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

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 الکترونیک: s_nasri2000@yahoo.com

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 مزانشیمی‌که از خون بند ناف انسان مشتق می شوند، در محیط آزمایشگاه، به انواع مختلفی از سلول‌ها از جمله؛ استخوان، غضروف و چربی تمایز می‌یابند. این مطالعه، امکان تبدیل سلول‌های بنیادی مزانشیمی‌را که از سلول‌های بنیادی خون بند ناف به دست آمده‌اند به سلول‌های کبدی در محیط آزمایشگاه بررسی می کند.

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 مزانشیمی‌از آن به وسیله سانتریفیوژ بر اساس شیب غلظت جدا و سلول‌های تک هسته‌ای آن کشت داده شد. وقتی تراکم سلولی سلول‌های بنیادی مزانشیمی‌مشتق شده از خون بند ناف انسان به ۸۰ درصد رسید، با استفاده از محلول تریپسین ـ اتیلن دی‌آمین تترا استیک اسید پاساژ داده شدند. سپس از پاساژ دوم سلول‌ها را در محیط کشت DMEM حاوی ۱۰ میلی‌لیتر بر لیترسرم جنینی گاوی،۲۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر فاکتور رشد کبدی،۱۰ نانوگرم بر لیتر فاکتور رشد فیبروبلاستی بازی و۲۰ 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 ۲۰ـ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد تا ذخیره آلبومین، 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 آلبومین، 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 مزانشیمی‌مشتق 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

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(۳ و ۲). 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(۵ و ۴).

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 ـ 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 (۱۲ و۱۱). 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 ـ 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 نظرگرفته‌اند(۱۷ ـ 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 ـ ۱۸). امروزه تمایز انواع مختلف سلول‌های بنیادی به سلول‌های کبدی درآزمایشگاه 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-Umbolical Cord Blood
5- Hepatopoitic Stem Cell (HSC)
6-Mesenchymal Stem Cell

فاکتورهای بیوشیمیایی مختلفی نظیر؛ آلفا فیتوپروتئین، آلکالین فسفاتاز، کلسیم، اوره و آلبومین ساخته می‌شوند که اندازه‌گیری آنها در محیط کشت، می‌تواند تمایز سلولی را تأیید کند(۲۷)، لذا به نظر می‌رسد که سنجش فاکتورهای فوق نقش مهمی در اثبات تمایز سلول‌های بنیادی به سلول‌های کبدی دارد.

هدف از این مطالعه تمایز سلول‌های بنیادی خون بند ناف به سلول‌های کبدی و ارزیابی فعالیت آلکالین فسفاتاز، آلفا فیتوپروتئین، کلسیم، اوره وآلبومین از طریق روش‌های بیوشیمیایی همراه با اثبات تجمع گلیکوژن در سلول‌های حاصل از تمایز به کمک رنگ‌آمیزی پریودیک اسید شیف[1] 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 تمایز سلول‌ها از شرکت‌های سیگما (آمریکا) و گیبکو(آلمان) خریداری شد. هم‌چنین کیت‌های تشخیصی اوره، آلبومین، کلسیم و آلکالین فسفاتاز از شرکت پارس آزمون ایران خریداری شد. کیت تشخیصی آلفا فیتوپروتئین به روش الایزا از شرکت پیشتاز طب ایران تهیه شد.

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[2] 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[3]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 کشتDMEM حاوی ۱۰ درصد سرم جنین گاوی ۱۰۰ واحد بر میلی‌لیتر پنی سیلین،۱۰۰ واحد بر میلی‌لیتر استرپتومایسین و ۲ میلی‌مول بر لیتر ال‌گلوتامین ریخته شده و به فلاسک‌های کشت ۲۵ سانتی‌متر مکعبNUNC 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

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 کشتDMEM 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 وانکوستاتین 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 ۲۰ــ 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 ۲۰ـ درجه سانتی‌گراد برای اندازه‌گیری آلکالین فسفاتاز، کلسیم، اوره وآلبومین در روزهای ۳،۶،۹،۱۲،۱۶،۲۰،۲۳،۲۶،۲۸ 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 حاوی۱۰ 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.

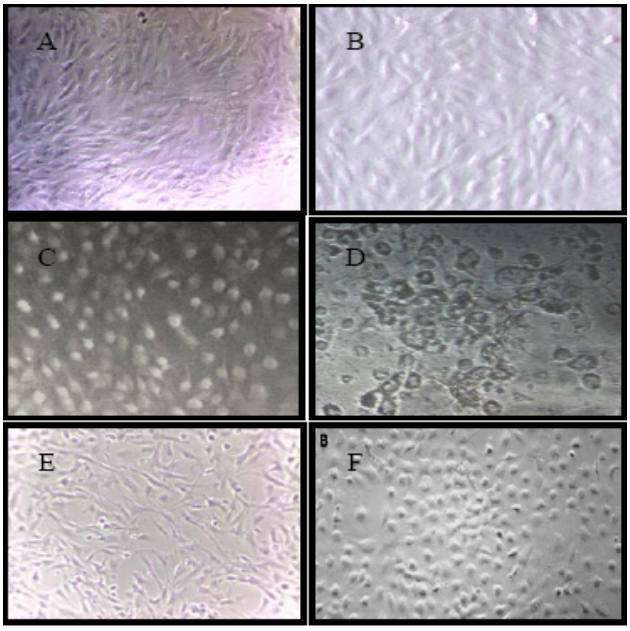
یافته‌ها

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 ـ 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(تصویر۱).

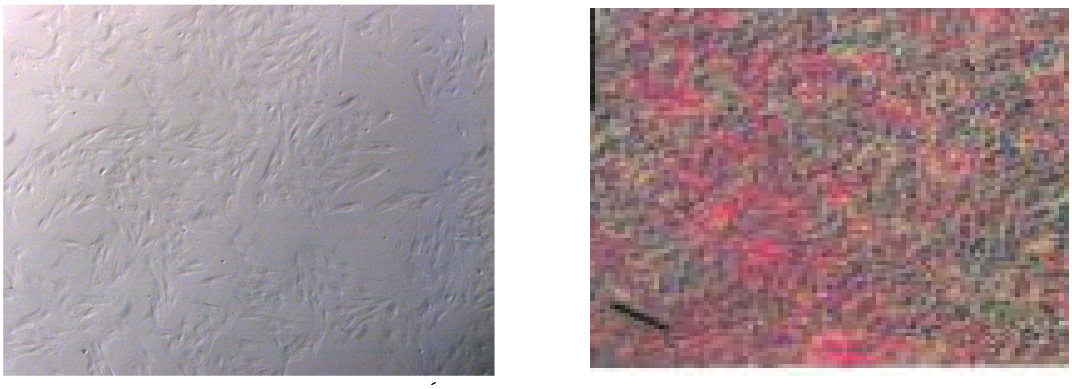
نتایج حاصل از رنگ‌آمیزی پریودیک اسید شیف، نشان دهنده ذخیره گلیکوژن در سلول‌های تمایز یافته بود که پس از گذشت ۱۰ دقیقه از اضافه کردن محلول شیف(بی رنگ)به سلول‌های کنترل مثبت و سلول‌های تمایز یافته، این سلول‌ها به رنگ ارغوانی درآمد، در حالی که در سلول‌های تمایز نیافته چنین واکنشی مشاهده نشد(تصویر ۲).

اندازه گیری میزان آلفا فیتوپروتئین، آلکالین 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 خود رسیده بود(نمودار۱). 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 (نمودار۲).

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(نمودار۴). فعالیت آنزیمی آلکالین فسفاتاز نیز از روز ۶ تمایز به بعد قابل پایش بود و در روز ۳۱ به حداکثر میزان خود رسید(نمودار ۵).

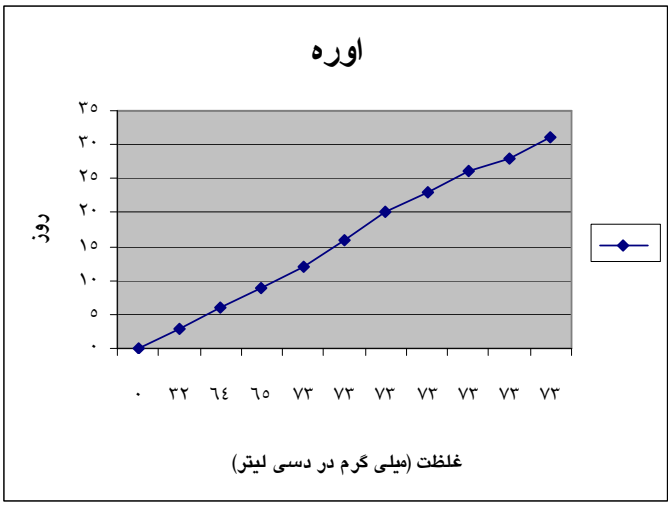


تصویر۱: تغییر در مورفولوژی سلولی در طی ۲۴ روز تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی‌به سلول‌های کبدی ؛ A) سلول‌های تیمار یافته با فاکتور رشد کبدی،فاکتور رشد فیبروبلاستی بازی و انکوستاتین M پس از ۶ روز؛ B) سلول‌های تیمار یافته پس از ۱۲ روز ؛ C) سلول‌های تیمار یافته پس از۱۸ روز؛ D) سلول‌های تیمار یافته پس از ۲۴ روز؛ E) سلول‌های تیمار نیافته؛ F) سلول‌های کبدی. (بزرگنمایی۲۰۰ با میکروسکوپ معکوس).

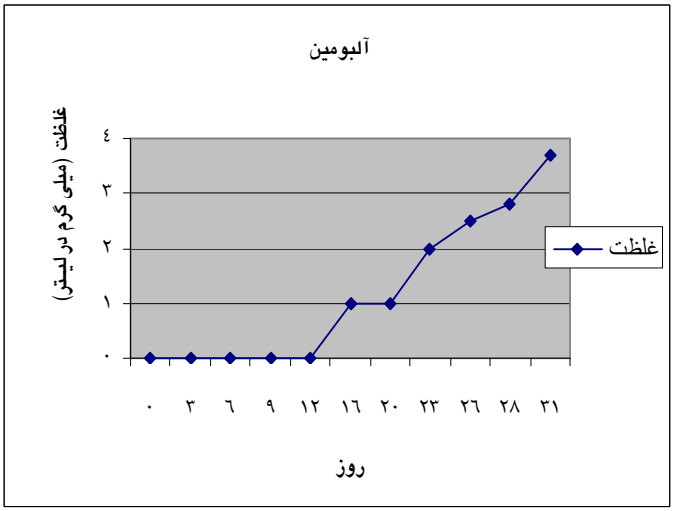


ب الف

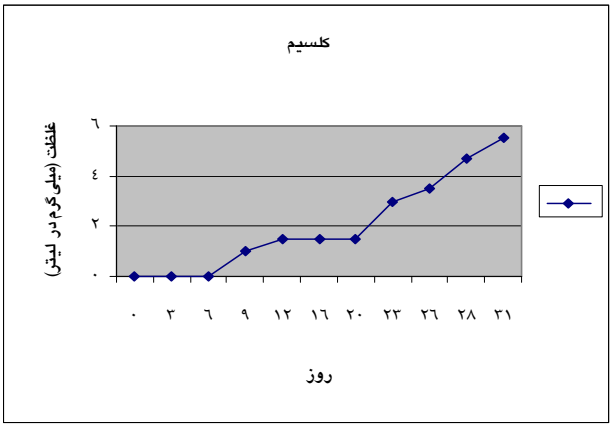
تصویر۲ : بررسی ذخیره گلیکوژن از طریق رنگ آمیزی پریودیک اسید شیف؛ الف) سلول‌های تمایز نیافته (کنترل منفی)؛ ب) سلول‌های تمایز یافته(کنترل مثبت). (بزرگنمایی ۲۰۰ با میکروسکوپ معکوس).



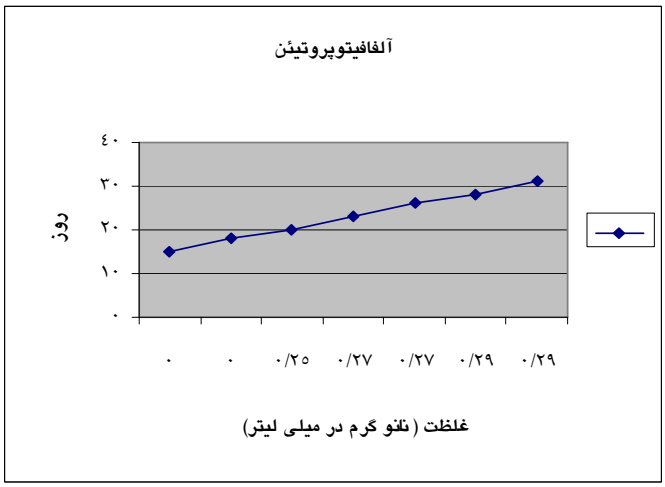
نمودار۱: میزان ترشح اوره در طی تمایز



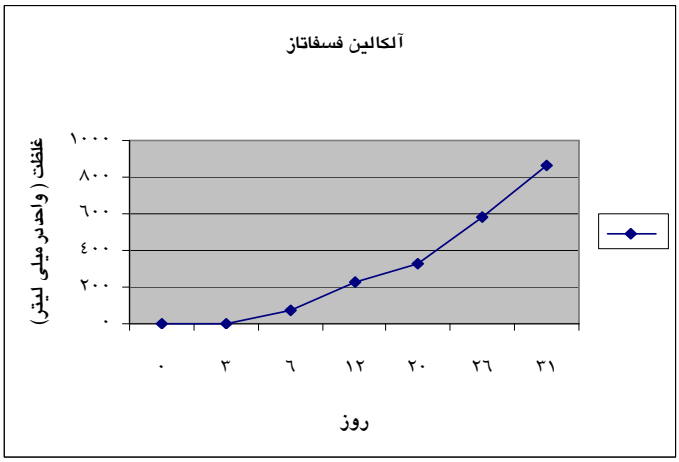
نمودار۲: میزان ترشح آلبومین طی تمایز



نمودار۳: میزان ترشح کلسیم طی تمایز



نمودار۴: میزان تولید آلفافیتوپروتئین طی تمایز



نمودار۵: میزان فعالیت آنزیمی‌آلکالین 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 فاکتورهایی نظیر فاکتور رشد فیبروبلاستی بازی، فاکتور رشد کبدی و انکوستاتین **M** تیمار شده، مشاهده شد که سلول‌هایی که از لحاظ ظاهری به سلول‌های هپاتوسیت شباهت داشتند، تبدیل شدند. استفاده از فاکتور رشد فیبروبلاستی بازی، فاکتور رشد کبدی و انکوستاتین **M** سبب تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی‌به سلول‌های هپاتوسیت می‌شود. صفات ظاهری و اعمال کبدی هپاتوسیت‌ها پس از ۷ روز مشاهده شد.

در این مطالعه مشاهده شد سلول‌هایی که به هپاتوسیت‌ها تمایز یافتند، توانستند اوره تولید کرده، آلفا فیتوپروتئین، آلکالین فسفاتاز، کلسیم وآلبومین نیز ترشح کنند.شوارتز و همکاران[1](۲۰۰۲) برای اولین بارگزارش 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[2] (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 فیبرو بلاستی بازی ۴، تولید آلبومین از روز ۱۶ پس از القای شرایط تمایزی شروع می‌شود(۲۹). هم‌چنین در مطالعه‌ای که تانگ و همکاران[3](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 مزانشیمی‌خون 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

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 روز۱۰ 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 سلول های شبه کبدی مشتق از سلول های 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 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 مزانشیمی‌خون 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[1] و بعدها در محیط داخل بدن[2] 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.

1-In Virro
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 PiayNoor, Tehran, Iran.
[**] Assistant Professor of Biology, Deprtment of Biology, Science Faculty, Tehran University of PiayNoor, 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 osteobblast, 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 Fatemieh 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 Panceat 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 Panceat 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 mesenshymal 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.