

Differentiation of Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells into Neuron-Like Cells Affected by Extract of Ginger Officinale

Mohammad Jabbarian^{1,2}, Marzieh Darvishi^{2,3}, Parastoo Barati Dowom², Azam Babakhani¹, Ali Jahanbazi Jahn-Abad², Kambiz Roshanaei^{1*}

¹Department of Physiology, Faculty of Sciences, Qom Branch, Islamic Azad University, Qom, Iran

²Shefa Neuroscience Research Center, Khatam Alanbia Hospital, Tehran, Iran

³Department of Anatomy, Faculty of Medicine, Ilam University of Medical Sciences, Ilam, Iran

Article Info:

Received: 3 Apr 2016

Revised: 1 Oct 2016

Accepted: 28 Jan 2017

ABSTRACT

Introduction: Ginger (*Zingiber officinale*) is an herbal medicine that has been used for treatment of many disorders. Ginger have been identified for antioxidant activity and neuroprotective effects. Ginger can alleviate cell death and regenerate the motor function in rats with spinal cord injury. In the present study, we investigated the effect of ginger on neural induction of bone marrow-derived mesenchymal stem cells and their differentiation into neural cells. **Materials and Methods:** Bone marrow stromal cells (BMSCs) were isolated from the femurs and tibias of rat and these cells were induced with the appropriate dose of ginger extract. These cells were assessed by crysel violet staining and immunocytochemistry. **Results:** The results showed that cells isolated from bone marrow were immunoreactive to CD106 (95.67 ± 2.26), CD90 (71.52 ± 6.64) but not to hematopoietic cell markers (CD45). Induced BMSCs by 10, 20, 30, 40, 50, 60 and 70 microg/ml of ginger after 12 and 24 hours were positive for nissl body. The highest percentage of live cells was observed with 30 microg/ml of ginger and maximum neural-like cells was induced with 60 microg/ml ginger after 12 hours. **Conclusion:** Ginger can be considered as a potential alternative non-toxic substance for induction of neuronal cells and can be used for induction of BMSCs to neuron-like cells.

Key words:

1. Bone Marrow
2. Rats
3. Death

*Corresponding Author: Kambiz Roshanaei

E-mail: kambizroshanaei@gmail.com

تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از مغز استخوان به سلول‌های شبه عصبی تحت تأثیر عصاره زنجبیل

محمد جباریان^{۱،۲}، مرضیه درویشی^{۲،۳}، پرستو براتی دوم^۲، اعظم باباخانی^۱، علی جهانبازی جهان آباد^۲، کامبیز روشنایی^{۱*}

^۱گروه فیزیولوژی، دانشکده علوم، واحد قم، دانشگاه آزاد اسلامی، قم، ایران

^۲مرکز تحقیقات علوم اعصاب شفا، بیمارستان خاتم‌الانبیاء، تهران، ایران

^۳گروه آناتومی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ایلام، ایلام، ایران

اطلاعات مقاله:

تاریخ پذیرش: ۹ بهمن ۱۳۹۵

اصلاحیه: ۱۰ مهر ۱۳۹۵

تاریخ دریافت: ۱۵ فروردین ۱۳۹۵

چکیده

مقدمه: زنجبیل (*Zingiber officinale*) یک داروی گیاهی است که برای درمان بسیاری از اختلالات استفاده می‌گردد. زنجبیل برای فعالیت آنٹی اکسیدانی و اثرات حفاظت عصبی شناسایی شده است. زنجبیل می‌تواند مرگ سلول را کاهش دهد و فعالیت حرکتی در موش‌های صحرایی با ضایعه نخاعی را بهبود بخشد. در مطالعه حاضر، ما به بررسی اثر زنجبیل بر القای عصبی سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از مغز استخوان و تمایز آن‌ها به سلول‌های عصبی پرداختیم. **مواد و روش‌ها:** سلول‌های استرومایی مغز استخوان از ران و درشتنی موش صحرایی جداسازی شد و این سلول‌ها با دوز مناسبی از عصاره زنجبیل القاء شدند. این سلول‌ها از طریق رنگ‌آمیزی کریستال ویوله و ایمونوسیتوشیمی ارزیابی شدند. **یافته‌ها:** این نتایج نشان داد که سلول‌های جدا شده از مغز استخوان به CD106 (95.67 ± 2.26) و CD90 (71.52) ± 6.64 واکنش ایمنی نشان دادند اما به مارکرهای سلول خونی (CD45) خیر. سلول‌های استرومایی مغز استخوان القاء شده با ۱۰، ۲۰، ۳۰، ۴۰، ۵۰، ۶۰ و ۷۰ میکروگرم/میلی‌لیتر از زنجبیل بعد از ۱۲ و ۲۴ ساعت برای جسم نیسل مثبت بودند. بالاترین درصد سلول‌های زنده با ۳۰ میکروگرم/میلی‌لیتر زنجبیل مشاهده شد و بیشترین سلول‌های شبه عصبی با ۶۰ میکروگرم/میلی‌لیتر زنجبیل بعد از ۱۲ ساعت القاء شدند. **نتیجه‌گیری:** زنجبیل می‌تواند به‌عنوان یک ماده غیر سمی، جایگزین بالقوه‌ای برای القای سلول‌های عصبی در نظر گرفته شود و می‌تواند برای القای سلول‌های استرومایی مغز استخوان به سلول‌های شبه عصبی استفاده شود.

کلید واژه‌ها:

۱. مغز استخوان
۲. موش‌های صحرایی
۳. مرگ

* نویسنده مسئول: کامبیز روشنایی

آدرس الکترونیکی: kambizroshanaei@gmail.com

مقدمه

زمینه انجام شده است ولی اکثر القاء کننده‌های عصبی مورد استفاده از ترکیبات شیمیایی توکسیک می‌باشند که منجر به مرگ سلول‌های تمایز یافته و در نتیجه تعداد کمی سلول در هر بار تمایز می‌شوند.

یکی از ترکیباتی که برای محافظت از سلول‌های عصبی شناسایی شده است *Zingiber officinale* می‌باشد (۱۰). زنجبیل از گیاهی با نام علمی *Zingiber officinale* به دست می‌آید. اولین بار در سال ۱۹۴۵ Cotton ساختار شیمیایی *Zingiber* را بیان نمود و عنوان کرد که عضوی از فنولیک آلکالین به نام وینیل استونی است. بررسی فارماکولوژیک این گیاه نشان داد که آنتی اکسیدان، ضد التهاب، ضد سرطان و فعالیت‌های ضد میکروبی دارد.

مطالعات آزمایشگاهی در مورد بررسی اثر محافظتی این ماده زیستی بر سیستم عصبی مرکزی انجام شده است. برای مثال بررسی‌ها نشان داده که آسیب به سیستم عصبی مرکزی باعث افزایش تولید ۳ و ۴ متیلن دکسی مت آمفتامین (MDMA)^۱ می‌شود. ترکیب MDMA موجب القاء مرگ سلولی و آپاپتوز در سلول‌های عصبی به دنبال افزایش بیان ژن BAX و کاهش بیان Bcl-2 می‌گردد. علاوه بر آن این ترکیب منجر به افزایش رادیکال‌های آزاد، پراکسیداسیون لیپیدها و افزایش سلول‌های تانل مثبت می‌گردد. عامل MDMA از طریق آزادسازی کاسپاز و سیتوکروم C مرگ سلولی را ایجاد می‌کند. بررسی‌ها نشان داده که *Zingiber* اثر آنتی اکسیدانی و حفاظت عصبی^۲ دارد. از طرفی *Zingiber* مرگ سلولی را کاهش می‌دهد و باعث بازسازی عملکرد حرکتی در آسیب‌های سیستم حرکتی می‌گردد (۱۱، ۱۰).

علاوه بر آن بررسی‌ها نشان می‌دهد که آسیب عصبی از طریق افزایش مونو سدیم گلوتامات و اثر توکسیک آن موجب کاهش مونوآمین‌های مغز می‌گردد. در مطالعه‌ای نشان داده شد که *Zingiber* با اعمال اثر بر روی مونو سدیم گلوتامات افزایش مونوآمین‌هایی چون افرین، دوپامین، نوراپی نفرین و سرتونین را ایجاد می‌کند و نقش حفاظت عصبی بر نورون‌ها خواهد داشت. همچنین مطالعات بعدی نشان داد که *Zingiber* باعث افزایش حافظه و حمایت از سیستم عصبی می‌گردد (۱۲).

از این رو یکی از اهداف این پژوهش و جنبه‌های نوآوری آن، بررسی اثر بقاء و تمایز سلول‌های استرومایی مغز استخوان به سلول‌های شبه عصبی در محیط کشت با استفاده از *Ginger Officinale* به عنوان عصاره گیاهی زنجبیل می‌باشد (۱۷-۱۳).

مواد و روش‌ها

۱. جداسازی و کشت سلول‌های بنیادی مشتق از

ضایعات سیستم عصبی مرکزی، آسیب‌های جبران ناپذیری هستند که هنوز درمان مؤثری برای آن مطرح نشده است. تاکنون روش‌های مختلفی جهت بهبود آسیب‌های سیستم عصبی مرکزی توسط محققان ارائه شده است که از این میان می‌توان به: ۱- درمان دارویی ۲- درمان جراحی ۳- استفاده از روش‌های فیزیوتراپی اشاره کرد. در سال‌های اخیر با مطرح شدن دانش سلول‌های بنیادی و مهندسی بافت، دریچه‌ای نو به سوی تحقیقات پزشکی در زمینه درمان آسیب‌های سیستم عصبی باز گردید. در این زمینه مطالعات گسترده‌ای انجام گرفت به طوری که گروهی از محققین نیز از سلول‌های بنیادی به منظور پیوند در آسیب‌های بافت‌های نخاعی و عصبی جنین همراه یا بدون فاکتورهای رشد استفاده کردند (۵-۱).

استفاده از سلول‌های بنیادی جنینی در ترمیم ضایعات عصبی در مطالعات زیادی بررسی شده است و این تحقیقات نشان دادند که در پیوند این سلول‌ها به نخاع و یا مغز آسیب دیده آن‌ها به نورون‌ها، آستروسیت‌ها و الیگودندروسیت‌ها تمایز یافته و بهبودی نسبتاً محدودی نیز در حرکات حیوانات ایجاد می‌کنند. با این وجود تهیه سلول‌ها و بافت‌های جنینی با موانع اخلاقی و قانونی متعددی روبرو است و از طرف دیگر بررسی‌ها نشان داده که تنها بخش محدودی از این سلول‌ها پس از پیوند زنده می‌مانند و این به علت واکنش‌های ایمنی است (۸-۶). گروهی از دانشمندان سلول‌های استرومایی مغز استخوان را معرفی نمودند. امروزه در استفاده از این سلول‌ها جهت درمان ضایعات سیستم عصبی و آسیب‌های نخاعی و تمایز آن‌ها به سلول‌های عصبی در حیوانات، مطالعات مختلفی انجام گرفته است (۷، ۵).

قابلیت تمایز سلول‌های بنیادی استرومایی به سلول‌های شبه نورونی یکی از عوامل جذابیت این سلول‌ها در امر درمان است و این موضوع زمینه مساعد و گسترده‌ای را در امر تحقیقات بر روی این سلول‌ها فراهم کرده است. اکثر سلول‌های استرومایی مشتق شده از مغز استخوان که به ناحیه ضایعه دیده پیوند شده‌اند، به سلول‌های عصبی تحرک ناپذیر تمایز می‌یابند و تعداد اندکی از آن‌ها به سلول‌های عصبی تبدیل می‌شوند و این امر موجب کاهش بهبود روند حسی حرکتی می‌گردد. این امر نشان می‌دهد که یکی از روش‌های درمانی جهت جایگزینی سلول‌های از دست رفته تولید سلول‌های تمایز یافته عصبی است (۹).

از این رو در مطالعه حاضر بر آن شدیم تا به مطالعه بیشتر تمایز سلول‌های بنیادی مغز استخوان به سلول شبه عصبی بپردازیم. اگر چه مطالعات زیادی در این

^۱ 3,4-Methylenedioxymethamphetamine^۲ Neuroprotective

مغز استخوان

از محلول پروپیدیوم یداید به صورت ۱ میلی گرم در ۱۰۰۰ میکرولیتر به مدت یک دقیقه استفاده شد. جهت بررسی سلول‌های مثبت، نمونه‌ها توسط میکروسکوپ فلورسانس اینورت (Olympus IX71) مورد بررسی قرار گرفتند.

۳. عصاره‌گیری از ریزوم زنجبیل

در مرحله بعد عصاره‌گیری از عصاره زنجبیل انجام گرفت برای این منظور ریزوم (ریشه) زنجبیل تهیه گردید و با دستگاه خرد کننده صنعتی کاملاً آسیاب شد. پودر عصاره زنجبیل تا زمان عصاره‌گیری در جای خشک و خنک نگهداری شد. از پودر عصاره زنجبیل عصاره الکلی به روش سوکسله تهیه شد. در این روش مقدار ۲۵ گرم از پودر عصاره زنجبیل به همراه حدود ۵۰۰ میلی‌لیتر الکل مطلق داخل بالن دستگاه ریخته شد. عصاره‌گیری سه روز متوالی از صبح تا شب صورت گرفت تا اطمینان حاصل شود که تمام عصاره قابل حل در الکل از پودر استخراج شده است. در این حالت عصاره خالص به دست آمده ۱ گرم بود. بعد از آن سلول‌ها به پلیت‌های ۶ خانه منتقل شدند (۱۰×۱۰۵) هزار سلول در هر خانه از پلیت ۶ خانه و با محیط DMEM حاوی عصاره زنجبیل تعویض محیط گردیدند. برای دستیابی به بهترین غلظت عصاره زنجبیل و بهترین زمان القاء از غلظت‌های ۱۰، ۲۰، ۳۰، ۴۰، ۵۰، ۶۰ و ۷۰ میکروگرم در میلی‌لیتر ترکیب ۱:۱ اتانول / DMSO تهیه شد و در بازه‌های زمانی ۱۲ و ۲۴ ساعت در معرض سلول قرار داده شد. بهترین غلظت و زمان با استفاده از ارزیابی درصد سلول‌های زنده و سلول‌های دارای فنوتیپ عصبی به دست آمد (۱۹).

۴. بررسی آزمون زنده ماندن

آزمون زنده ماندن بعد از مواجه سلول‌ها با عصاره زنجبیل صورت گرفته است. بدین صورت که برای انجام این آزمون یک حجم سوسپانسیون سلولی و یک حجم مساوی از رنگ تریپان بلو مخلوط شد و شمارش سلولی با استفاده از لام نفوبار در زیر میکروسکوپ اینورت انجام شد. در این روش رنگ به داخل سلول‌های مرده نفوذ می‌کند و به رنگ آبی در می‌آیند ولی سلول‌های رنگ نشده معرف سلول‌های زنده هستند که با شمارش کل سلول‌ها و سلول‌های رنگ شده درصد سلول‌های زنده به دست آمد.

۵. بررسی رنگ آمیزی کرزیل و بوله

جهت رنگ آمیزی، محیط کشت سلول‌ها دور ریخته شد و سلول‌ها توسط PBS سه مرتبه شستشو داده شد. سپس سلول‌ها توسط پارافرمالدهید ۴ درصد به مدت ۳۰ دقیقه فیکس شدند. در مرحله بعد به مدت ۵ دقیقه سلول‌ها در معرض محلول کرزیل فست و بوله

سلول‌های بنیادی مشتق از مغز استخوان با روش آسپیراسیون از استخوان‌های تی‌بی‌ا و فمور از موش‌های صحرایی نر نژاد اسپراگ داوولی با وزن ۲۲۰ تا ۲۵۰ گرم جداسازی شد (۱۸). سلول‌های جداسازی شده به فلاسک‌های ۲۵ سانتی حاوی محیط کشت DMEM، پنی‌سیلین استرپتومایسین ۱۰٪/ حاوی سرم FBS ۱۰٪ منتقل گردید. فلاسک‌ها داخل انکوباتور (دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و فشار پنج درصد CO₂) قرار داده شد. پس از ۷۲ ساعت محیط کشت فلاسک‌ها تعویض گردید و بدین طریق سلول‌های خونساز و ذرات بافتی موجود در محیط کشت جدا شده و در نتیجه عمدتاً سلول‌های استرومایی مغز استخوان که توانایی چسبیدن به کف فلاسک را دارند باقی ماندند. پس از پنج پاساژ، سلول‌های استرومایی تقریباً یک دست در کف فلاسک‌ها باقی ماندند که از این سلول‌ها برای بررسی ریخت‌شناسی و ایمونوسیتوشیمی استفاده شد. لازم به ذکر است که در این مطالعه از یک موش برای جداسازی و کشت سلول استفاده شد و در نهایت مطالعه در محیط‌های کشت سلولی به صورت تکرارهای سه تایی انجام گرفت. مطالعه حاضر روی یک نمونه و به صورت سه بار تکرار انجام شد.

۲. ایمونوسیتوشیمی

برای این منظور محیط سلول‌ها دور ریخته شد و با فسفات بافر سالین (PBS)^۳ سه مرتبه به مدت ۵ دقیقه شستشو شدند. سپس توسط پارافرمالدهید ۴ درصد به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۴ درجه فیکس شدند. سپس غشای سلول‌ها توسط تریتون ۰/۳ درصد برای مدت ۳۰ دقیقه نفوذپذیر شد و در مرحله بعدی برای جلوگیری از واکنش‌های غیر اختصاصی سلول‌ها با سرم ۱۰٪ FBS/ به مدت ۲۰ دقیقه پوشش داده شد. سپس به مدت ۱۲ ساعت در دمای ۴ درجه در معرض آنتی‌بادی‌های اولیه به شرح زیر قرار گرفت.

Mouse anti- CD106, polyclonal antibody 1:300(;
Millipore)
Mouse anti-CD90, monoclonal antibody 1:200(;
Millipore)
Mouse anti-CD45 polyclonal antibody 1:300(;
Millipore)

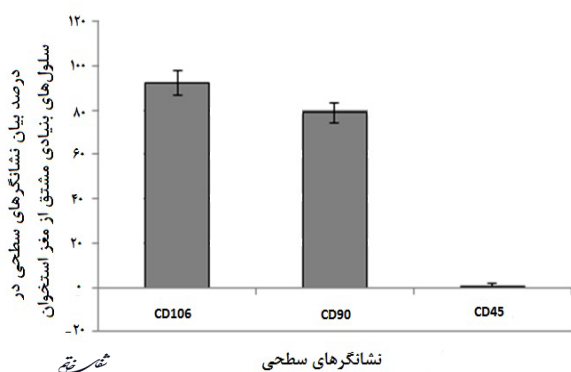
در ادامه بعد از ۱۲ ساعت آنتی‌بادی اولیه توسط PBS شستشو داده شد و به مدت ۲ ساعت در دمای اتاق و محیط تاریک در معرض آنتی‌بادی ثانویه ضد موشی کونژوگ به FITC با غلظت (۱/۵۰۰) قرار گرفت. برای مشخص شدن هسته سلول‌ها در هنگام شمارش

^۳ Phosphate-buffered saline

ارزیابی ایمونوسیتوشیمی نشانگرهای سطحی CD90 و CD106 بعد از رنگ آمیزی هسته با اتیدیوم بروماید نشان داد که $6/64 \pm 71/52$ درصد از سلول‌ها به آنتی‌بادی CD90 (نشانگر اختصاصی مربوط به سلول‌های مزانشیمی)، $2/26 \pm 95/67$ درصد به آنتی‌بادی CD106 (نشانگر اختصاصی مربوط به سلول‌های استرومایی مغز استخوان) واکنش مثبت نشان دادند. همچنین این سلول‌ها برای نشانگر CD45 (اختصاصی مربوط به سلول‌های هماتوپوئیتیک) با درصد $0/86 \pm 0/6$ منفی شدند (نمودار ۱ و تصویر ۲).

۳. نتایج آزمون زنده ماندن

نتایج مرحله القاء سلول‌ها با عصاره زنجبیل نشان داد که در تمایز سلول‌های بنیادی مغز استخوان به سلول‌های شبه عصبی، درصد سلول‌های زنده با افزایش غلظت از ۱۰ میکروگرم در میلی‌لیتر تا ۳۰ میکروگرم در میلی‌لیتر در بازه زمانی ۱۲ ساعت افزایش یافته که این افزایش در بازه زمانی ۱۲ ساعت معنی‌دار بوده است ($P < 0/05$). با افزایش غلظت از ۳۰ به ۷۰ میکروگرم در میلی‌لیتر و در هر دو زمان ۱۲ و ۲۴ ساعت کاهش درصد سلول‌های زنده دیده شده است. (نمودار ۲). بر اساس نتایج به دست آمده بیشترین درصد سلول‌های زنده مربوط به غلظت ۳۰ میکروگرم در میلی‌لیتر می‌باشد که در زمان القاء ۱۲ ساعت نسبت به ۲۴ ساعت این افزایش بیشتر می‌باشد ($P < 0/05$).



نمودار ۱- نمودار ستونی درصد بیان نشانگرهای سطح سلولی در سلول‌های مزانشیمی مشتق از مغز استخوان بعد از پاساژ سلولی چهارم.

قرار گرفتند (۲۰). بعد از رنگ آمیزی چندین بار توسط PBS شستشو داده شد. سپس به وسیله میکروسکوپ اینورت اجسام نیسل‌ها مورد مطالعه قرار گرفتند.

۶. تجزیه و تحلیل آماری

تمام مقادیر بر حسب میانگین $\pm$ انحراف استاندارد ارائه شده است. اطلاعات به دست آمده از بررسی زنده بودن سلول‌ها و شمارش سلولی با روش آماری آنالیز واریانس یکطرفه (ANOVA) و آزمون تعقیبی TUKEY بین زمان‌ها و گروه‌های مختلف به وسیله نرم‌افزار SPSS ویرایش ۱۵ انجام گرفت. سطح معنی‌داری $P < 0/05$ در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

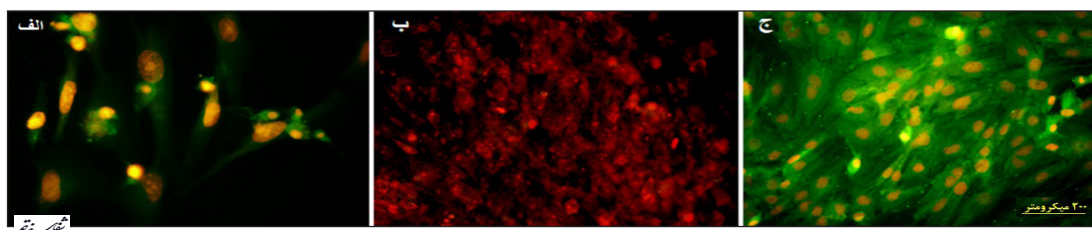
۱. جداسازی و کشت سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از مغز استخوان

نتایج حاصل از کشت سلول‌های بنیادی مشتق از مغز استخوان نشان داد که این سلول‌ها در بررسی ابتدایی بعد از ۲۴ ساعت از کشت اولیه، توانایی اتصال به کف فلاسک را دارند و از نظر ریخت‌شناسی شباهت بالایی به سلول‌های فیروبلست دارند. نتایج حاصل از مشاهدات سلولی به منظور بررسی ریخت‌شناسی سلول با استفاده از میکروسکوپ فاز کنتراست در تصویر ۱ نشان داده شده است.

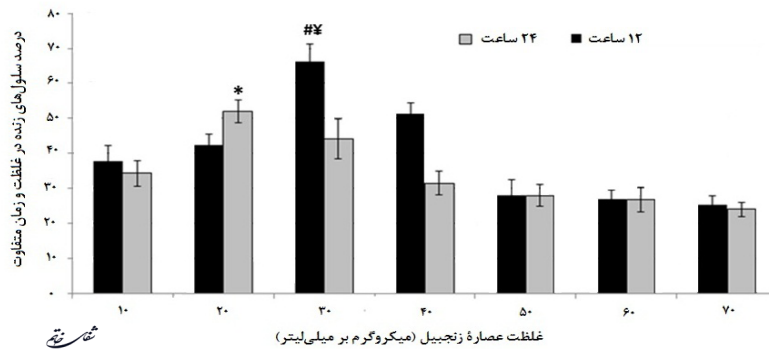
۲. ایمونوسیتوشیمی



تصویر ۱- تصویر فازکنتراست از سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از مغز استخوان کشت داده شده بعد از ۲۴ ساعت. سلول‌ها متصل شده به کف فلاسک دوکی شکل بوده (شبه فیروبلست) و هسته مشخصی دارند.



تصویر ۲- رنگ آمیزی ایمونوسیتوشیمی سلول‌های بنیادی مشتق از مغز استخوان موش صحرایی با نشانگر CD90 (الف) با مقیاس: ۵۰۰ میکرومتر، CD45 (ب)، CD106 (ج) مقیاس: ۲۰۰ میکرومتر. جهت شمارش و بیان درصد سلول‌هایی که این نشانگرها را بیان می‌کنند از رنگ آمیزی هسته با اتیدیوم بروماید استفاده شد. (رنگ قرمز نشانگر رنگ آمیزی هسته با اتیدیوم بروماید و رنگ سبز نشان دهنده رنگ آمیزی با fitc می‌باشد).

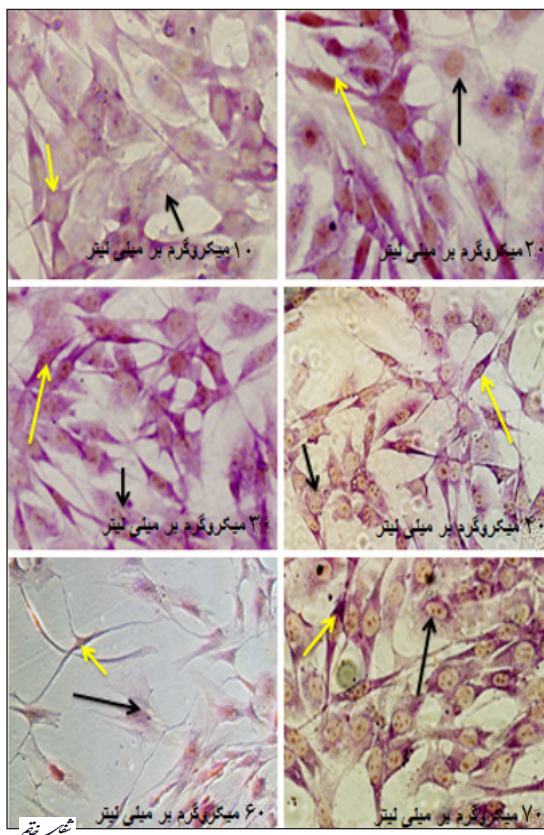


نمودار ۲- نمودار ستونی درصد سلول‌های زنده تحت تأثیر غلظت‌های مختلف عصاره زنجبیل در زمان‌های ۱۲ و ۲۴ ساعت. * تفاوت معنی‌دار بین غلظت ۲۰ میکروگرم در میلی‌لیتر و سایر غلظت‌ها در بازه زمانی ۲۴ ساعت را نشان می‌دهد ($P < 0.05$). # تفاوت معنی‌دار بین غلظت ۳۰ میکروگرم در میلی‌لیتر و سایر غلظت‌ها در بازه زمانی ۱۲ ساعت را نشان می‌دهد ($P < 0.05$). ## تفاوت معنی‌دار بین بازه‌های زمانی ۱۲ ساعت و ۲۴ ساعت در غلظت ۳۰ میکروگرم در میلی‌لیتر را نشان می‌دهد ($P < 0.05$).

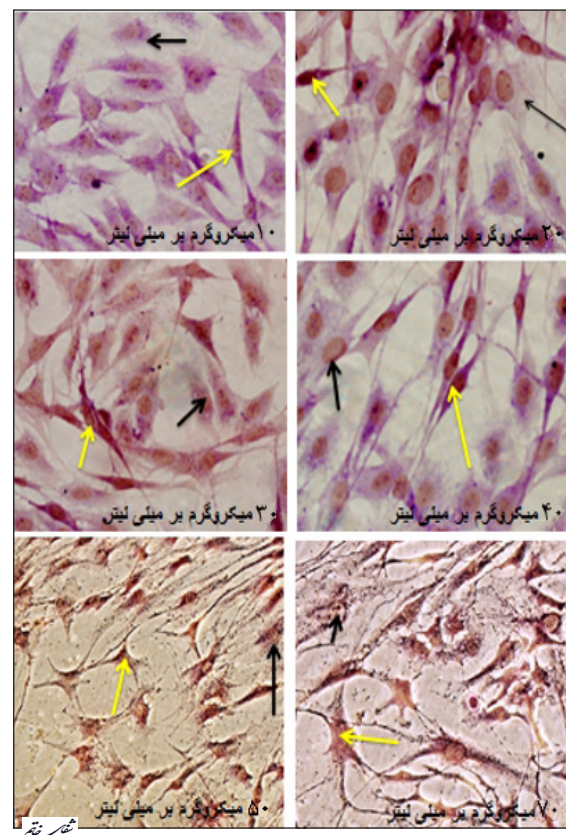
۴. نتایج رنگ‌آمیزی کرزیل ویوله

نتایج حاصل از شمارش سلول‌های شبه عصبی رنگ‌آمیزی شده با کرزیل فست ویولت نشان داد که در بین گروه‌های مورد آزمون با غلظت‌های ۱۰، ۲۰، ۳۰، ۴۰، ۵۰، ۶۰ و ۷۰ در زمان القاء ۱۲ و ۲۴ ساعت، بیشترین تعداد سلول‌های شبه عصبی مربوط به غلظت

۶۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر می‌باشد و این اختلاف بین غلظت‌های مورد آزمون در ۱۲ ساعت ($P < 0.05$) از نظر آماری معنی‌دار می‌باشد (تصویر ۳، ۴، ۵). از طرفی بررسی‌ها نشان داد که تعداد سلول‌های نیسل مثبت در غلظت ۶۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر، با القاء ۱۲ ساعت بیشتر از القاء به مدت ۲۴ ساعت می‌باشد و این تفاوت معنی‌دار است (نمودار ۳).



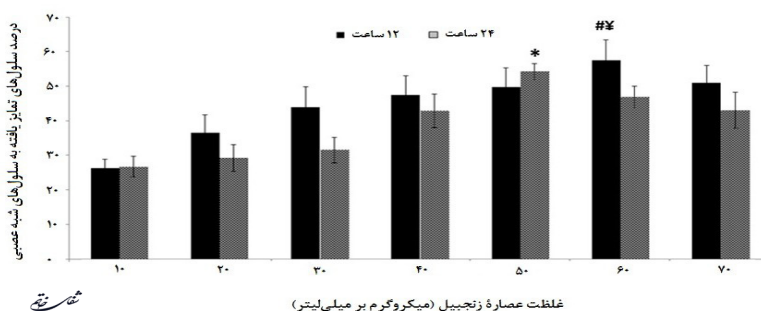
تصویر ۴- سلول‌های شبه عصبی القاء شده با عصاره Zingiber در غلظت‌های ۱۰، ۲۰، ۳۰، ۴۰، ۶۰ و ۷۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر و به مدت ۲۴ ساعت.



تصویر ۳- سلول‌های شبه عصبی القاء شده با عصاره Zingiber در غلظت‌های ۱۰، ۲۰، ۳۰، ۴۰، ۵۰ و ۷۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر و به مدت ۱۲ ساعت. علامت پیکان نشان دهنده سلول‌های نیسل مثبت می‌باشد.



تصویر ۵- سلول‌های شبه عصبی القاء شده با عصاره Zingiber در غلظت ۶۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر در بازه زمانی ۱۲ ساعت و ۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر در بازه زمانی ۲۴ ساعت و گروه کنترل (نرمال سالین).



نمودار ۳- نمودار مقایسه‌ای درصد سلول‌های شبه عصبی حاوی اجسام نیسل با رنگ آمیزی کریزیل ویوله در غلظت‌های مختلف Zingiber و زمان‌های مختلف (۱۲ و ۲۴ ساعت). نمودار نشان می‌دهد که غلظت ۶۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر و ۱۲ ساعت القاء بیشترین درصد سلول شبه عصبی ایجاد می‌گردد که این اختلاف در مقایسه با زمان ۲۴ ساعت معنی‌دار می‌باشد. * تفاوت معنی‌دار بین بازه‌های زمانی ۱۲ ساعت و ۲۴ ساعت را نشان می‌دهد ($P < 0.05$). * تفاوت معنی‌دار بین غلظت ۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر و سایر غلظت‌ها در بازه زمانی ۲۴ ساعت را نشان می‌دهد ($P < 0.05$). # تفاوت معنی‌دار بین غلظت ۶۰ میکروگرم در میلی‌لیتر و سایر غلظت‌ها در بازه زمانی ۱۲ ساعت را نشان می‌دهد ($P < 0.05$). % تفاوت معنی‌دار بین بازه‌های زمانی ۱۲ ساعت و ۲۴ ساعت در غلظت ۶۰ میکروگرم در میلی‌لیتر را نشان می‌دهد ($P < 0.05$).

بحث و نتیجه‌گیری

بنیادی عصبی درونی، سلول‌های غلاف عصب بویایی و سلول‌های استرومایی مغز استخوان اشاره کرد (۲۴-۲۱). غیر از آن از سلول‌های غیر بنیادی چون سلول‌های شوان، ماکروفاژها و سلول‌های دندرتیک نیز مورد استفاده قرار گرفته است. از میان این سلول‌ها، سلول‌های استرومایی مغز استخوان از انواع سلول‌های بنیادی بالغ هستند که در سال‌های اخیر بیشترین کارایی را در سلول درمانی نشان دادند (۲۸-۲۵).

در این مطالعه ما سلول‌های بنیادی مشتق از مغز استخوان را جهت تولید سلول‌های شبه عصبی استفاده کردیم. در این حالت سلول‌ها دوکی شکل و شباهت زیادی به سلول‌های فیبروبلاستی داشتند. علاوه بر آن بررسی نشانگرهای سلولی در مورد سلول‌های مزانشیمی مغز استخوان با بیان مثبت نشانگرهای مزانشیمی (CD90، CD106) و عدم بیان نشانگر خونی (CD45) همراه بود که این یافته‌ها نیز در توافق با سایر مطالعات انجام شده تاکنون می‌باشد. در این تحقیق سعی شد از عصاره زنجبیل با سمیت پایین جهت القاء سلول‌های مزانشیمی مغز استخوان استفاده گردد (۳۳-۲۹). بررسی‌هایی در زمینه تمایز سلولی در حضور عصاره زنجبیل انجام شده که از آن جمله توانایی این ترکیب گیاهی برای افزایش تمایز سلول‌های چربی است (۳۴). همچنین مطالعات دیگری نیز وجود دارد

بررسی میزان القاء سلول‌های بنیادی مغز استخوان به سلول‌های شبه عصبی نشان داد که با افزایش غلظت عصاره زنجبیل از غلظت ۱۰ تا ۶۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر تعداد سلول‌های نیسل مثبت افزایش می‌یابد. این نتایج در مورد هر دو زمان ۱۲ و ۲۴ ساعت القاء صدق می‌کند. در مقایسه بین دو زمان القاء ۱۲ و ۲۴ ساعته و غلظت‌های متفاوت عصاره زنجبیل، اپتیموم غلظت و زمان برای تولید بیشترین سلول‌های شبه عصبی (بر اساس یافته‌های حاصل از رنگ آمیزی کریزیل فست ویوله)، مربوط به غلظت ۶۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر می‌باشد و این اختلاف بین غلظت‌های مورد آزمون در ۱۲ ساعت ($P < 0.05$) از نظر آماری معنی‌دار می‌باشد. بنابراین با توجه به اثری که عصاره زنجبیل بر افزایش تعداد سلول‌های نیسل مثبت داشته است. از آنجا که تولید سلول‌های کارآمد و تمایز یافته عصبی هنوز به عنوان یک مسئله پیچیده در پزشکی مطرح می‌باشد، مطالعات ما نیز در این تحقیق بر پایه یافتن راهی مناسب برای رسیدن به این هدف انجام گرفته است. تاکنون از سلول‌های زیادی در زمینه درمان سلولی در ضایعات سیستم عصبی مرکزی استفاده گردیده که از جمله آن‌ها می‌توان به استفاده از سلول‌های بنیادی عصبی از جمله سلول‌های

اکثر یافته‌ها تأیید کننده این امر است که اثر این ترکیب گیاهی در سلول‌های سرطانی و غیر سرطانی متفاوت است (۴۲-۳۸).

در بررسی که توسط سایر محققین انجام شد نشان داد که عصاره زنجبیل در آسیب‌های سیستم عصبی مرکزی و به خصوص ضایعات نخاعی موجب کاهش آستروگلیوزیس می‌گردد. این عملکرد عصاره زنجبیل به واسطه مسیریهای پیام‌رسانی $p38^{\text{MAPK}}$, $p\text{-SAPK/JNK}$ و transcription-3 activation رخ می‌دهد (۴۹-۴۳). به علت خاصیت ضد التهابی و همچنین کاهش تکثیر آستروسیت‌ها و توانایی تمایز می‌تواند عامل مناسبی برای معرفی جهت درمان ضایعات حاد سیستم عصبی باشد. مطالعه انجام گرفته توسط واگاس نیز حاکی از آن است که عصاره زنجبیل دارای اثر محافظت کننده نورونی می‌باشد (۵۰). در مطالعه‌ای که توسط گیان و همکارانش در سال ۲۰۱۴ روی اثر عصاره زنجبیل بر مغز موش‌های دیابتی انجام گرفت، نقش حفاظتی عصاره زنجبیل در مغز موش‌های دیابتی از طریق کاهش استرس اکسیداتیو، آپوپتوز، و التهاب نشان داده شد (۵۱).

یافته‌های به دست آمده در این مطالعه نشان می‌دهد که ترکیب گیاهی عصاره زنجبیل فاکتور مناسبی جهت استفاده در رشد و تمایز سلول‌های عصبی می‌باشد. همچنین این ترکیب وابسته به دوز عمل کرده و با افزایش غلظت باعث افزایش تمایز می‌گردد در حالی که در دوز پایین القاء کننده رشد می‌باشد. بنابراین نتایج حاصل از مطالعه حاضر می‌تواند دریچه‌ای باشد بر انجام مطالعات بیشتر به منظور بررسی مسیریهای پیام‌رسانی دخیل در اثر عصاره زنجبیل بر تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از مغز استخوان به سلول‌های شبه عصبی جهت کاربردی کردن نتایج حاصل باشد.

که نشان دهنده اثر زنجبیل بر مرحله M1 از سیکل سلولی و تأثیر آن بر تمایز سلولی می‌باشد به صورتی که در رده‌های سلولی مختلف منجر به افزایش تمایز سلولی شده است. در مطالعه‌ای نیز اثر هیستون داستیلز بودن عصاره ریزوم زنجبیل مطرح شده است که این امر موجب مهار تکثیر، افزایش تمایز و یا آپاپتوز سلول‌های توموری می‌گردد (۳۵، ۳۴).

گیاهانی که در خانواده زنجبیل قرار دارند به طور چشمگیری در رژیم غذایی افراد دنیا قرار دارند. این عصاره از ساختارهایی چون gingerols, shogaols, gingerdiones و dehydrogingerdion تشکیل شده است و هر یک از این ساختارها از نظر تمایز سلولی و توانایی آنتی آدرنرژیک مورد مطالعه قرار گرفته‌اند. اولنورزینی که از ریشه گیاه زنجبیل تهیه می‌شود حاوی gingerol می‌باشد که یک ماده فعال از نظر فارماکولوژیک است. همچنین در مطالعات انجام گرفته در سال‌های گذشته تأثیر این مواد بر ممانعت از تکثیر سلول‌های سرطان انسانی از مسیر آپوپتوزیس به اثبات رسیده است. مطالعات ما نشان داد که عصاره زنجبیل در دوز پایین (۳۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) باعث القاء رشد و در دوز بالا (۶۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) موجب توقف در رشد و تکثیر سلولی و به دنبال آن افزایش تمایز سلولی می‌گردد (۳۷، ۳۶).

علاوه بر مطالعاتی که تاکنون انجام گرفته و مبنی بر این واقعیت است که عصاره زنجبیل باعث افزایش نشانگرهای آپاپتوزی (Bax) و تمایزی (p21) می‌گردد، با این وجود یافته‌هایی نیز وجود دارد که نشان می‌دهد مکمل‌های عصاره زنجبیل با کاهش نشانگرهای آپاپتوزی و تمایزی همراه هستند. در مورد عملکرد این ترکیب گیاهی یافته‌های متناقضی وجود دارد. البته

منابع

1. Ide C, Kitada M, Chakraborty S, Taketomi M, Matsumoto N, Kikokama S, et al. Grafting of choroid plexus ependymal cells promotes the growth of regenerating axons in the dorsal funiculus of rat spinal cord: a preliminary report. *Exp Neurol*. 2001; 167(2): 242-51.
2. Sasaki M, Honmou O, Akiyama Y, Uede T, Hashi K, Koesis JD, et al. Transplantation of an acutely isolated bone marrow fraction repairs demyelinated adult rat spinal cord axons. *Glia*. 2001; 35(1): 26-34.
3. Lee J, Kuroda S, Shichinohe H, Ikeda J, Seki TH. Migration and differentiation of nuclear fluorescence-labeled bone marrow stromal cells after transplantation into cerebral infarct and spinal cord injury in mice. *Neuropathology*. 2003; 23(3): 169-80.
4. Zurita M, Vaquero J. Functional recovery in chronic paraplegia after bone marrow stromal cells transplantation. *Neuroreport*. 2004; 15(7): 1105-8.
5. Ankeny DP, Mctigue DM, Jakeman LB. Bone marrow transplants provide tissue protection and directional guidance for axons after contusive spinal cord injury in rats. *Exp Neurology*. 2004; 190(1): 17-31.
6. Garcia R, Aguiar J. Bone marrow stromal cells produce nerve growth factor and glial cell line derived neurotrophic factor. *J Biochem Brain Res*. 2004; 316(3): 753-4.
7. Jiang Y, Henderson D. Neuroectodermal differentiation from mouse multipotent adult progenitor cells. *Proc Nat Acad Sci USA*. 2003; 100: 11854-60.

⁴ Mitogen-activated protein kinase

8. Jiang Y, Jahagirdar BN. Pleuripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature*. 2002; 418 (6893): 41-9.
9. Bodega G, Suarez I, Rubio M, B Fernandez. Ependyma: phylogenetic evolution of glial fibrillary acidic protein (GFAP) and vimentin expression in vertebrate spinal cord. *Histochemistry*. 1994; 102(2): 113-2.
10. Waggas AM. "Neuroprotective evaluation of extract of ginger (*Zingiber officinale*) root in monosodium glutamate induced toxicity in different brain areas male albino rats". *Pakistan Journal of Biological Sciences*. 2009; 12(3): 201-12.
11. Asnani V, Verma RJ. "Antioxidative effect of rhizome of *Zingiber officinale* on paraben induced lipid peroxidation: an in vitro study". *Acta Poloniae Pharmaceutica*. 2007; 64(1): 35-7.
12. Oliveira CH, Moraes MEA, Moraes MO, Bezerra FAF, Abib E, De Nucci G. "Clinical toxicology study of an herbal medicinal extract of *Paullinia cupana*, *Trichilia catigua*, *Ptychopetalum olacoides* and *Zingiber officinale* (Catuama) in healthy volunteers". *Phytotherapy Research*. 2005; 19(1): 54-7.
13. PM Wiedemann, J Simon, S Schicktanz, C Tannert. The future of stem-cell research in Germany. *EMBO Reports*. 2004; 5(10): 927-31.
14. Robey PG. Stem cells near the century mark. *J Clin Invest*. 2000; 105(11): 1489-91.
15. Wiessman IL. Stem cells: units of development, units of regeneration and units of evolution. *Cell*. 2000; 100(1): 157-68.
16. Adib S, Tiraihi T, Darvishi M, Taheri T, Kazemi H. Cholinergic differentiation of neural stem cells generated from cell aggregates-derived from human bone marrow stromal cells. *Tissue Engineering and Regenerative Medicine*. 2015; 12(1): 43-52.
17. Evaluating the function of motoneuron-like cells differentiated from rat adipose derived stem cells through Calcium ion imaging and investigating the synaptic vesicle recycling. *Iranian Biomedical Journal*. 2013; 18(5): 254-66.
18. barati P, Darvishi M, Tiraihi T, Doroudi T. Neurogenic differentiation of rat bone marrow stromal cells by non toxic factors of bioactive substance as inducer. *Shefaye Khatam*. 2014; 2(2): 47-55.
19. Alfaro M, Bélanger J, Padilla J, Paré J. Influence of solvent, matrix dielectric properties, and applied power on the liquid-phase microwave-assisted processes (MAP™)1 extraction of ginger (*Zingiber officinale*). *Food Research International*. 2003; 36(5): 499-504.
20. Darvishi M, Tiraihi T, Mesbah-Namin SA, Delshad A, Taheri T. Motor neuron transdifferentiation of neural stem cell from adipose-derived stem cell characterized by differential gene expression. *Cell Mol Neurobiol*. 2016. doi: 10.1007/s10571-016-0368-x.
21. Bianco P, Riminucci M, Gronthos S, Roby PG. Bone marrow stromal cells, nature, biology and potential applications. *Stem Cells*. 2001; 19(3): 180-92.
22. Aeschbach R, Loliger J, Scott BC, Murcia A, Butler J, Halliwell B, et al. Antioxidant actions of thymol, carvacrol, [6]-gingerol, zingerone and hydroxytyrosol. *Food Chem Toxicol*. 1994; 32(1): 31-6.
23. Aktan F, Henness S, Tran VH, Duke CC, Roufogalis BD, Ammit AJ. Gingerol metabolite and a synthetic analogue Capsarol inhibit macrophage NF-kappaB-mediated iNOS gene expression and enzyme activity. *Planta Med*. 2006; 72(8): 727-34.
24. Ali BH, Blunden G, Tanira MO, Nemmar A. Some phytochemical, pharmacological and toxicological properties of ginger (*Zingiber officinale* Roscoe): a review of recent research. *Food Chem Toxicol*. 2008; 46(2): 409-20.
25. Alizadeh-Navaei R, Roozbeh F, Saravi M, Pouramir M, Jalali F, Moghadamnia A. Investigation of the effect of ginger on the lipid levels. A double blind controlled clinical trial. *Saudi Med J*. 2008; 29(9): 1280-4.
26. Altman R D, Marcussen KC. Effects of a ginger extract on knee pain in patients with osteoarthritis. *Arthritis Rheum*. 2001; 44(11): 2531-8.
27. Antipenko AY, Spielman AI, Kirchberger MA. Interactions of [6]-gingerol and ellagic acid with the cardiac sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-AT Pase. *J Pharmacol Exp Ther*. 1999; 290(1): 227-34.
28. Bhandari U, Sharma JN, Zafar R. The protective action of ethanolic ginger (*Zingiber officinale*) extract in cholesterol fed rabbits. *J Ethnopharmacol*. 1998; 61(2): 167-71.
29. Bode AM, Ma WY, Surh Y J, Dong Z. Inhibition of epidermal growth factor-induced cell trans-formation and activator protein 1 activation by [6]-gingerol. *Cancer Res*. 2001; 61(3): 850-3.
30. Brown AC, Shah C, Liu J, Pham JT, Zhang JG, Jadus MR. Ginger's (*Zingiber officinale* Roscoe) inhibition of rat colonic adenocarcinoma cells proliferation and angiogenesis in vitro. *Phytother Res*. 2009; 23(5): 640-5.

31. Buddhakala N, Talubmook C, Sriyotha P, Wray S, Kupittayanant S. Inhibitory effects of ginger oil on spontaneous and PGF2alpha-induced contraction of rat myometrium. *Planta Med.* 2008; 74(4): 385-91.
32. Chen CY, Liu TZ, Liu YW, Tseng WC, Liu R, Lu FJ, et al. 6 -shogaol (alkanone from ginger) induces apoptotic cell death of human hepatoma p53 mutant Mahlavu subline via an oxidative stress-mediated caspase-dependent mechanism. *J Agric Food Chem.* 2007; 55(3): 948-54.
33. Chung M, Kim MY, Park WH, Moon HI. Histone deacetylase inhibitors from the rhizomes of Zingiber zerumbet. *Pharmazie.* 2008; 63: 774-6.
34. Sekiya K, Ohtani A, Kusano S. Enhancement of insulin sensitivity in adipocytes by ginger. *Biofactors.* 2004; 22(1-4): 153-6.
35. Kuroyanagi M, Umehara K, Hayashi T, Hirayamac Y. Cell differentiation inducers and antiandrogenic active compounds from zingiberis rhizoma. *Natural Medicines.* 2002; 56(2): 47-50.
36. Creson TK, Yuan P, Manji HK, Chen G. Evidence for involvement of ERK, PI3K, and RSK in induction of Bcl-2 by valproate. *J Mol Neurosci.* 2009; 37(2): 123-34.
37. Ernfors P, Lee KF, Jaenisch R. Mice lacking brain-derived neurotrophic factor develop with sensory deficits. *Nature.* 1994; 368(6467): 147-50.
38. Grondin R, Gash DM. Glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF): a drug candidate for the treatment of Parkinson's disease. *J Neurol.* 1998; 11(3): 35-42.
39. Hisaoka K, Takebayashi M, Tsuchioka M, Maeda N, Nakata Y, Yamawaki S. Antidepressants increase glial cell line-derived neurotrophic factor production through monoamine-independent activation of protein tyrosine kinase and extracellular signal-regulated kinase in glial cells. *J Pharmacol Exp Ther.* 2007; 321(1): 148-57.
40. Kim SD, Moon CK, Eun SY, Ryu PD, Jo SA. Identification of ASK1, MKK4, JNK, c-Jun, and caspase-3 as a signaling cascade involved in cadmium-induced neuronal cell apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun.* 2005; 328(1): 326-34.
41. Klein R, Smeyne RJ, Wurst W, Long L K, Auerbach BA, L Joyner A, et al. Targeted disruption of the trkB neurotrophin receptor gene results in nervous system lesions and neonatal death. *Cell.* 1993; 75(1): 113-22.
42. Lantz RC, Chen GJ, Sarihan M, Solyom AM, Jolad SD, Timmermann BN. The effect of extracts from ginger rhizome on inflammatory mediator production. *Phytomedicine.* 2007; 14(2-3): 123-8.
43. Liu YZ, Boxer LM, Latchman DS. Activation of the Bcl-2 promoter by nerve growth factor is mediated by the p42/p44 MAPK cascade. *Nucleic Acids Res.* 1999; 27(10): 2086-90.
44. Masuda Y, Kikuzaki H, Hisamoto M, Nakatani N. Antioxidant properties of gingerol related compounds from ginger. *Biofactors.* 2004; 21(1-4): 293-6.
45. McCarthy KD, de Vellis J. Preparation of separate astroglial and oligodendroglial cell cultures from rat cerebral tissue. *J Cell Biol.* 1980; 85(3): 890-902.
46. Rudolph JG, Lemasters JJ, Crews FT. Effects of NMDA and ferrous sulfate on oxidation and cell death in primary neuronal cultures. *Neurochem Int.* 2000; 37(5-6): 497-507.
47. Scharfman H, Goodman J, Macleod A, Phani S, Antonelli C, Croll S. Increased neurogenesis and the ectopic granule cells after intrahippocampal BDNF infusion in adult rats. *Exp Neurol.* 2005; 192(2): 348-56.
48. Shim S, Kim S, Choi DS, Kwon YB, Kwon J. Anti-inflammatory effects of [6]-shogaol: potential roles of HDAC inhibition and HSP70 induction. *Food Chem Toxicol.* 2011; 49(11): 2734-40.
49. Shim S, Kim S, Kwon YB, Kwon J. Protection by [6]-shogaol against lipopolysaccharide-induced toxicity in murine astrocytes is related to production of brain-derived neurotrophic factor. *Food Chem Toxicol.* 2012; 50(3-4): 597-602.
50. Waggas, Abeer M. "Neuroprotective evaluation of extract of Ginger (*Zingiber officinale*) root in monosodium glutamate-induced toxicity in different brain areas male albino rats." *Pakistan Journal of Biological Sciences.* 2009; 12(3): 201-12.
51. El-Akabawy G, El-Kholy W. Neuroprotective effect of ginger in the brain of streptozotocin-induced diabetic rats. *Ann Anat.* 2014; 196(2-3): 119-28.