تاثیر رتینوئیک اسید در تمایز سلّول‌های بنیادی مزانشیمال بافت چربی به سلّول‌های زایا

مریم حسین زاده شیرذیلی: کارشناس ارشد علوم تشریحی، گروه آناتومی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران. m_hoseinzadeh@razi.tums.ac.ir
دکتر پریچهر پاسبخش: دانشیار و متخصص علوم تشریحی، گروه آناتومی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران. pasbakhsh@hotmail.com
دکتر فردین عمیدی: دانشیار و متخصص علوم تشریحی، گروه آناتومی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران. amidifardin@yahoo.com
زهره افسر طلا: کارشناس ارشد بیولوژی، گروه بیولوژی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران. zafsartala@yahoo.com
***دکتر علیقلی سبحانی:** استاد و متخصص علوم تشریحی، گروه آناتومی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران (*نویسنده مسئول).

تاریخ دریافت: ۹۲/۴/۷ تاریخ پذیرش: ۹۲/۶/۸

چکیده

زمینه و هدف: مطالعات انجام شده در سال‌های اخیر در زمینه تمایز سلّول‌های بنیادی به سلّول‌های زایا نگرش دانشمندان را به مبحث باروری و ناباروری تغییر داده است. تولید داخل آزمایشگاهی سلّول‌های زایا گام مهمی در درک بهتر نحوه تکامل سلّول‌های زایا می‌باشد. با توجه به اینکه کاربرد بالینی سلّول‌های بنیادی رویانی به دلیل توان تومورزائی بالا و مسائل اخلاقی بسیار محدود است و محققان را با مشکلات عدیده‌ای روبرو می‌سازد، بنابراین یافتن سلّول‌هایی با ویژگی‌های پرتوانی و به دست آمده از یک بافت یا اندام بالغ می‌تواند جایگزین مناسبی برای سلّول‌های مذکور در تولید گامت‌های درون آزمایشگاهی باشد. در این تحقیق، جهت القای تمایز سلّول‌های بنیادی به سلّول‌های زایا از رتینوئیک اسید (Retinoic Acid-RA) استفاده شد. لذا در مطالعه حاضر سعی بر آن بود که با تمایز سلّول‌های بنیادی مزانشیمال بافت‌چربی به سلّول‌های زایا (Germ cell)، سلّول بنیادی مناسبی را به عنوان جایگزین سلّول‌های بنیادی رویانی معرفی کرد تا شاید بتوان با ادامه تحقیقات به تولید داخل آزمایشگاهی سلّول‌های جنسی تکامل یافته‌تر دست یافت.

روش کار: پس از به دست آوردن جمعیت خالصی از سلّول‌های بنیادی مزانشیمی برگرفته از بافت چربی (Adipose Tissue Derived Mesenchymal Stem Cells- ADMSC)، جهت ارزیابی چند توان بودن این سلّول‌ها با استفاده از محیط تمایزی به Osteoblast وAdipocyte تمایز داده و با رنگ آمیزی Alizarin Red S و Oil red-O تمایز آن ها بررسی شد. همچنین فلوسیتومتری جهت بررسی مارکرهای سطحی سلّول‌های بنیادی مزانشیمال حاصل از بافت‌چربی و مغز استخوان (بیان دو مارکرCD90، CD44 و عدم بیان مارکرهای CD45 و CD31) انجام شد. سپس این سلّول‌ها در محیط‌های القایی حاوی رتینوئیک اسید (به مدت۷ روز) به سلّول‌های زایا تمایز داده شدند. سپس آنالیز فلوسایتومتری و رنگ آمیزی ایمونوفلوروسنس جهت بررسی بیان مارکرهای رده سلّول‌های زایا (Mvh و DAZL) انجام شد.

یافته‌ها: در سلّول‌های مذکور، مثبت بودن مارکرهای سطحی سلّول‌های بنیادی CD90وCD44 و منفی بودن مارکر آندوتلیال (CD31) وسلّول‌های خونی (CD45) نشان داده شده است که گویای مزانشیمی بودن این سلّول‌ها بود. قابلیت تمایز به سلّول‌های Osteoblast و Adipocyte با رنگ Alizarin Red S وOil red-O نشان داده شد که بیان کننده چند توان بودن این سلّول‌ها می باشد. پس از بررسی سلّول‌ها با آنالیز فلوسایتومتری و ایمونوفلوروسنس مشخص شد که سلول‌های تیمار شده با رتینوئیک اسید، مارکرهای سلّول‌های زایا (Mvh & DAZL) را بیان داشته‌اند.

نتیجه‌گیری: در مطالعه حاضر نشان داده شد که مارکرهای سلّول جنسی در سلّول بنیادی مزانشیمال حاصل از بافت چربی پس از اضافه کردن فاکتور تمایزی رتینوئیک اسید به محیط کشت بیان شده است.

کلیدواژه‌ها: سلّول‌های بنیادی مزانشیمی، ناباروری، سلّول‌های زایا، اسید رتینوئیک.

مقدمه

ناباروری یکی از شایع‌ترین مشکلات بین زوجین می باشد که می‌تواند در اثر هر دو عامل زنانه و مردانه رخ دهد. ناباروری به عنوان ناتوانی در بارداری پس از یک سال مقاربت جنسی منظم بدون استفاده از روش‌های پیشگیری از بارداری تعریف شده است (۱و ۲). برای درمان ناباروری تحقیقات گسترده‌ای صورت گرفته و روش‌های درمانی بسیاری نظیر هورمون درمانی، لقاح آزمایشگاهی (IVF)، تزریق درون سیتوپلاسمی اسپرم (ICSI) و انجماد جنین و تخمک پیشنهاد شده است (۲).

روش‌های ذکر شده در برخی از زوج‌ها موثر نبوده. لذا در سال‌های اخیر، گروهی از محققان توانسته‌اند روش جدیدی جهت درمان ناباروری ارائه دهند. آن‌ها با تمایز سلّول‌های بنیادی

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2026-11-18]

(Stem cells) به سلّول‌های جنسی مذکر و مؤنث در محیط آزمایشگاه قدم‌های امیدوار کننده‌ای برای درمان ناباروری با استفاده از تکنولوژی سلّول‌های بنیادی برداشته‌اند (۷-۳). سلّول‌های زایا جمعیت سلّولی بسیار تخصص یافته‌ای هستند که جهت حفظ و بقای گونه ضروری می‌باشند. این سلّول‌ها طیف وسیع سلّولی هستند که شامل سلّول‌های زایای بدوی در طی دوران امبریوژنز تا اووسیت و اسپرم کامل پس از دوران گامتوژنز می‌باشند (۸).

در دهه‌های اخیر دانشمندان جهت به دست آوردن سلّول‌های زایا در محیط آزمایشگاه از منابع گوناگون سلّول‌های بنیادی از قبیل سلّول‌های بنیادی پوست، سلّول های بنیادی جنینی و سلّول‌های بنیادی مغز استخوان استفاده کردند (۳، ۴ و ۱۳-۹). به خاطر مسائل اخلاقی ناشی از دست کاری جنین انسان و احتمال ایجاد انواع تومورهای سرطانی در استفاده از ESCs، کانون توجه دانشمندان به سمت سلّول‌های بنیادی بزرگسالان معطوف شد(۱۶-۱۴) (۱۷-۱۵). یکی از منابع برای تهیّه سلّول‌های بنیادی بزرگسالان سلّول‌های بنیادی مزانشیمال حاصل از مغز استخوان می‌باشد که توانایی تمایز به سلّول‌های متفاوت از قبیل استخوان، غضروف، چربی، عضله و غیره را دارد.

با ادامه تحقیقات دانشمندان توانستند با استفاده از سلّول‌های بنیادی مزانشیمال حاصل از مغز استخوان انسانی و موشی، سلّول‌های جنسی مذکر تولید کنند (۳، ۴و۱۲-۹). Nayernia و همکاران در سال ۲۰۰۶ برای اولین بار موفق به تمایز سلّول‌های مزانشیمال مغز استخوان موشی به گامت نر در حضور رتینوئیک اسید شدند (۱۰). همچنین در سال‌های بعد مطالعات مشابهی در این زمینه انجام شد و دانشمندان توانستند تمایز سلّول‌های زایا را در مراحل مختلف از سلّول‌های بنیادی بالغ گزارش دهند (۹، ۱۱و۱۲). به دلیل مشکلات ناشی از استخراج سلّول‌های بنیادی مغز استخوان مطالعات بر روی منابع دیگر سلّول‌های بنیادی نیز متمرکز گردید.

بر همین اساس بسیاری از محققین سلّول‌های بنیادی مزانشیمی برگرفته از بافت چربی (ADMSCs) را به دلایل تزاید سریع، نمونه گیری راحت‌تر و عدم وجود عوارض در فرد دهنده، به عنوان جایگزین مناسبی برای مغز استخوان پیشنهاد داده‌اند (۱۷و۱۸). سلّول‌های بنیادی مزانشیمال استخراج شده از بافت چربی قابلیت تزاید زیادی داشته و به چندین رده سلّولی مثل آدیپوسیت، استئوبلاست، میوبلاست، کندروبلاست، آندوتلیال و کاردیومیوسیت تمایز داده شده‌اند (۱۷). با ادامه تحقیقات Song و همکاران توانستند سلّول‌های بنیادی بافت چربی را در محیط آزمایشگاه به سلّول‌های شبه اوسیت تمایز دهند (۱۹). برای به‌دست آوردن سلّول‌های تمایز یافته از سلول های بنیادی، دستکاری ژنتیکی فاکتورهای رونویسی و یا سیگنالینگ مولکول‌ها موثر شناخته شده‌اند (۲۰و۲۱) یکی از سیگنالینگ مولکول‌ها رتینوئیک اسید می‌باشد (۲۲). رتینوئیک اسید فرم اکسیدان ویتامین A می‌باشد و با توجه به مطالعات انجام شده باعث تمایز سلّول‌های بنیادی جنینی به سلّول‌های پیش ساز جنسی و تکثیر سلّول‌های پیش ساز جنسی می‌شود (۲۳). مطالعاتی هم که توسط Geijsen و همکاران در سال ۲۰۰۳ و Nayernia و همکاران در سال‌های ۲۰۰۴ و ۲۰۰۶ صورت گرفت، تأثیر مثبت اسید رتینوئیک در تمایز سلّول‌های بنیادی به سلّول‌های جنسی و تحریک تکثیر PGCs را نشان دادند (۵، ۷ و ۲۴).

توجه به محدودیت‌ها و عوارض استفاده از سلّول‌های بنیادی رویانی و مزانشیمی حاصل از مغز استخوان در انسان، یافتن سلّول هایی با ویژگی‌های پرتوانی و به دست آمده از یک بافت یا اندام بالغ می‌تواند جایگزین مناسبی برای سلّول‌های بنیادی رویانی و مزانشیمی مغز استخوان در تولید گامت‌های درون آزمایشگاهی باشد.

لذا مطالعه حاضر به منظوربررسی قابلیت تمایز ADMSCs به سلّول های زایا طراحی شده است. همچنین تاثیر RA به عنوان مکمل ضروری در محیط کشت در تمایز به سمت سلّول زایا مورد بررسی قرار گرفت تا بتوان با ادامه تحقیقات به تولید داخل آزمایشگاهی سلّول‌های جنسی تکامل

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2026-11-18]

یافته‌تر دست یافت.

روش کار

برای به دست آوردن سلّول‌های بنیادی مزانشیمال حاصل از بافت‌چربی، بافت چربی اطراف اپیدیدیم موش ۸-۶ هفته ای نژاد NMRI تحت شرایط استریل خارج گردید و به تیکه های کوچک تقسیم شد و سپس به ظرف حاوی محلول کلاژناز نوع یک (Collagenase1,Sigma, USA) منتقل گشت. پس از یک ساعت و اطمینان از هضم بافت‌ها، جهت خنثی نمودن کلاژناز به میزان حجم درون لوله، محیط کشت حاوی (Invitrogen, USA) اضافه گشت. سپس سلّول‌های به دست آمده به فلاسک کشت حاوی محیط کشت (Invitrogen, USA) DMEM که حاوی [۱۰٪ FBS، Penicillin 10 IU/ml and Streptomycin 10 IU µg/ml (Invitrogen, USA)] می‌باشد و به انکوباتور (دمای۳۷درجه سانتی‌گراد و دی اکسید کربن 5% و رطوبت ۹۵٪) منتقل گردید. اولین تعویض محیط ۲۴ ساعت پس از به‌دست آوردن سلّول‌ها انجام گردید تا سلّول‌های غیر چسبنده جدا گردند. پس از این مرحله محیط‌ها هر ۴ روز یک بار تعویض گشتند. این مرحله تا افزایش تعداد سلّول‌ها ادامه یافت و پس از رسیدن سلّول‌ها به تراکم ۹۰ درصد تریپسینه (trypsin, Invitrogen, USA) گشتند.

تمایز سلّول‌های بنیادی مزانشیمال چربی به استئوبلاست و لیپوبلاست: سلّول های به دست آمده از بافت چربی پس از رسیدن به تراکم ۸۰ الی ۹۰ درصد (سومین پاساژ سلّولی) در محیط کشت استئوژنیک و لیپوژنیک (Bonyakhte Company, Rasht, Iran) به مدت ۲۱ روز در دمای37 درجه سانتی‌گراد، دی اکسید کربن 5% و رطوبت ۹۵٪ انکوبه شدند. تعویض محیط هر۴-۳ روز تکرار شد. پس از آن، جهت بررسی و اثبات تمایز به استئوبلاست و نشان دادن نقاط مینیرالیزه و کلسیفیه شده، سلّول ها به‌وسیله Alizarin Red S (SIGMA, USA) رنگ‌آمیزی شدند. جهت بررسی و اثبات تمایز به لیپوبلاست و نشان دادن قطرات چربی به رنگ قرمز سلّول ها به وسیله Oil red-O (SIGMA, USA) رنگ آمیزی شدند.

آنالیز مارکرهای سطحی: سلّول‌های مزانشیمی به‌دست آمده از بافت چربی و به طور کلی سلّول‌های بنیادی مزانشیمی دارای خاصیت چسبندگی به ظروف کشت پلاستیکی هستند و ظاهری شبیه به فیبروبلاست و دارای توانایی بالا در تمایز می‌باشند. با این حال سلّول‌های گرفته شده از حیوان باید تعیین هویت شوند که آیا سلّول‌های کشت شده از نوع بنیادی مزانشیمی هستند یا خیر؛ که به واسطه CD مارکرهای موجود درسطح سلّولی بررسی می‌گردد. آنالیز فلوسیتومتری بر اساس پروتکول چمیکون (Chemicone) برای بررسی بیان دو مارکر سطحی CD90 (eBioscience UK، ab25064, abcam, USA) CD44 (ویژه سلّول‌های بنیادی مزانشیمال) و عدم بیان دو مارکر CD45 (ab25670, abcam, USA) و ab95652, abcam, USA) CD31 (ویژه سلّول‌های بنیادی خون ساز و سلّول‌های آندوتلیال) انجام گشت.

تمایز به سلّول‌های زایا: جهت تمایز سلّول‌های بنیادی مزانشیمال بافت چربی به سلّول‌های زایا، تعداد ۱۰۶ سلّول در فلاسک کشت ۲۵ سانتی‌متر مربع و در محیط تمایزی مناسب [DMEM حاوی ۱۰٪ FBS، Penicillin 100 IU/ml / Streptomycin 100µg/ml و µMRA(Invitrogen, USA) 10^{-5}] به مدت ۷ روز در انکو باتور (دمای ۳۷ درجه سانتی گراد با دی اکسید کربن۵٪ و رطوبت ۹۵٪) کشت داده شدند. محیط کشت هر دو روز یک‌بار تعویض شد. در گروه کنترل سلّول‌ها در محیط کشت فاقد فاکتور تمایزی به مدت ۷ روز کشت داده شدند. برای بررسی تمایز آنالیزهای ایمونو فلورسنس و فلوسایتومتری انجام گرفت.

رنگ آمیزی ایمونوفلورسنس: رنگ آمیزی با آنتی بادی سیتوپلاسمی علیه پروتئین Mvh و DAZL برای بررسی میزان تمایز به سلّول‌های

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2026-11-18]

زایا، پس از پشت سر گذاشتن مراحل القا سلّولی و همچنین به منظور بررسی عدم بیان مارکرهای سلّول‌های زایا در سلّول‌های فاقد فاکتور تمایزی انجام شد. روش کار به این صورت است که سلّول‌های کشت داده شده در پلیت پس از شستشو با PBS (Invitrogen, USA) سرد توسط فرم آلدئید ۴٪ (Sigma, USA) فیکس شدند. به دلیل اینکه نشانگرهای انتخاب شده ازپروتئین‌های سیتوپلاسمی هستند، باید غشای سلّول‌ها نفوذپذیرگردد تا آنتی بادی‌ها بتوانند به درون سلّول نفوذ پیداکنند. بنابراین از Triton 100-X (Invitrogen, USA) دقیقه استفاده شد. بعد از ایجاد نفوذپذیری در غشا در این مرحله با استفاده از Goat Serum (1% bovine serum albumin in phosphate-buffer (sulin pbs/tween) بلاکینگ پروتئین‌های غیر اختصاصی صورت گرفت سپس آنتی بادی اولیه با رقت مناسب [Dazl (SANTA CRUZ 1:50), Mvh (antibodies-online 1:50)] به خانه ها افزوده شد و سلّول ها به مدت یک شب در دمای ۴ درجه سانتی گراد باقی ماندند. پس از شتشو سلّول‌ها توسطPBS (سه بار و هر بار به مدت ۳ دقیقه) آنتی بادی ثانویه با رقت مناسب [Rat anti-Rabbit IgG (antibodies-online, 1:100) and donkey anti-goat IgG (SANTA CRUZ 1:100)] بر روی سلّول‌ها اضافه شد. سلّول‌ها دوساعت در تاریکی انکوبه شدند، سپس به آهستگی با PBS شستشو داده شدند تا آنتی بادی‌های اضافی شسته شود. به منظور رنگ آمیزی هسته سلّول‌ها، از محلول (Invitrogen, USA) DAPI استفاده شد. برای خشک نشدن سلّول‌ها در هر خانه در حد ۱ میلی لیتر از PBS ریخته و در دمای ۴ درجه سانتی گراد (درون فویل و دور از روشنایی) تا مشاهده زیر میکروسکوپ نگهداری شدند. سلّول‌هایی که در اسکلت سلّولی خود حاوی پروتئین‌های اختصاصی مورد نظر باشند در زیر میکروسکوپ فلوروسنس رنگ سبز درخشان از خود نشان می‌دهند.

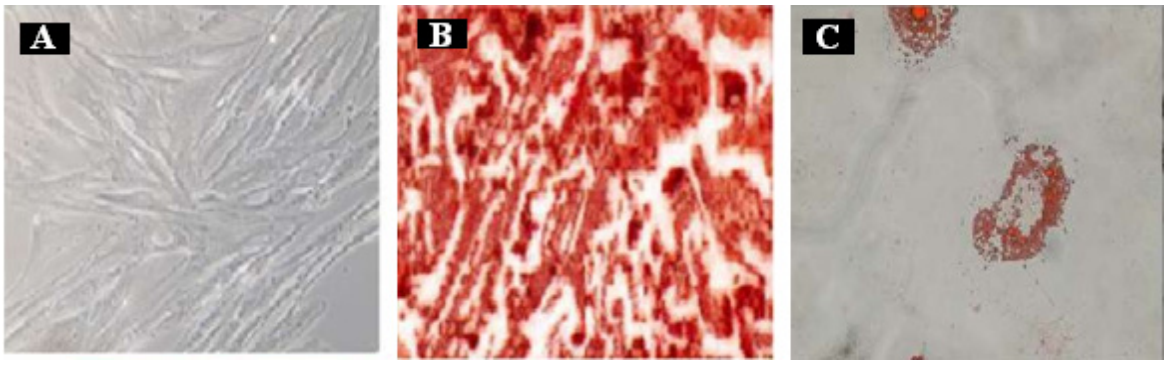
آنالیز فلوسایتومتری: برای بررسی میزان تمایز سلّول های بنیادی بافت چربی به سلّول های زایا، پس از پشت سر گذاشتن مراحل القاسلّولی فلوسایتومتری برای پروتئین Mvh و DAZL انجام شد.

تعداد ۱۰۶-۱۰۵ سلّول برداشته شد، سپس سلّول‌ها توسط محلول پارافرمالدهید ۴٪ فیکس شدند. برای دسترسی آنتی بادی‌ها به آنتی ژن‌های داخل از تریتون ۰/۱ ٪ استفاده شد. سپس آنتی بادی اولیه تهیه شده و کنترل ایزوتایپ مربوطه با رقت مناسب [Dazl (SANTA CRUZ 1:50) and Mvh (antibodies-online 1:50), Rabbit polyclonal IgG (ab27472, abcam, USA, 1:200), mouse IgG1 isotype control (11-4714, eBioscience, UK, 1:200)] به سوسپانسیون اضافه شد. سلّول‌ها به مدت یک شب در محلول آنتی بادی اولیه انکوبه شدند و روز بعد پس از شستشو سلّول ها با محلولPBS، محلول آنتی بادی ثانویه تهیه شده با رقت مناسب [FITC diluted ideally: Rat anti-Rabbit IgG (antibodies-online 30087, 1:100) donkey anti-goat IgG (SANTA CRUZ, sc-2024, 1:100)] افزوده شده و سلّول‌ها به مدت ۴۵-۳۰ دقیقه در این محلول در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند (از این مرحله به بعد پروسه در محیطی که نور مستقیم وجود ندارد انجام گرفت). پس از گذشت زمان مورد نظر سلّول ها با محلول PBS شستشو داده شده و در نهایت سلّول‌ها تا زمان آنالیز توسط دستگاه فلوسایتومتر (Partec) در محلول پارافرمالدهید ۱۰٪ قرار گرفته و کاملاً پخش شدند و سپس در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگه داری شدند.

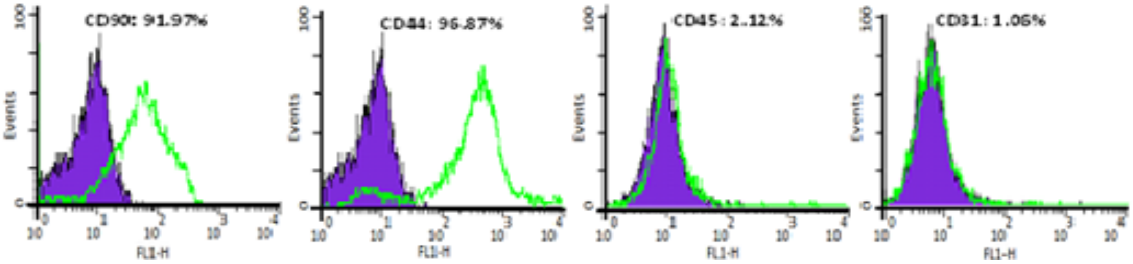
یافته‌ها

به طورطبیعی سلّول های ADMSCs در طی ۵-۴ روز به ۹۰-۸۰ در صد تراکم رسیدند (شکل 1A). جهت ارزیابی تمایز به استئوبلاست سلّول‌های به دست آمده پس از۳ هفته کشت در محیط استئوژنیک با رنگ آمیزی Alizarin Red S مورد ارزیابی قرار گرفتند (شکل 1B) و جهت بررسی تمایز به لیپوبلاست پس از۳ هفته کشت در

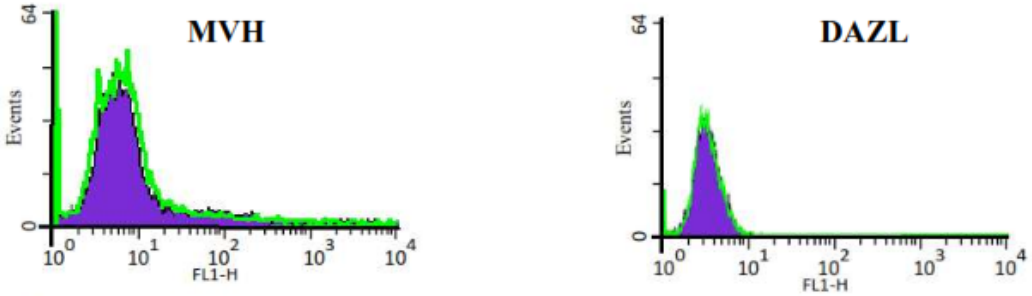
[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2026-11-18]



شکل۱- سلّول های بنیادی مزانشیمال بافت چربی (A) پیش از تمایز که دارای نمای دوکی شکل و شبه فیبروبلاستی می‌باشند. سلّول‌های بنیادی مزانشیمال بافت چربی (B) پس از قرار گیری در محیط کشت استئوژنیک به استئوبلاست تمایز یافته که با رنگ آمیزی Alizarin red S تأیید شده است. سلّول‌های بنیادی مزانشیمال بافت چربی (C) پس از قرار گیری در محیط کشت لیپوژنیک حاوی قطرات چربی شده که با رنگ آمیزی Oil red-O تأیید شده است (بزرگ نمایی x ۴۰۰).



شکل ۲- بررسی فلوسایتومتریک، بیان مارکرهای سطحی در سلّول های بنیادی استخراج شده از سلّول‌های بنیادی مزانشیمال بافت چربی. مثبت بودن مارکرهای سطحی سلّول‌های بنیادی **(CD90** و **CD44)** و منفی بودن مارکرهای آندوتلیال (**CD31**) وسلّول‌های خونی (**CD45**) نشان داده شده است (کنترل ایزوتایپ به رنگ بنفش می‌باشد).



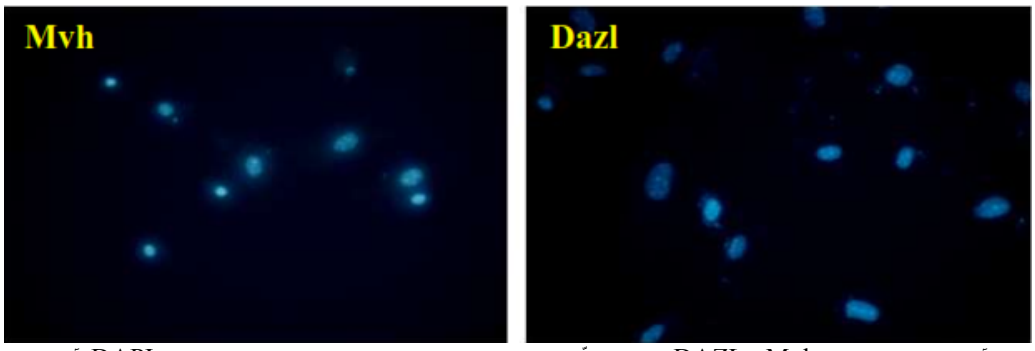
شکل ۳- بررسی فلوسیتومتریک سلّول های بنیادی مزانشیمال بافت چربی پس از کشت در محیط فاقد فاکتور تمایزی به مدت ۷ روز (پس از چهارمین پاساژ). با انجام فلوسیتومتری مشخص شد که این سلّول‌ها نسبت به مارکرهای سلّول های زایا (Mvh و DAZL) منفی هستند (کنترل ایزوتایپ به رنگ بنفش می باشد).

محیط لیپوژنیک با رنگ آمیزی Oil red-O مورد ارزیابی قرار گرفتند (شکل 1C). و نتایج نشان می‌دهد که مارکرهای سطحی CD90، CD44 مثبت و دو مارکر CD45 و CD31 در سلّول‌های مورد نظر منفی بوده است که نشان دهنده تأیید هویت سلّول‌های بنیادی مزانشیمی می‌باشد (شکل ۲).

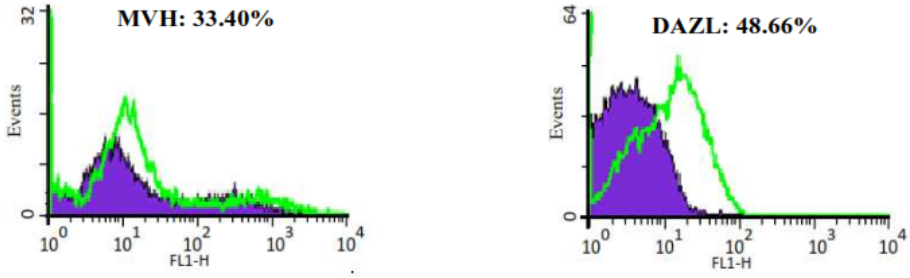
نتایج القاء سلّولی: سلّول‌های مزانشیمی‌موجود در گروه کنترل در محیط DMEM فاقد هرگونه فاکتور تمایزی کشت داده شدند. نتایج حاصل از رنگ آمیزی ایمونوفلوروسنس و آنالیز فلوسایتومتری نشان می‌دهند هیچ یک از سلّول‌های این گروه نسبت به مارکرهای سلّول‌های زایا (Mvh و DAZL) واکنش مثبت نشان ندادند (اشکال۳ و۴).

در گروه مورد مطالعه بعدی سلّول‌ها در محیط کشت حاوی رتینوئیک اسید به مدت ۷ روز کشت

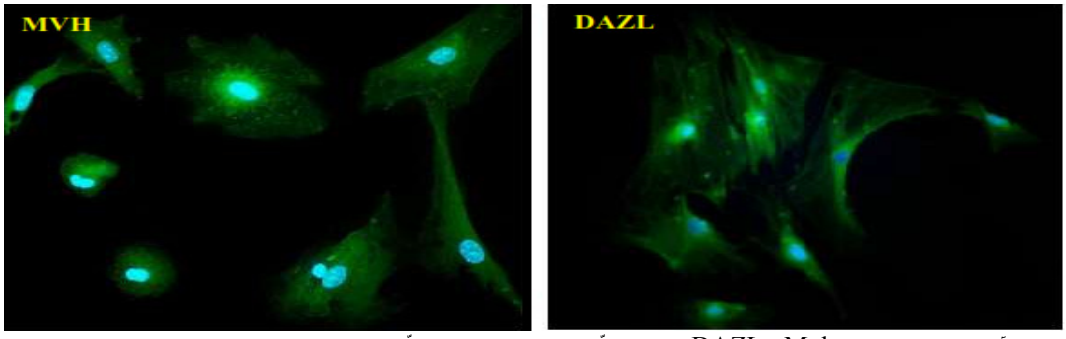
[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2026-11-18]



شکل ۴- رنگ آمیزی ایمونوفلورسنس Mvh و DAZL (سبز) در سلّول های بنیادی مزانشیمال و بافت چربی. هسته‌ها توسط DAPI (آبی) رنگ آمیزی شدند. گروه تمایزی بدون هیچ‌گونه فاکتور تمایزی. سلّول‌ها نسبت به آنتی بادی MVH و DAZL منفی شدند. بزرگ نمائی x۴۰۰.



شکل ۵- بررسی فلوسیتومتریک سلّول های بنیادی مزانشیمال بافت چربی پس از تمایز به سلّول های زایا توسط RA به مدت ۷ روز. با انجام فلوسیتومتری مشخص شد که این سلّول‌ها پس از تمایز نسبت به مارکرهای سلّول های زایا (Mvh وDAZL) مثبت هستند (کنترل ایزوتایپ به رنگ بنفش می باشد).



شکل ۶- رنگ آمیزی ایمونوفلورسنس Mvh و DAZL (سبز) در سلّول‌های زایای مشتق از سلّول های بنیادی مزانشیمال بافت چربی. هسته‌ها توسط DAPI (آبی) رنگ آمیزی شدند. گروه غنی شده به وسیله RA. بعد از القاء تمایز یافته و نسبت به آنتی بادی MVH و DAZL مثبت شدند. بزرگ نمائی x۴۰۰.

داده شدند. آنالیز فلو سایتومتری و رنگ آمیزی ایمونوفلوروسنس این گروه با بررسی دو مارکر رده سلّول‌های زایا یعنی Mvh و DAZL انجام شد ونتایج به دست آمده نشان داد که سلّول‌های این گروه نسبت به این دو مارکر واکنش مثبت نشان داده اند (اشکال ۵ و ۶).

بحث و نتیجه گیری

در مطالعه حاضر با استفاده از فاکتور تمایزی رتینوئیک اسید قابلیت سلّول‌های بنیادی مزانشیمی حاصل از بافت چربی در تمایز به سمت سلّول‌های رده زایا بررسی شد. در این مطالعه نشان داده شد که سلّول‌های تمایز یافته از سلّول‌های بنیادی مزانشیمی حاصل از بافت چربی قادر به بیان مارکرهای رده سلّول‌های زایا یعنی Mvh و Dazl می‌باشند و این بیانگر این مطلب است که سلّول‌های فوق به سمت سلّول‌های زایا در محیط In vitro تکامل یافته‌اند. روش تمایزی مورد استفاده در این مطالعه روش نسبتاً تغییر یافته مطالعات پیشین بود (۵ و ۱۰-۸). سلّول‌های

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2026-11-18]

بنیادی، سلّول‌های تمایز نیافته با توانایی تکثیر و تولید سلّول‌های تمایز یافته هستند. سلّول‌های بنیادی مزانشیمی به عنوان یک منبع ایده آل برای سلّول درمانی محسوب می‌گردند. استفاده از سلّول‌های بنیادی مزانشیمی جهت درمان بیماری‌ها بسیار رایج بوده است، این سلّول‌ها قابلیت تزاید زیادی داشته و می‌توانند به چندین رده سلّولی از قبیل سلّول‌های اندوتلیال، اپی‌تلیال، عضلانی، سلّول‌های شبه شوآن، هپاتوسیت و نورون تمایز یابند (۱۸و۲۵).

در مطالعه حاضر سلّول‌های شبه فیبروبلاست دوکی شکل به دست آمده از بافت چربی با استفاده از تغییر مداوم محیط کشت تکثیر داده شدند. نتایج این مطالعه نشان داد که تعویض پی در پی محیط کشت مانع از چسبیدن سلّول‌های غیر مزانشیمی و خونی به فلاسک پلاستیکی کشت می‌شوند که مشابه گزارش سایر محققین بوده است (۲۶و۲۷).

جهت اثبات مزانشیمال بودن سلّول‌ها مارکرهای سطحی برسی شدند. از طرفی در این مطالعه مارکرهای CD44 و CD90 در حد قابل توجهی بیان شدند. نتایج حاصل از تحقیق حاضر، نتایج مطالعه انجام شده توسط Dominici و همکاران و lee و همکاران را در بیان مارکرهای CD44 و CD90 و عدم بیان مارکرهای CD45 وCD31 تایید می‌نماید و نشانگر بنیادی بودن سلّول‌های حاصله می‌باشد (۲۶و۲۸).

جهت تایید چند توان بودن سلّول‌های بنیادی مزانشیمی حاصل از بافت‌چربی اقدام به تمایز آن‌ها در محیط تمایزی آدیپوسیت و استئوبلاست نموده و با استفاده ازرنگ‌های Oil red-O و Alizarin red S تمایز آن‌ها به‌ترتیب به آدیپوسیت و استئوبلاست نشان داده شد که در مطالعات قبلی نیز از این روش جهت تایید چند توان بودن استفاده شده است و نتایج مشابه نتایج گزارش های دیگر بوده است (۱۲و۲۹). در مجموع عدم بیان مارکرهای شاخص سلّول‌های خونی و آندوتلیال، بیان مارکرهای شاخص مزانشیمی، مورفولوژی دوکی سلّول‌ها، توان تکثیر بالا و تمایز به دودمان های مزانشیمی (استخوان و چربی) نشان دهنده این مطلب است که سلّول‌های به‌دست آمده در این مطالعه جمعیت خالصی از سلّول‌های بنیادی مزانشیمی می‌باشند (۲۷).

در مطالعه حاضر مدت زمان بسیار زیادی صرف می‌شد تا سلّول‌های بنیادی مغز استخوان رشد و تکثیر یابند. حتی در صورت رسیدن به Confluence کامل نیز به تعداد پاساژ بالاتر نمی‌رسیدند و به علّت کم بودن میزان رشد و تکثیر سریعاً به سلّول‌های چربی متمایز می‌شدند. سلّول‌های گرفته‌شده از بافت‌چربی علاوه بر نمونه‌گیری آسان، سریع رشد و تکثیر می‌یافتند و همچنین با حداقل آسیب می‌توان به مقدار زیادی سلّول دست یافت. به طور کلّی در مطالعات قبلی نیز این مطلب تایید شده است که کار با سلّول‌های بنیادی گرفته شده از بافت چربی راحت‌تر از کار با سلّول‌های بنیادی گرفته شده از مغز استخوان و بنیادی جنینی بوده (۳۰ و۳۱).

در مرحله بعد به روند تمایز سلّول‌های بنیادی مزانشیمی بافت‌چربی به سلّول‌های زایا در محیط کشت حاوی رتینوئیک اسید پرداخته شد و توان تشکیل سلّول‌های شبه زایا با آنالیز ایمونوفلوروسنس و فلوسایتومتری بررسی شد.

نظر به اینکه اسید رتینوئیک در هر دو جنس در مزونفروز تولید می‌شود و موجب تصمیم‌گیری سلّول‌های زایای پس مهاجر جهت ورود به مرحله میوز و یا توقف در مرحله میتوز می‌شود (۲۳)، بنابراین به‌نظر می‌رسد که اسید رتینوئیک ممکن است سبب تسریع ورود سلّول‌های زایا به مرحله میوز در ستیغ تناسلی گردد نکته قابل توجه این است که در In Vitro اسید رتینوئیک سبب القای تمایز سلّول‌های بنیادی و تحریک تقسیم میتوز و تمایز سلّول‌های بنیادی به سلّول‌های جنسی می‌شود در این زمینه مطالعات متعددی انجام گرفته که تمامی آن‌ها موید این مطلب بوده است(۵ ، ۷ و ۲۳). البته RA یک فاکتور تمایزی چند منظوره می‌باشد و می‌تواند باعث تمایز سلّول‌ها به سمت سلّول‌ای عصبی، قلبی و کبدی نیز بشود (۱۱).

گزارشات متعددی از نقش RA در روند تشکیل سلّول های بنیادی مزانشمال مغز استخوان و

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2026-11-18]

رویانی در شرایط in vitro حکایت دارند. به‌طوریکه فقدان این فاکتور تمایزی منجر به تمایز بسیار کم سلّول‌های مذکور به سلّول‌های رده زایا شده بود (۳، ۵ و ۹-۱۳)، لذا نقش انکار ناپذیر فاکتور RA در تمایز سلّول‌های بنیادی به سلّول‌های زایا مبرهن می‌باشد.

در مطالعه حاضر برای شناسایی سلّول‌های زایای تولید شده در شرایط in vitro از مارکرهای DAZL (Deleted in azoospermia-like) و MVH (mouse Vasa homolog gene) بهره بردیم. Mvh تنها مارکر قابل اطمینان برای شناسایی این رده سلّولی می‌باشد (۳۱). این مارکر یک RNA هلیکاز وابسته به ATP مخصوص رده سلّول‌های زایا می‌باشد که تا کنون بیان آن در هیچ رده سلّولی دیگر تایید نشده است. در هنگام مهاجرت سلّول‌های زایا به ستیغ گنادی اولین مارکر بیان شده در این رده Mvh می‌باشد. با توجه به تحقیقات گسترده‌ای که بر روی سلّول‌های زایا انجام شده است، در حال حاضر مطمئن‌ترین مارکر جهت تمایز سلّول‌های رده زایا از سایر سلّول‌ها مارکر Mvh می‌باشد (۳۲و۳۳). در گروه کنترل سلّول‌های بنیادی بدون هیچ‌گونه فاکتور تمایزی مورد مطالعه قرار گرفتند. در این گروه همانطور که انتظار می‌رفت سلّول‌های بنیادی مزانشیمی هیچ کدام از مارکرهای رده سلّول‌های زایا (Mvh، DAZL) رادر سطح پروتئین بیان نکردند که این نتایج همانند نتایج به دست آمده در مطالعات انجام شده پیشین می‌باشند و نشان دهنده این مطلب بوده است که سلّول‌های بنیادی مزانشیمی در محیط کشت فاقد فاکتور تمایزی به سلّول زایا تمایز نمی‌یابند (۱۱-۹). با اینکه در مطالعاتی، گزارشاتی مبنی بر تمایز خود به خودی سلّول‌های بنیادی جنینی موشی به سلّول‌های زایا گزارش شده بود (۵ و۳۳)، اما نتایج به دست آمده از این مطالعه بیانگر مطلبی خلاف می‌باشد، زیرا در گروه کشت داده شده بدون استفاده از هیچ گونه فاکتور رشد، هیچ یک از مارکرهای رده زایا بیانی نداشتند.

در گروه مورد مطالعه تمایزی تأثیر اسید رتینوئیک در تمایز سلّولهای بنیادی بافت چربی به سلّول‌های زایا بررسی شد. سلّول‌های مذکور به مدت ۷ روز در محیط کشت حاوی رتینوئیک اسید کشت داده شدند. رنگ آمیزی ایمونوفلوئورسنس و آنالیز فلوسیتومتریک نشان دادند که این سلّول‌ها تحت تاثیر RA مارکرهای Mvh و DAZL را بیان می‌کنند.

گروهی از محققین نقش تمایزی و تکثیری RA در In vitro را در تمایز سلّول‌های بنیادی مغز استخوان به سلّول‌های زایا گزارش کرده‌اند. Nayernia و همکاران توانسته بودند در مطالعات In vitro به تمایز سلّول‌های زایای مذکر از سلّول‌های بنیادی مزانشیمال مغز استخوان موشی و انسانی در محیط کشت حاوی RA دست یابند(۹و۱۰). در مطالعه‌ای دیگر Salvador و همکاران تمایز سلّول‌های زایای مذکر را از سلّول‌های بنیادی جنینی موش در محیط کشت تمایزی حاوی RA و تستسترون گزارش کردند و موفق به مشاهده اووسیت‌هایی شدند که توسط ساختارهای شبه فولیکولی احاطه شده بودند (۳۴).

همچنین Hua و همکاران موفق به تمایز سلّول‌های بنیادی مزانشیمال مغز استخوان جنین‌های سقط شده انسان به سلّول‌های زایای مذکر با اضافه کردن اسید رتینوئیک و عصاره بیضه (Testicular extraction) به محیط کشت شدند (۱۱).

بررسی‌هایی بر روی سلّول‌های Mvh+ به دست آمده از بافت چربی در اثر RA صورت نگرفته است، ولی نتایج تحقیق حاضر نشان دهنده اهمیت نقش تکثیری و تزایدی فاکتور RA در تمایز به سمت سلّول‌های جنسی می‌باشد و هیچ مغایرتی با نتایج به‌دست آمده در تحقیقات انجام شده قبلی که بر روی سلّول‌های بنیادی رویانی و مزانشیمی حاصل از مغز استخوان انجام شده، نداشته است.

تمایز سلّول‌های بنیادی به سلّول‌های زایا و گامت‌ها می‌تواند درک محققین را نیز از نحوه تکامل سلّول‌های زایا و سلّول‌های جنسی مذکر و مؤنث عمیق‌تر و بر مشکلات تکنیکی و اخلاقی استفاده از این سلّول‌ها در تحقیقات گوناگون به خصوص در نمونه‌های انسانی غلبه کند. همچنین مطالعات انجام شده در سال‌های اخیر و

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2026-11-18]

پیشرفت‌های صورت گرفته در تمایز سلّول‌های بنیادی به انواع مختلف سلّول‌ها، نگرش دانشمندان را به مبحث باروری و ناباروری تغییر داده است. می توان با ادامه تحقیقات و با ادامه تمایز سلّول‌های بنیادی بافت چربی به سلّول‌های جنسی مذکر و مؤنث (اووسیت و اسپرم) دریچه‌ای نو و امیدوارکننده برای درمان اختلالات باروری و غلبه بر ناباروری گشود.

در مطالعه حاضر سلّول‌های بنیادی جدا شده از بافت چربی موش‌های نر جهت اثبات پرتوان بودن، در محیط‌های تمایزی مناسب به استئوبلاست و لیپوبلاست تمایز داده شدند. همچنین این سلّول‌ها قادر به بیان مارکرهای سطحی سلّول‌های بنیادی مزانشیمی بودند. در نهایت با استفاده از فاکتور تمایزی مناسب سلّول‌های به دست آمده به سلّول‌های زایا تمایز داده شدند. نتایج مثبت به دست آمده نشان می‌دهد که سلّول های بنیادی پرتوان حاصل از بافت چربی قادر هستند به سلّول‌های زایا متمایز شوند.

تقدیر و تشکر

این پروژه با حمایت مالی معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی تهران با شماره ثبت ۹۰-۰۲-۳۰-۱۲۹۴۲ انجام گرفته است.

منابع

1. Valsangkar, S., et al., An evaluation of the effect of infertility on marital, sexual satisfaction indices and health-related quality of life in women. Journal of Human Reproductive Sciences. 2011;4(2):80.

2. Newson A, Smajdor A. Artificial gametes: new paths to parenthood? Journal of medical ethics. 2005;31(3):184-6.

3. Newson A, Smajdor, Artificial gametes: new paths to parenthood? Journal of medical ethics, 2005. 31(3): p. 184-186.
Hübner, K., et al., Derivation of oocytes from mouse embryonic stem cells. Science. 2003;300(5623):1251-6.

4. Toyooka, Y., et al., Embryonic stem cells can form germ cells in vitro. Proceedings of the National Academy of Sciences. 2003;100(20): 11457-62.

5. Geijsen, N., et al., Derivation of embryonic germ cells and male gametes from embryonic stem cells. Nature. 2003;427(6970):148-54.

6. Lacham Kaplan O, Chy H, Trounson A. Testicular cell conditioned medium supports differentiation of embryonic stem cells into ovarian structures containing oocytes. Stem Cells. 2005;24(2):266-73.

7. Nayernia, K., et al., In vitro-differentiated embryonic stem cells give rise to male gametes that can generate offspring mice. Developmental Cell. 2006; 11(1):125-32.

8. Molyneaux K, Wylie C. Primordial germ cell migration. International Journal of Developmental Biology. 2004; 48:537-44.

9. Drusenheimer, N., et al., Putative human male germ cells from bone marrow stem cells. Society of Reproduction and Fertility supplement. 2007;63: 69.

10. Nayernia, K., et al., Derivation of male germ cells from bone marrow stem cells. Laboratory investigation. 2006; 86(7):654-63.

11. Hua, J., et al., Derivation of male germ cell-like lineage from human fetal bone marrow stem cells. Reproductive biomedicine online. 2009;19(1): 99-105.

12. Mazaheri, Z., et al., Different doses of bone morphogenetic protein 4 promote the expression of early germ cell-specific gene in bone marrow mesenchymal stem cells. In Vitro Cellular & Developmental Biology-Animal. 2011;47(8):521-5.

13. Dyce, P.W., et al., Stem cells with multilineage potential derived from porcine skin. Biochemical and biophysical research communications. 2004; 316(3):651-8.

14. Young HE,Black AC. Adult stem cells. The Anatomical Record Part A: Discoveries in Molecular, Cellular, and Evolutionary Biology. 2003;276(1):75-102.

15. Wakitani, S., et al., Embryonic stem

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2026-11-18]

Cytotherapy. 2006;8(4):315-7.
27. Sun, S., et al., Isolation of mouse marrow mesenchymal progenitors by a novel and reliable method. Stem Cells. 2003;21(5):527-35.
28. Lee, K.D., et al., In vitro hepatic differentiation of human mesenchymal stem cells. Hepatology. 2004;40(6):1275-84.
29. Pittenger, M.F., et al., Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. Science. 1999;284(5411):143-7.
30. Villageois, P., et al. Regulators of human adipose-derived stem cell self-renewal. Am J Stem Cell. 2012;1(1):42-7.
31. Mizuno H, Tobita M, Uysal AC. Concise review: adipose derived stem cells as a novel tool for future regenerative medicine. Stem Cells. 2012; 30(5):804-10.
32. West, F.D., et al., Human haploid cells differentiated from meiotic competent clonal germ cell lines that originated from embryonic stem cells. Stem cells and development. 2010;20(6):1079-88.
33. Yamauchi, K., et al., In vitro germ cell differentiation from cynomolgus monkey embryonic stem cells. PloS One. 2009;4(4):e5338.
34. Salvador, L.M., et al., The promoter of the oocyte-specific gene, Gdf9, is active in population of cultured mouse embryonic stem cells with an oocyte-like phenotype. Methods. 2008;45 (2):172-81.
cells injected into the mouse knee joint form teratomas and subsequently destroy the joint. Rheumatology. 2003; 42(1):162-5.
16. Brickman JM, Burdon TG. Pluripotency and tumorigenicity. Nature genetics. 2002;32(4):557-8.
17. Zuk, P.A., et al., Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. Tissue engineering. 2001;7(2):211-28.
18. Jiang, L., et al., Differentiation of rat adipose tissue-derived stem cells into Schwann-like cells in vitro. Neuroreport. 2008;19(10):1015-9.
19. Song, S.H., et al., Characterization of porcine multipotent stem/stromal cells derived from skin, adipose, and ovarian tissues and their differentiation in vitro into putative oocyte-like cells. Stem cells and development. 2011; 20(8):1359-70.
20. Masui, S., et al. Pluripotency governed by Sox2 via regulation of Oct3/4 expression in mouse embryonic stem cells. Nature cell biology. 2007; 9(6):625-35.
21. Tolkunova, E., et al., The caudal□related protein Cdx2 promotes trophoblast differentiation of mouse embryonic stem cells. Stem Cells. 2006;24(1):139-44.
22. Ross, S.A., et al., Retinoids in embryonal development. Physiological reviews. 2000;80(3):1021-54.
23. Bowles, J., et al., Retinoid signaling determines germ cell fate in mice. Science Signalling. 2006;312(5773):596.
24. Nayernia, K., et al., Stem cell based therapeutical approach of male infertility by teratocarcinoma derived germ cells. Human molecular genetics. 2004; 13(14):1451-60.
25. De Ugarte, D.A., et al., Differential expression of stem cell mobilization-associated molecules on multi-lineage cells from adipose tissue and bone marrow. Immunology letters. 2003; 89(2):267-70.
26. Dominici, M., et al., Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement.

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2026-11-18]

The effect of retinoic acid on differentiation of mouse adipose tissue derived mesenchymal stem cells into germ cells

Maryam Hosseinzadeh Shirzeyli, MSc. Department of Anatomy, School of Medicine, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran. m_hoseinzadeh@razi.tums.ac.ir
Parichehr Pasbakhsh, PhD. Associate Professor of Anatomy, Department of Anatomy, School of Medicine, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran. pasbakhsh@hotmail.com
Fardin Amidi, PhD. Associate Professor of Anatomy, Department of Anatomy, School of Medicine, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran. amidifardin@yahoo.com
Zohre Afsartala, MSc. Department of Biology, School of Basic Science, Islamic Azad University, Tehran, Iran. zafsartala@yahoo.com
***Aligholi Sobhani,** Ph.D. Professor of Anatomy, Department of Anatomy, School of Medicine, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran (*Corresponding author). sobhania@tums.ac.ir

Abstract

Background: Recent publications regarding the differentiation of stem cells to germ cells have motivated researchers to make new approaches in infertility. In vitro production of germ cells improves the understanding of differentiation process of male and female germ cells. Since using embryonic stem cells for this purpose has been associated with tumorogenesis and ethical criticisms, the mentioned cells were suggested to be replaced with some adult multipotent stem cells. In this study, we used Retinoic acid to induce the differentiation of stem cells into germ cells.To find appropriate non invasive source replacement for embryonic stem cells in this study; we evaluated differential potentials of Adipocyte Derived Mesenchymal Stem Cells (ADMSCs) to germ like cells.
Methods: To find the differentiation capabilitypurified ADMSCs were obtained and differentiated to osteoblasts and adipocytes by using appropriate culture medium (Alizarin Red S and Oil red-O). Superficial markers for mesenchymal stem cells (expression of CD90 and CD44 and non-expression of CD45 and CD31) were investigated by flow cytometry to confirm mesenchymal lineage production. The cells were differentiated to germ cells in mediums containing Retinoic acid for 7 days. To evaluate germ cells characteristic markers (Mvh and Dazl) flow cytometry and imunoflorescence were used.
Results: Presence of stem cell superficial markers (CD90 and CD44) and absence of endothelial and blood cell markers (CD31 and CD45) were confirmative for the mesenchymal origin of these cells. The cells were able to differentiate into osteoblast and adipocyte cells. This fact was representative for the multipotential entity of the examined cells. After treating the cells with Retinoic acid, flow cytometry and imunoflorescence results showed remarkable expression of germ cells characteristic markers (Mvh and Dazl).
Conclusions: By this study, it was found that germ cell markers were expressed in ADMSCs after adding exogenous Retinoic acid into culture medium.

Keywords: Mesenchymal stem cells, Infertility, Germ cells, Retinoic acid

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2026-11-18]