مجله دانشگاه علوم پزشکی خراسان شمالی
بهار ۱۳۹۲؛۵(۱):۱۵۷-۱۴۷

Journal of North Khorasan University of Medical Sciences
Spring2013;5(1): 147-157

مقاله پژوهشی

بررسی روند تمایز سلول های شبه سلول عضله اسکلتی مشتق از سلول های بنیادی مزانشیمی بافت چربی انسان تحت تاثیر 5-azacytidine در شرایط آزمایشگاه

زینب نامجو گرمی[۱] ، محمد حسن حیدری[۲*]، محسن نوروزیان[۳]، رضا ماستری فراهانی[۲]، تقی الطریحی[۴] ، عباس پیریایی[۳]، وحید بیاتی[۵]، محمد حسین حیدری[۶]

[۱]دانشجوی کارشناسی ارشد علوم تشریح ، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران
[۲]دانشیار گروه علوم تشریح و بیولوژی تولید مثل، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران
[۳]استادیار گروه علوم تشریح و بیولوژی تولید مثل، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران
[۴]استاد گروه بافت شناسی،دانشگاه تربیت مدرس،تهران،ایران
[۵]استایار گروه علوم تشریح، مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز، اهواز؛ ایران
[۶] استادیار گروه علوم تشریح ، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی هرمزگان ، بوشهر ،ایران
***نویسنده مسئول:** گروه بیولوژی و علوم تشریحی، آزمایشگاه پروتئومیکس، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی شهید بهشتی تهران ایران.
پست الکترونیک: hdr@sbmu.ac.ir

وصول:۹۲/۱/۱۸ اصلاح:۹۲/۲/۳۱ پذیرش:۹۲/۳/۲۱

چکیده

هدف و زمینه : در این مطالعه روند تمایز سلول های شبه سلول عضله اسکلتی مشتق از سلول های بنیادی مزانشیمی بافت چربی انسان تحت تاثیر 5-azacytidine در شرایط آزمایشگاه مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش ها: *سلول های بنیادی بافت چربی انسان بعد از تخلیص، برای ایجاد تمایز استئوژنیک و آدیپوژنیک، تحت تاثیر محیط های کشت القایی استئوژنیک و آدیپوژنیک قرار گرفتند. از طرف دیگر، برای بررسی توان تمایز این سلول ها به سلول عضله اسکلتی از فاکتور [5-aza] 5-azacytidine استفاده شد. به مدت ۲۴ ساعت برای القای تمایز به سلول عضله اسکلتی تحت تاثیر 3µmol 5-azacytidine قرار گرفتند. سپس، این محیط کشت القایی با PBS شسته شد و سلول ها تا ۴ هفته با محیط کشت فاقد 5-azacytidine انکوبه شدند. برای بررسی روند تمایز سلول ها از مقایسه الگو و میزان بیان mRNA ژن های اختصاصی عضله اسکلتی شامل Myogenin، Myh، a-actin، Tropomyosin و Myosin با روش RT-PCR در پایان هفته های اول تا چهارم بعد از القا استفاده شد.*

یافته ها: *سلول های بنیادی مزانشیمی بافت چربی چسبنده، توان تکثیری قابل ملاحظه ای را نشان دادند و مانند مطالعات پیشین پتانسیل تمایز استئوژنیک و آدیپوزنیک را نیز داشتند.mRNA ژن های مورد بررسی به صورت الگویی وابسته به زمان بیان شدند. به نحوی که بیان mRNA ژن Myog در تمام نمونه های هفته ۱ تا ۴، به طور معنی دار با روندی صعودی افزایش یافته بود. ژن Myh در هفته ۲ نسبت به سایر هفته ها بیشترین میزان بیان خود را داشته و در هفته ۴ به کمترین مقدار خود رسیده بود. میزان بیان ژن های a-actinin و Myosin در هفته ۱ پایین بود. اما از هفته ۲ الی ۴ به طور معنی دار با روندی صعودی افزایش یافته بودند. ژن Tropomyosin در هیچکدام از نمونه ها بیان معنی داری نداشت.*

نتیجه گیری: *مطالعه حاضر نشان داد که سلول های بنیادی مزانشیمی بافت چربی انسان می توانند تحت تاثیر 3µmol 5-azacytidine به سلول عضله اسکلتی تمایز پیدا کنند و با افزایش مدت زمان القا، این سلول های عضلانی اسکلتی تکوین یافته تر می شوند.*

واژه های کلیدی: *بافت چربی، سلول بنیادی مزانشیمی، تمایز، سلول عضله اسکلتی*

مقدمه

ترمیم ماهیچه اخیرا به عنوان تکرار تکامل ماهیچه در نظر گرفته می شود. اگرچه برای بدست آوردن دیدگاه هایی در مورد تکامل پیش از تولد ماهیچه اسکلتی به دست آمده است که در چندین مرحله هم پوشان شده مختلف صورت می گیرد. ساخت ماهیچه اسکلتی با اتصال میوبلاست ها برای تشکیل میوتیوب در روز ۹ رویانی آغاز می شود و سپس در روز ۱۱و۱۲رویانی، میوتیوب ها برای تشکیل میوفیبر به هم متصل می شوند. برخی از میوبلاست ها برای تشکیل میوفیبر به هم متصل نمی شوند و به تکثیر و تمایز خود تا روز ۱۷-۱۵ رویانی ادامه می دهند و در نتیجه فیبرهای جنینی و یا ثانویه را ایجاد می کنند که در اصل کوچکتر هستند. در همین زمان غشای پایه در اطراف هر فیبر شروع به تشکیل می کند و فقط بعد از این زمان است که سلول های قمری را به عنوان سلول های تک هسته ای که بین غشای پایه و غشای پلاسمایی فیبر است می توان شناخت. در انتهای رشد بعد از تولد سلول های قمری وارد فاز خاموشی می شوند اما اگر بافت ماهیچه آسیب ببیند دوباره فعال می شوند. آنها فعالیت میتوزی را از سر می گیرند و فیبرهای آسیب دیده را ترمیم می کنند و یا اینکه به هم متصل شده و فیبرهای جدید را ایجاد می کنند[۱]. تعداد این سلولها در بافت ماهیچه ای نسبتاً ثابت است [٪۵-۱]. از طرف دیگر فراوانی این سلولها در عضلات مختلف متفاوت است که این احتمالاً به عملکرد متفاوت عضلات با توجه به نوع فیبرعضلانی [اکسیداتیو تند، اکسیداتیو کند، گلیکولیتیک تند] مربوط می شود [۲]. تا مدت ها گمان می شد که سلول های ماهواره ای تنها منبع سلولها ی بنیادی در بازسازی عضله اسکلتی می باشد [۳]. اما مطالعات فراوانی نشان داده اند که تعداد این سلول ها به هنگام آسیب عضلانی در طول روند بهبود کاهش می یابد و به اتمام می رسد و در پی آن فاز تخریب عضله اسکلتی در پیش گرفته می شود. به علاوه نسبت سلول های ماهواره ای در انواع عضلات با افزایش سن کاهش می یابد که این خود دلیلی بر کاهش توانایی ترمیم عضلانی در افراد مسن می باشد. هم چنین، در تحقیقات گوناگون این نتیجه حاصل شده است که تکثیر سلول های ماهواره ای در محیط in vivo و in vitro به سختی انجام می شود و این سلول ها سریعاً وارد فاز پیری می شوند. لذا حل این مشکل راه حل جدیدی می طلبد تا جهت ترمیم عضله اسکلتی، از دیگر منابع سلول های بنیادی در مهندسی بافت و سلول درمانی استفاده نمود[۹-۲]. برای سلول درمانی و مهندسی بافت بیماری تخریب کننده عضلانی، به منبعی از سلول ها با توانایی ساخت فیبر عضلانی نیاز می باشد [۳]. بافت چربی یکی از بافت هایی است که امروزه مورد توجه بسیاری از پژوهشگران قرار گرفته است. ثابت شده است که علاوه بر سلول های متعهد چربی زا و سلول های عروقی از قبیل سلول های عضله صاف و اندوتلیال، بافت چربی حاوی جمعیتی از سلول های چند ظرفیتی بوده که ویژگی های آنها مشابه به سلول های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان است[۱۵-۱۰]. این سلول ها تحت عنوان سلول های بنیادی مشتق از بافت چربی [ADSCs] نام گذاری شدند. این بافت همانند مغز استخوان منشأ مزانشیمال داشته و از چند جهت دارای مزیت می باشد:

۱-بافت چربی به راحتی و با حداقل روش تهاجمی و به میزان فراوان قابل دست یابی است.

۲-جمعیت سلولی حاصل از بافت چربی دارای منشأ مزانشیمال بوده و ناخالصی کمی از سلول های اندوتلیال، سلول های عضلانی صاف و پری سیت ها را دارد.

۳-سلول های بنیادی حاصل از بافت چربی حتی با گذرانیدن چندین پاساژ، دیرتر وارد فاز پیری می شوند.

۴-سلول های بنیادی حاصل از بافت چربی قابلیت تمایز به سلول های آدیپوژنیک، استئوژنیک، کندروژنیک و میوژنیک را دارند [۲۱-۱۶].

تا کنون نتایج آزمایشات بیانگر این بوده است که کشت کوتاه مدت سلول های بنیادی مشتق از بافت چربی و ترنس پلنت آن به عضله آسیب دیده ترمیم نسبی آن را باعث می شود و هنوز روشی که بتواند باعث تمایز کامل سلول های بنیادی بافت چربی به فنوتیپ میوژنیک شود شناخته نشده است[۲۲]. از فاکتورهایی که در حال حاضر به عنوان افزایش دهنده تمایز میوژنیک اسکلتال استفاده می شوند می توان به 5-azacytidin اشاره کرد. فایو آزاسایتیدین اساسا به عنوان یک آنتی تومور عمل کرده و همچنین برای درمان سرطان استفاده می شود. این ماده

سیتوتوکسیک می باشد ولی در مطالعات اخیر به بررسی توان القایی این فاکتور بر تمایز های میوژنیک، آدیپوژنیک و کندروژنیک پرداخته شده است در این مطالعه برای اولین بار به بررسی اثر این فاکتور بربیان ژن های اختصاصی عضله اسکلتی در سلول های تمایز یافته حاصله از سلول های بنیادی بافت چربی انسان در طی ۴ هفته تمایز پرداخته است. امید است که با انجام این تحقیق و حصول روند تمایز طبیعی و تجزیه و تحلیل نتایج به دست آمده، سلول های تولید شده بتوانند در آینده جایگزین سلول های بیمار و آتروفی و نکروز شده شوند.

روش کار

نمونه بافت چربی احشایی انسانی بعد از شستشو با محلول فسفات بافر سالین[PBS] به تکه هایی با ابعاد کوچک برش داده شد و به مدت ۵۰ دقیقه در دمای ۳۷° و co_2 ۵٪ و رطوبت ۹۵٪ در معرض کلاژناز تیپ ۱ gr ۰/۰۷۵ قرار گرفت. بعد از هضم شدن بافت چربی، جهت خنثی شدن عمل کلاژناز، دو برابر حجم نمونه، محیط کشت دارای FBS٪۱۵ به آن اضافه کرده و حجم نهایی فیلتر شد. مایع حاصل به یک فالکون ۱۵ منتقل شد و دو مرتبه در دور ۲۰۰۰ به مدت ۵ دقیقه سانتریفوژ شد. سلول های حاصل بعد از شمارش با استفاده از لام نئوبار، با تراکم ۱۲۰۰۰۰۰ سلول در هر سانتی متر مربع در فلاسک های ۲۵ سانتی متر مربع حاوی DMEM و FBS15% و Pens/Trep ریخته شدند و در انکوباتورانکوبه شدند. محیط کشت فلاسک ها هر روز یک بار جهت از بین رفتن بافت چربی موجود تعویض شد. پس از آنکه ۹۰٪ کف فلاسک با سلول پر شد، سلول ها به نسبت ۱ به ۴ پاساژ داده شدند. از سلول های پاساژ ۴ برای انجام مراحل بعدی استفاده شد.

برای فلوسیتومتری سلول های جدا شده کشت داده شدند و در پاساژ چهار بعد از جدا شدن با تریپسین، در حدود ده هزار سلول شمارش شده و به فالکون انتقال پیدا کردند. برای ممانعت از اتصال غیر اختصاصی آنتی بادی ها از مرحله بلوک کننده FC به وسیله BSA با غلظت ۰/۵٪ استفاده شد. سپس با پافرمالدهید ۴٪ تثبیت شده و برای نفوذپذیر کردن نسبت به آنتی بادی های درون سلولی از Triton-X100 با غلظت ۵٪ به مدت ۴ دقیقه استفاده شد. در نهایت سلول ها با آنتی بادی های کنژوگه شده با رنگ PE یا FITC به مدت ۱/۵ ساعت انکوبه شدند. نتایج با استفاده از دستگاه Becton Dic نرم افزار WinMDI تفسیر شد.

یکی از راه های اثبات وضعیت بنیادی در سلول های بنیادی مزانشیمی تمایز آنها به رده های مزانشیمی چربی و استخوان و غضروف می باشد که در این مطالعه، دو تمایز آدیپوژنیک و استئوژنیک انجام شده است. برای این کار، سلول های بنیادی مزانشیمی بافت چربی در پاساژ ۴ مورد استفاده قرار گرفتند. بعد از رسیدن سلول ها به تراکم ۵۰٪ محیط کشت القا کننده آدیپوژنیک و استئوژنیک هرکدام به ترتیب، به مدت ۱۴ روز و ۲۱ روز به سلول های گروه آزمایش اضافه گردید. برای تمایز آدیپوژنیک از محیط کشت DMEM، ۱۰٪ FBS، ۰.۵ میکرومول ایزوبوتیل متیل زانتین، ۱ میکرومول دگزامتازون، ۶۰ میکرومول ایندومتاسین و ۵ میکروگرم در میلی لیتر انسولین استفاده شد. برای تمایز استئوژنیک، از محیط کشت DMEM، ۱۰٪ FBS، ۵۰ میکرومول آسکوربات ۲ فسفات، ۱۰ میلی مول بتا گلیسروفسفات، ۰.۱ میکرومول دگزامتازون، NaCl 9%، ۰.۱٪ N HCL، ۱ میلی مول MgCl و ۵۰ میلی مول سدیم بیکربنات استفاده شد.

برای القای تمایز میوژنیک، از سلول های بنیادی بافت چربی پاساژ ۴ استفاده شد. به این ترتیب که سلول ها با تراکم ۸۰۰۰ سلول در پلیت های ۴ خانه پوشیده شده با ژلاتین ۲٪ کشت داده شده و با چسبیدن سلول ها به ژلاتین کف پلیت و رسیدن سلول ها به تراکم ۸۰٪ مرحله تمایز سلول ها آغاز شد. سلول ها به پلیت های ۴ خانه پوشیده شده با ژلاتین ۲٪ انتقال یافتند و به مدت ۴ هفته در محیط کشت حاوی 3µm 5- azacytidine انکوبه شدند. در پایان هر هفته نمونه برداری از سلول ها به عمل آمد. همچنین سلول های بنیادی مزانشیمی بافت چربی در پاساژ ۴ برای گروه کنترل منفی با محیط کشت FBS15% انکوبه شدند و در انتهای هر هفته بیان ژن آن ها بررسی شدند. بیوپسی گرفته شده از بافت عضله اسکلتی انسان نیز به عنوان گروه کنترل مثبت در نظر گرفته شد.

جهت مقایسه الگو و میزان بیان ژن های اختصاصی بافت عضله اسکلتی در سلول های در حال تمایز، شاخص های تمایز عضله اسکلتی شامل بیان ژن های Myog، Myh ، alpha-actin، Tropomyosin و Myosin در پایان هفته های اول تا چهارم مورد بررسی قرار گرفت. هم چنین از ژن GAPDH به عنوان کنترل داخلی استفاده شد. برای این منظور در هر مورد حدود ۵۰۰ هزار تا ۱ میلیون از سلول ها توسط PBS شسته و توسط بافر RNx^{plus} لیز شدند. کل RNA سلول ها با این روش استخراج شده و با استفاده از پرایمر Oligo dt و آنزیم نسخه بردار معکوس MMULV رشته مکمل cDNA ساخته شد. سپس واکنش PCR با استفاده از پرایمرهای جدول اختصاصی [جدول۱]، در حجم ۳۰ میکرولیتر و در ۲۵ تا ۳۰ سیکل انجام شد. سرانجام محصولات PCR به دست آمده روی ژل اگارز ۲ درصد الکتروفورز شد و تصاویر ژل ها با استفاده از دستگاه UV-Transilluminator در حضور سایبر گرین و تحت تابش نور UV تهیه شد. برای مقایسه نیمی کمی بیان ژن های مورد بررسی در زمان های مورد نظر از ژن GAPDH به عنوان کنترل داخلی استفاده شد و میزان بیان ژن ها

جدول ۱. مشخصات پرایمرهای مورد استفاده در PCR (جدول پرایمرها)

Genes	Primer sequences	Length (bp)
HLA-DR	F: 5’AGGCGAGTTTATGTTTGACT 3’ R: 5’ GGCTGTTTGTGAGCACAGTT 3’	۲۳۰
Aipha-actinin	F:5’ TGTTGGAGTGGATCCGCCGCACAA 3’ R5’ CATCCTGCCCTCAGAGGGGATGAA 3’	۲۳۰
GAPDH	F 5’ TATTGGGCGCCTGGTCACCAGGGCTGC T 3’ R5’ GGTCATGAGTCCTTCCACGACGATACC 3’	۵۱۰
Tropomyosin	F:5’ ATAAGAAAGCCGCTGAGGACAAG 3’ R:5’ CATGGCCCGGTTTTCTATC 3’	۳۲۰
Myoh	F:5’ GACAACCTGGCAGATGCTG 3’ R: 5’CTTGCGTGTTTCTCCTTCTC 3’	۲۰۰
Myogenin	F 5’ACAGCGCCTCCTGCAGTCCAG3’ R 5’ GGAGGCAGCTGGATGAGGGCG 3’	٤۰۰

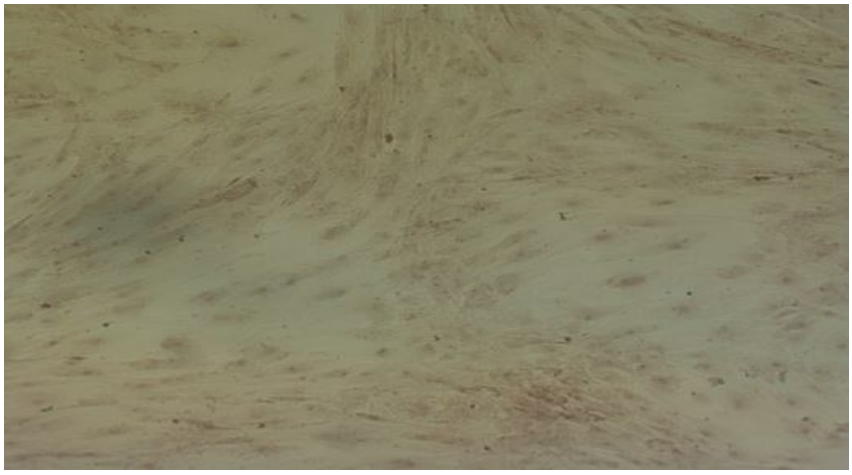
نسبت به روز صفر [سلول مزانشیم پاساژ ۴] محاسبه شد(جدول ۱). در این مطالعه با استفاده از نرم افزار Gene Tools میزان بیان ژن را در تکنیک RT-PCR به صورت داده های کمی پارامتریک درامده و با استفاده از برنامه SPSS16 و روش آماری LSD ANOVA تجزیه تحلیل آماری صورت پذیرفت.

یافته ها

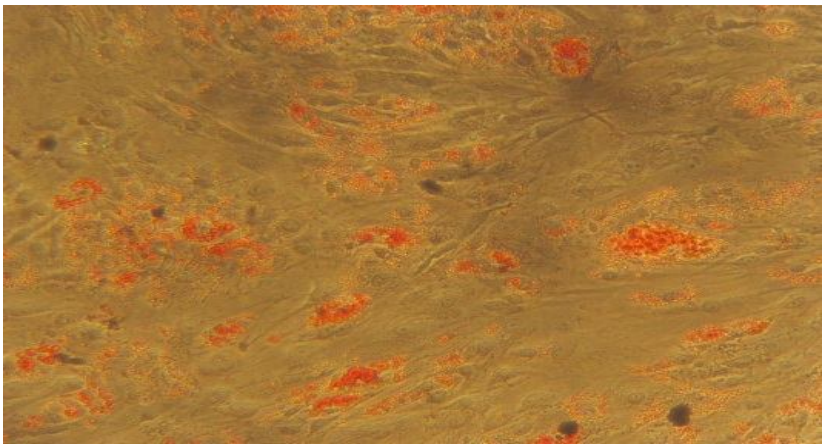
در مطالعه با میکروسکوپ نوری، سلول های بنیادی مزانشیمی دوکی شکل و شبه فیبروبلاست بافت چربی، به هنگام جداسازی و کشت از لحاظ مورفولوژیک شبیه سلول های بنیادی مزانشیمی هستند که از بافت های دیگر تا به حال جداسازی شده است(شکل۱).

بررسی CD-Marker های اختصاصی سلولهای مزانشیمی در سلولهای پاساژ چهارم با استفاده از flow cytometry نشان داد که بطور میانگین ۹۸/۶ درصد این سلول مارکر CD105 و حدود ۹۹/۶ درصد آن ها مارکر CD90 را بیان کردند. CD105 و CD90 مارکر های اختصاصی سلول های بنیادی مزانشیمی هستند. درحالیکه همین سلولها تقریباً مارکرهای اختصاصی سلول های بنیادی هماتوپوئتیک مانند CD34 و CD45 را بیان نکردند. بنابراین سلول های مورد استفاده در تحقیق حاضر سلول های بنیادی مزانشیمی بودند (نمودار ۱).

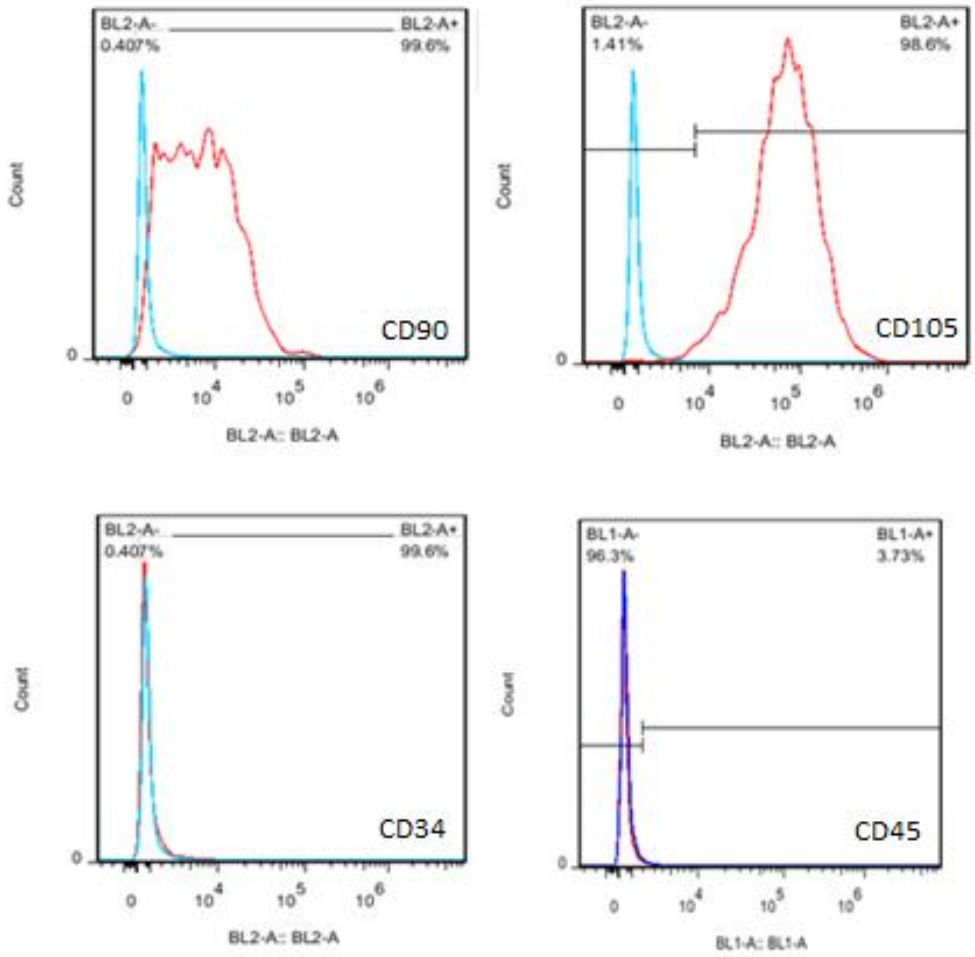
پتانسیل تمایزی سلول های بنیادی مزانشیمی نیز با کشت این سلول ها در محیط های آدیپوژنیک و استئوژنیک



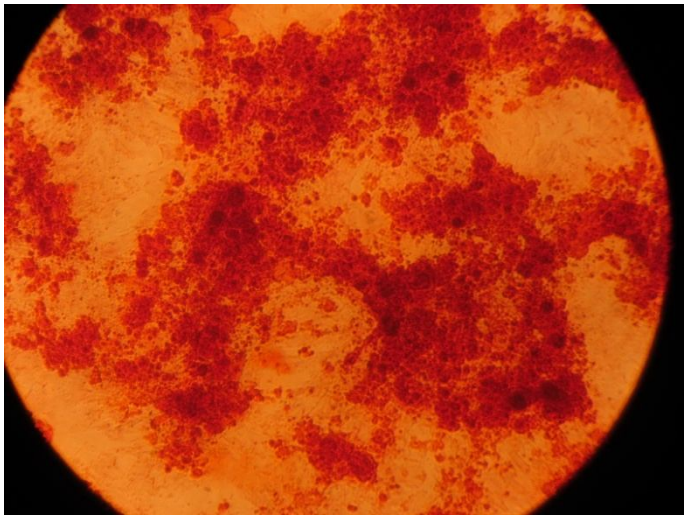
شکل ۱: تصویر میکروسکوپ نوری (سلول های بنیادی مشتق از بافت چربی در پاساز ۴)



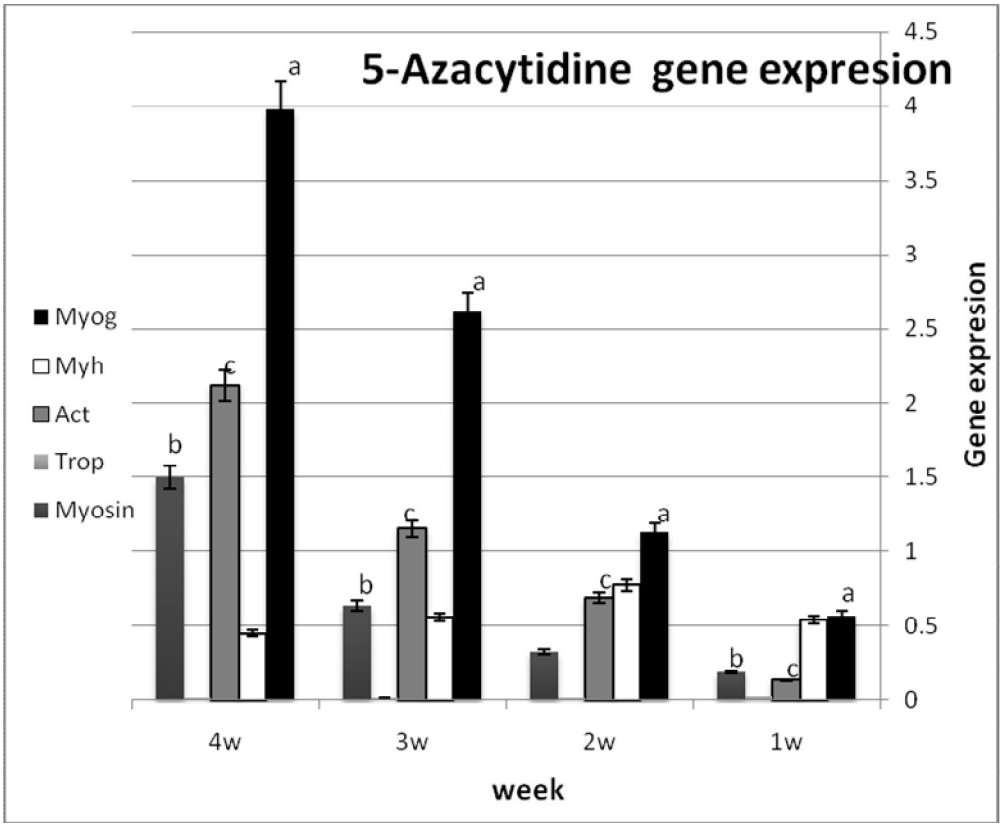
شکل ۲: رنگ آمیزی آلیزارین رد برای تمایز استئوژنیک(تمایز استئوژنیک)



نمودار ۱: نمودارهای فلوسیتومتری بررسی CD-Marker های سلول های بنیادی مزانشیمی بافت چربی انسان در پاساژ چهارم، که برای القای تمایز به سلول عضله اسکلتی استفاده شدند.



شکل ۳: رنگ آمیزی Oil-red برای تمایز آدیپوزنیک (تمایز آدیپوزنیک)



نمودار ۲: میزان بیان ژن های اختصاصی عضله اسکلتی درسلول های تمایز یافته حاصل ازسلول های بنیادی بافت چربی

مورد ارزیابی قرار گرفت. پس از ۲ هفته کشت سلول ها در محیط آدیپوژنیک، قطرات چربی در سیتوپلاسم سلول ها ظاهر شدند که برای مشاهده محتوای تری گلیسیرید آنها از رنگ آمیزی Oil red استفاده شد (شکل ۲). در تمایز استئوژنیک، بعد از ۳ هفته سلول ها چند لایه شده و در اطراف خود ماتریکس معدنی ترشح کردند که با رنگ آمیزی Alizarin red به صورت کلونی های استخوانی قابل رویت بودند(شکل ۳).

نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که سلول های بنیادی مزانشیمی بافت چربی تحت القاء محیط کشت حاوی 5-azacytidine قادر به بیان ژن های اختصاصی عضله اسکلتی می باشد. به طوری که میزان بیان ژن های Myog، Myh ، a- actin و Myosin در تمام نمونه های هفته ۱ تا ۴، به طور معنی دار نسبت به گروه کنترل منفی افزایش یافته بودند($P<0/05$). ولی میزان بیان ژن Tropomyosin تفاوت معنی داری نسبت به گروه کنترل منفی نداشت($P<0/05$) بیان mRNA ژن Myog در تمام نمونه های هفته۱تا ۴، به طور معنی دار با روندی صعودی افزایش یافته بود($P<0/05$). ژن Myh در هفته ۲ نسبت به سایر هفته ها بیشترین میزان بیان خود را داشته و در هفته ۴ به کمترین مقدار خود رسیده بود($P<0/05$). میزان بیان ژن های a-actinin و Myosin در هفته ۱ پایین بود. اما از هفته ۲ الی ۴ به طور معنی دار با روندی صعودی افزایش یافته بودند($P<0/05$) (نمودار ۲).

بحث

در سراسر طول عمر، عضلات بدن به طور مداوم در مواجهه با نیروهای بیومکانیکی و یا تغییرات دژنراتیو مرتبط با انواع بیماری ها قرار می گیرند. در عضله اسکلتی برخلاف عضله قلبی در مراحل اولیه بعد از آسیب، ترمیم دوباره عضله آغاز می شود اما در شکل های شدیدتر آسیب عضله اسکلتی مانند بیماری دیستروفی دوشن روند ترمیم پس از چند سال از بین می رود [۲۳]. بازسازی اولیه عضله اسکلتی در هنگام آسیب دزنراتیو، توسط تکثیر و تمایز سلولهای بنیادی میوژنیک واقع در بافت خود عضله اسکلتی انجام می شود. این سلول ها، سلول های اقماری نام دارند و در زیر بازال لامینای هر فیبر عضلانی قرار می گیرند [۲۴]. تعداد این سلولها در بافت ماهیچه ای نسبتاً ثابت و کم می باشد [۵٪-۱]. از طرف دیگر فراوانی این سلولها در عضلات مختلف متفاوت است که این احتمالاً به عملکرد متفاوت عضلات با توجه به نوع فیبرعضلانی (اکسیداتیو تند، اکسیداتیو کند، گلیکولیتیک تند) مربوط می شود [۲۵]. تا مدت ها گمان می شد که سلول های ماهواره ای تنها منبع سلولها ی بنیادی در بازسازی عضله اسکلتی می باشد [۲۶]. اما مطالعات فراوانی نشان داده اند که تعداد این سلول ها به هنگام آسیب عضلانی در طول روند بهبود کاهش می یابد و به اتمام می رسد و در پی آن فاز تخریب عضله اسکلتی در پیش گرفته می شود. به علاوه نسبت سلول های ماهواره ای در انواع عضلات با افزایش سن کاهش می یابد که این خود دلیلی بر کاهش توانایی ترمیم عضلانی در افراد مسن می باشد. هم چنین، در تحقیقات گوناگون این نتیجه حاصل شده است که تکثیر سلول های ماهواره ای در in vitro و in vivo به سختی انجام می شود و این سلول ها سریعاً وارد فاز پیری می شوند. بنابراین راه حل جدیدی را برای رفع این مشکل باید اتخاذ نمود تا جهت ترمیم عضله اسکلتی، از دیگر منابع سلول های بنیادی در مهندسی بافت و سلول درمانی استفاده نمود[۲۸-۲۵]. برای سلول درمانی و مهندسی بافت بیماری تخریب کننده عضلانی، به منبعی از سلول ها با توانایی ساخت فیبر عضلانی نیاز می باشد [۲۶]. در طی سال های اخیر، دانشمندان موفق به جداسازی و کشت سلول های بنیادی، عمدتاً از مغز استخوان و بافت چربی و عروق خونی شده اند که قادراند به انواع مختلفی از سلول ها و بافت ها تبدیل شوند [۷،۲۹،۳۰]. در مطالعات مختلف بسیاری از فاکتورهای بالقوه میوژنیک بررسی شده اند و مشخص شده است که در تمایز سلول بنیادی به سلول عضله اسکلتی، فاکتورهای القایی مختلفی از قبیل 5-azacytidine، سرم اسب، دگزامتازون، هیدروکورتیزون، آمفوتریپسین بی، TGF-β، ترکیبی از انسولین و ترنسفرین و سلنیوم و غیره نقش دارند[۳۱]. فاکتور5-azacytidine عامل دمتیله کننده ای است که به طور انتخابی موجب فعال شدن بیان ژن ها شده و بر وضعیت تمایزی ژن ها تاثیر می گذارد و نشان داده شده که موجب تمایز سلول های بنیادی مزانشیمی به میوبلاست های اسکلتی می شود بنابراین در این مطالعه برای بهبود شرایط محیط کشت تمایز عضله اسکلتی از ماده شیمیایی azacytidine -5 استفاده شده است [۳۲].

نتایج مطالعات مختلف نشان می دهد وقتی که سلول ها در حضور 5-azacytidine انکوبه شوند به سلول های شبه اسکلتال میوسیت تمایز می یابند اما تعیین غلظت دقیق تمایز میوژنیک آن هنوز نا معلوم ودر حال بررسی می باشد به طوری که Taylor و Jones در سال ۱۹۸۲ برای اولین بار گزارش دادند که 5-azacytidine سبب القای میوژنیک در سلول های بنیادی جنینی و بالغ می شود [۳۳].

جین فنگ هو[1] با به کار بردن ۱۰ میکرومول 5-azacytidine برای ۲۴ ساعت در دو گروه سلول بنیادی مغز استخوان دریافت کننده لیزر و فاقد لیزر و انجام دادن ایمونوسیتوشیمی، نشان داد که بعد از دو هفته، پروتئین های اختصاصی عضله اسکلتی از قبیل دسمین و آلفا-اکتین در هر دو گروه بیان شدند. بدین ترتیب به اثبات رسانید که 5-azacytidine نقش مهمی در تسهیل تمایز میوژنیک ایفا می کند. بررسی های وی در حد آنالیزهای سیتوتوکسیک بوده و بررسی تمایز میوژنیک، از نظر ژنتیکی و انجام PCR نبوده است[۳۴]. درمطالعه ای دیگر، ریوسک[2]، ۰/۵ میکرومول 5-azacytidine را به

1- Jian-feng Hou
2 -Ryusuke

مدت ۲۴ ساعت برای القای میوژنیک در سلول های بنیادی پالپ دندان استفاده نمود. نتایج RT-PCR بعد از ۳ هفته نشان داد که بیان ژن MyoD باعث up-regulate شدن بیان ژن Myog شد و تشکیل میوتیوب و تمایز نهایی سلول عضله اسکلتی با بیان زنجیره سنگین ژن Myosin مشخص می شود [۳۲]. آقای ونرونگ[1] به بررسی اثر 5-azacytidine با غلظت ۱۰ میکرومول بر تمایز عضله قلبی و اسکلتی سلول های بنیادی مغز استخان پرداخته بود و مشاهده کرد که میزان بیان ژن های Myosin و alpha-actin در عضله اسکلتی در انتهای هفته دوم افزایش یافته بود[۳۵]. با توجه به مطالعات یاد شده هنوز منبع سلولی بهینه جهت تمایز میوژنیک و میزان دقیق غلظت فاکتور القایی و بیان سایر ژن های اختصاصی عضله اسکلتی در تمایز های با مدت زمان بیشتر کشت سلول ها نامعلوم و مبهم می باشد. به همین منظور در این مطالعه بیان چندین ژن اختصاصی عضله اسکلتی از قبیل Myog، Myh ، alpha-actin ، Tropomyosin وMyosin در پایان هفته های اول تا چهارم، در سلول های تمایز یافته حاصل از سلول های بنیادی مزانشیمی بافت چربی انسانی تحت تاثیر غلظت 5-azacytidine 3µmol مورد بررسی قرارداده شد و نتایج به این گونه بود که mRNA ژن Myog در همه هفته ها بیان قابل توجه ای داشته و باعث up-regulate شدن بیان ژن Myh می شود. این نتایج مشابه کار Ryusukeبود که نشان داد بیان Myogenin تحت تاثیر 5-azacytidin افزایش می یابد32 . ژن Myh در هفته ۲ به طور قابل توجهی افزایش یافته و سپس در هفته ۳ و ۴ روند نزولی را نشان داده است. . ژن های Myog و Myh جزء فاکتورهای تنظیمی میوژنیک بوده و بیان آن ها منجر به بیان ژن های اختصاصی سلول تمایز یافته عضله اسکلتی مانند Myosin و Tropomyosin و alpha-actin می شوند. در این مطالعه بیان ژن های alpha-actin وMyosin، از هفته ۱ تا ۴، نسبت به گروه کنترل منفی به طور معناداری افزایش یافت به گونه ای که بیشترین میزان بیان ژن های alpha-actin و Myosin در انتهای هفته چهارم می باشد. همانطور که گفته شد، بیان این ژن ها در اوایل تمایز میوژنیک کم یا غیر قابل توجه می باشد و بیان آن ها تحت اثر القایی ژن های تمایز اولیه، مثل Myogenin وMyh به تدریج افزایش می یابد که این روند مشابه نتایج کار این مطالعه که در غلظت۳ میکرومول 5-azacytidine انجام شد می باشد. با توجه به اثر مثبت غلظت ۳ میکرومول5-azacytidine بر افزایش بیان ژن های یاد شده می توان نتیجه گرفت که این غلظت یک غلظت مناسب برای تمایز عضله اسکلتی می باشد چرا که غلظت های بالا آن سیتوتوکسیک و پایین ان بی تاثیر بر تمایز سلول های عضله اسکلتی می باشد و می توان نتیجه گرفت غلظت ۳ میکرومول به عنوان غلظت مناسب و متعادل برای تمایز این سلول ها باشد.البته باید گفت میزان بیان ژن Tropomyosin به عنوان یک ژن ساختاری عضله اسکلتی بر خلاف ژن های alpha-actin و Myosin در طی ۴ هفته کاهش یافته بود که این کاهش بیان ژن مارا به سمت انجام مطالعات بیشتر در این زمینه سوق می دهدتا به استفاده از سایر فاکتور های تمایزی و محیط های کشت بهترین تمایز عضله اسکلتی را از سلول های بنیادی مشتق از بافت چربی داشته باشیم از طرفی با مشخص کردن روند تمایزی سلول های بنیادی مزانشیمی به سلول عضله اسکلتی، می توانیم به راهکاری برای دست یابی به سلول هایی مناسبتر به منظور استفاده در سلول درمانی دست یابیم. به گونه ای که سلولهای حاصله شباهت بیشتری به سلول عضله اسکلتی بالغ داشته باشند، و همچنین درصد بیشتری از سلول های بنیادی به سلول های شبه سلول عضله اسکلتی تمایز یابند.

نتیجه گیری

نتیجه حاصل از این مطالعه نشان داد که سلول های بنیادی مزانشیمی بافت چربی انسان تحت 5-aza قادر به بیان ژنهای اختصاصی عضله اسکلتی می باشند.

تشکر و قدردانی

این مقاله نتایج حاصل از پایان نامه انجام شده با کد ۱۷۶ درگروه علوم تشریح و بیولوژی دانشکده علوم پزشکی دانشگاه شهید بهشتی می باشد و از همکاری صمیمانه اعضای محترم گروه علوم تشریح کمال تشکر را داریم.

1 -WENRONG

Reference

1. Cosimo De Bari, Francesco Dell'Accio, Frank Vandenabeele, Joris R. Vermeesch, Jean-Marc Raymackers and Frank P. Luyten: Skeletal muscle repair by adult human Mesenchymal stem cells from synovial membrane. TRUP. 2003, 909–918

2. Chet E. Holterman, Michael A. Rudnicki: Molecular regulation of satellite cell function. Seminars in Cell & Developmental Biology. 16 (2005) 575–584

3. Jennifer CJ Chen and David J Goldhamer: Skeletal muscle stem cells. Reproductive Biology and Endocrinology 2003; 1:1-7

4. Cosimo De Bari, Francesco Dell'Accio, Frank Vandenabeele, Joris R. Vermeesch, Jean-Marc Raymackers and Frank P. Luyten: Skeletal muscle repair by adult human Mesenchymal stem cells from synovial membrane. TRUP. 2003, 909–918

5. Jerzy Kawiak, Edyta Brzóska, Iwona Grabowska, Grazyna Hoser,Władysława Streminska, Danuta Wasilewska, Eugeniusz Krzysztof Machaj,Zygmunt Pojda and Jerzy Moraczewski: Contribution of stem cells to skeletal muscle regeneration. Folia Histochem Cytobiol. 2006; 44(2): 75-79

6. alle, Jordi Diaz-Manera, Graziella Messina, and Giulio Cossu: Repairing skeletal muscle: regenerative potential of skeletal muscle stem cells. J Clin Invest. 2010; 120(1): 11–19

7. Jerry Chan, Keelin O'donoghue, Manuela Gavina, Yvan Torrynte, Nigel kennea, Huseyin Mehmet, Helen Stewart, Diana J. Watt, Jennifer E. Morgan, Nicholas M. Fisk: Galectin-1 induces skeletal muscle differentiation in human fetal Mesenchymal stem cells and increases muscle regeneration. STEM CELLS. 2006; 24:1879–1891

8. Eun Ji Gang, Ju Ah Jeong, Seung Hyun Hong, Soo Han Hwang, Seong Whan Kim, Il Ho Yang, Chiyoung Ahn, Hoon Han, Hoeon Kim: Skeletal myogenic differentiation of mesenchymal stem cells isolated from human umbilical cord blood. STEM CELLS. 2004; 22: 617–624

9. Giulio Cossu and Fulvio Mavilio: Myogenic stem cells for the therapy of primary myopathies: wishful thinking or therapeutic perspective? Clinical Investigation. 2000; 1669-1674

10.Zuk PA, Zhu M, Ashjian P, De Ugarte DA, Huang JI, Mizuno H, et al: Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. Mol Biol Cell. 2002; 13(12): 4279-95

11.De Ugarte DA, Alfonso Z, Zuk PA, Elbarbary A, Zhu M, Ashjian P, et al: Differential expression of stem cell mobilization-associated molecules on multi-lineage cells from adipose tissue and bone marrow. Immunol Lett 2003; 89(2-3): 267-70

12.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): 211-28

13.Wickham MQ, Erickson GR, Gimble JM, Vail TP, Guilak F: Multipotent stromal cells derived from the infrapatellar fat pad of the knee. Clin Orthop Relat Res 2003; 412: 196-212

14.Rodriguez AM, Elabd C, Amri EZ, Ailhaud G, Dani C: The human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. Biochimie 2005; 87(1): 125-8

15.Rodriguez AM, Pisani D, Dechesne CA, Turc-Carel C, Kurzenne JY, Wdziekonski B, et al: Transplantation of a multipotent cell population from human adipose tissue induce dystrophin expression in the immunocompetent mdx mouse. J Exp Med 2005; 201(9): 1397-405

16.alle, Jordi Diaz-Manera, Graziella Messina, and Giulio Cossu: Repairing skeletal muscle: regenerative potential of skeletal muscle stem cells. J Clin Invest. 2010; 120(1): 11–19

17.Giuliana Di Rocco, Maria Grazia Iachininoto, Alessandra Tritarelli, Stefania Straino, Antonella Zacheo,Antonia Germani, Filippo Crea3 and Maurizio C. Capogrossi: Myogenic potential of adipose-tissue-derived cells. J Cell Sci. 2006; 15; 119(Pt 14): 2945-2952

18.Jean Gekas, Guillaume Walther, Daniel Skuk, Emmanuel Bujold, Isabelle Harvey, Olivier Francois Bertrand: In vitro and in vivo study of human amniotic fluid-derived stem cell differentiation into myogenic lineage. Clin Exp Med. 2010; 10:1–6

19.Brian M Strem, Kevin C Hicok, Min Zhu, Isabella Wulur, Zeni Alfonso, Ronda E Schreiber, John K Fraser and Marc H Hedrick: Multipotential differentiation of adipose tissue-derived stem cells. Keio J Med. 2005; 54 (3): 132–141

20.Hiroshi Mizuno and Hiko Hyakusoku: Mesengenic potential and future clinical perspective of human processed lipoaspirate cells. J Nippon Med Sch. 2003; 70(4): 300-305
21.Patricia A. Zuk, Min Zhu, Peter Ashjian, Daniel A. De Ugarte, Jerry I. Huang, Hiroshi Mizuno, Zeni C. Alfonso, John K. Fraser, Prosper Benhaim and Marc H. Hedrick: Human Adipose Tissue Is a Source of Multipotent Stem Cells. Molecular Biology of the Cell. 2002; 13: 4279–4295
22.Giuliana Di Rocco1,*, Maria Grazia Iachininoto2, Alessandra Tritarelli2, Stefania Straino2, Antonella Zacheo2, Antonia Germani1, Filippo Crea3 and Maurizio C. Capogrossi2,*: Myogenic potential of adipose-tissue-derived cells. Journal of Cell Science 119, 2945-2952 . 2006; doi:10.1242/jcs.03029
23.Zeidán Chuliá F, Noda M .Opening The Mesenchymal Stem Cell Tool Box .Eur J Dent 2009; 3:240-249.
24.Reginald E. Bittner , Christian Schöfer, Klara Weipoltshammer , Silva Ivanova, Berthold Streubel, Erwin Hauser, Michael Freilinger , Harald Höger, Adelheid Elbe Bürger, Franz Wachtler: Recruitment of bone-marrow-derived cells by skeletal and cardiac muscle in adult dystrophic mdx mice. Anat Embryol. 1999; 199: 391–396
25.Chet E. Holterman, Michael A. Rudnicki: Molecular regulation of satellite cell function. Seminars in Cell & Developmental Biology. 16 (2005) 575–584
26.Jennifer CJ Chen and David J Goldhamer: Skeletal muscle stem cells. Reproductive Biology and Endocrinology 2003; 1:1-7
27.Eun Ji Gang, Ju Ah Jeong, Seung Hyun Hong, Soo Han Hwang, Seong Whan Kim, Il Ho Yang, Chiyoung Ahn, Hoon Han, Hoeon Kim: Skeletal myogenic differentiation of mesenchymal stem cells isolated from human umbilical cord blood. STEM CELLS. 2004; 22: 617–624
28.Giulio Cossu and Fulvio Mavilio: Myogenic stem cells for the therapy of primary myopathies: wishful thinking or therapeutic perspective? Clinical Investigation. 2000; 1669-1674
29.*Takeshi Endo:* Stem cells and plasticity of skeletal muscle cell differentiation: potential application to cell therapy for degenerative muscular diseases. Regenerative Medicine. 2007; 2(3): 243-256
30.Richard K. Burt, Yvonne Loh, William Pearce, Nirat Beohar, Walter G. Barr, Robert Craig, Yanting Wen, Jonathan A. Rapp and John Kessler: Clinical applications of blood-derived and marrow-derived stem cells for nonmalignant diseases. JAMA. 2008 Feb 27; 299(8): 925-936
31.Peter E, Westerweel and Marianne C: Directing myogenic mesenchymal stem cell differentiation. Circ Res 2008; 103: 560-561
32.Ryusuke Nakatsuka, Tadashige Nozaki, Yasushi Uemura, Yoshikasu Matsuoka, Yutaka Sasaki, Mitsuko Shinohara, Kiyoshi Ohura, Yoshiaki Sonoda:; 5-Aza-2'-deoxycytidine treatment induces skeletal myogenic differentiation of mouse dental pulp stem cells. Archives Of Oral Biology 2010; 55: 350-357
33.Frank P. Barry, J. Mary Murphy: Mesenchymal stem cells: clinical applications and biological characterization. The Internal Journal Of Biochemistry & Cell Biology 2004; 568-584
34.Jian-Feng Hou, Hao Zhang, Xin Yuan, Jun Li, Ying-jie Wei and Sheng-shou Hu: In vitro effects of low-level laser irradiation for bone marrow mesenchymal stem cells: proliferation, growth factors secretion and myogenic differentiation. Lasers in Surgery and Medicine 2008; 40: 726-733
35.Wenrong Xu, Xiran Zhang, Hui Qian, Wei Zhu, Xiaochun Sun, Jiabo Hu, Hong Zhou and Yongchang Chen: Mesenchymal stem cells from adult human bone marrow differentiate into a cardiomyocyte phenotype. Experimental Biology and Medicine 2004; 229: 623-631

Original Article

Evaluation of the differentiation process of human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells to skeletal muscle-like cells: An in vitro study

Namjoo Germi Z[1] , Heydari M[2], Noruzian M[3], Mastari Farahani M[2] , Altarihi T[4], Piryaei M[3], Bayati V[5], Heydari M[6]*

[1]M.Sc student of Anatomical Sciences, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran
[2]Associate Professor of Anatomical Sciences, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran
[3] Assistant Professor Anatomical Sciences, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran
[4] Professor of Histology,Tarbiat Modares University, Tehran, Iran
[5] Assistant Professor of Anatomical Sciences, Cellular and Molecular Biology Research Center,Jondi Shapoor University of Medical Sciences,Ahvaz,Iran
[6] Assistant Professor Anatomical Sciences, Hormozgan University of Medical Sciences, Bushehr, Iran

***Corresponding Author**: School of Medicine, Shaheed beheshti Medical Sciences University, Tehran, Iran
Email: hdr@sbmu.ac.ir

Abstract

Background Objectives: *This study was carried out to evaluate the development of skeletal muscle-like cells derived from human adipose tissue mesenchymal stem cells induced by 5-azacytidine [5-aza] under in vitro condition.*

Materials and methods: *Human adipose tissue mesenchymal stem cells [ADSCs] were purified. These cells were cultured in osteogenic or adipogenic induction medium to induce osteogenic and adipogenic differentiation. On the other hand, the skeletal myogenic differentiation potential of these cells was investigated using 3µmol 5-azacytidine [5-aza] treatment for 24 hours. Then the culture was washed out by PBS and were put in the culture medium free of 5-aza for another 4 weeks until sampling. RT-PCR assay was performed to detect the expression of specific skeletal muscle genes including Myogenin, Myh, alpha-actin, tropomyosin and myosin at 1-4 weeks after the first induction.*

Results*: The adherent adipose tissue-derived mesenchymal stem cells exhibited a significant proliferative capacity and also showed osteogenic and adipogenic differentiation as seen in previous studies. The expression of four skeletal muscle cells genes was detected 1st to 4th week after induction in a time-dependent manner. There was a continuous increase in expression of Myogenin gene from the 1st to 4th week, whereas that of the Myh was higher after two weeks and lower after 4 weeks in comparison to the other weeks. The levels of mRNA of alpha-actin and Myosin expression were at the highest level in the fourth week. Expression of tropomyosin gene was not significant in the samples.*

Conclusion: *The current study indicated that stimulating human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells by 5-aza with the concentration of 3µmol under in vitro condition can lead to differentiating skeletal muscle-like cells. Furthermore prolonged culture duration may lead to more differentiated cells.*

Key words*: Adipose tissue, Mesenchymal stem cells, differentiation, skeletal muscle cell*

Submitted:1 Apr 2013
Revised:21 May 2013
Accepted:11June 2013