

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: ۱- محیط α -MEM کامل شده با سرم ۱۰ درصد ۲- سلول‌هایی که در محیط α -MEM حاوی ۲ 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 ($P \leq 0.05$). 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 [۲،۱]. 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 خودتکثیر و توانایی تمایز به سه

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

پلاستیسیته 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 MSCs بر 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 [۱۴، ۱۵]. 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) 25 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 ۴۸ ساعت 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 ۰/۰۴ درصد (Merck) از کف فلاسک جدا و با ترکم 4×10^5 subculture تهیه 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 $5 \times 10^4\text{ cm}^2$ به روی لامل آغشته به ژلاتین منتقل شدند. پس از شستشوی سلول‌ها با PBS به 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 نمونه‌ها 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 آزمون درستی روش کار با حذف آنتی‌بادی اولیه، واکنش مثبت کاذب کنترل

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، انیلینگ 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 داگ (UVIdoc, UK) مورد مشاهده و بررسی قرار گرفت. برای هر نمونه سه بار تکرار صورت گرفت و در مرحله تهیه cDNA با 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 $\beta 2M$ محاسبه گردید.

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 ۵/۰ میکروگرم RNA بر اساس دستور کار کیت cDNA (Fermentas-K1622) تهیه شد. سپس با استفاده از ۵ میکرولیتر cDNA به همراه ۲/۵ میکرولیتر بافر ۱x، ۰/۸ میکرولیتر $MgCl_2$ (۱/۵ mM) (۵۰ میلی‌مولار)، ۰/۸ میکرولیتر mM-dNTP (۰/۲ mM) (۱۰ میلی‌مولار)، پرایمر بالادست و پایین دست ۱۰ پیکومولار، ۰/۲۵ میکرولیتر آنزیم Taq polymerase (۲/۵Unit) و آب تزریقی تا حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر، طبق برنامه در ۳۴ سیکل توسط دستگاه تکثیر DNA (Mastercycler- eppendorf) انجام شد.

پرایمرهای مورد استفاده، اندازه و شماره دستیابی آن‌ها در Genbank در جدول ۱ آمده است. ژن $\beta 2M$ به عنوان ژن

جدول ۱. توالی پرایمرهای مورد استفاده، اندازه و شماره دستیابی آن‌ها در Genbank

توالی پرایمر	نام ژن	دمای انیلینگ °C	اندازه bp	کد دسترسی
F: 5'-CTCTGAGGTGCATAGCGTAATGTC-3' R: 5'-AAAACGCTGTGAGAGTGTAGAAC-3'	NGF	56	55	NM-012610
F: 5'-CTG GCT AGC AAG GAA GAT TCG-3' R: 5'-CAG GCC CTG ATG TTT TAC ATA AGA-3'	CNTF	70	55	NM-013166
F: 5'-AGG TCA GAA TTC CAG CCG AT-3' R: 5'-GTT-TCC-TCC-GTG-GTG-ATG-TT-3'	NT3	181	55	NM-031073
F: 5'-TATGTGCGGCGTTGACTGC-3' R: 5'-CACAGTCAGAAGGCACGGTA-3'	NT4	213	55	NM-013184
F: 5'-GAC TCC AAT ATG CCC GAA GA-3' R: 5'-TAG CCC AAA CCC AAG TCA GT-3'	GDNF	254	55	NM-019139
F: 5'-CCG TGA TCT TTC TGG TGC TT-3' R: 5'-TTT TGG GCT TCA GAG TG-3'	$\beta 2m$	318	55	NM-012512
F: 5'-GCC CAA CGA AGA AAA CCA TA-3' R: 5'-GAT TGG GTA GTT CGG CAT TG-3'	BDNF	405	55	D 10938
F: 5'-TGT CAC GTC CCC AAG GTT CAT -3' R: 5'-CGT GGG ACC AAT GTC TTC AGT G- 3'	TH	276	55	NM_012740
F: 5'-TCC CGG AGG AAC TGC ACT TCG-3' R: 5'-GTG TCT TCC TCT GCT CGA TCA-3'	Nurr1	683	55	U72345
F: 5'-TTA AAT GCC TTG GCC ATC TC-3' R: 5'-CGA GCC AGC ATG CCA TAC TT-3'	Shh	173	55	NC-005103
F: 5'-CCT CCT TTA CGG TGG ACA AA-3' R: 5'-ATC AAC TCC TCC TGC CCA TG-3'	PTCH	269	55	NC-005116

واریانس یک‌طرفه (One Way ANOVA) و به دنبال آن آزمون تکمیلی Tukey انجام شد. مرز استنتاج آماری نتایج

آنالیز آماری. تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS, version 16، انجام گرفت. محاسبات آماری جهت بررسی اختلاف بین گروه‌ها با استفاده از آزمون

$P \leq 0.05$ در نظر گرفته شد. نهایتاً هیستوگرام‌های مربوطه با نرم‌افزار Excel ترسیم گردید.

نتایج RT-PCR:

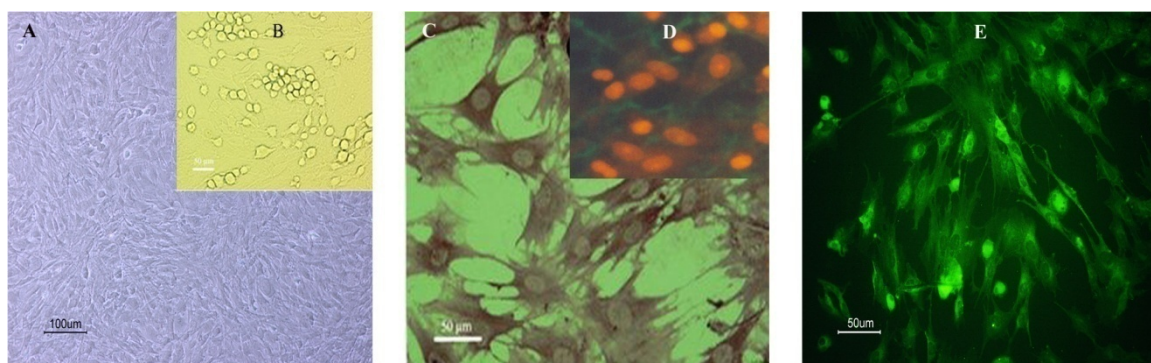
بخش اصلی این پژوهش مربوط به بررسی بیان NTF و برخی از ژن‌های سلول‌های دوپامینرژیک است. نتایج نشان می‌دهد که در سلول‌های تیمار نشده (کنترل) و تیمار شده توسط DMSO (۵ و ۱۰ روز پس از تیمار) تمامی NTF بیان شده است. مقایسه نیمه کمی شدت باندها در دو گروه، نشان می‌دهد که میزان بیان ژن‌های در گروه MSCs تیمار نشده، بیش‌تر از گروه DMSO است، که این اختلاف به لحاظ آماری برای ژن‌های CNTF, GDNF, BDNF 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 Nurr1 در دو گروه بیان شده و مقایسه نیمه کمی نشان می‌دهد که در گروه تیمار شده بیان ژن Th، معنی‌دار است (شکل ۳. A و B). نتایج روز پنجم با دهم پس از تیمار با یک‌دیگر تفاوتی نشان نداد.

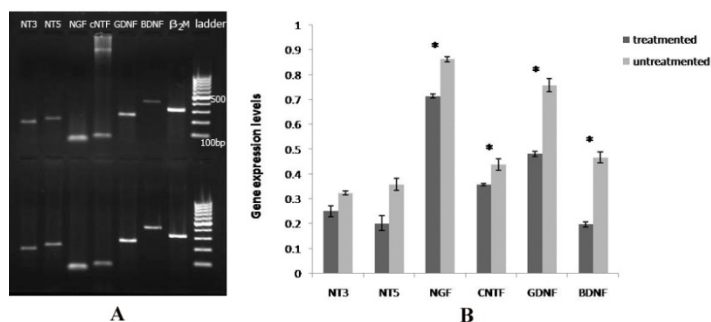
نتایج

ارزیابی میزان حیات، نشان داد که بیش از $95 \pm 2/5$ 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.

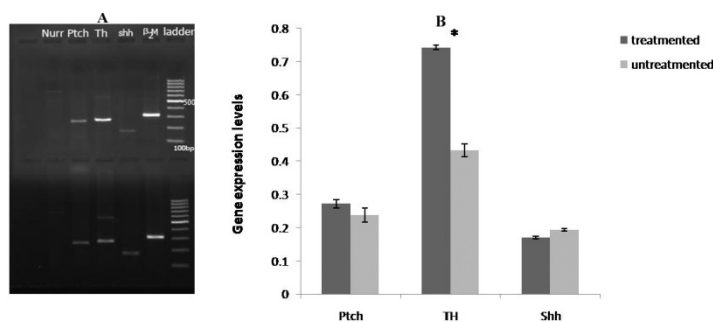
در ارزیابی به روش ایمنوسیتوشیمی، سیتوپلاسم MSCs برای نشانگر فیبرونکتین (رشته‌های)، سبز رنگ (شکل D.۱) و برای CD90 به رنگ سبز دیده می‌شوند (شکل E.۱). برای شمارش سلول‌های فیبرونکتین مثبت، هسته سلول‌ها با اتیدیوم بروماید به رنگ قرمز روشن در آمده‌اند و حدود 97 ± 2 درصد سلول‌ها به این نشانگرها واکنش دادند.



شکل ۱. 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.



شکل ۲. A. الگوی بیان عوامل نوروتروفیک به روش RT-PCR و مشاهده الکتروفورز ژل آگارز. از راست به چپ: β 2M, NT5, NGF, ladder. در گروه تیمار نشده MSCs (پایین) و گروه تیمار شده توسط DMSO (بالا) NT3 181bp, NT4/5 213bp, CNTF, GDNF, BDNF. B. مقایسه میزان بیان نیمه کمی ژن های NT3, NGF, CNTF, GDNF, BDNF در MSCs تیمار نشده و تیمار شده با DMSO نسبت به ژن کنترل (β 2M) و نیز علامت ستاره نشانه معنی داری است $P \leq 0.05$.



شکل ۳. A. الگوی بیان ژنها به روش RT-PCR و مشاهده الکتروفورز ژل آگارز. از راست به چپ: ladder, β 2M, 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, β 2M 318 bp. B. مقایسه شدت بیان نیمه کمی ژن های Ptch, Th, Shh در MSCs تیمار نشده و تیمار شده با DMSO نسبت به ژن کنترل (β 2M) و علامت ستاره نشانه معنی داری است $P \leq 0.05$.

است؛ می توان این ویژگی را ناشی از توان این سلول ها در تولید NTF فرض کرد. چنان که MSCs با تولید این فاکتورها، حیات نوروئین های باقی مانده را افزایش داده و موجب تکثیر سلول های درون زاد (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. هم چنین این ترکیب در غلظت های نسبتاً کم به عنوان یک آنتی اکسیدانت

بحث و نتیجه گیری

نتایج نشان داد که، MSCs قبل و پس از تیمار توسط DMSO قادر به بیان فاکتور های نوروتروفیک و برخی از ژن های دوپامینرژیک هستند. پژوهش های اخیر نشان می دهد که این سلول ها علاوه بر قدرت تمایز به انواع رده های سلولی، به خصوص سلول های عصبی، می توانند با تولید عوامل نوروتروفیک و هورمون های رشد و انواع سیتوکین ها، شرایط را برای القا تمایز سایر سلول ها فراهم کنند. می توان اثر حفاظت عصبی این سلول ها را ناشی از توانایی آن ها در تمایز به سلول های عصبی و جایگزین شدن با سلول های آسیب دیده دانست. اما پژوهش های اخیر امکان تازه ای را مطرح کرده

ضمناً این پژوهش نشان داد که MSCs می‌تواند عوامل نوروتروفیک 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 نوروزن، 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 آندونوس 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 آندونوس جمعیت سلول‌های زاینده به نورون‌های

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

در صورتی که شرایط کشت به گونه‌ای بهبود یابد که امکان فعال‌تر شدن ساخت عوامل رشد و نوروتروفیک توسط سلول‌ها پیش‌تر شود، استفاده از این سلول‌ها را برای درمان مساعدتر می‌نماید. با توجه به کاربرد این ماده به همراه سایر الفاکتورهای 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، ریتینوئیک اسید و فاکتور رشد فیبروبلاستی پایه، نشان دادند که MSCs چندین نوع نشان‌گر سلول‌های 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 الفاکتورها مانند BME و DMSO/BHA را بر تمایز سلول‌ها غیر واقعی و موقت می‌دانند [۲۶].

بنیادی مزانشیمی به دلیل بیان عوامل نروترفیک 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 stromal cells combined with pharmacologically active microcarriers transplanted in hemiparkinsonian 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

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 نروترفیک 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 مورفوزنیک است و *Nurr1* نیز گیرنده orphan بوده که برای تکوین نورون‌های دوپامینرژیک ضروری است [۴۰].

همان‌طوری که اشاره شد برخی از پژوهش‌ها به نقش موثر این قبیل الفاکتورها در پروتوکول‌های تمایزی اشاره دارند [۲۰، ۲۴، ۴۱، ۴۲] و برخی دیگر، مواد شیمیایی نظیر DMSO را برای سلول‌های سمی و تغییر مورفولوژی ناشی از آن را تغییر ساختار اسکلت سلولی و نه تمایز سلولی می‌دانند [۲۶، ۴۳، ۴۴]. 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-PCR دارد.

آنچه که این تحقیق را از سایر پژوهش‌ها متمایز می‌نماید، بررسی بیان هم‌زمان فاکتورهای نروترفیک 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

- [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 regulation 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 hydroxyanisole-induced toxicity: induction of apoptosis through direct release of cytochrome c. *Mol Pharmacol* 2000; 58: 431-437.
- 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-Eliás 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 neuritegenesis. *Exp Neurol* 2006; 198: 54-64.

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 2011 Accepted: 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