Journal of Shahid Sadoughi University of Medical Sciences
Vol. 23, No.1, Mar-Apr 2015
Pages: 1805-1815

مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد
دوره ۲۳، شماره ۱، فروردین ۱۳۹۴
صفحه: ۱۸۱۵-۱۸۰۵

مقایسه سلول‌های بنیادی مشتق از بافت چربی و سلول‌های استرومایی مغز استخوان بر اساس توانایی خودتکثیری در پاساژهای مختلف

علیرضا عبدانی پور*[۱]، علی نوری زاده[۲]، آرزو مجدی[۳]

چکیده

مقدمه: برای سال‌های طولانی مغز استخوان مهم‌ترین منبع تهیه سلول‌های بنیادی مزانشیمی برای مهندسی بافت بود، ولی در سال‌های اخیر بافت چربی جایگاه ویژه‌ای را در این خصوص پیدا کرده است چرا که جدا کردن این سلول‌ها از بافت چربی آسان‌تر از مغز استخوان بوده و عوارض کمتری برای بیمار دارد. هدف از این مطالعه بررسی و مقایسه سلول‌های بنیادی استخراج شده از دو منبع بافت چربی و مغز استخوان از نظر زمان تقسیم و درصد حیات در پاساژهای مختلف در شرایط آزمایشگاهی می‌باشد.

روش بررسی: در این مطالعه سلول‌ها در شرایط استریل و شرایط کشت یکسان در پاساژهای مختلف (تا ده مرحله) از نظر سرعت تکثیر و زمان تقسیم با روش MTT مورد ارزیابی قرار گرفتند. همچنین به منظور بررسی میزان تکثیر، بیان ژن Oct-4 با روش نیمه کمی و با استفاده از RT-PCR و نرم‌افزار Image j مورد ارزیابی قرار گرفت.

نتایج: سلول‌های بنیادی بافت چربی در مقایسه با سلول‌های استرومایی مغز استخوان در پاساژهای بالا مقاوم‌تر بوده و دارای سرعت تکثیر بالاتری بودند. در بررسی نیمه کمی RT-PCR مشخص شد هر دو نوع سلول قادر به ایجاد باند مشخص بر روی ژل الکتروفورز هستند، اما سلول‌های بنیادی بافت چربی در مقایسه با مغز استخوان قادرند بیان بیشتری از Oct-4 را نشان دهند.

نتیجه‌گیری: با توجه به کاهش زمان تقسیم و بالا بودن درصد سلول‌های زنده در پاساژهای طولانی مدت در سلول‌های بنیادی استخراج شده از بافت چربی نسبت به سلول‌های مغز استخوان، سلول‌های بنیادی بافت چربی می‌توانند منبع مناسبی برای سلول درمانی در کلینیک محسوب شوند.

واژه‌های کلیدی: سلول بنیادی بافت چربی، سلول‌های بنیادی مغز استخوان، زمان تقسیم، تکثیر سلولی

۱- استادیار گروه آناتومی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد اردبیل، اردبیل، ایران
۲- دکتری تخصصی بیهوشی، مرکز تحقیقات علوم اعصاب شفای بیمارستان خاتم الانبیا، تهران، ایران
۳- کارشناس گروه رادیولوژی، باشگاه پژوهشگران جوان و نخبگان، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد اردبیل، اردبیل، ایران
* (نویسنده مسئول)؛ تلفن: ۰۹۱۲۵۴۶۷۳۰۹، پست الکترونیکی: abdani.anatomy@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۴/۲۷ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۳/۹/۲۷

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2024-10-12]

مقدمه

در طی سال‌های اخیر تحقیقات نشان داده است که سلول‌های بنیادی ابزار امید بخشی برای جایگزینی سلول‌های از دست رفته در بافت‌هایی که به طور طبیعی قدرت ترمیم ندارند، به شمار می‌روند(۱). در بکارگیری این سلول‌ها به منظور سلول درمانی در نظر گرفتن قابل دسترس بودن و فراوانی سلول بنیادی، استخراج آسان و کم خطر برای بیماران، توانایی تبدیل به سایر رده‌های سلولی، ایمنی برای فرد گیرنده و عدم دفع پیوند بسیار حائز اهمیت می‌باشد(۲). از نظر اخلاقی به دلیل تخریب یک بلاستوسیست انسانی، کم بودن نمونه و بالا بودن قدرت تومورزایی کاربرد سلول‌های بنیادی جنینی برای درمان بیماری‌ها محدود شده است(۳). در مقابل، سلول‌های بنیادی بالغین به دلیل آسان بودن دستیابی به آنها و عدم وجود مشکلات اخلاقی و تومورزایی منبع مناسبی برای سلول درمانی به شمار می‌آیند(۴). در پزشکی ترمیمی تحقیقات پایه و مطالعات پیش‌بالینی در حال تلاش هستند که بتوانند به مشکلات ناشی از استفاده از سلول‌های بنیادی مزانشیمی فائق آیند تا از آنها در درمان بیماران نیز به صورت گسترده استفاده نمایند. سلول‌های بنیادی مزانشیمی را می‌توان از بافت‌هایی همانند مغز استخوان و یا بافت چربی جدا نمود. برای سال‌های طولانی مغز استخوان مهم‌ترین منبع تهیه سلول‌های بنیادی مزانشیمی برای مهندسی بافت بود ولی در سال‌های اخیر بافت چربی جایگاه ویژه‌ای را در این خصوص پیدا کرده است. جدا کردن این سلول‌ها از بافت چربی آسان‌تر از مغز استخوان بوده و عوارض کمتری برای بیمار دارد. با توجه به این که سرعت تکثیر سلول‌ها و قدرت حفظ حیات سلول‌ها در شرایط کشت آزمایشگاهی از مهمترین عوامل برای سلول درمانی محسوب می‌شوند. لذا با در نظر گرفتن زمان از لحظه نمونه‌گیری تا رسیدن به تعداد مطلوب جهت پیوند، سلول‌هایی ارزشمند خواهند بود که علاوه بر عدم تومورزایی و حفظ حیات دارای سرعت تکثیر بالایی نیز باشند. استفاده از سلول‌های بنیادی مغز استخوان بیماران مسن محدود شده است. زیرا توانایی تکثیر و میزان سلول‌های بنیادی سلول‌ها در نمونه مغز استخوان کاهش می‌یابد. بنابراین جایگزینی یک منبع سلولی مناسب ضروری به نظر می‌رسد(۵). نمونه بافت چربی محتوی سلول‌های چربی بالغ و سلول‌های استرومایی بافت چربی است که از سلول‌های چربی نابالغ (سلول‌های پیش ساز)، سلول‌های عضلانی صاف، سلول‌های فیبروبلاستی، سلول‌های اندوتلیالی، سلول‌های ایمنی و سلول‌های خونی تشکیل شده است(۵). سلول‌های استرومایی بافت چربی دارای ویژگی‌های مشترک با سلول‌های بنیادی مزانشیمی هستند از جمله: قدرت خود تجدیدی دارند، سلول‌هایی پرتوان هستند، ظاهری دوکی و فیبروبلاستی دارند، قدرت اتصال به ظروف پلاستیکی کشت سلول را دارند و قادرند به سایر رده‌های مزانشیمی تبدیل شوند(۶). دستیابی به منبع سلول‌های بنیادی بافت چربی در مقایسه با مغز استخوان کم خطرتر و ساده‌تر است(۷،۸). هر چند هر دو منبع سلولی از نظر بیان ژن و قدرت تمایز شبیه به هم عمل می‌کنند اما نشان داده شده است که سلول‌های بنیادی مشتق از بافت چربی از توانایی خودتکثیری بالاتری برخوردار هستند(۹). با در نظر گرفتن علاقه‌مندی اکثر محققین به استفاده از سلول‌های بنیادی مغز استخوان در سلول درمانی، توجه به زمان تقسیم سلول‌ها و درصد حیات سلول‌ها تا رسیدن به تعداد مناسب سلول به منظور پیوند بسیار ضروری است. بر همین اساس در این مطالعه زمان تقسیم و درصد حیات سلول‌های بنیادی استخراج شده از دو منبع بافت چربی و مغز استخوان مورد ارزیابی قرار گرفته اند.

روش بررسی

جداسازی سلول‌های بنیادی بافت چربی (ADSCs) از موش‌های صحرایی برای اولین بار در سال ۱۹۶۴ میلادی توسط Rodbell انجام شد(۱۰). در این مطالعه با رعایت اصول و مقررات کار با حیوانات (مورد تأیید دانشگاه تربیت مدرس) برای تهیه سلول‌های ADSCs، از موش‌های صحرایی بالغ نژاد Sprague-Dawley استفاده شد. پس از بیهوشی کامل، موش‌های صحرایی توسط کلروفرم کشته شدند و بافت چربی در شرایط کاملاً استریل از نواحی زیر جلدی پایین شکم و

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2024-10-12]

اطراف کلیه‌ها جدا شد. به منظور حذف سلول‌های خونی، نمونه‌های جدا شده چندین بار توسط فسفات بافر سالین (PBS: Phosphate Buffered Saline) حاوی آنتی‌بیوتیک شستشو داده شد. نمونه برداشته شده تا حد امکان به قطعات کوچکتری برش داده شد و معادل حجم نمونه بافت چربی، آنزیم Collagenase Type I سیگما- آمریکا با غلظت ۰/۰۷۵ درصد به نمونه اضافه شد و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ الی۶۰ دقیقه در دستگاه تکان‌دهنده اتوماتیک قرار داده شد. سپس آنزیم کلاژناز توسط محیط کشت (Invitrogen– آمریکا) (DMEM: Dulbecco Modified Eagle Medium) حاوی ۱۰ درصد سرم FBS: Fetal Bovine Serum (Invitrogen– آمریکا) خنثی شد. در مرحله بعدی محلول شیری رنگ به دست آمده به مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ۱۲۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ شد. رسوب سلولی به دست آمده با ۲ سی سی مدیوم پیپتاژ شد و سوسپانسیون سلولی از فیلتر نایلونی ۱۰۰ میکرومتری عبور داه شد. مایع عبور داده شده از فیلتر به مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ۱۲۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ شد(۱۱). رسوب سلولی بعد از پیتاژ به فلاسک ۲۵ سانتی منتقل شد و با محیط کشت DMEM حاوی ۱۰ درصد سرم(Invitrogen) FBS درون اینکوباتور با ۳۷ درجه سانتی‌گراد حرارت، ۹۵٪ رطوبت و ۵٪ CO2 کشت داده شد. هنگامی که جمعیت سلولی درون ظروف کشت به ۹۰ درصد رسید، پاساژ سلولی انجام شد. برای جداسازی سلول‌ها از کف ظروف کشت از محلول تریپسین ۰/۰۴ درصد و EDTA ۰/۲۵ درصد برای مدت ۳ دقیقه استفاده شد. در این مطالعه سلول‌ها تا ۱۰ پاساژ پیش رفتند.

موش صحرایی بالغ ۱۲ هفته ای نژاد Sprague Dawley توسط کلروفرم کشته شد. سپس استخوان‌های تیبیا و فمور از بدن حیوان جدا شد. عضلات چسبیده به استخوان جدا شدند و استخوان‌ها در داخل پتری دیش حاوی فسفات بافر سالین و آنتی‌بیوتیک قرار گرفتند. پتری دیش داخل ظرف محتوی یخ قرار گرفت و به زیر هود منتقل شد. دو سر استخوان توسط وسایل استریل شده که از قبل در زیر هود قرار داده شده بودند، قطع شدند و به وسیله سرنگ ۵ سی‌سی حاوی محیط کشت DMEM و FBS ۲۰ درصد محتویات داخل کانال استخوان‌ها به داخل فلاسک مخصوص کشت تخلیه شد. فلاسک حاوی سلول در داخل انکیباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و رطوبت ۹۵٪ و Co_2 ۵٪ قرار گرفت. پس از ۴۸ ساعت محیط کشت سلول‌ها تعویض شدند. بعد از ۲ الی ۳ روز سلول‌ها بر اثر تکثیر کف فلاسک را پر کردند و در این هنگام پاساژ اول برای کشت سلول انجام شد که در طی این عمل با استفاده از محلول تریپسین /EDTA سلول‌ها از کف فلاسک جدا شدند. در این مطالعه پاساژ سلولی تا ۱۰ مرحله تکرار شد(۱۲).

میزان رشد و حیات سلول‌های BMSCs و ADSCs در پاساژهای مختلف (تا ۱۰ پاساژ سلولی) با روش MTT (روش رنگ سنجی است که بر اساس احیا شدن و شکسته شدن کریستال‌های زرد رنگ تترازولیوم با فرمول شیمیایی 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide (MTT) به وسیله آنزیم سوکسینات دهیدروژناز و تشکیل کریستال‌های آبی رنگ نامحلول انجام می‌شود) و بر مبنای میزان جذب در طول موج ۵۷۰ نانومتر توسط دستگاه الایزا ریدر (BioTek- آمریکا) مورد ارزیابی قرار گرفت. در این روش در هر پاساژ سلولی در هر چاهک پلیت ۹۶ خانه حدود ۵۰۰۰ هزار سلول برای مدت ۳ روز در انکوباتور با شرایط استاندارد کشت (دمای ۳۷ درجه‌سانتی‌گراد، CO_2 ۵ درصد و رطوبت ۹۵ درصد) داده شد. پس از اتمام زمان انکوباسیون به هر چاهک ۲۰ میکرولیتر(سیگما- آمریکا) MTT با غلظت ۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر اضافه شد و به مدت ۴ ساعت در انکوباتور با شرایط استاندارد قرار گرفت. طی این مدت مایع رویی چاهک دور ریخته شد و ۲۰۰ میکرولیتر DMSO (مرک- آلمان) به هر چاهک اضافه شد. در نهایت جذب نوری محلول به دست آمده در طول موج ۵۷۰ نانومتر قرائت شد(۱۳).

تکثیر سلولی و زمان تقسیم سلول‌ها در هر پاساژ سلولی با استفاده از MTT بررسی شد. برای این منظور به تعداد ۵۰۰۰

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2024-10-12]

سلول BMSCs و ADSCs در هر پاساژ (تا ۱۰ پاساژ سلولی) در هر چاهک پلیت ۹۶ خانه برای مدت ۳ روز در شرایط یکسان با DMEM و ۲۰ درصد FBS کشت داده شد. تعداد سلول‌ها موجود بعد از تقسیم (CD: Cell doublings) با استفاده از فرمول $CD = \ln (N_f/N_i)/\ln 2$ ارزیابی شد. در این فرمول N_f معرف تعداد سلول‌های شمارش بعد از ۳ روز بود و N_i معرف تعداد سلول‌های اولیه می‌باشد. برای بررسی زمان تقسیم سلول‌ها (DT: Doubling Times) از فرمول $DT = CT/CD$ استفاده شد. در این فرمول CT معرف زمان کشت سلول در نظر گرفته شده است(۱۴).

برای بررسی مقایسه ای بیان ژن OCT4 و ژن β-2M به عنوان کنترل داخلی در سلول‌های ADSCs وBMSCs از تکنیک RT-PCR استفاده شد. برای این منظور سلول‌ها در پاساژ دهم برای آزمون RT-PCR انتخاب شدند. در این تکنیک استخراج RNA کل از سلول‌ها با استفاده از کیت Pure link RNA mini kit Invitrogen و دستورات شرکت سازنده انجام گرفت و با استفاده از آنزیم کپی‌برداری معکوس به cDNA تبدیل شد. در مطالعه حاضر، جهت ساخت cDNA از پرایمرoligo dT موجود در کیت Revert aid H Minus-First Strand cDNA Synthesis, K1632 (Fermentas- آلمان) استفاده شد و مطابق با دستور شرکت سازنده mRNA به cDNA تبدیل شد. سپس cDNA حاصله به روش PCR مورد بررسی قرار گرفت. پس از پایان واکنش PCR با پرایمرهای ویژه حدود ۵ میکرولیتر از محصول واکنش بر روی ژل آگارز ۱/۵ درصد الکتروفورز شد. پرایمرهای استفاده شده در جدول شماره یک نمایش داده شده‌اند.

تمام مقادیر بر حسب انحراف معیار ارائه شده است. داده‌های به دست آمده با روش آماری آنالیز واریانس یک طرفه (ANOVA) و آزمون TUKEY و نرم افزار SPSS نسخه ۱۵ تجزیه و تحلیل شد. سطح معنی‌داری کمتر از ۰/۰۵ در نظرگرفته شد.

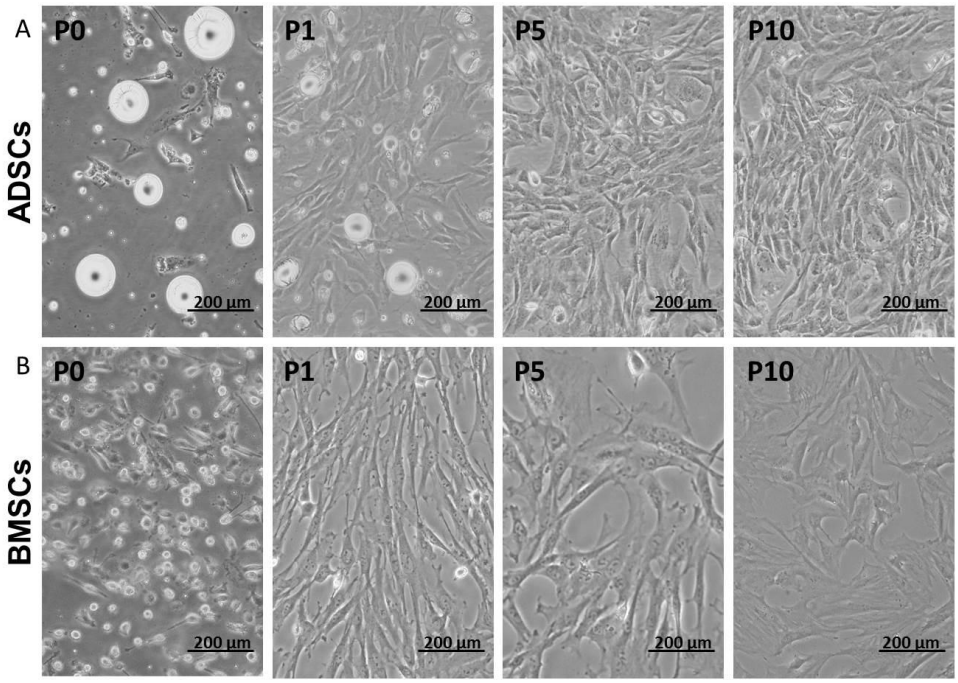
نتایج

نتایج حاصل از کشت سلول‌های بنیادی بافت چربی و مغز استخوان نشان داد که سلول‌های بنیادی بافت چربی همانند سلول‌های استرومایی مغز استخوان دارای ظاهری فیبروبلاستی با قابلیت اتصال به ظروف کشت و توانایی تقسیم می‌باشند. در چند ساعت ابتدایی از شروع کشت سلول‌های ADSCs به شکل سلول‌های گرد و شناور با هسته غیرقابل مشاهده در محیط کشت دیده شدند. زمان اتصال این سلول‌ها به ظروف کشت در حدود ۱۲ الی ۲۴ ساعت بود و این در حالی است که زمان اتصال سلول‌های استرومایی مغز استخوان در حدود ۶ الی ۱۲ ساعت دیده شد. در روزهای ابتدایی از شروع کشت، گرانول‌های چربی درون سیتوپلاسم سلول‌های ADSCs به وضوح قابل مشاهده بود. بعد از گذشت چند روز گرانول‌ها به همدیگر متصل شدند و قطرات بزرگ چربی سیتوپلاسمی را ایجاد کردند که این قطرات به فضای محیط کشت رها شدند. به همین دلیل محیط کشت سلول‌های بنیادی مشتق شده از بافت چربی نسبت به سلول‌های استرومایی مغز استخوان سریع‌تر تعویض می‌شود. نتایج مطالعه حاضر نشان داد که سرعت تقسیم و رشد سلول‌های بنیادی مشتق شده از بافت چربی نسبت به سلول‌های استرومایی مغز استخوان سریع‌تر انجام می‌شود به طوری که بعد از سومین پاساژ سلولی زمان دو برابر شدن سلول‌ها تقریباً دو روز است که این زمان در مقایسه با سلول‌های استرومایی مغز استخوان تقریباً ۴۰ درصد کاهش یافته است. همچنین اگر نمونه تهیه شده از موش‌های جوان‌تر باشد سرعت تشکیل کلونی‌های سلولی بالاتر است. در مطالعه حاضر سلول‌های ADSCs بعد از گذشت ۷ روز از شروع کشت قطری در حدود ۳۰ میکرومتر پیدا داشتند و برای پاساژ سلولی آماده شدند. به دلیل حضور قطرات چربی درون سیتوپلاسمی سلول‌های ADSCs تا پاساژ چهار و پنج برای انجام ادامه تحقیق مناسب نیستند و این در حالی است که سلول‌های استرومایی مغز استخوان از پاساژ اول قابل استفاده هستند. همچنین نتایج این مطالعه نشان داد که سلول‌های بنیادی استخراج شده از بافت چربی نسبت به سلول‌های استرومایی مغز استخوان مقاوم تر هستند و تا پاساژهای بالا به حالت متمایز نشده باقی می‌مانند ولی سلول‌های استرومایی

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2024-10-12]

مغز استخوان بعد از پاساژ هفتم دارای فنوتیپ متفاوتی به خود می‌گیرند (شکل ۱).

در شکل یک حضور گرانول‌های چربی در سیتوپلاسم سلول‌های چربی از پاساژ اول قابل مشاهده است. در پاساژهای بالا فنوتیپ سلول‌های BMSCs نسبت به سلول‌های ADSCs بیشتر دچار تغییرات می‌شوند. سلول‌های استرومایی مغز استخوان در پاساژهای بالا از حالت دوکی به پهن تغییر شکل می‌دهند و سرعت تقسیم در آنها نیز کاهش می‌یابد.



شکل ۱: مقایسه مراحل کشت سلول‌های بنیادی بافت چربی و مغز استخوان

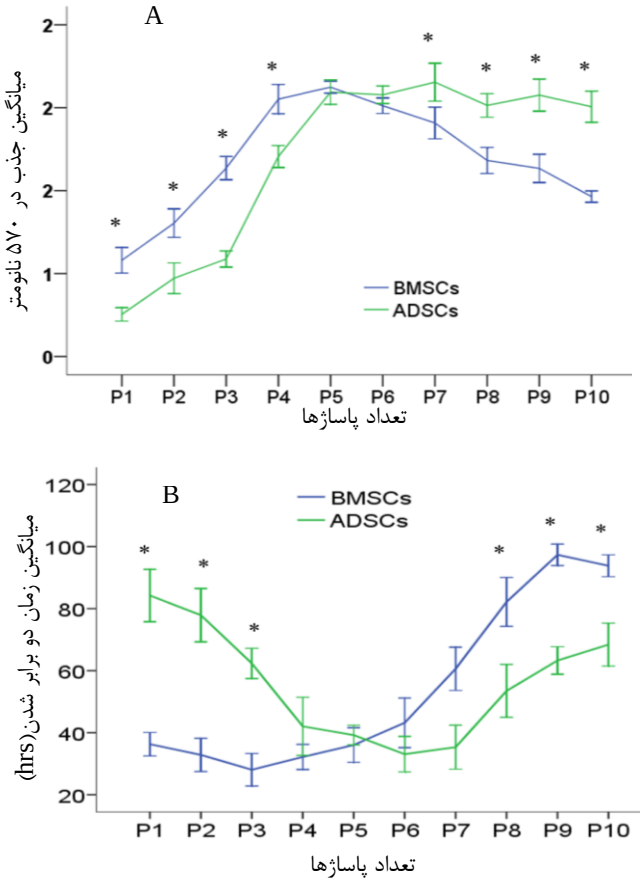
فوتومیکروگراف‌ها نشان دهنده سلول‌های بنیادی استخراج شده از بافت چربی (A) و سلول‌های استرومایی مغز استخوان (B) قبل از رسیدن به پاساژ P0 و پاساژهای اول، پنجم و دهم باشد. (بزرگنمایی ۲۰۰ برابر)

جدول ۱: اطلاعات مربوط به پرایمرهای Forward (Sense) و Reverse (Antisense) ژن‌های استفاده شده

Gene	Accession.N	Sense 5 → 3	Antisense 5 → 3	Size bp
GAPDH	NM_002046.3	CAAGGTCATCCATGACAACTTTG	GTCCACCACCCTGTTGCTGTAG	496
Oct-4	NM_001009178.2	GTCCCTAGGTGAGTCGTCCT	CAGAGTCTCCACGCCAACTT	321

تکثیر سلولی با روش MTT صورت گرفت و منحنی رشد بر مبنای جذب نوری در طول موج ۵۷۰ نانومتر تا ۱۰ پاساژ سلولی در زمان اشاره شده (سه روز بعد از هر پاساژ سلولی) ارزیابی شد. منحنی رشد اختلاف معنی‌داری را در پاساژهای اولیه (اول تا چهارم) و همچنین در پاساژ های بالاتر (هفتم تا دهم) بین دو گروه سلولی ADSCs و BMSCs نشان داد (شکل A۲). همچنین منحنی بررسی زمان تقسیم در دو گروه سلولی نشان داد که زمان تقسیم برای سلول‌های ADSCs و BMSCs در پاساژهای اولیه (اول تا سوم) و همچنین در پاساژهای بالاتر (هشتم تا دهم) دارای اختلاف معنی‌داری است. نتایج به دست آمده در شکل B۲ و جدول ۲ نشان داده شده است.

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2024-10-12]



شکل ۲: نمایش رشد و زمان تقسیم در سلول‌های ADSCs و BMSCs، با روش MTT.

(A) حدود ۵ هزار سلول‌ها در هر چاهک ۹۶ خانه تا سه روز در هر پاساژ سلولی کشت داده شد و باروش MTT در جذب نوری ۵۷۰ نانومتر منحنی رشد ترسیم شد. (B) مقایسه زمان تقسیم سلول‌ها می‌باشد. خطای معیار (SEM) برای ۵ تکرار، $^{*}P< 0.05$، نشان‌دهنده وجود اختلاف معنی بین دو گروه سلولی می‌باشد.

جدول ۲: نمایش زمان تقسیم در سلول‌های ADSCs و BMSCs، تا ۱۰ پاساژ سلولی

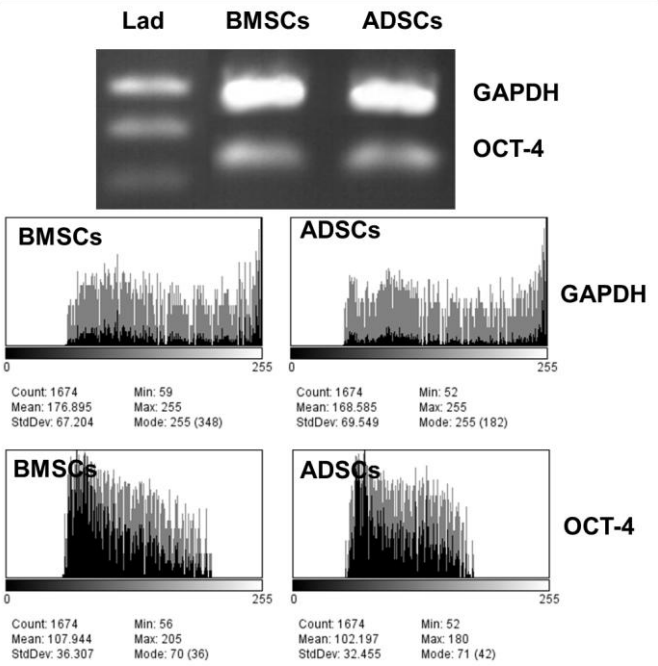
Cells	ADSCs (میانگین ±انحراف معیار)	BMSCs (میانگین ±انحراف معیار)
P1	۸۴/۲۲±۴/۲۲	۳۶/۳۰±۱/۸۹
P2	۷۷/۹۰±۴/۳۰	۳۲/۸۳±۲/۶۷
P3	۶۲/۳۴±۲/۴۳	۲۸/۰۵±۲/۶۱
P4	۴۲/۰۴±۴/۶۷	۳۲/۱۶±۲/۰۱
P5	۳۹/۲۱±۲/۷۸	۳۶/۰۳±۱/۵۷
P6	۳۳/۰۷±۳/۹۹	۴۳/۱۷±۲/۸۵
P7	۳۵/۳۱±۳/۵۴	۶۰/۵۹±۳/۴۸
P8	۵۳/۴۸±۴/۲۶	۸۲/۱۶±۳/۹۳
P9	۶۳/۲۷±۱/۷۳	۹۷/۳۴±۲/۲۲
P10	۶۸/۳۹±۳/۴۵	۹۳/۸۱±۱/۷۶

محاسبه زمان تقسیم ۳ روز بعد از هر پاساژ سلولی انجام شده است

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2024-10-12]

مقایسه بیان ژن Oct-4 در سلول‌های بنیادی ADSCs و BMSCs در شرایط کشت یکسان و در پاساژ دهم سلولی با روش RT-PCR بررسی شد و در این بررسی ژن GAPDH به عنوان ژن Housekeeping در نظر گرفته شد. در بررسی نیمه کمی RT-PCR مشخص شد که سلول‌های ADSCs در مقایسه با BMSCs قادرند بیان بیشتری از Oct-4 نسبت به BMSCs داشته باشند. هر دو نوع سلول قادر به ایجاد باند مشخص بر روی ژل الکتروفورز بودند. همچنین اندازه محصول RT-PCR با اندازه پیش‌بینی شده توسط داده‌های بیوانفورماتیک همخوانی داشت (شکل ۳).

محصول RT-PCR برای GAPDH (496 bp) و برای Oct-4 (321 bp) با توجه به Ladder در مکان‌های مورد انتظار قرار دارد. روشنایی باند ها با استفاده از نرم‌افزار ImageJ نشان‌دهنده بیان نسبی بیشتر ژن Oct-4 در ADSCs در مقایسه با BMSCs می‌باشد. در این تحقیق از 100 bp Ladder استفاده شد.



شکل ۳: بررسی محصول PCR برای ژن های Oct-4 و GAPDH در سلول‌های ADSCs و BMSCs در پاساژ دهم سلولی توسط تکنیک RT-PCR و نرم افزار ImageJ.

بحث

نتایج به دست آمده از این مطالعه نشان داد که سلول‌های بنیادی بافت چربی در مقایسه با سلول‌های استرومایی مغز استخوان در پاساژهای بالا مقاوم‌تر بوده و دارای سرعت تکثیر بالاتری می‌باشند. با توجه به این که سرعت رشد و درصد حیات سلول‌ها در بیمارانی که نیاز به پیوند دارند، دارای اهمیت بسیاری می‌باشد، محققین تمایل دارند تا منبع جایگزینی برای استفاده از سلول‌های BMSCs در کلینیک معرفی کنند. بافت چربی می‌تواند به عنوان یک منبع ایده‌ال برای این منظور باشد، زیرا به راحتی تهیه می‌شود و بیمار حداقل درد در زمان ایزولیشن سلولی را متحمل می‌شود. همچنین محققین نشان داده‌اند که سرعت رشد و تکثیر این سلول‌ها برای پاساژهای طولانی مناسب است(۵). در این مطالعه نشان داده شد که در پاساژهای پایین‌تر سرعت رشد سلول‌های ADSCs در مقایسه با BMSCs کمتر است. دلیل این امر می‌تواند این باشد که در

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2024-10-12]

هنگام تهیه نمونه بافت چربی، هضم آنزیماتیک (کلاژناز) و طولانی بودن زمان از لحظه استخراج بافت تا پلیت کردن سلول‌ها نقش مهمی در صدمات اولیه به سلول‌ها و تأخیر در رشد و بقاء آنها داشته است(۱۵). نتایج نشان داد در پاساژهای بالا که زمان دوبرابر شدن سلول‌ها بعد از چهارمین پاساژ سلولی تقریباً دو روز است که این زمان در مقایسه با سلول‌های استرومایی مغز استخوان تقریباً ۴۰ درصد کاهش یافته است. این یافته تحقیقاتی در این مطالعه با یافته های سایر محققین مطابقت دارد(۱۶). در مطالعه حاضر از سلول‌های بافت چربی و مغز استخوان موش‌هایی استفاده شد که دارای سن و نژاد یکسان بودند (۱۲ هفته - اسپراگو). مطالعات نشان داده‌اند که در موش‌های جوان‌تر میزان تکثیر و تمایز این سلول‌ها بالاتر خواهد بود(۱۷). همچنین در موش‌های جوان‌تر در نمونه‌های تهیه شده از بافت چربی و مغز استخوان تعداد سلول‌های بنیادی بیشتر خواهد بود. جنسیت موش‌ها نیز بر روی تکثیر و تعداد سلول‌های بنیادی مؤثر است. تحقیقات انجام شده نشان می‌دهد که موش‌های نر دارای سلول‌های بیشتر و توان تکثیری بالاتری هستند(۱۸،۱۹). در بررسی زمان تقسیم با توجه به مطالعات انجام شده توسط سایر محققین مشخص شد که در مجموع زمان تقسیم برای در دو منبع سلولی طولانی نیست(۱۷). همچنین نتایج مطالعه حاضر نشان داد که زمان تقسیم برای سلول‌های ADSCs و BMSCs در پاساژهای اولیه (اول تا سوم) و همچنین در پاساژهای بالاتر (هشتم تا دهم) دارای اختلاف معنی‌داری است. در هر دو گروه پلاتو در بین پاساژهای ۴ الی ۷ مشاهده شد. و از این به بعد تکثیر در سلول‌های چربی بشتر از سلول‌های مغز استخوان بود. در تحقیق مشابه که از موش‌های جوان‌تر استفاده شده بود، نشان دادند که سلول‌های چربی از ابتدا دارای رشد بیشتری نسبت به سلول‌های مغز استخوان بودند(۱۷)، که این می‌تواند به دلیل حضور تعداد بیشتر سلول‌های بنیادی در نمونه اولیه باشد. نکته مهم دیگر در انتخاب نوع سلول در روند سلول درمانی، توجه داشتن به این نکته است که تهیه سلول‌های بنیادی از بافت چربی همواره با خطر ایجاد آلودگی در حین کار مواجه است. این در حالی است که این مهم برای سلول‌های BMSCs کمتر دیده می‌شود(۵). نتیجه‌گیری کلی این که، اگر چه نمونه مغز استخوان منبع خوبی برای تهیه سلول‌های بنیادی می‌باشد ولی از چندین لحاظ کاربرد این سلول‌ها در کلینیک نسبت به سلول‌های بنیادی مشتق شده از بافت چربی محدود شده است. تهیه نمونه مغز استخوان روشی تهاجمی و دردناک است و این در حالی است که با یک برش ساده پوستی و یا در طی عمل لیپوساکشن می‌توان برای تهیه نمونه بافت چربی اقدام نمود(۶). میزان بقاء، قدرت تمایز و تعداد سلول‌های بنیادی موجود در نمونه مغز استخوان با افزایش سن بیمار کاهش می‌یابد ولی این محدودیت سنی برای نمونه بافت چربی وجود ندارد(۱۷). Farasar و همکاران در مطالعه‌ای نشان دادند که در یک حجم برابر از نمونه بافت چربی و مغز استخوان تعداد سلول‌های بنیادی بافت چربی ۵۰۰ برابر بیشتر از نمونه مغز استخوان است(۶). همچنین در نمونه مغز استخوان تنوع سلولی به مراتب بیشتر از نمونه بافت چربی است. نکته مهم دیگری که کاربرد سلول‌های بنیادی مغز استخوان را محدود می‌کند این است که این سلول‌ها در پاساژ های بالا دستخوش تمایز خود به خودی می‌شوند، در حالی که در سلول‌های ADSCs این امر به ندرت اتفاق می‌افتد(۲۱). این تحقیق نشان داد که سلول‌های بنیادی بافت چربی با توجه به داشتن ویژگی بیولوژیکی مشترک با سلول‌های مغز استخوان در پاساژهای طولانی مدت سلول‌های نسبت به سلول‌های مغز استخوان دارای توان تکثیری بالاتری هستند و کمتر دچار پیری و تغییر فنوتیپ می‌شوند. این ویژگی در پاساژهای سلولی پایین تر نیز قبلا توسط محققین گزارش شده است(۲۲،۲۳) و نوآوری این تحقیق مقایسه سلول‌ها تا پاساژهای دهم و بررسی بیان ژن oct-4 است.

سپاسگزاری

این تحقیق در آزمایشگاه سلول‌های بنیادی دانشگاه آزاد اسلامی واحد اردبیل انجام شده است. لذا لازم است از حمایت‌های بی‌دریغ جناب آقای دکتر سید سعید هاشمین معاونت پژوهشی دانشگاه و جناب آقای دکتر فرشید سلیمی ریاست دانشگاه نهایت تقدیر و سپاس را داشته باشیم.

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2024-10-12]

References:

1- Williams MD, Mitchell GM, Hardikar AA. ***stem cells: epigenetic basis of differentiation.*** Open Stem Cell J 2011; 3: 28-33.

2- Pachón-Peña G, Yu G, Tucker A, Wu X, Vendrell J, Bunnell BA, et al. ***Stromal stem cells from adipose tissue and bone marrow of age-matched female donors display distinct immunophenotypic profiles.*** J Cell Physiol 2011; 226(3):843-51.

3- Lo B, Parham L. ***Ethical issues in stem cell research.*** Endocr Rev 2009; 30(3): 204-13.

4- Gimble JM, Katz AJ, Bunnell BA. ***Adipose-derived stem cells for regenerative medicine***. Circ Res 2007; 100(9): 1249-60.

5- Zuk PA, Zhu M, Mizuno H, Huang J, Futrell JW, Katz AJ, et al. ***Multilineage cells from human adipose tissue: Implications for cell-based therapies.*** Tissue Eng 2001; 7(2):211-218.

6- Fraser JK, Wulur I, Alfonso Z, Hedrick MH. ***Fat tissue: an underappreciated source of stem cells for biotechnology.*** Trends Biotechnol 2006; 24(4): 150-4.

7- Golipoor Z, Kashani-Ragerdi I, Akbari M, Hassanzadeh GH, Malek F, Mahmoudi R. ***Differentiation of adipose-derivedstem cells into schwann cell phenotype in comparison with bone marrow stem cells.*** Iran J Basic Med Sci 2010; 13 (3): 76-84.

8- Jang S, Cho HH, Cho YB, Park JS, Jeong HS. ***Functional neural differentiation of human adipose tissue-derived stem cells using bFGF and forskolin.*** BMC Cell Biol 2010; 11(1): 25.

9- Kingham PJ, Kalbermatten DF, Mahay D, Armstrong SJ, Wiberg M, Terenghi G. ***Adipose-derived stem cells differentiate into a Schwann cell phenotype and promote neurite outgrowth in vitro.*** Exp Neurol 2007; 207(2): 267-74.

10- Rodbell M. ***Localization of lipoprotein lipase in fat cells of rat adipose tissue.*** J Biol Chem 1964; 239: 753-5.

11- Zhang DZ, Gai LY, Liu HW, Jin QH, Huang JH, Zhu XY. ***Transplantation of autologous adipose-derived stem cells ameliorates cardiac function in rabbits with myocardial infarction.*** Chin Med J 2008; 120(4): 300-7.

12- Woodbury D, Schwarz EJ, Prockop DJ, Black IB. ***Adult rat and human bone marrow stromal cells differentiate into neurons.*** J Neurosci Res 2000; 61(4): 364-70.

13- Akhtar MN, Zareen S, Yeap SK, Ho WY, Lo KM, Hasan A, et al. ***Total synthesis, cytotoxic effects of damnacanthal, nordamnacanthal and related anthraquinone analogues.*** Molecules 2013; 18(8): 10042-55.

14- Rainaldi G, Pinto B, Piras A, Vatteroni L, Simi S, Citti L. ***Reduction of proliferative heterogeneity of CHEF18 Chinese hamster cell line during the progression toward tumorigenicity.*** In Vitro Cell Dev Biol 1991; 27A(12): 949-52.

15- Williams SK, McKenney S, Jarrell BE. ***Collagenase lot selection and purification for adipose tissue digestion.*** Cell Transplantation 1995; 4(3): 281-89.

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2024-10-12]

16- Lin L, Shen Q, Wei X, Hou Y, Xue T, Fu X, et al. ***Comparison of osteogenic potentials of BMP4 transduced stem cells from autologous bone marrow and fat tissue in a rabbit model of calvarial defects.*** Calcif Tissue Int 2009; 85(1):55-65.

17- Lotfy A, Salama M, Zahran F, Jones E, Badawy A, Sobh M. ***Characterization of mesenchymal stem cells derived from rat bone marrow and adipose tissue: a comparative study.*** Int J Stem Cells 2014; 7(2): 135-42.

18- Katsara O, Mahaira LG, Iliopoulou EG, Moustaki A, Antsaklis A, Loutradis D, et al. ***Effects of donor age, gender, and in vitro cellular aging on the phenotypic, functional, and molecular characteristics of mouse bone marrow-derived mesenchymal stem cells.*** Stem Cells Dev 2011; 20(9): 1549-61.

19- Zhu Y, Liu T, Song K, Fan X, Ma X, Cui Z. ***Adipose-derived stem cell: a better stem cell than BMSC.*** Cell Biochem Funct 2008; 26(6): 664-75.

20- Huang T, He D, Kleiner G, Kuluz J. ***Neuron-like differentiation of adipose-derived stem cells from infant piglets in vitro.*** J Spinal Cord Med 2007; 30(Suppl 1): S35-40.

21- Wang CY, Yang F, He XP, Je HS, Zhou JZ, Eckermann K, et al. ***Regulation of neuromuscular synapse development by glial cell line-derived neurotrophic factor and neurturin.*** J Biol Chem 2002; 277(12): 10614-25.

22- De Ugarte DA, Morizono K, Elbarbary A, Alfonso Z, Zuk PA, Zhu M, et al. ***Comparison of multi-lineage cells from human adipose tissue and bone marrow.*** Cells Tissues Organs 2003; 174(3): 101-9.

23- Lin TM, Tsai JL, Lin SD, Lai CS, Chang CC. ***Accelerated growth and prolonged lifespan of adipose tissue-derived human mesenchymal stem cells in a medium using reduced calcium and antioxidants.*** Stem Cells Dev 2005; 14(1): 92-102.

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2024-10-12]

A Comparison Study between Adipose-Derived *Stem Cells and Bone Marrow Stromal Cells Based on Self-Renewal Potential of Various Passages*

Abdanipour AR(PhD)*[1], Noori-Zadeh A(PhD)[2], Majdi A(BSc)[3]

[1]*Department of Anatomy, Shefa Neuroscience Research Center, Islamic Azad University, Ardabil Branch, Ardabil, Iran*
[2]*Department of Biochemitry, Shefa Neuroscience Research Center, Khatam Al-Anbia Hospital, Tehran, Iran*
[3]*Department of Radiology, Young Researchers and Elite Club, Islamic Azad University, Ardabil Branch, Ardabil, Iran*

Received: 18 Jul 2014 ***Accepted:*** 16 Dec 2014

Abstract

Introduction: For many years, bone marrow mesenchymal stem cells (BMSCs) was the main source for tissue engineering, though within recent years adipose tissue-derived stem cells (ADSC) has obtained a special place in this regard, since it seems easier to isolate these cells with fewer complications to the patients. Therefore, the purpose of this study was to compare two main sources of stem cells, ADSCs and BMSCs, considering cell doubling time and the percentage of viable cells during various cell passages.

Methods: In this study, with equal Sterile and culture conditions in various cell passages, the percentage of viable cells and cell doubling time were assessed using MTT assay. Moreover, semi quantitative Oct-4 gene expression, RT-PCR method and image j software (1 to 10 passages) were applied to assess proliferation rate.

Results: Attained results of this study demonstrated that, at high passages ADSCs have a higher proliferation rate and viable cells compared to BMSCs. Furthermore, semi-quantitative RT-PCR revealed the both cells were able to express Oct-4 and create a distinct band on gel electrophoresis, though ADSCs showed stronger band in comparison with BMSCs.

Conclusion: Due to the rapid growth and viability, stem cells deriving from adipose tissue can be considered as a good stem cell source for cell therapy in the clinic in comparison with BMSCs.

Keywords: ADSCs; BMSCs; Cell doubling time; Proliferation rate

This paper should be cited as:
Abdanipour AR, Noori-Zadeh A, Majdi A. ***A comparison study between adipose-derived stem cells and bone marrow stromal cells based on self-renewal potential of various passages***. J Shahid Sadoughi Univ Med Sci 2015; 23(1): 1805-15.

Corresponding author: Tel: +98 9125467309, Email: abdani.anatomy@yahoo.com

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2024-10-12]