Expression of Hepatocyte Markers in Wharton's Jelly Mesenchymal Stem Cells Using Mouse Liver Cell Extract

Maryam Borhani-Haghighi[1, 2*], Fatemeh Alipour[1], Arezou Eshaghabadi[1]

[1]Shefa Neuroscience Research Center, Khatam Alanbia Hospital, Tehran, Iran
[2]Department of Anatomy, School of Medicine, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

Article Info:

Received: **24 Jul 2016** ***Accepted:*** **6 Apr 2017**

ABSTRACT

Introduction: Efforts have been taken to find appropriate sources to replace liver transplantation. Wharton's jelly is an unlimited source of stem cells that can be used in cell therapy and tissue engineering. In this study we investigated whether Wharton's jelly-derived mesenchymal stem cells (WJMSCs) could trans-differentiate into hepatocyte in the presence of mouse liver cell-free extract. ***Materials and Methods:*** Mesenchymal stem cells (MSCs) were isolated from the umbilical cord. The cells were permeabilized by Sterptolysin O in the presence of mouse liver cell-free extract for 21 days. To evaluate differentiation and morphological changes, immunostaining for cytokeratin 18 and 19 were performed for differentiated and control cells. Functional assays were done by periodic acid Schiff (PAS) stain. ***Results:*** The phenotype of treated MSCs in the presence of liver cell-free extract changed into polygonal cells. Immunostaining demonstrated the expression of cytokeratin 18 and 19 in differentiated cells. Glycogen storage in differentiated cells revealed by PAS staining indicated functional property of differentiated cells. ***Conclusion:*** It seems that factors existing in the extract able to trans-differentiate WJMSCs into functional hepatocyte.

Key words:

1. Mesenchymal Stromal Cells
2. Liver Extracts
3. Hepatocytes
4. Wharton Jelly

***Corresponding Author:** Maryam Borhani-Haghighi

E-mail: *borhanihm@gmail.com*

[Downloaded from shefayekhatam.ir on 2025-07-07]

[DOI: 10.18869/acadpub.shefa.5.2.S1.1]

بیان نشانگرهای کبدی در سلول‌های بنیادی مزانشیمی ژله وارتون بند ناف توسط عصارهٔ سلول کبد موش

مریم برهانی حقیقی[۱،۲*]، فاطمه علی‌پور[۱]، آرزو اسحق آبادی[۱]

[۱]مرکز تحقیقات علوم اعصاب شفا، بیمارستان خاتم‌الانبیاء، تهران، ایران

[۲]گروه آناتومی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران

اطلاعات مقاله:

تاریخ دریافت: ۳ مرداد ۱۳۹۵

تاریخ پذیرش: ۱۷ فروردین ۱۳۹۶

چـــــکیده

مقدمه: برای پیدا کردن منابع مناسب در جایگزینی پیوند کبد تلاش‌هایی صورت گرفته شده است. ژله وارتون یک منبع نامحدود از سلول‌های بنیادی است که می‌تواند در سلول درمانی و مهندسی بافت به کار رود. در این مطالعه بررسی کردیم که آیا سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق شده از ژله وارتون بند ناف می‌توانند در حضور عصارهٔ عاری از سلول کبد موش به سلول‌های کبدی تمایز یابند. **مواد و روش‌ها:** سلول‌های بنیادی مزانشیمی از بند ناف جدا شدند. سلول‌ها توسط استرپتولیزین O در حضور عصارهٔ عاری از سلول کبد موش به‌مدت ۲۱ روز نفوذپذیر شدند. به‌منظور ارزیابی تمایز و تغییرات ریخت‌شناسی، ایمونوهیستوشیمی برای سیتوکراتین ۱۸ و ۱۹ برای سلول‌های تمایز یافته و کنترل انجام شد. سنجش عملکرد توسط روش رنگ‌آمیزی PAS انجام شد. **یافته‌ها:** فنوتیپ سلول‌های بنیادی مزانشیمی در حضور عصارهٔ عاری از سلول کبدی به سلول‌های چند ضلعی تغییر پیدا کرد. ایمونوهیستوشیمی بیان سیتوکراتین ۱۸ و ۱۹ در سلول‌های تمایز یافته را نشان داد. ذخیره‌سازی گلیکوژن در سلول‌های تمایز یافته توسط رنگ‌آمیزی PAS خاصیت عملکردی سلول‌های تمایز یافته را نشان داد. **نتیجه‌گیری:** به نظر می‌رسد که عوامل موجود در عصاره می‌توانند سبب تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی ژله وارتون بند ناف به سلول‌های کبدی عملکردی شوند.

کلید واژه‌ها:

۱. سلول‌های مزانشیمی استرومال
۲. عصارهٔ کبد
۳. هپاتوسیت‌ها
۴. ژله وارتون

* **نویسنده مسئول:** مریم برهانی حقیقی

آدرس الکترونیکی: *borhanihm@gmail.com*

[Downloaded from shefayekhatam.ir on 2025-07-07]

[DOI: 10.18869/acadpub.shefa.5.2.S1.1]

مقدمه

بر اساس آمارهای سازمان بهداشت جهانی بیش از صدها میلیون نفر در سراسر دنیا مبتلا به بیماری‌های کبدی هستند. در حال حاضر پیوند کبد یکی از مؤثرترین راه‌های درمانی برای بیماران مبتلا به نارسایی‌های مزمن یا حاد کبدی می‌باشد، اما متأسفانه تعداد کم اندام‌های اهدایی، نیاز به سرکوب ایمنی شدید شخص گیرنده و پیچیدگی‌های عمل جراحی، این گزینه را نیز محدود ساخته است. کبدهای مصنوعی یا پیوند سلول‌های کبدی، از ایده‌های مطرح شده برای درمان است. امروزه فناوری سلول‌های بنیادی و قابلیت تمایز آن‌ها به انواع سلول‌های بالغ می‌تواند به‌عنوان یکی از گزینه‌های مورد نظر برای تهیهٔ سلول‌های کبدی در نظر گرفته شود. در سال‌های اخیر، انواع مختلفی از سلول‌های بنیادی جهت تمایز به سلول‌های کبدی مورد استفاده قرارگرفته است (۱).

سلول‌های بنیادی بالغین[1] سلول‌های بنیادی هستند که تقریباً در تمام بافت‌های بدن موجود می‌باشند. سلول‌های بنیادی مزانشیمی (MSCs)[2] بالغین به‌عنوان گروه بزرگی از این نوع سلول‌ها محسوب می‌گردند. این سلول‌ها در بافت‌هایی نظیر مغز استخوان، بافت چربی، ژله وارتون بند ناف، مایع آمنیون و به میزان متفاوت در سایر بافت‌ها یافت می‌شوند (۲). از ویژگی‌های خاص در مورد MSCs، ایمنوژنیک نبودن آن‌ها و یا ایجاد کمترین واکنش ایمنی در میزبان می‌باشد (۳). امروزه توجه زیادی به سلول‌های مزانشیمی استخراج شده از ژله وارتون بند ناف (WJMSCs)[3] می‌شود. از جمله مزایای این سلول‌ها نسبت به منابع دیگر که آن را برای این منظور به‌عنوان بهترین کاندیدا معرفی می‌کند، می‌توان به در دسترس بودن بند ناف اشاره کرد. بند ناف یک محصول دور ریز پس از زایمان است و روش تهیهٔ آن غیر تهاجمی و بدون درد است. بنابراین نگرانی‌های اخلاقی در مورد آن وجود ندارد. WJMSCs ابتدایی‌تر از سلول‌های مزانشیمی مشتق شده از سایر بافت‌ها است. همچنین تراتوم القاء نمی‌کنند. سلول‌های WJMSCs طی پدیدهٔ تغییر تمایز[4] به سلول‌های کبدی متمایز می‌شوند. تغییر تمایز فرایندی است که به موجب آن یک نوع سلول تبدیل به نوعی متفاوت از سلول با منشاء متفاوت می‌گردد (۴). تغییر تمایز به روش‌های متفاوتی انجام می‌شود تاکنون از روش‌های مختلفی جهت انجام این کار استفاده شده است که عبارتند از:

۱.Cloning Nuclear Transfer: انتقال هستهٔ سلول سوماتیک[5] به اووسیتی که هستهٔ آن قبلاً خارج شده است (۵).

۲.Cell Fusion: ادغام سلول سوماتیک با سلول بنیادی چند ظرفیتی سلولی را می‌سازد به نام هیبرید[6] که خاصیت هر دو سلول در آن وجود دارد (۶).

۳.Gene Transfection: استفاده از حامل‌های مختلف جهت انتقال ژن‌های مورد نظر به سلول‌های سوماتیک و القای بیان فاکتورهای نسخه‌برداری (۷).

۴.Co-Culture: هم کشتی سلول‌های مختلف با هم شرایطی را ایجاد می‌کند که سلول‌های سوماتیک می‌توانند مجدداً برنامه‌دار شوند (۸).

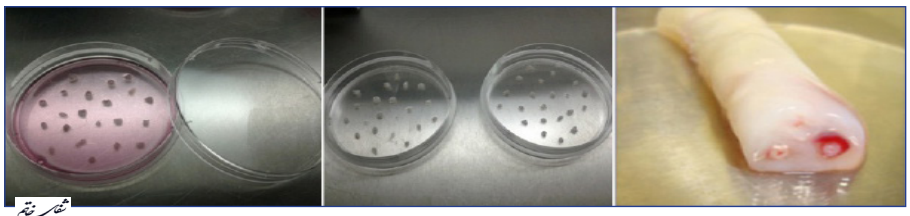
۵. Cell Extract: استفاده از عصاره‌های سلولی (۹).

در این تحقیق سعی ما بر این بود تا با استفاده از عصارهٔ کبد[7] که حاوی پروتئین‌ها و فاکتورهای نسخه‌برداری فراوان است و اضافه نمودن آن به سلول‌های بنیادی مزانشیمی استخراج شده از ژله وارتون بند ناف که با کمک استرپتولیزین[8] به این فاکتورها تراوا شده، این سلول‌ها را به سلول‌های کبدی متمایز کنیم.

مواد و روش‌ها

۱- استخراج WJMSCs

بند ناف نوزاد تازه متولد شده را با PBS شسته و به قطعات ۰/۵ سانتی‌متری بریده شد. قطعات بند ناف با کمک پنس به کف پلیت ۱۰ سانتی‌متری منتقل و پس از آن که قطعات به کف ظرف چسبید، محیط کشت MEM-α[9] حاوی FBS (۱۰ درصد) را اضافه کرده و ظرف کشت به انکوباتور با دمای ۳۷ درجهٔ سانتی‌گراد منتقل گردید (تصویر ۱). محیط کشت هر پنج روز یکبار تعویض شده و بعد از مدت حدود ۱۰ تا ۱۴ روز سلول‌های مزانشیمی توسط آنزیم تریپسین پاساژ گردیدند.



تصویر ۱- مراحل استخراج WJMSCs از ژله وارتون بند ناف.

[1] Adult stem cell
[2] Mesenchymal stem cells
[3] Wharton's jelly mesenchymal stem cells
[4] Transdifferentiation
[5] Somatic cell
[6] Hybrid
[7] Liver extract
[8] Sterptolysin
[9] Minimum essential medium eagle alpha

[Downloaded from shefayekhatam.ir on 2025-07-07]
[DOI: 10.18869/acadpub.shefa.5.2.S1.1]

۲- فلوسایتومتری جهت بررسی نشانگرهای سطح سلول‌های مزانشیمی ژله وارتون

سلول‌ها بین لوله‌های فلوسایتومتری به گونه‌ای تقسیم شدند که در هر لوله به طور متوسط ۵۰۰۰۰۰ سلول WJMSCs قرار داده شدند. آنتی‌بادی‌های نشاندار، بر طبق جدول ۱ به هر یک از لوله‌های فلوسایتومتری اضافه گردیدند. جهت فیکس کردن سلول‌ها، پارافرمالدئید ۱ درصد به مدت ۱۵ دقیقه به آن‌ها اضافه شد و سپس نمونه‌ها به دستگاه فلوسایتومتری انتقال داده شد.

۳- به دست آوردن عصارهٔ کبد

ابتدا ۶ میلی‌لیتر محلول HBSS[10] حاوی FBS ۳ درصد به درون بطن چپ موش نژاد C57BL/6 تزریق شد در حالی که دهلیز راست جهت خروج خون شکاف داده شده بود. سپس ۶ میلی‌لیتر محلول HBSS حاوی FBS ۳ درصد و collagenase IV ۰/۱ درصد و ۵ میلی‌لیتر محلول HBSS حاوی FBS ۳ درصد و EDTA ۰/۱ درصد به ترتیب تزریق شد. بعد از روشن شدن رنگ کبد، کبد جدا شده و به پلیت کوچک حاوی PBS سرد حاوی پنی‌سیلین / استرپتومایسین ۱ درصد، منتقل شد. سپس کبد به قطعات بسیار کوچک تقسیم شد. قطعات کوچک کبد توسط PBS سرد شستشو داده شد. به قطعات کبد ml ۳ Trypsin / EDTA، به مدت بیست دقیقه در دمای ۳۷ درجهٔ سانتی‌گراد اضافه شد. قطعات بافتی توسط PBS سرد شستشو و به داخل یک کرایوتیوب منتقل شدند. کرایوتیوب‌ها داخل نیتروژن مایع انداخته شد تا منجمد شوند، سپس محتویات تیوب با دور g ۸۰۰، به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۴ درجهٔ سانتی‌گراد سانتریفیوژ شد. به رسوب حاصل Lysis buffer حاوی DTT[11] اضافه و با دور g ۸۰۰، به مدت ۱۰ دقیقه، در دمای ۴ درجهٔ سانتی‌گراد سانتریفیوژ گردید. به اندازهٔ حجم پلیت تشکیل شده، Lysis buffer حاوی Protease Inhibitor ۰/۱ درصد، اضافه شد. سوسپانسیون حاصل به مدت ۴۵ دقیقه روی یخ در یخچال قرار داده شد. نمونه‌ها ۷ بار با ۲۵٪، پالس ۰/۵ ثانیه، ۴۵ ثانیه سونیکیت شده و سوسپانسیون با دور g۱۵۰۰۰ به مدت ۱۵ دقیقه در ۴ درجهٔ سانتی‌گراد سانتریفیوژ شد. محلول رویی برداشته شده Snap Freeze شد و سپس برای استفادهٔ بعدی در دمای ۸۰ - درجهٔ سانتی‌گراد نگهداری شد.

۴- اندازه‌گیری میزان پروتئین موجود در عصاره

پس از ذوب شدن عصاره بر روی یخ، از روش برادفورد[12] استفاده شد. سپس به وسیلهٔ دستگاه اسپکترومتر با طول موج ۵۹۵ نانومتر میزان OD[13] اندازه‌گیری گردید.

[17] Fluorescein isothiocyanate
[18] Adenosine triphosphate (ATP) regenerating system
[19] Phosphocreatine
[20] Guanosine triphosphate
[21] Creatine phosphokinase
[22] Deoxynucleotide

۵- آزمون نفوذپذیری

آزمون نفوذپذیری[14] جهت اطمینان از نفوذپذیر شدن غشاء سلول WJMSC، قبل از شروع، برنامه‌ریزی مجدد[15] انجام می‌گردد. این آزمون در حضور دکستران[16] متصل به FITC[17] با وزن مولکولی ۷۰۰۰۰ کیلو دالتون انجام شد. جهت این آزمون ابتدا سلول‌ها، دکستران متصل به FITC و استرپتولیزین O را دریافت نمودند. در اینجا ذکر این نکته ضروری به نظر می‌رسد که جهت آزمون نفوذپذیری، غلظت استرپتولیزین O ۹۲۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر در نظر گرفته شد. میکروتیوب‌های حاوی سلول، به مدت ۵۰ دقیقه به‌صورت افقی در بن ماری با دمای ۳۷ درجهٔ سانتی‌گراد قرار داده شدند. بعد از گذشت ۵۰ دقیقه، سلول‌ها به پلیت ۲۴ خانه‌ای حاوی لامل گرد منتقل و محیط کشت با دمای ۳۷ درجهٔ سانتی‌گراد حاوی CaCl2 (۲ میلی‌مولار) به هر خانه اضافه شد سپس سلول‌ها به مدت ۴-۲ ساعت درون انکوباتور با دمای ۳۷ درجهٔ سانتی‌گراد قرار داده شدند. بعد از گذشت این زمان محیط کشت از روی سلول‌ها برداشته و نتایج با میکروسکوپ فلورسانس ارزیابی شد.

۶- نفوذپذیر نمودن سلول‌های WJMSCs و تمایز این سلول‌ها توسط عصارهٔ کبدی

نفوذپذیر نمودن سلول‌های WJMSCs توسط استرپتولیزین O انجام شد. عصارهٔ کبد همراه با سیستم بازسازی ATP[18] شامل فسفوکراتین[19]، تری فسفات گوانوزین (GTP)[20]، ATP، کراتین فسفوکیناز[21] و dNTP[22] به سلول‌های WJMSCs اضافه شد. سلول‌ها به مدت

جدول ۱- نحوهٔ اضافه نمودن نشانگرها به سلول‌های مزانشیمی ژله وارتون، جهت انجام فلوسایتومتری و بررسی نشانگرهای سطح سلول.

ردیف	لیبل	نشانگر
۱	Percp (Peridinin chlorophyll protein complex) / PE (Phycoerythrin) / FITC	CD 34، CD 44، CD 105
۲	PE / FITC	CD 144، CD 106
۳	FITC	CD 44
۴	PE	CD 106
۵	Percp	CD 105
۶	FITC	CD 90
۷	FITC / PE	CD 106، CD 44
۸	Percp / FITC	CD 44، CD 105
۹	Percp/ PE	CD 34، CD 105

[10] Hanks' balanced salt solution
[11] Dithiothreitol
[12] Bradford
[13] Optical density
[14] Permeabilization assay
[15] Reprogramming
[16] Dextran

[Downloaded from shefayekhatam.ir on 2025-07-07]
[DOI: 10.18869/acadpub.shefa.5.2.S1.1]

۲۱ روز درون انکوباتور با دمای ۳۷ درجهٔ سانتی‌گراد قرار داده شد و در این فاصلهٔ زمانی محیط کشت به طور مرتب تعویض می‌گردید.

۷- بررسی عملکرد سلول‌های تمایز یافته

جهت بررسی عملکردی شدن سلول‌های تمایز یافته رنگ‌آمیزی PAS[23] انجام شد تا سنتز گلیکوژن در سلول‌ها بررسی شود.

۸- بررسی بیان نشانگرهای کبدی سیتوکراتین ۱۸ و ۱۹ توسط روش پلیمر دکستران

ابتدا سلول‌ها توسط پارافرمالدئید ۴ درصد فیکس شدند سپس در تاریکی محلول H_2O_2[24] ۰/۳درصد به مدت ۲۰ دقیقه بر روی سلول‌ها قرار داده شد. آنتی‌بادی‌های غیر اختصاصی توسط سرم بز ۱۰ درصد به مدت ۲۰ دقیقه بلاک گردید. آنتی‌بادی اولیه سیتوکراتین ۱۸ و سیتوکراتین ۱۹ به مدت ۴۵ دقیقه روی سلول ها اضافه گردید سپس آنزیم super enhancer envision به مدت ۱۵ دقیقه بر روی سلول‌ها قرار داده شد بعد از آن آنتی‌بادی ثانویهٔ SS label envision: polymer HRP به مدت ۳۰ دقیقه روی سلول‌ها ریخته شد. در پایان محلول DAB[25] را به سلول‌ها اضافه کرده تا کروموژن با کمک آنزیم نشاندار کننده، رسوب رنگی را در محل آنزیم -که به آنتی‌بادی متصل است- ایجاد نماید.

یافته‌ها

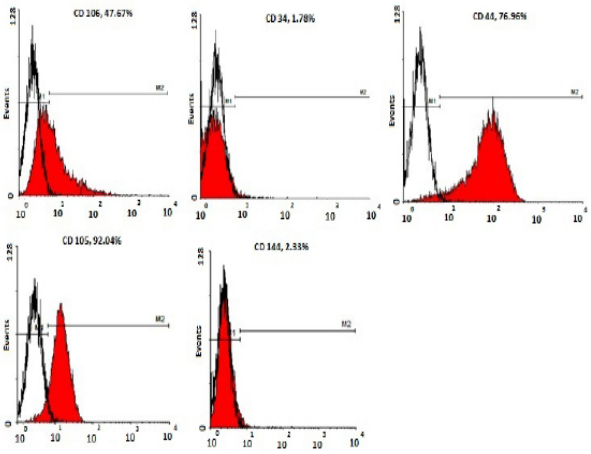
بررسی ریخت‌شناسی سلول‌های WJMSCs

پس از گذشت حدود ۱۰ روز از کشت سلول‌ها در محیط کشت، سلول‌های شبه فیبروبلاست با ظاهری دوکی شکل، کشیده و یا استطاله دار از اطراف قطعات بند ناف جوانه زدند (تصویر ۲).

تصویر ۲- جوانه زدن سلول‌های مزانشیمی از یک قطعه بند ناف.

بررسی بیان نشانگرهای سطحی سلول‌های WJMSCs

به‌منظور بررسی نشانگرهای سطح سلولی، فلوسایتومتری انجام گرفت. سلول‌های مزانشیمی ژله وارتون نشانگرهای سلول‌های خونساز (CD34) و سلول‌های اندوتلیال (CD144) را بسیار کم و به ترتیب ۱/۷۸ درصد و ۲/۳۳ درصد بیان کردند، با این حال، با نشانگرهای CD105، CD106 و CD44 واکنش دادند و به ترتیب این نشانگرها را به میزان ۹۲/۴ درصد، ۴۷/۶۷ درصد و ۹۶/۷۶ درصد بیان کردند (نمودار ۱).



نمودار ۱- بیان نشانگرهای سطحی سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از ژله وارتون. سلول‌ها نشانگرهای CD44 ، CD105 و CD106 را بیان کردند، اما نشانگرهای CD34, CD144 به میزان بسیار کمی بیان شدند.

نتایج بررسی غلظت پروتئین موجود در عصارهٔ کبدی با استفاده از آزمون برادفورد

این آزمون جهت تعیین غلظت پروتئین موجود در عصارهٔ کبد انجام شد. بعد از انجام کار، میزان پروتئین موجود در عصاره ۷۵۳۰ میکروگرم در میلی‌لیتر برآورد شد.

نتایج آزمون سمی بودن عصارهٔ کبد

با اضافه نمودن عصاره به سلول‌های WJMSCs، آن‌ها در معرض مقادیر زیادی فاکتورهای نسخه‌برداری، آنزیم و پروتئین‌های ساختمانی موجود در عصاره قرار می‌گیرند. این مواد ممکن است اثرات کشنده بر سلول‌ها داشته باشند. هرچند این آنزیم‌ها توسط مهارکنندهٔ پروتئازها مهار می‌شوند اما ممکن است به طور بالقوه به سلول‌ها آسیب برسانند؛ بنابراین بایستی قبل از شروع آزمایش، میزان سمّیت عصاره ارزیابی شود. بررسی با تریپان‌بلو نشان داد که درصد سلول‌های زنده‌ای که در مجاورت عصاره قرار گرفته بودند ۷۶/۲ درصد و در گروه کنترل ۹۳ درصد بود.

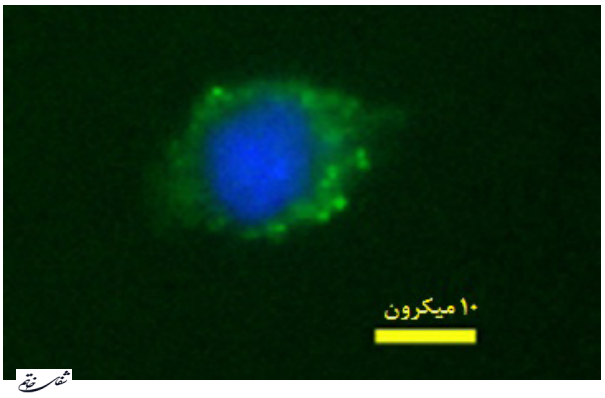
آزمون نفوذپذیری برای اطمینان از عملکرد استرپتولیزین O

این آزمون برای اطمینان از عملکرد استرپتولیزین O، با

[23] Periodic acid–schiff
[24] Hydrogen peroxide
[25] 3,3'-diaminobenzidine

[Downloaded from shefayekhatam.ir on 2025-07-07]
[DOI: 10.18869/acadpub.shefa.5.2.S1.1]

کمک دکستران متصل به FITC انجام شد. دکستران متصل به FITC اندازه‌ای شبیه به متوسط اندازهٔ پروتئین‌های موجود در عصاره دارد. که در صورت ورود دکستران متصل به FITC به درون سلول پس از نفوذپذیر کردن غشای آن توسط استرپتولیزین O می‌توان مطمئن شد که پروتئین‌های موجود در عصاره نیز پس از نفوذپذیر شدن وارد سلول می‌شوند. نتایج حاصل از این آزمون نشان داد غلظت ۹۲۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر استرپتولیزین O برای نفوذپذیرکردن غشاء سلول مناسب است. در بررسی با میکروسکوپ فلورسانس، دکستران متصل به FITC درون سلول‌های نفوذپذیر شده با استرپتولیزین O مشاهده شد (تصویر ۳).



تصویر ۳- سلول مزانشیمی ژله وارتون بعد از دریافت دکستران متصل به FITC و استرپتولیزین O. دانه‌های سبز نمایانگر دکستران متصل به FITC است که پس از نفوذپذیری وارد سلول شده است و رنگ آبی مربوط به DAPI است که هسته‌ها را رنگ می‌کند.

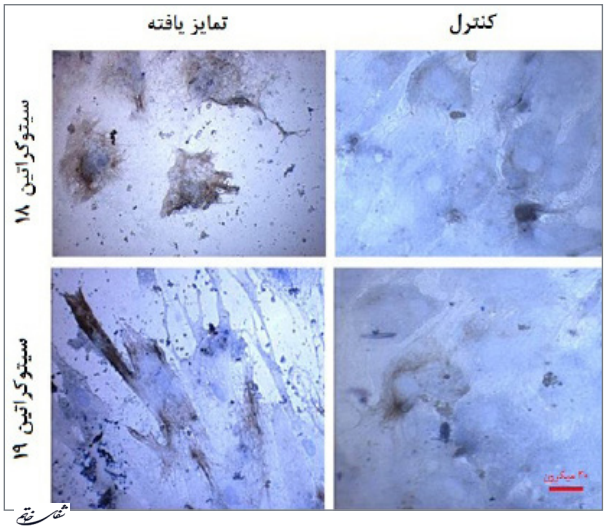
بررسی مطالعهٔ ریخت‌شناسی سلول‌های WJMSCs بعد از دریافت عصاره

در حالت طبیعی سلول‌های WJMSCs کشیده و استطاله دار می‌باشند. این در حالی است که وقتی سلول‌های مزانشیمی در ظرف مخصوص کشت داده شده و در معرض عصاره قرار داده شدند، تغییر ریخت‌شناسی داده و به صورت سلول‌های چند وجهی تغییر فرم دادند.

بررسی بیان نشانگرهای کبدی در سلول‌های WJMSCs به وسیلهٔ ایمونوسیتوشیمی بعد از دریافت عصاره

به‌منظور ارزیابی تأثیر عصاره بر روی سرنوشت سلول‌ها، بیان ۳ پروتئین درون سلول‌هایی که روی آن‌ها روند تغییر، تمایز و برنامه‌ریزی مجدد انجام شده بود، مورد ارزیابی قرار گرفت. این پروتئین‌ها شامل: سیتوکراتین ۱۸ و ۱۹ بودند. در گروه کنترل به ترتیب ۲ ± ۲۱/۱۳٪ و ۱ ± ۹/۴۳٪ سلول‌ها سیتوکراتین ۱۸ و ۱۹ را بیان کرده بودند. ۲/۷ ± ۸۳/۶٪ سلول‌های تمایز یافته سیتوکراتین ۱۸ را بیان کرده بودند. ۴ ± ۵۷/۳٪ سلول‌های تمایز یافته سیتوکراتین ۱۹ را بیان کرده بودند (تصویر ۴).

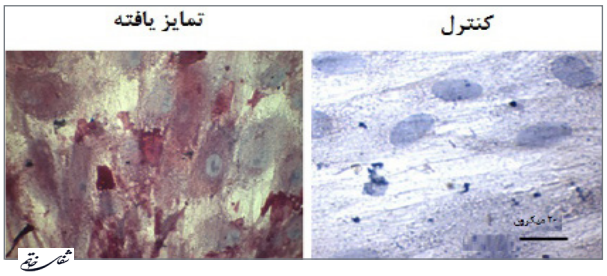
بررسی میزان سنتز گلیکوژن توسط رنگ‌آمیزی



تصویر ۴- بیان نشانگرهای کبدی در سلول‌های WJMSCs به وسیلهٔ ایمونوسیتوشیمی بعد از دریافت عصاره. درصد بالاتری از سلول‌های تمایز یافته نسبت به گروه کنترل سیتوکراتین ۱۸ و ۱۹ را بیان کردند.

PAS در سلول‌های WJMSCs بعد از دریافت عصاره

رنگ‌آمیزی PAS که برای نشان دادن گلیکوژن ذخیره شده در سلول استفاده شد، نشان داد که گروه سلول‌های دریافت کنندهٔ عصاره بسیار شدید با PAS واکنش دادند که نشان دهندهٔ ذخیرهٔ گلیکوژن بیشتر توسط این سلول‌ها پس از تمایز است (تصویر ۵).



تصویر ۵- بررسی سنتز گلیکوژن توسط رنگ‌آمیزی PAS در سلول‌های WJMSCs بعد از دریافت عصاره. سلول‌های تمایز یافته با عصاره با شدت بیشتری نسبت به گروه کنترل با PAS واکنش دادند.

بحث و نتیجه‌گیری

در سال‌های اخیر پژوهش‌های زیادی در مورد سلول‌های بنیادی و کاربرد آن در درمان بیماری‌های مختلف انجام شده است. اگر چه از نظر بعضی محققین مغز استخوان به‌عنوان مهم‌ترین منبع سلول‌های بنیادی مزانشیمی در نظر گرفته شده است، اما از بسیاری از بافت‌های دیگر نیز سلول بنیادی مزانشیمی استخراج گردیده است که یکی از آن‌ها ژله وارتون بند ناف می‌باشد. از سلول‌های مزانشیمی ژله وارتون به‌عنوان ابزاری نویدبخش برای درمان بسیاری از بیماری‌ها انتظار می‌رود. WJMSCs دارای پتانسیل تمایز گسترده به انواع سلول‌ها مانند سلول‌های تولید کنندهٔ انسولین (۱۰)، سلول‌های عصبی (۱۱) و سلول‌های قلبی و همچنین سلول‌های شبه کبدی می‌باشند (۱۲).

[Downloaded from shefayekhatam.ir on 2025-07-07]
[DOI: 10.18869/acadpub.shefa.5.2.S1.1]

روش آسان استخراج سلول‌های مزانشیمی بند ناف، توانایی تکثیر بالای این سلول‌ها (۱۳)، خاصیت تعدیل سیستم ایمنی و داشتن اثر مهاری بر روی سلول‌های T تحریک شده در محیط In vitro می‌تواند یک مزیت برای پیوندهای آلوژن به حساب آید (۱۴). علاوه بر این مطالعات بالینی نشان داده‌اند که WJMSC ها می‌توانند عملکرد کبد را بهبود بخشیده و فیبروز کبدی را در مدل حیوانی با آسیب کبدی کاهش دهند (۱۵). مزیت‌های ذکر شده برای این سلول‌ها و همچنین بیان نشانگرهای اولیهٔ کبدی توسط این سلول‌ها (۱۶)، آن‌ها را کاندیدای مناسبی برای استفاده در سلول درمانی بیماری‌های کبد می‌گرداند. قابلیت تمایز سلول‌های مزانشیمی ژله وارتون به سلول‌های شبه کبدی قبلاً توسط سایر دانشمندان نشان داده شده است (۱۸، ۱۷، ۱۲).

روش‌ها و پروتکل‌های متفاوتی برای تمایز این سلول‌های بنیادی به سلول‌های شبه کبدی عملکردی وجود دارد (۱۹، ۱۸). برای مثال سلول‌های مزانشیمی ژله وارتون که در معرض محیط کشت حاوی فاکتورهای رشد مناسب قرار داده شدند به سلول‌های شبه کبدی تمایز یافتند (۱۸). نشان داده شده است که اضافه کردن عصارهٔ سلولی (فاقد سلول) به محیط کشت سبب القاء تمایز در سلول‌های بنیادی می‌شود در فرایند تغییر تمایز[۲۶]، سلول‌ها مجدداً برنامه دار می‌شوند. برنامه دار شدن مجدد به پاک کردن نشانگرهای اپی ژنتیک سلول‌ها و ایجاد نشانگرهای جدید اطلاق می‌شود (۲۰). در واقع با استفاده از این روش می‌توان سرنوشت سلول را تغییر داده و سلول‌های خودی[۲۷]، برای درمان انواع مختلفی از بیماری‌ها تولید نمود (۲۱).

طبق اطلاعاتی که از مطالعات گذشته به دست آمده است، روش‌های مختلفی برای تغییر برنامهٔ سلول‌ها وجود دارد که شامل روش انتقال هسته، ادغام سلولی، هم کشتی استفاده از عصاره‌های سلولی و ... می‌باشد. جهت تمایز از عصارهٔ سلولی در تحقیقات متعددی استفاده شده است. شین[۲۸] و همکاران نشان دادند که عصارهٔ جفت می‌تواند به‌عنوان یک ترکیب جدید جهت تمایز سلول‌های بنیادی به سمت سلول‌های شبه کبدی استفاده شود. عصارهٔ جفت دارای تعدادی از سایتوکین و کموکین‌های ضروری برای تمایز سلول‌های بنیادی به سمت سلول‌های شبه کبدی می‌باشد (۲۲). عصارهٔ سلول (فاقد سلول) شامل فاکتورهای رونویسی لازم برای بیان نشانگرهای خاص بافت بالغ است. برخی از محققان سلول‌های نفوذپذیر شده را در معرض عصاره عاری از سلول قرار داده که این کار سبب تمایز سلول‌های بنیادی به سمت سلول‌های تمایز یافته شده است. گوستاد[۲۹] و همکاران توانستند با استفاده از عصارهٔ سلول‌های قلبی، سلول‌های مزانشیمی بافت چربی را به سلول‌های کاردیومیوسیت متمایز کنند (۲۳).

نتایج حاصل از آزمایشات ما نشان داد که سلول‌های مزانشیمی ژله وارتون هنگامی که نفوذپذیر شده و در معرض عصارهٔ کبد قرار بگیرند توانایی تمایز به سلول‌های عملکردی کبدی را دارا می‌باشند. تشخیص پروتئین‌های کبدی در سیتوپلاسم سلول‌های مزانشیمی ژله وارتون بند ناف نمی‌تواند به دلیل باقی ماندن پروتئین‌های موجود در عصاره، در سیتوپلاسم این سلول‌ها باشد، زیرا فاصلهٔ زمانی قرارگیری سلول‌ها در معرض عصاره با بررسی نشانگرهای مورد نظر تقریباً طولانی بوده است (۲۱ روز). همچنین این سلول‌های تمایز یافته قادر به ذخیرهٔ گلیکوژن بودند که نشان دهندهٔ عملکردی بودن این سلول‌های تمایز یافته است (۲۴).

این مطالعه نشان داد که سلول‌های مزانشیمی ژله وارتون بند ناف با استفاده از عصاره، قابل تمایز به سلول‌های کبدی هستند و با توجه به امکان استفاده از کبد افراد دهنده که قابلیت پیوند زدن به افراد متقاضی کبد پیوندی را ندارند می‌توان از این روش به‌عنوان روشی مناسب و قابل دسترس جهت سلول درمانی و نیز تولید سلول‌های هپاتوسیت جهت مطالعات آزمایشگاهی و تحقیقات بر روی تکامل کبد یا Trans differentiation استفاده کرد.

منابع

1. Guettier C. Which stem cells for adult liver? Ann Pathol. 2005; 25(1): 33-44.

2. Klingemann H, Matzilevich D, Marchand J. Mesenchymal stem cells-sources and clinical applications. Transfus Med Hemother. 2008; 35(4): 272-7.

3. Salem HK, Thiemermann C. Mesenchymal stromal cells: current understanding and clinical status. Stem Cells. 2010; 28(3): 585-96.

4. Wells WA. Is transdifferentiation in trouble? J Cell Biol. 2002; 157(1): 15–8.

5. Wilmut I, Beaujean N, De Sousa P, Dinnyes A, King T, Paterson L, et al. Somatic cell nuclear transfer. Nature. 2002; 419(6907): 583-7.

6. Matsumura H, Tada T. Cell fusion-mediated nuclear reprogramming of somatic cells. Reprod Biomed Online. 2008; 16(1): 51-6.

7. Park IH, Zhao R, West JA, Yabuuchi A, Huo H, Ince TA, et al. Reprogramming of human somatic cells

[26] Trans differentiation
[27] Autologous
[28] Shin
[29] Gaustad

[Downloaded from shefayekhatam.ir on 2025-07-07]
[DOI: 10.18869/acadpub.shefa.5.2.S1.1]

to pluripotency with defined factors. Nature. 2007; 451(7175): 141-6.

8. Burguera EF, Bitar M, Bruinink A. Novel in vitro co-culture methodology to investigate heterotypic cell-cell interactions. Eur Cell Mater. 2010; 19: 166-79.

9. Collas P, Taranger CK. Epigenetic reprogramming of nuclei using cell extracts. Stem Cell Rev. 2006; 2(4): 309-17.

10. Chao KC, Chao KF, Fu YS, Liu SH. Islet-like clusters derived from mesenchymal stem cells in Wharton's Jelly of the human umbilical cord for transplantation to control type 1 diabetes. PLoS One. 2008; 3(1): e1451. doi: 10.1371/journal.pone.0001451.

11. Mitchell KE, Weiss ML, Mitchell BM, Martin P, Davis D, Morales L, et al. Matrix cells from Wharton's jelly form neurons and glia. Stem Cells. 2003; 21(1): 50-60.

12. Borhani-Haghighi M, Talaei-Khozani T, Ayatollahi M, Vojdani Z. Wharton's jelly-derived mesenchymal stem cells can differentiate into hepatocyte-like cells by HepG2 cell line extract. Iranian Journal of Medical Sciences. 2015; 40(2): 143-51.

13. Anzalone R, Iacono ML, Corrao S, Magno F, Loria T, Cappello F, et al. New emerging potentials for human Wharton's jelly mesenchymal stem cells: immunological features and hepatocyte-like differentiative capacity. Stem Cells Dev. 2010; 19(4): 423-38.

14. Weiss ML, Anderson C, Medicetty S, Seshareddy KB, Weiss RJ, Vander Werff I, et al. Immune properties of human umbilical cord wharton's jelly-derived cells. Stem Cells. 2008; 26(11): 2865-74.

15. Yan Y, Xu W, Qian H, Si Y, Zhu W, Cao H, et al. Mesenchymal stem cells from human umbilical cords ameliorate mouse hepatic injury in vivo. Liver Int. 2009; 29(3): 356-65.

16. Zhang S, Chen L, Liu T, Zhang B, Xiang D ,Wang Z, et al. Human umbilical cord matrix stem cells efficiently rescue acute liver failure through paracrine effects rather than hepatic differentiation. Tissue Eng Part A. 2012; 18(13-14): 1352-64.

17. Zhao Q, Ren H, Li X, Chen Z, Zhang X, Gong W, et al. Differentiation of human umbilical cord mesenchymal stromal cells into low immunogenic hepatocyte-like cells. Cytotherapy. 2009; 11(4): 414-26.

18. Talaei-Khozani T, Borhani-Haghighi M, Ayatollahi M, Vojdani Z. An in vitro model for hepatocyte-like cell differentiation from Wharton's jelly derived-mesenchymal stem cells by cell-base aggregates. Gastroenterology and Hepatology from Bed to Bench. 2015; 8(3): 188.

19. Ayatollahi M, Soleimani M, Tabei SZ, Salmani MK. Hepatogenic differentiation of mesenchymal stem cells induced by insulin like growth factor-I. World J Stem Cells. 2011; 3(12): 113-21.

20. Hochedlinger K, Jaenisch R. Nuclear reprogramming and pluripotency. Nature. 2006; 441 (7097): 1061-7.

21. Gurdon JB, Melton DA. Nuclear reprogramming in cells. Science. 2008; 322(5909): 1811-5.

22. Shin K, Lee H, Jung J, Cha D, Kim G. Culture and in vitro hepatogenic differentiation of placenta-derived stem cells, using placental extract as an alternative to serum. Cell Prolif. 2010; 43(5): 435-44.

23. Gaustad KG, Boquest AC, Anderson BE, Gerdes AM, Collas P. Differentiation of human adipose tissue stem cells using extracts of rat cardiomyocytes. Biochem Biophys Res Commun. 2004; 314(2): 420-7.

24. Yamada T, Yoshikawa M, Kanda S, Kato Y, Nakajima Y, Ishizaka S, et al. In vitro differentiation of embryonic stem cells into hepatocyte-like cells identified by cellular uptake of indocyanine green. Stem Cells. 2002; 20(2): 146-54.

[Downloaded from shefayekhatam.ir on 2025-07-07]

[DOI: 10.18869/acadpub.shefa.5.2.S1.1]