Original Article

Effect of Vitamin C on Bioviability and Differentiation Potential of Human Umbilical Cord Wharton's Jelly-Derived Mesenchymal Stem Cells

Tayebeh Mohammadi[1], Saeed Azandeh[2], Dariush Bijannejad[2], Najmeh Shamseddini Lori[1]*

[1]*Department of Biology, Faculty of Sciences, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran.*

[2]*Cellular & Molecular Research Center, Ahvaz Jundishapur University of Medical Sciences, Ahvaz, Iran.*

[*]***Corresponding Author:*** **Tayebeh Mohammadi**, Department of Biology, Faculty of Sciences, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran.

Email: t.mohammadi@scu.ac.ir

Received: 23 Jul, 2016

Accepted: 22 Nov, 2016

Downloaded from journal.muq.ac.ir at 6:06 IRDT on Monday May 28th 2018

Abstract

***Background and Objectives*:** Human umbilical cord Wharton's jelly-derived mesenchymal stem cells are one of the valuable sources for cell therapy and tissue engineering, and for these purposes, it is necessary to proliferate them in culture medium. Culture medium imposes oxidative stress on cells. Vitamin C (vit C) is a potent antioxidant. The aim of this study was to investigate the effect of vit C on proliferation and differentiation of these cells.

***Methods*:** After isolation and culture of cells from umbilical cord Wharton's jelly, cells of third passage culture, were treated with different concentrations of vit C in five groups, including: 1- without vit C, 2- supplemented medium with 5µM of vit C; 3- supplemented medium with 50µM of vit C; 4- supplemented medium with 250, and 5- supplemented medium with 500µM of vit C. The treatment period was 9days. Cellular bioviability was assessed by MTT assay, and their differentiation potential was assessed by osteogenic and adipogenic differentiation inducer medium and histochemical staining.

***Results*:** In this study, vit C with concentration of 250µM increased cellular bioviability, while other concentrations decreased it ($p \leq 0.05$). Also, 50µM concentration improved osteogenic differentiation; while, in terms of adipogenic differentiation, it could just uniform dispersion of lipid droplets with 50 µM concentration.

***Conclusion*:** The results of this study showed that an appropriate concentration of vit C can increase the viability of Wharton's jelly and affect osteogenic and adipogenic differentiation in a dose-dependent manner.

***Keywords*:** Wharton jelly; Mesenchymal Stromal Cells, Ascorbic Acid; Cell Differentiation**.**

مجله دانشگاه علوم پزشکی قم
دوره یازدهم، شماره یازدهم، بهمن ۹۶
صفحه ۱ الی ۱۱

مقاله پژوهشی
(Original Article)

اثر ویتامین ث بر بقای زیستی و پتانسیل تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی استخراج‌شده از ژله وارتون بندناف انسان

طیبه محمدی[1*]، سعید آزنده[2]، داریوش بیژن‌نژاد[2]، نجمه شمس‌الدینی لری[1]

[1]گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران.

[2]مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی جندی‌شاپور اهواز، اهواز، ایران.

[*]نویسنده مسئول مکاتبات:
طیبه محمدی، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران؛

آدرس پست الکترونیکی:
t.mohammadi@scu.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۵/۱

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۵/۹/۱

چکیده

زمینه و هدف: سلول‌های بنیادی مزانشیمی استخراج‌شده از ژله وارتون بندناف انسان، یکی از منابع ارزشمند برای سلول درمانی و مهندسی بافت است و برای این اهداف لازم است در محیط کشت تکثیر شوند. محیط کشت، استرس اکسیداتیو را به سلول‌ها تحمیل می‌کند. ویتامین ث یک آنتی‌اکسیدان قوی است. هدف این مطالعه بررسی اثر ویتامین ث روی تکثیر و تمایز این سلول‌ها بود.

روش بررسی: بعد از جداسازی و کشت سلول‌ها از ژله وارتون بندناف، سلول‌های پاساژ سوم کشت سلولی، تحت تیمار با غلظت‌های مختلف ویتامین ث در پنج گروه شامل: ۱- فاقد ویتامین ث؛ ۲- محیط غنی‌شده با ۵ میکرومول ویتامین ث؛ ۳- محیط غنی‌شده با ۵۰ میکرومول ویتامین ث ؛ ۴- محیط غنی‌شده با ۲۵۰ و محیط غنی‌شده با ۵۰۰ میکرومول ویتامین ث قرار گرفتند. طول مدت تیمار ۹ روز بود. بقای زیستی سلول‌ها با استفاده از آزمون MTT و پتانسیل تمایز آن‌ها با کمک محیط القاگر تمایزی استئوژنیک، آدیپوژنیک و رنگ‌آمیزی هیستوشیمیایی بررسی شد.

یافته‌ها: در این مطالعه، ویتامین ث با غلظت ۲۵۰ میکرومول، بقای سلولی را افزایش داد؛ درحالی‌که سایر غلظت‌ها آن را کاهش داد ($p\leq ۰/۰۵$). همچنین غلظت ۵۰ میکرومول، تمایز استئوژنیک را بهبود بخشید؛ درحالی‌که در رابطه با تمایز آدیپوژنیک با غلظت ۵۰ میکرومول فقط توانست پراکندگی قطرات چربی را یکنواخت کند.

نتیجه‌گیری: نتایج این مطالعه نشان داد ویتامین ث با غلظت مناسب می‌تواند بقای سلول‌های بنیادی مزانشیمی ژله وارتون را افزایش دهد و به‌صورت وابسته به دوز روی تمایز استئوژنیک و آدیپوژنیک آنها اثر بگذارد.

کلید واژه‌ها: ژله وارتون؛ سلول‌های بنیادی مزانشیمی؛ اسید اسکوربیک؛ تمایز سلولی.

لطفاً به این مقاله به‌صورت زیر استناد نمایید:

Mohammadi T, Azandeh S, Bijannejad D, Shamseddini Lori N. Effect of vitamin C on bioviability and differentiation potential of human umbilical cord wharton's Jelly-derived mesenchymal stem cells. Qom Univ Med Sci J 2018;11(11):1-11. [Full Text in Persian]

Downloaded from journal.muq.ac.ir at 6:06 IRDT on Monday May 28th 2018

Downloaded from journal.muq.ac.ir at 6:06 IRDT on Monday May 28th 2018

مقدمه

سلول‌های بنیادی مزانشیمی استخراج‌شده از ژله وارتون بندناف انسان با داشتن ویژگی‌های سلول‌های بنیادی بالغ و جنینی، قادرند به انواع رده‌های مختلف سلولی تمایز پیدا کنند. همچنین این سلول‌ها به‌واسطه دارا بودن ویژگی‌های منحصر به‌فردی همچون ظرفیت تکثیر بالا، کمترین احتمال آلودگی ویروسی یا باکتریایی، دستیابی آسان، فعالیت تعدیل‌کنندگی ایمنی، خواص ضدسرطانی و نداشتن مسائل اخلاقی، به‌عنوان یکی از منابع ارزشمند برای سلول درمانی و مهندسی بافت مورد توجه هستند (۱). استفاده از این سلول‌ها جهت کاربرد درمانی، مستلزم تعداد زیاد این سلول‌ها می‌باشد؛ بنابراین لازم است قبل از کاربرد درمانی، در محیط‌های کشت آزمایشگاهی تکثیر شوند (۲). محیط کشت، وضعیت استرس اکسیداتیو را به سلول‌ها تحمیل می‌کند. استرس اکسیداتیو نتیجه عدم تعادل بین رادیکال‌های آزاد و دفاع آنتی‌اکسیدانی بدن بوده که می‌تواند موجب پیری، مرگ و یا تغییر سلولی شود (۳). در مقابل، آنتی‌اکسیدان‌ها ترکیباتی هستند که از تشکیل رادیکال‌های آزاد در سلول جلوگیری می‌کنند و نقش مهمی در حفاظت از سلول در برابر آسیب‌های ناشی از استرس اکسیداتیو دارند (۴). ویتامین ث (C) یا اسید آسکوربیک یک ویتامین محلول در آب است که بهترین نقش شناخته‌شده آن، این است که به‌عنوان یک آنتی‌اکسیدان، رادیکال‌های آزاد بسیار واکنش‌پذیر را که پیوسته به‌وسیله متابولیسم سلول تولید می‌شوند از بین می‌برد (۵)، همچنین این ویتامین جزئی از مکانیسم حفاظتی آنتی‌اکسیدانی عمومی موجود در سلول‌ها و بافت‌ها به شمار می‌آید (۶)، در شرایط آزمایشگاهی، رادیکال‌های آزاد موجود در میتوکندری مغز موش را تجزیه می‌کند (۷)، و قادر است جلوی جهش ناشی از اکسایش در DNA سلول‌های انسانی را بگیرد (۸)، و زمانی‌که به محیط کشت اضافه شود می‌تواند به‌عنوان تحریک‌کننده رشد برای افزایش تکثیر سلولی و سنتز DNA عمل کند (۹). همچنین، وجود این ویتامین جهت تقلید محیط فیزیولوژیک سلول‌های بنیادی مزانشیمی و تنظیم تکثیر و تمایز آنها لازم است (۱۰). از طرفی، مورفولوژی کلنی‌های سلول بنیادی رویانی موش را حفظ کرده و تمایز آنها را مهار می‌کند (۱۱). این ویتامین، فعالیت پروموتر و سطح پروتئین Nanog را که فاکتور کلیدی پرتوانی است، افزایش داده و روی مسیرهای سیگنال‌دهی مختلف اثر می‌گذارد (۱۲). باوجود اینکه تحقیقات زیادی در رابطه با اثر اسید آسکوربیک روی سنتز ماتریکس خارج سلولی، تکثیر و تمایز سلولی انجام شده، ولی در رابطه با اثرات آن روی بقای زیستی، تمایز hWJ-MSCs و سمّیت سلولی آن مطالعه‌ای صورت نگرفته است؛ بنابراین، این مطالعه با هدف بررسی اثر غلظت‌های مختلف ویتامین ث به‌عنوان یک مکمل آنتی‌اکسیدانی در محیط کشت بر بقا و تمایز این سلول‌ها انجام شد.

روش بررسی

از بندناف نوزادان سالم متولدشده به روش سزارین (با کسب رضایت والدین)، نمونه‌هایی به طول تقریبی ۱۵ سانتی‌متر از ناحیه اتصال آن به جفت، جدا و در شرایط استریل در داخل سرم فیزیولوژی و روی یخ از بیمارستان به آزمایشگاه کشت سلولی منتقل گردید. جداسازی سلول‌ها به روش کشت قطعه بافت انجام شد (شکل شماره ۱)؛ به این صورت که بندناف در آزمایشگاه پس از ۲ بار شست‌وشو با سرم بافر فسفاته (PBS) به قطعات حدود ۳ سانتی‌متری تقسیم شد. غشای آمنیون و عروق نافی به‌آرامی جدا شدند، سپس بندناف به قطعاتی حدود ۵ میلی‌متر، تقسیم و ۲بار با PBS شست‌وشو داده شد. به‌منظور کشت سلول‌ها، ۶-۵ قطعه از هر بندناف به فلاسک T-25 منتقل و به هر فلاسک ۳ میلی‌لیتر محیط DMEM حاوی غلظت بالای گلوکز (High glucose Dulbecco's Modified Eagle's Medium) (Gibco, Bio- IDEA)، FBS 10% (Bio- IDEA) و ۱٪ پنی‌سیلین- استرپتومایسین (Gibco, Bio- IDEA) اضافه شد. فلاسک‌ها در شرایط دمای ۳۷ درجه سانتیگراد، رطوبت ۹۵٪ و دی‌اکسیدکربن ۵٪ انکوبه شدند و هر ۳ روز یک‌بار محیط کشت آنها تعویض شد. در روز ششم، قطعات بافتی برداشته شدند. پس از پر شدن کف فلاسک، پاساژ سلولی (شامل سه مرحله) با استفاده از تریپسین ۰/۲۵٪ - EDTA (Gibco, Bio-IDEA) انجام گرفت.

Downloaded from journal.muq.ac.ir at 6:06 IRDT on Monday May 28th 2018

شکل شماره ۱: جداسازی ژله وارتون بندناف و کشت قطعات در فلاسک‌ها.
در این شکل غشای آمنیون و رگ‌های نافی از قطعات بندناف به‌آرامی جدا و باقیمانده آن به‌عنوان ژله وارتون قطعه‌قطعه و درون فلاسک‌ها کشت شده است.

در مرحله بعد، سلول‌های پاساژ سوم در ۱۵ چاهک (۳×۱۰^{۳} سلول در هر چاهک) از پلیت ۹۶ چاهکی کشت داده شدند و به پنج گروه به شرح ذیل تقسیم شدند:

۱-گروه کنترل: سلول‌های کشت‌شده در محیط LG-DMEM (Low Glucose Dulbecco's Modified Eagle's Medium) غنی‌شده با 15% FBS بدون افزودن ویتامین ث (L- Ascorbic acid - 2-phosphate(sigma،USA)؛ ۲- گروه تیمار ۱: سلول‌های کشت‌شده در محیط LG-DMEM غنی‌شده با 15% FBS و ۵ میکرومول ویتامین ث؛ ۳- گروه تیمار ۲: سلول‌های کشت‌شده در محیط LG-DMEM غنی‌شده با 15% FBS و ۵۰ میکرومول ویتامین ث؛ ۴- سلول‌های کشت‌شده در محیط LG-DMEM غنی‌شده با 15% FBS و ۲۵۰ میکرومول ویتامین ث و ۵- سلول‌های کشت‌شده در محیط LG-DMEM غنی‌شده با 15% FBS و ۵۰۰ میکرومول ویتامین ث.

طول دوره تیمار سلول‌ها ۹ روز بود (۹). طی این دوره هر ۳ روز یک‌بار محیط کشت سلولی تعویض می‌شد. پس از ۹ روز، محیط کشت خارج و به هرکدام از خانه‌ها ۱۰۰ میکرولیتر محیط LG-DMEM (حاوی ۵ میلی‌گرم برمیلی‌لیتر متیل تیازول تترازولیوم) (Sigma) اضافه و به مدت ۴ ساعت انکوبه شد. پس از تشکیل بلورهای فورمازون، این بلورها در حلال دی متیل سولفوکساید (DMSO)(Sigma) حل شدند، سپس میزان جذب نمونه‌ها در طول موج ۵۴۰ نانومتر با دستگاه ELISA rider 680 series اندازه‌گیری شد.

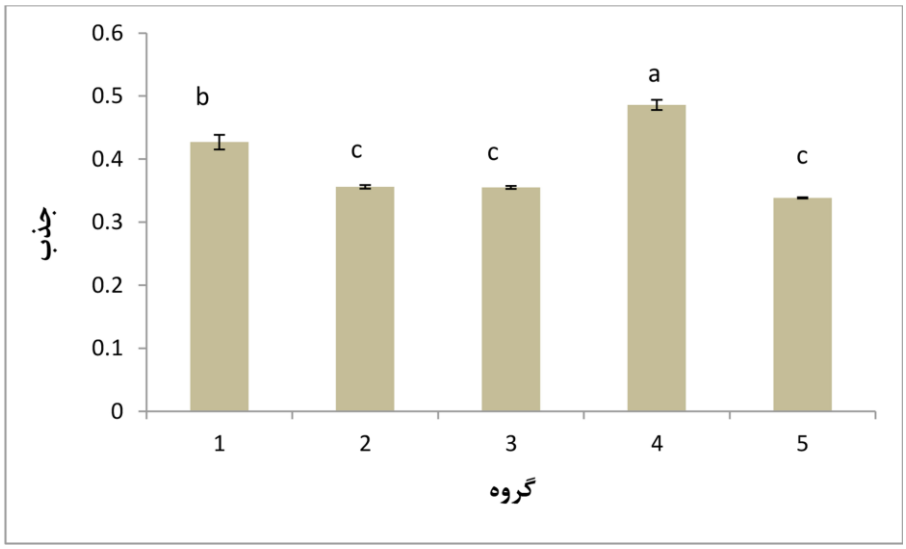
شکل شماره ۲: آزمون MTT واکنش سلول‌های زنده با محلول MTT.
شکل تشکیل کریستال ارغوانی یا بنفش‌رنگ را نشان می‌دهد.

بعد از اینکه سلول‌ها، سطح ظرف کشت را کاملاً پوشانده و با غلظت‌های مختلف (۵۰۰-۰ میکرومول) ویتامین ث تیمار شدند، در محیط تمایزی استئوژنیک و آدیپوژنیک کشت داده شدند (۹). در ادامه، بعد از ۳ هفته، رنگ‌آمیزی آلیزارین‌رد برای تمایز استئوژنیک و رنگ‌آمیزی اویل‌رداُ برای تمایز آدیپوژنیک انجام شد.

داده‌ها به کمک نرم‌افزار SPSS نسخه ۱۶، آزمون آنالیز واریانس یک‌طرفه و پس‌آزمون LSD تجزیه و تحلیل شدند. سطح معنی‌داری، $p\leq۰/۰۵$ در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

در این مطالعه، میانگین میزان جذب در گروه تیمار ۳ (۲۵۰ میکرومول)، ۰/۴۸۶±۰/۰۱۴ به دست آمد که در مقایسه با گروه کنترل به‌صورت معنی‌داری بیشتر بود ($p\leq۰/۰۵$)؛ درحالی‌که میانگین در گروه‌های تیمار ۱ (۵ میکرومول)، تیمار ۲ (۵۰ میکرومول)و تیمار ۴ (۵۰۰ میکرومول) به ترتیب: ۰/۳۵۶±۰/۰۰۵، ۰/۳۵۵±۰/۰۰۴ و ۰/۳۳۸ ±۰/۰۰۲ برآورد شد که نسبت به گروه کنترل (۰/۴۲۷±۰/۰۲)، کمتر بود ($p\leq۰/۰۵$). به بیان ساده‌تر از بین غلظت‌های به‌کار برده‌شده ویتامین ث، غلظت ۲۵۰ میکرومول، بقا و تکثیر سلول‌های بنیادی مزانشیمی ژله وارتون را افزایش داد؛ درحالی‌که سایر غلظت‌ها، به‌ویژه غلظت ۵۰۰ میکرومول، بقا و تکثیر آنها را کاهش داد (نمودار).

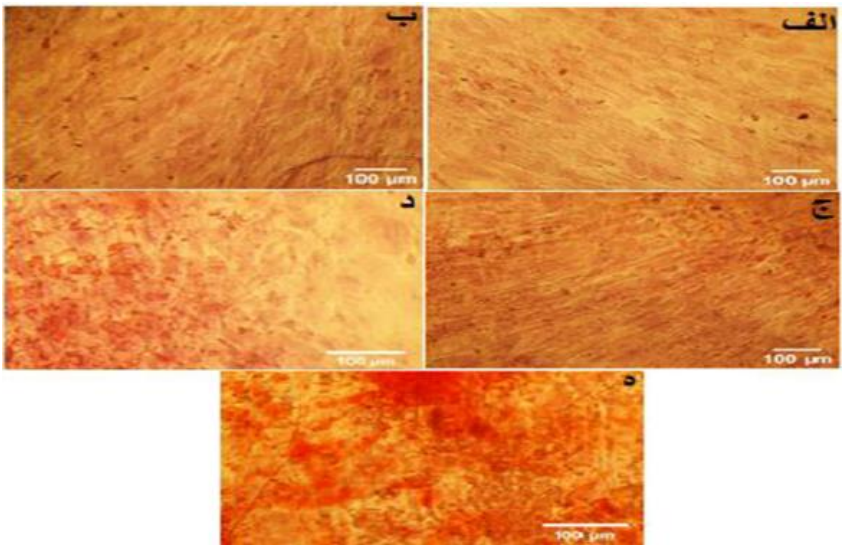


نمودار: اثر ویتامین ث بر بقای سلول‌های بنیادی مزانشیمی استخراج‌شده از ژله وارتون.
بیشترین تعداد سلول‌های زنده در گروه دریافت‌کننده ویتامین ث با غلظت ۲۵۰ میکرومول می‌باشد.
حروف غیرمشابه، نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار گروه‌های مورد مطالعه است ($p\leq۰/۰۵$).

سلول‌ها بعد از تیمار ۹ روزه با غلظت‌های مختلف ویتامین ث، در محیط تمایزی استئوژنیک کشت داده شدند. بعد از گذشت ۲۱ روز از شروع تمایز، نتایج حاصل از مطالعه میکروسکوپی کشت سلولی در گروه‌های مورد مطالعه نشان داد در غلظت‌های ۵، ۵۰، ۲۵۰ و ۵۰۰ میکرومول در مقایسه با گروه شاهد، رسوب کلسیم بیشتری تشکیل شده است؛ اما رسوبات کلسیم در غلظت‌های ۵ و ۵۰ میکرومول ویتامین ث، پراکندگی یکنواخت بیشتری داشتند و بین این دو گروه نیز میزان رسوبات در غلظت ۵۰ میکرومول بیشتر از غلظت ۵ میکرومول بود (شکل شماره ۳). در مجموع، میزان و پراکندگی رسوب کلسیم در غلظت ۵۰ میکرومول، بهتر از سایر گروه‌ها بود (شکل شماره ۳- ج).

Downloaded from journal.muq.ac.ir at 6:06 IRDT on Monday May 28th 2018

Downloaded from journal.muq.ac.ir at 6:06 IRDT on Monday May 28th 2018



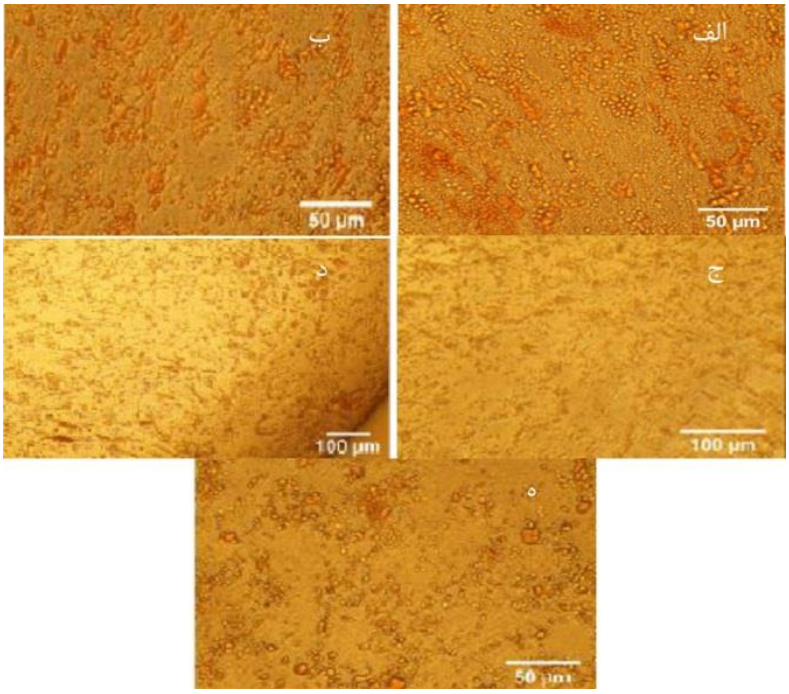
شکل شماره ۳: تمایز به دودمان استخوان‌ساز (رنگ‌آمیزی Alizarin red)

الف) گروه کنترل، ب)گروه تیمار ۱(۵ میکرومول ویتامین ث)، ج) گروه تیمار ۲ (۵۰ میکرومول ویتامین ث)، د)گروه تیمار ۳ (۲۵۰میکرومول ویتامین ث)، ه) گروه تیمار ٤ (۵۰۰ میکرومول ویتامین ث).

در شکل رسوب کلسیم در گروه تیمارشده (با ۲۵۰ میکرومول ویتامین ث)، بیشتر و پراکندگی یکنواخت‌تری دارد.

بعد از گذشت ۲۱ روز از شروع تمایز آدیپوژنیک، مطالعه میکروسکوپی نشان داد در غلظت‌های ۵، ۲۵۰ و ۵۰۰ میکرومول، قطرات چربی کمتری نسبت به گروه شاهد تشکیل شده است (شکل شماره ۴).

در غلظت ۵۰ میکرومول، تعداد قطرات چربی برابر با گروه کنترل بود؛ با این تفاوت که این قطرات یکنواخت‌تر از گروه کنترل پخش شده بودند (شکل شماره ۴- ج).



شکل شماره ٤: تمایز به دودمان چربی‌ساز (رنگ‌آمیزی Oil red O)

الف). گروه کنترل، ب) گروه تیمار ۱ (۵ میکرومول ویتامین ث)، ج) گروه تیمار ۲ (۵۰ میکرومول ویتامین ث)، د) گروه تیمار ۳ (۲۵۰ میکرومول ویتامین ث) و ه) گروه تیمار ٤ (۵۰۰ میکرومول ویتامین ث).

قطرات چربی به‌صورت قطرات قرمزرنگ دیده می‌شوند که در گروه تیمار ۲ برابر گروه کنترل، ولی یکنواخت‌تر پخش شده‌اند.

Downloaded from journal.muq.ac.ir at 6:06 IRDT on Monday May 28th 2018

بحث

سلول‌های بنیادی مزانشیمی استخراج‌شده از ژله وارتون بندناف انسان به‌عنوان یکی از منابع با ارزش سلول‌های بنیادی مزانشیمی برای اهداف سلول‌درمانی و مهندسی بافت مورد توجه است. معمولاً این سلول‌ها قبل از اینکه برای این اهداف استفاده شوند، لازم است در محیط کشت تکثیر شوند. از این‌رو، شناسایی و افزودن مکمل‌هایی که تکثیر این سلول‌ها را در محیط کشت افزایش دهند، ضروری است. باوجود انجام مطالعات پیشین در زمینه اثر اسید آسکوربیک (ویتامین ث) روی تکثیر سلول‌های بنیادی مزانشیمی، هنوز اطلاعاتی در رابطه با تأثیر غلظت‌های کم آن بر روی تکثیر و پتانسیل تمایز hWJ-MSCs موجود نیست؛ بنابراین، در مطالعه حاضر اثر غلظت‌های مختلف ویتامین ث بر تکثیر و پتانسیل تمایز این سلول‌ها مورد بررسی قرار گرفت.

در مطالعه حاضر، نتایج حاصل از آزمون MTT نشان داد میزان جذب نوری سلول‌های گروه تیمارشده با ۲۵۰ میکرومول ویتامین ث بیشتر از سایر گروه‌ها بوده که نشان‌دهنده تعداد بیشتر سلول‌های زنده می‌باشد؛ به عبارت دیگر، ویتامین ث با غلظت ۲۵۰ میکرومول بقای این سلول‌ها را در آزمایشگاه افزایش داده که می‌تواند حاکی از پتانسیل تکثیر سلول‌ها تا تعداد بیشتری پاساژ متوالی باشد. همچنین میزان جذب در تناسب با تعداد سلول‌های زنده در هر نمونه بوده که در نتیجه MTT منعکس‌کننده تعداد تکثیر سلولی است (۱۳). همچنین در این مطالعه، میزان جذب سلول‌های گروه تیمارشده (با ۵۰۰ میکرومول ویتامین ث) نسبت به سایر گروه‌ها ازجمله گروه کنترل کاهش یافت که این کاهش تکثیر سلولی نسبت به گروه کنترل می‌تواند نتیجه سمّیت سلولی ویتامین ث در این غلظت خاص باشد. بنابراین، از میان غلظت‌های استفاده‌شده ویتامین ث، غلظت ۲۵۰ میکرومول برای افزایش تکثیر مفید به‌نظر می‌رسد. به‌طورکلی، تکثیر سلول‌های بنیادی مزانشیمی به غلظت اسید آسکوربیک بستگی دارد و غلظت‌های خاصی از اسید آسکوربیک بر تکثیر آنها اثر مثبت داشته که ممکن است ناشی از اثر آنتی‌اکسیدانی وابسته به غلظت اسید آسکوربیک باشد. Rock و همکاران اعلام کردند آنتی‌اکسیدان‌ها را رادیکال‌های آزاد که طی مراحل بیولوژیکی و در پاسخ به محرک‌های خارجی تولید می‌شوند، خنثی کرده و از این طریق، خطر حاصل از استرس اکسیداتیو را برطرف می‌کنند (۱۴). در غیاب رادیکال‌های آزاد، آسیب سلولی نیز برطرف می‌شود و سلول‌ها توانایی زیستی بیشتری دارند که در نتیجه رشد بهتری نشان خواهند داد. از طرف دیگر، ممکن است در غلظت بالای ویتامین ث، سمّیت حاصل از این غلظت بالا، سیستم دفاعی آنتی‌اکسیدانی را ناقص و در نتیجه میزان رادیکال‌های آزاد افزایش یابد که منجر به کاهش توانایی زیستی سلول‌ها و متعاقب آن تکثیر سلولی می‌شود. Choi و همکاران در تحقیقی مشابه، سلول‌های بنیادی مزانشیمی استخراج‌شده از مغز استخوان موش صحرایی را به مدت ۲ هفته در محیط کشت غنی‌شده با غلظت‌های مختلف ال- آسکوربیک اسید ۲- فسفات (۵۰۰-۰ میکرومول) کشت دادند، نتایج حاصل از سنجش تعداد سلول‌های زنده با استفاده از آزمون MTT نشان داد آسکوربیک اسید (در غلظت‌های ۵، ۵۰ و ۲۵۰ میکرومول) تکثیر سلول‌های بنیادی مزانشیمی را افزایش داده است، به‌ویژه سلول‌ها در غلظت ۲۵۰ میکرومول، بیشترین تکثیر را در مقایسه با گروه کنترل که دارای شرایط کشت معمولی بود، نشان دادند و از سوی دیگر، غلظت ۵۰۰ میکرومول آن به‌طور قابل‌توجهی تکثیر سلول‌ها را کاهش داد؛ زیرا غلظت بیش از حد ویتامین ث (۵۰۰ میکرومول) ممکن است باعث آسیب سلولی شود و تعداد سلول‌های زنده را کم کند (۹). Potdar و همکاران اثر آسکوربیک اسید را بر تکثیر سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از بافت چربی زیرجلدی انسان بررسی کردند، آنها به مدت ۴ هفته سلول‌ها را در محیط کشت حاوی اسید آسکوربیک کشت داده و افزایش بیان مارکرهای پرتوانی SOX2 و OCT4 را نشان دادند که در نتیجه اسید آسکوربیک با غلظت ۲۵۰ میکرومول، رشد سلول‌ها را بدون از دست‌دادن فنوتیپ و پتانسیل تمایزشان، به‌طور چشمگیری افزایش داد و اعلام کردند اسید آسکوربیک تکثیر سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از بافت چربی زیرجلدی انسان را از طریق بیان مارکرهای پرتوانی سلول بنیادی SOX2 و OCT4 افزایش می‌دهد (۱۵). Takamizawa و همکاران نیز اثر آسکوربیک اسید ۲- فسفات را بر رشد و تکثیر سلول‌های شبه استئوبلاست انسان بررسی کردند. آن‌ها محیط کشت سلول‌های MG-63 را با غلظت‌های مختلف (۱-۰/۲۵ میکرومول) این فاکتور تیمار کردند

Downloaded from journal.muq.ac.ir at 6:06 IRDT on Monday May 28th 2018

و نشان دادند آسکوربیک اسید ۲- فسفات به‌طور قابل‌توجهی رشد سلولی را در همه غلظت‌ها در حضور FBS تحریک می‌کند (۱۶). Kumar Mecala و همکاران جهت بررسی اثر L – آسکوربیک اسید بر تکثیر سلول‌های بنیادی خون بندناف انسان، این سلول‌ها را در معرض غلظت‌های مختلف این ویتامین قرار دادند و بیان کردند رشد سلول‌های بنیادی خون بندناف به‌وسیله L- آسکوربیک اسید افزایش می‌یابد. در حقیقت، رشد این سلول‌ها به غلظت آسکوربیک اسید وابسته است؛ به بیان دیگر، در غلظت خاص (۲۵۰ میکرومول) L – آسکوربیک اسید، تکثیر سلول‌ها بدون تغییر باقی می‌ماند، اما افزایش غلظت L- آسکوربیک اسید (۵۰۰ میکرومول) باعث کاهش تکثیر سلولی و درپی آن تغییرات مورفولوژیکی در سلول‌ها می‌شود. به گفته این گروه، کاهش تکثیر سلولی، ممکن است به دلیل سیستم دفاعی آنتی‌اکسیدانی ناقص باشد (۱۷). GAO و همکاران نیز با مطالعه در زمینه حفظ سلول‌های بنیادی پرتوان، بیان کردند ویتامین ث حفظ سلول‌های بنیادی پرتوان را توسط افزایش رونویسی ژن پرتوانی، آسان می‌کند، همچنین فعالیت پروموتری Nanog (فاکتور کلیدی پرتوانی) را افزایش می‌دهد (۱۱).

در مطالعات مشابه با استفاده از عوامل آنتی‌اکسیدان دیگر نیز نتایج مشابهی گزارش شده است. سلیمانی مهرنجانی و همکاران بیان کردند ویتامین E به‌صورت وابسته به دوز باعث افزایش بقای زیستی در سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان موش صحرایی بالغ می‌شود و نشان دادند از این ویتامین می‌توان در دوز ۱۵ میکرومولار جهت افزایش بقای سلولی در کشت استفاده کرد (۱۸). همچنین Lin و همکاران طی مطالعه‌ای اعلام کردند کاهش کلسیم و افزایش آنتی‌اکسیدان‌ها در محیط کشت سلول‌های بنیادی مزانشیمی چندتوان استخراج‌شده از بافت چربی انسان، میزان رشد و طول عمر این سلول‌ها را افزایش می‌دهد (۱۹).

همچنین ویتامین ث قادر است فعالیت تلومراز در سلول‌های بنیادی لیگامنت دور دندانی را القا کند و بیان مارکرهای بنیادینگی سلول‌ها /OCT4، Nanog و تولید ماتریکس خارج سلولی را افزایش داده و از این طریق تشکیل صفحات سلولی از سلول‌های بنیادی و بازسازی بافت را نیز افزایش دهد (۱۰).

Wu و همکاران نشان دادند STAT2 یک تنظیم‌گر مثبت Nanog است که به‌وسیله فسفریلاسیون فعال شده و تیمار با ویتامین ث این فسفریلاسیون را برمی‌انگیزد؛ به عبارتی، ویتامین ث از طریق فعال‌کردن مسیر سیگنال‌دهی JAK/STAT، بیان Nanog را افزایش می‌دهد (۱۲). در تحقیق حاضر، تأثیر غلظت‌های مختلف اسید آسکوربیک روی پتانسیل تمایز سلول‌ها به دودمان‌های استخوان‌ساز و چربی‌ساز نیز مورد بررسی قرار گرفت. نتایج حاصل از تمایز استئوژنیک در گروه‌های مورد مطالعه نشان داد بهترین غلظت از نظر میزان و توازن رسوب کلسیم در سلول‌های دودمان استخوان‌ساز، غلظت ۵۰ میکرومول است. در مورد تمایز آدیپوژنیک نیز از نظر میزان و توازن قطرات چربی، غلظت ۵۰ میکرومول بهتر از غلظت‌های ۵، ۵۰ و ۲۵۰ میکرومول عمل کرد، اما نسبت به گروه شاهد، افزایشی در مقدار قطرات نداشت؛ بلکه فقط قطرات چربی، پراکندگی یکنواخت‌تری داشتند. به‌نظر می‌رسد غلظت ۵۰ میکرومول اسید آسکوربیک، جهت افزایش یکنواختی پراکندگی قطرات چربی در محیط تمایزی آدیپوژنیک مناسب باشد؛ چون نسبت به غلظت‌های ۵، ۲۵۰ و ۵۰۰ میکرومول بر میزان قطرات چربی اثر کاهشی ندارد، اما اگر هدف فقط میزان قطرات چربی باشد، این مکمل در محیط تمایز آدیپوژنیک پیشنهاد نمی‌شود. همان‌گونه که Choi نیز بیان کرد معمولاً در محیط کشت جهت تمایز آدیپوژنیک سلول‌ها از ویتامین ث به‌عنوان مکمل استفاده نمی‌شود (۹).

به‌طورکلی غلظت‌های محدودی از اسید آسکوربیک، تمایز سلولی را بهبود می‌بخشد. Choi و همکاران اثر غلظت‌های مختلف آسکوربیک اسید را بر تمایز استئوژنیک و آدیپوژنیکی سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان مورد بررسی قرار دادند. آن‌ها محیط تمایزی را با غلظت‌های ۰، ۵، ۵۰، ۲۵۰ و ۵۰۰ میکرومول آسکوربیک اسید غنی‌سازی کرده و تمایز را به مدت ۳ هفته به سمت استئوژنز و آدیپوژنز القا کردند و نشان دادند تمایز استئوژنیک در غلظت ۵۰ میکرومول و تمایز آدیپوژنیک در غلظت ۵۰۰ میکرومول اسید آسکوربیک، قوی‌تر عمل می‌کند؛ این در حالی است که نتایج مطالعه حاضر نشان داد تمایز آدیپوژنیک در غلظت ۵۰ میکرومول بهتر عمل کرده و در غلظت ۵۰۰ میکرومول ضعیف بوده است (۹).

Downloaded from journal.muq.ac.ir at 6:06 IRDT on Monday May 28th 2018

طبق مطالعه سلیمانی و همکاران، خاصیت آنتی‌اکسیدانی باعث القای تمایز استئوژنیک می‌شود (۱۸)؛ از این‌رو ممکن است دلیل بهترشدن تمایز استئوژنیک در مطالعه حاضر، خاصیت آنتی‌اکسیدانی اسید آسکوربیک بوده است. طبق گزارش Sun و همکاران، افزودن ترکیبات آنتی‌اکسیدان ازجمله ویتامین ث به محیط کشت سلول‌های بنیادی مشتق‌شده از بافت چربی انسان، تمایز آن‌ها به سلول‌های ادیپوسیت، استئوبلاست و کندروسیت را افزایش می‌دهد (۲۰). Takamizawana و همکاران با مطالعه اثر L-آسکوربیک اسید۲-فسفات بر تمایز سلول‌های شبه‌استئوبلاست انسان، بیان کردند این فاکتور، بیان مارکرهای تمایزی استئوبلاست مانند سنتز کلاژن و فعالیت آلکالین فسفاتاز را افزایش می‌دهد (۱۶). Kumar Mekala و همکاران نیز با کشت سلول‌های بنیادی خون بندناف انسان در محیط تمایزی استئوژنیک و در معرض L-آسکوربیک اسید، مشاهده کردند آسکوربیک اسید در غلظت ۲۵۰ میکرومول بر تمایز استئوژنیک سلول‌های بنیادی خون بندناف اثر مثبت داشته و غلظت اسید آسکوربیک در تمایز سلولی نیز نقش حیاتی دارد (۱۷). Cao و همکاران بیان کردند اسید آسکوربیک تمایز سلول‌های بنیادی پرتوان القایی (iPSCs) به سلول‌های قلبی را از طریق پیشبرد تکثیر سلول‌های پیش‌ساز قلبی افزایش می‌دهد. آنها با استفاده از ۱۶ القاگر کاردیومیوسیت بر روی iPSCs مختلف موش سوری، دریافتند فقط اسید آسکوربیک می‌تواند به‌طور سازگار و پایدار، تمایز ۱۱ لاین سلولی به سلول قلبی را افزایش دهد، همچنین نشان دادند اسید آسکوربیک بیان مارکرهای قلبی- عروقی را افزایش می‌دهد و یک القاگر کاردیومیوسیت مناسب برای سلول‌های بنیادی پرتوان القایی است که تمایز و بلوغ قلبی را نیز افزایش می‌دهد (۲۱).

Mitsumoto و همکاران در بررسی اثر L- آسکوربیک اسید ۲- فسفات بر بیان میوژنین در طول تمایز سلول‌های ماهیچه‌ای L6، مشاهده کردند سلول‌های تیماریافته با اسید آسکوربیک در مقایسه با سلول‌های تیمارنیافته، مقدار بیشتری میوژنین دارند. این نتایج نشان داد اسید آسکوربیک، بیان ژن میوژنین را افزایش داده و تمایز را در سلول‌های ماهیچه‌ای L6 پیش می‌برد (۲۲). ویتامین ث در القای سلول‌های سوماتیک به سلول‌های بنیادی پرتوان القایی نیز نقش دارد (۲۳).

Ishikawa و همکاران در تحقیقی با بررسی نقش ویتامین ث در تمایز اولیه استئوبلاستی سلول‌های لیگامنت دوردندانی نشان دادند تولید کلاژن I، فعالیت آلکالین فسفاتاز، همچنین بیان اینتگرین $\alpha_2\beta_1$ در محیط کشت این سلول‌ها در حضور ویتامین ث (۲۰۰PM)، افزایش می‌یابد (۲۴).

Leboy و همکاران بیان کردند آسکوربیک اسید آلکالین فسفاتاز، کلاژن نوع X و رسوب کلسیم را در کندروسیت‌های کشت‌شده القا می‌کند. به گفته آن‌ها ویتامین ث ممکن است نقش مهمی را در استخوان‌سازی داخل غضروفی توسط تنظیم بیان ژن در کندروسیت‌های هیپرتروفیک بازی کند (۲۵). سلیمانی مهرنجانی و همکاران نیز اظهار داشتند ویتامین E می‌تواند در رفتاری وابسته به دوز، تمایز استئوژنیک سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان رت بالغ را افزایش دهد؛ زیرا ویتامین E قادر است با خاصیت آنتی‌اکسیدانتی خود و با برقراری تعادل در قابلیت نفوذپذیری انتخابی غشای سلول‌ها باعث ورود کلسیم و القای تمایز استئوژنیک شود (۱۸). Gupta و همکاران بیان کردند توانایی تمایز استئوبلاست در سلول‌های بنیادی مشتق از چربی، به فعالیت ترکیبی ویتامین D3، β-گلیسرو فسفات و آسکوربیک اسید نیاز دارد (۲۶).

نتیجه‌گیری

در مجموع، نتایج مطالعه حاضر نشان داد تأثیر اسید آسکوربیک (ویتامین ث) روی بقای زیستی (به‌طور غیرمستقیم تکثیر) و پتانسیل تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی استخراج‌شده از ژله وارتون، وابسته به دوز است؛ به‌طوری‌که بیشترین بقای زیستی سلول‌ها در غلظت ۲۵۰ میکرومول و بهترین تمایز استئوژنیک در غلظت ۵۰ میکرومول می‌باشد. با این حال، استفاده از آن برای تمایز آدیپوژنیک توصیه نمی‌شود.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله نویسندگان مقاله از معاونت پژوهشی و فناوری دانشگاه شهید چمران اهواز و مرکز سلولی مولکولی دانشگاه علوم پزشکی جندی‌شاپور اهواز تشکر و قدردانی می‌نمایند.

Downloaded from journal.muq.ac.ir at 6:06 IRDT on Monday May 28th 2018

References:

1. Allahbakhshi E, Nejad DB, Shariati M, Tabandeh MR, Dehbashi FN, Hashemitabar M. Differentiation of the definitive endoderm from Wharton's Jelly Mesenchymal Stem Cells (WJMSC). J Biol Res 2013; 20:217-27.

2. Wei X, Yang X, Han ZP, Qu FF, Shao L, Shi YF. Mesenchymal stem cells: A new trend for cell therapy. Acta Pharmacol Sin 2013; 34(6):747-54.

3. Halliwell B. Oxidative stress in cell culture: An under-appreciated problem? FEBS Lett 2003;540(1-3):3-6.

4. Traber MG, Atkinson J. Vitamin E, antioxidant and nothing more. Free Radic Biol Med 2007;43(1):4-15.

5. Padayatty SJ, Katz A, Wang Y, Eck P, Kwon O, Lee JH, et al. Vitamin C as an antioxidant: Evaluation of its role in disease prevention. J Am Coll Nutr 2003;22(1):18-35.

6. Bendich A, Machlin LJ, Scandurra O, Burton GW, Wayner DM. The antioxidant role of vitamin C. Free Radic Biol Med 1986;2(2):419-44.

7. Vatassery GT, Smith WE, Quach HT, Lai JCK. In vitro oxidation of vitamin E, vitamin C, thiols and cholesterol in rat brain mitochondria incubated with free radicals. Neurochem Int 1995;26(5):527-35.

8. Lutsenko EA, Cárcamo JM, Golde DW. Vitamin C prevents DNA mutation induced by oxidative stress. J Biol Chem 2002;277(19):16895-9.

9. Choi KM, Seo YK, Yoon HH, Song KY, Kwon SY, Lee HS, et al. Effect of ascorbic acid on bone marrow-derived mesenchymal stem cell proliferation and differentiation. J Biosci Bioeng 2008;105(6):586-94.

10. Wei F, Qu C, Song T, Ding G, Fan Z, Liu D, et al. Vitamin C treatment promotes mesenchymal stem cell sheet formation and tissue regeneration by elevating telomerase activity. J Cell Physiol 2012;227(9):3216-24.

11. Gao Y, Yang L, Chen L, Wang X, Wu H, Ai Z, et al. Vitamin C facilitates pluripotent stem cell maintenance by promoting pluripotency gene transcription. Biochimie 2013;95(11):2107-13.

12. Wu H, Wu Y, Ai Z, Yang L, Gao Y, Du J, et al. Vitamin C enhances Nanog expression via activation of the JAK/STAT signaling pathway. Stem Cells 2014;32(1):166-76.

13. Sharma V, Anderson D, Dhawan A. Zinc oxide nanoparticles induce oxidative DNA damage and ROS-triggered mitochondria mediated apoptosis in human liver cells (HepG2). Apoptosis 2012;17(8):852-70.

14. Rock CL, Jacob RA, Bowen PE. Update on the biological characteristics of the antioxidant micronutrients: Vitamin C, vitamin E, and the carotenoids. J Am Diet Assoc 1996;96(7):693-702;quiz 703-4.

15. Potdar PD, D'souza SB. Ascorbic acid induces in vitro proliferation of human subcutaneous adipose tissue derived mesenchymal stem cells with upregulation of embryonic stem cell pluripotency markers Oct4 and SOX 2. Hum Cell 2010;23(4):152-5.

16. Takamizawa S, Maehata Y, Imai K, Senoo H, Sato S, Hata RI. Effects of ascorbic acid and ascorbic acid 2-phosphate, a long-acting vitamin C derivative, on the proliferation and differentiation of human osteoblast-like cells. Cell Biol Int 2004;28(4):255-65.

17. Kumar Mekala N, Raju Baadhe R, Rao Parcha S, Devi Y. Enhanced proliferation and osteogenic differentiation of human umbilical cord blood stem cells by L-ascorbic acid, in vitro. Curr Stem Cell Res Ther 2013;8(2):156-62.

18. Soleimani Mehranjani M, Azimi A. In vitro study of the effect of vitamin E on viability, morphological changes and induction of osteogenic differentiation in adult rat bone marrow mesenchymal stem cells. J Shahid Sadoughi Univ Med Sic 2014;22(4):1406-18. [Full Text in Persian]

19. Lin TM, Tsai JL, Lin SD, Lai CS, Chang CC. Accelerated growth and prolonged lifespan of adipose tissue-derived human mesenchymal stem cells in a medium using reduced calcium and antioxidants. Stem Cells Dev 2005;14(1):92-102.

20. Sun LY, Pang CY, Li DK, Liao CH, Huang WC, Wu CC, et al. Antioxidants cause rapid expansion of human adipose-derived mesenchymal stem cells via CDK and CDK inhibitor regulation. J biomed Sci 2013;20(1):53.

21. Cao N, Liu Z, Chen Z, Wang J, Chen T, Zhao, et al. Ascorbic acid enhances the cardiac differentiation of induced pluripotent stem cells through promoting the proliferation of cardiac progenitor cells. Cell Res 2012;22(1):219-36.

22. Mitsumoto Y, Liu Z, Klip A. A long-lasting vitamin C derivative, ascorbic acid 2-phosphate, increases myogenin gene expression and promotes differentiation in L6 muscle cells. Biochem Biophys Res Commun 1994;199(1):394-402.

23. Esteban MA, Wang T, Qin B, Yang J, Qin D, Cai J, et al. Vitamin C enhances the generation of mouse and human induced pluripotent stem cells. Cell Stem Cell 2010;6(1):71-9.

24. Ishikawa s, Iwasaki K, Komaki M, Ishikawa I. Role of ascorbic acid in periodontal ligament cell differentiation. J Periodontol 2004;75(5):709-16.

25. Leboy PS, Vaias L, Uschmann B, Golub E, Adams SL, Pacifici M. Ascorbic acid induces alkaline phosphatase, type X collagen, and calcium deposition in cultured chick chondrocytes. J Biol Chem 1989;264(29):17281-86.

26. Gupta A, Leong DT, Bai HF, Singh SB, Lim TC, Hutmacher DW. Osteo-maturation of adipose-derived stem cells required the combined action of vitamin D3, β-glycerophosphate, and ascorbic acid. Biochem Biophys Res Commun 2007;362(1):17-24.

Downloaded from journal.muq.ac.ir at 6:06 IRDT on Monday May 28th 2018