مجله دانشکده پزشکی اصفهان
سال سی و سوم/شماره ۳۴۵/هفته اول مهر ماه ۱۳۹٤

تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۱/۲۰
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۴/۴/۱۵

بررسی تأثیر استروژن بر میزان بیان نشانگرهای عصبی در طی تمایز نوروژنیک سلول‌های بنیادی مشتق از چربی

دکتر شهناز رضوی[۱]، نفیسه احمدی[۲]، محمد کاظمی[۳]، حمیدرضا صادقیان[۴]

مقاله پژوهشی

چکیده

مقدمه: با توجه به سهولت دستیابی به سلول‌های بنیادی حاصل از بافت چربی نسبت به سایر منابع سلول‌های بنیادی در صورتی که بتوان از عوامل رشد مانند استروژن جهت افزایش تمایز نرونی استفاده نمود، نرون‌های تمایز یافته، در پیوند اتولوگ بیماری‌های عصبی دژنراتیو خاص مانند بیماری پارکینسون و ضایعات نخاعی استفاده‌ی وسیعی دارد. هدف از این مطالعه، ارزیابی تأثیر استروژن بر تمایز عصبی سلول‌های بنیادی مشتق از بافت چربی از طریق ارزیابی بیان نشانگر نورون بالغ (MAP۲ یا Microtubule-associated protein۲)، نشانگر سلول‌های گلیال (Glial fibrillary acidic protein یا GFAP) و نشانگر سلول‌های پیش‌ساز عصبی (Nestin) بود.

روش‌ها: پس از جداسازی سلول‌های بنیادی از بافت چربی، القای عصبی سلول‌های بنیادی از طریق روش تشکیل نروسفر انجام شد. پس از یک هفته، تجمعات سلولی نروسفر تشکیل شده جهت تمایز نهایی، به محیط کشت القای عصب منتقل شد و در گروه تیمار استروژن با دوز ۱۰ نانومول تا انتهای دوره‌ی تمایز روزانه به محیط کشت القای عصب اضافه گردید. سپس ارزیابی بیان نشانگرهای Nestin، MAP۲ و GFAP در سلول‌های تمایز یافته از طریق تکنیک RT-PCR (Reverse transcription-polymerase chain reaction) صورت گرفت. به علاوه، آزمایش MTT [۳(۴،۵- dimethyl thiazol-۲-yl) ۲،۵ diphenyl tetrazolium bromide assay] جهت ارزیابی تکثیر سلولی انجام شد.

یافته‌ها: میانگین بیان نشانگرهای Nestin و GFAP در گروه شاهد نسبت به مورد بیشتر بود و این اختلاف میانگین، از لحاظ آماری معنی‌دار بود ($P < ۰/۰۵۰$)؛ در حالی که میزان بقای سلولی در دو گروه، اختلاف معنی‌داری را نشان نداد.

نتیجه‌گیری: در مجموع، می‌توان دریافت استروژن سبب کاهش بیان نشانگرهای عصبی می‌شود. با این حال، جهت تعیین تأثیر استروژن بر تمایز عصبی سلول‌های بنیادی، پیشنهاد می‌شود این مطالعه به صورت گسترده‌تر و با استفاده از تکنیک‌های حساس‌تری بررسی گردد.

واژگان کلیدی: استروژن، نورون‌زایی، سلول‌های بنیادی مشتق از چربی، Reverse transcription polymerase chain reaction

ارجاع: رضوی شهناز، احمدی نفیسه، کاظمی محمد، صادقیان حمیدرضا. **بررسی تأثیر استروژن بر میزان بیان نشانگرهای عصبی در طی تمایز نوروژنیک سلول‌های بنیادی مشتق از چربی.** مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۳۹۴؛ ۳۳ (۳۴۵): ۱۲۴۹-۱۲۳۹

۱- استاد، گروه علوم تشریحی و بیولوژی مولکولی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
۲- کارشناس ارشد، گروه زیست‌شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات تهران، تهران، ایران
۳- دانشجوی دکتری، گروه ژنتیک، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
۴- دانشجوی پزشکی، دانشکده‌ی پزشکی و کمیته‌ی تحقیقات دانشجویی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
نویسنده‌ی مسؤول: دکتر شهناز رضوی
Email: razavi@med.mui.ac.ir

مقدمه

از مدت‌ها پیش مشخص شده است که قدرت بازسازی سیستم عصبی، بسیار اندک است و اگر چه نروژنز در سراسر دوره‌ی زندگی انسان و گونه‌های مختلف صورت می‌گیرد، اما به علت محدودیت تعداد سلول‌های بنیادی عصبی قابل دسترس در سیستم عصبی پس از تولد، به کارگیری پیوند سلول‌های بنیادی نرونی، زمینه‌ی مناسبی جهت بهبود عملکرد اعصاب در بیماری‌های نرودژنراتیو و ضایعات عصبی فراهم نموده است (۱).

هم اکنون، سلول‌های بنیادی مزانشیمی که از مغز استخوان (۲) و سایر بافت‌ها (۴-۳) جداسازی می‌شوند، ظرفیت تمایز به انواع رده‌های مختلف سلولی را دارند و علاوه بر این که قابلیت تمایز به سلول‌های استئوبلاست، آدیپوسیت و کندروسیت را دارند (۵)، به بافت عصبی که از مشتقات اکتودرم است (۷-۶) و همچنین، هپاتوسیت از مشتقات اندودرم، تمایز می‌یابند (۹-۸).

با توجه به مطالعات اخیر، مشخص شده است که سلول‌های بنیادی حاصل از بافت چربی، می‌تواند یک جایگزین مناسب برای سلول‌های بنیادی مشتق از بافت مغز استخوان محسوب شود؛ چرا که این بافت، از طریق لیپوساکشن و روش‌هایی که نسبت به آسپیراسیون از مغز استخوان، کمتر تهاجمی هستند، به دست می‌آید. به علاوه، تعداد سلول‌های بنیادی استخراج شده از این بافت، نسبت به مغز استخوان بسیار بیشتر است (در بافت مغز استخوان به ازای هر ۱۰۰۰۰ سلول، یک سلول بنیادی و در بافت چربی، به ازای هر ۱۰۰ سلول، ۵-۱ سلول بنیادی) (۱۱-۱۰).

افزون بر این، سلول‌های بنیادی مشتق از بافت چربی، ظرفیت تمایز به انواع رده‌ی سلول‌های مزودرمی و غیرمزودرمی را دارند و علاوه بر این که به سهولت در دسترس می‌باشند، سرعت تکثیر بالاتری نسبت به سلول‌های بنیادی مشتق از بافت مغز استخوان دارند. بنابراین، از این بافت می‌توان به تعداد کافی سلول بنیادی استخراج و در موارد کلینیکی استفاده نمود (۱۳-۱۲).

در پژوهش‌های اخیر، محققان با به کارگیری پروتکل‌های مختلف کشت سلولی و استفاده از ترکیبات شیمیایی و غلظت مناسب عوامل رشد، توانسته‌اند تغییرات مورفولوژیک و بیان نشانگرهای عصبی را در سلول‌های تمایز یافته القا نمایند (۱۸-۱۴)، اما تعداد سلول‌های به دست آمده بسیار اندک می‌باشد و در برخی موارد، این سلول‌ها بار دیگر از حالت تمایز خارج می‌شوند (۲۰-۱۹، ۹).

در حال حاضر، مطالعات گسترده‌ای در زمینه‌ی تشخیص و تعیین غلظت مناسب عوامل رشد القای تمایز عصبی در شرایط آزمایشگاهی In vitro و حفظ خصوصیات سلول‌های تمایز یافته پس از پیوند در حال انجام است. اغلب این مطالعات، بر روی سلول‌های بنیادی مشتق از بافت مغز استخوان صورت گرفته است و هنوز اطلاعات ما در زمینه‌ی سایر سلول‌های مزانشیمی اندک است.

اثرات استروژن به عنوان یک هورمون جنسی بر دستگاه تناسلی مؤنث به خوبی شناخته شده است. علاوه بر این، مشخص شده است که این هورمون در هر دو جنس به عنوان یک عامل نروترفیک جهت تکامل سیستم عصبی ضروری است (۲۳-۲۱). استرادیول‌ها، از بدو تکامل سیستم عصبی تا هنگام بلوغ در بافت مغز مهره‌داران وجود دارند و میزان

تمایز عصبی، بقا و تغییر شکل‌پذیری (Plasticity) نرون‌ها را تحت تأثیر قرار می‌دهند (۲۶-۲۱).

شواهد موجود حاکی از آن است که استروژن، بر عملکرد سلول‌های پیش‌ساز عصبی و به طور کلی نروژنز مؤثر است؛ به طوری که در جوندگان، فعالیت آنزیم آروماتاز که در بیوسنتز استروژن شرکت دارد، طی مرحله‌ی امبریونیک به حداکثر میزان خود می‌رسد (۲۷). به علاوه، مشخص شده است که در شرایط آزمایشگاه مصرف ۱۷- بتا استرادیول (E۲ یا Estradiol۲) سبب افزایش پرولیفراسیون سلول‌های پیش‌ساز عصبی می‌گردد و در صورت بلوک نمودن گیرنده‌های استروژن، میزان پرولیفراسیون سلول‌های پیش‌ساز عصبی کاهش می‌یابد (۲۸).

در موش‌هایی که گیرنده‌ی ER۲ (Estrogen receptor۲) مغز آن‌ها Knockout شده است، تعداد سلول‌های عصبی به خصوص در کورتکس مغز، کاهش می‌یابد (۲۹).

این گزارش‌ها نشان می‌دهد که در بدن E۲ طی تکامل کورتکس مغز به عنوان یک عامل پرولیفراسیون عمل می‌نماید. همچنین، از مدت‌ها قبل مشخص شده است که استروژن، می‌تواند به عنوان یک عامل حفاظت از بافت عصبی (Neuroprotective) در هنگام ترمیم آسیب‌های مغزی عمل نماید؛ به طوری که پس از ایجاد ضایعات عصبی بیان آنزیم سازنده‌ی استروژن، آروماتاز در سلول‌های آستروسیت (در رت) و سلول‌های رادیال گلیال (در پرندگان) مشاهده می‌شود (۳۰، ۲۸).

طی مطالعات متعددی مشخص شده است که در اطراف نواحی ضایعات عصبی، افزایش تولید استروژن با نروژنز همراه است (۳۲-۳۱) و استرادیول باعث پیشبرد نروژنز به دنبال حملات ایسکمی می‌گردد (۳۳). بنابراین، می‌توان نتیجه گرفت که استروژن طی نروژنز در مراحل امبریونیک و بلوغ، همچنین هنگام ترمیم بافت عصبی به صورت یک عامل تنظیم کننده عمل می‌نماید.

از دیگر سو، مشخص شده است که در موش، E۲ سبب تحریک تشکیل و طویل شدن زواید نرونی در نرون‌های کورتکس مغز کشت شده در آزمایشگاه، می گردد (۳۴)؛ به طوری که استرادیول (E۲)، از طریق تغییر فعالیت نسخه‌برداری سبب افزایش سطح نروتروفین‌های ضروری جهت طویل شدن زواید نرونی و تغییر شکل‌پذیری نرون‌ها می‌شود. در موش، E۲ سبب تحریک تولید عامل نروتروفین مشتق از سلول‌های گلیال (GDNF یا Glial cell line-derived neurotrophic factor) در نرون‌های موجود در هیپوتالاموس در حال رشد می‌گردد (۳۵).

به علاوه، E۲ در موشی که تخمدان آن برداشته شده است، سبب افزایش سطح عوامل رشد BDNF (Brain-derived neurotrophic factor)، NGF (Nerve growth factor) و NT-۳ (Neurotrophins-۳) در کورتکس مغز می‌شود (۳۶). حتی برخی از محققان معتقدند، مصرف E۲ علاوه بر این که در بهبود یادگیری و حافظه مؤثر است، می‌تواند در درمان بیماری آلزایمر سودمند باشد و در جلوگیری از حملات مغزی و سکته‌ی قلبی اهمیت دارد (۳۹-۳۷).

در سال‌های گذشته، Kang و همکاران گزارش نمودند که سلول‌های بنیادی مشتق از بند ناف، قابلیت تمایز به انواع سلول‌های رده‌ی مزانشیمی و نرونی را دارد و اضافه نمودن E۲ به محیط کشت، نه تنها تمایز

نرونی حاصل از سلول‌های بنیادی امبریونیک و سلول‌های بنیادی عصبی را افزایش می‌دهد؛ بلکه در تمایز نرونی سلول‌های بنیادی مشتق از طناب نافی نیز مؤثر است (۴۰).

با توجه به اثرات بارز استروژن بر تکامل و عملکرد عصبی و این که تاکنون تأثیر آن بر تمایز عصبی سلول‌های بنیادی مشتق از چربی بررسی نشده است؛ از این رو، در این مطالعه تأثیر استروژن بر سلول‌های بنیادی مشتق از بافت چربی که تحت شرایط خاص به سلول‌های عصبی تمایز می‌یابند، مورد بررسی قرار گرفت و وضعیت بیان نشانگر نورون بالغ (MAP۲ یا Microtubule-associated protein۲)، نشانگر سلول‌های گلیال (Glial fibrillary acidic protein یا GFAP) و Nestin (نشانگر سلول‌های پیش‌ساز عصبی) از طریق تکنیک RT-PCR (Reverse transcription polymerase chain reaction) ارزیابی می‌گردد.

روش‌ها

جداسازی سلول‌های بنیادی مزانشیمی از بافت چربی مطابق دستورالعمل مطالعات پیشین صورت گرفت (۴۱). پس از اخذ رضایت‌نامه از بیماران مراجعه کننده جهت عمل جراحی،بافت چربی زیر جلدی تهیه و سپس با PBS (Gibco) (Phosphate-buffered saline) جهت حذف بقایای سلولی و سلول‌های خونی شستشو داده شدند. در ادامه، با استفاده از تیغ تیز، تجزیه‌ی مکانیکی انجام گرفت. سپس کلاژناز نوع I (سیگما) به نمونه اضافه شد و پس از ۳۰ دقیقه، اثر کلاژناز با استفاده از محیط کشت DMEM (Gibco) (Dulbecco's modified Eagle's medium) حاوی FBS (Fetal bovine serum) خنثی گردید. پس از سانتریفوژ و تخلیه‌ی محیط رویی، رسوب سلولی در محیط کشت حل گردید.

سوسپانسیون سلولی در فلاسک T۲۵ حاوی DMEM و سرم در شرایط ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد و CO_2 ۵ درصد کشت داده شد و محیط کشت هر ۴-۳ روز یک بار تعویض گردید.

سلول‌های بنیادی در محیط پیش القایی DMEM/F۱۲ فاقد سرم و حاوی ۲۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر bFGF (Basic fibroblast growth factor)، ۲۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر (Epidermal growth factor) EGF و B۲۷ ۲ درصد کشت داده شد. پس از یک هفته، تجمعات سلولی نروسفر تشکیل شد، سپس جهت القا و تمایز نهایی، این سلول‌ها به محیط کشت نوروبازال منتقل شدند (به عنوان گروه شاهد). در گروه مورد، استرادیول E۲ (سیگما) با دوز ۱۰ نانومول تا انتهای دوره‌ی تمایز روزانه به محیط کشت اضافه گردید.

برای ارزیابی میزان بقا و تکثیر سلولی، در کشت سلول‌های در حال تمایز که به آن استروژن اضافه شده بود، ارزیابی MTT (diphenyl tetrazolium bromide ۲،۵ assay) ۳(۴،۵- dimethyl thiazol-۲-yl) پس از تیمار استروژن در دو گروه مورد و شاهد انجام شد. سلول‌های تمایز یافته با PBS شسته شدند و آزمایش MTT انجام شد. ۲×۱۰^۳ سلول در چاهک‌های پلیت ۹۶ خانه در محیط القا کاشته شدند و گروه مورد در حضور ۱۰ نانومول استروژن تمایز یافتند. پس از ۷ روز از تمایز، محیط کشت تخلیه و ۱۰۰ میکرولیتر

از DMEM/F۱۲ و ۱۰ میکرولیتر از محلول MTT به هر کدام از چاهک‌ها اضافه شد و به مدت ۴ ساعت در انکوباتور قرار گرفت. سپس محلول MTT از محیط کشت حذف شد و ۱۰۰ میکرولیتر از محلول DMSO (Dimethyl sulfoxide) به چاهک اضافه گردید. پس از پیپتینگ، میزان جذب هر کدام از چاهک‌ها در طول موج ۵۴۰ نانومتر توسط میکروپلیت ریدر اندازه‌گیری شد.

در این مطالعه، از تکنیک RT-PCR جهت بررسی بیان Nestin (نشانگر سلول‌های پیش‌ساز عصبی)، MAP۲ (نشانگر سلول‌های عصبی بالغ)، GFAP (نشانگر سلول‌های گلیال) در سلول‌های حاصل از تمایز در دو گروه مورد و شاهد استفاده شد. در این مطالعه، (Glyceraldehyde ۳–phosphate dehydrogenase) GAPDH به عنوان Housekeeping gene استفاده شد. به منظور جداسازی RNA از کیت جداسازی RNA isolation RNX plus (CinnaGen) استفاده شد. جهت سنتز cDNA (complementary DNA) با استفاده از روند نسخه‌برداری معکوس، رشته‌ی DNA از الگوی RNA ساخته شد. بدین منظور، از پرایمرهای الیگو و کیت (Fermentage) RevertAid™ First strand cDNA synthesis kit استفاده شد.

بعد از ران نمودن روی ژل آگارز و مشاهده و عکس‌برداری باند بیان نشانگرهای پیش‌گفته در گروه‌های مختلف، از طریق نرم‌افزار Image J با یکدیگر مقایسه می‌گردد. یافته‌های مربوط، در جدول ۱ آمده است.

یافته‌ها

مورفولوژی سلول‌های بنیادی مشتق از بافت چربی

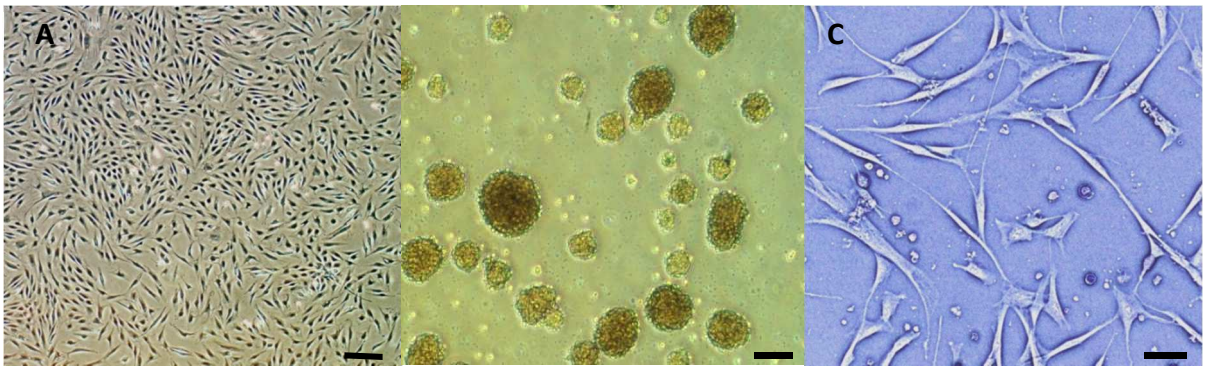
سلول‌های بنیادی جداسازی شده از بافت چربی، به کف فلاسک چسبیده و تکثیر شدند. این سلول‌ها، مورفولوژی دوکی شکل و فیبروبلاست مانند داشتند (تصویر A ۱).

از سلول‌های پاساژ ۵–۳ جهت القای عصبی استفاده شد. القای تمایز عصبی در دو مرحله انجام گرفت. ابتدا با قرار دادن سلول‌های بنیادی در محیط پیش القای توده‌های کروی شکلی که در محیط به صورت شناور بودند، به نام نروسفر تشکیل شدند (تصویر B ۱).

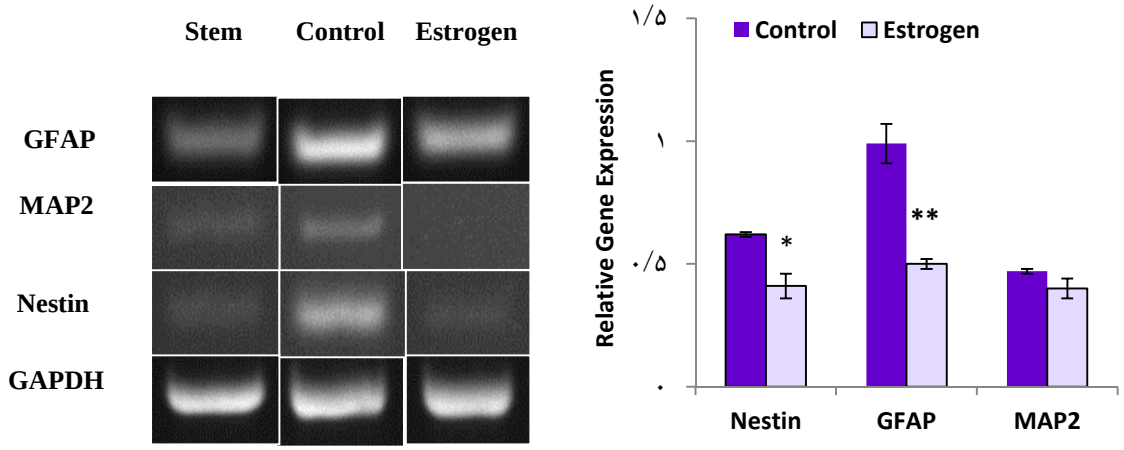
جدول ۱. لیست پرایمرهای مورد استفاده در این مطالعه

نام ژن	توالی پرایمرها	اندازه‌ی محصول
GFAP	'۳'-CCTCTCCCTGGCTCGAATG-۵F- '۳'-GGAAGCGAACCTTCTCGATGTA-۵R-	۱۶۱ bp
Nestin	'۳'-AACAGCGACGGAGGTCTCTA-۵F- '۳'-TTCTCTTGTCCCGCAGACTT-۵R-	۲۲۰ bp
MAP۲	'۳'-TCAGAGGCAATGACCTTACC-۵F- '۳'-GTGGTAGGCTCTTGGTCTTT-۵R-	۳۲۱ bp
GAPDH	'۳'-GGGCTGCTTTTAACTCTGGT-۵F- '۳'-GCAGGTTTTTCTAGACG-۵R-	۶۸۰ bp

GFAP: Glial fibrillary acidic protein; MAP2: Microtubule-associated protein2; GAPDH: Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase



شکل ۱. تصاویر میکروسکوپ مرحله‌ی کنتراست از سلول‌های بنیادی مشتق از چربی (A)، تشکیل توده‌های کروی نوروسفر (B)، تمایز نهایی سلول‌های شبه عصبی (C)



شکل ۲. مقایسه‌ی باندهای حاصل از تکنیک RT-PCR و مقایسه‌ی نیمه‌ی کمی باندهای نشانگرهای MAP۲، GFAP و Nestin در سلول‌های بنیادی، سلول‌های تمایز یافته در گروه شاهد و مورد. میزان بیان نشانگرهای GFAP و Nestin به طور معنی‌دار در گروه مورد نسبت به گروه شاهد کاهش معنی‌دار نشان می‌دهد (*P < ۰/۰۵۰، **P < ۰/۰۱۰).

RT-PCR: Reverse transcription-polymerase chain reaction; GFAP: Glial fibrillary acidic protein; MAP2: Microtubule-associated protein2; GAPDH: Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase

سپس سلول‌های منفرد حاصل از نروسفرها در محیط القای تمایز نهایی به صورت سلول‌های کشیده و دارای زواید متعدد شبیه سلول‌های عصبی در کف فلاسک مشاهده شد. این سلول‌ها، از طریق زوایدشان با یکدیگر ارتباط داشتند (تصویر C ۱).

MTT assay

پس از جمع‌آوری داده‌ها، آنالیز با استفاده از آزمون ANOVA (Analysis of variance) انجام گرفت. یافته‌های حاصل از ارزیابی MTT نشان داد که میانگین میزان بقای سلولی در گروه شاهد ۰/۰۵ ± ۰/۴۶ و در گروه مورد ۰/۰۹ ± ۰/۵۶ بود که این اختلاف میانگین، از لحاظ آماری معنی‌دار نبود. بنابراین، استروژن باعث افزایش تکثیر سلولی می‌شود؛ اگر چه از لحاظ آماری این افزایش معنی‌دار نبود.

تکنیک RT-PCR

همان‌طور که در تصویر ۲ مشاهده می‌شود، میانگین بیان نشانگر Nestin در گروه شاهد نسبت به گروه

مورد بیشتر بود و این اختلاف میانگین، معنی‌دار بود (P < ۰/۰۵۰). به علاوه، میانگین بیان نشانگر GFAP در گروه مورد نسبت به گروه شاهد کمتر بود و این اختلاف میانگین نیز از لحاظ آماری معنی‌دار بود (P < ۰/۰۱۰)؛ در حالی که بیان نشانگر MAP۲ در گروه مورد با این که نسبت به گروه شاهد کاهش داشته است؛ اما این اختلاف، از لحاظ آماری معنی‌دار نیست (P = ۰/۱۶۰).

بحث

استروژن یکی از مهم‌ترین هورمون‌هایی است که اثرات مختلفی بر بافت‌های بدن به ویژه بافت‌های عصبی دارد. استروژن، همچنین در روند تمایز جنینی نقش مهمی دارد و می‌تواند بر تکامل ساختار مغز و همچنین حالات، ادراک و احساسات تأثیر مختلفی داشته باشد.

با توجه به سهو لت دستیابی به سلول‌های بنیادی حاصل از بافت چربی نسبت به سایر منابع سلول‌های بنیادی مانند مغز استخوان، در صورتی که از این سلول‌ها در حضور استروژن تمایز بیشتر نرونی به دست آید، می‌توان از نرون‌های تمایز یافته، در پیوند اتولوگ بیماری‌های عصبی دژنراتیو خاص مانند بیماری پارکینسون و ضایعات نخاعی استفاده نمود. در این مطالعه، تأثیر استروژن بر سلول‌های بنیادی مشتق از بافت چربی که تحت شرایط خاص به سلول‌های عصبی تمایز می‌یابد، بررسی شد و میزان تمایز عصبی از طریق بیان نشانگرهای مختلف عصبی از طریق تکنیک RT-PCR ارزیابی گردید. در این مطالعه، مشخص شد اگر چه استروژن می‌تواند سبب کاهش بیان نشانگرهای Nestin و GFAP شود و این کاهش نیز از نظر آماری معنی‌دار می‌باشد؛ اما کاهشی که در بیان نشانگر MAP۲ در گروه مورد مشاهده می‌شود، چشمگیر نیست و از لحاظ آماری معنی‌دار نمی‌باشد.

در مطالعه‌ای که Brannvall و همکاران انجام دادند، اثر ۱۷- بتا استرادیول را در میزان پرولیفراسیون سلول‌های بنیادی عصبی جنینی و بالغین بررسی و مشاهده نمودند که در گروه مورد، میزان تولید سلول‌های بنیادی عصبی کاهش یافت که این کاهش در سلول‌های بنیادی عصبی که از مغز فرد بالغ استخراج شده بود، بیشتر بود. در این مطالعه، علاوه بر عامل رشد EGF در گروه مورد، میزان ۱۰ نانومول ۱۷- بتا استرادیول هم اضافه شده بود. همچنین، این مطالعه نشان داد که ۱۷- بتا استرادیول می‌تواند میزان تکثیر سلول‌های نورون بالغ را نسبت به سلول‌های گلیال حاصل از تمایز سلول‌های بنیادی عصبی جنینی افزایش دهد. نتایج این تحقیق همچنین نشان داد که استروژن از طریق گیرنده‌های خود می‌تواند بر تکثیر و تمایز سلول‌های بنیادی عصبی تأثیر گذارد (۳۴).

در مطالعه‌ی Wang و همکاران، مشخص گردید ماده‌ی Allopregnanolone که یک نورواستروئید می‌باشد، تولید سلول عصبی را در نورون‌های هیپوکامپ جنینی در محیط آزمایشگاهی افزایش می‌دهد و این اثر وابسته به دوز است. همچنین نشان داده شد که دوز ۵۰۰-۱۰۰ نانومول Allopregnanolone به صورت قابل توجهی تعداد سلول‌های تکثیر یافته (Brdu مثبت) را افزایش می‌دهد؛ در حالی که دوزهای بیشتر از ۱۰۰۰ نانومول باعث کاهش می‌شوند (۴۲).

در مطالعه‌ی Okada و Kai، اثر ۱۷- بتا استرادیول بر میزان پرولیفراسیون و تمایز سلول‌های بنیادی موش

ارزیابی شـــد. در این مطالعه، ســـلول‌های بنیادی از ناحیه‌ی تلانسفال موش‌ها در روز ۱۵ جنینی به دست آمده بود و از FGF-۲ نیز به عنوان یک عامل میتوژن در تحریک تکثیر سـلول‌های بنیادی استفاده شد. آن‌ها دریافتند که استروژن در غیاب FGF-۲ می‌تواند منجر بـه تحریـک نوروژنز در ســـلول‌های بنیادی شـــود. همچنین، در این مطالعه نشـان داده شـد که اسـتروژن نسـبت سـلول‌های گلیال را به کل سـلول‌ها افزایش می‌دهد؛ هر چند این نسـبت هنگام اسـتفاده از عامل رشـــد مشـــتـق از پـلاکـت (PDGF یـا Platelet-derived growth factor) و یـا نوروتروپین ۳ تغییر نکرد (۴۳).

در مطـالعـه‌ی دیگری کـه توســط Sekiguchi و همکاران انجام شـــد، تأثیر اســـتروژن بر ســـلول‌های **بنیادی** عصبی بررسی شد. سلول‌های بنیادی عصبی از مغز اسـتخراج و به عصب سیاتیک آسیب دیده منتقل شد. به علاوه، به یک گروه استروژن داده شد و گروه دیگر بـدون اســـتروژن بودند. در گروهی که به آن‌ها اســـتروژن داده شـــده بود، به طور معنی‌داری عصـــب بهبود یافت. آنان گزارش نمودند که اســـتروژن باعث تکثیر و تمایز سلول‌های بنیادی عصبی می‌شود (۴۴).

بـا توجـه بـه مطالعات انجام گرفته در این زمینه، می‌توان دریافت که اختلاف در نتایج ناشی از نوع سلول، دوز مصرفی و مدت زمان مورد مطالعه می‌باشد.

در مجموع، می‌توان دریافت اگر چه در این مطالعه استروژن موجب کاهش بیان نشانگر سلول‌های عصبی بالغ گردید، اما این تغییرات چندان واضـح و مشخص نبود. از این رو، پیشـنهاد می‌شـود اثرات اسـتروژن با اســـتفـاده از تکنیک‌های دیگر و به طور گســـترده‌تر بررسی گردد.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه علوم پزشـکی اصـفهان که در زمینه‌ی انجام طرح پژوهشی حاضـــر (به شـــماره‌ی ۱۸۷۱۲۸) مســـاعدت نمودند، تشکر و قدردانی به عمل می‌آید.

References

1. Barami K, Hao HN, Lotoczky GA, Diaz FG, Lyman WD. Transplantation of human fetal brain cells into ischemic lesions of adult gerbil hippocampus. J Neurosurg 2001; 95(2): 308-15.
2. Friedenstein AJ, Chailakhyan RK, Latsinik NV, Panasyuk AF, Keiliss-Borok IV. Stromal cells responsible for transferring the microenvironment of the hemopoietic tissues. Cloning in vitro and retransplantation in vivo. Transplantation 1974; 17(4): 331-40.
3. Noth U, Osyczka AM, Tuli R, Hickok NJ, Danielson KG, Tuan RS. Multilineage mesenchymal differentiation potential of human trabecular bone-derived cells. J Orthop Res 2002; 20(5): 1060-9.
4. da Silva ML, Chagastelles PC, Nardi NB. Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues. J Cell Sci 2006; 119(Pt 11): 2204-13.
5. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. Science 1999; 284(5411): 143-7.
6. 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(2): 247-56.
7. Grove JE, Bruscia E, Krause DS. Plasticity of bone marrow-derived stem cells. Stem Cells 2004; 22(4): 487-500.
8. Petersen BE, Bowen WC, Patrene KD, Mars WM, Sullivan AK, Murase N, et al. Bone marrow as a potential source of hepatic oval cells. Science 1999; 284(5417): 1168-70.
9. Jiang Y, Jahagirdar BN, Reinhardt RL, Schwartz RE, Keene CD, Ortiz-Gonzalez XR, et al. Pluripotency of mesenchymal stem cells

derived from adult marrow. Nature 2002; 418(6893): 41-9.
10. Woodbury D, Schwarz EJ, Prockop DJ, Black IB. Adult rat and human bone marrow stromal cells differentiate into neurons. J Neurosci Res 2000; 61(4): 364-70.
11. 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.
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. Halvorsen YD, Bond A, Sen A, Franklin DM, Lea-Currie YR, Sujkowski D, et al. Thiazolidinediones and glucocorticoids synergistically induce differentiation of human adipose tissue stromal cells: biochemical, cellular, and molecular analysis. Metabolism 2001; 50(4): 407-13.
14. Erickson GR, Gimble JM, Franklin DM, Rice HE, Awad H, Guilak F. Chondrogenic potential of adipose tissue-derived stromal cells in vitro and in vivo. Biochem Biophys Res Commun 2002; 290(2): 763-9.
15. Woodbury D, Reynolds K, Black IB. Adult bone marrow stromal stem cells express germline, ectodermal, endodermal, and mesodermal genes prior to neurogenesis. J Neurosci Res 2002; 69(6): 908-17.
16. Lu P, Blesch A, Tuszynski MH. Induction of bone marrow stromal cells to neurons: differentiation, transdifferentiation, or artifact? J Neurosci Res 2004; 77(2): 174-91.
17. Croft AP, Przyborski SA. Formation of neurons by non-neural adult stem cells: potential mechanism implicates an artifact of growth in culture. Stem Cells 2006; 24(8): 1841-51.
18. Dezawa M, Kanno H, Hoshino M, Cho H, Matsumoto N, Itokazu Y, et al. Specific induction of neuronal cells from bone marrow stromal cells and application for autologous transplantation. J Clin Invest 2004; 113(12): 1701-10.
19. Egusa H, Schweizer FE, Wang CC, Matsuka Y, Nishimura I. Neuronal differentiation of bone marrow-derived stromal stem cells involves suppression of discordant phenotypes through gene silencing. J Biol Chem 2005; 280(25): 23691-7.
20. Jiang Y, Henderson D, Blackstad M, Chen A, Miller RF, Verfaillie CM. Neuroectodermal differentiation from mouse multipotent adult progenitor cells. Proc Natl Acad Sci U S A 2003; 100(Suppl 1): 11854-60.
21. Garcia-Segura LM, Azcoitia I, DonCarlos LL. Neuroprotection by estradiol. Prog Neurobiol 2001; 63(1): 29-60.
22. Garcia-Segura LM, Veiga S, Sierra A, Melcangi RC, Azcoitia I. Aromatase: a neuroprotective enzyme. Prog Neurobiol 2003; 71(1): 31-41.
23. Saravia FE, Beauquis J, Revsin Y, Homo-Delarche F, de Kloet ER, de Nicola AF. Hippocampal neuropathology of diabetes mellitus is relieved by estrogen treatment. Cell Mol Neurobiol 2006; 26(4-6): 943-57.
24. Brann DW, Dhandapani K, Wakade C, Mahesh VB, Khan MM. Neurotrophic and neuroprotective actions of estrogen: basic mechanisms and clinical implications. Steroids 2007; 72(5): 381-405.
25. Suzuki S, Brown CM, Wise PM. Mechanisms of neuroprotection by estrogen. Endocrine 2006; 29(2): 209-15.
26. Toran-Allerand CD. Minireview: A plethora of estrogen receptors in the brain: where will it end? Endocrinology 2004; 145(3): 1069-74.
27. Lephart ED. A review of brain aromatase cytochrome P450. Brain Res Brain Res Rev 1996; 22(1): 1-26.
28. Martinez-Cerdeno V, Noctor SC, Kriegstein AR. Estradiol stimulates progenitor cell division in the ventricular and subventricular zones of the embryonic neocortex. Eur J Neurosci 2006; 24(12): 3475-88.
29. Jin K, Wang X, Xie L, Mao XO, Zhu W, Wang Y, et al. Evidence for stroke-induced neurogenesis in the human brain. Proc Natl Acad Sci U S A 2006; 103(35): 13198-202.
30. Yague JG, Munoz A, de Monasterio-Schrader P, Defelipe J, Garcia-Segura LM, Azcoitia I. Aromatase expression in the human temporal cortex. Neuroscience 2006; 138(2): 389-401.
31. Wiltrout C, Lang B, Yan Y, Dempsey RJ, Vemuganti R. Repairing brain after stroke: a review on post-ischemic neurogenesis. Neurochem Int 2007; 50(7-8): 1028-41.
32. Leker RR, Soldner F, Velasco I, Gavin DK, Androutsellis-Theotokis A, McKay RD. Long-lasting regeneration after ischemia in the cerebral cortex. Stroke 2007; 38(1): 153-61.
33. Suzuki S, Gerhold LM, Bottner M, Rau SW, Dela CC, Yang E, et al. Estradiol enhances neurogenesis following ischemic stroke through estrogen receptors alpha and beta. J Comp Neurol 2007; 500(6): 1064-75.
34. Brannvall K, Korhonen L, Lindholm D. Estrogen-receptor-dependent regulation of neural stem cell proliferation and differentiation. Mol Cell Neurosci 2002; 21(3): 512-20.
35. Ivanova T, Karolczak M, Beyer C. Estradiol stimulates GDNF expression in developing hypothalamic neurons. Endocrinology 2002; 143(8): 3175-8.

36. Bimonte-Nelson HA, Nelson ME, Granholm AC. Progesterone counteracts estrogen-induced increases in neurotrophins in the aged female rat brain. Neuroreport 2004; 15(17): 2659-63.
37. Paganini-Hill A, Henderson VW. Estrogen deficiency and risk of Alzheimer's disease in women. Am J Epidemiol 1994; 140(3): 256-61.
38. Hurn PD, Macrae IM. Estrogen as a neuroprotectant in stroke. J Cereb Blood Flow Metab 2000; 20(4): 631-52.
39. Lafferty FW, Fiske ME. Postmenopausal estrogen replacement: a long-term cohort study. Am J Med 1994; 97(1): 66-77.
40. Kang JH, Lee CK, Kim JR, Yu SJ, Jo JH, Do BR, et al. Estrogen stimulates the neuronal differentiation of human umbilical cord blood mesenchymal stem cells (CD34-). Neuroreport 2007; 18(1): 35-8.
41. Razavi S, Mardani M, Kazemi M, Esfandiari E, Narimani M, Esmaeili A, et al. Effect of leukemia inhibitory factor on the myelinogenic ability of Schwann-like cells induced from human adipose-derived stem cells. Cell Mol Neurobiol 2013; 33(2): 283-9.
42. Wang JM, Johnston PB, Ball BG, Brinton RD. The neurosteroid allopregnanolone promotes proliferation of rodent and human neural progenitor cells and regulates cell-cycle gene and protein expression. J Neurosci 2005; 25(19): 4706-18.
43. Okada A, Kai O. Effects of estradiol-17beta and bisphenol A administered chronically to mice throughout pregnancy and lactation on the male pups' reproductive system. Asian J Androl 2008; 10(2): 271-6.
44. Sekiguchi H, Ii M, Jujo K, Thorne T, Ito A, Klyachko E, et al. Estradiol promotes neural stem cell differentiation into endothelial lineage and angiogenesis in injured peripheral nerve. Angiogenesis 2013; 16(1): 45-58.

Journal of Isfahan Medical School
Received: 09.04.2015
Vol. 33, No. 345, 1st Week, October 2015
Accepted: 07.06.2015

Effects of Estrogen on the Expression of Neural Markers in Differentiated Adipose-Derived Stem Cells

Shahnaz Razavi PhD[1], Nafiseh Ahmadi MSc[2], Mohammad Kazemi MSc[3], Hamid Reza Sadeghian[4]

Original Article

Abstract

Background: Over the past decade, researchers have used the existing knowledge about pathways messaging protocols to successfully stimulate stem cells to generate neurons. Due to the ease of access to adipose tissue-obtained stem cells rather than other sources, whereas estrogen factor could be used to improve neural differentiation, antilogous transplantation of differentiated neurons would be widely used for certain degenerative neurological diseases such as Parkinson's disease and spinal cord injuries. The purpose of this study was to evaluate the effect of estrogen on expression of microtubule-associated protein-2 (MAP2), glial fibrillary acidic protein (GFAP) and Nestin markers.

Methods: After the isolation of stem cells from adipose tissue, the neural induction was carried out through neurosphere construction; then, final differentiation of the cells was performed. Neurosphere-singed cell were transferred to neural induction medium (control group). In the estrogen-treated group, estrogen was added to the culture medium until the end of the day of distinction. Then, evaluation of the expression of neural markers, was performed using reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) technique. In addition, MTT assay [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] was performed to assess cell viability.

Findings: The mean expression of GFAP and Nestin markers were down regulated in treated group compared to controls ($P < 0.05$). The difference between the mean of MAP2 expression was not significant between the two groups. In addition, the difference between the mean of cell viability was not significant between two groups, too.

Conclusion: In this study, we found that estrogen can decrease the expression of neuronal markers. However, to determine the effect of estrogen on neurogenic differentiation of stem cells, next studies should be done broader using other precise techniques.

Keywords: Estrogen, Neurogenesis, Adipose-derived stem cell, Reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR)

Citation: Razavi Sh, Ahmadi N, Kazemi M, Sadeghian HR. **Effects of Estrogen on the Expression of Neural Markers in Differentiated Adipose-Derived Stem Cells.** J Isfahan Med Sch 2015; 33(345): 1239-49

1- Professor, Department of Anatomical Sciences and Molecular Biology, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
2- Department of Biology, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran
3- PhD Student, Department of Genetics, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
4- Student of Medicine, School of Medicine AND Student Research Committee, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
Corresponding Author: Shahnaz Razavi PhD, Email: razavi@med.mui.ac.ir