دانشور
پزشکی

دوماهنامه علمی–پژوهشی
دانشگاه شاهد
سال بیست‌وسوم–شماره ۱۲۳
تیر ۱۳۹۵

ارزیابی توان تمایز سلول‌های بنیادی مشتق از خون قاعدگی به سلول‌های قلبی در شرایط آزمایشگاهی

نویسندگان: مریم رحیمی[۱،۲]، امیرحسن زرنانی[۳،٤]، هما محسنی کوچصفهانی[۲]، سمیه کاظم‌نژاد[۵*]

۱. دانشگاه ملایر، دانشکدهٔ علوم، گروه زیست‌شناسی، ملایر، ایران
۲. دانشگاه خوارزمی تهران، دانشکدهٔ علوم زیستی، گروه علوم جانوری، تهران، ایران
۳. پژوهشکدهٔ نانوبیوتکنولوژی پژوهشگاه فناوری‌های نوین علوم زیستی جهاد دانشگاهی، ابن‌سینا، تهران، ایران
٤. مرکز تحقیقات ایمونولوژی، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران
۵. گروه پژوهشی مهندسی بافت پژوهشگاه فناوری‌های نوین علوم زیستی جهاد دانشگاهی، ابن‌سینا، تهران، ایران

* نویسنده مسئول: سمیه کاظم‌نژاد E-mail: kazemnejad_s@yahoo.com

دریافت: ۱۳۹۵/۰۲/۳۱
آخرین اصلاح‌ها: ۱۳۹۵/۰۳/۰۵
پذیرش: ۱۳۹۵/۰۳/۱۱

چکیده

مقدمه و هدف: در دهه‌های اخیر، سلول‌های بنیادی به‌عنوان یک روش درمانی جدید برای بیماران مبتلا به اختلالات قلبی معرفی شده است. به‌تازگی شناسایی سلول‌های بنیادی مشتق از خون قاعدگی به‌عنوان یک منبع منحصربه‌فرد از سلول‌های بنیادی با برخی خصوصیاتی مثل سهولت دسترسی، توانایی تکثیر و خودتجدیدی بالا، امید فراوانی را برای سلول‌درمانی ایجاد کرده است. در این مطالعه، توانایی تمایز این سلول‌ها به کاردیومیوسیت بررسی شده است.

مواد و روش‌ها: بعد از بررسی مارکرهای سطحی این سلول‌ها تمایز آن‌ها به سلول‌های شبه کاردیومیوسیت در حضور ۵- آزاسیتیدین و فاکتور رشد فیبروبلاستی بررسی شد. سپس بیان سلول‌های تمایزی در سطح پروتئین و mRNA به‌وسیلهٔ رنگ‌آمیزی ایمونوفلورسنت و real-time quantitative PCR بررسی گردید.

نتایج: براساس آنالیز فلوسایتومتری ، این سلول‌ها به‌طور معمول، مارکرهای سلول‌های بنیادی مزانشیمی شبیه CD105، CD44،CD73 و CD166 همچنین OCT-4 به‌عنوان یک مارکر جنینی را بیان کردند. سلول‌های تمایزداده‌شده، مارکرهای سلول‌های کاردیومیوسیتی را در سطح mRNA و پروتئین بیان کردند. سلول‌های کاردیومیوسیت تمایزیافته از این سلول‌ها برای پروتئین Connexin-43 و troponin T2 (TNNT2) مثبت بودند. همچنین mRNA ، Connexin-43،Connexin-40، Alpha actinin، Tropomyosin1 و TNNT2 در سطح بالایی در سلول‌های تمایزی بیان گردید.

نتیجه‌گیری: براساس داده‌های ما سلول‌های بنیادی مشتق از خون قاعدگی، جمعیت سلولی منحصربه‌فردی هستند که توانایی تمایز به سلول‌هایی با ویژگی‌هایی که به‌طور معمول، به سلول‌های کاردیومیوسیت نسبت داده می‌شود دارند.

واژگان کلیدی: خون قاعدگی، سلول بنیادی، کاردیومیوسیت، تمایز

مقدمه

ازجمله مشکلاتی که امروزه جامعهٔ انسانی با آن مواجه است، بیماری‌های قلبی‌عروقی است. کاردیومیوسیت‌های قلبی، سلول‌های پس‌میتوزی می‌باشند که بعد از تولد توانایی تکثیر خود را از دست می‌دهند. بعد از وقوع سکتهٔ قلبی، کاردیومیوسیت‌ها نکروزه گشته و به‌وسیلهٔ سلول‌های غیرانقباضی فیبروبلاستی جایگزین شده و در محل آسیب، بافت اسکار تشکیل می‌گردد (٤-١)؛ لذا یافتن مخزن سلولی دردسترس که بتواند در صورت نیاز، به کاردیومیوسیت یا بافت قلبی متمایز شوند و به محل آسیب‌دیده تزریق یا پیوند شوند، تحولی شگرف را در درمان این بیماران فراهم خواهد نمود (٥،٦). اخیراً باتوجه‌به ماهیت سلول‌های بنیادی استفاده از روش‌های سلول‌درمانی در بیماری‌های قلبی گسترش یافته است. یک منبع ایده‌آل برای سلول‌های بنیادی مورداستفاده در بیماری‌های قلبی، باید دارای ویژگی‌های خاص همچون راحتی در جمع‌آوری سلول‌ها، امکان تکثیر، عدم‌تحریک پاسخ‌های ایمنی، مقاومت در مقابل شرایط ایسکمیک و توانایی تمایز به سلول‌های دارای عملکرد قلبی باشد. متأسفانه هنوز منبع بسیار مناسبی برای سلول‌درمانی در بیماری‌های قلبی شناخته نشده است. در حال حاضر، مغز استخوان انسان دردسترس‌ترین و متداول‌ترین منبع سلول‌های بنیادین بالغ می‌باشد (٧). لیکن در استفاده از این سلول‌ها نیز با مشکلاتی روبه‌رو هستیم که از بین آن‌ها به عدم‌دسترسی آسان، تهاجمی‌بودن روش نمونه‌گیری و پایین‌بودن ظرفیت پتانسیل تکثیری سلول‌های بنیادین بالغ در مقایسه با سلول‌های بنیادین جنینی می‌توان اشاره کرد؛ بنابراین، درحال‌حاضر باتوجه‌به اهداف بالینی استفاده از سلول‌های بنیادین نیاز به منبعی از سلول‌های بنیادین که محدودیت‌های ذکرشده را برطرف سازد وجود دارد (٨). اخیراً مشخص شده که خون قاعدگی شامل جمعیت منحصربه‌فردی از سلول‌ها با خصوصیاتی مشابه با سلول‌های بنیادین بالغ، تحت‌عنوان سلول‌های بنیادی مشتق از خون قاعدگی است (٩،١٠). توانایی بالای ترمیم بافت اندومتر رحم انسان در سیکل تکثیر سلولی، تمایز و ریزش بافت اندومتر یک مدرک روشن برای حمایت از این فرضیه است (١١). سلول‌های بنیادی مشتق از خون قاعدگی توانایی خودتجدیدی طولانی‌مدت و رشد بسیار بالاتری را در مقایسه با سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از خون بند ناف نشان می‌دهند؛ به‌علاوه ریسک ناهنجاری‌های کاریوتیپی و توانایی تشکیل تومور این سلول‌ها بسیار کم است (١٢،١٣). مطالعات قبلی ما نشان داد که این سلول‌ها مورفولوژیی شبیه به سلول‌های مزانشیمی دارند، اما علاوه بر بیان مارکرهای سلول‌های بنیادی مزانشیمی برخی از مارکرهای سلول‌های بنیادی جنینی مثل OCT-4 را نیز بیان می‌کنند؛ به‌علاوه ما نشان دادیم که این سلول‌ها فعالیت immunomodulatory و توانایی تمایز به برخی از رده‌های سلولی مثل استئوبلاست، کندروسیت و هپاتوسیت را دارند (١٨-١٤). این ویژگی‌ها همچنین فراوانی و دسترسی آسان و غیرتهاجمی‌بودن روش نمونه‌گیری خون قاعدگی را به‌عنوان یک منبع سلول بنیادی مناسب جهت سلول‌درمانی و مهندسی بافت قلب معرفی می‌کند. ازآنجایی‌که ممکن است سلول‌های بنیادی تمایزنیافته که به بدن پیوند می‌شوند، به‌طور خودبه‌خودی، به چندین رده سلولی متمایز شوند، بدیهی است تمایز سلول‌های بنیادی به سلول‌های شبیه کاردیومیوسیت در محیط کشت قبل از پیوند می‌تواند نتایج بهتری را در ترمیم بافت قلبی و بازگشت عملکرد قلب داشته باشد. در این زمینه چندین فاکتور رشد شامل فاکتورهای رشد transforming-growth-factor-β1(TGF-β1)، platelet- derived growth factor(PDGF)، basic-fibroblast growth- factor (bFGF) همچنین ترکیبات شیمیایی از قبیل 5-azacytidine، retinoic acid و dimethylsulfoxide (DMSO) برای القای تمایز کاردیومیوسیتی انواعی از سلول‌های بنیادی استفاده شده‌اند (١٩-٢٢). مطالعات اخیر شواهدی را برای پتانسیل تمایزی سلول‌های مشتق از خون قاعدگی

در هم‌کشتی با سلول‌های کاردیومیوسیت جنینی موش و استفاده از 5-azacytidine به همراه گلوتاماکس نشان دادند (۱۲ و ۲۳). اطلاعات کمی دربارهٔ تمایز این سلول‌ها به کاردیومیوسیت در حضور فاکتورهای رشد و سیتوکین‌ها در محیط کشت وجود دارد. هدف اصلی از مطالعهٔ حاضر یافتن ترکیبی از فاکتورهای رشد مناسب برای تمایز کاردیومیوسیتی سلول‌های بنیادی مشتق از خون قاعدگی بود. برای رسیدن به این هدف، دو فاکتور مهم درگیر در تمایز کاردیومیوسیتی 5-Azacytidin و bFGF در ترکیب با درصد کمی از سرم در محیط کشت استفاده گردید.

مواد و روش‌ها

۱. جداسازی و کشت سلول‌های بنیادی مشتق از خون قاعدگی انسان

افراد اهداکنندهٔ خون قاعدگی از خانم‌های سالم با متوسط سن بین ۲۲ تا ۳۶ سال انتخاب شدند. تمام اهداکنندگان فرم رضایتنامهٔ تأییدشده توسط کمیتهٔ اخلاق پزشکی پژوهشگاه فناوری‌های نوین علوم پزشکی جهاد دانشگاهی ابن‌سینا با شمارهٔ تأییدیهٔ ۸۹/۲۷۵٤ را امضا کردند. ۵ میلی‌لیتر خون قاعدگی با استفاده از یک Divacup (Diva International Co, Lunette, Finland) استریل در روز دوم سیکل قاعدگی جمع‌آوری شد. خون جمع‌آوری‌شده به یک لولهٔ فالکون استریل شامل ۲/۵ میلی‌گرم / میلی‌لیتر fungizone (Gibco,UK)، ۱۰۰ میلی‌گرم / میلی‌لیتر استرپتومایسین، ۱۰۰ واحد/ میلی‌لیتر پنی‌سیلین(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) و ۰/۵ میلی‌مولار EDTA (Gibco) در phosphate buffered saline(PBS) منتقل شد. سلول‌های تک‌هسته‌ای با استفاده از گرادیان غلظت Ficoll-Hypaque (GE-Healthcare, Uppsala, Sweden) جدا شدند. بدین ترتیب که مقدار ۵ میلی‌لیتر فایکول در یک لولهٔ فالکون ۱۵ میلی‌لیتری ریخته شد، سپس هم‌حجم آن از خون جمع‌آوری‌شده، به‌آرامی به آن اضافه گشته و به‌مدت بیست دقیقه با دور ۶۰۰g سانتریفیوژ شد. پس از اتمام سانتریفیوژ، چهار لایه جدا شد که از پایین به بالا عبارت‌اند از: گلبول‌های قرمز، فایکول، حلقهٔ سلول‌های تک‌هسته‌ای و پلاسما. پس از اتمام سانتریفیوژ، لایهٔ سلول‌های تک‌هسته‌ای به‌آرامی جمع‌آوری شدند و سه بار با PBS به‌مدت پنج دقیقه با دور ٤٥۰g سانتریفیوژ و شسته شدند. سلول‌های تک‌هسته‌ای به داخل فلاسک کشت ۲۵ cm2 حاوی محیط کشت Dulbecco's Modified Eagle Medium/Nutrient Mixture F12-Ham (DMEM-F12) و ۱۵درصد Fetal bovine serum (FBS) هر دو از (Sigma) منتقل شدند. سپس فلاسک‌ها در دمای ۳۷°C و ۵درصد CO_2 در انکوباتور انکوبه گردیدند. پس از ۲٤ ساعت انکوباسیون محیط رویی تعویض شده و به سلول‌های بنیادی که خاصیت چسبندگی دارند، اجازهٔ رشد داده شد. سلول‌ها دو بار در هفته، تعویض محیط شده و پس از آنکه ۸۰ الی ۹۰درصد فلاسک‌ها را پر کردند با استفاده از Trypsin/EDTA (Gibco) پاساژ داده شدند (١٤).

۲. تعیین مارکرهای سطحی سلول‌های بنیادین با روش فلوسایتومتری

به‌منظور بررسی ماهیت سلول‌های بنیادی مشتق از خون قاعدگی درصد بیان تعدادی از آنتی‌ژن‌های سطح سلولی بنیادی مزانشیمی نظیرCD10، STRO1، CD9، CD29، CD73، CD44و CD105 و برخی مارکرهای داخل سلولی مرتبط با سلول‌های بنیادی جنینی نظیر OCT-4 در سلول‌های کشت‌داده‌شده در پاساژ ۳ تا ۵ با روش فلوسایتومتری ارزیابی شدند. همچنین به‌منظور بررسی عدم‌آلودگی سلول‌های هماتوپوئتیک، بیان مارکرهای اختصاصی این سلول‌ها نظیر CD34، CD38، CD133 و CD45 در سلول‌های کشت‌داده‌شده مورد بررسی قرار گرفت. جهت انجام فلوسایتومتری، ابتدا سلول‌ها تریپسینه شدند و در لولهٔ تست هرکدام 10^5 سلول ریخته و به‌مدت هفت دقیقه در دور ۲۰۰g سانتریفیوژ شد. رسوب جداشده در ۲درصد PBS-FBS حل شده و سه بار شسته شدند. سپس سلول‌ها به‌طور جداگانه با آنتی‌بادی‌های مونوکلونال (PE) کانژوگه mouse anti

human: CD29(clone 04-MAR; BD Pharmingen)، CD44 (clone515; BD ،CD73(cloneAD2; BD Pharmingen) Pharmingen)، CD133 (clone TMP4; eBioscience)، clone CD10(HI10a CD146(clone P1H12; BD ،BD Pharmingen) Pharmingen)،CD105 (clone 43A3; BioLegend) و (FITC) کانژوگه mouse anti human: CD34 (clone 581; BD Pharmingen) CD45 (clone ،CD38 (clone HIT2; BD Pharmingen) HI30; BD Pharminggen)برای ۴۰ دقیقه در تاریکی انکوبه شدند. برای رنگ‌آمیزی غیرمستقیم با آنتی‌بادی غیرکنژوگه STRO1 پس از شست‌وشوی سلول‌ها با ۲٪ PBS-FBS سلول‌ها به‌مدت ۴۰ دقیقه با mouse anti human STRO1(clone STRO-1; R&D Systems) انکوبه شدند. پس از این مدت، دو بار با ۲٪ PBS-FBS شسته و با آنتی‌بادی ثانویه FITC-conjugated sheep anti mouse (Aviccena Research Institute) به‌مدت۳۰ دقیقه انکوبه شدند. در مورد رنگ‌آمیزی سلول‌ها با آنتی‌بادی داخل سلولی OCT-4 پس از شست‌وشوی سلول‌ها با PBS، به‌مدت ۱۰ دقیقه در فرم آلدهید ٤٪ فیکس شدند. پس از این مدت، سلول‌ها با PBS شسته و به‌منظور افزایش نفوذپذیری آنتی‌بادی در سلول رسوب سلولی در ساپونین ۰/۱٪ حل و ۷ دقیقه در دور ۲۰۰g سانتریفیوژ شد. سپس سلول‌ها به‌مدت ٤۰ دقیقه با آنتی‌بادی پلی‌کلونال غیرکنژوگه rabbit anti-human OCT-4 (Abcam) انکوبه شدند. پس از این مدت، سلول‌ها ۲ بار با ساپونین ۰/۱٪ در دور ۲۰۰g شسته و با آنتی‌بادی ثانویه FITC-conjugated goat anti rabbit Ig (Sigma) به‌مدت ۳۰ دقیقه انکوبه شدند. سپس سلول‌ها ۳ بار با PBS شسته و در محلول فرم آلدهید ۱٪ فیکس و تا زمان آنالیز در ٤°C قرار داده شدند. آنالیز نمونه‌ها با استفاده از دستگاه فلوسایتومتری Partec (Germany) نسبت به یک ایزوتایپ کنترل (clone MOPC-21;BD Pharmingen) انجام شد.

۳. تمایز سلول‌های بنیادی مشتق از خون قاعدگی به سمت سلول‌های استخوان و غضروف و چربی

برای بررسی بیشتر خصوصیات سلول‌های بنیادی مشتق از خون قاعدگی، توانایی تمایز آن‌ها به چربی و استخوان و غضروف قبل از ارزیابی توان تمایزی این سلول‌ها به سلول‌های کاردیومیوسیت بررسی گردید. در راستای تمایز به استخوان، سلول‌ها به‌وسیلهٔ محیط DMEM همراه با ۱٪ FBS (Gibco)، ۰/۱ میکرومول دگزامتازون، ۱۰ میکرومول بتا-گلیسروفسفات و ۵۰ میکرومول آسکوربات فسفات همگی از (Sigma) تیمار شدند. بعد از دو هفته سلول‌های کشت‌داده‌شده، به‌وسیلهٔ رنگ‌آمیزی اختصاصی برای کلسیم با کیت رنگ‌آمیزی Alizarin red (Sigma) بررسی شدند. برای تمایز به غضروف سلول‌ها با محیطی حاوی ۲درصد FBS (Gibco)، ۱۰۰ میکروگرم/میلی‌لیتر سدیم پیرووات، ۲۰ نانوگرم /میلی‌لیتر TGF β3 ، ۵۰ نانوگرم /میلی‌لیتر BMP 6، ۱۰۰ نانومول دگزامتازون ITS+۱Premix X۱و۵۰ میکروگرم/میلی‌لیتر آسکوربیک اسید (Sigma) تیمار شدند. محیط کشت دو بار در هفته تعویض شد و تمایز به غضروف به‌وسیلهٔ رنگ‌آمیزی ایمونوفلورسنت برای کلاژن نوع II بررسی گردید. به‌طور خلاصه، نمونه‌ها با ۰/٤٪ تریتون۱۰۰ -X برای ۲۰ دقیقه نفوذپذیر شدند و برای یک شب، در ٤°C با آنتی‌بادی مونوکلونال mouse anti-human Collagen type II (clone 5B2.5, 1:500; Abcam) انکوبه شدند. سپس سلول‌ها با FITC-labeled goat anti-mouse IgG (Abcam) در ۳۷°Cبرای ٤۵ دقیقه در تاریکی انکوبه شدند. سپس سلول‌ها با DAPI (Sigma) برای رنگ‌آمیزی هسته‌ها انکوبه گردیدند و با یک میکروسکوپ فلورسنت (Olympus BX51microscope, Tokyo, Japan) متصل به دوربین دیجیتال (Olympus DP71, Tokyo, Japan) مشاهده شدند. برای تمایز به چربی سلول‌ها با محیط DMEM حاوی ۱۰٪ FBS، ۱ میلی‌مولار دگزامتازون ،۱۰ میلی‌گرم/میلی‌لیتر انسولین، ۰/۵ میلی‌مولار ۳-ایزوبوتیل-۱-متیل-زانتینیند و۲۰۰ میلی‌مولار ایندومتاسین همگی از (Sigma) برای ۲ هفته تیمار شدند. سلول‌های تمایزیافته به چربی برای رنگ‌آمیزی واکوئل‌های چربی با استفاده از رنگ‌آمیزی Oil red O (Sigma) رنگ شدند و سپس با میکروسکوپ معکوس (Olympus CKX41, USA) بررسی گردیدند.

٤. تمایز سلول‌های بنیادی مشتق از خون قاعدگی به سمت سلول‌های کاردیومیوسیت

برای تمایز سلول‌های بنیادی مشتق از خون قاعدگی به سمت سلول‌های کاردیومیوسیت از پاساژ دوم سلول‌های بنیادی بهره گرفته شد. بدین صورت که پس از انجام پاساژ سلولی، هنگامی که تراکم سلولی در پلیت‌های پوشانده شده با ۰/۱درصد ژلاتین (از پوست خوک) (sigma) به ۷۰ تا ۸۰درصد رسید، محیط کشت عادی از ظرف‌های کشت خارج شده و با محیط کشت تمایزی تعویض گردید. بدین منظور، سلول‌ها به‌مدت دو روز، در معرض۱۰ مایکرومول ۵- آزاسایتیدین (sigma) و۱۰ نانوگرم/میلی‌لیتر فاکتور رشد فیبروبلاستی (sigma) قرار گرفتند. بعد از آن محیط سلول‌ها برداشته شد و سلول‌ها کاملاً با PBS شست‌وشو داده شدند تا اینکه هیچ گونه اثری از ۵- آزاسایتیدین در محیط باقی نماند. سپس سلول‌ها به‌مدت ۳ هفته در معرض محیط محتوی۱۰ نانوگرم/میلی‌لیتر فاکتور رشد فیبروبلاستی و ۵درصد FBS کشت داده شدند و هر سه روز یک بار، محیط کشت سلول‌ها تعویض گردید.

۵. رنگ‌آمیزی ایمنوفلورسنت

جهت آنالیز بیان پروتئین‌های اختصاصی کاردیومیوسیت ازجمله Connexin-43 و TNNT2 سلول‌های کشت‌داده‌شده در محیط تمایزی در آخرین روز تمایز، با PBS استریل و گرم شست‌وشو شدند و بعد در محلول neutral-buffered formalin(NBF) به‌مدت ۱۵ دقیقه، در دمای اتاق تثبیت شدند. سلول‌های فیکس‌شده به‌مدت یک شب با آنتی‌بادی اولیه Polyclonal Anti –TNNT2– (۳۰۰: ۱) و Polycolonal- Anti-Connexin 43 (۲۰۰: ۱) در دمای ٤ درجه انکوبه شدند. سپس سلول‌ها ۳ بار با PBS شست‌وشو شدند و سپس به‌مدت ٤٥ دقیقه در دمای ۳۷ درجه با FITC-labeled sheep anti-mouse IgG (AvicennaResearch Institute) انکوبه شدند. بعد از شست‌وشو با PBS سلول‌ها با 4, 6 diamidino-2-phenylindole (DAPI) (۱۰۰: ۱) برای رنگ‌آمیزی هسته انکوبه گردیدند و سپس سلول‌ها با میکروسکوپ فلورسنت (Olympus BX51) مشاهده شدند.

۶. بررسی بیان ژن‌های اختصاصی قلبی در سلول‌های تمایزداده‌شده با تکنیک Real- Time PCR

الگوی بیان مارکرهای قلبی از قبیل Connexin-43، Connexin-40، TNNT2، ACTN2، TMP1 در سلول‌های تمایزی نسبت به سلول‌های غیرتمایزی با استفاده از qRT-PCR بررسی شدند. سلول‌های قلبی جداشده از جنین‌های سقط‌شده (۸ تا ۱۲ هفته) به‌عنوان کنترل مثبت استفاده گردید. RNA کل از $8 \pm 2 \times 10^5$ سلول تمایزی و غیرتمایزی با استفاده از کیت RNEasy (Qiagen, CA, USA) استخراج گردید. برای ساخت cDNA ازRNA تیمارشده با ۱ مایکرولیتر DNAse I (Fermentas Inc, MD, USA)، ۱ مایکرولی SuperScriptTM II Reverse Transcriptase (200 U) (Life Technologies, CA, USA)، ٤ مایکرولیتر 5X First Strand buffer، ۲۰ پیکومول dNTP Mix، ۲۰پیکومول N6 Random-Hexamer، ۲ میکرولیتر Dithiothreitol (0.1M) و ۱ مایکرولیتر RiboLockTM RNase inhibitor همگی از (Fermentas Inc) در ترموسایکلر (Eppendorf, Germany) در ۲۵°C برای ۱۰ دقیقه، ٤۲°C برای ۵۰ دقیقه و ۷۰°C برای ۱۵ دقیقه استفاده شد. سپس ۱ مایکرولیتر از cDNA (۱مایکروگرم) با ۵ مایکرولیتر (x ۲)SYBR® Premix Ex Taq™ (Takara Bio Inc, Japan)، ۰/۲ مایکرولیتر از هر پرایمر ۱۰ پیکومولی (جدول ۱) با ۳/٦ مایکرولیتر آب مقطر دوبار تقطیر استریل مخلوط گردید و درنهایت واکنش qRT-PCR در دستگاه Rotor gene Q Real Time PCR(USA) انجام شد. در ضمن بیان ژن GAPDH به‌عنوان کنترل داخلی استفاده شد.

۷. تحلیل آماری

تجزیه‌وتحلیل آماری نتایج بیان ژن در سلول‌های تمایزی نسبت به سلول‌های غیرتمایزی با تکنیک Time Real- PCR با استفاده با دو نرم‌افزار[۲٤](۱۱ Ling Reg PCR Version) و 2009 REST- انجام شد.

جدول ۱. توالی پرایمرهای استفاده‌شده برای بررسی تمایز سلول‌های بنیادی مشتق از خون قاعدگی به سلول‌های شبیه به کاردیومیوسیت.

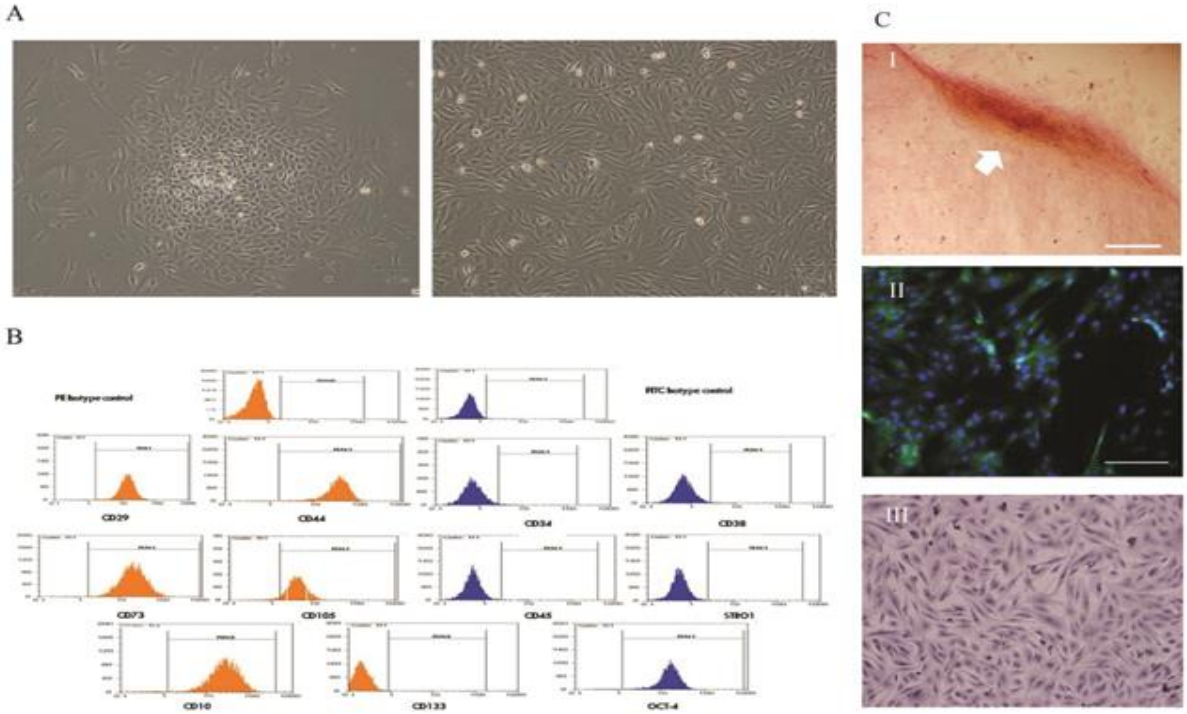
نام پرایمر	توالی پرایمر	طول قطعه حاصل (bp)	شماره دست یابی	دمای Annealing (C°)
TPM1	F 5'- GGCACCGAAGATGAACTGGACA-3' R 5'- GCGTCTGTTCAGAGAAGCTACG-3'	120	NM_000366	60
ACTN2	F 5'-GAGGGCAAGATGGTGTCGGATA-3' R 5'-CTTCTCAGCCAGGTGTTCCAAG-3'	126	NM_001103	60
TNNT2	F 5'-AAGAGGCAGACTGAGCGGGAAA-3' R 5'-AGATGCTCTGCCACAGCTCCTT-3'	124	NM_000364	60
Connexin-43	F 5'-GGAGATGAGCAGTCTGCCTTTC-3' R 5'-TGAGCCAGGTACAAGAGTGTGG-3'	149	NM_000165	60
Connexin-40	F 5'-TAGGCAAGGTCTGGCTCACTGT-3' R 5'-GAAAGCCTGGTCGTAGCAGACA-3'	149	NM_005266	60
GAPDH	F5' -CTCTCTGCTCCTCCTGTTCG-3' R 5'-ACGACCAAATCCGTTGACTC-3'	114	NM_00110	60

TPM1: Tropomyosin alpha-1 chain ,ACTN2: Actinin, alpha 2,TNNT2: Troponin T type 2, GAPDH: Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase.

نتایج

۱. ارزیابی خصوصیات سلول‌های بنیادی مشتق از خون قاعدگی کشت‌داده‌شده

به‌طور میانگین از هر ۵ سی‌سی خون قاعدگی ۸ الی ۱۰ میلیون سلول تک‌هسته‌ای جدا گردید که این تعداد در ۳ فلاسک ۷۵ تقسیم شد. حدود ۵درصد از این تعداد را سلول‌های بنیادی تشکیل می‌دهند. سلول‌های بنیادی خون قاعدگی پس از یک شبانه‌روز، به کف فلاسک می‌چسبند. این سلول‌ها قادر به تشکیل کلنی بوده و پس از یک الی دو بار پاساژ، کشیده‌تر می‌شوند و ظاهری فیبروبلاستی پیدا می‌کنند. بعد از حدود ده روز ۷۰ الی ۸۰درصد فلاسک را پر می‌کنند. سرعت رشد سلول‌های بنیادی خون قاعدگی سریع می‌باشد؛ به‌طوری که پس از رسیدن به فاز لگاریتمی رشد، نیاز به دو بار پاساژ این سلول‌ها در هفته می‌باشد (شکل۱-A). نتایج آنالیز فلوسایتومتری نشان می‌دهد که درصد بیان مارکرهای CD105، CD29، CD44، CD73، CD9 و CD10 در سلول‌های بنیادی خون قاعدگی به‌ترتیب ۹۵درصد، ۹۹درصد، ۹۹درصد، ۹۹درصد، ۹۸درصد، ۹۷درصد می‌باشد. همچنین سلول‌های بنیادی خون قاعدگی قادر به بیان قابل‌توجه OCT-4 (۹۵درصد) می‌باشند. این در حالی است که مارکرهای ویژهٔ سلول‌های هماتوپوئتیک ازجمله CD45، CD34، CD38 و CD133 در این سلول‌ها بیان قابل‌توجهی نشان ندادند؛ همچنین سلول‌های بنیادی خون قاعدگی، قادر به بیان مارکر STRO1 نمی‌باشند (شکل۱-B). این نتایج از یک سو نشان‌دهندهٔ ویژگی منحصربه‌فرد سلول‌های بنیادی خون قاعدگی و از سوی دیگر مؤید کیفیت جداسازی سلول‌های بنیادی خون قاعدگی و حذف سلول‌های هماتوپوئتیک در طی جداسازی سلول‌های استرومال از خون قاعدگی می‌باشد. تجمع ندول‌های کلسیمی که نشان از تمایز به سلول‌های استئوبلاستی می‌باشد در سلول‌های تمایزداده‌شده با استفاده از رنگ‌آمیزی آلیزارین رد مشاهده گردید. علاوه بر این سلول‌های تمایزیافته به غضروف کلاژن نوع II را بیان کردند. درحالی‌که رنگ‌آمیزی Oil red O سلول‌های تمایزیافته به چربی منفی بود (شکل۱-C).



شکل۱. خصوصیات ظاهری سلول‌های بنیادی مشتق از خون قاعدگی.

A. مورفولوژی سلول‌های بنیادی مشتق از خون قاعدگی در کشت اولیه (سمت چپ) و پاساژ ۳ (سمت راست)، بزرگ‌نمایی: X ۱۰۰، B. نمودار ایمونوفنوتایپینگ سلول‌های بنیادی مشتق از خون قاعدگی به‌وسیلهٔ فلوسایتومتری، C. سلول‌های بنیادی مشتق از خون قاعدگی تمایزیافته به استخوان (I) و غضروف (II) و چربی (III)

۲. ارزیابی سلول‌های بنیادی مشتق از خون قاعدگی تمایزداده‌شده به سمت سلول‌های کاردیومیوسیت

۲-۱. بررسی مورفولوژیکی سلول‌های تمایزداده‌شده

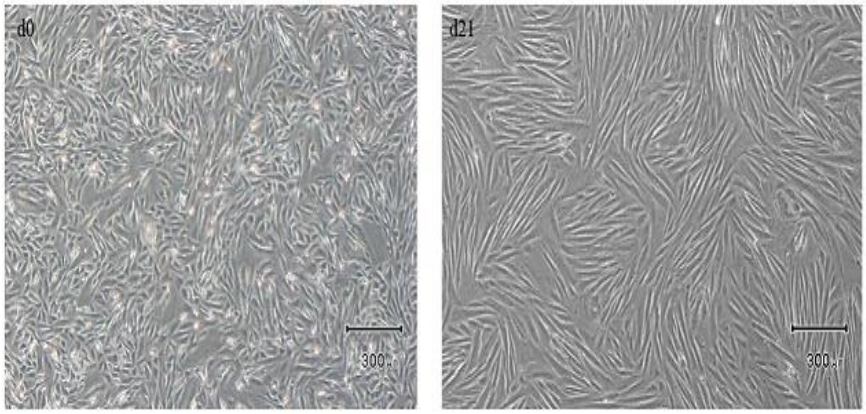
مورفولوژی ظاهری سلول‌های کشت‌داده‌شده در محیط تمایزی در حین تمایز با میکروسکوپ فاز کنتراست مشاهده شد. این سلول‌ها قبل از تمایز، شکلی شبیه فیبروبلاست داشتند. در حین تمایز، بعد از اضافه‌کردن آزاسایتیدین تعداد کمی از سلول‌ها مردند و از کف فلاسک جدا شدند، اما سلول‌های باقی‌مانده کم‌کم شروع به تغییر شکل کردند؛ به‌طوری‌که یک هفته بعد از آغاز تمایز، به‌طور واضح سلول‌هایی دیده شد که شروع به کشیده و بلندشدن کردند. در هفتهٔ دوم تمایز، تعداد بیشتری از سلول‌ها حالت کشیده پیدا کردند و در هفتهٔ سوم تمایز مشاهده شد که سلول‌های کشیده‌شده که مورفولوژی Stick-like داشتند و شروع به برقرای ارتباط با سلول‌های مجاور خود کردند و همچنین یک نظمی در ساختار آن‌ها ایجاد شده است (شکل۲).

۲-۲. رنگ‌آمیزی ایمنوفلورسنت Connexin-43 و TNNT2

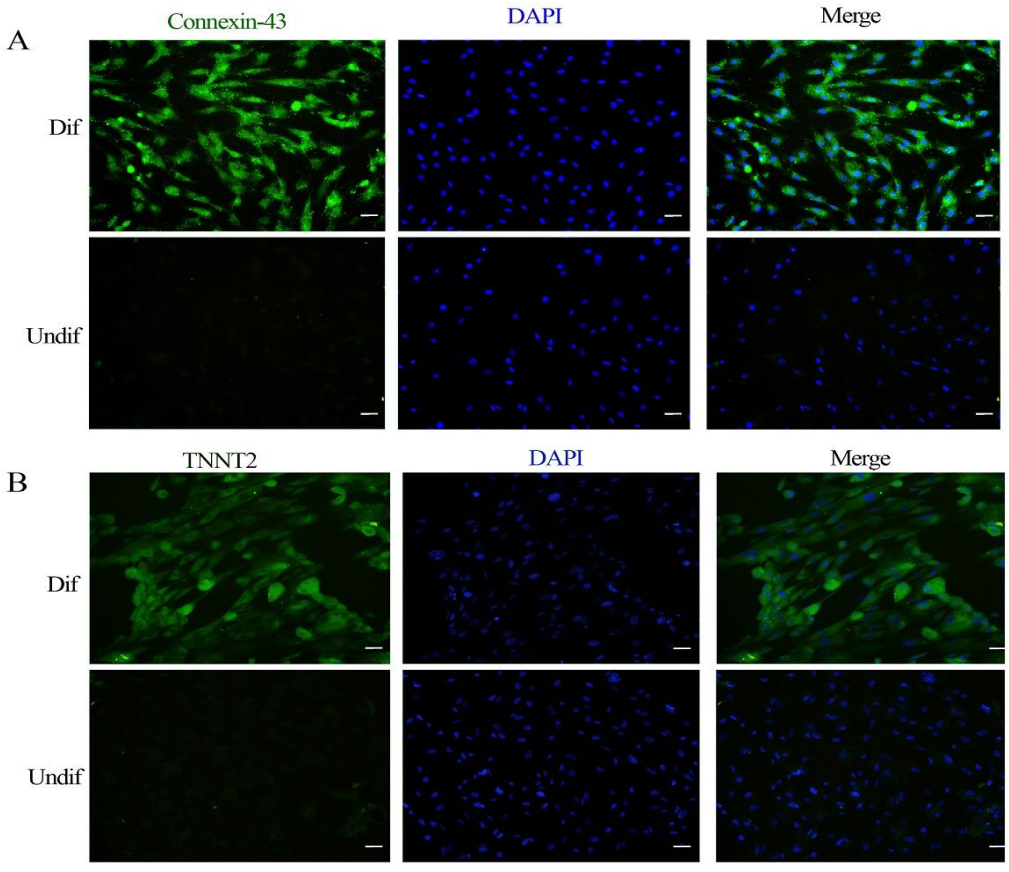
همان‌طور که در شکل (۳) نشان داده شده است، سلول‌های تمایزیافته در روز بیست‌ویکم قادر به بیان Connexin-43 و TNNT2 می‌باشند؛ این در حالی است که بیان این مارکرها در سلول‌های بنیادی خون قاعدگی قبل از تمایز (روز صفر) منفی بود.

۲-۳. بیان ژن‌های کاردیومیوسیت

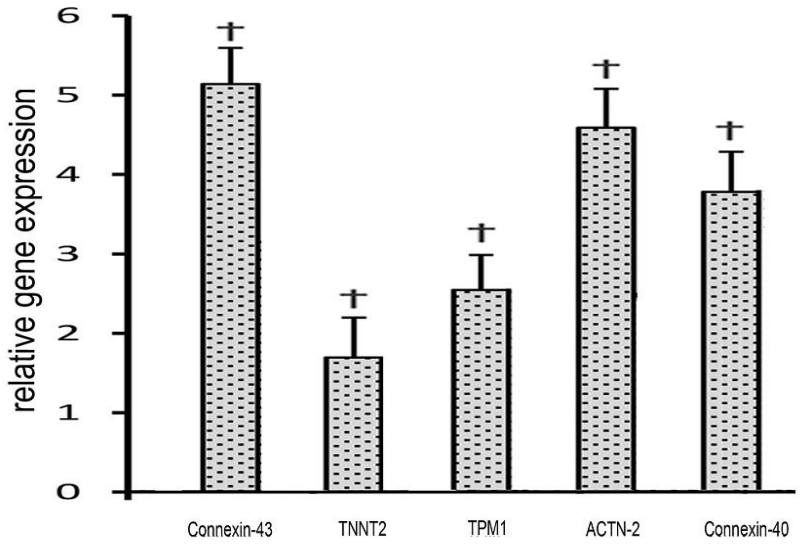
الگوی بیان Connexin-43،Connexin-40 و TMP1 به‌عنوان مارکرهای کاردیومیوسیتی و TNNT2 و ACTN2 به‌عنوان یک مارکر نهایی[۲۵] در سلول‌های تمایزیافته نسبت به سلول‌های تمایزنیافته با استفاده از Real-Time PCR بررسی شد. همان‌طور که در شکل ٤ نشان داده شده است، افزایش معنی‌داری در بیان ژن‌های Connexin-43،Connexin-40، TNNT2 ، TMP1 و ACTN2 (P=0.001) در سلول‌های تمایزی نسبت به سلول‌های غیرتمایزی وجود دارد.



شکل۲. تغییرات مورفولوژیکی سلول‌های بنیادی مشتق از خون قاعدگی به سلول‌های شبه‌کاردیومیوسیت در طول ۲۱ روز، با استفاده از میکروسکوپ معکوس. بزرگ‌نمایی: X۳۰۰



شکل۳. رنگ‌آمیزی ایمونوفلورسنت سلول‌های بنیادی مشتق از خون قاعدگی تمایزیافته به سمت کاردیومیوسیت. بیان پروتئین‌های Connexin-43 (A) و TNNT2 (B) در سلول‌های تمایزی با رنگ‌آمیزی ایمونوفلورسنت (رنگ سبز) بررسی گردید. هسته‌ها با DAPI (آبی) رنگ شدند. **بزرگ‌نمایی: X ۲۰.**



شکل ٤. نتایج Real Time PCR: داده‌های مربوط به سلول‌های تمایزی با نتایج مربوط به GAPDH متعادل شدند و سپس نسبت به سلول‌های غیرتمایزی محاسبه گردیدند. † تفاوت معنی‌دار P=0.001 سلول‌های تمایزی در مقایسه با سلول‌های غیرتمایزی است.

بحث و نتیجه‌گیری

اخیراً سلول‌های بنیادی مشتق‌شده از خون قاعدگی به‌عنوان یک جمعیت منحصربه‌فرد از سلول‌های بنیادی تشخیص داده شده‌اند و امیدهای فراوانی را برای سلول‌درمانی ایجاد کرده است (۲۶،۲۷). هرچند مطالعات فراوانی نیاز است تا این سلول‌ها را برای سلول‌درمانی و مهندسی بافت مناسب معرفی کنند. در این مطالعه، خصوصیات منحصربه‌فرد و توان تمایزی قلبی سلول‌های بنیادی مشتق از خون قاعدگی بررسی شده است. در مرحلهٔ اول، در کل خصوصیات مورفولوژیکی، تکثیر و ایمونوفنوتایپینگ سلول‌های بنیادی مشتق از خون قاعدگی را بررسی کردیم. ما مشاهده کردیم که بخش سلول‌های چسبندهٔ خون قاعدگی یک مورفولوژی شبه‌مزانشیمی داشتند، اما سریع‌تر از سلول‌های بنیادی مشتق از مغز استخوان تکثیر می‌یافتند. بیان بالای مارکرهای سلول‌های بنیادی مزانشیمی CD105, CD44,CD73 همچنین Oct-4 به‌عنوان یک مارکر سلول بنیادی جنینی خصوصیت دوگانهٔ سلول‌های بنیادی مشتق از خون قاعدگی را نشان می‌دهد. از طرف دیگر، عدم بیان مارکر سلول‌های بنیادی مزانشیمی STRO-1 و مارکرهای سلول‌های بنیادی جنینی از قبیل NANOG و SSEA-4 سلول‌های بنیادی مشتق از خون قاعدگی انسان را از این دو نوع سلول بنیادی متمایز می‌کند. ارزیابی‌های اولیهٔ ما حاکی‌از توانایی تمایز این سلول‌ها به رده‌های غضروف و استخوان است؛ بااین‌حال این سلول‌ها توان تمایز به سمت سلول‌های چربی را نداشتند. بر اساس خصوصیات فنوتیپی، مورفولوژیکی و تکثیر سلول‌های بنیادی مشتق از خون قاعدگی، ما درنظر گرفتیم که این سلول‌ها را به‌سمت سلول‌های کاردیومیوسیت تمایز دهیم. تاکنون تأثیر فاکتورهای رشد و سیتوکین‌های مختلفی جهت تمایز کاردیومیوسیتی سلول‌های مزانشیمی مشتق از مغز استخوان مورد مطالعه قرار گرفته است، نظیر 5-azacytidin به‌تنهایی (۲۸،۲۹)، ترکیبی از 5-azacytidin با bFGF (۳۰)، ترکیبی از bFGF و BMP-2 و IGF (۳۱) و هم کشتی با کاردیومیوسیت‌ها (۳۲،۳۳). داده‌های به‌دست‌آمده از این مطالعات نشان می‌دهد که نوع و ترکیب و غلظت فاکتورهای رشد و سیتوکین‌ها و مدت زمان تمایز در تمایز سلول‌های مزانشیمی مشتق از مغز

استخوان به سلول‌های شبه‌کاردیومیوسیت تأثیرگذار است. با وجود مطالعات گسترده‌ای که بر روی تمایز سلول‌های‌های مزانشیمی مشتق از مغز استخوان به سمت کاردیومیوسیت در شرایط in vitro وجود دارد، تاکنون مطالعات کمی در جهت تمایز کاردیومیوسیتی سلول‌های بنیادی مشتق از خون قاعدگی انسان انجام گرفته است. تلاش برای تمایز سلول‌های بنیادی مشتق از خون قاعدگی به سلول‌های کاردیومیوسیت اولین بار، توسط Hida و همکارانش در آپریل ۲۰۰۸ توسط Azacytidin همراه با هم‌کشتی با کاردیومیوسیت‌های جنینی موش و Patel و همکاران در فوریهٔ ۲۰۰۸ توسط 5-azacytidin به همراه گلوتاماکس انجام گرفت. محققین ژاپنی در آوریل سال ۲۰۰۸ ضربان نبض‌دار و تشکیل تارهای عضلانی قلبی را در سلول‌های پیش‌ساز جداشده از خون قاعدگی که همراه سلول‌های قلبی موش صحرایی کشت داده شده بودند گزارش کردند. آن‌ها نشان دادند که ۲۷ تا ۳۲درصد سلول‌های قلبی تمایزیافته از منشأ سلول‌های خون قاعدگی پروتئین تروپونین I را بیان کردند و پیوند سلول‌های تمایزیافته به موش nude سبب ترمیم اختلال قلبی به‌وجود آمده و کاهش انفارکتوس قلبی شد (۲۳). در این مطالعه تأثیر دو فاکتور مهم درگیر در تمایز کاردیومیوسیتی، 5-Azacytidin و bFGF در ترکیب با درصد کمی از سرم در محیط کشت، بر روی تمایز سلول‌های بنیادی مشتق از خون قاعدگی بررسی گردید. نتایج ما نشان داد که azacytidin همراه با bFGF در طول سه هفته، تأثیر قابل‌توجهی بر روی بیان فاکتورهای اختصاصی سلول‌های کاردیومیوسیتی دارد. در تأیید این یافته‌ها، Wenrong و همکارانش در سال ۲۰۰٤ گزارش کردند که 5-azacytidin به همراه bFGF در طول دو هفته، باعث افزایش بیان beta-MHC, desmin, alpha-cardiac actin و cardiac troponin T در سطح mRNA و در سطح پروتئین beta-myosin heavy chain،alpha-cardiac actin و desmin می‌شود؛ همچنین Singla و همکارانش در سال ۲۰۰۵، نشان دادند که bFGF نقش مهمی در تمایز hESCs به سمت سلول‌های کاردیومیوسیتی دارد (۳٤).

علاوه‌برآن Yong Hahn و همکارنش نیز در سال ۲۰۰۸ گزارش کردند که bFGF همراه با BMP-2 و IgF در تمایز کاردیومیوسیتی نقش قابل توجهی دارد. Vidarsson و همکارانش در سال ۲۰۱۰، فاکتورهای رشد مؤثر در تمایز قلبی را در سه گروه مهم قرار دادند که یک گروه از آن‌ها FGFها بودند (۳۵). در این گروه bFGF نقش مهمی در تمایز و بقا و مهاجرت سلولی دارد. bFGF یک عضو از خانواده heparin-binding growth factors است که به رسپتورهای تیروزین کیناز متصل می‌شوند. در قلب نشان داده شده که بیان bFGF بعد از آسیب‌های قلبی از قبیل سکته قلبی افزایش می‌یابد؛ همچنین باید به این نکته توجه کرد که در طول embryogenesis، bFGF نقش مهمی را در حرکت سلول‌های مزودرمی به سمت کاردیومیوسیتی بازی می‌کند (۳٦-۳۸). در کل، نتایج ما نشان داد که سلول‌های بنیادی مشتق از خون قاعدگی پتانسیل خوبی جهت تمایز به سلول‌های کاردیومیوسیت دارند. به‌گونه‌ای که بیان پاره‌ای از مارکرهای اختصاصی قلبی در سلول‌های تمایزداده‌شده نسبت به سلول‌های غیرتمایزی افزایش می‌یابد؛ بنابراین باتوجه‌به دسترسی آسان و غیرتهاجمی به نمونهٔ خون قاعدگی و پتانسیل تکثیری بالای سلول‌های بنیادی مشتق از خون قاعدگی به‌نظر می‌رسد که این سلول‌ها منبع مناسبی جهت اهداف سلول‌درمانی بیماری‌های قلبی باشند. از سوی دیگر، بررسی مسیرهای سیگنالینگی که در تمایز سلول‌های بنیادی مشتق از خون قاعدگی نقش دارند به تبیین ماهیت این سلول‌ها کمک می‌کند. بدون شک با پیشرفت‌های آینده در مهندسی بافت و سلول‌درمانی می‌توان از این سلول‌ها در جهت منافع بیماران زیادی استفاده کرد.

منابع

1. Pfeffer MA, Braunwald E. Ventricular remodeling after myocardial infarction. Experimental observations and clinical implications. Circulation 1990;81(4):1161-72
2. Li RK, Jia ZQ, Weisel RD, Mickle DA, Zhang J, Mohabeer MK,et al. Cardiomyocyte transplantation improves heart function. The Annals of Thoracic Surgery1996;62(3):654-60
3. Eriksson H. Heart failure: a growing public health problem. Journal of Internal Medicine 1995;237(2):135-41.
4. Li RK, Mickle DA, Weisel RD, Mohabeer MK, Zhang J, Rao V, et al. Natural history of fetal rat cardiomyocytes transplanted into adult rat myocardial scar tissue. Circulation 1997;96(9):179-86
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):143-7.
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):93-8.
7. Edwards RG. Stem cells today: B1. Bone marrow stem cells. Reproductive BioMedicine Online 2004;9(5):541-83.
8. Tuan RS, Boland G, Tuli R. Adult mesenchymal stem cells and cell-based tissue engineering. Arthritis Research & Therapy 2003;5(1):32-45.
9. Meng X, Ichim TE, Zhong J, Rogers A, Yin Z, Jackson J, et al. Endometrial regenerative cells: a novel stem cell population. Journal of Translational Medicine 2007 15;5:57.
10. Musina RA, Belyavski AV, Tarusova OV, Solovyova EV, Sukhikh GT. Endometrial mesenchymal stem cells isolated from the menstrual blood. Bulletin of Experimental Biology and Medicine 2008;145(4):539-43.
11. Masuda H, Matsuzaki Y, Hiratsu E, Ono M, Nagashima T, Kajitani T, et al. Stem cell-like properties of the endometrial side population: implication in endometrial regeneration.Plos One2010;5(4):e10387
12. Patel AN, Park E, Kuzman M, Benetti F, Silva FJ, Allickson JG. Multipotent menstrual blood stromal stem cells: isolation, characterization, and differentiation. Cell Transplant 2008;17(3):303-11.
13. Allickson JG, Sanchez A, Yefimenko N, Borlongan CV, Sanberg PR. Recent Studies Assessing the Proliferative Capability of a Novel Adult Stem Cell Identified in Menstrual Blood. Open Stem Cell J 2011;3(2011):4-10.
14. Darzi S, Zarnani AH, Jeddi-Tehrani M, Entezami K, Mirzadegan E, Akhondi MM, et al. Osteogenic differentiation of stem cells derived from menstrual blood versus bone marrow in the presence of human platelet releasate. Tissue Engineering Part A 2012;18(15-16):1720-8.
15. Khanmohammadi M, Khanjani S, Bakhtyari MS, Zarnani AH, Edalatkhah H, Akhondi MM, et al. Proliferation and chondrogenic differentiation potential of menstrual blood- and bone marrow-derived stem cells in two-dimensional culture. International Journal of Hematology2012;95(5):484-93.
16. Kazemnejad S, Akhondi MM, Soleimani M, Zarnani AH, Khanmohammadi M, Darzi S, et al. Characterization and chondrogenic differentiation of menstrual blood-derived stem cells on a nanofibrous scaffold. The International journal of Artificial Organs2012;35(1):55-66.
17. Khanjani S, Khanmohammadi M, Zarnani AH, Talebi S, Edalatkhah H, Eghtesad S, et al. Efficient generation of functional hepatocyte-like cells from menstrual blood-derived stem cells. Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine 2013 Mar 18. [Epub ahead of print]
18. Nikoo S, Ebtekar M, Jeddi-Tehrani M, Shervin A, Bozorgmehr M, Kazemnejad S, et al. Effect of menstrual blood-derived stromal stem cells on proliferative capacity of peripheral blood mononuclear cells in allogeneic mixed lymphocyte reaction. Journal of Obstetrics and Gynaecology Research2012;38(5):804-9.
19. Martin-Rendon E, Sweeney D, Lu F, Girdlestone J, Navarrete C, Watt SM. 5-Azacytidine-treated human mesenchymal stem/progenitor cells derived from umbilical cord, cord blood and bone marrow do not generate cardiomyocytes in vitro at high frequencies. Vox Sanguinis 2008;95(2):137-48.
20. Fukuda K. Reprogramming of bone marrow mesenchymal stem cells into cardiomyocytes. Comptes Rendus Biologies 2002;325(10):1027-38.
21. Behfar A, Zingman LV, Hodgson DM, Rauzier JM, Kane GC, Terzic A, et al. Stem cell differentiation requires a paracrine pathway in the heart. The FASEB Journal 2002;16(12):1558-66.
22. Xu C, Police S, Rao N, Carpenter MK. Characterization and enrichment of cardiomyocytes derived from human embryonic stem cells. Circulation Research 2002 20;91(6):501-8.
23. Hida N, Nishiyama N, Miyoshi S, Kira S, Segawa K, Uyama T, Mori T, Miyado K, Ikegami Y, Cui C, Kiyono T, Kyo S, Shimizu T, Okano T, Sakamoto M, Ogawa S, Umezawa A. Novel cardiac precursor-like cells from human menstrual blood-derived mesenchymal cells. Stem Cells 2008;26(7):1695-704.
24. Ruijter JM, Ramakers C, Hoogaars WM, Karlen Y, Bakker O, van den Hoff MJ, Moorman AF. Amplification efficiency: linking baseline and bias in the analysis of quantitative PCR data. Nucleic Acids Research 2009;37(6):e45.

25. Efe JA, Hilcove S, Kim J, Zhou H, Ouyang K, Wang G, Chen J, Ding S. Conversion of mouse fibroblasts into cardiomyocytes using a direct reprogramming strategy. Nature Cell Biology2011;13(3):215-22.
26. Zhang MJ, Liu B, Xia W, Sun ZY, Lu KH. Could cells from menstrual blood be a new source for cell-based therapies? Medical Hypotheses 2009;72(3):252-4.
27. Gargett CE. Uterine stem cells: what is the evidence? Human Reproduction Update 2007;13(1):87-101.
28. Makino S, Fukuda K, Miyoshi S, Konishi F, Kodama H, Pan J, Sano M, Takahashi T, Hori S, Abe H, Hata J, Umezawa A, Ogawa S. Cardiomyocytes can be generated from marrow stromal cells in vitro. The Journal of Clinical Investigation1999;103(5):697-705.
29. Zhang Y, Chu Y, Shen W, Dou Z. Effect of 5-azacytidine induction duration on differentiation of human first-trimester fetal mesenchymal stem cells towards cardiomyocyte-like cells. Interactive CardioVascular and Thoracic Surgery 2009;9(6):943-6.
30. Xu W, Zhang X, Qian H, Zhu W, Sun X, Hu J, Zhou H, Chen Y. Mesenchymal stem cells from adult human bone marrow differentiate into a cardiomyocyte phenotype in vitro. Experimental biology and medicine 2004;229(7):623-31
31. Hahn JY, Cho HJ, Kang HJ, Kim TS, Kim MH, Chung JH, Bae JW, Oh BH, Park YB, Kim HS. Pre-treatment of mesenchymal stem cells with a combination of growth factors enhances gap junction formation, cytoprotective effect on cardiomyocytes, and therapeutic efficacy for myocardial infarction. American College of Cardiology Foundation 2008;51(9):933-43.
32. Rangappa S, Entwistle JW, Wechsler AS, Kresh JY. Cardiomyocyte-mediated contact programs human mesenchymal stem cells to express cardiogenic phenotype. The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery2003;126(1):124-32.
33. Wang T, Xu Z, Jiang W, Ma A. Cell-to-cell contact induces mesenchymal stem cell to differentiate into cardiomyocyte and smooth muscle cell. International Journal of Cardiology 2006;109(1):74-81.
34. Singla DK, Sobel BE. Enhancement by growth factors of cardiac myocyte differentiation from embryonic stem cells: a promising foundation for cardiac regeneration. Biochemical and Biophysical Research Communications 2005;335(3):637-42.
35. Vidarsson H, Hyllner J, Sartipy P. Differentiation of human embryonic stem cells to cardiomyocytes for in vitro and in vivo applications. Stem Cell Reviews and Reports 2010;6(1):108-20.
36. Szebenyi G, Fallon JF. Fibroblast growth factors as multifunctional signaling factors. International Review of Cytology 1999;185:45-106.
37. Detillieux KA, Sheikh F, Kardami E, Cattini PA. Biological activities of fibroblast growth factor-2 in the adult myocardium. Cardiovascular Research 2003;57(1):8-19.
38. Solloway MJ, Harvey RP. Molecular pathways in myocardial development: a stem cell perspective. Cardiovascular Research 2003;58(2):264-77.

Daneshvar

Medicine

Scientific-Research Journal of Shahed University
23nd Year, No.123
June- July, 2016

Received: 20/05/2016
Last revised: 25/05/2016
Accepted: 31/05/2016

Evaluation of differentiation potential of menstrual blood-derived stem cells to cardiomyocytes in vitro

Maryam Rahimi[1,2], Amir-Hassan Zarnani[3,4], Homa Mohseni-Kouchesfehani[2], Somaieh Kazemnejad[5]*

1. Department of Biology, Faculty of Sciences, Malayer University, Malayer, Iran.
2. Department of Animal Biology, Faculty of Biological Sciences, Kharazmi University, Tehran, Iran.
3. Nanobiotechnology Research Center, Avicenna Research Institute, ACECR, Tehran, Iran.
4. Immunology Research Center, Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran.
5. Reproductive Biotechnology Research Center, Avicenna Research Institute, ACECR, Tehran, Iran.

***Corresponding author e-mail: kazemnejad_s@yahoo.com**

Abstract

Background and Objective: In recent decades, stem cell therapy has been introduced as a novel therapeutic approach for patients suffering from cardiac disorders**.** Recently, identification of menstrual blood-derived stem cells (MenSCs) as a unique source of stem cell with some characteristics as well as ease of access, high proliferative ability and renewability has created enormous promise for cell therapy.

Materials and Methods: In this study, differentiation ability of MenSCs into cardiomyocytes has been investigated. After MenSCs immunophenotyping, their differentiation into cardiomyocyte was investigated in the presence of 5-azacytidine and basic-fibroblast growth factor. Then, expression of the putative myogenic cells at mRNA and protein levels was determined by immunofluorescent staining and real-time quantitative PCR.

Results: Based on flow cytometric analysis, the isolated MenSCs typically expressed mesenchymal stem cell markers like CD105, CD73, CD44 and CD166 in parallel to OCT-4 as an embryonic marker. The differentiated MenSCs expressed cardiomyocyte markers at mRNA/protein level. The myogenic cells differentiated from MenSCs were positive for Connexin-43 and troponin T2 (TNNT2) protein. The mRNAs of Connexin-43, Connexin-40, Alpha actinin, Tropomyosin1 and TNNT2 were highly expressed in the differentiated myogenic cells.

Conclusion: Based on our data, MenSCs are a unique cell population with differentiation ability into cells with characteristics commonly attributed to cardiomyocytes.

Keywords: Menstrual blood, Stem cell, Cardiomyocyte, Differentiation