Original Article

In Vitro Differentiation of Human Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells into Cardiomyocyte-like Cells

Reihaneh Motamedi, M.Sc.[1], Mehri Azadbakht, Ph.D.[1], Fardin Fathi, Ph.D.[2]*, Ali Amini, Ph.D.[1], Mohammad Ismail Ghaidari, M.D.[3], Ezat Salehi, M.D.[2]

1. Department of Biology, Faculty of Sciences, RAZI University, Kermanshah, Iran
2. Cellular and Molecular Research Center, Kurdistan University of Medical Sciences, Sanandaj, Iran
3. Department of Cardiovascular, Taleghani Hospital, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran

**** Corresponding Address: P.O.Box: 6617713446, Cellular and Molecular Research Center, Kurdistan University of Medical Sciences, Sanandaj, Iran***
Email: farfath@gmail.com

Received: 13/Jan/2010, Accepted: 29/Aug/2010

Abstract

Objective: Human mesenchymal stem cells (MSCs) have been recognized as potential candidates for cell therapy. In the present study, the ability of human bone marrow mesenchymal stem cells (hBMSCs) to differentiate into cells with characteristics of cardiomyocytes *in vitro* was investigated.

Materials and Methods: hBMSCs cultured in enriched medium were treated with oxytocin and 5-azacytidin. The differentiation of hBMSCs into cells that expressed cardiac-specific genes such as α3-actinin, alpha - myosin heavy chain (α-MHC), beta - myosin heavy chain (β-MHC), myosin light chain isoform 2a (MLC2a), myosin light chain isoform 2v (MLC2v), artial natriuretic factor (ANF), GATA4 and oxytocin receptor (OTR) was investigated by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR). Protein expressions of β-actinin and troponin I-C in the cells were analyzed through immunofluorescence staining.

Results: MSCs are spindle-shaped with irregular processes. Cells treated with oxytocin and 5-azacytidin connected with adjoining cells to form myotube-like structures. Expressions of a number of cardiac-specific genes were detected by RT-PCR. Immunofluorescence staining analysis showed that the differentiated cells stained positively for β-actinin and troponin I-C protein.

Conclusion: These results indicate that adult hBMSCs can differentiate into cardiomyocytes in vitro by treatment with oxytocin and 5-azacytidin, and can be considered as a source of cells for cellular cardiomyoplasty.

Keywords: Human Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells, Cardiomyocytes, Oxytocin, Cell Differentiation

Yakhteh Medical Journal, Vol 12, No 3, Autumn 2010, Pages: 387-394

تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از مغز استخوان انسان به سلول‌های شبه قلبی به روش آزمایشگاهی

ریحانه معتمدی M.Sc.[۱]، مهری آزادبخت Ph.D.[۱]، فردین فتحی Ph.D.[۲*]، علی امینی Ph.D.[۱]، محمداسماعیل قیداری M.D.[۳]، عزت صالحی M.D.[۲]

۱. دانشگاه رازی، دانشکده علوم پایه، گروه بیولوژی، کرمانشاه، ایران
۲. دانشگاه علوم پزشکی کردستان، مرکز تحقیقات علوم سلولی و مولکولی، سنندج، ایران
۳. دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، بیمارستان طالقانی، بخش قلب و عروق، تهران، ایران

* آدرس نویسنده مسئول: ایران، سنندج، صندوق پستی: ۶۶۱۷۷۱۳۴۴۶، دانشگاه علوم پزشکی کردستان، مرکز تحقیقات علوم سلولی و مولکولی
پست الکترونیک: Emails: farfath@gmail.com

دریافت مقاله: ۸۸/۱۰/۲۳، پذیرش مقاله: ۸۹/۶/۷

چکیده

* **هدف:** بررسی توانایی تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان انسان به سلول‌های قلبی با استفاده از اکسی توسین
* **مواد و روش‌ها:** سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان انسان در محیط کشت Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) دارای ۱۵ درصد Fetal Bovine Serum (FBS) کشت داده شدند. به منظور القای تمایز سلول‌های قلبی، تعداد ۱×۱۰^{۴} سلول در دیش‌های ۳۵ میلی‌متری کشت داده شده و بعد از رسیدن به تراکم ۷۰ درصد تحت تیمار بااکسی‌توسین ($M^{-۶}۱۰$) و ۵-آزاسیتیدین (با غلظت ۱۰ میکرومولار، کنترل مثبت) قرار گرفتند. در طول دوره، سلول‌ها توسط میکروسکوپ معکوس از نظر تغییرات مورفولوژیکی مورد بررسی قرار گرفتند. بیان ژن‌های خاص سلول قلبی همچون: آلفا- اکتینین، زنجیره سنگین میوزین آلفا و بتا، زنجیره سبک و تنظیمی میوزین (۲v و ۲a)، فاکتور ناتریورتیک دهلیزی، GATA4، و گیرنده اکسی‌توسین، از طریق روش Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) مورد بررسی قرار گرفت. هم‌چنین از ارزیابی ایمونوسیتوشیمی برای اثبات بیان پروتئین‌های خاص سلول قلبی استفاده گردید.
* **یافته‌ها:** سلول‌های بنیادی مزانشیمی، دوکی شکل با زواید نامنظم بوده که پس از تیمار با اکسی‌توسین ($M^{-۶}۱۰$) و ۵-آزاسیتیدین (۱۰ میکرومولار)، به یکدیگر متصل شده و ساختارهای میوتیوب مانند را ایجاد نمودند. بیان تعدادی از ژن‌های خاص سلول‌های قلبی در پایان دوره القایی تایید شد. ارزیابی ایمونوسیتوشیمی برای آنتی ژن‌های آلفا- اکتینین و تروپونین نشان داد که این پروتئین‌ها در سلول‌های تمایز یافته بیان می‌شوند.
* **نتیجه‌گیری:** نتایج این تحقیق نشان داد که سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان انسان قادرند تحت تاثیر اکسی‌توسین و ۵- آزاسیتیدین به سلول‌های قلبی تمایز یابند.

* **کلیدواژگان:** سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان انسان، سلول‌های قلبی، اکسی‌توسین، تمایز سلولی

فصلنامه پزشکی یاخته، سال دوازدهم، شماره ۳، پاییز ۸۹، صفحات: ۳۹۴-۳۸۷

مقدمه

کاردیومیوسیت‌های انسان، سلول‌های پس‌میتوزی می‌باشند و بعد از تولد توانایی تکثیر خود را از دست می‌دهند. بعد از وقوع سکته‌قلبی، کاردیومیوسیت‌ها می‌میرند و نکروزه می‌گردند. این کاردیومیوسیت‌های نکروزه در قلب آسیب‌دیده به طور پیش‌رونده‌ای به وسیله سلول‌های غیرانقباضی فیبروبلاستی جایگزین می‌شوند و در محل آسیب، بافت اسکار تشکیل می‌گردد (۴-۱). پیوند سلول قلبی یک روش درمانی بالقوه برای درمان نارسایی قلبی محسوب می‌گردد و تشخیص انواع سلولی که توانایی ترمیم میوکاردیوم آسیب دیده را دارند، بسیار مورد توجه می‌باشد (۵، ۶).

مغز استخوان شامل مجموعه خاصی از سلول‌های بنیادی می‌باشد که توانایی حمایت از خون‌سازی و تمایز به دودمان‌های استیوژنیک، آدیپوژنیک، کندروژنیک، میوژنیک و کاردیومیوژنیک را دارند (۷، ۸). این سلول‌ها اولین بار در سال ۱۹۷۴ توسط فریندستاین و همکاران به عنوان سلول‌های بنیادی فیبروبلاستی تشکیل‌دهنده کلونی (Colony Forming Units-Fibroblast; CFU-F) توصیف شدند (۹). بعد، عبارت CFU-F به وسیله فیبروبلاست‌های استرومایی مغز استخوان جایگزین شد (۱۰) و این سلول‌ها را سلول‌های بنیادی مزانشیمی نیز می‌نامند (۱۱). وقتی سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از مغز استخوان انسان به طور مستقیم به میوکاردیوم موشی بالغ پیوند می‌شود به کاردیومیوسیت‌ها تمایز می‌یابند (۱۲، ۶). راه‌کار دیگر، تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از مغز استخوان در شرایط *in vitro* و قبل از پیوند می‌باشد. ماکینو و همکاران برای اولین بار نشان دادند که سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از مغز استخوان موش تحت تیمار با ۵-آزاسیتیدین توانایی تمایز به کاردیومیوسیت‌های ضربان‌دار را دارند (۱۳). سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از مغز استخوان انسان نیز تحت تیمار با ۵- آزاسیتیدین و در شرایط *in vitro* به کاردیومیوسیت‌ها تمایز می‌یابند (۱۴). از عوامل القایی دیگر جهت تمایز سلول‌های بنیادی به سلول‌های قلبی در حالت *in vitro* می‌توان به فاکتور رشد فیبروبلاستی اشاره کرد (۱۵).

اکسی‌توسین، یک هورمون نوناپپتید می‌باشد که به طور عمده از هسته‌های هیپوتالاموسی ترشح می‌گردد. با این وجود اکسی‌توسین در بافت‌های محیطی مثل: رحم، جفت، جسم سفید، قلب و غیره نیز تولید می‌گردد. اکسی‌توسین و گیرنده‌های آن به عنوان عامل اصلی تنظیم‌کننده عملکردهای تولیدمثلی از جمله القای انقباضات رحمی،

خروج شیر و تخمک‌گذاری شناخته می‌شوند (۱۶). مطالعات جدید نقش اکسی‌توسین در تکوین قلبی را نشان داده‌اند، به طوری که گیرنده اکسی‌توسین در سطح پروتئینی در قلب موش از روز ۷ بارداری، یعنی در زمان شروع تمایز قلبی، افزایش می‌یابد (۱۷). در راستای بررسی تاثیر اکسی‌توسین بر تکامل قلب، نتایج مطالعات قبلی نشان می‌دهد که چنانچه اکسی‌توسین با دوز بالا به جنین تزریق شود، ممکن است در نمونه‌های انسانی و موش‌های صحرایی منجر به اختلال در رشد قلب شود. از طرف دیگر، بلوکه کردن گیرنده‌های اکسی‌توسین به کمک آنتاگونیست‌های اختصاصی، در مراحل اولیه تکامل جوجه منجر به ناهنجاری قلبی در جنین‌ها می‌شود (۱۸). علاوه بر این، اکسی‌توسین یک القاکننده بالقوه‌ی سلول‌های P19 و تمایز کاردیومیوژنیک سلول‌های بنیادی بالغ می‌باشد (۱۸، ۱۹). اکسی‌توسین هم‌چنین منجر به افزایش تمایز سلول‌های بنیادی جنینی موش به کاردیومیوسیت‌ها می‌گردد (۲۰). از آنجایی که تا زمان شروع این مطالعه گزارشی در زمینه بررسی توانایی اکسی‌توسین در تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از مغز استخوان انسان به کاردیومیوسیت‌ها مشاهده نشده بود، در مطالعه حاضر توانایی تمایز سلول‌های بنیادی مذکور به کاردیومیوسیت‌ها با استفاده از اکسی‌توسین مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش ها

در این مطالعه که با تصویب کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی کردستان انجام گرفت، سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان انسان (اهدایی از طرف دکتر مسعود سلیمانی، گروه هماتولوژی، دانشگاه تربیت مدرس) مورد استفاده قرار گرفت. جهت رشد و تکثیر سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از مغز استخوان انسان از محیط کشت Dulbecco`s Modified Eagle's Medium-Low Glucose (DMEM) (گیبکو) حاوی ۱۵ درصد سرم Fetal Bovine Serum (FBS) (گیبکو)، آنتی‌بیوتیک‌های استرپتومایسین و پنی‌سیلین و فلاسک‌های T-25 استفاده شد. به منظور پاساژ سلول‌ها، مخلوط مایع تریپسین با غلظت ۰/۲۵ درصد و Ethylene Diamine Tetraacetic Acid (EDTA) با غلظت ۰/۰۴ درصد مورد استفاده قرار گرفت.

برای القای تمایز قلبی، تعداد 10^4 سلول بنیادی مزانشیمی مغز استخوان انسان در در دیش‌های ۳۵ میلی‌متری، در محیط DMEM-LG (گیبکو) دارای ۱۵ درصد FBS (گیبکو) کشت داده شدند. پس از رسیدن تراکم سلول‌ها به حدود ۷۰ درصد، تمایز قلبی در این سلول‌ها القا گردید. به این ترتیب که سلول‌ها به مدت چهار هفته تحت تیمار با اکسی-توسین (10^{-6}M) (کال‌بیوکم) قرار گرفتند. بعد از شروع القا، تعویض محیط برای سلول‌ها هر ۳ روز یک‌بار صورت گرفت. در مطالعه حاضر در گروه شاهد، محیط کشت فاقد اکسی‌توسین بود. از آنجا که تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان انسان به سلول‌های قلبی تحت تیمار با ۵- آزاسیتیدین از قبل ا انجام شده بود (۱۴)، در گروه کنترل مثبت، سلول‌ها به مدت ۲۴ ساعت تحت تیمار با ۵- آزاسیتیدین (۱۰ میکرومولار) (سیگما) قرار گرفتند که بعد از آن سلول‌ها با محیط کشت بدون ۵- آزاسیتیدین تعویض محیط شدند و به مدت چهار هفته مورد بررسی قرار گرفتند. از روش Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) برای بررسی ژن‌های خاص قلبی استفاده شد (جدول ۱).

برای این منظور، ابتدا با استفاده از محلول RNX (Plus- سینازن)، RNA کل را از سلول‌های تحت تیمار با اکسی‌توسین، در هفته‌های تمایزی اول، دوم، سوم، چهارم وسلول‌های تحت تیمار با ۵- آزاسیتیدین، به عنوان کنترل مثبت، و سلول‌های تمایز نیافته، استخراج نموده و پس از اطمینان یافتن از کیفیت RNA استخراج شده با انجام الکتروفورز ژل آگارز و اسپکتروفتومتری، جهت تهیه cDNA از آغازگر Random hexamer (فرمنتاز) و کیت RT (بیونیر-کره‌جنوبی) استفاده شد. واکنش RT در حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر انجام گرفت. واکنش PCR در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر انجام و جهت تهیه حجم مذکور، علاوه بر DNA الگو (محصول واکنش RT) از کیت PCR (سینازن)، آب مقطر استریل و آغازگرهای بالادست (Forward) و پایین‌دست (Reverse)، با مشخصات مورد اشاره در جدول شماره ۱ استفاده شد.

جدول ۱: مشخصات پرایمرهای طراحی شده برای بررسی بیان ژن‌های خاص سلول‌های قلبی

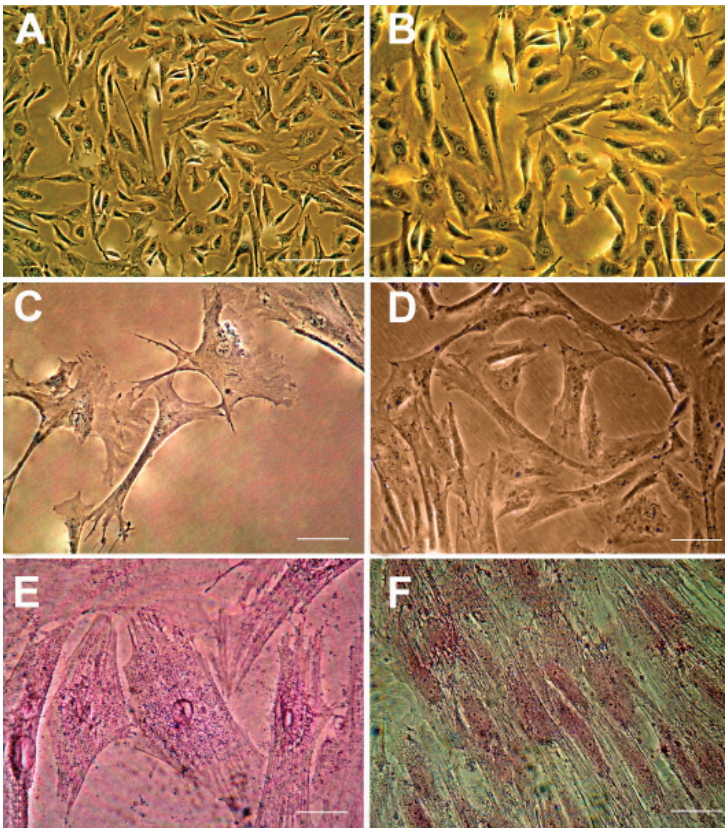
نام پرایمر	شماره دست‌یابی	توالی پرایمر	طول قطعه حاصل (bp)
Alpha3-actinin	NM 001104.1	F: GGGAAAGGAGGAGATGCTG R: GGGTGATGTAGGGATTGGTG	۵۵۱
Beta-myosin heavy chain	NM 000257.2	F: CTGTGTCTTTCCCTGCTGCT R: GATAGGCGTTGTCGGAGATG	۵۷۶
Alpha-myosin heavy chain	NM 002471.2	F: GTCATTGCTGAAACCGAGAATG R: GCAAAGTACTGGATGACACGCT	۴۱۳
Myosin light chain isoform 2v	NM 000432.3	F: CAGAACAGGGATGGCTTCA R: TCTCCGTGGGTGATGATGT	۳۷۷
Myosin light chain isoform 2a	NM 021223.2	F: GAGGAGAATGGCCAGCAGGAA R: GCGAACATCTGCTCCACCTCA	۴۴۹
hGATA4	NM 002052.3	F: TGGCCTGTCATCTCACTACG R: TCAGCGTGTAAAGGCATCTG	۴۲۳
Oxytocin receptor	NM 000916.3	F: TGTGCCGCCTGGTCAAGTAC R: GGCCAGCACGATGATGAAAG	۵۱۸
Atrial natriuretic factor	NM 006172.2	F: GAGAGACAGAGCAGCAAGCA R: AGGCGAGGAAGTCACCATC	۷۰۵
Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	NM 002046.3	F:CCAGGTGGTCTCCTCTGACTTCAACA R: AGGGTCTCTCTCTTCCTCTTGTGCTC	۲۲۴

پس از آماده ساختن حجم مورد نظر جهت انجام واکنش، واکنش PCR با شرایط ۴۵ ثانیه دناتوریشن در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد، ۴۵ ثانیه آنیلینگ در دمای ۵۵ درجه سانتی‌گراد و ۱ دقیقه اکستنشن در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد انجام گرفت. تعداد ۴۰ سیکل و یک سیکل اکستنشن نهایی به مدت ۱۰ دقیقه در ۷۲ درجه سانتی‌گراد در نظر گرفته شد. جهت انجام هر دو واکنش RT-PCR از دستگاه ماستر سایکلر (اپندورف) استفاده شد.

ژن گلیسرآلدهید فسفات دهیدروژناز (Glyceraldehyde 3-Phosphate Dehydrogenase; GAPDH) به عنوان کنترل داخلی مورد استفاده قرار گرفت. بعد از اتمام واکنش، ۸ میکرولیتر از محصول واکنش PCR توسط الکتروفورز ژل آگارز ۱ درصد بررسی شد. آغازگرهای مورد استفاده در این مطالعه با کمک نرم‌افزارهای Gene Runner و Primer 3 طراحی شدند. تعدادی از آغازگرها (α-MHC, MLC2a) نیز با توجه به مقاله‌های مرتبط برای سفارش انتخاب شدند (۲۱، ۲۲). کلیه آغازگرها از شرکت سیناژن خریداری شدند.

در طول آزمایش از میکروسکوپ معکوس فلورسنت (Nikon-TE ۳۰۰) جهت ارزیابی سلول‌ها استفاده شد. به منظور ارزیابی ایمونوسیتوشیمی، سلول‌ها پس از اتمام دوره القا، به مدت ۲۰ دقیقه با استفاده از پارافرمالدیید ۴ درصد در دمای اتاق فیکس شدند. از بافر بلاک کننده‌ی حاوی Triton X-100 و Bovine Serum Albumin (BSA) جهت نفوذپذیری سلول‌ها و مهار آنتی‌ژن غیر اختصاصی که احتمال اتصال آنتی‌بادی ثانویه به آنها وجود داشت، استفاده شد.

سلول‌ها در طول شب در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد با آنتی‌بادی اولیه Rabbit Anti Human α-actinin (سانتاکروز بیوتکنولوژی) با غلظت ۱/۵۰ و Goat Anti Human Troponin I-C (سانتاکروز بیوتکنولوژی)با غلظت ۱/۵۰ انکوبه شدند. سپس از آنتی‌بادی ثانویه Goat Anti Rabbit (سانتاکروز بیوتکنولوژی) متصل به Texas Red و آنتی‌بادی ثانویه Donkey Anti Goat (سانتاکروز بیوتکنولوژی) متصل به Fourescent Isotiocyanate (FITC) به ترتیب جهت اتصال به آنتی‌بادی اولیه علیه α-actinin و Troponin I-C هر دو با غلظت ۱/۲۰۰ به مدت ۴۵ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد استفاده شد. بعد از شست‌وشوی سلول‌ها با بافر فسفات، سلول‌ها به کمک میکروسکوپ فلورسنت مطالعه و عکس‌برداری شدند. هم‌چنین، یک چاهک به عنوان کنترل در نظر گرفته شد که در آن، آنتی‌بادی اولیه اضافه نگردید. سلول‌هایی که به مدت ۲۴ ساعت تحت تیمار با ۵-آزاسیتیدین قرار گرفته بودند در پایان هفته چهارم به عنوان گروه کنترل مثبت مورد استفاده قرار گرفتند.



شکل ۱: تغییرات مورفولوژیکی سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان انسان به سلول‌های قلبی بعد از تیمار با اکسی‌توسین. تمایز مورفولوژیکی سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان انسان. A و B) به سلول‌های قلبی به تدریج بعد از القای اکسی‌توسین مشاهده گردید. سلول‌ها تاحدی زواید سیتوپلاسمی خود را گسترش دادند. به سلول‌های مجاور خود متصل شدند و ساختارهایی شبیه میوتیوب را ایجاد کردند (D). سلول‌های تمایز یافته در هفته چهارم القا دارای ظاهری مخطط، انتهایی منشعب و هسته تیپیک مرکزی بودند (F) (در اینجا سلول‌ها با فوشین بازی رنگ‌آمیزی شده‌اند). در گروه کنترل مثبت سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان انسان به مدت ۲۴ ساعت تحت تیمار با ۵-آزاسیتیدین قرار گرفتند و در طی ۴ هفته تغییرات مورفولوژیکی و فنوتیپ سلول‌های قلبی را نشان دادند (C و E). مقیاس تصویر A، ۲۰۰ میکرومتر، تصویر E، ۵۰ میکرومتر، و سایر تصاویر ۱۰۰ میکرومتر می‌باشد.

یافته ها

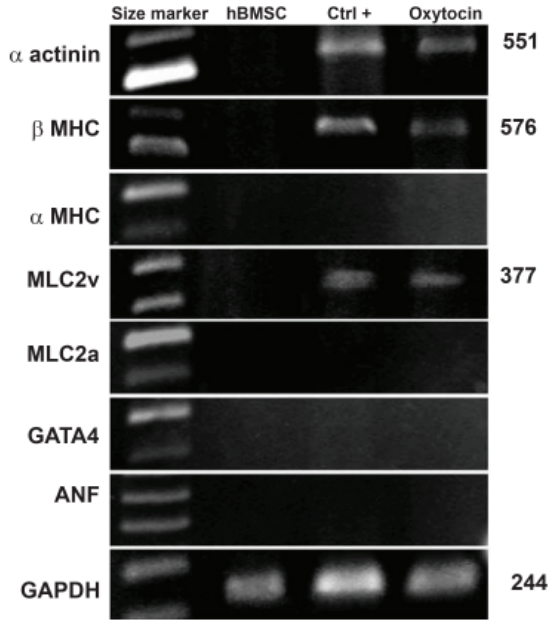
جهت تعیین تغییرات مورفولوژیک، سلول‌های تحت القا به وسیله میکروسکوپ معکوس مورد بررسی قرار گرفتند. سلول‌ها قبل از القا مورفولوژی شبه فیبروبلاستی را نشان می‌دادند و این فنوتیپ در پاساژهای متوالی و موقعیت‌های غیرالقایی حفظ می‌گردید. بعد از القا با اکسی‌توسین (10^{-6} M) سلول‌ها شروع به تغییرات مورفولوژیک نمودند. سلول‌ها تاحدی زواید سیتوپلاسمی خود را گسترش دادند و به سلول‌های مجاور خود متصل شدند و ساختارهایی شبیه میوتیوب را ایجاد کردند.

هم‌چنین سلول‌های تمایز یافته دارای ظاهری مخطط، انتهایی منشعب و هسته‌ی تیپیک مرکزی بودند. سلول‌های تحت تیمار با ۵- آزاسیتیدین (گروه کنترل مثبت) نیز این تغییرات مورفولوژیک را نشان دادند (شکل ۱).

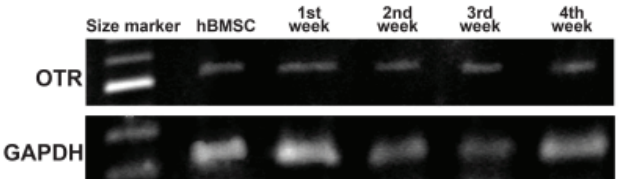
برای ارزیابی تمایز قلبی، بیان mRNA ژن‌های خاص سلول قلبی در سلول‌های تحت القا بررسی شد. در مطالعه حاضر، نمونه‌های RNA از سلول‌های تحت تیمار با اکسی‌توسین در هفته‌های اول، دوم، سوم و چهارم، سلول‌های تحت تیمار با ۵- آزاسیتیدین (کنترل مثبت) و سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان انسان استخراج گردید. قابل ذکر است که سعی بر آن شد تعداد سلول‌ها و به دنبال آن میزان RNA تخلیص شده از آنها در نمونه‌های تمایز نیافته، کنترل مثبت و تمایز یافته برابر در نظر گرفته شود. پس از بررسی‌های کمی و کیفی روی RNAی استخراج شده، واکنش رونویسی معکوس و به دنبال آن واکنش PCR با استفاده از آغازگرهای طراحی شده برای هر ژن صورت گرفت. بررسی‌های انجام شده نشان داد که اولا سلول‌ها تنها در هفته چهارم القای ژن‌های خاص قلبی را بیان می‌نمایند. ثانیا از بین ژن‌های مورد بررسی فقط بیان ژن‌های (Oxytocin Receptor; Beta-Myosin Heavy Chain; βMHC)، (Ventricular Myosin Light Chain Type-2; MLC2v)، (Beta-Myosin Heavy Chain; α3-actinin) و (Oxytocin Receptor; OTR) در سلول‌هایی که به مدت ۴ هفته تحت القا با اکسی‌توسین بودند و گروه کنترل مثبت، تایید شد. در واقع برخلاف اعمال تغییرات مختلف در دمای آنیلینگ و تعداد سیکل‌های PCR، برای بررسی بیان ژن‌های خاص قلبی، بعد از انتقال به ژل الکتروفورز برای ژن‌های MLC2a، (Alpha-Myosin Heavy Chain; αMHC)، (Atrial Natriuretic Factor; ANF) و GATA4 باندی مشاهده نشد. ژن‌های αMHC، α3-actinin و MLC2v در سلول‌های تمایز نیافته بیان نشد ولی در سلول‌های تحت تیمار با اکسی‌توسین و گروه کنترل مثبت در هفته‌ی چهارم القا بیان شدند (شکل ۲).

ژن OTR در سلول‌های تمایز نیافته و سلول‌های تمایز یافته تحت تیمار با اکسی‌توسین در طی دوره القا بیان شد. از ژن GAPDH به عنوان کنترل داخلی استفاده گردید که در تمام سلول‌ها بیان آن مشاهده شد (شکل ۳).

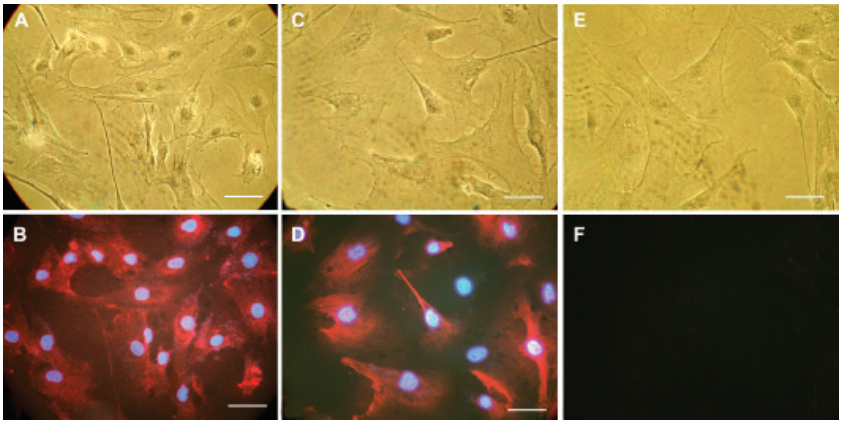
در روز ۲۸ القا، بیان مارکرهای آلفا- اکتینین و تروپونین I-C در سلول‌های تمایز یافته از طریق تکنیک ایمونوسیتوشیمی نیز به اثبات رسید. برای نمونه‌های کنترل منفی کلیه شرایط مشابه نمونه اصلی بوده است با این تفاوت که آنتی‌بادی اولیه استفاده نگردید. پس از بررسی توسط میکروسکوپ فلورسنت، در نمونه‌های آزمایش مشاهده شد که واکنش سلول‌ها به آنتی بادی‌های مذکور مثبت است، به طوری که در مورد آنتی‌ژن آلفا-اکتینین که آنتی‌بادی ثانویه علیه آن کونژوگه با تگزاس رد بود، سلول‌ها به رنگ قرمز مشاهده شدند (شکل ۴) و در مورد آنتی‌ژن تروپونین I-C که آنتی‌بادی ثانویه علیه آن کونژوگه با FITC بود، سلول‌ها به رنگ سبز مشاهده شدند (شکل ۵). قابل ذکر است که این علایم، در نمونه‌های کنترل منفی یافت نگردید.



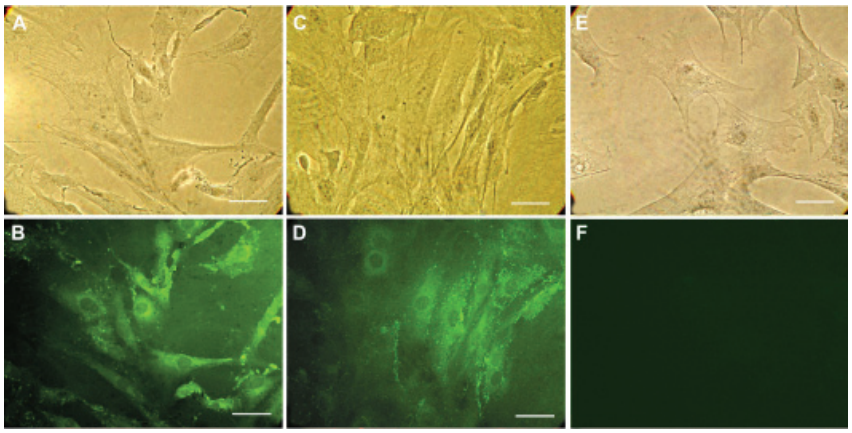
شکل ۲: بیان ژن‌های خاص سلول قلبی در سلول‌های تحت تیمار با اکسی‌توسین. به منظور واکنش رونویسی معکوس و انجام RNA، RT-PCR کل از سلول‌های تمایز یافته در هفته‌های اول، دوم، سوم، و چهارم دوره القا استخراج شد. بررسی RT-PCR برای ژن‌های αMHC، GATA4، ANF، α- actinin، MLC2v، MLC2a، αMHC، در هفته‌های اول، دوم، سوم و چهارم دوره القا انجام شد. سلول‌هایی که به مدت ۲۴ ساعت تحت القای ۵- آزاسیتیدین بودند نیز به عنوان گروه کنترل مثبت در نظر گرفته شدند. سلول‌های تمایز یافته تحت القای اکسی‌توسین در هفته چهارم القا ژن‌های αMHC، α-actinin و MLC2v را بیان نمودند. ژن‌های ANF، MLC2a، αMHC و GATA4 در هیچ یک از گروه‌ها بیان نشدند. سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان تمایز نیافته (hBMSC) به عنوان کنترل منفی استفاده شدند. از ژن GAPDH به عنوان کنترل داخلی استفاده گردید.



شکل۳: بیان ژن گیرنده اکسی‌توسین (OTR). سلول‌های تمایز یافته تحت القای اکسی‌توسین در طول دوره القا ژن OTR را بیان نمودند. سلول‌های تمایز نیافته (hBMSC) نیز ژن OTR را بیان کردند. از ژن GAPDH به عنوان کنترل داخلی استفاده گردید.



شکل ۴: بررسی بیان مارکر آلفا-اکتینین از طریق تکنیک ایمونوسیتوشیمی در سلول‌های تمایز یافته (تصاویر A و B مربوط به گروه آزمایش، تصاویر C و D مربوط به گروه کنترل مثبت و تصاویر E و F مربوط به گروه کنترل منفی می‌باشد)، A، C و E سلول‌های تمایز یافته می‌باشند که با میکروسکوپ فازکنتراست مشاهده و عکس‌برداری شده‌اند. D، B و F تصاویر سلول‌های قلبی تمایز یافته را نشان می‌دهد که واکنش‌شان به آنتی‌بادی علیه آلفا- اکتینین مثبت شده است و رنگ قرمز در تصاویر بیانگر مثبت بودن نتیجه واکنش ایمونوسیتوشیمی در سلول‌های تمایز یافته است (مقیاس تصاویر ۵۰ میکرومتر می‌باشد).



شکل ۵: بررسی بیان مارکر تروپونین I-C از طریق تکنیک ایمونوسیتوشیمی در سلول‌های تمایز یافته (تصاویر A و B مربوط به گروه آزمایش، تصاویر C و D مربوط به گروه کنترل مثبت و تصاویر E و F مربوط به گروه کنترل منفی می‌باشد)، A، C و E سلول‌های تمایز یافته می‌باشند که با میکروسکوپ فازکنتراست مشاهده و عکس‌برداری شده‌اند. B، D و F تصاویر سلول‌های قلبی تمایز یافته را نشان می‌دهد که واکنش‌شان به آنتی‌بادی تروپونین I-C مثبت شده است رنگ سبز در تصاویر بیانگر مثبت بودن نتیجه واکنش ایمونوسیتوشیمی در سلول‌های تمایز یافته است (مقیاس تصاویر ۵۰ میکرومتر می‌باشد).

بحث

سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از مغز استخوان انسان در شرایط *in vitro* و *in vivo* توانایی تمایز به انواع گوناگونی از سلول‌ها را دارند و در ترمیم استخوان، غضروف، و عضله شرکت می‌نمایند (۵). نتیجه این مطالعه نیز نشان داد که سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از مغز استخوان انسان می‌توانند در شرایط آزمایشگاهی و تحت تیمار با اکسی‌توسین به کاردیومیوسیت‌ها تمایز یابند. این سلول‌های تمایز یافته ژن‌های خاص قلبی از جمله αMHC، α3-actinin و MLC2v و OTR را بیان می‌نمایند. سلول‌های تمایز یافته پروتئین‌های قلبی آلفا- اکتینین و تروپونین I-C را نیز بیان می‌نمایند.

در مطالعه حاضر، اندازه سلول‌ها در طول دوره القا افزایش یافت. سلول‌ها زواید سیتوپلاسمی خود را گسترش دادند و به سلول‌های مجاور متصل شدند. سلول‌های تمایز یافته در هفته‌ی چهارم القا، به طور واضح انتهای منشعب، ظاهر مخطط و هسته تیپیک مرکزی را نیز نشان دادند. رده سلولی کاردیومیوژنیک حاصل از سلول‌های استرومایی مغز استخوان موش بعد از تیمار با ۵- آزاسیتیدین به کاردیومیوسیت‌ها تمایز می‌یابند

و ژن‌های خاص قلبی از جمله GATA4 Nkx2.5/Csx، BNP، ANP را بیان می‌کنند (۱۳). زو و همکاران گزارش نموده‌اند که سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان انسان - که تحت القای ۵- آزاسیتیدین بوده‌اند - مارکرهای تمایز میوژنیک، از جمله: دسمین، تروپونین T قلبی، α-cardiac actin و αMHC را بیان می‌نمایند (۱۴).

گاتکوسکا و همکاران در سال ۲۰۰۰ گزارش نمودند که اکسی‌توسین به وسیله قلب تولید و آزاد می‌شود و به عنوان یک تنظیم کننده اصلی عملکردهای قلبی-عروقی عمل می‌نماید (۲۳). اکسی‌توسین و گیرنده‌های اکسی-توسین در قلب موش صحرایی مرحله فتال بیان می‌شوند و در دوران بلوغ به نسبت کاهش می‌یابند. تشخیص گیرنده‌های اکسی‌توسین در کاردیومیوسیت‌های موش‌های صحرایی تازه متولد شده از این فرضیه حمایت می‌کند که اکسی-توسین در تکوین این سلول‌ها نقشی ایفا می‌نماید (۲۴). پاکویین و همکاران نشان دادند که سلول‌های کارسینومای P19 گیرنده‌های اکسی‌توسین را بیان نموده و اکسی‌توسین تمایز این سلول‌ها به کلونی‌های ضربان‌دار، بیان کننده mRNA ANF و مارکرهای اختصاصی کاردیومیوسیت‌ها را تحریک می‌نماید (۱۸). فتحی و همکاران نیز سلول‌های P19CL6 را تحت تاثیر اکسی‌توسین به سلول‌های قلبی تمایز دادند و نشان دادند که تشکیل اجسام جنینی برای تمایز این سلول‌ها به کاردیومیوسیت‌ها ضروری می‌باشد. این اجسام جنینی بعد از تیمار با اکسی‌توسین ژن‌های αMHC، Nkx2.5، GATA4، Tbx5، α-cardiac actin، و Tbx20 را بیان نمودند (۲۵). اکسی‌توسین هم‌چنین می‌تواند تمایز کاردیومیوژنیک سلول‌های اجدادی/ بنیادی بالغ را نیز القا نماید. به طوری که کاتسوهیسا و همکاران نشان داده‌اند که سلول‌های Sca-1 مثبت جدا شده از قلب موش‌های بالغ سطوح پایینی از mRNA گیرنده اکسی‌توسین را بیان نموده و بعد از تیمار با اکسی‌توسین ژن‌های قلبی از جمله: α-MHC، αMHC، GATA4، Nkx2.5/Csx، MLC2v، MLC2a، و cardiac α-actin و پروتئین‌های انقباضی را بیان نموده و ساختار سارکومری و ضربان خودبه‌خودی نشان می‌دهند (۱۹). حاتمی و همکاران سلول‌های بنیادی جنینی موش را کشت داده و بعد از تشکیل اجسام جنینی آنها را تحت تیمار با اکسی‌توسین قرار دادند. بیان ایزوفرم‌های αMHC و αMHC قلبی در گروه‌های شاهد و تحت تیمار مشخص شد. در طول تکوین اجسام جنینی از مرحله ابتدایی به مرحله تاخیری در گروه‌های کنترل و تحت تیمار، تنظیم مثبت αMHC و تنظیم منفی αMHC مشاهده شد (۲۰). این اختلاف در الگوی بیان، هماهنگ با گذر از αMHC به αMHC در طول تکوین قلبی موش می‌باشد (۲۶). در این بررسی، mRNAهای MLC2v و ANF، مارکرهای اختصاصی حفرات قلبی، نیز در سطوح نسبتا بالایی مشاهده شدند (۲۰). در مطالعه حاضر سلول‌هایی که به مدت چهار هفته تحت تیمار با اکسی‌توسین بودند، ژن‌های αMHC، α-actinin و MLC2v را بیان نمودند.

خانواده GATA از جمله فاکتورهای رونویسی در تشکیل قلب می‌باشند و در قلب مهره داران سه ژن: GATA4، GATA و GATA6 بیان می‌شود. جنین‌های موشی که فاقد GATA4 هستند، لوله‌های قلب دو شاخه داشته و تعداد میوسیت‌های قلبی آنها کاهش می‌یابد. با وجود این بیان ژن مذکور در هر دو گروه آزمایش و کنترل این مطالعه مشاهده نشد (۲۷، ۲۸).

از بیان MLC2v و ANF اغلب به ترتیب برای مشخص نمودن سلول‌های شبه بطنی (۲۹) و شبه دهلیزی (۳۰) در کشت‌های سلول‌های بنیادی استفاده می‌نمایند؛ بنابراین می‌توان گفت از آنجا که در پژوهش حاضر، سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان انسان در پایان دوره‌ی القایی MLC2v را بیان نموده‌اند، میوسیت‌های موجود از نوع بطنی می‌باشند. در سلول‌های بنیادی جنینی انسان، بیان αMHC به محض شروع دوره انقباضی، کاهش می‌یابد. این مشاهده غلبه αMHC در جنین‌های انسانی در نیمه بارداری و سپس محدود شدن بیان آن به دهلیز انسان را در نظر می‌آورد (۳۱، ۳۲). هم‌چنین چون αMHC قلبی ایزوفرم غالب MHC قلبی در بطن‌ها در طول تکوین فتال می‌باشد (۳۳)، می‌توان نتیجه گرفت که بیان αMHC و MLC2v نشان دهنده حضور سلول‌های شبه بطنی در سلول‌های تحت القا می‌باشد. بنابراین بیان ژن‌های قلبی αactinin، αMHC، و MLC2v و عدم بیان ژن‌های MLC2a، αMHC و ANF، نشان‌دهنده تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان انسان به کاردیومیوسیت‌های بطنی بعد از القا به وسیله اکسی‌توسین می‌باشد.

در مطالعه حاضر برای نشان دادن نقش گیرنده اکسی‌توسین در کاردیومیوژنز سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان انسان، بیان گیرنده اکسی‌توسین در سلول‌های تمایز یافته و تمایز نیافته بررسی شد. گیرنده اکسی‌توسین در سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان انسان (شاهد) و سلول‌های تحت تیمار در هفته‌های مختلف القا بیان می‌گردد. بنابراین اکسی‌توسین به واسطه گیرنده خود، عملکرد تمایزی‌اش را انجام می‌دهد و باعث تمایز قلبی سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان می‌گردد. جهت تایید تمایز قلبی از بررسی بیان پروتئین‌های ساختاری قلب از جمله؛ تروپونین و آلفا-اکتینین، به وسیله رنگ‌آمیزی ایمونوسیتوشیمی استفاده شد. در مطالعه حاضر، سلول‌های تمایز یافته در پایان دوره القا (روز ۲۸) آلفا- اکتینین و تروپونین را در سیتوپلاسم خود بیان نموده بودند. بر عکس سلول‌های بنیادی جنینی به هنگام تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی به سلول‌های قلبی سلول‌های قلبی ضربان دار ایجاد نمی‌شوند مروری بر مطالعات قبلی انجام شده، نشان داد که سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان انسان قادر به تمایز به سلول‌های قلبی ضربان‌دار نیستند و در مورد سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز موش فقط زمانی که ماکینو و همکاران مدت ۴ ماه به طور مداوم آنها را کشت داده و سپس تحت شرایط خاص کلون‌هایی را از آنها تهیه کردند، ۳۰ درصد از کلون‌ها تحت تاثیر دوز ۳ میکرومول ۵- آزاسایتدین به سلول‌های قلبی ضربان‌دار تمایز پیدا کردند (۳۴). شاید علت این پایین بودن توانایی تمایزی سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان در مقایسه با سلول‌های بنیادی جنینی در حالت *in vitro* باشد چون در حالت *in vivo* پس از پیوند سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان به مدل آزمایشگاهی نارسایی قلبی تمایز آنها به سلول‌های قلبی و جایگزینی آنها در بافت قلبی گزارش شده است (۳۵).

نتیجه‌گیری

در مطالعه حاضر، سلول‌های بنیادی مزانشیمی که مغز استخوان انسان برای اولین بار تحت القای اکسی‌توسین قرار گرفته‌اند. با نتایج به دست آمده و شواهد حاصل از بررسی‌های RT-PCR و رنگ‌آمیزی ایمونوفلورسنت می‌توان گفت که این سلول‌ها توانایی ایجاد کاردیومیوسیت‌ها را دارند. نتایج این مطالعه ممکن است کاربردهای مهمی برای سلول درمانی در آینده داشته باشد. اکسی‌توسین ممکن است به تقسیم‌های جبرانی میوسیت‌ها در اندام‌های آسیب دیده منجر گردد. بررسی‌های بیشتری برای روشن شدن چگونگی اثر اکسی‌توسین و تمایز سلول‌های بنیادی به کاردیومیوسیت و استفاده از این سلول‌ها در درمان بیماری‌های قلبی لازم می‌باشد.

تقدیر و تشکر

این پژوهش با هزینه و مساعدت معاونت پژوهشی دانشگاه‌های علوم پزشکی کردستان و رازی کرمانشاه انجام شده که بدینوسیله قدردانی می‌شود.

References

1. Pfeffer MA, Braunwald E. Ventricular remodeling after myocardial infarction: experimental observations and clinical implications. Circulation. 1990; 81: 1161-1172.
2. Li RK, Jia ZQ, Weisel RD, Mickle DA, Zhang J, Mohabeer MK, et al. Cardiomyocyte transplantation improves heart function. Ann Thorac Surg. 1996; 62(3): 654-661.
3. Erikson H. Heart failure: a growing public health problem. J Intern Med. 1995; 237(2): 135-141.
4. Li RK, Mickle DA, Weisel RD, Mohabeer MK, Zhang J, Rao V, et al. Natural history of fetal rat cardiomyocyte transplanted into adult rat myocardial scar tissue. Circulation. 1997; 96: 179-187.
5. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. Science 1999; 284(5411): 143-147.
6. 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): 93-98.
7. Minguell JJ, Conget P, Erices A. Biology and clinical utilization of mesenchymal progenitor cells. Braz J Med Biol Res. 2000; 33(8): 881-887.
8. Caplan AI, Bruder SP. Mesenchymal stem cells: building blocks for molecular medicine in the 21st century. Trends Mol Med. 2001; 7(6): 259-264.
9. Friedenstein AJ, Gorskaja JF, Kulagina NN. Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs. Exp Hematol. 1976; 4(5): 267-274.
10. Kuznetsov SA, Friedenstein AJ, Robey PG. Factors required for bone marrow fibroblast colony formation in vitro. Br J Haematol. 1997; 97(3): 561-570.
11. Caplan AI. The mesengenic process. Clin Plast Surg. 1994; 21(3): 429-435.
12. Rangappa S, Reddy VG, Bongso A, Lee EH, Sim EKW. Transformation of the adult human mesenchymal stem cells into cardiomyocyte- like cells in vivo. Cardiovasc Eng: An International Journal. 2002; 2: 7-14.
13. Makino S, Fukuda K, Miyoshi S, Konishi F, Kodama H, Pan J, et al. Cardiomyocytes can be generated from marrow stromal cells in vitro. J Clin Invest. 1999; 103(5): 697-705.
14. Xu W, Zhang X, Qian H, Zhu W, Sun X, Hu J, et al. Mesenchymal stem cells from adult human bone marrow differentiate into a cardiomyocyte phenotype in vitro. Exp Biol Med (Maywood). 2004; 229(7): 623-631.
15. Rezazadeh Valojerdi M, Baharvand H, Khezri Sh, Sepehri H. The effect of basic fibroblast growth factor on differentiation of mouse embryonic stem cells into cardiomyocytes. Yakhteh. 2005; 7(3): 172-177.
16. Gimpl G, Fahrenholz F. The oxytocin receptor system: structure, function, and regulation. Physiol Rev. 2001; 81(2): 629-683.
17. Mukaddam-Daher S, Jankowski M, Wang D, Menaouar A, Gutkowska J. Regulation of cardiac oxytocin system and natriuretic peptide during rat gestation and postpartum. J Endocrinol. 2002; 175(1): 211-216.
18. Paquin J, Danalache BA, Jankowski M, McCann SM, Gutkowska J. Oxytocin induces differentiation of P19 embryonic stem cells to cardiomyocytes. Proc Natl Acad Sci USA. 2002; 99(14): 9550-9555.
19. Matsuura K, Nagai T, Nishigaki N, Oyama T, Nishi J, Wada H, et al. Adult cardiac Sca-1-positive cells differentiate into beating cardiomyocytes. J Biol Chem. 2004; 279(12): 11384-11391.
20. Hatami L, Valojerdi MR, Mowla SJ. Effects of oxytocin on cardiomyocyte differentiation from mouse embryonic stem cells. Int J Cardiol. 2007; 117(1): 80-89.
21. Mummery C, Ward-van Oostwaard D, Doevendans P, Spijker R, van den Brink S, et al. Differentiation of human embryonic stem cells to cardiomyocytes: role of coculture with visceral endoderm-like cells. Circulation. 2003; 107(21): 2733-2740.
22. Huber I, Itzhaki I, Caspi O, Arbel G, Tzukerman M, Gepstein A, et al. Identification and selection of cardiomyocytes during human embryonic stem cell differentiation. FASEB J. 2007; 21: 2551-2563.
23. Gutkowska J, Jankowski M, Mukaddam-Daher S, McCann SM. Oxytocin is a cardiovascular hormone. Braz J Med Biol Res. 2000; 33(6): 625-633.
24. Jankowski M, Danalache B, Wang D, Bhat P, Hajjar F, Marcinkiewicz M, et al. Oxytocin in cardiac ontogeny. Proc Natl Acad Sci USA. 2004; 101(35): 13074-13079.
25. Fathi F, Murasawa S, Hasegawa S, Asahara T, Kermani AJ, Mowla SJ. Cardiac differentiation of P19CL6 cells by oxytocin. Int J Cardiol. 2009; 134(1): 75-81.
26. Morkin E. Control of cardiac myosin heavy chain gene expression. Microsc Res Tech. 2000; 50(6): 522-531.
27. Molkentin JD. The zinc finger-containing transcription factors GATA-4, -5, and -6.Ubiquitously expressed regulators of tissue-specific gene expression. J Biol Chem. 2000; 275(50): 38949-38952.
28. Molkentin JD, Lin Q, Duncan SA, Olson EN. Requirement of the transcription factor GATA4 for heart tube formation and ventral morphogenesis. Genes Dev. 1997; 11(8): 1061-1072.
29. Miller-Hance WC, LaCorbiere M, Fuller SJ, Evans SM, Lyons G, Schmidt C, et al. In vitro chamber specification during embryonic stem cell cardiogenesis. Expression of the ventricular myosin light chain-2 gene is independent of heart tube formation. J Biol Chem 1993; 268(33): 25244-25252.
30. Fassler R, Rohwedel J, Maltsev V, Bloch W, Lentini S, Guan K, et al. Differentiation and integrity of cardiac muscle cells are impaired in the absence of beta1 integrin. J Cell Sci. 1996; 109(Pt 13): 2989-2999.
31. Nakao K, Minobe W, Roden R, Bristow MR, Leinwand LA. Myosin heavy chain gene expression in human heart failure. J Clin Invest. 1997; 100: 2362-2370.
32. Ritter O, Luther HP, Haase H, Baltas LG, Baumann G, Schulte HD, et al. Expression of atrial myosin light chains but not alpha-myosin heavy chains is correlated in vivo with increased ventricular function in patients with hypertrophic obstructive cardiomyopathy. J Mol Med. 1999; 77(9): 677-685.
33. Lompre AM, Nadal-Ginard B, Mahdavi V. Expression of the cardiac ventricular alfa- and beta-myosin heavy chain genes is developmentally and hormonally regulated. J Biol Chem. 1984; 259: 6437-6446.
34. Makino S, Fukuda K, Miyoshi S, Konishi F, Kodama H, Pan J, et al .Cardiomyocytes can be generated from marrow stromal cells in vitro. J Clin Invest. 1999; 103:697-705.
35. Nagaya N, Kangawa K, Itoh T, Iwase T, Murakami S, Miyahara Y, et al. Transplantation of mesenchymal stem cells improves cardiac function in a rat model of dilated cardiomyopathy. Circulation. 2005; 112: 1128-1135.