

بررسی اثر رزمارینیک اسید در القای تمایز عصبی در سلول‌های بنیادی ژله‌ی وارتون

محسن سلمانوندی^۱، شبنم کرمانی^۲، اکرم علیزاده^۳

مقاله پژوهشی

چکیده

مقدمه: رزمارینیک اسید، یک ترکیب فنولی است که خاصیت حفاظت عصبی دارد و در بهبود بیماری‌های سیستم عصبی مانند پارکینسون و آلزایمر تأثیر مثبتی داشته است. همچنین، باعث افزایش بیان عوامل نوروتروفیک نظیر Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) می‌شود و می‌تواند در تمایز سلول‌های بنیادی به عصبی نقش داشته باشد.

روش‌ها: سلول‌های بنیادی ژله‌ی وارتون پس از جداسازی، تأیید و تکثیر، در محیط کشت القا کننده‌ی تمایز عصبی و حاوی رزمارینیک اسید قرار داده شدند. به منظور سنجش سمیت، از آزمون MTT استفاده شد. برای بررسی اثر رزمارینیک اسید بر القای تمایز عصبی در سلول‌های بنیادی ژله‌ی وارتون، پس از ۴ روز بیان ژن‌های Nestin و β -Tubulin III به روش Real-time polymerase chain reaction (Real-time PCR) مورد ارزیابی قرار گرفت.

یافته‌ها: نتایج آزمون MTT نشان داد اختلاف معنی‌داری در بقای سلول‌هایی که در تماس با محیط کشت حاوی رزمارینیک اسید بودند، نسبت به گروه شاهد وجود نداشت ($P < 0/05$). نتایج Real-time PCR نشان داد افزودن رزمارینیک اسید به محیط کشت القا کننده‌ی تمایز عصبی، باعث افزایش بیان ژن‌های Nestin و β -Tubulin III می‌شود ($P < 0/05$).

نتیجه‌گیری: افزایش بیان Nestin و β -Tubulin III در حضور رزمارینیک اسید، می‌تواند نشان دهنده‌ی القای بیشتر تمایز عصبی در سلول‌های بنیادی ژله‌ی وارتون باشد. نتایج به دست آمده، نشان می‌دهد رزمارینیک اسید بر سلول‌های بنیادی ژله‌ی وارتون اثر القا کننده‌ی تمایز عصبی دارد.

واژگان کلیدی: تمایز سلولی، سلول‌های ژله‌ی وارتون، رزمارینیک اسید

ارجاع: سلمانوندی محسن، کرمانی شبنم، علیزاده اکرم. بررسی اثر رزمارینیک اسید در القای تمایز عصبی در سلول‌های بنیادی ژله‌ی وارتون. مجله

دانشکده پزشکی اصفهان ۱۳۹۸؛ ۳۷ (۵۱۹): ۲۴۲-۲۴۸

مقدمه

تکثیر می‌شوند، دیرتر پیر می‌شوند و خواص بنیادی خود را حتی پس از پاساژهای مکرر حفظ می‌کنند (۲). به علاوه، واکنش دستگاه ایمنی نسبت به آن‌ها بسیار کم است و باعث ایجاد تومور نمی‌شوند و با توجه به توانایی تعدیل کنندگی پاسخ‌های سیستم ایمنی، از این سلول‌ها می‌توان در پیوندهای آلورژنیک استفاده کرد (۳).

رزمارینیک اسید، یک گیاه ضد التهابی است که خاصیت آنتی‌اکسیدانی و آنتی‌باکتریایی دارد (۴). این ترکیب فنولی، خاصیت حفاظت از سلول‌های عصبی دارد و در بهبود بیماری‌های سیستم عصبی مانند پارکینسون، آلزایمر و ایسکمی مغزی تأثیر مثبتی داشته است. رزمارینیک اسید، همچنین باعث افزایش بیان عوامل

بیماری‌ها و آسیب‌های سیستم عصبی، به علت عدم وجود ترمیم و بازسازی کافی این سلول‌ها، از مهم‌ترین مشکلات پزشکی هستند. استفاده از سلول‌های بنیادی با توانایی تمایز به سلول‌های عصبی، می‌تواند به کاهش آسیب وارده به سلول‌های بافت عصبی کمک کند (۱). سلول‌های بنیادی ژله‌ی وارتون، سلول‌های بنیادی پرتوانی می‌باشند که ویژگی هر دو نوع سلول بنیادی بالغ و جنینی را دارند. این سلول‌ها، ظاهری شبه فیروبلاست دارند و نسبت به سلول‌های بنیادی مغز استخوان توان تمایزی و قدرت تکثیر بیشتر و توانایی ایجاد کلونی و فعالیت تلومرازی بالاتری دارند و با وجود این که در زمان کوتاه‌تر

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد، دانشکده‌ی مهندسی مواد، واحد نجف‌آباد، دانشگاه آزاد اسلامی، نجف‌آباد، ایران

۲- استادیار، دانشکده‌ی مهندسی مواد، واحد نجف‌آباد، دانشگاه آزاد اسلامی، اصفهان، ایران

۳- استادیار، دانشکده‌ی مهندسی مواد، واحد نجف‌آباد، دانشگاه آزاد اسلامی، اصفهان و گروه مهندسی بافت و علوم سلولی کاربردی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی سمنان، سمنان، ایران

Email: a.alizadeh@semums.ac.ir

نویسنده‌ی مسؤول: اکرم علیزاده

تهیه‌ی رزمارینیک اسید: به منظور تهیه‌ی استوک رزمارینیک اسید، ویال ۱۰ میلی‌گرم رزمارینیک اسید شرکت Sigma Dimethyl sulfoxide (R4033-10MG) در ۵۰۰ میکرولیتر (DMSO) حل شد. غلظت رزمارینیک اسید در استوک تهیه شده، ۵۶ میلی‌مولار بود.

ارزیابی سمیت رزمارینیک اسید: به منظور ارزیابی سمیت رزمارینیک اسید و بقای سلول‌ها، از آزمون 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) استفاده شد. به این منظور، ۵۰۰۰ سلول در پلیت ۹۶ چاهک کشت داده شد. بعد از گذشت یک روز و چسبیدن سلول‌ها به کف چاهک، محیط کشت خارج گردید و محیط کشت حاوی رزمارینیک اسید (غلظت ۵۶ میکرومولار) بر روی سلول‌ها ریخته شد. ۷۲ ساعت بعد، محیط کشت آسپیره شد و با MTT-1 reagent (۰/۵ میلی‌گرم/میلی‌لیتر MTT در PBS) در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۴ ساعت انکوبه شدند. در پایان زمان انکوبه شدن، محیط رویی سلول‌ها خارج و ۱۰۰ میکرولیتر DMSO اضافه گردید و پس از ۲۰ دقیقه انکوباسیون، در طول موج ۵۷۰ نانومتر با استفاده از Microplate Reader Model 680 چگالی نوری اندازه‌گیری شد.

بررسی تأثیر رزمارینیک اسید بر تمایز عصبی سلول‌های بنیادی ژله‌ی وارتون: به منظور بررسی تأثیر رزمارینیک اسید بر القای تمایز عصبی در سلول‌های بنیادی ژله‌ی وارتون، محیط کشت تمایز عصبی با توجه به سایر مطالعات شامل محیط کشت Dulbecco's Modified Eagle medium: Nutrient mixture F-12 Knockout serum replacement (DMEM/F12)، سرم ۱۰ درصد (KSR)، عامل رشد (EGF) Epidermal growth factor (bFGF) ۲۰ نانوگرم/میلی‌لیتر و ۱۰ میلی‌گرم/میلی‌لیتر هپارین تهیه شد. به این محیط تمایز دهنده، رزمارینیک اسید (با غلظت ۵۶ میکرومولار) اضافه گردید. ۴ گروه مورد بررسی، عبارت از سلول بنیادی ژله‌ی وارتون در محیط کشت DMEM/F12، سلول بنیادی ژله‌ی وارتون در محیط تمایز عصبی، سلول بنیادی ژله‌ی وارتون در محیط تمایز عصبی + رزمارینیک اسید و سلول بنیادی ژله‌ی وارتون در محیط کشت DMEM/F12 + رزمارینیک اسید بودند. پس از ۴ روز، سلول‌ها از نظر ریخت‌شناسی با میکروسکوپ فاز کنتراست اینسورت مورد ارزیابی قرار گرفتند. همچنین، Real-time polymerase chain reaction (Real-time PCR) با استفاده از پرایمرهای ژن‌های Nestin، β -Tubulin III و β -actin (به عنوان شاهد داخلی) انجام شد.

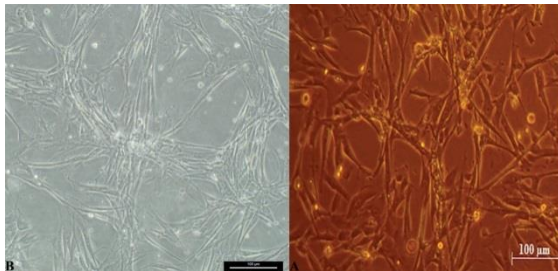
نوروتروفیک یا حفاظت‌کننده‌ی سلول‌های عصبی نظیر هورمون Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) می‌شود که نقش اساسی در پلاستیسیته یا انعطاف‌پذیری سیناپس‌ها و بقا و رشد نورون‌ها دارد (۵). BDNF در القای تمایز عصبی سلول‌های بنیادی تأثیر دارد (۶). به علاوه، در افزایش بیان تیروزین هیدروکسیلاز مؤثر است (۷). BDNF و تیروزین هیدروکسیلاز، نقش مهمی در تنظیم و سنتز انتقال‌دهنده‌های سیستم عصبی دارند (۸). همچنین، رزمارینیک اسید از کم شدن سطح سیناپتوفیزین جلوگیری می‌کند. سیناپتوفیزین نقش حفاظتی در ایسکمی مغزی دارد و در پیدایش و حیات وزیکول‌های ترشحی، تغییر و تثبیت دیگر پروتئین‌های سیناپسی نقش دارد و در هنگام بازسازی سلول‌های عصبی بیان بیشتری دارد (۵). هدف از انجام این مطالعه، بررسی اثر رزمارینیک اسید در القای تمایز عصبی در سلول‌های بنیادی ژله‌ی وارتون بود.

روش‌ها

جداسازی سلول‌های بنیادی ژله‌ی وارتون: نمونه‌های بندناف تحت شرایط استریل در ظرف حاوی نرمال‌سالین گذاشته و به آزمایشگاه منتقل شد. برای از بین بردن آلودگی‌ها، بندناف با الکل ۷۰ درصد به مدت ۳۰ ثانیه شستشو داده شد. سپس، نمونه‌ی بندناف با Phosphate buffered saline (PBS) حاوی پنی‌سیلین و استرپتومایسین، آمفی‌تریسین و نیز جتتامایسین شستشو داده شدند. بافت ژله‌ی وارتون جدا و به قطعاتی کمتر از ۰/۵ میلی‌متر تقسیم شد. پس از شستشو با PBS، قطعات به محیط کشت کامل (حاوی گلوکز بالا همراه با ۲۰ درصد (FBS) Fetal bovine serum)، ۱ درصد آنتی‌بیوتیک (پنی‌سیلین/استرپتومایسین) منتقل شدند و در انکوباتور دارای ۸۸ درصد رطوبت و ۵ درصد CO_2 و دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد قرار داده شدند. ریخت‌شناسی (Morphology) سلول‌ها زیر میکروسکوپ فاز کنتراست اینسورت بررسی شد. هر سه روز یک بار، محیط کشت تعویض گردید و نمونه‌ها در زمان لازم به کمک آنزیم تریپسین پاساژ داده شدند.

تأیید هویت سلول‌های بنیادی ژله‌ی وارتون: به منظور تأیید هویت سلول‌های بنیادی ژله‌ی وارتون، سلول‌های استخراجی پاساژ سه به لوله‌های مخصوص فلوسایتومتری منتقل شدند و در یک اتاق تاریک، به هر لوله یکی از آنتی‌بادی‌های CD90، CD73، CD105، CD45، CD44 و CD34 اضافه شد و ۶۰-۳۰ دقیقه در دمای اتاق انکوبه شدند. سپس، توسط دستگاه فلوسایتومتری (BD FACSCalibur Bioscience, USA)، میزان سلول‌های دارای هر یک از آنتی‌بادی‌ها بررسی و نتایج با استفاده از نرم‌افزار FlowJo نسخه‌ی ۷,۶,۱ واکاوی گردید.

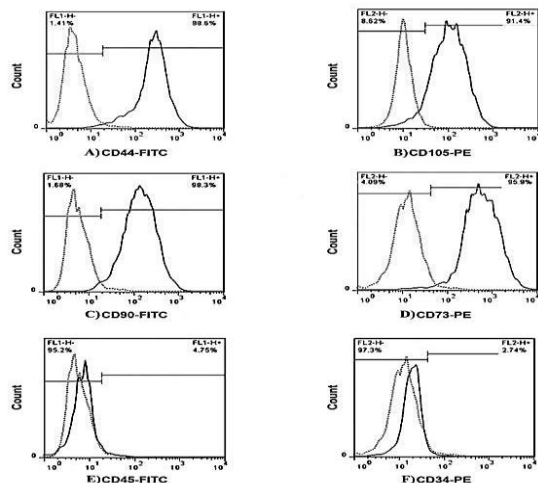
نشان داد از بین نشانگرهای مثبت سلول‌های بنیادی، CD44 با ۹۸/۶ درصد بیشترین بیان را داشته است و سایر نشانگرهای مثبت CD105، CD90 و CD73 به ترتیب ۹۱/۴، ۹۸/۳ و ۹۵/۹ درصد بیان نشان دادند (شکل ۲). همچنین، نشانگرهای منفی یا هماتوپویتیک CD45 و CD34 به ترتیب ۴/۷۵ و ۲/۷۴ درصد بیان داشته‌اند.



شکل ۱. A: ریخت‌شناسی شبه فیروپلاستی سلول‌های بنیادی ژلهی وارتون در محیط کشت Dulbecco's Modified Eagle medium: Nutrient mixture F-12 (DMEM/F12) در سمت راست، B: سلول‌های بنیادی ژلهی وارتون القا شده به سلول‌های عصبی در محیط کشت تمایزی بعد از ۴ روز در سمت چپ

رزمارینیک اسید سمیت سلولی برای سلول‌های بنیادی ژلهی

وارتون ندارد: نتایج آزمایش سمیت با استفاده از MTT نشان داد که اختلاف معنی‌داری در بقا بین سلول‌هایی که در تماس با رزمارینیک اسید بودند، نسبت به گروه شاهد وجود نداشت ($P < 0.05$).



شکل ۲. واکاوی فلوسایتومتری سلول‌های بنیادی ژلهی وارتون شامل A: CD44، B: CD105، C: CD90، D: CD73، E: CD45 و F: CD34

فلورسانس نسبی شدت پراکندگی نور بر روی محور X و تعداد ذرات یا سلول‌ها بر روی محور Y

Nestin FW: ggcttctctcagcatcttgg
 Nestin RV: aaggctggcataggtgtgtc
 β -tubulin III FW: cagagcaagaacagcagctactt
 β -tubulin III RV: gtgaactccatctctgccatgcctc
 β -actin FW: acatcaaggagaagctgtgtctac
 β -actin RV: cttcatgatggagttgaaggtagt

به طور خلاصه، استخراج RNA سلول‌ها طبق دستورالعمل کیت کیازن انجام و غلظت RNA هر نمونه با نانودراپ سنجیده شد. برای سنتز complementary DNA (cDNA) نیز از کیت کیازن طبق شیوه‌نامه‌ی شرکت سازنده استفاده گردید. به منظور انجام Real-time PCR، برای هر ژن یک شاهد منفی در نظر گرفته شد. برای هر نمونه، ۳ تکرار تهیه شد. ترکیب هر نمونه شامل ۱۰ میکرولیتر Syber green، ۱ میکرولیتر Rox، ۰/۷ میکرولیتر primer R، ۰/۷ میکرولیتر primer F، ۶/۴ میکرولیتر Water RNase free و حجم هر واکنش ۲۰ میکرولیتر بود. در شاهد‌های منفی، تمامی ترکیب بالا به جز cDNA وجود داشت. واکنش در دستگاه ABI Step one طبق شیوه‌نامه‌ی شرکت سازنده انجام گرفت. ۴۰ دوره برای هر چرخه‌ی Real-time PCR در نظر گرفته شد. پس از هر Run از PCR صحت هر منحنی تکثیر توسط منحنی Melting و با استفاده از دمای اختصاصی Melt of product که برای هر ژن اختصاصی است، تأیید گردید. میزان بیان ژن هدف (Nestin و β -Tubulin III) نسبت به ژن مرجع (β -actin) با استفاده از فرمول $\Delta\Delta CT$ محاسبه شد. برای تحلیل نتایج حاصل از Real-time PCR نیز داده‌های خام با استفاده از نرم‌افزار REST 2009 (Pfaffl and QIAGEN, Germany) به داده‌های قابل تفسیر تبدیل شد. سپس، با استفاده از آزمون One-way ANOVA، مقایسه‌ی لازم انجام شد. تجزیه و تحلیل داده‌ها با نرم‌افزار SPSS نسخه‌ی ۲۳ (version X, IBM Corporation, Armonk, NY) و رسم نمودار با نرم‌افزار Excel 2016 (Microsoft, Redmond, WA) انجام شد. $P < 0.05$ به عنوان سطح معنی‌داری اختلاف بین میانگین‌ها در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

تأیید هویت سلول‌های بنیادی ژلهی وارتون: اگر چه سلول‌های بنیادی ژلهی وارتون مورد استفاده در این تحقیق، در مطالعه‌ی دیگری به روش بررسی تمایز به دو رده‌ی چربی و استخوان، مورد تأیید هویت قرار گرفته بودند، اما با این وجود، از نظر عوامل سطحی نیز به روش فلوسیتومتری بررسی شدند (۹). نتایج نشان داد این سلول‌ها پس از ۲۴ ساعت به کف فلاسک می‌چسبند و ظاهر شبیه سلول فیروپلاست پیدا می‌کنند (شکل ۱). تجزیه و تحلیل فلوسایتومتری

بنیادی ژله‌ی وارتون در محیط تمایز عصبی حاوی رزمارینیک اسید کشت داده شدند.

بحث

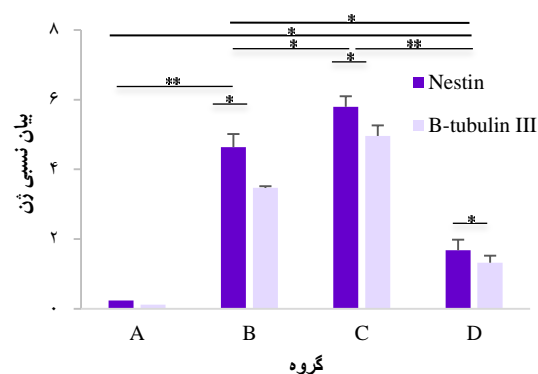
نتایج این مطالعه نشان می‌دهد رزمارینیک اسید، تأثیر مثبتی در القای تمایز عصبی در سلول‌های بنیادی ژله‌ی وارتون دارد. بررسی ریخت‌شناسی سلول‌های بنیادی ژله‌ی وارتون در راستای سایر گزارش‌ها نشان داد این سلول‌ها، مانند سایر سلول‌های مزانشیمی، ظاهر شبیه فیروبلاست پیدا می‌کنند. نتایج فلوسایتومتری نشان داد این سلول‌ها، نشانگرهای سطحی سلول‌های بنیادی مزانشیمی شامل CD90، CD73، CD105 و CD44 را بیان کردند؛ در حالی که نشانگرهای سطحی سلول‌های هماتوپویتیک شامل CD45 و CD34 را بیان نکردند (۹).

Lee و همکاران (۱۰)، تأثیر حفاظتی رزمارینیک اسید در سلول‌های عصبی ترشح‌کننده‌ی دوپامین در برابر آپوپتوز ناشی از پراکسید هیدروژن را مورد ارزیابی قرار دادند. این محققین، با مطالعه‌ی دزهای مختلف، دریافتند که دز ۵۶ میکرومولار رزمارینیک اسید، بیشترین تأثیر حفاظتی را دارد. با در نظر گرفتن این مطالعه، دز ۵۶ میکرومولار رزمارینیک اسید در گروه‌های این مطالعه بررسی شده است. Shang و همکاران (۱۱)، تأثیر حفاظتی رزمارینیک اسید را در آسیب طناب نخاعی بررسی کردند. نتایج مطالعه‌ی آن‌ها نشان داد رزمارینیک اسید، اثر بازدارنده‌ی بر روی سیتوکاین پیش‌تهابی و تولید Nuclear factor kappa (NF-KB) دارد. نقش کلیدی در القای عوامل التهابی و گونه‌های فعال اکسیژن و اکسید نیتریک دارد (۱۲). مطالعه‌ی Mueller و همکاران (۱۳)، نشان داد رزمارینیک اسید باعث افزایش بیان اینترلوکین ۱۰ (IL-10) می‌شود. این افزایش بیان، نسبت به بسیاری از مواد گیاهی مورد بررسی در این مطالعه بیشتر بوده است. IL-10 باعث کاهش عوامل پیش‌تهابی و افزایش عوامل ضد آپوپتوز می‌شود. IL-10 عوامل نوروتروفیک برای نورون‌ها را از طریق گیرنده‌ی آن‌ها فراهم می‌کند. ماکروفاژهای نفوذی به محل آسیب سلول‌های عصبی، می‌توانند فنوتیپ مضر پیش‌تهابی یا مفید ضد التهابی داشته باشند. IL-10 باعث می‌شود ماکروفاژهای نفوذ کرده فنوتیپ ضد التهابی و مفید داشته باشند (۱۴). نتایج حایز اهمیتی در این مطالعات به دست آمده است، اما تاکنون مطالعه‌ی در مورد تأثیر رزمارینیک اسید بر تمایز عصبی سلول‌های بنیادی انجام نشده است.

Nestin و β -Tubulin III از نشانگرهای سلول‌های عصبی هستند. افزایش بیان ژن β -Tubulin III و Nestin، نشان دهنده‌ی تمایز سلول‌های بنیادی ژله‌ی وارتون به سلول‌های عصبی و نقش

رزمارینیک اسید بیان ژن‌های مربوط به القای تمایز عصبی را

افزایش می‌دهد. نتایج بیان کمی ژن Nestin و β -Tubulin III در شکل ۳ نشان داده شده است. سلول‌های بنیادی ژله‌ی وارتون کشت شده در محیط تمایز عصبی، نسبت به محیط کشت DMEM/F12 بیان بالاتری از Nestin و β -Tubulin III داشتند ($P < 0/01$). بیان این دو ژن، هنگامی که سلول‌های بنیادی ژله‌ی وارتون در محیط تمایز عصبی بودند، بالاتر از حالتی است که این سلول‌ها در محیط کشت DMEM/F12 حاوی رزمارینیک اسید بودند ($P < 0/01$). بیان Nestin و β -Tubulin III در سلول‌های بنیادی ژله‌ی وارتون کشت داده شده در محیط کشت DMEM/F12 حاوی رزمارینیک اسید، بیشتر از سلول‌های بنیادی کشت داده شده در محیط DMEM/F12 بود ($P < 0/05$). بیان Nestin و β -Tubulin III در سلول‌های بنیادی ژله‌ی وارتون کشت داده شده در محیط کشت تمایز عصبی حاوی رزمارینیک اسید، بیشتر از هنگامی بود که این سلول‌ها در مجاورت محیط کشت تمایز عصبی بدون رزمارینیک اسید بودند ($P < 0/05$).



شکل ۳. نتایج بیان ژن Nestin و β -Tubulin III در گروه‌های مورد مطالعه بعد از ۴ روز. A: سلول بنیادی ژله‌ی وارتون در محیط کشت Dulbecco's Modified Eagle medium: Nutrient mixture F-12 (DMEM/F12). B: سلول بنیادی ژله‌ی وارتون در محیط تمایز عصبی. C: سلول بنیادی ژله‌ی وارتون در محیط تمایز عصبی + رزمارینیک اسید. D: سلول بنیادی ژله‌ی وارتون در محیط کشت DMEM/F12 + رزمارینیک اسید
 $P < 0/01^{**}$; $P < 0/05^*$

بیان Nestin در سلول بنیادی ژله‌ی وارتون کشت داده شده در محیط تمایز عصبی، محیط تمایز عصبی حاوی رزمارینیک اسید و محیط کشت DMEM/F12 حاوی رزمارینیک اسید، بیشتر از β -Tubulin III بود ($P < 0/05$). بیشترین بیان Nestin و β -Tubulin III نسبت به گروه شاهد هنگامی بود که سلول‌های

که تأثیر BDNF بر آن باعث به دست آمدن این نتایج شده است، می‌توان به PI3K Phosphoinositide 3-kinase، Akt Protein kinase B و Glycogen synthase kinase-3 β (GSK-3 β) اشاره کرد (۱۷).

هنگامی که سلول‌های بنیادی ژله‌ی وارتون در محیط تمایز عصبی همراه با رزمارینیک اسید کشت داده شدند، بیان بالاتری از دو ژن Nestin و β -Tubulin III نسبت به حالتی که سلول‌ها در محیط تمایز عصبی بودند، مشاهده شد. استفاده از این ترکیب گیاهی که می‌تواند در القای تمایز عصبی کمک کند، هم از نظر اقتصادی مقرون به صرفه می‌باشد و هم دارای اثرات مفیدی مانند محافظت‌کنندگی است. اگر چه شاید بتوان با استفاده از دزهای دیگری از این ترکیب، به تنهایی نیز تمایز عصبی را القا نمود. با توجه به ماهیت طبیعی بودن و دیگر اثرات مفید و محافظتی رزمارینیک اسید، استفاده از آن برای القای تمایز عصبی پیشنهاد می‌شود.

تشکر و قدردانی

این مقاله برگرفته از پایان‌نامه‌ی دوره‌ی کارشناسی ارشد مهندسی بافت به شماره‌ی ۱۳۰۶۹۴۲۰۱۰۴۰۱۵ دانشگاه آزاد اسلامی واحد نجف‌آباد می‌باشد. از مسؤولین محترم آزمایشگاه مرکزی دانشگاه علوم پزشکی ایران نیز که امکانات لازم جهت انجام این مطالعه فراهم کردند، سپاسگزاری می‌گردد. در پایان، از زحمات دکتر سید محمدامین حرمشاهی که در انجام این پژوهش همکاری کردند، قدردانی می‌شود.

حمایت‌کنندگی رزمارینیک اسید در القای این تمایز می‌باشد. Nestin و Tubulin III، از نشانگرهای مرسوم برای بررسی تمایز به عصب می‌باشند و مطالعات مختلفی از این ژن‌ها برای بررسی تمایز به عصب استفاده کرده‌اند. برای مثال، قربانی و همکاران (۱۵)، تأثیر داربست سه بعدی حاوی والپروئیک اسید را بر تمایز عصبی سلول‌های بنیادی ژله‌ی وارتون ارزیابی کردند. این محققین، بیان ژن‌های Nestin، Map2 و Neuron specific enolase را در سلول‌های بنیادی ژله‌ی وارتون کشت داده شده درون داربست کامپوزیت سه بعدی نافیبری پلی‌لاکتیک اسید به همراه ۱ میلی‌مول والپروئیک اسید بعد از ۲۱ روز به روش Quantitative reverse transcription-PCR (qRT-PCR) بررسی کردند. مقایسه‌ی نتایج به دست آمده در این مطالعه با مطالعه‌ی قربانی و همکاران، نشان می‌دهد که رزمارینیک اسید به تنهایی، در مقایسه با والپروئیک اسید به تنهایی، در مدت زمان کمتر باعث بیان معنی‌دار ژن Nestin شده است. با توجه به تأثیر رزمارینیک اسید در افزایش بیان BDNF و نقش اساسی BDNF در القای تمایز سلول‌های بنیادی به عصبی (۶) این نتیجه دور از انتظار نبوده است.



در بین ۴ عضو خانواده‌ی نوروتروفین‌ها، BDNF بیشترین عامل رشد موجود در مغز می‌باشد و نقش مهمی در حفظ فرایندهای فیزیولوژیکی مغز دارد. BDNF این تأثیر را به واسطه‌ی گیرنده‌های اختصاصی خود مانند تیروزین کیناز B (Trk-B) می‌گذارد که باعث افزایش تکثیر و تمایز عصبی سلول‌های بنیادی سیستم عصبی می‌شود (۱۶). BDNF، همچنین باعث افزایش رشد جسم سلولی و رشته‌های سلول‌های عصبی می‌شود. از مسیرهای سیگنالینگ اختصاصی دیگر

References

1. Steward MM, Sridhar A, Meyer JS. Neural regeneration. *Curr Top Microbiol Immunol* 2013; 367: 163-91.
2. Allahbakhshi E, Hashemitabar M, Shariati M, Tabandeh MR, Solgi G. Differentiation of the definitive endoderm from Wharton's jelly mesenchymal stem cells (WJMSC). *J Biol Res-Thessalon* 2013; 20: 221-7.
3. Vawda R, Fehlings MG. Mesenchymal cells in the treatment of spinal cord injury: Current and future perspectives. *Curr Stem Cell Res Ther* 2013; 8(1): 25-38.
4. Iswandana R, Pham BT, van Haaften WT, Luangmonkong T, Oosterhuis D, Mutsaers HA, et al. Organ- and species-specific biological activity of rosmarinic acid. *Toxicol In Vitro* 2016; 32: 261-8.
5. Fonteles AA, de Souza CM, de Sousa Neves JC, Menezes AP, Santos do Carmo MR, Fernandes FD, et al. Rosmarinic acid prevents against memory deficits in ischemic mice. *Behav Brain Res* 2016; 297: 91-103.
6. Okada M, Murase K, Makino A, Nakajima M, Kaku T, Furukawa S, et al. Effects of estrogens on proliferation and differentiation of neural stem/progenitor cells. *Biomed Res* 2008; 29(3): 163-70.
7. Hwang ES, Kim HB, Choi GY, Lee S, Lee SO, Kim S, et al. Acute rosmarinic acid treatment enhances long-term potentiation, BDNF and GluR-2 protein expression, and cell survival rate against scopolamine challenge in rat organotypic hippocampal slice cultures. *Biochem Biophys Res Commun* 2016; 475(1): 44-50.
8. Ghaffari H, Venkataramana M, Jalali GB, Chandra NS, Nataraju A, Geetha NP, et al. Rosmarinic acid mediated neuroprotective effects against H₂O₂-induced neuronal cell damage in N2A cells. *Life Sci* 2014; 113(1-2): 7-13.
9. Hosseini A, Estiri H, Akhavan NH, Alizadeh A, Abdolhossein ZB, Ghaderian SMH, et al. Multiple sclerosis gene therapy with recombinant viral vectors: Overexpression of IL-4, leukemia inhibitory factor, and IL-10 in Wharton's jelly stem cells used in EAE Mice Model. *Cell J* 2017; 19(3): 361-74.
10. Lee HJ, Cho HS, Park E, Kim S, Lee SY, Kim CS, et al. Rosmarinic acid protects human dopaminergic

- neuronal cells against hydrogen peroxide-induced apoptosis. *Toxicology* 2008; 250(2-3): 109-15.
11. Shang AJ, Yang Y, Wang HY, Tao BZ, Wang J, Wang ZF, et al. Spinal cord injury effectively ameliorated by neuroprotective effects of rosmarinic acid. *Nutr Neurosci* 2017; 20(3): 172-9.
 12. Umar S, Umar K, Sarwar AH, Khan A, Ahmad N, Ahmad S, et al. *Boswellia serrata* extract attenuates inflammatory mediators and oxidative stress in collagen induced arthritis. *Phytomedicine* 2014; 21(6): 847-56.
 13. Mueller M, Hobiger S, Jungbauer A. Anti-inflammatory activity of extracts from fruits, herbs and spices. *Food Chemistry* 2010; 122(4): 987-96.
 14. Thompson CD, Zurko JC, Hanna BF, Hellenbrand DJ, Hanna A. The therapeutic role of interleukin-10 after spinal cord injury. *J Neurotrauma* 2013; 30(15): 1311-24.
 15. Ghorbani S, Tiraihi T, Soleimani M. Differentiation of mesenchymal stem cells into neuron-like cells using composite 3D scaffold combined with valproic acid induction. *J Biomater Appl* 2018; 32(6): 702-15.
 16. Meng L, Liu B, Ji R, Jiang X, Yan X, Xin Y. Targeting the BDNF/TrkB pathway for the treatment of tumors. *Oncol Lett* 2019; 17(2): 2031-9.
 17. Li XT, Liang Z, Wang TT, Yang JW, Ma W, Deng SK, et al. Brain-derived neurotrophic factor promotes growth of neurons and neural stem cells possibly by triggering the phosphoinositide 3-kinase/AKT/glycogen synthase kinase-3beta/beta-catenin pathway. *CNS Neurol Disord Drug Targets* 2017; 16(7): 828-36.

Evaluation of the Effect of Rosmarinic Acid in Induction of Neural Differentiation in Wharton's Jelly Stem Cells

Mohsen Salmanvandi¹, Shabnam Kermani², Akram Alizadeh³

Original Article

Abstract

Background: Rosemarinic acid is a phenolic compound that has neuroprotective properties. It has beneficial effect in neurological diseases such as Parkinson's and Alzheimer's. Rosmarinic acid increases the expression of neurotrophic factors such as brain-derived neurotrophic factor (BDNF), which can contribute in neuronal differentiation of stem cells.

Methods: After isolation and proliferation, Wharton's jelly stem cells were placed in inductive culture medium containing Rosmarinic acid. MTT assay was used to evaluate toxicity. After 4 days, induction of neuronal differentiation in Wharton's jelly stem cells was evaluated using real-time polymerase chain reaction (real-time PCR) via analyzing the expression of Nestin and β -Tubulin III genes.

Findings: MTT assay showed was no significant difference in viability between cells cultured in culture medium with Rosmarinic acid and control group ($P < 0.05$). Real-time PCR showed that adding Rosmarinic acid to culture medium increased the expression of Nestin and β -Tubulin III genes ($P < 0.05$).

Conclusion: Increasing the expression of β -Tubulin III and Nestin, when there is Rosmarinic acid, may indicate a greater induction of neuronal differentiation in Wharton's jelly stem cells. The results show that Rosmarinic acid induces the neuronal differentiation of Wharton's jelly stem cells.

Keywords: Cell differentiation, Wharton's jelly cells, Rosmarinic acid

Citation: Salmanvandi M, Kermani S, Alizadeh A. Evaluation of the Effect of Rosmarinic Acid in Induction of Neural Differentiation in Whartons Jelly Stem Cells. J Isfahan Med Sch 2019; 37(519): 242-8.

1- MSc Student, School of Materials Science and Engineering, Najafabad Branch, Islamic Azad University, Najafabad, Iran

2- Assistant Professor, School of Materials Science and Engineering, Najafabad Branch, Islamic Azad University, Najafabad, Iran

3- Assistant Professor, School of Materials Science and Engineering, Najafabad Branch, Islamic Azad University, Najafabad AND Department of Tissue Engineering and Applied Cell Sciences, School of Medicine, Semnan University of Medical Sciences, Semnan, Iran

Corresponding Author: Akram Alizadeh, Email: a.alizadeh@semums.ac.ir