pickel J, McKay R, Nadal-Ginard B, Bodine DM, Leri A, Anversa P. Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium. Nature 2001; 410: 701-705.
16. Orlic D. Adult bone marrow stem cells regenerate myocardium in ischemic heart disease. Ann N Y Acad Sci 2003; 996: 152-157.
17. Jackson KA, Majka SM, Wang H, Pocius J, Hartley CJ, Majesky MW, Entman ML, Michael LH, Hirschi KK, Goodell MA. Regeneration of ischemic cardiac muscle and vascular endothelium by adult stem cells. J Clin Invest 2001; 107: 1395-1402.
18. Krause DS, Theise ND, Collector MI, Henegariu O, Hwang S, Gardner R, Neutzel S, Sharkis SJ. Multi-organ, multi-lineage engraftment by a single bone marrow-derived stem cell. Cell 2001; 105: 369-377.
19. Lagasse E, Connors H, Al-Dhalimy M, Reitsma M, Dohse M, Osborne L, Wang X, Finegold M, Weissman IL, Grompe M. Purified hematopoietic stem cells can differentiate into hepatocytes in vivo. Nat Med 2000; 6: 1229-1234.
20. Wang X, Montini E, Al-Dhalimy M, Lagasse E, Finegold M, Grompe M. Kinetics of liver repopulation after bone marrow transplantation. Am J Pathol 2002; 161: 565-574.
21. Mallet VO, Mitchell C, Mezey E, Fabre M, Guidotti JE, Renia L, Coulombel L, Kahn A, Gilgenkrantz H. Bone marrow transplantation in mice leads to a minor population of hepatocytes that can be selectively amplified in vivo. Hepatology 2002; 35: 799-804.
22. Nakamura T. Structure and function of hepatocyte growth factor. Progress in growth factor research 1991; 3: 67.
23. Kamiya A, Kinoshita T, Miyajima A. Oncostatin M and hepatocyte growth factor induce hepatic maturation via distinct signaling pathways. FEBS Lett 2001; 492: 90-4.
24. Wang PP, Wang JH, Ya ZP, Hu MY, Lau GK, Fan ST, et al. Expression of hepatocyte-like phenotypes in bone marrow stromal cells after HGF induction. Biochem Biophys Res Commun 2004; 320: 712-6.
25. She HO, Masahiro M, Hirosuke K, Yusuke I, Masakiyo S, Toshiya T, et al. Hepatocyte growth factor induces differentiation of adult rat bone marrow cells into a hepatocyte lineage in vitro. Biochem Biophys Res Commun 2000; 279: 500-4.
26. Henning CF, Michael VL, Lourdes CD, Claudia L, Dietrich K, Boris F, et al. Liver-specific gene expression in cultured human hematopoietic stem cells. Stem Cells 2003; 21: 98-104.
27. Michalopeulos GK, DeFrances MC. Liver regeneration. Science 1997; 276: 60-6.
28. Caplan A.I. Mesenchymal stem cells. J Orthop Res1991; 9: 641-650.
29. Fukuda K. Development of regenerative cardiomyocytes from mesenchymal stem cells for cardiovascular tissue engineering. Artif Organs 2001; 25: 187-93.

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-11-01]

30. Sai-Nan Shu, Lai Wei, Jiang-Hua Wang, Yu-Tao Zhan, Hong-Song Chen, Yu Wang. Hepatic differentiation capability of rat bone marrow-derived mesenchymal stem cells and hematopoietic stem cells. World J Gastroenterol 2004; 10: 2818-2822.
31. Xiao-lei SHI, Yu-dong QIU, Qiang LI, Ting XIE, Zhang-hua ZHU, Lei-lei CHEN, Lei LI, Yi-tao DING. Hepatocyte-like cells from directed differentiation of mouse bone marrow cells in vitro. Acta Pharmacologica Sinica 2005 Apr; 26: 469-476.
32. Xin-Qin Kang, Wei-Jin Zang, Tu-Sheng Song, Xiao-Li Xu, Xiao- iang Yu, Dong-Ling Li, Ke-Wei Meng, Sheng-Li Wu, Zhi-Ying Zhao. Rat bone marrow mesenchymal stem cells differentiate into hepatocytes in vitro World J Gastroenterol 2005; 11:3479-3484.
33. Xin-Qin Kang, Wei-Jin Zang, Li-Jun Bao, Dong-Ling Li, Tu-Sheng Song, Xiao-Li Xu, Xiao-Jiang Yu. Fibroblast growth factor-4 and hepatocyte growth factor induce differentiation of human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells into hepatocytes. World J Gastroenterol 2005; 11: 7461-7465.
34. Wei Li, Su-Nan Liu, Duan-De Luo, Lei Zhao, Ling-Lan Zeng, Shu-Ling Zhang, Shu-Li Li. Differentiation of hepatocytoid cell induced from whole-bonemarrow method isolated rat myeloid mesenchymal stem cells. World J Gastroenterol 2006 ; 12: 4866-4869.
35. Raquel Taléns-Visconti, Ana Bonora, Ramiro Jover, Vicente Mirabet, Francisco Carbonell, José Vicente Castell, María José Gómez-Lechón. Hepatogenic differentiation of human mesenchymal stem cells from adipose tissue in comparison with bone marrow mesenchymal stem cells. World J Gastroenterol 2006 28; 12: 5834-5845.
36. Baharvand H, Hashemi SM, Kazemi Ashtiani S, and Farokhi A. Differentiation of human embryonic stem cells into hepatocytes in 2D and 3D culture systems in vitro. Int J Dev Biol 2006. 50: 645-652.

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-11-01]