Original Article

Expression of nestin and nerve growth factors in adipose-derived mesenchymal stem cells

Ghorbanian MT*, Haji-Ghasem-Kashani M, Hossein-Pour L, Mirzaiyan L

Faculty of Biology, Damghan University, Damghan, I. R. Iran.

Received May 22, 2011; Accepted July 31, 2011

Abstract:

Background: Adipose tissue represents an accessible source of mesenchymal stem cells (Adipose tissue derived mesenchymal stem cells-ADSCs). ADSCs could be differentiated into various mesenchymal stem cells (e.g. chondrocytes, adipocytes, osteoblasts, and neuronal lineages). Neurotrophic factors are diffusible polypeptides that have a critical role in survival, proliferation and differentiation of stem cells. This study aimed to evaluate the proliferative capacity and the expression of some neurotrophic factors such as brain-derived neurotrophic factor (BDNF), ciliary neurotrophic factor (CNTF), glial cell-derived neurotrophic factor (GDNF), neurotrophin-3 (NT-3), neurotrophin-4 (NT-4), nerve growth factor (NGF) and the expression of nestin in ADSCs.

Materials and Methods: Rat ADSCs were isolated from the subcutaneous adipose tissue using mechanical and enzymatic digestion. These cells were cultured in αMEM supplemented with 10% fetal bovine serum. ADSCs of the third passage were evaluated by immunocytochemistry to detect the cell surface markers of CD90 and nestin. Reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) was used to study the expression of the above-mentioned neurotrophic factors in the ADSCs. Moreover, adipogenic and chondrogenic differentiation of ADSCs were induced in-vitro.

Results: The assessment of ADSCs identity and purity showed that 90% and 80% of the stem cells were positive for CD90 marker and nestin, respectively. According to RT-PCR results, the above-mentioned neurotrophic factors were expressed in these stem cells. Furthermore, a small number of cells were positive for cresyl violet staining.

Conclusion: Adipose tissue contains a stem cell population that seems to be a good multipotential cell candidate for cell replacement therapy.

Keywords: Mesenchymal stem cell, Neurotrophic factors, Nestin

* **Corresponding Author.**
Email: ghorbanian@du.ac.ir
Tel: 0098 912 531 8732
Fax: 0098 232 524 7146

Conflict of Interests: ***No***

Feyz, Journal of Kashan University of Medical Sciences, Winter, 2012; Vol. 15, No 4, Pages 322-330

Please cite this article as: Ghorbanian MT, Haji-Ghasem-Kashani M, Hossein-Pour L, Mirzaiyan L. Expression of nestin and nerve growth factors in adipose-derived mesenchymal stem cells. ***Feyz*** 2012; 15(4): 322-30.

[Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2026-11-25]

بررسی بیان نستین و فاکتورهای رشد عصبی در کشت سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از بافت چربی

محمدتقی قربانیان [۱*]، مریم حاجی قاسم کاشانی [۱]، لیلی حسین‌پور [۲]، لیلا میرزائیان [۳]

خلاصه:

سابقه و هدف: بافت چربی منبع قابل دسترسی برای سلول‌های بنیادی (Adipose tissue-derived mesenchymal stem cells; ADSCs) است. فاکتورهای نوروتروفیک، مولکول‌هایی هستند که در بقا، تکثیر و تمایز سلول‌های بنیادی نقش حیاتی دارند. هدف از این مطالعه بررسی ظرفیت تکثیری و قابلیت بیان فاکتورهای نوروتروفیک (NGF، CNTF، NT3، NT4، GDNF و BDNF) و همچنین بیان فیلامان بینابینی سلول‌های پیش‌ساز عصبی (نستین) در ADSC ها می‌باشد.

مواد و روش‌ها: ADSC ها از بافت چربی زیرجلدی موش صحرایی بزرگسال به‌روش هضم مکانیکی و آنزیمی جدا شد. این سلول‌ها در محیط αMEM غنی شده با سرم ۱۰ درصد FBS کشت شدند. سلول‌های پاساژ سوم به‌روش ایمنوسیتوشیمی برای نشانگرهای CD90 و نستین مورد ارزیابی قرار گرفتند. بیان فاکتورهای نوروتروفیک ذکر شده در ADSC ها به‌روش RT-PCR صورت گرفت. همچنین، این سلول‌ها در محیط القایی به سلول‌های چربی و استخوان تمایز داده شدند.

نتایج: ارزیابی تعیین هویت و خلوص ADSC ها نشان داد که ۹۰ درصد سلول‌ها برای نشانگر CD90 و ۸۰ درصد آنها برای نشانگر نستین مثبت بوده‌اند. نتایج RT-PCR نیز نشان داد که فاکتورهای نوروتروفیک اشاره شده، در این سلول‌ها بیان شده‌اند. علاوه بر این، تعداد کمی از سلول‌ها به کرزیل ویوله واکنش دادند.

نتیجه‌گیری: بافت چربی دارای جمعیت سلولی بنیادی است که به‌دلیل قابلیت تکثیر و توان تمایزی می‌تواند کاندید مناسبی برای پیوند سلولی در آینده باشد.

واژگان کلیدی: سلول بنیادی مزانشیمی، فاکتورهای نوروتروفیک، نستین

فصلنامه علمی– پژوهشی فیض، دوره پانزدهم، شماره ٤، زمستان ۱۳۹۰، صفحات ۳۳۰-۳۲۲

مقدمه

سلول‌های بنیادی مزانشیمی (Mesenchymal stem cells; MSCs) به‌دلیل قابلیت تولید فاکتورهای نوروتروفیک و تمایز به سلول‌های عصبی، کاندید مناسبی برای درمان بیماری‌ها و ضایعات عصبی هستند. از بافت چربی به سهولت می‌توان سلول بنیادی مزانشیمی را استخراج نموده و مورد کشت قرار داد [۳-۱]. سلول-های بنیادی مشتق از بافت چربی (ADSCs) علاوه بر قابلیت تکثیر زیاد، می‌توانند به رده‌های سلول مزانشیمی مثل استئوبلاست، آدیپوسیت و کندرئوسیت تمایز یابند [۲،۱]. همچنین، این سلول‌ها در شرایط درون و برون‌تنی به انواع سلول‌های عصبی و گلیالی تمایز می‌یابند. ADSCs را می‌توان به‌روش لیپوساکشن از بافت چربی برداشته و با سانتریفوژ و هضم آنزیمی توسط کلاژناز، جدا و کشت نمود [۷-۳]. پژوهش‌هایی در زمینه تمایز MSC ها در شرایط کشت با استفاده از مواد شیمیایی، ترانسفکشن یا هم‌کشتی صورت گرفته [۹،۸] و بیان نشانگر نستین، فیلامان بینابینی سلول‌های نورواپیتلیال، در مرحله ابتدایی تمایز این سلول‌ها گزارش شده است [۱۲-۱۰]. برخی از مطالعات نشان داده‌اند که پیوند MSCs در ضایعات عصبی، با ترشح فاکتورهای نوروتروفیک، بقا و بازسازی نورون-های میزبان و بهبودی را افزایش می‌دهد [۱۲،۱۱]. پاسخ‌های نوروتروفیک تولید شده توسط NSC های درون‌زاد نمی‌توانند فقدان نورونی موجود در بیماری‌های CNS را به‌طور کامل جبران کنند. بنابراین استفاده از فاکتورهای خارجی جهت تحریک نورون-زایی لازم است. یکی از سلول‌هایی که برای تحریک نوروژنز مناسب است، MSCs بوده که با بیان فاکتورهای رشد و سیتوکین-ها نوروژنز را فعال می‌کند [۱٤،۱۳،۱۱]. هدف از این پژوهش، استخراج و کشت سلول‌های ADSC موش صحرایی از بافت چربی زیر جلدی و بررسی قابلیت تکثیر، تمایز و بیان فاکتورهای نوروتروفیک و نوروفیلامان نستین در محیط برون‌تنی است.

[۱] استادیار، دانشکده زیست شناسی، دانشگاه دامغان

[۲] کارشناس ارشد زیست شناسی تکوینی، دانشکده زیست شناسی، دانشگاه دامغان

[۳] دانشجوی کارشناسی ارشد، دانشکده زیست شناسی، دانشگاه دامغان

*نشانی نویسنده مسوول:

ایران، دامغان، دانشگاه دامغان، کدپستی ۱۵۶۵- ۱۴۱۵۵

تلفن: ۰۹۱۲ ۵۳۱۸۷۳۲ دورنویس: ۰۲۳۲ ۵۲۴۷۱۴۶

پست الکترونیک: ghorbanian@du.ac.ir

تاریخ دریافت: ۹۰/۳/۱ تاریخ پذیرش نهایی: ۹۰/۵/۹

[Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2026-11-25]

مواد و روش‌ها

استخراج و کشت سلول‌ها

به‌منظور رعایت اصول اخلاقی کار بر روی حیوانات، مطالعه حاضر بر اساس دستور کار کمیته اخلاقی دانشکده زیست شناسی دانشگاه دامغان انجام شد. در این مطالعه تجربی، از موش صحرایی بالغ نژاد ویستار استفاده گردید. حیوانات توسط کلروفرم کاملا بیهوش شده و با رعایت شرایط استریل، قطعه‌ای از بافت چربی زیر جلدی (حدود یک گرم)، جدا گردیده و جهت استخراج مورد استفاده قرار گرفت. سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از بافت چربی پس از هضم مکانیکی و هضم آنزیمی توسط کلاژناز (محلول ۰/۲ درصد کلاژناز در Krebs-Ringer Bicarbonate Buffer)، استخراج شدند. ADSCs در محیط α-MEM (Gibco) غنی شده با ده درصد FBS (Gibco) و پنی‌سیلین-استرپتومایسین (Gibco) یک درصد در فلاسک $25cm^2$(Falcon) کشت داده شده و در شرایط، با دمای ۳۷ درجه سانتی گراد، و CO_2 ۵ درصد قرار داده شد. پس از ٤٨ ساعت با تعویض محیط، سلول‌های شناور از سلول‌های چسبیده به کف فلاسک جدا گردیدند. پس از رسیدن سلول‌ها به تراکم ۷۰ تا۸۰ درصد به کمک تریپسین ۰/۲۵ درصد به‌همراه EDTA ۰/۰۲ درصد (Merck) سلول‌ها از کف فلاسک جدا شده و با تراکم 5×10^5 سلول در هر فلاسک subculture تهیه شد. در این تحقیق از سلول‌های پاساژ سوم استفاده گردید. برای ارزیابی حیات سلولی و تعیین سرعت تکثیر (زمان دو برابر شدن) سلول‌های MSCs استخراج شده از بافت چربی و کشت شده در شرایط فوق الذکر، در ٢٤، ٤٨ و ٧٢ ساعت پس از کشت در پاساژهای ۲ تا ۵ به‌روش هموسایتومتری (Hemocytometer) شمارش شدند. همچنین، با استفاده از روش نشان‌دار کردن سلول‌ها توسط Brdu و انجام ایمنوسیتوشیمی با آنتی‌بادی آنتی Brdu کونژوگه با HRP سلول‌ها رنگ شده و شمارش سلولی صورت گرفت.

بررسی توان تمایزی ADSCs

تمایز استئوژنیک: سلول‌های پاساژ دوم در پلیت شش خانه حاوی محیط القاکننده، تمایز به استخوان (Osteocyte Differentiation Medium, Stem cell technology, BON 1008) کشت شدند. پس از گذشت ۲۱ روز، تمایز سلول‌ها با روش رنگ آمیزی آلیزارین رد (Alizarin Red S, Sigma A5533-23G)، بررسی شد. ابتدا سلول‌ها با PBS شسته شده و مدت ۱ ساعت در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد در معرض محلول فیکساتیو پارافرمالدئید ٤ درصد قرار داده شدند. سپس سلول‌ها به‌مدت ۲ دقیقه در معرض محلول رنگی آلیزارین رد قرار گرفته و در نهایت سلول‌ها با آب مقطر شسته شده و پس از خشک شدن با میکروسکوپ مشاهده گردیدند.

تمایز آدیپوژنیک: برای تمایز به سلول چربی ADSCs پاساژ دوم در پلیت شش خانه حاوی محیط القاکننده، تمایز به چربی (Adipocyte Differentiation Medium, Stem cell technology, BON 1007) کشت شدند. پس از گذشت ۲۱ روز، تمایز سلول‌ها با روش رنگ آمیزی اُیل رد (Oil Red O, Sigma O0625-25G)، بررسی شد؛ بدین ترتیب که سلول‌ها با PBS شسته شده و به‌مدت ۱ ساعت در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد در معرض محلول فیکساتیو پارا فرمالدئید ٤ درصد قرار داده شدند. سپس، سلول‌ها با الکل ۷۰ درصد شسته شده و به‌مدت ۱۰ تا ۱۵ دقیقه در معرض محلول رنگی اُیل رد قرار داده شدند. در مرحله‌ی بعد محلول رنگی خارج گردیده و سلول‌ها ۳ بار با الکل ۷۰ درصد شستشو داده شده و با میکروسکوپ مشاهده گردیدند.

رنگ‌آمیزی کرزیل ویوله

برای شناسایی و بررسی ریخت‌شناسی سلول‌های شبه-عصبی و تمایز خودبه‌خودی، سوسپانسیون سلولی بر روی لامل استریل پوشیده شده با ژلاتین ۰/۱ درصد (sigma) کشت شد. برای رنگ‌آمیزی ابتدا نمونه‌ها با استفاده از محلول ٤ درصد پارافرمالدئید (Sigma) به‌مدت نیم ساعت فیکس شده و پس از شستشو با PBS و آب‌دهی در الکل‌های با درجات نزولی انجام شد. در مرحله بعد، قرار دادن در محلول کرزیل ویوله به‌مدت ۵-۲ دقیقه و پس از آن شستشو با PBS صورت گرفت. فرایند آب‌گیری در الکل با غلظت‌های صعودی (هر کدام یک ضربه) انجام شده و عمل شفاف کردن با گزیلول (در دو مرحله هر بار ۱۰ دقیقه) صورت گرفت. در خاتمه با استفاده از چسپ انتالن (Sigma)، لامل‌ها چسبانده شده و با میکروسکوپ مشاهده و عکس‌برداری شد.

ایمنوسیتوشیمی

برای تعیین هویت ADSCs استخراج شده از بافت چربی، پس از کشت سلول‌ها بر روی لامل آغشته به ژلاتین با تراکم 5×10^4 در سانتی‌متر مربع سلول، به‌روش ایمنوسیتوشیمی، نمونه‌ها با آنتی‌بادی‌های آنتی nestin (۱:۱۰۰) (Sigma, N5413)، و آنتی CD90 (۱:۲۰) (Miltenyi Biotec-130094524) ارزیابی شدند. پس از شستشوی سلول‌ها با PBS، مدت۲۰ دقیقه در پارافرمالدهید ٤ درصد ثبوت انجام شد. سپس به-مدت ۱۵ دقیقه در معرض Triton X-100 ۰/۳ درصد و مدت ۱۵ دقیقه سرم ۱۰ درصد نرمال بز قرار داده شدند. پس از آن، نمونه‌ها به‌مدت یک‌شب در دمای ٤ درجه و شرایط مرطوب در

[Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2026-11-25]

معرض آنتی بادی اولیه nestin و CD90 انکوبه گشتند. پس از شستشو، نمونه‌ها به‌مدت یک‌ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و شرایط مرطوب به‌ترتیب با آنتی‌بادی ثانویه ضد خرگوش (Chemicon, AP132F) (۱:۱۰۰) کونژوگه به FITC و آنتی بادی ثانویه ضد موش (۱:۱۰۰) کونژوگه به رودامین (۱:۱۰۰) (Millipore-AP124R) در تاریکی انکوبه شدند. در پایان نمونه‌ها با میکروسکوپ فلورسنت (E600-Eclipse Nikon) و دوربین دیجیتال (Nikon Digital Camera DXM 1200) مطالعه و عکس‌برداری شدند. برای نشانگر Brdu از آنتی‌بادی آنتی Brdu (B2531 sigma) (۱:۱۰۰) و آنتی‌بادی ثانویه کونژوگه به HRP (A2304 sigma) (۱:۲۰۰) استفاده شد. با استفاده از محلول Diaminobenzidine (DAB) نمونه‌ها رنگ-آمیزی شد. برای آزمودن درستی روش کار با حذف آنتی‌بادی اولیه، واکنش مثبت کاذب کنترل گردید. برای هر یک از آنتی‌بادی-ها در هر گروه سه بار تکرار انجام شد.

روش بررسی RT-PCR

برای بررسی ژن‌ها، از روش (Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction; RT-PCR) استفاده شد. برای این منظور RNA کل سلول‌های مورد نظر در پاساژهای مختلف، با استفاده از RNX- Plus و مطابق با دستور کار سیناژن جداسازی شد. پس از اطمینان یافتن از کیفیت RNA استخراج شده با انجام الکتروفورز روی ژل آگاروز و اسپکتروفتومتری، برای تهیه cDNA تک زنجیره‌ای با ۰/۵ میکروگرم RNA و استفاده از پرایمر oligo (dt) و آنزیم ترانس کریپتاز معکوس [Revert Aid First Strand cDNA synthesis Kit(K1622, Fermentas, EU)] تهیه شد، (واکنش RT در حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر انجام گرفت). در ادامه واکنش PCR در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر انجام شده و جهت تهیه حجم مذکور، علاوه بر DNA الگو (محصول واکنش RT) از کیت PCR (سیناکلون)، و ۱۰ پیکومولار پرایمرهای بالادست و پایین‌دست استفاده شد. پس از آماده ساختن حجم مورد نظر برای ادامه کار، واکنش PCR با شرایط باز شدن اولیه ۹۴ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۲ دقیقه، و سیکل‌های با شرایط باز شدن ۹۴ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۳۰ ثانیه، اتصال ۵۵ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۳۰ ثانیه، گسترش ۷۲ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۳۰ ثانیه و پس از اتمام ۳۴ سیکل، مرحله گسترش نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۵ دقیقه انجام شد. بعد از اتمام واکنش، ۸ میکرولیتر از محصول واکنش PCR توسط الکتروفورز ژل آگار ۱/۵ درصد بررسی شد. ژن (β_2 β2M microglobulin;) به‌عنوان ژن کنترل داخلی استفاده شد. توالی و شماره دست‌یابی پرایمرها در جدول شماره ۱ آمده است.

جدول شماره ۱- توالی پرایمرهای مورد استفاده، اندازه و شماره دست‌یابی آن‌ها در بانک ژن

نام ژن	کد دسترسی	اندازه bp	توالی پرایمر
NGF	NM-012610	۱٦٤	F: 5'-CCTCTTCGGACACTCTGGA-3' R: 5'-CGTGGCTGTGGTCTTATCT-3'
CNTF	NM-013166	۷۰	F: 5'-CTG GCT AGC AAG GAA GAT TCG-3' R: 5'-CAG GCC CTG ATG TTT TAC ATA AGA-3'
NT3	NM-031073	۱۸۱	F: 5'-AGG TCA GAA TTC CAG CCG AT-3' R: 5'GTT-TCC-TCC-GTG-GTG-ATG-TT-3'
NT4	NM-013184	۲۱۳	F: 5'-TATGTGCGGCGTTGACTGC-3' R: 5'CACAGTCAGAAGGCACGGTA-3'
GDNF	NM-019139	۲٥٤	F: 5'-GAC TCC AAT ATG CCC GAA GA-3' R: 5'-TAG CCC AAA CCC AAG TCA GT-3'
B2m	NM-012512	۳۱۸	F: 5'-CCG TGA TCT TTC TGG TGC TT-3' R: 5'-TTT TGG GCT TCA GAG TG-3'
BDNF	D 10938	٤۰٥	F: 5'-GCC CAA CGA AGA AAA CCA TA-3' R: 5'-GAT TGG GTA GTT CGG CAT TG-3'

آنالیز آماری

تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS ویرایش ۱٦ انجام گرفت. محاسبات آماری برای بررسی اختلاف بین زمان دو برابر شدن سلول‌های ADSC در پاساژهای مختلف با استفاده از آزمون واریانس یک‌طرفه و به‌دنبال آن آزمون تعقیبی Tukey انجام شد. مرز استنتاج آماری نتایج $P\leq$۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

نتایج

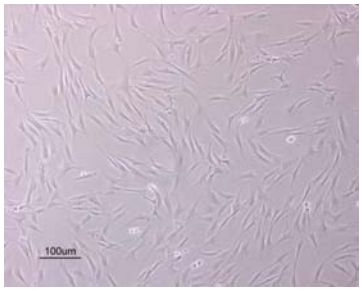
سلول‌های بنیادی مشتق از بافت چربی در کشت اولیه با

[Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2026-11-25]

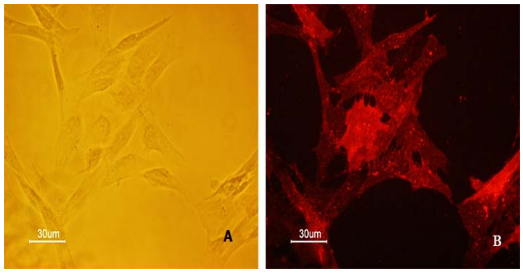
اشکال مختلف سلولی دیده می‌شوند، که به‌تدریج در پاساژهای بعدی، فنوتیپ سلولی یک‌دست می‌شود. سلول‌های مزانشیمی، سلول‌هایی هستند که ۲ تا ۳ روز پس از کشت اولیه کف ظرف کشت را پر کرده و به تراکم confluency (۷۰ تا ۸۰ درصد) می‌رسیدند. این سلول‌ها به ظرف کشت چسبیده، به‌سرعت تکثیر شده و معمولا به سه شکل در محیط نمایان هستند. تعدادی از سلول‌ها که در حال تکثیر هستند ظاهری کروی و کوچک داشته و برخی دیگر که بیشتر سلول‌ها را به‌خود اختصاص می‌دهند به شکل دوکی و شبه فیبروبلاستی مشخص می‌شوند. تعداد کمی از سلول‌ها به‌صورت پهن و از نظر اندازه بزرگ‌تر از سایر سلول‌ها، در محیط کشت دیده می‌شوند (شکل شماره ۱). سلول‌های دوکی با ظاهر فیبروبلاست مانند در بین سلول‌های مزانشیمی مشهودتر است. در پاساژهای بالاتر، از سرعت تکثیر سلولی کاسته شده و مورفولوژی آن‌ها به سلول‌های پهن‌تر تغییر یافت. ارزیابی میزان حیات سلولی نشان داد، که بیش از ۹۵ درصد سلول‌ها در پاساژهای مختلف زنده بودند. مقایسه زمان دوبرابر شدن سلول‌های ADSC در پاساژهای مختلف، بر اساس آزمون واریانس یک طرفه صورت گرفت (جدول شماره ۲). فرض همگنی واریانس‌ها بررسی گردیده و آزمون لون (Levene's test) نتایج معنی‌داری را نشان نداد. همچنین، نرمالیتی برقرار بود. نتایج، اختلاف معنی‌داری را بین پاساژهای مختلف نشان داد ($P\leq$۰/۰۵). مقایسه زوجی با آزمون Tukey فقط اختلاف معنی‌داری را بین پاساژ پنجم با هر یک از چهار پاساژ دیگر نشان داد ($P\leq$۰/۰۵). سایر مقایسه‌های زوجی معنی‌دار نبود.

بررسی ایمنوسیتوشیمی

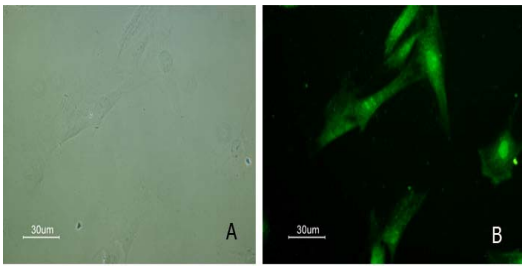
جهت تعیین هویت ADSCs ایمنوسیتوشیمی علیه نشانگرهای nestin و CD90 انجام شد. نتایج نشان داد که ADSCs نشانگر CD90 را به‌میزان ۹۰ و نستین را به‌میزان ۸۰ درصد بیان می‌کنند (شکل‌های شماره ۲ و ۳). برای هر نشانگر سه بار تکرار و برای هر نمونه به‌صورت تصادفی، سلول‌های ۲۰ زمینه شمارش شدند.



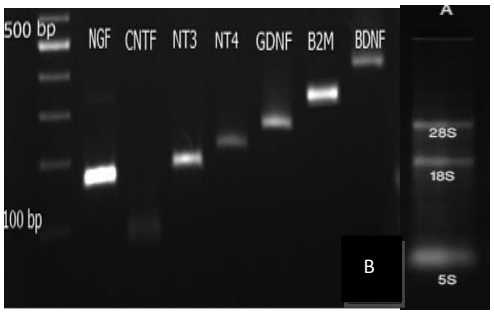
شکل شماره ۱- مشاهده تصویر فازکنتراست ADSCs پاساژ ٤ که در محیط αMEM حاوی سرم ده درصد کشت داده شدند.



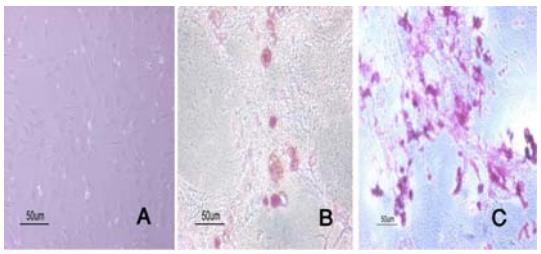
شکل شماره ۲- تعیین هویت سلول‌های بنیادی مزانشیمی به‌روش ایمنوسیتوشیمی. مشاهده سلول‌های ADSCs که به نشانگر CD90 پاسخ داده‌اند (A) تصویر فازکنتراست. (B) تصویر فلورسانس رنگ شده با رودامین



شکل شماره ۳- بررسی بیان نشانگر نستین به روش ایمنوسیتوشیمی در سلول‌های ADSCs. مشاهده سلول‌های ADSCs که به نشانگر نستین پاسخ داده‌اند (A) تصویر فازکنتراست. (B) تصویر فلورسانس رنگ شده با FITC.



شکل شماره ٤- (A) الکتروفورز RNA کل سلول که باندهای S ۵، S ۱۸ و S ۲۸ دیده می‌شود. (B) الگوی بیان ژن فاکتورهای نوروتروفیک در سلول‌های بنیادی مزانشیمی استخراج شده از بافت چربی به‌روش RT-PCR که در تصویر الکتروفورز آن دیده می‌شود. از چپ به راست (NGF, CNTF, NT3, NT4, GDNF, β2M, BDNF)

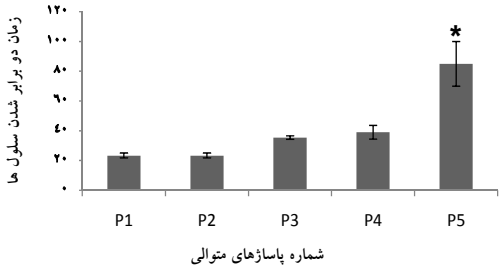


شکل شماره ۵- تصویر فازکنتراست سلول‌های ADSC القا نشده A، مشاهده سلول‌های تمایز یافته ADSCs به سلول‌های چربی B و استخوانی C که به ترتیب با رنگ آمیزی Oil Red-O و Alyzarin Red نشان داده می‌شود.

[Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2026-11-25]



شکل شماره ٦- ارزیابی تکثیر سلول‌های ADSC که با Brdu نشان-دار شده و پس از ایمنوسیتوشیمی که با آنتی‌بادی آنتی Brdu هسته سلول‌های تکثیر شده به رنگ قهوه‌ای دیده می‌شوند.



نمودار شماره ۱- مقایسه زمان دو برابر شدن سلول‌های ADSC در پاساژهای مختلف. مقایسه زوجی زمان دو برابر شدن پاساژ پنجم با هر یک از پاساژهای دیگر نشان دهنده‌ی اختلاف معنی‌دار ($P\leq$۰/۰۵) می‌باشد.

جدول شماره ۲- زمان دو برابر شدن ADSCs در پاساژهای مختلف

زمان دو برابر شدن (ساعت)	تعداد سلول برداشت شده	تعداد سلول کشت شده	تعداد پاساژ
۲۳/۳	۲۴۰۹۰۰۰	۵۰۰۰۰۰	۱
۲۳/۳	۲۳۰۳۳۳۳	۵۰۰۰۰۰	۲
۲۶/۹	۱۷۱۱۶۶۶	۵۰۰۰۰۰	۳
۳۹	۱۲۸۸۳۳۳	۵۰۰۰۰۰	۴
۴۰/۵۳	۱۲۲۳۳۳۳	۵۰۰۰۰۰	۵

زمان دو برابر شدن ADSCs در پاساژهای مختلف بر اساس فرمول زیر محاسبه شده است:

PDT= total time elapsed/number of generations

$R=3.32(\log N_h-\log N_i)/(t_2-t_1)$ $PDT= 1/R$

PDT: زمان دوبرابر شدن سلول‌ها R: سرعت تکثیر، N_h: تعداد سلول‌های برداشت شده، N_i: تعداد سلول‌های کشت شده، (t_2-t_1): مدت زمان کشت

بحث

هرچند مغز استخوان به‌عنوان اولین منبع MSCs شناخته شده، اما این سلول‌ها را می‌توان از بافت‌های دیگر نیز استخراج و کشت نمود. بافت چربی بالغ همانند مغز استخوان از بافت مزانشیمی جنینی منشا گرفته و با نام سلول‌های بنیادی مشتق از بافت چربی (ADSC) شناخته می‌شود. بافت چربی یکی از غنی-ترین منابع دارای سلول‌های بنیادی است که به سادگی بدون آسیب به بافت، تهیه و کشت می‌شوند. هم‌چنین، این سلول‌ها را می‌توان از فرد بیمار تهیه و به‌صورت اتوگرافت بدون نگرانی از رد پیوند برای درمان استفاده نمود [۱۵،۸]. ADSCs منبع سلولی مناسبی برای پزشکی ترمیمی هستند. استفاده از این سلول‌ها برای سلول درمانی و مهندسی بافت به‌دلیل استخراج ساده آنها از بافت چربی زیر جلدی نسبت به مغز استخوان ترجیح داده می‌شود [۱٦]. این جمعیت سلولی را می‌توان به‌سادگی از بافت چربی انسان برداشت و در محیط کشت، به انواع سلول‌های با منشا مزانشیمی و رده سلولی عصبی تمایز داد [۱۷،۸،۲]. اولین بار Fridenstein سلول-های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان را سلول‌های غیرهماتوپوئیتیک و چسبنده با قابلیت تشکیل کلونی فیبروبلاستی معرفی نمودند. این واحدهای کلونی فیبروبلاستی (CFU-Fs) که قادرند در شرایط درون و برون‌تنی به سلول‌های استئوژنیک، آدیپوژنیک و کندروژنیک تمایز یابند [۲۰-۱۸]. در مطالعه حاضر، ADSC ها از بافت چربی زیر جلدی موش صحرایی بالغ با استفاده از روش هضم مکانیکی و آنزیمی (آنزیم کلاژناز) و انجام سانتریفوژ، استخراج و کشت شد. این سلول‌ها در کشت اولیه به‌سرعت به کف فلاسک چسبیده و با گذشت ۲ تا ۳ روز ظرف کشت را کاملا مفروش نمودند. همان‌گونه که در تصاویر مشاهده می‌شود، بیشتر سلول‌ها ظاهری دوکی، کشیده و فیبروبلاست مانند دارند. در سایر پژوهش‌ها نیز کشت این سلول‌ها با استفاده از هضم آنزیمی توسط کلاژناز و سانتریفوژ و یا عبور از فیلترهای مخصوص انجام شده است [۸]. ADSCs به سلول‌هایی با خاصیت چسبندگی به پلاستیک و قابلیت خودتکثیری و چند ظرفیتی اطلاق می‌شود [۱۸]. هم‌چنین، یکی از مزیت‌هایی که برای این سلول‌ها قایل هستند سرعت تکثیر بسیار بالا است [۱۹]. نتایج پژوهش حاضر نشان داد که سرعت تکثیر ADSCها در پاساژهای متعدد با یکدیگر اختلاف داشته و سرعت و توان تکثیر سلولی در پاساژهای پایین‌تر، بیشتر است. جدول شماره ۲ نیز، نشان‌دهنده افزایش زمان دو برابر شدن ADSCها در پاساژهای متوالی است و در پاساژ دوم زمان دو برابر شدن ۲۳/۳۳ و در پاساژ پنجم ٤۰/۵۳ ساعت می‌باشد. این افزایش زمان در پاساژهای بالا نشان از کاهش سرعت و ظرفیت تکثیری سلول‌ها است. گزارش‌ها اندکی در مورد زمان دو برابر شدن سلولی وجود دارد که در این مورد می‌توان به گزارش Chen و همکاران اشاره کرد که در آن زمان دو برابر شدن در MSCs خون بند ناف انسان ۲٦ ساعت گزارش شده است [٦]. ارزیابی حیات، و شمارش سلولی به‌روش هموسایتومتر نشان داد که ۹۵ درصد سلول‌ها زنده بودند. نتایج نشان‌دار کردن هسته سلول‌ها با Brdu نشان دهنده قابلیت تکثیر این سلول‌ها است که بیش از ۹۰

[Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2026-11-25]

درصد سلول‌ها در هر نوبت پاساژ سلولی تکثیر یافتند (تصویر شماره ٦). برای اطمینان از درجه خلوص و تعیین ماهیت MSCs از نشانگرهای متعددی استفاده می‌شود. یکی از نشانگرهای مورد استفاده CD90 است که پروتئین سطحی سلول‌های بنیادی است و ۹٦ درصد ADSCs به این نشانگر پاسخ مثبت می‌دهند [۲۳-۲۱]. در پژوهش حاضر ایمنوسیتوشیمی برای نشانگر CD90 نشان داد که ۹۰ درصد سلول‌ها به این نشانگر واکنش مثبت داده‌اند (تصویر شماره ۲). هم‌چنین، برای نشان دادن قابلیت چند ظرفیتی این سلول‌ها، تمایز به سلول‌های چربی و استخوان نیز صورت گرفت. پس از اثر محیط تمایزی آدیپوژنیک و استئوژنیک بر ADSCs کشت شده، به‌تدریج مورفولوژی شبیه سلول چربی و استخوان ظاهر گردیده و پس از سه هفته رنگ‌آمیزی اختصاصی انجام شد (تصویر شماره ۵). تمایز چربی با تجمع قطرات لیپید از هفته اول آغاز می شود که پس از ۲۱ روز با رنگ آمیزی Oil Red-O قابل مشاهده است. همچنین ADSCs در شرایط کشت تمایزی استئوژنیک با تولید فسفات کلسیم تولید شده و ماتریکس خارج سلولی معدنی، پس از ۲۱ روز با رنگ آمیزی Alyzarin Red مشاهده می‌گردد. سایر مطالعات نشان می‌دهد که این سلول‌ها پس از ١٤ تا ۲۱ روز کشت در محیط تمایزی آدیپوژنیک و استئوژنیک، به سلول‌های چربی و استخوان تمایز یافته‌اند [۲۳،۱۸]. وقتی که سلول‌های بنیادی مزانشیمی استخراج شده از مغز استخوان در معرض برخی از مواد القا کننده یا فاکتورهای رشد قرار گیرند و یا برای بیش از ۱۰ پاساژ کشت شوند، نستین را بیان می‌کنند [۲۲]. نستین به‌طور معمول برای شناسایی سلول‌های زاینده (پروژنیتور) عصبی در دستگاه عصبی مرکزی مورد استفاده قرار می‌گیرد. نستین فیلامان حدواسط سلول‌های نورواپیتلیال و پیش‌ساز عصبی است که در مراحل ابتدایی تکوین دستگاه عصبی بیان می‌شوند [۲۳]. پژوهش‌های قبلی نیز نشان می‌دهند که علاوه بر BMSC، سلول-های بنیادی عصبی (NSC) نیز در مرحله پیش‌تمایزی این نشانگر را بیان می‌کنند. همان‌طوری که در تصویر شماره ۳ دیده می‌شود ۸۰ درصد سلول‌های ADSC پاساژ ٤ تا ٥ در شرایط کشت معمولی نشانگر نستین را بیان نمودند. هم‌چنین، کشت طولانی مدت این سلول‌ها بر روی لامل آغشته به ژلاتین مورفولوژی سلول‌های چند قطبی با استطاله بلند شبه‌عصبی را نشان می‌دهد که در رنگ‌آمیزی کریزیل‌ویوله، حدود ۱۰ درصد سلول‌ها رنگ می-گیرند. در یک مطالعه نشان داده شده است که ADSCهای نستین مثبت با القا فاکتورهای رشد، نوروسفر تولید کرده و به سلول شوان تمایز یافته و ترمیم و بهبود عصب حرکتی آسیب دیده را افزایش می‌دهند [۲]. در زمینه تمایز MSCs در شرایط برون و درون‌تنی گزارش‌های متعددی وجود دارد، ولی در زمینه بیان نستین و تمایز خودبه‌خودی ADSCs گزارشی وجود ندارد. تولید و ترشح فاکتورهای رشد، سیتوکین‌ها و عوامل نوروتروفیک، یکی از قابلیت‌های سلول‌های بنیادی مزانشیمی محسوب می‌شود [۲۷-۲٤]. ADSCs در شرایط درون‌تنی بیان فاکتورهای نوروتروفیک مثل NGF، GDNF و BDNF را نشان داده‌اند [۳۲-۲۸]. بررسی‌های مختلف نشان می‌دهند که این سلول‌ها دارای قابلیت بیان و تولید برخی از فاکتورهای نوروتروفیک و مولکول‌های فعال بیولوژیک موثر و دارای اثر محافظ اعصاب در پدیده ترمیم آسیب‌های عصبی می‌باشند [۳۳]. نتایج پژوهش حاضر نیز نشان می‌دهد که ADSCها فاکتورهای نوروتروفیک NGF، CNTF، NT3، NT4/5، GDNF و BDNF را در سطح mRNA بیان می‌نمایند. فاکتورهای نوروتروفیک مثل NGF و BDNF برای بقا سلول‌های عصبی مهم بوده و ADSCs می‌توانند HGF، VEGF، NGF و BDNF در سطح پروتئین تولید کنند [۱٥،۱٤]. فاکتورهای نوروتروفیک علاوه بر دخالت در تکوین عصبی در بهبود آسیب‌ها و درمان ضایعات عصبی نیز نقش دارند. نقش این فاکتورها در نورون‌زایی، تمایز عصبی، رشد آکسون و دندریت نشان داده شده است [۳٤،۱٥]. پیوند این سلول‌ها به‌دلیل قابلیت تمایزی و اثرات نوروتروفیک می‌تواند نقش درون‌زاد خود را بر بافت میزبان باقی گذارد.

نتیجه‌گیری

با توجه به نتایج مطالعه حاضر می‌توان سلول‌های بنیادی مزانشیمی بافت چربی را به‌دلیل قابلیت خودتکثیری و ظرفیت تمایزی، بیان فاکتور نستین و هم‌چنین بیان فاکتورهای نوروتروفیک، به‌عنوان سلول مناسب برای درمان بیماری‌ها و ضایعات عصبی معرفی کرد.

تشکر و قدردانی

از دانشگاه دامغان به‌خاطر پرداخت هزینه مواد، وسایل و در اختیار گذاشتن امکانات آزمایشگاهی تقدیر و تشکر می‌گردد. هم‌چنین، بخشی از این مقاله جز پایان نامه دانشجویی و بخش دیگر در غالب طرح پژوهشی مصوب ستاد سلول‌های بنیادی معاونت علمی و فناوری ریاست جمهوری بوده است.

[Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2026-11-25]

References:

[1] Ozawa K, Sato K, Oh I, Ozaki K, Uchibori R, Obara Y, et al. Cell and gene therapy using mesenchymal stem cells (MSCs). ***J Autoimmun*** 2008; 30(3): 121-7.

[2] Tansey MG, Botterman BR, Tansey KE, McCoy MK, Martinez TN, Ruhn KA, et al. Autologous transplants of Adipose-Derived Adult Stromal (ADAS) cells afford dopaminergic neuroprotection in a model of Parkinson's disease. ***Exp Neurol*** 2008; 210(1): 14-29.

[3] Qiao C, Xu W, Zhu W, Hu J, Qian H, Yin Q, et al. Human mesenchymal stem cells isolated from the umbilical cord. ***Cell Biol Int*** 2008; 32(1): 8-15.

[4] di Summa PG, Kingham PJ, Raffoul W, Wiberg M, Terenghi G, Kalbermatten DF. Adipose-derived stem cells enhance peripheral nerve regeneration. ***J Plast Reconstr Aesthet Surg*** 2009; 63(9): 1544-52

[5] Sterodimas A, Faria J, Nicaretta B, Pitanguy I. Tissue engineering with adipose-derived stem cells (ADSCs): Current and future applications. ***J Plast Reconstr Aesthet Surg*** 2010; 63(11): 1886-92

[6] Gomillion CT, Burg KJL. Stem cells and adipose tissue engineering. ***Biomaterials*** 2006; 27(36): 6052–63.

[7] Vallée M, Côté J F, Fradette J. Adipose-tissue engineering: Taking advantage of the properties of human adipose-derived stem/stromal cells. ***Pathol Biol (Paris)*** 2009; 57(4): 309–17.

[8] Deng ZF, Wang Y, Song SX, Lai Xianliang, Min L. Effects of bone marrow mesenchymal stem cells transplantation on angiogenesis and neuronal progenitor proliferation in injured region of middle cerebral artery occlusion rats. ***Chin J Anat*** 2005; 28(5): 500-3.

[9] 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): 365.

[10] Wang Y, Deng Z. Mesenchymal stem cells regulate the proliferation and differentiation of neural stem cells through Notch signaling. ***Cell Biol Int*** 2009; 33(11): 1-7.

[11] Fraser JK, Wulur I, Alfonso Z, Hedrick MH. Fat tissue: an underappreciated source of stem cells for biotechnology. ***Trends Biotechnol*** 2006; 24(4): 150-4.

[12] Imitola J, Snyder EY, Khoury SJ. Genetic programs and responses of neural stem/progenitor cells during demyelination: potential insights into repair mechanisms in multiple sclerosis. ***Physiol Genomics*** 2003; 14(3): 171–97.

[13] Chen J, Li Y, Katakowski M, Chen X, Wang L, Lu D, et al. Intravenous bone marrow stromal cell therapy reduces apoptosis and promotes endogenous cell proliferation after stroke in female rat. ***J Neurosci Res*** 2003; 73(6): 778-86.

[14] Li Y, Chen J, Chen XG, Wang L, Gautam SC, Xu YX, et al. Human marrow stromal cell therapy for stroke in rat: neurotrophins and functional recovery. ***Neurology*** 2002; 59(4): 514-23.

[15] Tapp H, Hanley EN Jr, Patt JC, Gruber HE. Adipose-derived stem cells: characterization and current application in orthopaedic tissue repair. ***Exp Biol Med (Maywood)*** 2009; 234(1): 1-9.

[16] Higuchia A, Chuanga CW, Lingc QD, Huange SC, Wange LM, Chena H, et al. Differentiation ability of adipose-derived stem cells separated from adipose tissue by a membrane filtration method. ***J Memb Sci*** 2011; 366: 286–94.

[17] Bia L, Caplan A, Lennon D, Miller RH. Human mesenchymal stem cells signals regulate neural stem cell fate. ***Neurochem Res*** 2007; 32(2): 353–62.

[18] Li G, He Q, Wan C. Concise review multipotent mesenchymal stromal cells in blood. ***Stem Cells*** 2007; 25(1): 69–70.

[19] Meirelles Lda S, Fontes AM, Covas DT, Caplan AI. Mechanisms involved in the therapeutic properties of mesenchymal stem cells. ***Cytokine Growth Factor Rev*** 2009; 20(5-6): 419–27.

[20] Park IS, Han M, Rhie JW, Hyun Kim S, Jung Y, Hwan Kim I, et al. The correlation between human adipose-derived stem cells differentiation and cell adhesion mechanism. ***Biomaterials*** 2009; 30(36): 6835–43.

[21] Martinello T, Bronzini I, Maccatrozzo L, Mollo A, Sampaolesi M, Mascarello F, et al. Canine adipose-derived-mesenchymal stem cells do not lose stem features after a long-term cryopreservation. ***Res Vet Sci*** 2011; 91(1): 18–24.

[22] Lei Z, Yongda L, Jun M, Yingyu S, Shaoju Z, Xinwen Z, Mingxue Z. Culture and neural differentiation of rat bone marrow mesenchymal stem cells in vitro. ***Cell Biol Int*** 2007; 31(9): 916-23.

[23] Radtke C, Schmitz B, Spies M, Kocsis JD, Vogt PM. Peripheral glial cell differentiation from neurospheres derived from adipose mesenchymal stem cells. ***Int J Dev Neurosci*** 2009; 27(8): 817–23.

[24] Tohill M, Mantovani C, Wiberg M, Terenghi G. Rat bonemarrow mesenchymal stem cells express glial markers and stimulate nerve regeneration. ***Neurosci Lett*** 2004; 362: 200–3.

[25] Dezawa M, Takahashi I, Esaki M, Takano M, Sawada H. Sciatic nerve regeneration in rats induced by transplantation of in vitro differentiated bonemarrow stromal cells. ***Eur J Neurosci*** 2001; 14: 1771–6.

[26] Keilhoff G, Goihl A, Langnase K, Fansa H, Wolf G. Transdifferentiation of mesenchymal stem cells into Schwann cell-like myelinating cells. ***Eur J Cell Biol*** 2006; 85(1): 11–24.

[27] Keilhoff G, Goihl A, Stang F, Wolf G, Fansa H. Peripheral nerve tissue engineering: autologous Schwann cells vs. transdifferentiated mesenchymal stem cells. ***Tissue Eng*** 2006; 12(6): 1451–65.

[28] Wei X, Zhao L, Zhong J, Gu H, Feng D, Johnstone BH, et al. Adipose stromal cells-secreted

[Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2026-11-25]

neuroprotective media against neuronal apoptosis. ***Neurosci Lett*** 2009; 462(1): 76–9.
[29] Kalbermatten DF, Schaakxs D, Kingham PJ, Wiberg M. Neurotrophic activity of human adipose stem cells isolated from deep and superficial layers of abdominal fat. ***Cell Tissue Res*** 2011; 344(2): 251-60.
[30] de Villiers JA, Houreld N, Abrahamse H. Adipose Derived Stem Cells and Smooth Muscle Cells: Implications for Regenerative Medicine. ***Stem Cell Rev*** 2009; 5(3): 256–65.
[31] Hausmana G J, Barb C R, Dean R G. Patterns of gene expression in pig adipose tissue: Insulin-like growth factor system proteins, neuropeptide Y (NPY), NPY receptors, neurotrophic factors and other secreted factors. ***Domest Anim Endocrinol*** 2008; 35(1): 24–34.
[32] Zhao L, Wei X, Ma Z, Feng D, Tu P, Johnstone B H, et al. Adipose stromal cells-conditional medium protected glutamate-induced CGNs neuronal death by BDNF. ***Neurosci Lett*** 2009; 452(3): 238–40.
[33] Lu S, Lu C, Han Q, Li J, Du Z, Liao L, et al. Adipose-derived mesenchymal stem cells protect PC12 cells from glutamate excitotoxicity-induced apoptosis by upregulation of XIAP through PI3-K/Akt Activation. ***Toxicology*** 2011; 279(1-3): 189–95.
[34] An Official Publication of the American College, Neuropsychopharmacology: The 5th Generation of Progress, 207-8. An Official Publication of the American College; 2002.

[Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2026-11-25]