DOI: 10.22122/jims.v36i509.10855 Published by Vesnu Publications

مجله دانشکده پزشکی اصفهان سال سی و ششم/شماره‌ی ۵۰۹/هفته‌ی اول اسفند ۱۳۹۷

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۷/۷ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۸/۹ تاریخ چاپ: ۱۳۹۷/۱۲/۱

بررسی تأثیر اگزوزوم‌های مشتق از سلول‌های بنیادی چربی بر بقا و تمایز عصبی سلول‌های PC12

سمیرا شریعتی[۱]، نوشین امیرپور[۲]، حمید بهرامیان[۳]، حسین صالحی[۳]

مقاله پژوهشی

چکیده

مقدمه: سلول‌های بنیادی مزانشیمی، علاوه بر توانایی تمایز به دودمان‌های مختلف، عوامل متفاوتی را به محیط ترشح می‌کنند. این ترشحات، شامل مولکول‌ها و وزیکول‌های خارج سلولی یا اگزوزوم (Exosome)ها می‌باشند که اعمال متفاوتی برای آن‌ها مطرح گردیده است. اگزوزوم‌ها، نانووزیکول‌هایی هستند که پروتئین‌ها و ماده‌ی ژنتیک به سلول هدف وارد می‌کنند و به دنبال آن، تکثیر، بقای سلولی و تمایز را در سلول گیرنده القا می‌نمایند. این ویژگی‌ها، می‌تواند اگزوزوم‌ها را به عامل درمانی مناسب تبدیل کند. هدف از انجام این مطالعه، بررسی تأثیر اگزوزوم بر بقا و تمایزعصبی رده‌ی سلولی Pheochromocytoma (PC12) بود.

روش‌ها: پس از دریافت رضایت‌نامه از بیماران جوان کاندیدای عمل جراحی، سلول‌های بنیادی از بافت چربی جداسازی، کشت و پاساژ داده شد. سپس، اگزوزوم‌ها از محیط رویی سلول‌ها جداسازی شدند. به منظور تمایزعصبی، سلول‌های PC12 به مدت ۷ روز در چهار گروه شامل گروه‌های تیمار با اگزوزوم، عامل رشد عصبی (Nerve growth factor یا NGF)، NGF/exosome و گروه شاهد کشت و تمایز داده شدند. بقای سلول‌های تمایز یافته با استفاده از روش MTT و تمایزعصبی آن‌ها با روش Real-time polymerase chain reaction (Real-time PCR) مورد ارزیابی قرارگرفت.

یافته‌ها: نتایج MTT نشان‌داد میزان بقای سلول‌های تمایز یافته با اگزوزوم در روزهای ۱، ۳ و ۷ نسبت به سایر گروه‌ها تفاوت معنی‌داری دارد. همچنین، نتایج حاصل از Real-time PCR نشان داد که بیان نشانگر عصبی Microtubule-associated protein 2 (Map2) در روز هفتم نسبت به گروه شاهد افزایش معنی‌داری داشت ($P < ۰/۰۰۱$).

نتیجه‌گیری: این مطالعه، نشان داد اگزوزوم‌های مشتق از سلول بنیادی چربی، می‌توانند سبب افزایش بقا و تمایزعصبی سلول‌های PC12 شوند. امید است شناخت بیشتر اگزوزوم‌ها، کمک شایانی به درمان‌های غیر سلولی بیماری‌های تخریب کننده‌ی عصبی باشد.

واژگان کلیدی: تمایز سلولی، بافت چربی، سلول‌های بنیادی، اگزوزوم‌ها، Pheochromocytoma

ارجاع: شریعتی سمیرا، امیرپور نوشین، بهرامیان حمید، صالحی حسین. **بررسی تأثیر اگزوزوم‌های مشتق از سلول‌های بنیادی چربی بر بقا و تمایز عصبی سلول‌های PC12.** مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۳۹۷؛ ۳۶ (۵۰۹): ۱۵۸۳-۱۵۷۸

مقدمه

بیماری‌های تخریب کننده‌ی عصبی، با تخریب سلول‌های عصبی و گلیال همراه است. با توجه به کم بودن قدرت ترمیم در بافت عصبی و عدم جایگزینی سلول‌ها، محققان همواره به دنبال راه مناسبی برای درمان این بیماری‌ها بوده‌اند. به تازگی، سلول‌های بنیادی در خصوص درمان برخی از بیماری‌ها نظیر بیماری‌های عصبی، بسیار مورد توجه قرار گرفته‌اند (۱). از میان انواع سلول‌های بنیادی، سلول‌های بنیادی مزانشیمی بالغین (Mesenchymal stem cells یا MSCs) به علت خاصیت سازگاری ایمنی و عدم وجود مشکلات اخلاقی در استفاده از آن‌ها و دستیابی به نسبت آسان گزینه‌ی مناسبی می‌باشند. MSCs، می‌توانند به انواع دیگر سلول‌ها تمایز یابند و آسیب‌های بافتی را ترمیم کنند که از این ویژگی جهت درمان بیماری‌های نورودژنراتیو استفاده شده است (۲). با این حال، همیشه در سلول‌درمانی، نگرانی‌هایی در مورد خطراتی چون رد سلولی توسط سیستم ایمنی، بدخیمی‌ها و بی‌ثباتی ژنتیکی وجود دارد (۳).

به تازگی، محققان ثابت کرده‌اند MSCs اثرات درمانی خود را به طور عمده، از طریق عوامل تروفیک ترشحی اعمال می‌کنند. این عوامل، شامل عوامل رشد، میکروRNAها (Micro RNAs یا

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

نویسنده‌ی مسؤول: حسین صالحی

Email: ho_salehi@med.mui.ac.ir

miRNAs) و وزیکول‌هایی هستند که بر حسب اندازه، میکرو و نانووزیکول (اگزوزوم) نامیده می‌شوند (۴).

اگزوزوم، نانووزیکولی محصور در غشایی با لایه‌ی فسفولیپیدی می‌باشد و ترکیبی مشابه سلول والد خود شامل پروتئین، لیپید، RNAهای کدینگ و غیر کدینگ دارد. درمان با اگزوزوم، سبب بهبود پیامدهای درمانی و کاهش مشکلات درمان‌های سلولی و جراحی می‌شود که این به خاطر توانایی اگزوزوم در آغاز فرایندهای ترمیمی داخلی در بافت آسیب دیده و تنظیم مناسب تحمل ایمنی است (۵). اگزوزوم‌ها، توانایی عبور از سد خونی- مغزی را دارند و می‌توان آن‌ها را از مسیرهای وریدی، بدون نیاز به جراحی به سیستم عصبی مرکزی (Central nervous system یا CNS) وارد نمود (۶). این وزیکول‌ها، در درمان بیماری آلزایمر مؤثر می‌باشند و سبب کاهش بتاآمیلوئید در داخل و خارج سلول می‌شوند. مواجهه‌ی نورون‌ها و آستروسیت‌ها با اگزوزوم‌ها، سبب بهبود عملکرد در بیماری پارکینسون و آسیب طناب نخاعی می‌شود. اگزوزوم‌ها، خاصیت حفاظت نورونی دارند و با انتقال miRNAs به سلول هدف، سبب انعطاف‌پذیری عصبی و باز گرداندن عملکرد نورون‌ها و آستروسیت‌ها و درمان آسیب‌های ناشی از سکته‌ی مغزی شده‌اند (۷). همچنین، اگزوزوم‌ها در افزایش رشد و بقای سلولی مؤثرند (۸). از این رو، در مطالعه‌ی حاضر با توجه به ویژگی‌های پیش‌گفته، تأثیر اگزوزوم‌های MSCs حاصل از چربی، بر بقا و تمایز رده‌ی سلول عصبی Pheochromocytoma (PC12) مورد ارزیابی قرار گرفت.

روش‌ها

جداسازی سلول‌های بنیادی چربی (Human adipose stem cells یا hASCs): پس از اخذ رضایت‌نامه از بیماران جوان کاندیدای عمل جراحی، مقداری بافت چربی زیر جلدی دریافت و به آزمایشگاه انتقال داده شد. پس از شستشوی بافت چربی با Phosphate buffered saline (PBS)، جهت حذف بافت‌های اضافی و سلول‌های خونی، بافت به صورت مکانیکی خرد گردید. سپس، به مدت ۳۰ دقیقه آنزیم کلاژناز I با غلظت ۰/۰۷۵ درصد اضافه و کلاژناز با استفاده از محیط Fetal bovine serum (FBS) ۱۰ درصد به همراه Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) خنثی شد. با انجام سانتریفیوژ و تخلیه‌ی محیط رویی، رسوب سلولی به دست آمده با استفاده از محیط کشت FBS ۱۰ درصد به همراه DMEM و Penicillin/streptomycin ۱ درصد کشت داده شد.

جداسازی اگزوزوم: سلول‌های پاساژ ۳ تا ۵ با محیط DMEM بدون FBS به مدت ۴۸ ساعت کشت داده شد و پس از جمع‌آوری محیط رویی آن‌ها، به منظور جداسازی اگزوزوم‌ها، محیط رویی با دور g ۱۲۰۰ به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفیوژ شد تا سلول‌ها و بقایای سلولی حذف شوند. سپس، اگزوزوم‌ها با استفاده از کیت Exo-spinTM (Cell Guidance Systems) و طبق شیوه‌نامه‌ی شرکت سازنده جداسازی و در دمای ۸۰- درجه‌ی سانتی‌گراد ذخیره‌سازی شدند.

شناسایی اگزوزوم‌ها با میکروسکوپ الکترونی عبوری: برای تأیید جداسازی موفق اگزوزوم‌ها، از میکروسکوپ الکترونی عبوری (TEM یا Transmission electron microscope) (Zeiss,EM10C) استفاده شد. ۲۰ میکرولیتر از محلول اگزوزوم با ۲۰ میکرولیتر Phosphotungstic acid ۲ درصد برای یک دقیقه رنگ‌آمیزی و خشک گردید. نمونه با استفاده از TEM بررسی و عکس‌برداری انجام شد (۹).

تمایز سلول‌های PC12: سلول‌های PC12 به تعداد ۳۰۰۰ در سانتی‌مترمربع در محیط تمایزی Roswell Park Memorial Institute (RPMI) به همراه ۱۰ درصد Horse serum، ۵ درصد FBS و ۱ درصد پنی‌سیلین/استرپتومایسین بر روی ظرف‌هایی که با Laminin/Poly-D-Lysine (Laminin/PDL) پوشش داده شده بودند، به مدت ۷ روز کشت و تمایز داده شدند. در این مطالعه، گروه‌ها شامل گروه شاهد، گروه تیمار شده با ۱۰۰ نانوگرم/میلی‌لیتر Nerve growth factor (NGF) (۱۰)، گروه تیمار شده با ۵۰ میکروگرم/میلی‌لیتر اگزوزوم (۱۱)، گروه تیمار شده با ۱۰۰ نانوگرم/میلی‌لیتر NGF و ۵۰ میکروگرم/میلی‌لیتر اگزوزوم بودند.

بررسی ورود اگزوزوم‌ها به سلول‌های هدف: اگزوزوم‌ها با ۲۰ مول/میکرولیتر اکریدین‌اورنج (Acridine orange یا AO) رنگ‌آمیزی و به مدت ۹۰ دقیقه در دمای اتاق نگهداری شدند. سپس، اگزوزوم‌ها به محیط کشت سلول‌های PC12 اضافه شدند و به مدت یک شب در انکوباتور قرار گرفتند. سلول‌ها با پارافرمالدهید ۴ درصد ثابت شده و هسته‌ها با 4′,6-Diamidino-2-phenylindole (DAPI) رنگ‌آمیزی شدند. در نهایت، سلول‌ها با میکروسکوپ فلورسنت بررسی گردیدند (۱۲).

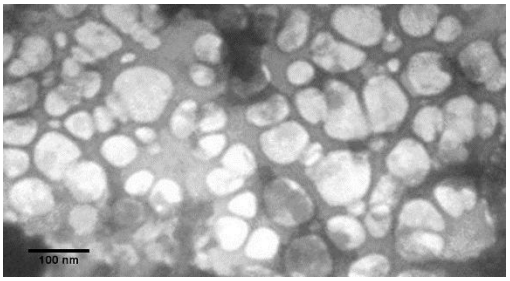
تکنیک 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide (MTT): در این روش، ابتدا محیط رویی نمونه‌ها در روزهای ۱، ۳ و ۷ تخلیه، سپس ۴۰ میکرولیتر محیط کشت و ۴۰ میکرولیتر MTT اضافه شد و به مدت ۴ ساعت انکوبه گردید. سپس، MTT تخلیه و ۴۰۰ میکرولیتر Dimethyl sulfoxide (DMSO) برای ۲۰ دقیقه اضافه شد. میزان جذب نوری با طول موج ۵۴۰ نانومتر اندازه‌گیری گردید.

تکنیک Real-time Pplymerase chain reaction (Real-time PCR): این روش جهت بررسی میزان بیان ژن Microtubule-associated protein 2 (Map2) در روز ۷ انجام گرفت. به طور خلاصه، RNA از سلول‌ها با استفاده از RNeasy mini kit و طبق دستورالعمل ارایه شده توسط شرکت سازنده استخراج گردید. از روی RNA استخراج شده، با به کار بردن First strand cDNA synthesis kit، نسخه‌ی complementary DNA (cDNA) ساخته شد. اندازه‌گیری میزان بیان ژن‌های مورد نظر با استفاده از کیت Maxima SYBR Green/Rox qPCR master mix و با روش Comparative Ct (ΔΔCt) انجام گردید. برنامه‌ی دمایی مورد استفاده، شامل دمای واسرشت اولیه در ۹۵ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۴ دقیقه و سپس، ۴۰ چرخه به ترتیب با دمای واسرشت ۹۵ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۱۰ ثانیه و دمای اتصال مناسب برای هر پرایمر به مدت ۳۰ ثانیه و دمای طویل شدن ۶۰ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۶۰ ثانیه بود. سپس، دمای ذوب شدن بین ۹۵–۵۵ درجه‌ی سانتی‌گراد تعیین Threshold گردید. پرایمرهای مورد استفاده در این مطالعه، شامل Map2-F: GACAGAGAAACAGCAGAGGAAGTG، Map2–R: TGTTCTGATGCTGGCGATGGT، GAPDH-F: CAAGTTCAACGGCACAGTCAAG و GAPDH-R: ACATACTCAGCACCAGCATCAC (Housekeeping gene) بودند. پرایمرها با استفاده از نرم‌افزار Allele Id 76 طراحی گردید.

تجزیه و تحلیل داده‌ها: واکاوی‌های آماری با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه‌ی ۲۲ (version 22, IBM Corporation, Armonk, NY) انجام گرفت. داده‌های حاصل از MTT و Real-time PCR با روش آماری One-way ANOVA و آزمون تعقیبی Tukey مورد ارزیابی قرار گرفتند. $P < ۰/۰۵۰$ به عنوان شاخص معنی‌داری در نظر گرفته شد.

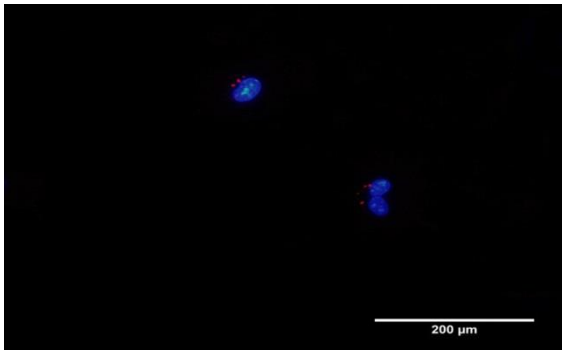
یافته‌ها

بررسی با میکروسکوپ TEM نشان داد، اگزوزوم‌ها از محیط کشت Human adipose-derived stem cells (hASCs) تخلیص گردیده‌اند و وزیکول‌های گرد با قطر ۱۰۰–۳۰ نانومتر می‌باشند (شکل ۱).



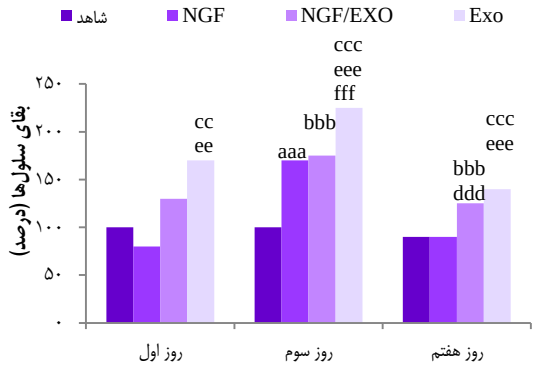
شکل ۱. تصویر میکروسکوپ الکترونی عبوری از اگزوزوم تخلیص شده

بررسی انتقال اگزوزوم‌ها به سلول‌های هدف: نتایج حاصل از بررسی‌ها، ورود اگزوزوم‌های رنگ شده با آکریدین‌اورنج به این سلول‌ها را تأیید نمود (شکل ۲).



شکل ۲. تصویر میکروسکوپ فلورسنت از حضور اگزوزوم‌ها در سلول‌های هدف (4′,6-Diamidino-2-phenylindole یا DAPI: آبی، هسته‌ی سلول) (Acridine orange یا AO: قرمز، اگزوزوم)

بررسی بقای سلول‌های تمایز یافته: نتایج حاصل از MTT در شکل ۳ آمده است. در گروه تیمار شده با اگزوزوم نسبت به گروه شاهد، در همه‌ی روزها تفاوت معنی‌داری در میزان بقای سلولی، مشاهده شد. همچنین، میزان بقای گروه اگزوزوم در روز سوم نسبت به سایر گروه‌ها ($P < ۰/۰۰۱$) و در روز هفتم نسبت به گروه NGF ($P < ۰/۰۰۱$) نیز تفاوت معنی‌داری را نشان داد.



شکل ۳. مقایسه‌ی نتایج 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide (MTT) گروه‌های مختلف در روزهای ۱، ۳ و ۷

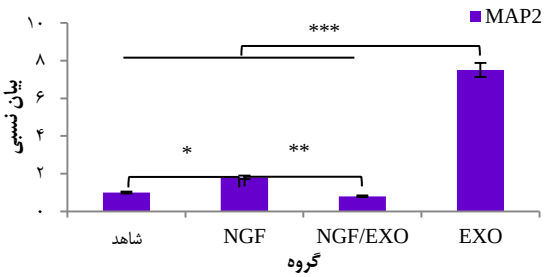
(a: مقایسه‌ی گروه NGF با گروه شاهد، b: مقایسه‌ی گروه NGF/اگزوزوم با گروه شاهد، c: مقایسه‌ی گروه اگزوزوم با گروه شاهد، d: مقایسه‌ی گروه NGF/اگزوزوم با گروه NGF، e: مقایسه‌ی گروه اگزوزوم با گروه NGF، f: مقایسه‌ی گروه اگزوزوم با گروه NGF/اگزوزوم)

cc و ee: $P < ۰/۰۱۰$

aaa، bbb، ccc، ddd و eee، fff: $P < ۰/۰۰۱$

بررسی تمایز عصبی سلولهای PC12: سلول‌های PC12 پس از ۷ روز تمایز، از نظر بیان نشانگر Map2 مورد بررسی قرار گرفتند.

طبق شکل ۴، نتایج به دست آمده نشان داد بیان ژن Map2 در گروه‌های NGF و اگزوزوم، به طور معنی‌داری نسبت به گروه شاهد بیشتر بود. همچنین، بیان این ژن در گروه اگزوزوم نسبت به سایر گروه‌ها افزایش معنی‌داری ($P < ۰/۰۰۱$) نشان داد.



شکل ۴. نتایج میزان بیان نسبی ژن Microtubule-associated protein 2 (Map2) در گروه‌های مورد آزمایش

*: $P < ۰/۰۵۰$؛ **: $P < ۰/۰۱۰$؛ ***: $P < ۰/۰۰۱$

بحث

سلول‌های بنیادی مزانشیمی، از انواع سلول‌های بنیادی می‌باشند که می‌تواند طیف گسترده‌ای از انواع سلول‌های بالغ ایجاد کنند و در درمان بیماری‌های عصبی مورد استفاده قرار گیرند (۲). از ویژگی‌های این سلول‌ها، ترشح عوامل مختلف شامل مولکول‌ها و وزیکول‌ها در محیط کشت می‌باشد (۴). اگزوزوم‌ها، نانووزیکول‌هایی هستند که دارای پروتئین، لیپید و ماده‌ی ژنتیک می‌باشند و انتقال این مواد به سلول هدف، می‌تواند سبب تمایزعصبی شود (۷) و از آپوپتوز سلولی جلوگیری کند (۸). در نتیجه، در درمان بیماری‌های عصبی مؤثر می‌باشند (۱۱) و همچنین، بیان نشانگرهای عصبی را افزایش می‌دهند (۱۳). همچنین، اگزوزوم‌ها خاصیت حفاظت نورونی دارند (۳).

مطالعات قبلی نشان دادند اگزوزوم‌ها ساختارهایی با غشای دو لایه و اندازه‌ی ۱۰۰–۳۰ نانومتر با شکل گرد هستند (۱۴). مطالعه‌ی حاضر نیز نشان داد اگزوزوم‌ها ذراتی با اندازه‌ی ۱۰۰–۳۰ نانومتر و شکل گرد هستند. در مطالعه‌ی Waldenstrom و همکاران، ورود اگزوزوم‌ها به سلول‌های هدف بررسی گردید و نتایج نشان داد اگزوزوم‌ها قادر به ورود به سلول‌های دیگر هستند و محتویات اگزوزوم‌ها درون سیتوپلاسم و هسته‌ی سلول‌های هدف ردیابی شدند (۱۲). یافته‌های این مطالعه، هم‌راستا با سایر مطالعات نشان می‌دهد اگزوزوم‌ها توسط سلول‌های هدف جذب می‌شوند.

اگزوزوم‌ها دارای اثرات متفاوتی مانند افزایش بقای سلولی هستند. بر اساس مطالعه‌ی ما، اگزوزوم‌ها دارای اثر محافظت عصبی هستند. در مطالعه‌ی Hu و همکاران، اگزوزوم‌های مترشحه از سلول بنیادی چربی، سبب افزایش قابلیت رشد سلول‌ها شدند. این افزایش رشد، با افزایش غلظت اگزوزوم‌ها ارتباط مستقیمی داشت. Farinazzo و همکاران، نشان دادند اگزوزوم‌های Adipose tissue derived stem cells (ASCs) با کاهش Caspase3، باعث کاهش آپوپتوز نورون‌ها و در نتیجه، افزایش بقای سلولی می‌شوند (۱۵). در سایر بررسی‌ها نیز ثابت کرده‌اند اگزوزوم‌ها سبب افزایش رشد و بقای سلولی می‌شوند که علت این افزایش، تغییر بیان ژن‌های مربوط به تکثیر سلولی می‌باشد (۱۶). بنابراین، نتیجه‌ی مطالعه‌ی حاضر در راستای مطالعات قبلی نشان داده است اگزوزوم‌ها، باعث افزایش بقای سلول‌های تمایز یافته می‌شود. از دیگر آثار اگزوزوم، می‌توان به افزایش تمایز عصبی اشاره کرد. در این مطالعه، اگزوزوم‌ها سبب افزایش معنی‌دار تمایز عصبی (با توجه به بیان ژن Map2) در سلول‌های PC12 شدند.

مطالعات Zhang و همکاران بر روی اگزوزوم‌های سلول بنیادی مزانشیمی، نشان داد اگزوزوم‌ها می‌توانند باعث تمایز عصبی شوند و نورون‌های بالغ ایجاد کنند و سبب تغییر شکل و طویل شدن نوریت‌ها شوند که شاید به علت حضور عوامل رشد درون اگزوزوم‌ها باشد (۱۷). Wang و همکاران، در مطالعه‌ای محتویات اگزوزوم را بررسی نمودند و نشان دادند اگزوزوم‌ها با انتقال پروتئین‌ها به سایر سلول‌ها، سبب ایجاد و افزایش طول نوریت‌ها می‌شوند (۱۸). مطالعات سایر محققان نیز ثابت کرده است اگزوزوم‌ها دارای مقادیر زیادی Messenger RNA (mRNA)، MicroRNA (miRNA) و پروتئین‌های مربوط به تمایز عصبی هستند. اگزوزوم‌ها، مقادیر زیادتری از miRNAهای مخصوص بافت عصبی را دارا می‌باشند. وجود مقادیر بالای miRNA، از عوامل مؤثر در رونویسی پروتئین‌ها در اگزوزوم‌ها می‌باشد و به آن‌ها پتانسیل القای تمایز عصبی می‌دهد (۱۳). همچنین، مطالعه‌ی Farinazzo وهمکاران، نشان دادند اگزوزوم‌ها باعث فعال شدن سیگنال‌های مربوط به نوروژنز در سلول‌های ASCs می‌شوند. افزایش بیان پروتئین Nestin، بیانگر فعال شدن الیگودندروگلیال‌ها بود (۳). در مطالعه‌ی حاضر، از اگزوزوم‌ها جهت تمایز عصبی استفاده شد و نتایج نشان داد اگزوزوم‌ها قادر به القای تمایز عصبی هستند.

با توجه به عدم وجود درمان مناسب برای بیماری‌های عصبی و با توجه به مزایای استفاده از اگزوزوم‌ها، امید است شناخت بهتر اگزوزوم‌ها، راهی نوین و هموار جهت درمان این بیماری‌ها به وجود آورد.

تشکر و قدردانی

این مقاله، برگرفته از طرح پژوهشی به شماره‌ی ۳۹۶۵۷۱ مصوب معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی اصفهان می‌باشد. بدین وسیله، از این معاونت جهت حمایت مالی سپاسگزاری می‌گردد.

References

1. Kim SU, de Vellis J.. Stem cell-based cell therapy in neurological diseases: a review. J Neurosci Res 2009; 87(10): 2183-200.
2. 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.
3. Farinazzo A, Turano E, Marconi S, Bistaffa E, Bazzoli E, Bonetti B. Murine adipose-derived mesenchymal stromal cell vesicles: in vitro clues for neuroprotective and neuroregenerative approaches. Cytotherapy 2015; 17(5): 571-8.
4. Ishii S, Okada Y, Kadoya T, Matsuzaki Y, Shimazaki T, Okano H. Stromal cell-secreted factors promote the survival of embryonic stem cell-derived early neural stem/progenitor cells via the activation of MAPK and PI3K-Akt pathways. J Neurosci Res 2010; 88(4): 722-34.
5. Vlassov AV, Magdaleno S, Setterquist R, Conrad R. Exosomes: Current knowledge of their composition, biological functions, and diagnostic and therapeutic potentials. Biochim Biophys Acta 2012; 1820(7): 940-8.
6. Alvarez-Erviti L, Seow Y, Yin H, Betts C, Lakhal S, Wood MJ. Delivery of siRNA to the mouse brain by systemic injection of targeted exosomes. Nat Biotechnol 2011; 29(4): 341-5.
7. Xin H, Li Y, Buller B, Katakowski M, Zhang Y, Wang X, et al. Exosome-mediated transfer of miR-133b from multipotent mesenchymal stromal cells to neural cells contributes to neurite outgrowth. Stem Cells 2012; 30(7): 1556-64.
8. Shabbir A, Cox A, Rodriguez-Menocal L, Salgado M, Van Badiavas E. mesenchymal stem cell exosomes induce proliferation and migration of normal and chronic wound fibroblasts, and enhance angiogenesis in vitro. Stem Cells Dev 2015; 24(14): 1635-47.
9. Yang L, Wu XH, Wang D, Luo CL, Chen LX. Bladder cancer cell-derived exosomes inhibit tumor cell apoptosis and induce cell proliferation in vitro. Mol Med Rep 2013; 8(4): 1272-8.
10. Katerji M, Barada K, Jomaa M, Kobeissy F, Makkawi AK, Abou-Kheir W, et al. Chemosensitivity of U251 cells to the co-treatment of D-penicillamine and copper: Possible implications on Wilson disease patients. Front Mol Neurosci 2017; 10: 10.
11. Lee M, Liu T, Im W, Kim M. Exosomes from adipose-derived stem cells ameliorate phenotype of Huntington's disease in vitro model. Eur J Neurosci 2016; 44(4): 2114-9.
12. Waldenstrom A, Genneback N, Hellman U, Ronquist G. Cardiomyocyte microvesicles contain DNA/RNA and convey biological messages to target cells. PLoS One 2012; 7(4): e34653.
13. Lee YS, Jung WY, Heo H, Park MG, Oh SH, Park BG, et al. Exosome-Mediated Ultra-Effective Direct Conversion of Human Fibroblasts into Neural Progenitor-like Cells. ACS Nano 2018; 12(3): 2531-8.
14. Baranyai T, Herczeg K, Onodi Z, Voszka I, Modos K, Marton N, et al. Isolation of exosomes from blood plasma: qualitative and quantitative comparison of ultracentrifugation and size exclusion chromatography methods. PLoS One 2015; 10(12): e0145686.
15. Choi EW, Seo MK, Woo EY, Kim SH, Park EJ, Kim S. Exosomes from human adipose-derived stem cells promote proliferation and migration of skin fibroblasts. Exp Dermatol 2018; 27(10): 1170-2.
16. Hu L, Wang J, Zhou X, Xiong Z, Zhao J, Yu R, et al. Exosomes derived from human adipose mensenchymal stem cells accelerates cutaneous wound healing via optimizing the characteristics of fibroblasts. Sci Rep 2016; 6: 32993.
17. Zhang Y, Chopp M, Meng Y, Katakowski M, Xin H, Mahmood A, et al. Effect of exosomes derived from multipluripotent mesenchymal stromal cells on functional recovery and neurovascular plasticity in rats after traumatic brain injury. J Neurosurg 2015; 122(4): 856-67.
18. Wang Y, Balaji V, Kaniyappan S, Kruger L, Irsen S, Tepper K, et al. The release and trans-synaptic transmission of Tau via exosomes. Mol Neurodegener 2017; 12(1): 5.

DOI: *10.22122/jims.v36i509.10855* *Published by Vesnu Publications*

Journal of Isfahan Medical School **Vol. 36, No. 509, 1st Week, March 2019**

Received: 07.07.2018 Accepted: 09.08.2018 Published: 20.02.2019

Investigating the Effect of Human Adipose Stem Cell-Derived Exosomes on Survival and Neural Differentiation of PC12 Cells

Samira Shariati[1], Noushin Amirpour[2], Hamid Bahramian[3], Hossein Salehi[3]

Original Article

Abstract

Background: Mesenchymal stem cells can be differentiated into multiple cell lineages, and secrete different factors. These secretions contain molecules and extracellular vesicles that have some effects. Exosomes are nanovesicles that enter protein and genetic material to target cells, and thereby induce proliferation, survival, and neural differentiation in target cells. So, exosomes can be considered as an ideal source for non-cellular therapy. The aim of this study was to investigate the effects of human adipose stem cell (ASC)-derived exosomes on survival and neural differentiation of pheochromocytoma cell line (PC12).

Methods: The adipose tissue samples were obtained from young donors after signing the consent. The stem cells were isolated and cultured. Then exosomes were isolated from supernatant. In order to neural differentiation, the PC12 cells were treated in four groups with exosomes, nerve growth factor (NGF), NGF/exosome, and control for 7 days. The cells survival was assayed using MTT assay and neural differentiation of cells was confirmed by real-time polymerase chain reaction (real-time PCR).

Findings: Based on MTT assay, there was significant difference in cell survival between exosome-treated group and other groups at days 1, 3, and 7. The results of real-time PCR showed that the expression of neural marker microtubule-associated protein 2 (Map2) significantly increased in exosome-treated group compared to other group at day 7 ($P < 0.001$).

Conclusion: This study revealed that ASC-derived exosomes improved the survival and neural differentiation of PC12 cells. Our results suggest that exosomes may pave the way for non-cellular treatment of neurodegenerative diseases.

Keywords: Cell differentiation, Adipose tissue, Stem cells, Exosomes, Pheochromocytoma

Citation: Shariati S, Amirpour N, Bahramian H, Salehi H. **Investigate the Effect of Human Adipose stem Cell Derived Exosomes on Survival and Neural Differentiation of PC12 Cells.** J Isfahan Med Sch 2019; 36(509): 1578-83.

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: Hossein Salehi, Email: ho_salehi@med.mui.ac.ir