

## تمایز سلول‌های بنیادی مشتق از چربی انسان به سلول‌های عصبی با استفاده از محیط رویی آن‌ها

شیوا امیری‌زاده<sup>۱</sup>، حسین صالحی<sup>۲</sup>، بتول هاشمی‌بنی<sup>۳</sup>، حمید بهرامیان<sup>۳</sup>، نوشین امیرپور<sup>۲</sup>

## مقاله پژوهشی

## چکیده

**مقدمه:** سلول‌های بنیادی مشتق از چربی انسان (hADSCs یا Human adipose derived stem cells) جمعیتی از سلول‌های بنیادی مزانشیمی (MSCs یا Mesenchymal stem cells) هستند که از بافت چربی به دست می‌آیند. hADSCs توانایی تمایز به دودمان‌های مختلف را دارند و سیتوکاین‌های مختلفی را ترشح می‌کنند که بسیاری از این عوامل، خاصیت حفاظت عصبی دارند و در تمایز و بقای عصب مؤثر می‌باشند. هدف از انجام این مطالعه، بررسی تأثیر محیط رویی تغلیظ شده‌ی hADSCs بر تمایز عصبی این سلول‌ها بود.

**روش‌ها:** پس از دریافت رضایت از افراد جوان کاندیدای عمل جراحی، سلول‌های بنیادی از بافت چربی جداسازی، کشت و پاساژ داده شد. به منظور تمایز عصبی، سلول‌های حاصل از پاساژ ۳ تا ۵ به مدت ۲۱ روز تحت تأثیر محیط رویی تغلیظ شده قرار گرفتند. بقای سلول‌های تمایز یافته با استفاده از روش (Immunocytochemistry) 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) و تمایز عصبی آن‌ها، با روش ایمونوسیتوشیمی (Immunocytochemistry) مورد ارزیابی قرار گرفت.

**یافته‌ها:** نتایج MTT نشان داد که میزان بقای سلول‌های تمایز یافته با محیط رویی در روزهای ۷ و ۲۱ نسبت به گروه شاهد، افزایش معنی‌داری داشت. همچنین، بیان نشانگر عصبی  $\beta$ -tubulin III ( $\beta$ -TUB III) به عنوان نشانگر اختصاصی اسکلت سلول عصبی، در روز ۲۱ نسبت به گروه شاهد تفاوت معنی‌داری را نشان داد ( $P < 0.05$ ).

**نتیجه‌گیری:** بر اساس یافته‌های این مطالعه، محیط رویی hADSCs توانست منجر به افزایش بقا و تمایز عصبی سلول‌های بنیادی مشتق از چربی گردد. امید است شناخت بهتر ترکیبات این محیط رویی، راه را برای درمان‌های غیر سلولی بیماری‌های تخریب کننده‌ی عصبی هموار سازد.

**واژگان کلیدی:** تمایز، سلول‌های بنیادی، محیط رویی

**ارجاع:** امیری‌زاده شیوا، صالحی حسین، هاشمی‌بنی بتول، بهرامیان حمید، امیرپور نوشین. تمایز سلول‌های بنیادی مشتق از چربی انسان به سلول‌های

عصبی با استفاده از محیط رویی آن‌ها. مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۳۹۶؛ ۳۵ (۴۳۵): ۷۲۶-۷۳۰

به عنوان یکی از منابع مهم MSCs، دارای سلول بنیادی بیشتر (۵۰۰۰ گرم) نسبت به مغز استخوان (۱۰۰۰ گرم) است و سلول‌های بنیادی این بافت، با روش‌های تهاجمی کمتر، به دست می‌آید (۴). Human adipose derived stem cells (hADSCs)، می‌توانند به دودمان مزودرمی کندروسیت، استئوسیت و میوسیت و دودمان غیر مزودرمی مانند هپاتوسیت و سلول‌های عصبی تمایز پیدا کنند (۵).

همچنین، hADSCs عوامل مختلف رشد، سیتوکاین‌ها و عوامل بازسازی بافت‌ها را ترشح می‌کنند که این عوامل در ترمیم و

## مقدمه

با توجه به ظرفیت بازسازی محدود بافت عصبی و عدم وجود درمان مؤثر برای بسیاری از بیماری‌های تخریب کننده‌ی عصبی نظیر پارکینسون و آلزایمر، به تازگی سلول درمانی مورد توجه قرار گرفته است (۱). از بین سلول‌های بنیادی، پتانسیل تمایز عصبی MSCs (Mesenchymal stem cells)، این سلول‌ها را به عنوان منبع ایده‌آلی برای درمان آسیب‌های بافت عصبی مطرح کرده است (۲). سلول‌های بنیادی مزانشیمی را می‌توان از بافت‌های مختلفی نظیر مغز استخوان، چربی، بند ناف و ... جداسازی کرد (۳). بافت چربی،

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه علوم تشریح، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

۲- استادیار، گروه علوم تشریح، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

۳- دانشیار، گروه علوم تشریح، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

بقای عصب نقش دارند (۶-۷). یکی از مهم‌ترین این عوامل، عوامل رشد نوروتروفیک (Neurotrophic factor یا NTF) می‌باشند (۸). مطالعات نشان داده‌اند که این عوامل در محیط رویی (Conditioned medium) آن‌ها نیز وجود دارند (۹).

با وجود روش‌های مختلف برای تمایز hADSCs به دودمان‌های مختلف، این مطالعه به دنبال یافتن روش مناسبی به منظور تمایز عصبی این سلول‌ها با هزینه‌ی کمتر می‌باشد. در بیشتر روش‌های تمایزی، از عوامل نوروتروفیک نوترکیب نظیر GDNF، (BDNF) Brain-derived neurotrophic factor Nerve growth factor و (Glial cell-derived neurotrophic factor) (NGF) به عنوان القاگر استفاده می‌شود. با توجه به هزینه‌ی بالای این عوامل و از طرفی، ترشح این عوامل توسط hADSCs، هدف از انجام این مطالعه، استفاده از محیط رویی تغلیظ شده‌ی سلول‌های hADSC و ریز مولکول‌ها، جهت تمایز این سلول‌های بنیادی به سلول‌های عصبی بود.

### روش‌ها

**جداسازی hADSCs:** پس از اخذ رضایت از سه بیمار جوان مؤنث (با میانگین سنی  $5 \pm 34$  سال) کاندیدای عمل لاپاراسکوپی، بافت چربی زیر جلدی جداسازی و به آزمایشگاه انتقال داده شد. برای برداشتن سلول‌های خونی و دبیردهای سلولی، نمونه‌ها با Phosphate buffered saline (PBS) شستشو داده شد. سپس، نمونه‌ها به قطعات کوچک تبدیل شدند و به مدت ۳۰ دقیقه در معرض آنزیم کلاژناز I با غلظت ۰/۰۷۵ درصد قرار گرفتند. به منظور از بین بردن اثر آنزیم، از حجم برابر Fetal bovine serum (FBS) ۱۰ درصد + Dulbecco's modified eagle's medium (DMEM) استفاده و به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ گردید. پس از آن، سلول‌ها در محیط حاوی DMEM غنی شده با FBS ۱۰ درصد و Penicillin/streptomycin ۱ درصد کشت داده شدند.

**تهیه‌ی محیط رویی:** سلول‌های پاساژ ۳-۵ در محیط بدون سرم کشت داده شدند. پس از ۷۲ ساعت، محیط رویی جمع‌آوری شد و به مدت ۱۰ دقیقه با شتاب ۱۶۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ گردید. سپس، محیط رویی با فیلتر Amicon Ultra-15 به مدت ۱۲ دقیقه با شتاب ۳۶۰۰ g سانتریفیوژ شد و تا زمان استفاده در دمای ۷۰- درجه‌ی سانتی‌گراد نگهداری گردید.

**تمایز عصبی hADSCs:** به منظور تمایز عصبی، از سلول‌های پاساژ ۳-۵ استفاده شد. سلول‌ها به تعداد ۵۰۰۰/سانتی‌متر مربع در ظروف ۲۴ خانه با محیط تمایز حاوی L-glutamine (L-GLU)، Penicillin/streptomycin، Non-essential amino acid

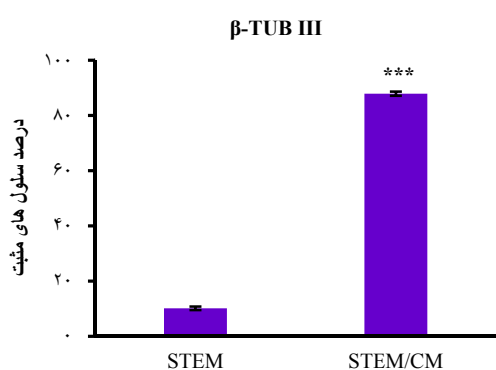
**ایمونوسیتوشیمی:** بعد از ۲۱ روز، سلول‌های تمایز یافته به مدت ۲۰ دقیقه با پارافمالدئید ۴ درصد تثبیت شدند. سپس، به مدت ۳۰ دقیقه با استفاده از ۰/۴ درصد (Sigma) Triton X-100 نفوذپذیر شدند. سلول‌ها با آنتی‌بادی اولیه‌ی anti-βIII-TUB (Abcam, ab14545) جهت تشخیص پروتئین β-tubulin III (β-TUB III) به عنوان نشانگر اختصاصی اسکلت سلول عصبی در طول شب انکوبه شدند. پس از شستشو با آنتی‌بادی ثانویه‌ی Fluorescein isothiocyanate anti-mouse Immunoglobulin G (FITC anti-mouse IgG) (Abcam, ab97022) به مدت یک ساعت انکوبه گردید. رنگ‌آمیزی هسته‌ها با 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) (Sigma) انجام گرفت. شمارش سلولی با استفاده از پلاگین Cell counter نرم‌افزار ImageJ (v. 1.47, National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA) انجام شد.

**روش MTT** برای بررسی میزان بقای سلول‌ها، از روش 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) استفاده گردید. برای انجام این روش، ابتدا محیط رویی سلول‌ها استخراج شد. سپس، ۴۰۰ میکرولیتر DMEM و ۴۰ میکرولیتر MTT اضافه و به مدت ۴ ساعت انکوبه شد. آن گاه، MTT خارج و ۴۰۰ میکرولیتر Dimethyl sulfoxide (DMSO) به مدت ۲۰ دقیقه اضافه گردید. میزان جذب در طول موج ۵۸۰ نانومتر اندازه‌گیری شد.

**آنالیز آماری:** آنالیزهای آماری با استفاده از نرم افزار SPSS نسخه‌ی ۲۲ (version 22, IBM Corporation, Armonk, NY) انجام گرفت. داده‌های حاصل از ایمونوسیتوشیمی و روش MTT، با استفاده از آزمون آماری Independent t مورد واکاوی قرار گرفتند.

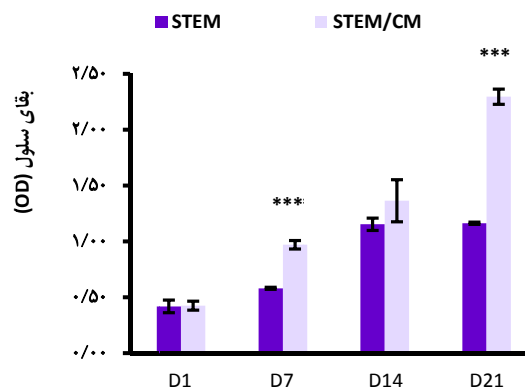
### یافته‌ها

**بررسی بقای سلول‌های تمایز یافته:** نتایج حاصل از MTT برای بررسی میزان بقای سلول‌های تمایز یافته در شکل ۱ آمده است. این نمودار، میزان بقای سلول‌های تمایز یافته را در روزهای ۱، ۷، ۱۴ و ۲۱ نمایش می‌دهد. نتایج حاصل از بررسی میزان بقای hADSCs بعد از تمایز نشان داد که محیط رویی تغلیظ شده‌ی این سلول‌ها، باعث تکثیر و بقای معنی‌دار hADSCs در روزهای ۷ و ۲۱ (به ترتیب  $0.970 \pm 0.060$  و  $0.300 \pm 0.060$ ) نسبت به گروه شاهد (به ترتیب  $0.580 \pm 0.009$  و  $0.160 \pm 0.010$ ) شده بود ( $P < 0.010$ ).



شکل ۳. نتایج کمی ایمونوسیتوشیمی مربوط به نشانگر عصبی

β-tubulin III (β-TUB III) در گروه‌های شاهد و مورد در روز ۲۱ (P < ۰/۰۰۱:\*\*\*)



شکل ۱. بررسی بقای سلول‌ها: مقایسه‌ی نتایج روش

3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) در گروه‌های مورد و شاهد در روزهای ۱، ۷، ۱۴ و ۲۱ (P < ۰/۰۰۱:\*\*\*)

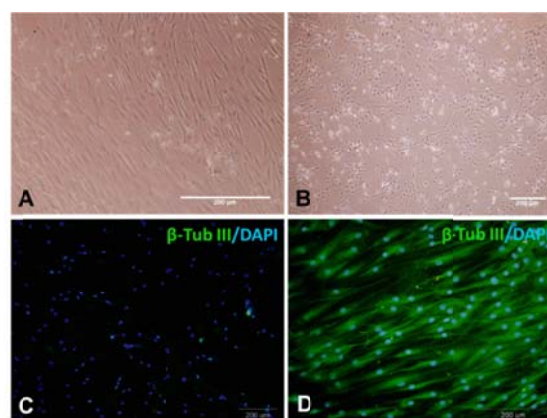
### بحث

امروزه، بافت چربی به عنوان یک منبع قابل دسترس برای سلول‌های بنیادی مزانشیمی مورد توجه قرار گرفته است. مطالعات نشان داده است که hADSCs توانایی تمایز به انواع سلول‌های مختلف نظیر سلول‌های عصبی را دارا می‌باشند. تحقیقات متعددی بیان کرده‌اند که MSCs، طیف وسیعی از سیتوکاین‌ها نظیر Neurotrophin-3، Insulin-like growth factor 1، GDNF، NT-4، (NT-3) و BDNF را ترشح می‌کنند (۳).

مطالعات نشان داده‌اند که این عوامل در محیط رویی hADSCs نیز وجود دارند. بر این اساس، مطالعه‌ی حاضر نشان داد که محیط رویی hADSCs باعث افزایش معنی‌دار بقای سلول‌های تمایز یافته نسبت به گروه شاهد شد. Mead و همکاران اثبات کردند که عوامل موجود در محیط رویی hADSCs، اثرات حفاظتی در مقابل استرس اکسیداتیو و آسیب عصبی دارند و باعث افزایش بقای عصبی می‌شوند (۹). مطالعه‌ی Koeberle و Ball، GDNF خارجی از طریق مسیرهای سیگنالینگ داخل سلولی Mitogen-activated protein kinases (MAPK)، 3-kinase Phosphatidylinositol (PI3K) و Src، اثرات حفاظت عصبی بر روی سلول‌های عصبی داشته است (۱۱).

همچنین، Egashira و همکاران، با تزریق داخل بطنی محیط رویی hADSCs تغلیظ شده در موش‌های دچار عارضه‌ی سکته‌ی مغزی ایسکمیک، مشاهده کردند که این مداخله، باعث بهبود عملکرد و بقای عصبی می‌گردد (۱۰). بنابراین، نتایج مطالعه‌ی حاضر در راستای نتایج تحقیقات قبلی، نشان داد که محیط رویی hADSCs تأثیر معنی‌داری بر بقای سلول‌های تمایز یافته دارد. در ارتباط با معنی‌دار نبودن بقای سلولی در روز ۱۴ نسبت به گروه شاهد، به نظر می‌رسد که سلول‌ها در فاصله‌ی روزهای ۱۴-۷ وارد مرحله‌ی تمایز

بررسی تمایز عصبی hADSCs سلول‌های بنیادی حاصل از پاساژ ۳-۵، به مدت ۲۱ روز در محیط تمایز عصبی کشت داده شدند. بعد از تمایز، تغییرات ریخت‌شناسی سلولی از حالت دوکی و فیبروبلاستی شکل (شکل A-۲) به سلول‌های عصبی زائده‌دار (شکل B-۲) مشاهده گردید.



شکل ۲. تصاویر میکروسکوپ فاز کنتراست مربوط به گروه شاهد (A) و مورد (B)، تصاویر ایمونوسیتوشیمی مربوط به نشانگر عصبی β-tubulin III (β-TUB III) در گروه شاهد (C) و مورد (D).

سلول‌های تمایز یافته، از نظر نشانگر عصبی β-TUB III مورد بررسی قرار گرفتند. شکل C-D-۲، نتایج حاصل از رنگ‌آمیزی ایمونوسیتوشیمی برای نشانگر β-TUB III را در هر دو گروه نشان می‌دهد. بیان این نشانگر در سلول‌های تمایز یافته با محیط رویی تغلیظ شده (۰/۷۶ ± ۸۷/۹۰ درصد) نسبت به گروه شاهد (۰/۶۴ ± ۱۰/۱۳ درصد) تفاوت معنی‌داری داشت (شکل ۳).

hADSCs، تأثیرات تمایزی بهتری نسبت به عوامل خارجی (آگزونوس) داشته است.

در این مطالعه، از محیط رویی تغلیظ شده‌ی hADSCs (حاوی عوامل حفاظت عصبی) و ریز مولکول‌ها به جای استفاده از عوامل القاگر نوترکیب جهت تمایز عصبی سلول‌های بنیادی چربی استفاده شد. به نظر می‌رسد که نتایج حاصل از این مطالعه، در مقایسه با روش‌های قبلی درصد سلول‌های تمایز یافته‌ی عصبی بیشتری را نشان می‌دهد. با توجه به هزینه‌ی گزاف عوامل القایی نوترکیب و از طرفی، تأثیر مثبت محیط رویی hADSCs بر میزان بقا و تمایز عصبی سلول‌های بنیادی مزانشیمی، امید است شناخت بهتر ترکیبات این محیط رویی راه را برای درمان‌های غیر سلولی بیماری‌های تخریب کننده‌ی عصبی هموار سازد.

### تشکر و قدردانی

این مقاله، حاصل از طرح پژوهشی به شماره‌ی ۳۹۵۰۶۱، مصوب شورای پژوهشی طرح‌های علوم پایه‌ی معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی اصفهان می‌باشد. نویسندگان، از این معاونت جهت حمایت مالی پژوهش حاضر، سپاسگزاری می‌نمایند.

شده‌اند؛ از این رو، میزان تکثیر کاهش یافته است و در فاصله‌ی روزهای ۲۱-۱۴، افزایش تکثیر می‌تواند به دلیل تکثیر سلول‌های پیش‌ساز عصبی (تمایز یافته) باشد (۱۲).

همچنین، در این تحقیق محیط رویی hADSCs، باعث افزایش معنی‌دار تمایز عصبی (با توجه به بیان  $\beta$ -TUB III) در hADSCs شد. Guo و همکاران نیز با محیط کشت حاوی GDNF در مدت ۱۵ روز تمایز عصبی سلول‌های مزانشیمی را مشاهده کردند. آن‌ها، بیان نشانگرهای عصبی *Microtubule-associated protein 2* (Map2) (۳۰ درصد) و *Neuron-specific enolase* (NSE) (۴۱ درصد) را در سلول‌های تمایز یافته گزارش نمودند (۱۳).

Lee و همکاران، نشان دادند که اضافه کردن عوامل GDNF، BDNF و NT-3 به محیط کشت سلول‌های مزانشیمی، باعث تمایز عصبی (۲۸ درصد) در این سلول‌ها در طول مدت ۱۴ روز شد (۱۴). در راستای این مطالعات، نتایج تحقیق حاضر نیز بیانگر افزایش معنی‌دار تمایز عصبی hADSCs با بیان نشانگر  $\beta$ -TUB III بود. در مطالعه‌ی حاضر، درصد سلول‌های بیان کننده‌ی نشانگر عصبی  $\beta$ -TUB III، حدود ۸۷ درصد بود که نشان می‌دهد محیط رویی

### References

1. Horner PJ, Gage FH. Regenerating the damaged central nervous system. *Nature* 2000; 407(6807): 963-70.
2. Esfandiari B, Soliemi M, Kaviani S, Parivar K. Rapid neural differentiation of human adipose tissue-derived stem cells using NGF, forskolin and bFGF. *Biomed Pharmacol J* 2016; 9(1): 39-48.
3. Salehi H, Amirpour N, Niapour A, Razavi S. An overview of neural differentiation potential of human adipose derived stem cells. *Stem Cell Rev* 2016; 12(1): 26-41.
4. Arribas MI, Ropero AB, Reig JA, Fraga MF, Fernandez AF, Santana A, et al. Negative neuronal differentiation of human adipose-derived stem cell clones. *Regen Med* 2014; 9(3): 279-93.
5. Razavi S, Razavi MR, Kheirollahi-Kouhestani M, Mardani M, Mostafavi FS. Co-culture with neurotrophic factor secreting cells induced from adipose-derived stem cells: promotes neurogenic differentiation. *Biochem Biophys Res Commun* 2013; 440(3): 381-7.
6. Kim DY, Choi YS, Kim SE, Lee JH, Kim SM, Kim YJ, et al. In vivo effects of adipose-derived stem cells in inducing neuronal regeneration in Sprague-Dawley rats undergoing nerve defect bridged with polycaprolactone nanotubes. *J Korean Med Sci* 2014; 29(Suppl 3): S183-S192.
7. Razavi S, Khosravizadeh Z, Bahramian H, Kazemi M. Changes of neural markers expression during late neurogenic differentiation of human adipose-derived stem cells. *Adv Biomed Res* 2015; 4: 209.
8. Bikbova G, Oshitari T, Baba T, Yamamoto S. Neurotrophic factors for retinal ganglion cell neuropathy - with a special reference to diabetic neuropathy in the retina. *Curr Diabetes Rev* 2014; 10(3): 166-76.
9. Mead B, Berry M, Logan A, Scott RA, Leadbeater W, Scheven BA. Stem cell treatment of degenerative eye disease. *Stem Cell Res* 2015; 14(3): 243-57.
10. Egashira Y, Sugitani S, Suzuki Y, Mishiro K, Tsuruma K, Shimazawa M, et al. The conditioned medium of murine and human adipose-derived stem cells exerts neuroprotective effects against experimental stroke model. *Brain Res* 2012; 1461: 87-95.
11. Koeberle PD, Ball AK. Effects of GDNF on retinal ganglion cell survival following axotomy. *Vision Res* 1998; 38(10): 1505-15.
12. Kim YH, Chung JI, Woo HG, Jung YS, Lee SH, Moon CH, et al. Differential regulation of proliferation and differentiation in neural precursor cells by the Jak pathway. *Stem Cells* 2010; 28(10): 1816-28.
13. Guo L, Yin F, Meng HQ, Ling L, Hu-He TN, Li P, et al. Differentiation of mesenchymal stem cells into dopaminergic neuron-like cells in vitro. *Biomed Environ Sci* 2005; 18(1): 36-42.
14. Lee JH, Kang WK, Seo JH, Choi MY, Lee YH, Kim HM, et al. Neural differentiation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells: applicability for inner ear therapy. *Korean J Audiol* 2012; 16(2): 47-53.

## Differentiation of Human Adipose-Derived Stem Cells toward Neural Cells Using Their Conditioned Medium

Shiva Amirizadeh<sup>1</sup>, Hossein Salehi<sup>2</sup>, Batool Hashemibeni<sup>3</sup>, Hamid Bahramian<sup>3</sup>, Noushin Amirpour<sup>2</sup>

### Original Article

#### Abstract

**Background:** Human adipose-derived stem cells (hADSCs) are population of mesenchymal stem cells isolated from adipose tissue. Multipotent hADSCs can be differentiated into different cell lineages and they have ability to secrete variety of cytokines such as growth factors. These factors have neuroprotective effects and lead to survival and neural differentiation. The aim of this study was to investigate the effects of concentrated hADSCs conditioned medium (hADSCs-CM) on neural differentiation.

**Methods:** The adipose tissue samples were obtained from young donors after signing the consent. The stem cells were isolated and cultured through several subcultures. In order to neural differentiation, the cells from 3<sup>rd</sup> to 5<sup>th</sup> passages were treated with hADSCs-CM for 21 days. The cells survival was assayed using 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) method and neural differentiation of cells was confirmed via immunocytochemistry.

**Findings:** MTT assay indicated that there was significant difference ( $P < 0.050$ ) in cell survival between treated and control groups at the days 7 and 21. The expression of neural marker  $\beta$ -tubulin III ( $\beta$ -TUB III) significantly increased in comparison to control group at the day 21.

**Conclusion:** This study reveals that concentrated hADSCs-CM improves the survival and neural differentiation of hADSCs. Our results suggest that hADSCs-CM may pave the way for non-cellular treatment of neurodegenerative diseases.

**Keywords:** Differentiation, Stem cells, Conditioned medium

**Citation:** Amirizadeh S, Salehi H, Hashemibeni B, Bahramian H, Amirpour N. **Differentiation of Human Adipose-Derived Stem Cells toward Neural Cells Using Their Conditioned Medium.** J Isfahan Med Sch 2017; 35(435): 726-30.

1- MSc Student, Department of Anatomical Sciences, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran

2- Assistant Professor, Department of Anatomical Sciences, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran

3- Associate Professor, Department of Anatomical Sciences, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran

**Corresponding Author:** Noushin Amirpour, Email: amirpour@med.mui.ac.ir