

The Effect of Soy Isoflavone on the Proliferation and Differentiation of Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells into Chondrocytes and Expression of Collagen II and Aggrecan Genes

Fatemeh Bamdadpasand Shekarsaraei¹, Mohsen Eslami Farsani^{1}, Nasrin Heidarieh¹*

¹Department of Anatomy,
Faculty of Medicine, Qom
Branch, Islamic Azad
University, Qom, Iran.

*Corresponding Author:
Mohsen Eslami Farsani,
Department of Anatomy,
Faculty of Medicine, Qom
Branch, Islamic Azad
University, Qom, Iran.

Email:
ahoramh.82@gmail.com

Received: 4 Jan, 2016

Accepted: 19 Apr, 2016

Abstract

Background and Objectives: Due to the lack of blood vessels in cartilage tissue, its damage is not repairable. This study was conducted to investigate the effect of soy isoflavone on proliferation and differentiation of adipose-derived mesenchymal stem cells into chondrocytes and expression of collagen II and aggrecan genes.

Methods: In this experimental study, human subcutaneous fat was obtained during liposuction and incubated with collagenase enzyme (type 1) for the breakdown of collagen, and collagenase was deactivated by DMEM medium, and was cultured in the cell sediment after centrifugation, the cells were isolated after the third passage, were placed in chondrogenic medium for differentiate into the cartilage, and were divided into three groups, including control, treatment with TGF- β 1, and treatment with soy isoflavones tablets. The tablets were dissolved in distilled water, sterilized by passing through a 0.2 μ m filter and were added to the culture medium. After 48 hours, cell viability was determined by MTT assay, and after 14 days, collagen II and aggrecan gene expressions were assessed by real-time PCR technique. Data were statistically analyzed by one-way ANOVA and Tukey's post-hoc test using SPSS 20 and $p < 0.05$.

Results: The results of MTT assay showed a significant increase in viability in the TGF- β 1 group compared to the control and soy isoflavone groups ($p < 0.05$). The RT-PCR indicated a significant increase in the expression of collagen II and aggrecan genes in isoflavones and TGF- β 1 groups compared to the control group, and also, the mean CT associated with collagen II gene had a significant increase in isoflavone and TGF- β 1 groups compared to the control group ($p < 0.05$).

Conclusion: Soy in culture medium increases the expression of collagen II and aggrecan genes and cell proliferation, but this increase is not high compared to the TGF- β 1 group.

Keywords: Soy isoflavone aglycone; Mesenchymal stromal cells; Chondrocytes; Collagen type II; Aggrecans.

تأثیر ایزوفلاون سویا بر تکثیر و تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از چربی به کندروسیت، با بیان ژن‌های کلاژن II و آگریکان

فاطمه بامدادپسند شکارسرائی^۱، محسن اسلامی فارسانی^{۱*}، نسرین حیدریه^۱

چکیده

زمینه و هدف: به دلیل فقدان عروق خونی در بافت غضروف، آسیب‌های این بافت قابل ترمیم نیست. این مطالعه با هدف بررسی تأثیر ایزوفلاون سویا بر تکثیر و تمایز سلول‌های بنیادی مشتق از چربی به کندروسیت و بیان ژن‌های کلاژن II و آگریکان انجام شد.

روش بررسی: در این مطالعه تجربی، ابتدا چربی زیرجلدی انسانی در طی عمل لیپوساکشن، تهیه و با آنزیم کلاژناز (نوع I) جهت تجزیه کلاژن انکوبه شد و کلاژناز توسط مدیوم DMEM، غیرفعال و پس از سانتریفوژ در رسوب سلولی کشت داده شد، سپس در پاساژ سوم، سلول‌ها جدا و در محیط کندروژنیک جهت تمایز به غضروف قرار گرفتند، و به سه گروه: کنترل، تیمار با TGF- β_1 و تیمار با قرص ایزوفلاون سویا تقسیم شدند. قرص‌ها در آب مقطر حل شده و با عبور از فیلتر ۰/۲ میکرومتری استریل، به محیط کشت اضافه شدند و ۴۸ ساعت بعد بقای سلولی به وسیله MTT و ۱۴ روز بعد بیان ژن‌های کلاژن II و آگریکان با Real Time - PCR بررسی گردید. یافته‌ها با آزمون واریانس یک‌طرفه و تست توکی تحلیل شدند.

یافته‌ها: نتایج MTT، افزایش معنی‌دار میزان Viability در گروه TGF- β_1 نسبت به گروه کنترل و ایزوفلاون سویا را نشان داد ($p < 0/05$). نتایج (RT-PCR)، افزایش بیان کلاژن II و آگریکان در گروه ایزوفلاون و TGF- β_1 نسبت به گروه کنترل را نشان داد، همچنین میانگین CT مرتبط با ژن کلاژن II در دو گروه ایزوفلاون و TGF- β_1 نسبت به گروه کنترل دارای افزایش معنی‌داری بود ($p < 0/05$).

نتیجه‌گیری: سویا در محیط کشت موجب افزایش در بیان ژن‌های آگریکان، کلاژن II و تکثیر سلولی می‌شود، اما به نسبت گروه TGF- β_1 این افزایش زیاد نیست.

کلید واژه‌ها: ایزوفلاون سویا؛ سلول‌های بنیادی مزانشیمی؛ کندروسیت‌ها؛ کلاژن نوع ۲؛ آگریکان‌ها.

گروه علوم تشریح، دانشکده پزشکی، واحد قم، دانشگاه آزاد اسلامی، قم، ایران.

*نویسنده مسئول مکاتبات:

محسن اسلامی فارسانی، گروه علوم تشریح، دانشکده پزشکی، واحد قم، دانشگاه آزاد اسلامی، قم، ایران؛

آدرس پست الکترونیکی:

ahoramh.82@gmail.com

تاریخ دریافت: ۹۴/۱۰/۱۵

تاریخ پذیرش: ۹۵/۱/۳۱

لطفاً به این مقاله به صورت زیر استناد نمایید:

Bamdadpasand Shekarsaraei F, Eslami Farsani M, Heidarieh N. The effect of soy isoflavone on the proliferation and differentiation of adipose-derived mesenchymal stem cells into chondrocytes and expression of collagen ii and aggrecan genes. Qom Univ Med Sci J 2017;11(1):18-28. [Full Text in Persian]

مقدمه

بافت غضروف فاقد عروق خونی و اعصاب است و تغذیه سلول‌های این بافت تنها از طریق انتشار مواد غذایی به درون بافت انجام می‌شود (۱). از آنجا که ترمیم طبیعی هر بافت با تقسیم سلولی آن و رسیدن فاکتورهای هومورال و سلول‌های بنیادی یا پروژنیاتور به محل آسیب انجام می‌گیرد و این امر در غضروف ممکن نیست، لذا به دلیل فقدان عروق خونی و دانسیته سلولی پایین غضروف، توانایی محدودی در ترمیم آسیب‌ها و بیماری‌ها دارد (۲، ۳). در کشورهای پیشرفته، استئوآرتریت زانو، مهم‌ترین علت ناتوانی مزمن در سالمندان به شمار می‌رود (۴). طی سالهای اخیر، با کشف سلول‌های بنیادی، روش‌های نوین سلول درمانی و مهندسی بافت؛ چشم‌انداز روشنی را فراروی درمان انواع آسیب‌ها و بیماری‌ها گشوده است. محققان به این نتیجه رسیدند که از سلول‌های بنیادین مزانشیمی جهت درمان غضروف استفاده کنند و برای اینکه از تمایز ناخواسته سلول‌های بنیادین مزانشیمی به چربی، استخوان، عصب و غیره جلوگیری کنند این سلول‌ها را به کندروسیت‌های کاملاً بالغ تمایز داده تا انتقال کندروسیت‌ها به محل مورد نظر را تضمین کنند (۵، ۶). در سالهای اخیر، سلول‌های بنیادین مزانشیمی تحت عنوان سلول‌های بنیادین مشتق از چربی (Adipose Derived Stem Cells, ADSC) از بافت چربی به‌دست آمده است (۷). به دلیل دستیابی آسان به بافت چربی زیرجلدی از طریق لیپوساکشن نیز سلول‌های بنیادی مشتق از چربی یکی از کاندیداهای ارزشمند در سلول درمانی و مهندسی بافت محسوب می‌شوند (۸). مصرف داروهای گیاهی توسط بیماران مبتلا به روماتوئید در حال افزایش است (۹). گزارشهای مبنی بر تأثیر نوع تغذیه بر متابولیسم سلول‌های غضروفی و چگونگی فعالیت آنها ارائه شده است. بنابراین، سویا می‌تواند موجب اصلاح و تغییر در مفاصل مبتلا به استئوآرتریت شده و با مهارکردن پیشرفت بیماری، سبب ترمیم غضروف گردد که خاصیت ضدالتهابی نیز دارد (۱۰). پروتئین سویا، منبع مهم نیتروژن و اسیدآمینوهای ضروری را برای انسان فراهم می‌کند (۱۱). گزارشهای دیگری نیز در مورد اثر سویا در افزایش جذب کلسیم در روده ارائه شده که نشان‌دهنده اثر کلسیم بر رشد غضروف و مشخص‌کننده فعالیت گیرنده کلسیم در صفحه رشد است و

رشد استخوان دراز را که ناشی از تحریک سلول‌های اجدادی غضروف‌ساز صفحه رشد می‌باشد سرعت می‌بخشد (۱۲). مطالعات نشان می‌دهد پپتون کوچک از محصولات میانی و هیدرولیزشده پروتئین سویا بوده و در محیط کشت سلول‌های مزانشیمی، تولیدکننده فاکتور رشد $TGF-\beta_1$ در ناحیه بدون سرم می‌باشد (۱۱). در مطالعه حاضر تأثیر ایزوفلاون سویا بر تکثیر و تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از چربی به کندروسیت با بیان ژن‌های کلاژن II و آگریکان بررسی گردید.

روش بررسی

جهت جداسازی سلول‌های بنیادی، بافت چربی زیرجلدی انسانی با کسب اجازه کتبی از بیماران (به تعداد ۵ نفر) تحت عمل لیپوساکشن در شرایط استریل به دست آمد و به‌وسیله آنزیم کلاژناز نوع IA (Sigma) به میزان ۱-۱/۵ میلی‌گرم به‌ازای هر گرم بافت چربی، تجزیه و در انکوباتور (به مدت ۳۰-۴۰ دقیقه) قرار گرفت. در ادامه، پس از غیرفعال کردن آنزیم کلاژناز به‌وسیله مدیوم DMEM + FBS10%، محلول بافتی حاصله سانتریفوژ شد (۱۴۰۰ دور در دقیقه، به مدت ۸ دقیقه) و رسوب سلولی در مدیوم DMEM + FBS10% حاوی ۱٪ آنتی‌بیوتیک پنی‌سیلین/استرپتومایسین در شرایط ۵٪ CO_2 ، رطوبت نسبی و حرارت ۳۷ درجه سانتیگراد کشت داده شد و با تعویض مدیوم بعد از ۲۴ ساعت، سلول‌های اضافی که به کف فلاسک چسبندگی نداشتند تخلیه شدند و هر ۳ روز، محیط کشت تعویض گردید. در پاساژ سوم، تریپسین و شمارش سلولی انجام گرفت. جهت تمایز، $2/5 \times 10^5$ سلول در میلی‌لیتر به لوله فالكون ۱۵ میلی‌لیتر انتقال یافت و پس از سانتریفوژ (۱۴۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه) مایع رویی تخلیه شد و به رسوب حاصل که به سه گروه کنترل و تیماری با قرص Soy Isoflavone و $TGF-\beta_1$ تقسیم شده بود و ۲۰ میلی‌لیتر مدیوم کندروژنیک حاوی glucose DMEM high و Streptomycin - پنی‌سیلین ۱٪ و ITS 1%، آسکوربیک ۲ فسفات، لینوئیک اسید، دکزامتازون 10^{-5} و bFGF (۱ng/ml) و 1% BSA افزوده شد. در گروه $TGF-\beta_1$ مقدار (10ng/ml) $TGF-\beta_1$ افزوده شد و در گروه سویا قرص سویا در ۱۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر حل شده و به میزان ۴۰ میکرولیتر

سپس به هر چاهک، ۴۰۰ میکرولیتر محلول دی‌متیل سولفوکساید DMSO و محلول خالص جهت حل کردن بلورهای فورمازان افزوده شد و میزان جذب به وسیله دستگاه ELISA rider در طول موج ۵۷۰ نانومتر قرائت گردید. در ادامه، غلظت 1×10^7 سلول در تیوب ریخته شد و به منظور جداسازی RNA، از کیت جداسازی RNA plys (Cinna Gen) RNA Isolation استفاده گردید. غلظت RNA براساس جذب نوری در طول موج ۲۸۰، ۲۶۰ و ۲۳۰ نانومتر قرائت شد و معادل ۱۰ متر برآورد گردید. با استفاده از ۱۰-۱ میلی‌گرم RNA و کیت Revert Aid First Strand CDNA Synthesis Kit، سنتز CDNA انجام شد و PCR آن مطابق با پروتکل (جدول‌های شماره ۱ و ۲) زیر انجام گرفت:

به محیط کشت اضافه گردید. سپس لوله‌ها در انکوباتور ۳۷ درجه سانتیگراد انکوبه شدند و بعد از ۴۸ ساعت میزان بقای سلولی و جذب نوری در ۵۷۰ نانومتر به روش MTT اندازه‌گیری شد و پس از ۱۴ روز، میزان بیان ژن‌های آگریکان و کلاژن II به روش Real Time PCR بررسی گردید. (سلول‌هایی که از نظر متابولیسمی فعال هستند روند احیای MTT را انجام داده و به‌عنوان سلول زنده در نظر گرفته می‌شوند). برای انجام این تست بعد از گذشت ۴۸ ساعت، جهت شست‌وشوی سلول و محیط حاوی قرص Soy Isoflaven، از ۲۰۰ لاندا PBS استفاده شد و در هر چاهک ۴۰۰ میکرولیتر محیط خالص یا محیط بدون FBS و ۴۰ میکرولیتر محلول MTT اضافه گردید و طی مدت ۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد انکوبه شد.

جدول شماره ۱: توالی‌های پرایمر

Scale (OD)	Sequences (5'→3')	Name
کلاژن ۲	CTCCTGGAGCATCTGGAGAC	c 2F
کلاژن ۲	GTCTCACCACGATCACCCCTT	c 2R
آگریکان	GAATCAACTGCTGGAGACCA	A 1F
آگریکان	CCACTGGTAGTCTTGGGCAT	A1R
GAPDH	GAGTCAACGGATTTGGTCGT	G 1F
CAPDH	GACAAGCTTCCCGTTCTAG	G 1R

جدول شماره ۲: مقادیر مواد استفاده‌شده در Real-time PCR

مقادیر (میکرولیتر)	مواد
۷/۵	Master mix plus
۰/۶	Primer mix (F & R 10picomole)
۱/۵	cDNA
۵/۴	آب
۱۵	حجم نهایی

Annealing و ۴۰ ثانیه با دمای ۵۸ درجه سانتیگراد برای Extension انجام شد و CT‌های به‌دست آمده از دستگاه با فرمول $2^{-\Delta\Delta Ct}$ مورد ارزیابی و آنالیز آماری قرار گرفتند (جدول شماره ۳).

یک سیکل مقدماتی: به مدت ۱۲ دقیقه در ۹۵ درجه سانتیگراد برای دناتوره کردن Initial Denaturation، سپس ۴۰۰ سیکل متوالی شامل ۱۵ ثانیه با دمای ۹۵ درجه سانتیگراد برای Denaturation و ۴۰ ثانیه با دمای ۵۸ درجه سانتیگراد برای

جدول شماره ۳: برنامه دمایی واکنش Real-time PCR

سیکل‌ها	زمان	دما	موقعیت
۱	۱۲ دقیقه	۹۵	Initial Denaturation
۴۰	۱۵ ثانیه	۹۵	Denaturation
	۴۰		Amplification
	۵۵-۹۴		Melting curve analysis

داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS و براساس روش آنالیز واریانس یک‌طرفه و تست توکی تجزیه و تحلیل شدند. سطح معنی‌داری، $p < 0/05$ در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

یافته‌ها در مورد میزان بقا و تکثیر سلولی بعد از ۴۸ ساعت در MTT نشان داد گروه $TGF-\beta_1$ نسبت به گروه کنترل، همچنین ایزوفلاون سویا دارای افزایش معنی‌داری است ($p < 0/05$) (نمودار شماره ۱ و ۲) (جدول شماره ۴).

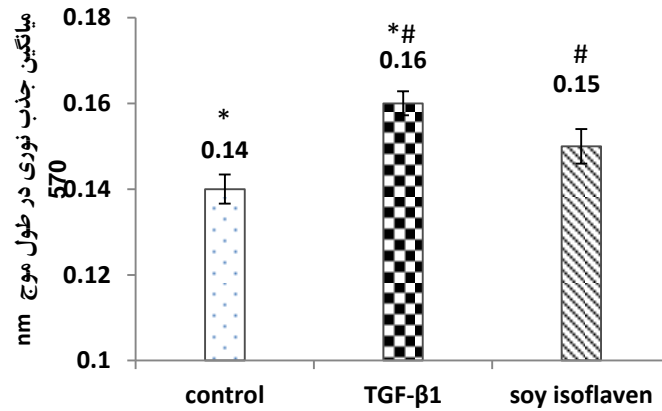
نتایج RT-PCR در روز چهاردهم در مورد بیان ژن‌های ویژه غضروف (کلاژن II و آگریکان در سلول‌های تمایز یافته) نشان داد میزان بیان ژن کلاژن II و ژن آگریکان در گروه $TGF-\beta_1$ نسبت به گروه کنترل به ترتیب ۲۴/۰۸ و ۱۸/۶ برابر افزایش داشته است، در حالی که در میزان بیان هر دو ژن (کلاژن II و آگریکان) در گروه ایزوفلاون سویا نسبت به گروه کنترل، ۸/۷ برابر افزایش مشاهده گردید (نمودار شماره ۳ و ۵) (جدول شماره ۴). همچنین میانگین CT مرتبط با ژن کلاژن II و ژن آگریکان در دو گروه سویا و $TGF-\beta_1$ نسبت به گروه کنترل دارای افزایش معنی‌داری بود ($p < 0/05$) (نمودار شماره ۴ و ۶) (جدول شماره ۴).

در مطالعه حاضر، جهت جداسازی سلول‌های بنیادی از بافت چربی، با تجزیه کردن بافت چربی تحت تأثیر آنزیم کلاژناز، سلول‌های تک‌هسته‌ای به دست آمده در فلاسک‌های ۲۵ سانتی‌متری کشت داده شدند. در ابتدا با مشاهده فلاسک‌ها در زیر میکروسکوپ، سلول‌ها به حالت کروی و شناور بودند، ولی با گذشت چند ساعت (حدود ۵ ساعت)، به تدریج مرحله چسبندگی خود را به کف فلاسک آغاز کردند و در این زمان از حالت کروی، خارج و با اشکال چندوجهی، ستاره‌ای و دوکی با زواید سیتوپلاسمی کوتاه و اندک مشخص شدند، سپس به تدریج تحت شرایط مناسب (دما ۳۷ درجه سانتیگراد و دی‌اکسید کربن ۵٪) سلول‌های متصل به کف فلاسک با انجام تقسیم میتوزی، رشد و تکثیر یافتند و اکثر سلول‌های دوکی شکل را ایجاد کردند. پلیت سلولی که به مدت ۱۴ روز در معرض محیط کندرورژنیک قرار داشت، هر ۳-۴ روز یک‌بار با میکروسکوپ اینورت مشاهده شد. توده سلولی در طول این مدت به خوبی رشد کرده و اندازه آن تقریباً دو برابر شد.

نتایج این تحقیق در مورد میزان بقای سلولی در روش MTT پس از ۴۸ ساعت و در مورد بیان ژن‌های ویژه غضروف؛ یعنی کلاژن II و آگریکان در روش RT-PCR در روز چهاردهم به دست آمد.

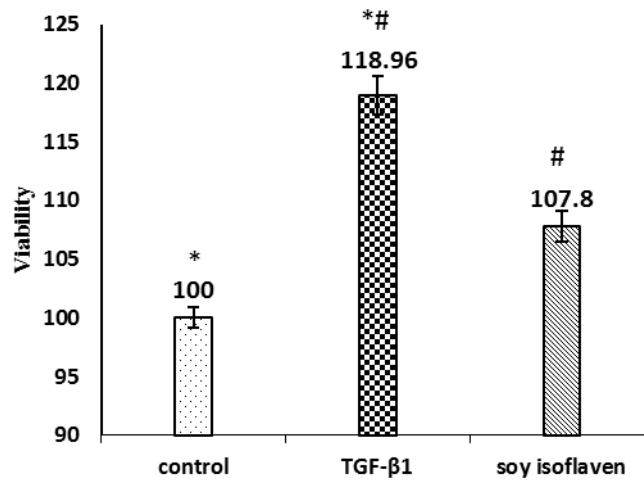
جدول شماره ۴: مقادیر MTT و CT ژن‌های کلاژن II و آگریکان به همراه viability و بیان ژن کلاژن II و آگریکان

گروه	بیان ژن آگریکان	میانگین \pm انحراف معیار CT آگریکان	بیان ژن کلاژن II	میانگین \pm انحراف معیار CT کلاژن II	viability	میانگین \pm انحراف معیار MTT
کنترل	۱	۲۴/۶۸ \pm ۱/۶	۱	۲۵/۵۶ \pm ۱/۷۴۹۶۴	۱۰۰	۰/۱۴ \pm ۰/۰۳۴۱
$TGF-\beta_1$	۲۴/۰۸	۲۳/۱۵ \pm ۰/۷۸	۱۸/۶۴	۲۱/۳۲ \pm ۰/۷۹۸۴	۱۱۸/۹۶	۰/۱۶ \pm ۰/۰۲۸۳
Soy Isoflavon	۸/۷۵	۲۱/۰۹ \pm ۰/۹۱۱۲۹	۸/۷۵	۲۰/۴۵ \pm ۱/۲	۱۰۷/۸۲	\pm ۰/۰۱۵/۰۴۰۳



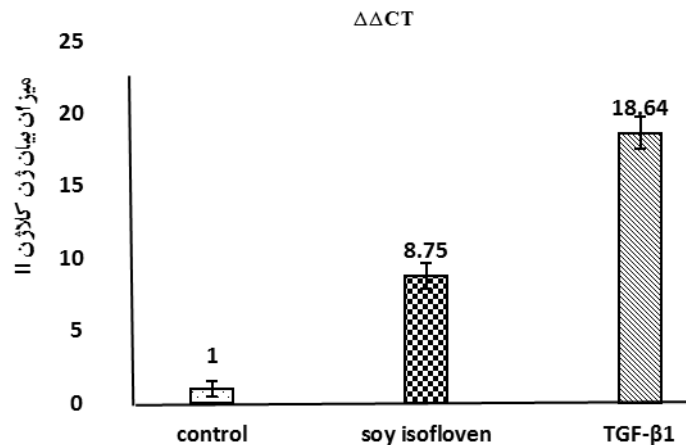
نمودار شماره ۱: میانگین جذب نوری در طول موج ۵۷۰ نانومتر.

بین دو گروه TGF-β₁، کنترل، و گروه soy Isoflaven، اختلاف معنی‌داری وجود دارد *p<۰/۰۵ و #p<۰/۰۵.

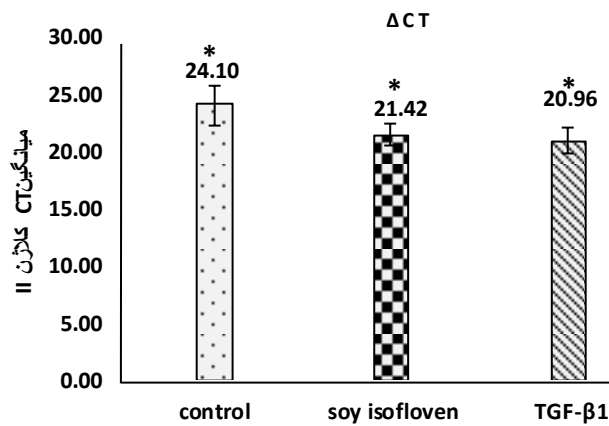


نمودار شماره ۲: میانگین بقا و زیست‌پذیری سلول

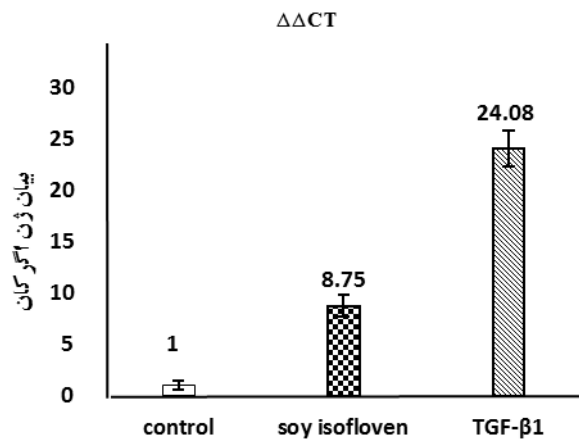
بین دو گروه TGF-β₁، کنترل، و گروه soy Isoflaven، اختلاف معنی‌دار است *p<۰/۰۵ و #p<۰/۰۵.



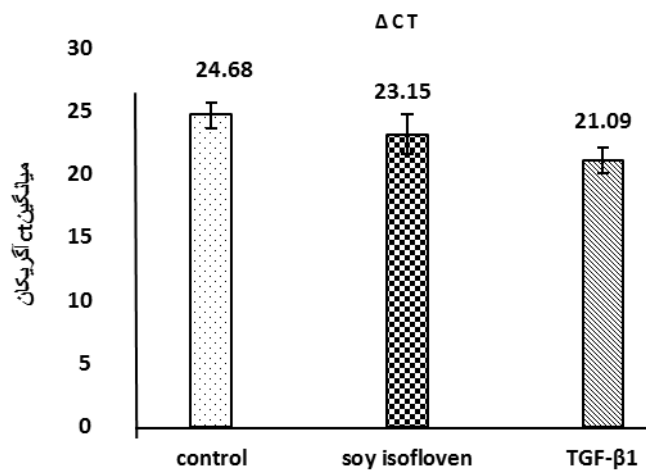
نمودار شماره ۳: بیان ژن کلاژن II براساس فرمول $2^{-\Delta\Delta CT}$ در حضور TGF-β₁ (10ng/ml) نسبت به گروه کنترل، ۱۸/۶۳ و در حضور soy Isoflavones نسبت به گروه کنترل، ۸/۷۵ برابر افزایش بیان داشته است.



نمودار شماره ۴: میانگین CT ژن کلاژن II نشان می‌دهد اختلاف معنی‌دار با $p < 0.05$ بین دو گروه TGF- β 1 و soy Isoflavones نسبت به گروه کنترل وجود دارد.



نمودار شماره ۵: بیان ژن آگریکان بر اساس فرمول $2^{-\Delta\Delta CT}$ در حضور TGF- β 1 (10ng/ml) نسبت به گروه کنترل، ۲۴ برابر و در حضور soy Isoflavones نسبت به گروه کنترل، ۸/۷۵ برابر افزایش بیان داشته است.



نمودار شماره ۶: میانگین CT ژن آگریکان نشان می‌دهد اختلاف معنی‌دار بین دو گروه TGF- β 1 و soy Isoflavones نسبت به گروه کنترل وجود دارد ($p < 0.05$).

بحث

پس از دستیابی محققین به سلول‌های بنیادی، استفاده از انواع سلول‌های بنیادی در جهت سلول درمانی و مهندسی بافت، به‌طور روزافزون رو به گسترش بوده است. گرچه سلول‌های بنیادی رویانی، پتانسیل تمایز به انواع سلول‌های مشتق از سه لایه اکتودرم، اندودرم و مزودرم را دارند، اما به‌وجود آمدن تراوما در مدل‌های پیوندی و هتک موازین اخلاقی در به‌دست آوردن اولیه این سلول‌ها از بلاستوسیسیت؛ به کارگیری سلول‌های بنیادی رویانی را در جهت ترمیم آسیب‌ها و معالجه بیماری‌ها محدود کرده است (۱۳). ارزش سلول‌های بنیادی مزانشیمی با توجه به خصوصیات منحصر به فرد، همچون قدرت تکثیر و تمایز بالای این سلول‌ها، بی‌خطر بودن پیوند آنها، همچنین سهل‌الوصول بودن و امکان جداسازی MSC از بافت‌های مختلف می‌باشد که امروزه نیز اهمیت آن به دلیل قابلیت بالای تمایز، سازگاری بافتی آنها و امکان استفاده از MSC خود بیمار جهت پیوند به خودش به‌صورت اتوگرافت، بر هیچ‌کس پوشیده نیست. این سلول‌ها منبعی بی‌بدیل در مطالعه مدل‌های تمایز سلول درمانی و مهندسی بافت هستند (۱۶-۱۴). طی سالهای اخیر سلول‌های بنیادی مشتق از بافت چربی، به دلایل مختلف مورد توجه محققین قرار گرفته‌اند. بافت چربی زیرپوستی به‌راحتی قابل دسترسی بوده و سلول‌های بنیادی به تعداد فراوان از این بافت جدا می‌شود. سلول‌های بنیادی مشتق از چربی، نیاز به نگهداری طولانی‌مدت در بانک‌های سلول همراه با صرف هزینه بالا ندارند. بنابراین، نه تنها پیوند اتوگرافت (به دلیل نداشتن آنتی‌ژن HLA-PR)؛ بلکه پیوند آلوگرافت سلول‌های بنیادی مشتق از بافت چربی نیز بدون خطر رد پیوند و انتقال بیماری‌های واگیردار امکان‌پذیر است (۱۷). از این جهت در تحقیق حاضر از بافت چربی زیرجلدی ناحیه شکم، سلول‌های بنیادی تک‌هسته‌ای، جدا و کشت داده شدند. از آنجاکه در بافت غضروفی؛ عروق خونی و اعصاب وارد نمی‌شود و تعداد سلول‌های کندروسیت نیز در این بافت محدود بوده و آسیب‌های این بافت نیز قابل ترمیم نیست، لذا از طریق مهندسی بافت می‌توان با استفاده از سلول‌های بنیادی به بافت غضروفی دست یافت که البته این امر به بررسی‌های وسیع (تحت شرایط مختلف) نیاز دارد.

براساس تعامل بین‌سلولی، به ترتیب از طریق سیستم کشت Micramass می‌توان تعامل بین سلولی مناسب، جهت القای کندروژنز فراهم کرد (۱۹،۱۸). مدیوم کندروژنیک دارای فاکتورهای رشد، سیتوکین‌های مناسب و عدم وجود سرم، از ضروریات القای غضروف‌سازی محسوب می‌شود (۲۰). درحالی‌که برخی محققین وجود یکی از اعضای $TGF-\beta$ را برای القای تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی به غضروف، ضروری و کافی می‌دانند، گروهی دیگر وجود این فاکتور را به تنهایی القاکننده تمایز کندروژنیک ندانسته و برخی دیگر ترکیبی از فاکتورهای رشد گوناگون را به کار گرفته‌اند تا بهترین و مناسب‌ترین شرایط جهت طراحی بافت غضروف را شناسایی کنند. Johnstone و همکاران (سال ۱۹۹۸)، از روش کشت توده‌ای جهت تمایز کندروژنیک سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از مغز استخوان خرگوش استفاده کردند. ایشان در مطالعه خود، 2×10^5 سلول را پس از سانتیفریژ در محیط کندروژنیک کشت دادند و فاکتور رشد $TGF-\beta_1$ را در غلظت‌های مختلف و دگزامتازون را به‌طور مجزا یا توأم جهت القای غضروف‌سازی به کار بردند (۲۱). در مطالعات دیگری نشان داده شده است فاکتور رشد فیبروبلاست (FGF_{18}) در محیط کشت می‌تواند تکثیر کندروسیت‌های غضروف و در نتیجه، افزایش تولید ماتریکس خارج سلولی را در پی داشته باشد. بیان ژن این فاکتور در محیط کشت منجر به افزایش کندروسیت‌ها و در نتیجه افزایش ماتریکس خارج سلولی می‌شود (۲۲). در این مطالعه نیز از فاکتور رشد فیبروبلاست و $TGF-\beta_1$ برای القای کندروسیت در محیط کشت استفاده شد. در پژوهش حاضر به‌علت تأثیرات مفید سویا بر تکثیر و تمایز سلول‌های کندروسیت که در مطالعات مختلف بیان شده، از ایزوفلاون سویا در محیط کشت کندروژنز استفاده شد. در این مورد تحقیقات دیگر نشان می‌دهد سویا در بیماران استئوآرتریت مؤثر بوده و موجب تغییر در ترکیبات متالوپروتئیناز، سیتوکیناز و پروستاگلاندین E_2 غضروف مفصلی از طریق تغییر در متابولیسم کندروسیت‌ها می‌شود (۲۳). همچنین نتایج نشان داده ترکیبات سویا غیرصابونی در *in vitro* موجب کاهش تولید ناگهانی IL-6 استرومیلین و IL-8 به‌وسیله کندروسیت‌ها شده و وجود همین مواد موجب تخریب غضروف در سلول‌های

مدل حیوانی می‌شود. سویا به‌طور نسبی باعث تأثیر منفی و کاهش دهنده IL- β_1 بر روی کندروسیت‌ها بوده و در محیط کشت نیز موجب اثر معکوس IL-1 در تحریک سنتز کلاژن به‌وسیله کندروسیت‌ها شده و تولید متالوپروتئین‌های ماتریکس را مهار می‌کند (۲۴، ۲۵). مطالعاتی در زمینه عصاره سویا و آووکادو بر فعالیت کلاژنولیتیک کندروسیت‌های غضروف مفصل خرگوش در محیط کشت انجام گرفته که نتایج آن، نشان‌دهنده نقش این ماده در محدود کردن اثر زیان‌آور IL-1 در بیماری استئوآرتریت و کاهش فعالیت آن در تحریک تولید کلاژناز به‌وسیله کندروسیت‌ها می‌باشد. در یک مطالعه، کندروسیت‌ها در ۵ روز به مدت ۴۸ ساعت در محیط کشت دارای پیاسکلیدین به میزان ۱۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر قرار گرفتند که نتایج نشان داد این دارو تولید کلاژناز را افزایش داده و از طریق کاهش ظرفیت سیتوکاین‌ها، اثر منفی بر عملکرد اینترلوکین دارد و در نتیجه از تخریب کندروسیت‌ها و سلول‌های سینوویال جلوگیری می‌کند (۲۶). در این تحقیق از قرص ایزوفلاون سویا با غلظت ۴۰ میکرولیتر در محیط کشت استفاده شد و تست MTT پس از گذشت ۴۸ ساعت به کار برده شد که نشان داد سویا نسبت به گروه کنترل در محیط MTT، اختلاف معنی‌داری نداشته است (نمودارهای شماره ۱ و ۲) (جدول شماره ۴). این یافته با نتایج مطالعه زهرا وجدانی (سال ۱۳۹۲) که در آن از پودر خشک‌شده سویا در آب و الکل استفاده شده بود و براساس تست MTT بعد از ۲۴ ساعت استفاده از عصاره سویا (دوز ۱۰۰۰ و ۱۰۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) نسبت به گروه کنترل، اختلاف معنی‌داری را گزارش کرد و مشخص گردید عصاره سویا الکلی آبی باعث افزایش نرخ تکثیر سلولی می‌شود، (۲۷) مغایرت داشت؛ علت این اختلاف شاید استفاده از قرص ایزوفلاون سویا به جای عصاره سویا و حل کردن آن در آب در مطالعه حاضر بوده است.

در تحقیق حاضر سلول‌های بنیادی تحت اثر ایزوفلاون سویا این پتانسیل را داشتند که در شرایط آزمایشگاهی (in vivo) به سلول‌های غضروفی تمایز یابند که این قضیه در آنالیز RT-PCR (Real time PCR) با تولید مارکرهای غضروفی، بیان ژن آگریکان و کلاژن نوع ۲ به‌خوبی آشکار شد. البته بیان ژن آگریکان به‌صورت بسیار جزئی بوده و CT این ژن نسبت به گروه کنترل، اختلاف معنی‌داری نداشت (نمودار شماره ۶-۳) (جدول شماره ۴). Jienn و همکاران در مطالعه خود با استفاده از تکنیک‌های MTT و Rael Time PCR (در دو دوز ۰/۵ و ۱٪/مدیوم پتید سویا) برای ۳ روز تحت شرایط بدون سرم، نشان دادند در روش MTT، غلظت ۱٪/مدیوم عصاره پتید سویا سلول‌ها دارای حداکثر تکثیر سلولی در سلول‌های بنیادین مزانشیمی بندناف و چربی در شرایط بدون سرم می‌شود، به‌طوری‌که ۲۵-۲۰٪ افزایش در نرخ رشد و تکثیر در سلول‌های چربی و بندناف وجود دارد، همچنین در تکنیک Rael Time PCR نیز در این غلظت برای ۳ روز و براساس فرمول $2^{-\Delta\Delta Ct}$ با دارا بودن $p < 0/05$ در گروه درمان‌شده با سویا، افزایش در بیان ژن آگریکان و کلاژن II مشاهده گردید (۱۱)، که این نتایج با یافته‌های مطالعه حاضر در بررسی بیان ژن کلاژن II و آگریکان همخوانی داشت.

نتیجه‌گیری

در تحقیق حاضر به‌دلیل عملکرد سویا به جای سرم‌های حیوانی، همچنین توانایی سویا در تولید TGF- β_1 که یکی از فاکتورهای رشد در محیط کندروژنیز می‌باشد. از این عصاره در محیط کشت استفاده شد و مشخص گردید سویا در میزان تکثیر سلولی، بیان ژن‌های کلاژن II و آگریکان نقش داشته و در گروه سلول‌های حاوی این عصاره، افزایش می‌یابد، اما نسبت به گروه TGF- β_1 این افزایش کمتر است.

References:

1. Mansour JM, Mow VC. The permeability of articular cartilage under compressive strain and at high pressures. *J Bone Joint Surg Am* 1976;58(4):509-16.
2. Junqueira L, Carneiro J. Junqueira's basic histology: Text and atlas. 11th ed. New York: McGraw-Hill Medical; 2005. p. 120-33.
3. Mitchell N, Shepard N. The resurfacing of adult rabbit articular cartilage by multiple perforations through the subchondral bone. *J Bone Joint Surg Am* 1976;58(2):230-3.
4. Kuo CK, Li WJ, Mauck RL, Tuan RS. Cartilage tissue engineering: its potential and uses. *Curr Opin Rheumatol* 2006;18(1):64-73.
5. Holtzer H, Abbott J, Lash J, Holtzer S. The loss of phenotypic traits by differentiated cells in vitro, I. differentiation of cartilage cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1960;46(12):1533-42.
6. Esfandiary E, Amirpour N, Fesharaki M, Nasr Esfahani MH, Molavi F, Molavi F, et al. Access to chondrocyte culture, with alginate, In Iran. *Yakhteh J* 2008;10(1):73-5.
7. Zuk PA, Zhu M, Ashjian P, De Ugarte DA, Huang JI, Mizuno H, et al. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Mol Biol Cell* 2002;13(12):4279-95.
8. Prockop DJ. Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues. *Science* 1997;276(5309):71-4.
9. Herman CJ, Allen P, Hunt WC, Prasad A, Brady TJ. Use of complementary therapies among primary care clinic patients with arthritis. *Prev Chronic Dis* 2004;1(4):A12.
10. Henrotin YE, Labasse AH, Jaspar JM, De Groote DD, Zheng SX, Guillou GB, et al. Effects of three avocado/soybean unsaponifiable mixtures on metalloproteinases, cytokines and prostaglandin E2 production by human articular chondrocytes. *Clin Rheumatol* 1998;17(1):31-9.
11. Jienny Lee, Kyung-Baeg Roh, Sang-Cheol Kim, Jongsung Lee, Park D. Soy peptide-induced stem cell proliferation: involvement of ERK and TGF- β 1. *J Nutr Biochem* 2012;23(10):1341-51.
12. Wu S, Palese T, Prakash Mishra O, Delivoria-Papadopoulos M, De Luca F. Effects of Ca²⁺-sensing receptor activation in the growth plate. *FASEB J* 2004;18(1):143-5.
13. Erdo F, Buhle C, Blunk J, Hoehn M, Xia Y, Fleischmann B, et al. Host-dependent tumorigenesis of embryonic stem cell transplantation in experimental stroke. *J Cereb Blood Flow Metab* 2003;23(7):780-5.
14. Sekia I, Vuoristo JT, Larson BL, Prockop DJ. In vitro cartilage formation by human adult stem cells from bone marrow stroma defines the sequence of cellular and molecular events during chondrogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002;99(7):4397-402.
15. Sekia I, Larson BL, Vuoristo JT, Cui JG, Prockop DJ. Adipogenic differentiation of human adult stem cells from bone marrow stroma (MSCs). *J Bone Miner Res* 2004;19(2):256-64.
16. Horwitz EM, Prockop DJ, Fitzpatrick LA, Koo WW, Gordon PL, Neel M, et al. Transplantability and therapeutic effects of bone marrow-derived mesenchymal cells in children with osteogenesis imperfecta. *Nat Med* 1999;5(3):309-13.
17. Puissant B, Barreau C, Bourin P, Clavel C, Corre J, Bousquet C, et al. Immunomodulatory effect of human adipose tissue-derived adult stem cells: comparison with bone marrow mesenchymal stem cells. *Br J Haematol* 2005;129(1):118-29.
18. Wakitani S, Imoto K, Yamamoto T, Saito M. Human autologous culture expanded bone marrow mesenchymal cell transplantation for repair of cartilage defects in osteoarthritic knees. *Osteoarthritis Cartilage* 2002;10(3):199-206.

19. Estes BT, Wu AW, Guilak F. Potent induction of chondrocytic differentiation of human adiposederived adult stem cells by bone morphogenetic protein 6. *Arthritis Rheum* 2006;54(4):1222-32.
20. Awad HA, Wickham MQ, Leddy HA, Gimble JM, Guilak F. Chondrogenic differentiation of adipose-derived adult stem cells in agarose, alginate, and gelatin scaffolds. *Biomaterials* 2004;25(16):3211-22.
21. Sekiya I, Larson BL, Vuoristo JT, Reger RL, Prockop DJ. Comparison of effect of BMP-2, -4, and -6 on in vitro cartilage formation of human adult stem cells from bone marrow stroma. *Cell Tissue Res* 2005;320(2):269-76.
22. Johnstone B, Hering TM, Caplan AI, Goldberg VM, Yoo JU. In vitro chondrogenesis of bone marrow-derived mesenchymal progenitor cells. *Exp Cell Res* 1998;238(1):265-72.
23. Ellsworth JL, Berry J, Bukowski T, Claus J, Feldhaus A, Holderman S, et al. Fibroblast growth factor-18 is a trophic factor for mature chondrocytes and their progenitors. *Osteoarthritis Cartilage* 2002;10(4):308-20.
24. Lippiello L, Nardo JV, Harlan R, Chiou T. Metabolic effects of avocado/soy unsaponifiables on articular chondrocytes. *Evid Based Complement Alternat Med* 2008;5(2):191-7.
25. Cake MA, Read RA, Guillou B, Ghosh P. Modification of articular cartilage and subchondral bone pathology in an ovine meniscectomy model of osteoarthritis by avocado and soya unsaponifiables (ASU). *Osteoarthritis Cartilage* 2000;8(6):404-11.
26. Mauviel A, Loyau G, Pujol JP. Effect of unsaponifiable extracts of avocado and soybean (Piascledine) on the collagenolytic action of cultures of human rheumatoid synoviocytes and rabbit articular chondrocytes treated with interleukin-1. *Rev Rhum Mal Osteoartic* 1991;58(4):241-5.
27. Zahra Vojdani, Zahra Khodabandeh, TaherehTalaie-Khozani. In vitro study of the protective effects of hydroalcoholic extract of soybean against impact of oxidative damage on osteogenesis and chondrogenesis of mouse limb bud. *ASJ* 2013;10(3):131-6.