

اندازه‌گیری فاکتورهای بیوشیمیایی حاصل از تمایز سلول‌های بنیادی خون بند ناف انسان به سلول‌های شبه کبدی در آزمایشگاه

چکیده :

مقدمه و هدف: خون بند ناف به عنوان یک منبع از سلول‌های بنیادی خون‌ساز است. این سلول‌ها نیای سلول‌هایی هستند که می‌توانند سیستم خون‌ساز در بیماران مبتلا به بیماری‌های بدخیم و خوش‌خیم را بازسازی کنند. سلول‌های بنیادی مزانشیمی که از خون بند ناف انسان مشتق می‌شوند، در محیط آزمایشگاه، به انواع مختلفی از سلول‌ها از جمله؛ استخوان، غضروف و چربی تمایز می‌یابند. این مطالعه، امکان تبدیل سلول‌های بنیادی مزانشیمی را که از سلول‌های بنیادی خون بند ناف به دست آمده‌اند به سلول‌های کبدی در محیط آزمایشگاه بررسی می‌کند.

مواد و روش‌ها: این یک مطالعه تجربی است که در سال ۱۳۸۷ در دانشگاه پیام نور مرکزی تهران با همکاری دانشگاه علوم پزشکی همدان انجام شد. خون بند ناف انسان از بیمارستان فاطمیه همدان تهیه شد و سلول‌های بنیادی مزانشیمی از آن به وسیله سانتریفیوژ بر اساس شیب غلظت جدا و سلول‌های تک هسته‌ای آن کشت داده شد. وقتی تراکم سلولی سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق شده از خون بند ناف انسان به ۸۰ درصد رسید، با استفاده از محلول تریپسین - اتیلن دی‌آمین تترا استیک اسید پاساژ داده شدند. سپس از پاساژ دوم سلول‌ها را در محیط کشت DMEM حاوی ۱۰ میلی‌لیتر بر لیتر سرم جنینی گاوی، ۲۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر فاکتور رشد کبدی، ۱۰ نانوگرم بر لیتر فاکتور رشد فیبروبلاستی بازی و ۲۰ نانوگرم بر لیتر انکوستاتین M کشت داده شدند. به طور متوسط هر سه روز یک‌بار محیط‌ها را تعویض کرده و محیط‌های جمع‌آوری شده در فریزر ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد تا ذخیره آلومین، اوره، آلکالین فسفاتاز و آلفا فیتوپروتئین اندازه‌گیری شود. در پایان سلول‌های تمایز یافته با رنگ‌آمیزی پریودیک اسید شیف جهت بررسی ذخیره گلیکوژن در سلول‌ها مورد بررسی قرار گرفت.

یافته‌ها: اندازه‌گیری فاکتورهای بیوشیمیایی در روزهای مختلف کشت نشان داد که غلظت آلومین، اوره، آلکالین فسفاتاز و آلفا فیتوپروتئین به تدریج در طی تمایز افزایش یافت. همچنین رنگ‌آمیزی پریودیک اسید شیف حاکی از ذخیره گلیکوژن در این سلول‌ها بود.

نتیجه‌گیری: نتایج این مطالعه نشان داد که سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از خون بند ناف انسان می‌توانند در آزمایشگاه تحت القاء فاکتورهای رشد کبدی و فیبروبلاستی پایه به سلول‌های کبدی تمایز یابند.

واژه‌های کلیدی: سلول‌های بنیادی، بند ناف، سلول کبدی، تمایز

آمنه خرم‌رودی *

دکتر سیما نصری **

دکتر ایرج امیری ***

* کارشناس ارشد زیست‌شناسی، دانشگاه پیام نور تهران، دانشکده علوم، گروه زیست‌شناسی
** دکترای زیست‌شناسی، استادیار دانشگاه پیام نور تهران، دانشکده علوم، گروه زیست‌شناسی
*** دکترای آناتومی، دانشیار دانشگاه علوم پزشکی همدان، دانشکده پزشکی، گروه علوم تشریح

تاریخ وصول: ۱۳۸۸/۴/۲۸

تاریخ پذیرش: ۱۳۸۸/۷/۱۳

مؤلف مسئول: دکتر سیما نصری

پست الکترونیکی: s_nasri2000@yahoo.com

مقدمه

پیوند کبد یکی از مؤثرترین راه‌های درمانی برای افراد مبتلا به نارسایی‌های مزمن یا حاد کبدی می‌باشد^(۱)، با این حال تعداد کمی از بیماران توانایی دریافت کبد را خواهند داشت. از این رو نیاز به جایگزینی راه‌های درمانی بهتر ضروری به نظر می‌رسد. کبد‌های مصنوعی یا پیوند سلول‌های کبد، از ایده‌های مطرح شده‌ای می‌باشند که تحقیقاتی بر روی آنها صورت گرفته است^(۲ و ۳). سلول‌های بنیادی به عنوان سلول‌هایی که دارای قابلیت خودتجدیدی بوده و می‌توانند به انواع گوناگون سلول‌ها تمایز یابند به عنوان یکی از گزینه‌های مورد نظر برای تهیه سلول‌های کبدی مورد بررسی قرار گرفتند^(۴ و ۵).

سلول‌های بنیادی به طور کلی به دو گروه تقسیم می‌شوند؛ سلول‌های بنیادی جنینی^(۱) و سلول‌های بنیادی بالغ^(۲)، که نقش و ویژگی‌های متفاوتی دارند^(۱۰ - ۶). بررسی‌ها نشان داده است خونی که از بند ناف و جفت پس از زایمان باقی می‌ماند و معمولاً دور ریخته می‌شود، نیز حاوی هر دو سلول‌های بنیادی خون‌ساز و سلول‌های مزانشیمی چندتوان^(۳) می‌باشد که می‌تواند جهت استفاده کلینیکی و پژوهش‌های تحقیقی مورد استفاده قرار گیرند^(۱۱ و ۱۲). خون بند ناف^(۴) به عنوان یک منبع نادر، اما گرانبها از سلول‌های بنیادی خون‌ساز اولیه و به عنوان سلول‌های اجدادی که می‌توانند سیستم خون‌ساز را در بیماران مبتلا به بیماری‌های بدخیم یا غیربدخیم به حال اول برگردانند، شناخته

شده‌اند^(۱۴ - ۱۱). خون بند ناف به عنوان منبعی غنی از سلول‌های بنیادی خون‌ساز اولیه^(۵) می‌باشد، به طوری که بعضی از محققین خون بند ناف را بهترین منبع برای سلول‌های بنیادی خون‌ساز اولیه نسبت به مغز استخوان در نظر گرفته‌اند^(۱۷ - ۱۵).

یکی از مهم‌ترین کاربردهایی که در آینده برای سلول‌های بنیادی متصور می‌شود استفاده از آنها در پیوندهای سلولی می‌باشد که این امر با توجه به قابلیت تمایز آنها به سلول‌های مختلف امکان‌پذیر می‌گردد. در مورد تمایز سلول‌های بنیادی به انواع سلول‌های بالغ پژوهش‌های فراوانی انجام پذیرفته است. برخی از مطالعه‌های فوق تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی^(۶) به رده‌های سلولی مزودرمی، هم‌چون؛ سلول‌های استخوانی، غضروفی و چربی، سلول ماهیچه قلبی، سلول‌های عصبی و سلول‌های شبه کبدی را در بدن موجود زنده و در محیط آزمایشگاه گزارش کرده‌اند^(۲۶ - ۱۸). امروزه تمایز انواع مختلف سلول‌های بنیادی به سلول‌های کبدی در آزمایشگاه به طور وسیعی تحت مطالعه قرار دارد و راه‌های مختلفی نیز برای اثبات این تمایز مورد استفاده قرار می‌گیرند. یکی از مهم‌ترین این راه‌ها بررسی‌های بیوشیمیایی می‌باشد. در هنگام تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی به سلول‌های کبدی،

-
- 1-Embryonic Stem Cell
 - 2-Adult Stem Cell
 - 3-Multipotent Mesenchymal Stem Cell
 - 4-Umbilical Cord Blood
 - 5- Hepatopoietic Stem Cell (HSC)
 - 6-Mesenchymal Stem Cell

خون بند ناف نوزاد انسان از بیمارستان فاطمیه همدان به دست آمد که بدین منظور بلافاصله بعد از تولد نوزادان، بند ناف و جفت از اتاق زایمان تحویل گرفته شد و به وسیله یک سوزن استریل خون از سیاهرگ بند ناف گرفته شد و به درون کیسه جمع کننده خون محتوی ماده ضد انعقاد هپارین یا اسید سیترات دکستروز^(۲) تخلیه شد.

جداسازی سلول‌های بنیادی از خون بند ناف طبق روش‌های اثبات شده به وسیله محققین دیگر انجام پذیرفت. بدین منظور خون بند ناف به نسبت یک به یک با محلول بافر فسفات^(۳) رقیق شده و با نسبتی حدود یک به دو (فایکول به خون بند ناف) روی فایکول ریخته شد. سلول‌های تک هسته‌ای پس از دو بار سانتریفیوژ به مدت ۴۰ دقیقه با ۲۲۰۰ دور در دقیقه و شستشو با بافر فسفات از خون بند ناف جدا شدند. سپس سلول‌های تک هسته‌ای به دست آمده در محیط کشت DMEM حاوی ۱۰ درصد سرم جنین گاوی ۱۰۰ واحد بر میلی‌لیتر پنی سیلین، ۱۰۰ واحد بر میلی‌لیتر استرپتومایسین و ۲ میلی‌مول بر لیتر آل‌گلوتامین ریخته شده و به فلاسک‌های کشت ۲۵ سانتی‌متر مکعب NUNC منتقل شدند و در انکوباتور حاوی دی‌اکسیدکربن به میزان ۵ درصد و دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد کشت داده شدند (۲۷ و ۲۳). به تدریج در طی دوره کشت با تعویض محیط کشت (دو الی سه

فاکتورهای بیوشیمیایی مختلفی نظیر؛ آلفا فیتوپروتئین، آلكالین فسفاتاز، کلسیم، اوره و آلبومین ساخته می‌شوند که اندازه‌گیری آنها در محیط کشت، می‌تواند تمايز سلولی را تأیید کند (۲۷)، لذا به نظر می‌رسد که سنجش فاکتورهای فوق نقش مهمی در اثبات تمايز سلول‌های بنیادی به سلول‌های کبدی دارد. هدف از این مطالعه تمايز سلول‌های بنیادی خون بند ناف به سلول‌های کبدی و ارزیابی فعالیت آلكالین فسفاتاز، آلفا فیتوپروتئین، کلسیم، اوره و آلبومین از طریق روش‌های بیوشیمیایی همراه با اثبات تجمع گلیکوژن در سلول‌های حاصل از تمايز به کمک رنگ‌آمیزی پریودیک اسید شیف^(۱) بود.

مواد و روش‌ها

این یک مطالعه تجربی از نوع مطالعات پایه ای بود که در دانشگاه پیام نور مرکزی تهران با همکاری مرکز تحقیقات پزشکی مولکولی دانشگاه علوم پزشکی همدان در سال ۱۳۸۷ انجام پذیرفت.

کلیه مواد مورد استفاده در این پژوهش جهت کشت و تمايز سلول‌ها از شرکت‌های سیگما (آمریکا) و گییکو (آلمان) خریداری شد. هم‌چنین کیت‌های تشخیصی اوره، آلبومین، کلسیم و آلكالین فسفاتاز از شرکت پارس آزمون ایران خریداری شد. کیت تشخیصی آلفا فیتوپروتئین به روش الیزا از شرکت پیشتاز طب ایران تهیه شد.

1-Periodic Acid-Schiff (PAS)
2-Acid Citrate Dextrose (ACD-B)
3-Phosphate Buffer Saline (PBS)

روز یکبار) سلول‌های خونی و خون‌ساز به دلیل عدم توانایی در اتصال به کف ظروف کشت از سلول‌های مزانشیمی جدا و حذف شدند، در حالی که سلول‌های بنیادی مزانشیمی با توجه به قابلیت اتصال آنها به کف فلاسک‌های کشت رشد نموده و تکثیر پیدا کردند و پس از آنکه بیش از ۸۰ درصد از کف فلاسک را پوشانیدند، پاساژ داده شدند و پس از آن، پاساژ سلولی هر سه روز یکبار تجدید شد.

برای تمایز سلول‌های مزانشیمی به سلول‌های کبدی از پاساژهای دوم و سوم سلول‌های بنیادی استفاده شد. بدین صورت هنگامی که تراکم سلولی در فلاسک به ۸۰ درصد رسید، محیط کشت عادی را از ظرف‌های کشت خارج ساخته و محیط کشت مخصوص جهت هدایت سلول‌های بنیادی به سمت تبدیل شدن آنها به سلول‌های کبدی که از قبل تهیه شده بود به داخل فلاسک ریخته شد. برای تهیه این محیط از محیط کشت DMEM حاوی ۱۰ درصد سرم جنین گاوی و فاکتور رشد کبدی به غلظت ۲۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر، فاکتور رشد فیبروبلاستی بازی به غلظت ۱۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر و انکوستاتین M به غلظت ۲۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر استفاده گردید. محیط کشت فوق هر سه روز یکبار تعویض شد و محیط مصرف شده جهت انجام سنجش‌های بیوشیمیایی جمع‌آوری شد و در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. فرایند القاء تمایز تا روز ۳۱ ادامه یافت. در نهایت جهت مشخص شدن تجمع گلیکوژن در سلول‌های فوق از رنگ‌آمیزی پریودیک اسید شیف استفاده شد.

نمونه‌های محیط کشت نگهداری شده در فریزر در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد برای اندازه‌گیری آلکالین فسفاتاز، کلسیم، اوره و آلبومین در روزهای ۲۸، ۲۶، ۲۳، ۲۰، ۱۶، ۱۲، ۹، ۶، ۳ و ۳۱ مورد استفاده قرار گرفت. گروه کنترل که به عنوان کنترل منفی به کار گرفته شده بود، شامل؛ سلول‌های کشت داده شده در محیط عادی DMEM حاوی ۱۰ درصد سرم جنین گاوی بودند.

برای سنجش‌های فوق از کیت‌های رنگ‌سنجی استفاده گردید. برای سنجش آلفا فیتوپروتئین از دستگاه ریدر الیزا با طول موج ۴۵۰ نانومتر بهره گرفته شد. مراحل انجام آزمایش مطابق دستورالعمل کیت بود.

یافته‌ها

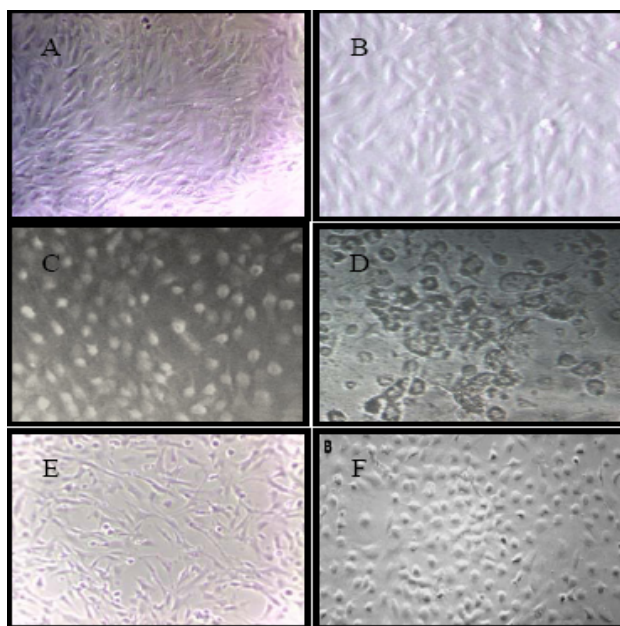
در طی دوره کشت مشاهده شد که سلول‌های تک هسته‌ای جدا شده از خون بند ناف به تدریج به کف فلاسک چسبیده و در طی ۶ - ۴ روز پس از کشت کلونی‌های سلولی را تشکیل دادند و سلول‌های دوکی شکل در ته فلاسک کشت مشاهده شد. سپس در هنگام تمایز سلول‌های فوق به سلول‌های کبدی در حضور فاکتور رشد کبدی و فاکتور رشد فیبروبلاستی پایه، تکثیر سلول‌های بنیادی مزانشیمی متوقف شده و به تدریج و در طول دوره تمایزی ظاهر دوکی شکل آنها از بین رفته و سلول‌ها به لحاظ مورفولوژی به تدریج ظاهری پهن و مکعبی شکل پیدا کردند (تصویر ۱).

خود رسیده بود(نمودار ۱). ترشح آلبومین نیز از روز ۱۲ شروع شده و میزان آن به تدریج در طی تمایز افزایش یافت، به طوری که در روز ۳۱ به بیشترین میزان خود رسیده بود (نمودار ۲).

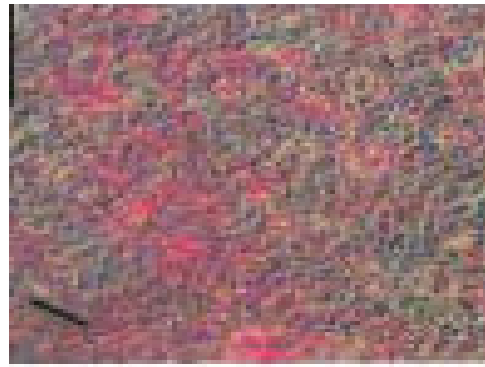
ترشح کلسیم از روز ۶ شروع شده و میزان آن به تدریج در طی تمایز افزایش یافت، به طوری که در روز ۳۱ به بیشترین میزان خود رسیده بود (نمودار ۳)، ولی در مورد آلفا فیتوپروتئین، تنها از روز ۱۵ تمایز به بعد بود که تولید آن در محیط‌های تمایزی مشاهده شد و تا روز ۲۸ غلظت آن به تدریج افزایش یافت(نمودار ۴). فعالیت آنزیمی آلكالین فسفاتاز نیز از روز ۶ تمایز به بعد قابل پایش بود و در روز ۳۱ به حداکثر میزان خود رسید(نمودار ۵).

نتایج حاصل از رنگ‌آمیزی پریودیک اسید شیف، نشان دهنده ذخیره گلیکوژن در سلول‌های تمایز یافته بود که پس از گذشت ۱۰ دقیقه از اضافه کردن محلول شیف(بی رنگ) به سلول‌های کنترل مثبت و سلول‌های تمایز یافته، این سلول‌ها به رنگ ارغوانی درآمد، در حالی که در سلول‌های تمایز نیافته چنین واکنشی مشاهده نشد(تصویر ۲).

اندازه گیری میزان آلفا فیتوپروتئین، آلكالین فسفاتاز، کلسیم، اوره و آلبومین در محیط‌های کشت جمع‌آوری شده در روزهای مختلف نشان داد که غلظت اوره در سلول‌های تمایز نیافته در حد صفر می‌باشد. در حالی که در محیط‌های تمایزی در سومین روز اوره مشاهده شد و میزان آن به تدریج در طی تمایز افزایش یافت و تا روز ۳۱ به بیشترین میزان



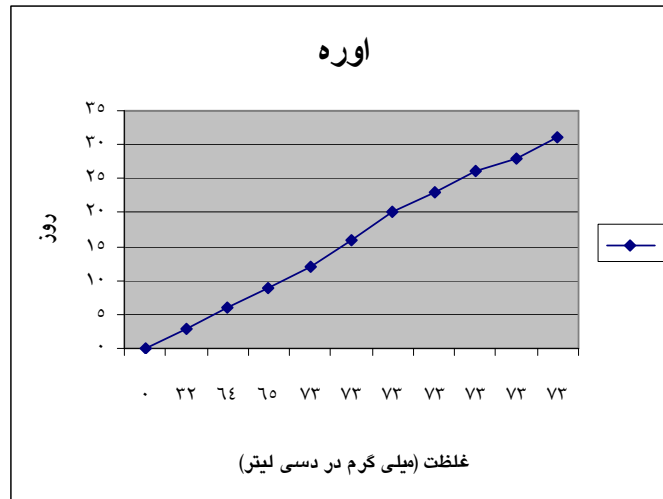
تصویر ۱: تغییر در مورفولوژی سلولی در طی ۲۴ روز تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی به سلول‌های کبدی (A) سلول‌های تیمار یافته با فاکتور رشد کبدی، فاکتور رشد فیبروبلاستی بازی و انکوستاتین M پس از ۶ روز؛ (B) سلول‌های تیمار یافته پس از ۱۲ روز؛ (C) سلول‌های تیمار یافته پس از ۱۸ روز؛ (D) سلول‌های تیمار یافته پس از ۲۴ روز؛ (E) سلول‌های تیمار نیافته؛ (F) سلول‌های کبدی. (بزرگنمایی ۲۰۰ با میکروسکوپ معکوس).



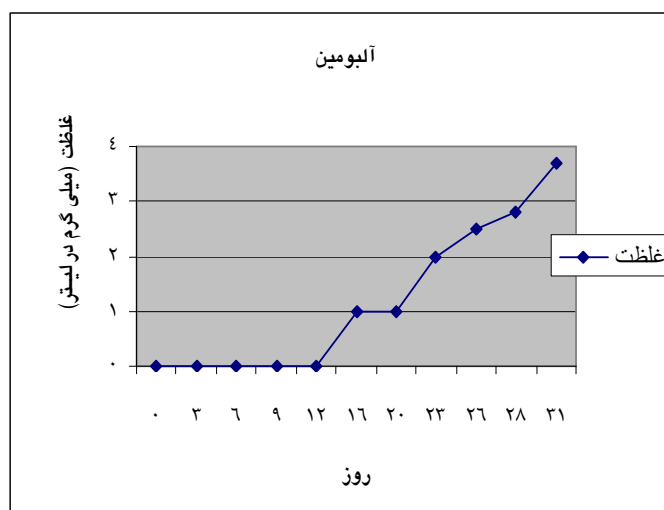
الف

ب

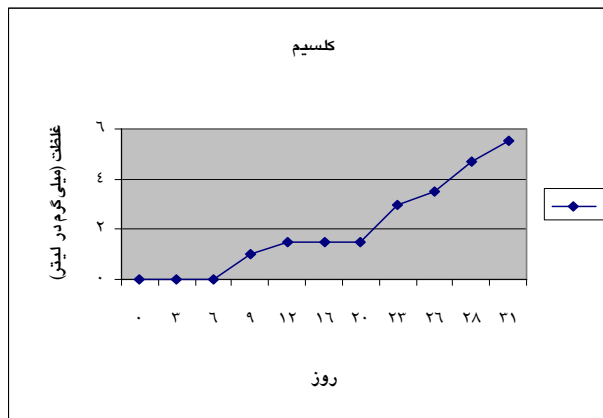
تصویر ۲: بررسی ذخیره گلیکوژن از طریق رنگ آمیزی پریودیک اسید شیف؛ الف) سلول‌های تمایز نیافته (کنترل منفی)؛ ب) سلول‌های تمایز یافته (کنترل مثبت). (بزرگنمایی ۲۰۰ با میکروسکوپ معکوس).



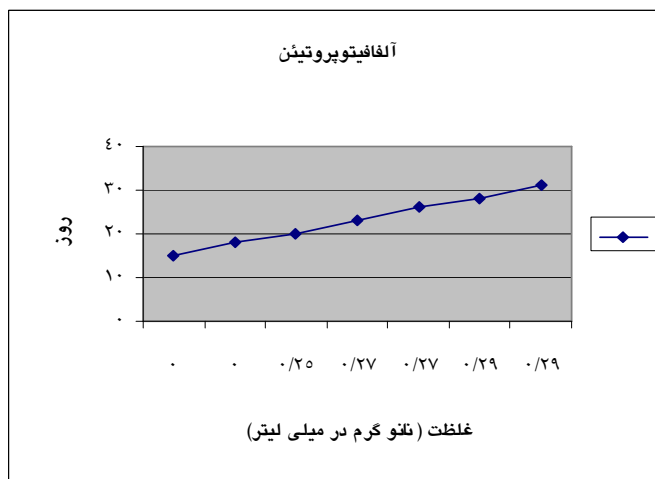
نمودار ۱: میزان ترشح اوره در طی تمایز



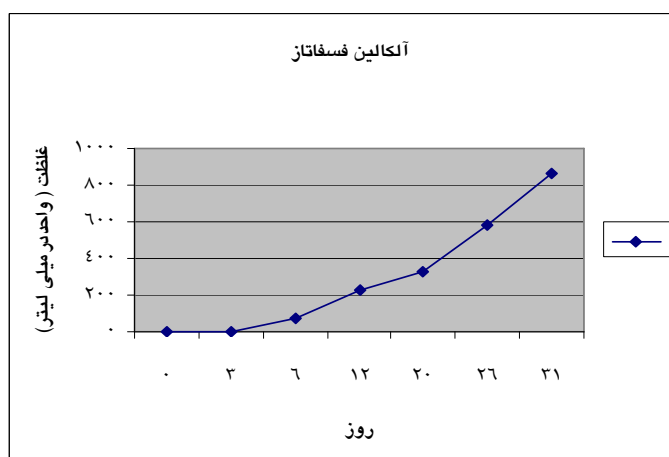
نمودار ۲: میزان ترشح آلبومین طی تمایز



نمودار ۳: میزان ترشح کلسیم طی تمایز



نمودار ۴: میزان تولید آلفایتوپروتئین طی تمایز



نمودار ۵: میزان فعالیت آنزیمی آلکالین فسفاتاز طی تمایز

بحث و نتیجه‌گیری

سلول‌های بنیادی که در خون بند ناف وجود دارند، سلول‌هایی نامیرا و نامتمایز هستند. این سلول‌ها توانایی تکثیر بالایی داشته و قادر هستند به سلول‌های مختلفی مانند؛ سلول‌های استخوانی، سلول‌های غضروف، سلول‌های چربی، سلول‌های ماهیچه، تاندون، استرومای استخوان و سلول‌های آستروسیت تمایز یابند (۲۰ و ۱۹). سلول‌های بنیادی خون‌ساز و سلول‌های بنیادی مزانشیمی زیادی در خون بند ناف وجود دارد. هدف از این پژوهش، جداسازی سلول‌های بنیادی مزانشیمی از خون بند ناف بود.

پس از جداسازی سلول‌های مزانشیمی با فاکتورهای نظیر فاکتور رشد فیبروبلاستی بازی، فاکتور رشد کبدی و انکوستاتین M تیمار شده، مشاهده شد که سلول‌هایی که از لحاظ ظاهری به سلول‌های هیپاتوسیت شباهت داشتند، تبدیل شدند. استفاده از فاکتور رشد فیبروبلاستی بازی، فاکتور رشد کبدی و انکوستاتین M سبب تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی به سلول‌های هیپاتوسیت می‌شود. صفات ظاهری و اعمال کبدی هیپاتوسیت‌ها پس از ۷ روز مشاهده شد.

در این مطالعه مشاهده شد سلول‌هایی که به هیپاتوسیت‌ها تمایز یافتند، توانستند اوره تولید کرده، آلفا فیتوپروتئین، آکالین فسفاتاز، کلسیم و آلبومین نیز ترشح کنند. شوارتز و همکاران^(۱) (۲۰۰۲) برای اولین بار گزارش کردند که سلول‌های بنیادی مشتق از مغز

استخوان می‌توانند به سلول‌های شبه کبدی و نیز اجداد اکتودرمی و مزودرمی در محیط آزمایشگاه تمایز یابند (۲۸).

در مطالعه‌ای که به وسیله کنگ و همکاران^(۲) (۲۰۰۵) انجام شد، مشاهده گردید که در اثر القای تمایز سلول‌های مزانشیمی مشتق از مغز استخوان به سلول‌های کبدی به فاکتور رشد کبدی و فاکتور رشد فیبروبلاستی بازی ۴، تولید آلبومین از روز ۱۶ پس از القای شرایط تمایزی شروع می‌شود (۲۹). همچنین در مطالعه‌ای که تانگ و همکاران^(۳) (۲۰۰۶) انجام دادند، تولید آلبومین را در سلول‌های شبه کبدی مشتق از سلول‌های بنیادی خون بند ناف انسان پس از گذشت ۱۶ روز از آغاز القای شرایط تمایزی به اثبات رساند (۳۰)، در حالی که در تحقیق حاضر تولید آلبومین در سلول‌های شبه کبدی مشتق از سلول‌های مزانشیمی خون بند ناف انسان پس از گذشت ۱۲ روز از آغاز القای شرایط تمایزی مشاهده شد. لازم به یادآوری است که میزان این پروتئین از روز اول کشت مورد بررسی قرار گرفت و از روز ۱۲ به بعد میزان این ماده در محیط کشت تمایزی به تدریج افزایش پیدا کرد، به طوری که در روز ۳۱ به حداکثر میزان خود رسید. همچنین در مطالعه تانگ و همکاران (۲۰۰۶) تولید اوره از روز ۲۰ پس از القای شرایط تمایزی تشخیص داد شد (۳۰). در تحقیق اخیر با استفاده از تکنیک رنگ سنجی، تولید اوره در

1-Schwartz et al

2-Kang et al

3-Tang et al

افزایش دقت و صحت کار تحقیقاتی انجام شده می‌باشد.

در مجموع نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که محیط کشت تمایزی حاوی فاکتورهای رشد و سیتوکین‌ها توانایی تولید سلول‌های کبدی را از سلول‌های بنیادی مزانشیمی خون بند ناف داراست. با توجه به این که این سلول‌ها بسیار سهل‌الوصول بوده و به میزان زیاد وجود دارند، می‌توان از آنها برای دستیابی به سلول‌های کبدی با مورفولوژی صحیح و عملکرد درست در محیط آزمایشگاه^(۱) و بعدها در محیط داخل بدن^(۲) بهره گرفت.

تقدیر و تشکر

در اینجا لازم می‌دانیم تا از تلاش‌های دکتر رضا محمودی، نوشین محمدپور، مرضیه قربانی، مریم بهمن‌زاده و کلیه پرسنل بخش IVF بیمارستان فاطمیه همدان که همکاری لازم را در انجام این طرح داشتند تشکر و قدردانی نماییم.

سلول‌های شبه کبدی پس از گذشت ۳ روز از آغاز القاء شرایط تمایزی به اثبات رسید. میزان این ماده از روز اول کشت مورد بررسی قرار گرفت و از روز ۳ به بعد میزان این ماده در محیط کشت تمایزی به تدریج افزایش پیدا کرد، به طوری که روز ۳۱ به حداکثر میزان خود رسید.

در مطالعه کنگ و همکاران (۲۰۰۵) تولید آلفافیتوپروتئین در ۱۰ پس از القای شرایط تمایزی تشخیص داده شد (۲۹) و در مطالعه‌ای که به وسیله تانگ و همکاران (۲۰۰۶) انجام شد تولید آلفافیتوپروتئین از روز ۷ پس از القای شرایط تمایزی تشخیص داده شد در حالی که در این تحقیق با استفاده از تکنیک ایمنواسی تولید آلفافیتوپروتئین سلول‌های شبه کبدی مشتق از سلول‌های مزانشیمی مشتق از خون بند ناف پس از گذشت ۱۵ روز از آغاز القاء شرایط تمایزی اندازه‌گیری شد (۳۰). پس از روز ۶ فعالیت ناچیزی از آنزیم آلکالین فسفاتاز مشاهده گردید. این فعالیت همچنان در طول دوران تمایز ادامه یافت، به طوری که در روز ۳۱ به نهایت فعالیت خود رسید. ترشح کلسیم پس از گذشت ۶ روز از آغاز القاء شرایط تمایزی شروع شده و میزان آن به تدریج در طی تمایز افزایش یافت، به طوری که در روز ۳۱ به بیشترین میزان خود رسیده بود. لازم به یادآوری است که اندازه‌گیری فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز و کلسیم در سلول‌های مزانشیمی کبدی مشتق از خون بند ناف برای اولین بار انجام گرفته است، که این عامل نیز یکی از فاکتورهای مهم در

1-In Vitro
2-In Vivo

The in Vitro Assessment of Biochemical Factors in Hepatocyte like Cells Derived from Umbilical Cord Blood Stem Cells

KHoramroodi A^{*},
Nasri S^{**},
Amiri I^{***}

^{*}MSc in Biology, Department of Biology, Science Faculty, Tehran University of PlayNoor, Tehran, Iran.

^{**} Assistant Professor of Biology, Deptment of Biology, Science Faculty, Tehran University of PlayNoor, Tehran, Iran.

^{***} Associate Professor of Anatomy, Department of Anatomy, Medicine Faculty, Hamadan Medical Sciences University, Hamadan, Iran

Received:19/07/2009

Accepted:05/10/2009

Corresponding Author: Nasri S
Email: s_nasri2000@yahoo.com

ABSTRACT:

Introduction & Objective: Umbilical cord blood (UCB) is a source of Hematopoietic Stem Cells (HSC) and progenitor cells that can reconstitute the hematopoietic system in patients with malignant and nonmalignant disorders. Mesenchymal stem cell-derived from umbilical cord blood (UCB) have been differentiated to some kind of cells, such as osteoblast, adipoblast and chondroblast in Vitro. This study examined the differentiation of Umbilical Cord Blood (UCB) derived stem cells to functional hepatocytes.

Materials & Methods: The present study was an experimental study which was carried out in the Payam-e-Noor University of Tehran in cooperation with Hamedan University of Medical Sciences in 2008. Umbilical cord blood (UCB) was obtained from Fatemeh hospital (Hamadan, Iran). Stem cells were isolated from the cord blood by combining density gradient centrifugation with plastic adherence. When the isolated cells reached 80% confluence, they differentiated to hepatocyte like cells. The medium which was used was consists of DMEM and 10% Fetal Bovine Serum (FBS) supplemented with 20 ng/mL Hepatocyte Growth Factor (HGF), 10 ng/mL basic Fibroblast Growth Factor (bFGF) and 20 ng/mL Oncostatin M (OSM).The medium was changed every 3 days and stored for Albumin (ALB), Alpha Fetoprotein (AFP), Alkaline Phosphatase (ALP), and urea assay. Finally PAS stain was done to study Glycogen storage in the differentiated cell.

Results: Measurement of biochemical factors in different days showed that concentration of albumin (ALB), alpha fetoprotein (AFP), alkaline phosphatase (ALP), and Urea gradually increased. Also, PAS staining showed the storage of glycogen in these cells.

Conclusion: Stem cell-derived from human umbilical cord blood (HUCB) is a new source of cell types for cell transplantation therapy of hepatic diseases and under certain conditions these cells can differentiate into liver cells.

Keywords: Stem Cells, Human Umbilical Cord Blood (HUCB), Differentiation, Hepatocyte Cell.

REFERENCES:

- 1.Thorgeirsson SS. Liver regeneration: Hepatic Stem cells in liver regeneration. *FASEB J* 2001; 10: 1249–56.
- 2.Mitaka T. Reconstruction of hepatic organoid by hepatic stem cells. *J Hepatobiliary Pancreat Surg* 2002; 9: 697–703.
- 3.Malhi H, Gupta S. Hepatocyte transplantation: new horizons and challenges. *J Hepatobiliary Pancreat Surg* 2001; 8: 40–50.
- 4.Colter DC, Sekiya I, Prockop DJ. Identification of a subpopulation of rapidly self-renewing and multipotential adult stem cells in colonies of human marrow stromal cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98(14): 7841–5.
- 5.Suzuki A, Zheng YW, Kaneko S, Onodera M, Kukao K, Nakauchi H, et al. Clonal identification and characterization of self-renewing pluripotent stem cells in the developing liver. *J Cell Biol* 2002; 156: 173–84.
- 6.Quesenberry PJ, Dooner G, Colvin G, Abedi M. Stem cell: biology and the plasticity polemic. *Exp Hematol* 2005; 33: 389-94.
- 7.Bieback K, Kern S, Kluter H, Eichler H. Critical parameters for the isolation of mesenchymal stem cells from umbilical cord blood. *Stem Cells* 2004; 22: 625-34.
- 8.Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS, et al. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* 1998; 282: 1145-7.
- 9.Hamazaki T, Terada N. In vitro differentiation of embryonic stem cells into hepatocytes. *Methods Enzymol* 2003; 365: 277-87.
- 10.Quesenberry PJ, Dooner G, Colvin G, Abedi M. Stem cell biology and the plasticity polemic. *Exp Hematol* 2005; 33: 389-94.
- 11.Tanabe Y, Tajima F, Nakamura Y, Shibasaki E, Wakejima M, Shimomura T, et al. Analyses to clarify rich fractions in hepatic progenitor cells from human umbilical cord blood and cell fusion. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; 324: 711-8.
- 12.Goldstein G, Toren A, Nagler A. Human umbilical cord blood biology,transplantation and plasticity. *Curr Med Chem* 2006;13:1249-59.
- 13.Mitaka T. Reconstruction of hepatic organoid by hepatic stem cells. *J Hepatobiliary Pancreat Surg* 2007; 9: 697–703.
- 14.Covas DT, Zago MA. Comparison of gene expression of umbilical cord vein and bone marrow derived mesenchymal stem cells. *Stem Cells* 2004; 22: 1263-78.
- 15.Zhang Y, Bai XF, Huang CX. Hepatic stem cells: existence and origin. *World J Gastroenterol* 2003; 9: 201–4.
- 16.Kakinuma S, Tana ka Y, Chinzei R, Watanabe M, ShimizuSaito K, Hara Y, et al. Human umbilical cord blood as a source of transplantable hepatic progenitor cells. *Stem Cells* 2003; 21: 217-7.
- 17.Yang SE, Ha CW, Jung M, Jin HJ, Lee M, Song H, et al. Mesenchymal stem/progenitor cells developed in cultures from UC blood. *Cytotherapy* 2004; 6: 476-86.
- 18.Benayahu D, Kletter Y, Zipori D, Wientroub S. Bone marrow-derived stromal cell line expressing osteoblastic phenotype in vitro and osteogenic capacity in vivo. *J Cell Physiol* 2022; 140(1): 1-7.
- 19.Ahdjoudj S, Lasmoles F, Oyajobi BO, Lomri A, Delannoy P, Marie PJ. Reciprocal control of osteoblast/chondroblast and osteoblast/adipocyte differentiation of multipotential clonal human marrow stromal F/STRO-1(+) cells. *J Cell Biochem* 2001; 1: 23-38.
- 20.Toma C, Pittenger MF, Cahill KS, Byrne BJ, Kessler PD. Human mesenchymal stem cells differentiate to a cardiomyocyte phenotype in the adult murine heart. *Circulation* 2002;105(1): 93-8.
- 21.Buzanska L, Machaj EK, Zablocka B, Pojda Z, Domanska-Janik K. Human cord blood-derived cells attain neuronal and glial features in vitro. *J Cell Sci* 2002; 115: 2131-8.
- 22.Ruhnke M, Ungefroren H, Zehle G, Bader M, Kremer B, Fandrich F. Long-term culture and differentiation of rat embryonic stem cell-like cells into neuronal, glial, endothelial, and hepatic lineages. *Stem Cells* 2003; 21: 428-36.
- 23.Kang XQ, Zang WJ, Bao LJ, Xu XL, Yu XJ. Fibroblast growth factor-4 and hepatocyte growth factor induce differentiation of human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells into hepatocytes. *World J Gastroenterol* 2005;11(47): 7461-746.
- 24.Wang PP, Wang JH, Ya ZP, Hu MY, Lau GK, Fan ST, et al. Expression of hepatocytelike phenotypes in bone marrow stromal cells after HGF induction. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; 320: 712–6.

25. Lagasse E, Connors H, Al-Dhalimy M, Reitsma M, Dohse M, Osborne L, et al. Purified hematopoietic stem cells can differentiate into hepatocytes in vivo. *Nat Med* 2000; 6: 1229-34.
26. Kamiya A, Kinoshita T, Miyajima A. Oncostatin M and hepatocyte growth factor induce hepatic maturation via distinct signaling pathways. *FEBS Lett* 2001; 492: 90-4.
27. Raoufi A. In vitro Differentiation of human umbilical Vein-derived mesenchymal stem cells into hepatocyte cells. *Stem Cells* 2009; 24(11) : 256-63.
28. Schwartz RE, Reyes M, Koodie L, Jiang Y, Blackstad M, Lund T, et al. Multipotent adult progenitor cells from bone marrow differentiate into functional hepatocyte-like cells. *J Clin Invest* 2002; 109: 1291-302.
29. Kang XQ, Song TS, Xu XL, Yu XJ, Li DL, Meng KW, et al. Rat bone marrow mesenchymal stem cells differentiate into hepatocytes in vitro. *World J Gastroenterol* 2005;17(22):3479- 84.
30. Tang XP, Zhang M, Yang X, Chen LM, Zeng Y. Differentiation of human umbilical cord blood stem cells into hepatocytes in vivo and in vitro . *World J Gastroenterol* 2006;12(25): 4014-9.