مجله علوم پزشکی رازی دوره ۲۷، شماره ۱، فروردین ۱۳۹۹
http://rjms.iums.ac.ir
مقاله پژوهشی

بررسی اثر طولانی مدت اپی‌گالوکاتچین‌گالات بر تکثیر سلولی و تمایز استئوژنیک سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان موش صحرایی

آتناسادات عظیمی: دانشجوی دکتری زیست شناسی سلولی- تکوین، گروه زیست شناسی، دانشگاه اراک، اراک، ایران
بیان لطفی: کارشناسی ارشد زیست شناسی سلولی- تکوینی، گروه زیست شناسی، دانشگاه اراک، اراک، ایران
مجید مهدیه: دانشیار و متخصص فیزیولوژی گیاهی، گروه زیست شناسی، دانشگاه اراک، اراک، ایران (*نویسنده مسئول) m-mahdiyeh@araku.ac.ir
ملک سلیمانی مهرنجانی: استاد و متخصص بافت و جنین، گروه زیست شناسی، دانشگاه اراک، اراک، ایران

چکیده

زمینه و هدف: اپی‌گالوکاتچین‌گالات به‌عنوان یک آنتی‌اکسیدانت قوی نقش مهمی در مهار رادیکال‌های آزاد ایفا می‌کند. بنابراین هدف از این پژوهش، بررسی اثر اپی‌گالوکاتچین‌گالات بر توانایی زیستی، مورفولوژی و تمایز استئوژنیک سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان موش صحرایی است.

روش کار: در این مطالعه تجربی، سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان با استفاده از روش فلشینگ استخراج شدند. در پایان پاساژ سوم سلول‌ها به ۹ گروه کنترل و آزمایشی تقسیم شدند. سلول‌های گروه‌های آزمایشی با غلظت‌های مختلف اپی-گالوکاتچین‌گالات (۰، ۱، ۵، ۱۰، ۱۵، ۲۰، ۲۵، ۳۰ و ۵۰ میکرومولار) برای یک دوره ۲۱ روزه در محیط استئوژنیک حاوی ۱۰ درصد سرم جنین گاوی تیمار شدند. سپس توانایی زیستی، میزان معدنی شدن ماتریکس استخوانی، سطح کلسیم داخل و خارج سلولی، میزان فعالیت آلکالین فسفاتاز و سطح بیان ژن‌های آلکالین فسفاتاز و استئوکلسین طی روند استئوژنزیس مورد بررسی قرار گرفت. داده‌ها با روش آماری آنالیز واریانس یک‌طرفه مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت و تفاوت میانگین‌ها در سطح $P<0/05$ معنی‌دار در نظر گرفته شد.

یافته‌ها: توانایی زیستی، میزان معدنی شدن ماتریکس استخوانی، سطح کلسیم، میزان فعالیت آلکالین فسفاتاز و سطح بیان ژن‌های آلکالین فسفاتاز و استئوکلسین در سلول‌های بنیادی مزانشیمی تیمار شده با اپی‌گالوکاتچین‌گالات به‌طور معنی‌داری در رفتاری وابسته به دوز، در مقایسه با گروه کنترل افزایش یافت ($P<0/05$). همچنین گستردگی سیتوپلاسم نیز در سلول‌های تیمار شده با اپی‌گالوکاتچین‌گالات مشاهده شد.

نتیجه‌گیری: از آنجاکه اپی‌گالوکاتچین‌گالات افزایش معنی‌داری در توانایی زیستی و تمایز استئوژنیک سلول‌های بنیادی مزانشیمی ایجاد می‌کند، بنابراین می‌تواند برای افزایش تمایز و بقای سلولی استفاده شود.

تعارض منافع: گزارش نشده است.
منبع حمایت کننده: دانشگاه اراک

کلیدواژه‌ها
اپی‌گالوکاتچین‌گالات،
تمایز استئوژنیک،
سلول‌های بنیادی مزانشیمی،
موش صحرایی

تاریخ دریافت: ۹۸/۰۶/۰۹
تاریخ پذیرش: ۹۸/۱۱/۱۲

شیوه استناد به این مقاله:
Azimi AS, Lotfi B, Mahdiyeh M, Soleimany Mehranjani M. The effect of long term of Epigallocatechin gallat on cell proliferation and osteogenic differentiation of rat bone marrow mesenchymal stem cells. Razi J Med Sci. 2020;27(1):26-37.

*انتشار این مقاله به‌صورت دسترسی آزاد مطابق با CC BY-NC-SA 3.0 صورت گرفته است.

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2024-12-27]

Razi Journal of Medical Sciences.2020;27(1):26-37. http://rjms.iums.ac.ir

Original Article

The effect of long term of Epigallocatechin gallat on cell proliferation and osteogenic differentiation of rat bone marrow mesenchymal stem cells

Atena Sadat Azimi, PhD student of Cell Genomic Biology, Department of Biology, Arak University, Arak, Iran
Bayan Lotfi, MSc, Department of Biology, Arak University, Arak, Iran
Majid Mahdiyeh, PhD, Associate Professor of Plant Physiology, Department of Biology, Arak University, Arak, Iran (*Corresponding author) m-mahdiyeh@araku.ac.ir
Malek Soleimany Mehranjani, PhD, Professor of Embryology and Histology, Department of Biology, Arak University, Arak, Iran

Abstract

Background: Epigallocatechin gallat as a strong antioxidant plays an important role in inhibiting free radicals. Therefore, this study aimed to investigate the effect of Epigallocatechin gallat on the viability, morphology and osteogenic differentiation in bone marrow mesenchymal stem cells of rat.
Methods: In this experimental study, the bone marrow mesenchymal stem cells were extracted using flashing-out method. At the end of the third passage, cells were divided into 9 groups of control and experimental. The cells of experimental groups were treated with the different doses of epigallocatechin gallat (0, 1, 5, 10, 15, 20, 25, 30 and 50 µm) for a period of 21 days in the osteogenic media containing 10% of fetal bovine serum. Then, cell proliferation, bone matrix mineralization, intracellular and extracellular calcium deposition, alkaline phosphatase activity and expression of alkaline phosphatase and osteocalcin genes were investigated during the procedure of osteogenesis. Data was analyzed using one-way ANOVA and the means difference was considered significant at $p<0.05$.
Results: The cell viability, mean bone matrix mineralization, calcium deposition, alkaline phosphatase activity, expression of alkaline phosphatase and osteocalcin of the mesenchymal stem cells treated with epigallocatechin gallat significantly increased, compared to the control group in a dose dependent manner ($p<0.05$). Also cytoplasm extensions were observed in the cells treated with epigallocatechin gallat.
Conclusion: Since epigallocatechin gallat caused a significant increase in cell viability and osteogenic differentiation in the mesenchymal stem cells, therefore, it can be utilized in order to increase cell differentiation and survival.

Conflicts of interest: None
Funding: Arak University

Keywords
Epigallocatechin gallat, Osteogenic differentiation, Mesenchymal stem cells, Rat

Received: 31/08/2019
Accepted: 01/02/2020

Cite this article as:
Azimi AS, Lotfi B, Mahdiyeh M, Soleimany Mehranjani M. The effect of long term of Epigallocatechin gallat on cell proliferation and osteogenic differentiation of rat bone marrow mesenchymal stem cells. Razi J Med Sci. 2020;27(1):26-37.

*This work is published under CC BY-NC-SA 3.0 licence.

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2024-12-27]

مقدمه

سلول‌های بنیادی از لحاظ منشأ به دو دسته عمده سلول‌های بنیادی جنینی و سلول‌های بنیادی بالغ تقسیم می‌شوند. محدودیت استفاده از سلول‌های بنیادی جنینی در پزشکی ترمیمی و مهندسی بافت، امکان استفاده از سلول‌های بنیادی بالغ را به عنوان جایگزین مناسبی در مباحث سلول درمانی مطرح می‌سازد (۱). از مهم‌ترین سلول‌های بنیادی بالغ که امروزه توجه اکثر محققین را به خود جلب کرده است می‌توان به سلول‌های بنیادی مزانشیمی اشاره کرد. سلول‌های بنیادی مزانشیمی (Mesenchymal Stem Cells-MSCs) اولین بار درسال ۱۹۶۶ و در تحقیقات پتراکووا و فردانشتاین مطرح شد. آن‌ها موفق به جداسازی سلول‌های بنیادی مغز استخوان موش آزمایشگاهی شده بودند (۲). این سلول‌ها جمعیتی از سلول‌های بنیادی سوماتیک چند توان می‌باشند که تاکنون در بافت‌هایی نظیر مغز استخوان، ماهیچه اسکلتی، مغز، بافت چربی، خون بند ناف، خون محیطی و بافت‌های پیوندی پوستی شناسایی شده‌اند. سلول‌های مزانشیمی، دارای مارکرهای سطحی از جمله CD29، CD44، CD37، CD90، CD105، CD106 و CD166 هستند ولی مارکرهای سطحی هماتوپویتیک و HLA – DR را ندارند (۳). این سلول‌ها صرف نظر از منبع بافتی‌شان، در برخی خصوصیات نظیر توانایی تکثیر و خودنوسازی طولانی مدت البته در شرایط کنترل شده کشت سلول، مورفولوژی دوکی شکل و پتانسیل تمایز به دودمان مزودرمی مشترک هستند (۴). سلول‌های مزانشیمی، پتانسیل تمایز به مزودرم احشایی، استئوبلاست، آدیپوسیت، کندروسیت و مایوسیت را دارا می‌باشند. همچنین در مطالعات اخیر نشان داده شده است که در محیط‌های تمایزی مناسب، سلول‌های بنیادی مزانشیمی، می‌توانند به کاردیومیوسیت و یا حتی سلول‌هایی از مشتقات غیر مزودرمی نظیر هپاتوسیت‌ها و نورون‌ها، تمایز یابند. طبق مطالعات صورت گرفته سلول‌های بنیادی مزانشیمی در محیط استئوژنیک می‌توانند به استئوبلاست تمایز یابند (۵).

تمایز استئوژنیک سلول‌های بنیادی مزانشیمی می‌تواند راهکار درمانی مهمی در راستای ترمیم بافت‌های استخوانی و همچنین درمان بیماری‌های مربوط به استخوان محسوب شود (۶).

به‌علاوه طبق بررسی‌های صورت گرفته مشخص شده است که اضافه شدن برخی ترکیبات مانند آنتی اکسیدانت‌ها به محیط تمایزی، می‌تواند تمایز را افزایش دهد و بروز شاخص‌های تمایزی را بالا ببرد. از جمله مهم ترین این ترکیبات می‌توان به آنتی‌اکسیدانت های موجود در چای سبز اشاره کرد. چای سبز از برگ‌های گیاه Camellia Sinensis استخراج می‌شود و یکی از متداول‌ترین آشامیدنی‌ها است که خواص سودمندی مثل آثار ضد سرطانی و آنتی‌اکسیدانتی دارد (۷). در چین باستان و آسیای شرقی از چای سبز به عنوان گیاهی دارویی در درمان دیابت استفاده می‌شود (۸). چای سبز اثر ضد انعقادی و ضد سرطانی دارد و موجب افزایش سطح ایمنی غیراختصاصی بدن می‌شود (۹). بیش از ۱۵۰ گزارش در زمینه‌ی خواص این گیاه دارویی وجود دارد که اغلب آن‌ها بر ویژگی آنتی‌اکسیدانتی این ماده تاکید کرده‌اند. چای سبز حاوی کاتچین‌ها، کافئین، ویتامین‌های B، C، E، فلانوئیدها، گلیکوپروتئین، فیبر، لیپید و کارتنوئیدها است (۱۱-۹). کاتچین‌ها که مهم‌ترین آنتی‌اکسیدانت چای سبز محسوب می‌شوند، در دسته پلی‌فنول‌ها قرار می‌گیرند. تاکنون چهار نوع اصلی کاتچین در برگ چای سبز شناسایی شده است که عبارتند از: اپی‌گالوکاتچین‌گالات (Epigallocatechin gallate-EGCG)، اپی‌کاتچین‌گالات (ECGEpicatechin gallate-)، اپی‌گالوکاتچین (EGCEpigallocatechin-) و اپی‌کاتچین (Epicatechin-EC) (۱۲).

اپی‌گالوکاتچین‌گالات یک ترکیب اصلی پلی‌فنولی چای سبز است که خاصیت آنتی‌اکسیدانی، ضد سرطان و ضد موتاژن دارد (۱۳). بررسی‌های بیولوژی و اپیدمیولوژی در ده سال اخیر نشان داده که اپی-گالوکاتچین‌گالات می‌تواند بازدارنده رشد تومور در سینه، ریه، کبد، لوزالمعده، معده، پانکراس، پوست،

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2024-12-27]

مثانه و پروستات باشد (۱۴). اپی‌گالوکاتچین‌گالات مهار کننده کموتریپسین، فاکتور التهابی نکروزدهنده تومور آلفا (Tumour Necrosis Factor α -TNF-α)، گلوکز ۶ فسفاتاز کبدی و لیپیدپراکسیداز می‌باشد (۱۵). مطالعات اپیدمیولوژیک صورت گرفته نشان داده است که غلظت ماده معدنی استخوان (BMD-Bone Marrow Density) در زنان یائسه که عادت به نوشیدن چای سبز دارند بیشتر از زنانی است که چای سبز نمی‌خورند (۱۶). پوکی استخوان بیماری پیچیده‌ای است که به وسیله ژنتیک و فاکتورهای محیطی مانند رژیم غذایی و شیوه زندگی تحت تأثیر قرار می‌گیرد (۱۷). طبق مطالعه صورت گرفته مشخص شده است که اپی‌گالوکاتچین‌گالات باعث تحریک مرگ سلولی در استئوکلاست و مانع از شکل‌گیری آن در محیط کشت سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان نیز می‌شود. براساس این مطالعه می‌توان چنین برداشت کرد که احتمالا اپی‌گالوکاتچین‌گالات می‌تواند وضعیت پوکی استخوان را نیز بهبود بخشد و به‌عنوان دارویی موثر در بهبود استئوپروزیس به‌کار رود (۱۶).

لذا، با توجه به کاربردهای گسترده اپی‌گالوکاتچین‌گالات و ورود آن به زنجیره غذایی و از سوی دیگر با توجه به پتانسیل بالای سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان در تمایز و توان تکثیر طولانی‌مدت و همچنین نقش آن‌ها در ترمیم و بازسازی استخوان، این مطالعه با هدف بررسی اثر آنتی‌اکسیدانتی اپی‌گالوکاتچین‌گالات بر توانایی زیستی، تمایز استئوژنیک و تغییرات مورفولوژیک سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان موش صحرایی به‌عنوان یک مدل آزمایشگاهی طراحی شد.

روش کار

جداسازی و کشت سلول‌های مغز استخوان: پس از کسب مجوز از کمیته اخلاق دانشگاه اراک و رعایت اصول اخلاقی، موش‌های صحرایی نژاد ویستار به کمک دی‌اتیل‌اتر بیهوش شده، استخوان‌های ران و ساق پای آن‌ها جدا و سپس بافت‌های پیوندی اطراف استخوان‌ها به طور کامل پاک گردید. استخوان‌ها در محیط کشت کامل (DMEM حاوی ۱۵٪ سرم FBS) در دمای ۴ درجه سانتی گراد قرار گرفته، به زیر هود لامینار منتقل شد. دو سر استخوان با قیچی استریل قطع و مغز استخوان با عمل فلاشینگ خارج و به داخل لوله فالکون حاوی محیط کشت کامل هدایت و سپس به مدت ۵ دقیقه در ۱۲۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد. محیط رویی خارج و رسوب سلولی در یک میلی‌لیتر محیط تازه معلق گردید و در فلاسک T25 کشت و در انکوباتور CO_2 دار (دمای ۳۷ درجه سانتی گراد، ۵٪ CO_2) آنکوبه گردید. بعد از ۲۴ ساعت محیط رویی که دارای سلول‌های غیر چسبنده بود، خارج شده و شستشوی سلول‌ها با PBS^- انجام گردید. سپس به مدت ۱۴ روز هر سه روز یک بار محیط سلول‌ها تعویض گردید. زمانی که کف فلاسک به تراکم بالایی از سلول رسید، سلول‌ها با کمک Trypsin/EDTA (کلیه مواد مورد استفاده در این تحقیق از شرکت Sigma – Aldrich تهیه شده است مگر در موارد ذکر شده) از کف فلاسک جدا و به فلاسک‌های جدید منتقل شدند. برای به دست آوردن خلوص بالایی از این سلول‌ها سه مرحله پاساژ تکرار شد. سلول‌های پاساژ سوم به تعداد ۵×۱۰^۳ سلول در هر خانه‌ی پلیت ۲۴ خانه‌ای در حضور غلظت‌های مختلف اپی‌گالوکاتچین‌گالات شامل صفر، ۱، ۵، ۱۰، ۱۵، ۲۰، ۲۵، ۳۰ و ۵۰ میکرومولار در محیط استئوژنیک (محیط DMEM حاوی ۱۵٪ سرم گاوی، ۱۰ میلی‌مولار بتاگلیسرول‌فسفات، ۱۰ نانومولار دگزامتازون و ۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر آسکوربیک ۳ فسفات) به مدت ۲۱ روز تیمار شد.

ارزیابی قدرت زیستی سلول‌ها با روش MTT: در آزمون متیل‌تیازول‌تترازولیوم (MTT) فعالیت آنزیم دهیدروژناز میتوکندری سلولی و نهایتاً میزان احیای نمک تترازولیوم که شاخصی از رشد و بقای سلولی است مورد بررسی قرار می‌گیرد. برای انجام این آزمون لول‌های تیمار شده با اپی‌گالوکاتچین‌گالات پس از ۲۱ روز دو بار با PBS^- شستشو داده شده و به آن ها محیط کشت حاوی MTT در تاریکی اضافه گردید و به مدت ۳ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتیگراد، انکوبه شد. پس از آن محیط رویی به آرامی حذف گردیده و به کریستال‌های فورمازان حاصل، محصول DMSO اضافه شد و جذب نوری محلول حاصله با دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۵۵۰ نانومتر قرائت شد. لازم به ذکر است که هر آزمایش سه بار تکرار گردید.

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2024-12-27]

اندازه‌گیری میزان معدنی شدن ماتریکس استخوانی: سلول‌های پاساژ سوم به تعداد ۵×۱۰۳ سلول در هر خانه‌ی پلیت ۲۴ خانه ای به مدت ۲۴ ساعت کشت و پس از چسبیدن این سلول‌ها به کف در حضور گروه‌کنترل (محیط استئوژنیک: محیط DMEM (Dulbeccos modified eagle medium) حاوی ۱۰٪ سرم گاوی، ۱۰ میلی مولار بتاگلیسرول فسفات، ۱۰ نانومولار دگزامتازون و ۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر آسکوربیک ۳-فسفات) و غلظت‌های مختلف اپی-گالوکاتچین‌گالات (۰، ۱، ۵، ۱۰، ۱۵، ۲۰، ۲۵، ۳۰ و ۵۰ میکرومولار) (تهیه شده از شرکت Sigma-Aldrich) در محیط استئوژنیک کشت شد. پس از ۲۱ روز، میزان معدنی شدن ماتریکس استخوانی سلول‌ها با روش کمی و کیفی آلیزارین‌رد ارزیابی گردید. برای انجام این روش محیط کشت رویی برداشته و سلول‌ها با فرمالین ۱۰٪ فیکس شد و سپس با محلول رنگی آلیزارین‌رد (Sigma, St. Louis, MO, USA) رنگ‌آمیزی شد. سلول‌ها با آب مقطر شستشو و سپس اسید استیک ۱۰٪ به سلول‌ها افزوده و بدین ترتیب رنگ قرمز آلیزارین‌رد از ماتریکس استخوانی استخراج شد و با استفاده از میکروسکوپ نوری عکس‌برداری نمونه‌ها انجام شد. در پایان جذب محلول‌های قرمز رنگ حاصل در طول موج ۴۰۵ نانومتر با دستگاه اسپکتروفوتومتر (PGplus-Germany) ثبت شد.

استخراج RNA و آنالیز RT-PCR: کشت سلولی و جداسازی RNA: در این مرحله سلول‌ها به تعداد ۵×۱۰^{۲} در فلاسک‌های T شکل۲۵ سانتی متر مربع کشت و به مدت ۲۱ روز با محیط استئوژنیک و غلظت ۲۵۰ نانومولار بیسفنول A کشت و تیمار شدند و سپس با کمک اسکالپر، سلول‌ها از کف فلاسک تراشیده و به اپندورف منتقل گردیدند. سلول‌ها در ازت مایع به فریزر ۸۰- درجه سانتی‌گراد انتقال یافتند. جهت جداسازی RNA از این سلول‌ها از کیت RNeasy mini kit (Qiagen) و برطبق دستوالعمل کارخانه سازنده استفاده شد و به منظور سنجش میزان RNA استخراج شده از دستگاه اسپکتروفتومتر استفاده گردید و پس از صفر کردن دستگاه توسط آب دیونیزه به عنوان blank، ۳ میکرولیتر از نمونه با ۹۷ میکرولیتر آب دیونیزه رقیق و پس از وارد کردن ضریب رقت، مقدار RNA استخراج شده و همچنین نسبت بین جذب در طولموج های ۲۶۰ و ۲۸۰ ثبت گردید. تمامی مراحل در زیر هود لامینار صورت گرفت.

سنتز c-DNA (Reverse transcription reaction): ابتدا ۲ میکرولیتر از عصاره سلولی حاوی RNA (با غلظت ۰/۵ میکروگرم بر میکرو لیتر) برداشته شد. به هرکدام از اپندورف‌ها ۱ میکرولیتر پرایمر oligo dT_{18} اضافه و حدود ۳-۵ ثانیه نمونه را ورتکس شد. سپس نمونه‌ها به مدت ۵ دقیقه در ۷۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد و پس از آن روی یخ نگه داشته شد. در ادامه ۴ میکرولیتر 5x reaction buffer، ۱ میکرولیتر مهارکننده RNase RiboLock (20u/µl) ، ۱ میکرولیتر از مخلوط dNTP به نمونه‌ها اضافه شد. پس از یک ورتکس کوتاه، ۲ میکرولیتر آنزیم رونویسی معکوس M-MuLV (20u/µl) به اپندورف‌ها اضافه و به مدت ۵ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داشته شد و جهت متوقف کردن واکنش، نمونه‌ها در دمای ۷۰ درجه سانتی گراد انکوبه شد. در پایان نیز اپندورف‌ها در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

واکنش زنجیره پلی‌مراز (PCR) : واکنش RT-PCR در حجم ۲۵ میکرولیتر و با دمای آنیلینگ برابر با ۵۸ درجه سانتی‌گراد، در ۳۵ سیکل صورت گرفت و از ژن GAPDH (Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase) به عنوان کنترل داخلی استفاده شد. توالی پرایمر ژن های مورد نظر در جدول ۱ آورده شده است.

بررسی میزان کلسیم داخل سلولی: کلسیم با کرزول‌فتالئین ایجاد کمپلکسی می‌نماید که در محیط قلیایی، ارغوانی رنگ است و شدت رنگ حاصله متناسب با غلظت کلسیم می‌باشد. در این سنجش از کیت کلسیم شرکت درمان کاو استفاده گردید. سلول‌های بنیادی مزانشیمی پس از پاساژ سوم در پلیت‌های ۲۴ خانه قرار گرفتند و تیمار سلول‌ها با دوزهای مختلف اپی‌گالوکاتچین‌گالات انجام شد. سلول‌ها در گروه‌های جداگانه پس از شستشو با PBS^{-} به کمک اسکراپر و ۵۰ میکرولیتر بافر استخراج کلسیم(Hcl ۰/۶ نرمال) از کف پلیت جدا شدند و به اپندورف منتقل شدند. پس از طی مدت زمان ۲۴ ساعت در دمای ۴ درجه سانتی گراد، به تعداد نمونه‌ها و همچنین نمونه شاهد، ویال

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2024-12-27]

جدول ۱- توالی پرایمرهای استفاده شده در این مطالعه

ژن	Primer sequences (5′-3′) توالی پرایمرها		اندازه محصول (bp)
GAPDH	Forward Reverse	TGATTCTACCCACGGCAAGTT TGATGGGTTTCCCATTGATGA	162 bp
Alkaline Phophatase (ALP)	Forward Reverse	CAGTGGGACGACCACGAGGT GAGGCCGATCGGCATGTCG	150 bp
Osteocalcin	Forward Reverse	CGCCTGGGTCTCTTCACTAC CTCACACTCCTCGCCCTATT	143 bp

محلول بافر انتخاب گردید و به همه ویال‌های مورد نظر ۱۰۰ میکرولیتر محلول رنگزا اضافه شد. سپس به هر ویال ۳۰ میکرولیتر از نمونه سلولی اضافه گردید و جذب توسط دستگاه اسپکتروفتومتر T80+ PG instrument (England، Ltd) در طول موج ۵۷۵ نانومتر اندازه‌گیری شد.

بررسی میزان فعالیت آنزیم آلکالین‌فسفاتاز: جهت بررسی میزان فعالیت آلکالین‌فسفاتاز از کیت شرکت درمان کاو استفاده گردید. این کیت حاوی محلول بافر، ویال‌های سوبسترا، سود سه نرمال و محلول ذخیره استاندارد می‌باشد. به تعداد ۵۰۰۰ سلول در پایان پاساژ سوم در هر خانه پلیت ۲۴ خانه‌ای کشت داده شدند و تیمار سلول‌ها با دوزهای مختلف اپی‌گالوکاتچین‌گالات در محیط استئوژنیک انجام گرفت. پس از پایان تیمار سلول‌ها ۲ بار با PBS^- شسته و به کمک اسکراپر و بافر استخراج آلکالین‌فسفاتاز از کف پلیت جدا شدند. نمونه‌ها به اپندورف انتقال یافت. در زمان انجام آزمون روش لاوری به منظور تعیین مقادیر پروتئین انجام گرفت و ۵۰۰ میکرولیتر از محلول بافر – سوبسترا اضافه شد و به مدت ۵ دقیقه در بن ماری ۳۷ درجه سانتی گراد قرار گرفت. در مرحله بعد حجم‌های محاسبه شده از نمونه‌ها، به لوله‌های آزمایش اضافه گردیده و به مدت ۳۰ دقیقه در بن ماری ۳۷ درجه سانتی گراد قرار گرفت. پس از آن به هر لوله، ۵ میلی لیتر از سود ۰/۰۲ نرمال افزوده شده و پس از مخلوط نمودن، جذب لوله نمونه‌ها در مقابل لوله بلانک در طول موج ۴۱۰ نانومتر خوانده شد.

بررسی مورفولوژی سلول‌ها: پس از کشت و تیمار ۲۱ روزه سلول‌ها با دوز صفر، ۱۰ و ۵۰ میکرومولار اپی-گالوکاتچین‌گالات به همراه محیط استئوژنیک رنگ-آمیزی کروماتین با هوخست (۱ میکروگرم بر میلی لیتر) جهت بررسی مورفولوژی هسته و همچنین برای بررسی تغییرات رخ داده در مورفولوژی سیتوپلاسم از رنگ فلورسنس آکریدین اورانژ (۰/۰۱ گرم بر میلی لیتر) استفاده شد. سپس جهت بررسی مورفولوژی سلول‌ها از میکروسکوپ فلورسانس(Olympus IX70) استفاده گردید.

آنالیز داده‌ها: با استفاده از نرم افزار SPSS، از روش آماری آنالیز واریانس یک طرفه، آزمون Tukey استفاده شد و تفاوت میانگین‌ها در سطح $P<0/05$ معنی‌دار در نظر گرفته شد.

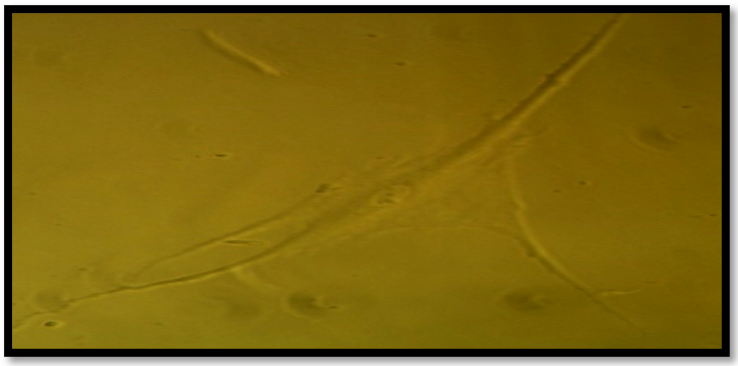
یافته‌ها

کشت سلول: سلول‌های مغز استخوان در طی کشت اغلب ظاهر فیبروبلاستی داشتند و این مورفولوژی را در طی پاساژها حفظ کردند (شکل ۱).

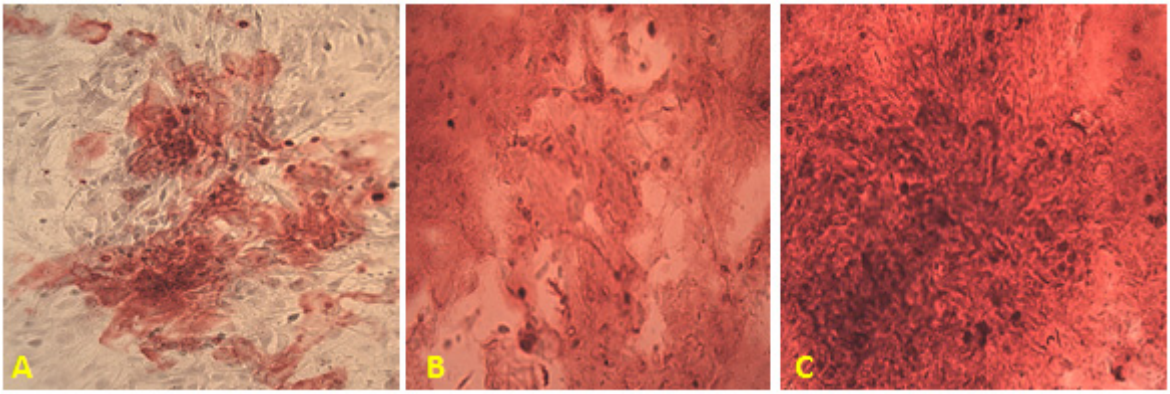
توانایی زیستی سلول‌های بنیادی مزانشیمی بر پایه روش MTT (رنگ‌سنجی): آنالیز واریانس یک‌طرفه داده‌های به دست آمده از روش رنگ‌آمیزی MTT نشان داد که اثر دوز مصرفی اپی‌گالوکاتچین‌گالات باعث افزایش معنی‌دار توانایی زیستی سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان موش صحرایی طی تمایز استئوژنیک گردید (جدول ۲).

میزان معدنی شدن ماتریکس استخوانی: رنگ‌آمیزی آلیزارین رد ماتریکس استخوانی سلول‌های تیمار شده با دوزهای مختلف اپی‌گالوکاتچین‌گالات نشان داد که رنگ قرمز ایجاد شده در این سلول‌ها نسبت به گروه کنترل دارای افزایش قابل توجهی بود به‌طوریکه شدت

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2024-12-27]



شکل ۱- سلول‌های بنیادی مزانشیمی جدا شده از مغز استخوان موش صحرایی عمدتا مورفولوژی فیبروبلاستی داشتند.



شکل ۲- تشدید میزان معدنی شدن ماتریکس استخوانی در حضور اپی‌گالوکاتچین‌گالات در یک دوره تیمار ۲۱ روزه. A) گروه کنترل. B) گروه تیمار با دوز ۱۰ میکرومولار اپی‌گالوکاتچین‌گالات. C) گروه تیمار با دوز ۵۰ میکرومولار اپی‌گالوکاتچین‌گالات.

این رنگ در گروه سلول‌های تیمار شده با دوز ۵۰ میکرومولار نسبت به گروه کنترل و سایر گروه‌های تیماری دارای افزایش قابل توجهی بود (شکل ۲). علاوه بر این داده‌های حاصل از اندازه‌گیری رنگ استخراج شده از ماتریکس سلول‌های تیمار شده با استفاده از دستگاه ELISA-reader نشان داد که میزان معدنی شدن ماتریکس استخوانی در سلول‌های تیمار شده با دوزهای مختلف اپی‌گالوکاتچین‌گالات نسبت با گروه کنترل دارای تفاوت معنی‌دار بود (جدول ۲).

بررسی رسوب کلسیم به روش وان کوزا (VAN KOSSA): مقایسه تصاویر حاصل از رسوب کلسیم خارج سلولی توسط رنگ‌آمیزی وان‌کوزا پس از ۲۱ روز تیمار با دوزهای مختلف اپی‌گالوکاتچین‌گالات، افزایش میزان رسوب کلسیم را نسبت به گروه کنترل نشان داد. در واقع با استفاده از این تکنیک می‌توان نمک‌های کلسیم (فسفات، کربنات، سولفات و اکسالات) را مشخص کرد، رسوب‌های فسفات کلسیم با این تکنیک به شکل ندول‌های تیره رنگ در می‌آیند (شکل ۳).

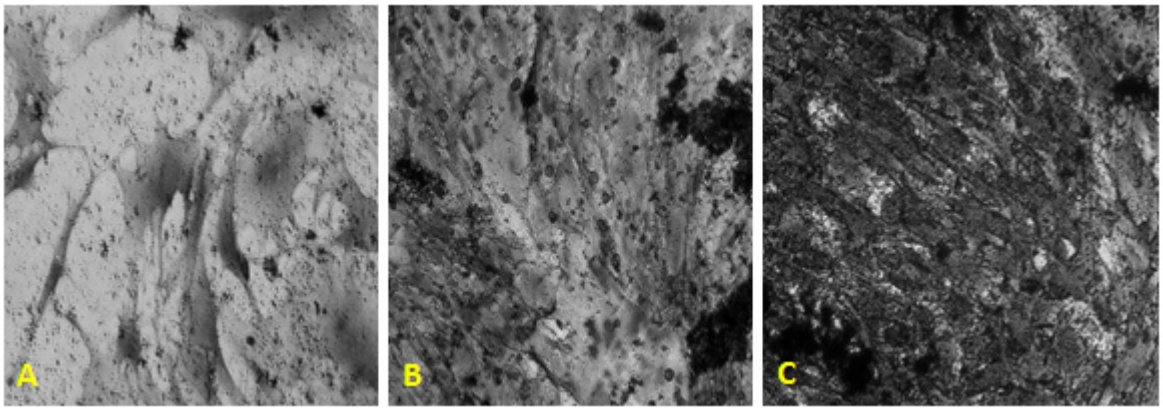
میزان کلسیم داخل سلولی: مقایسه نتایج نشان داد که تیمار سلول‌های مزانشیمی مغز استخوان با دوزهای مختلف اپی‌گالوکاتچین‌گالات در طی روند تمایز استئوژنیک تفاوت معنی‌داری در میزان کلسیم داخل سلولی نسبت به گروه کنترل مشاهده شد. در واقع تیمار سلول‌ها با دوزهای مختلف اپی‌گالوکاتچین‌گالات باعث افزایش معنی‌دار سطح کلسیم داخل سلولی در شرایط وابسته به دوز نسبت به گروه کنترل شد ($P<0/05$) (جدول ۳).

میزان فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز: در این آزمون از پارانیتروفنول فسفات به عنوان سوبسترای آنزیم استفاده می‌شود. پارانیتروفنول فسفات بیرنگ است ولی در حضور آلکالین فسفاتاز و در PH قلیایی به پارانیتروفنوکساید زرد رنگ تبدیل می‌شود و شدت رنگ حاصل با فعالیت آنزیم نسبت مستقیم دارد. مقایسه نتایج این آزمون نشان داد که تیمار سلول‌های

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2024-12-27]

جدول ۲- مقایسه میانگین تعداد سلول‌های زنده (قابلیت حیات) و میزان معدنی شدن ماتریکس استخوانی سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان موش صحرایی تمایز یافته به استئوبلاست پس از تیمار با دوزهای مختلف اپی‌گالوکاتچین‌گالات در مدت زمان ۲۱ روز با روش متیل تترازولیوم و رنگ‌آمیزی آلیزارین رد. مقادیر به صورت میانگین (انحراف معیار) می‌باشد. میانگین‌ها با کدهای حرف‌های متفاوت نامگذاری شده‌اند دارای تفاوت معنی‌دار می‌باشند (one way ANOVA Tukeys Test P<0.05) (آزمون توکی-آنالیز واریانس یک‌طرفه. P< ۰/۰۵).

آزمون دوز (میکرومولار)	میزان معدنی شدن ماتریکس استخوانی برحسب غلظت آلیزارین‌رد (میلی‌مولار)	تعداد سلول‌های زنده (×۱۰۰۰)
۰	۴۰۴/۲^{f}(۲۰/۲)	۱۷۱/۴۵^{i}(۷/۵)
۱	۴۳۲/۵^{ef}(۲۹/۵)	۲۱۷/۹۱^{h}(۳/۷)
۵	۴۹۴/۲^{e}(۱۸/۸)	۲۴۹/۱۶^{g}(۹/۷)
۱۰	۶۱۴/۲^{d}(۲۱/۸)	۳۰۵/۰۰^{f}(۹/۱)
۱۵	۶۷۸/۳^{d}(۲۰/۱)	۳۶۱/۴۵^{e}(۷/۶)
۲۰	۸۰۷/۵^{c}(۳۱/۳)	۳۸۵/۲۰^{d}(۵/۱)
۲۵	۸۷۶/۶^{b}(۲۲/۷)	۴۱۶/۶۶^{c}(۷/۱)
۳۰	۹۳۵^{b}(۱۶/۴)	۴۴۲/۲۹^{b}(۵/۳)
۵۰	۱۰۵۸^{a}(۲۲/۷)	۵۵۳/۱۲^{a}(۶/۵)



شکل ۳- رنگ‌آمیزی وان‌کوزا با نیترات نقره در سلول‌های بنیادی مزانشیمی تمایزیافته به استئوبلاست، ۲۱ روز تیمار با اپی‌گالوکاتچین‌گالات. A) گروه کنترل. B) گروه تیمار با دوز ۱۰ میکرومولار اپی‌گالوکاتچین‌گالات. C) گروه تیمار با دوز ۵۰ میکرومولار اپی‌گالوکاتچین‌گالات.

مزانشیمی مغز استخوان با دوزهای مختلف اپی‌گالوکاتچین‌گالات در طی روند تمایز استئوژنیک باعث افزایش معنی‌دار در میزان فعالیت آنزیم آلکالین‌فسفاتاز نسبت به گروه کنترل شد (P< ۰/۰۵) (جدول ۳).

همچنین پس از استخراج RNA از سلول‌های بنیادی مزانشیمی تمایز یافته به استئوبلاست و آنالیز RT-PCR به صورت کیفی، مشاهده شد که اپی‌گالوکاتچین‌گالات علاوه‌بر افزایش میزان فعالیت آنزیم آلکالین‌فسفاتاز، باعث افزایش قابل توجه سطح بیان ژن‌های آلکالین‌فسفاتاز و استئوکلسین که از شاخص‌های مهم تمایز استئوژنیک هستند، نیز می‌شود. این نتایج موید نقش مثبت اپی‌گالوکاتچین‌گالات در پیش‌برد روندتمایز استئوژنیک می‌باشد (شکل ۴).

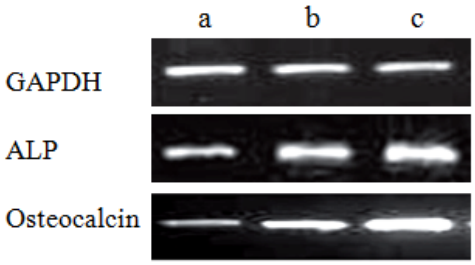
بررسی مورفولوژی سلول‌ها: پس از رنگ‌آمیزی با رنگ فلورسنت هوخست، هسته‌ها به رنگ آبی درآمدند. تیمار سلول‌های بنیادی مزانشیمی با دوزهای مختلف اپی‌گالوکاتچین‌گالات در طی روند تمایز ۲۱ روزه نشان داد که اپی‌گالوکاتچین‌گالات باعث افزایش قطر هسته‌های سلول‌های بنیادی مزانشیمی نسبت به گروه کنترل شد (شکل ۵).

رنگ‌آمیزی آکریدین اورانژ تغییرات رخ داده در سیتوپلاسم و موقعیت هسته و سیتوپلاسم را نسبت به هم نشان داد. طبق نتایج حاصل در گروه‌های کنترل، شکل سیتوپلاسم چندوجهی و زوائد سلولی قابل تشخیص بود و هسته‌ها در موقعیت مرکزی نسبت به سیتوپلاسم قرار داشتند. در گروه‌های تیمار با اپی‌گالوکاتچین‌گالات در طی روند تمایز سلول‌های

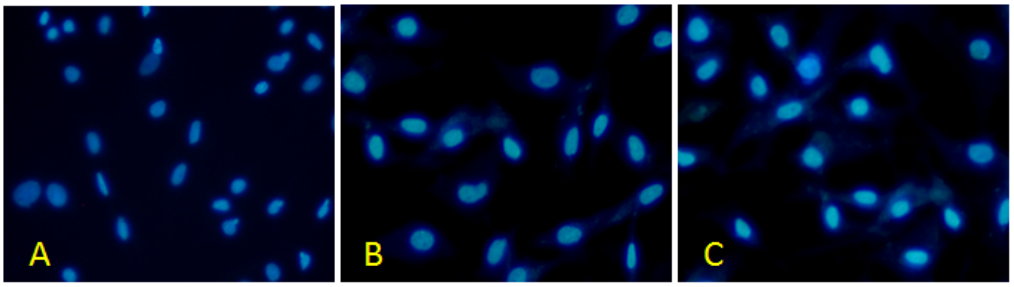
[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2024-12-27]

جدول ۳- مقایسه میانگین میزان کلسیم (میلی‌گرم بر دسی‌لیتر) و میانگین میزان فعالیت آنزیم آلکالین‌فسفاتاز در نمونه‌های استئوژنیک تیمار شده با اپی‌گالوکاتچین‌گالات با گروه کنترل در ۲۱ روز. مقادیر به صورت means±sd می‌باشد. میانگین‌های با کد حرف‌های متفاوت دارای تفاوت معنی‌دار می‌باشد (one way ANOVA,Tukey's test $p<0.05$).

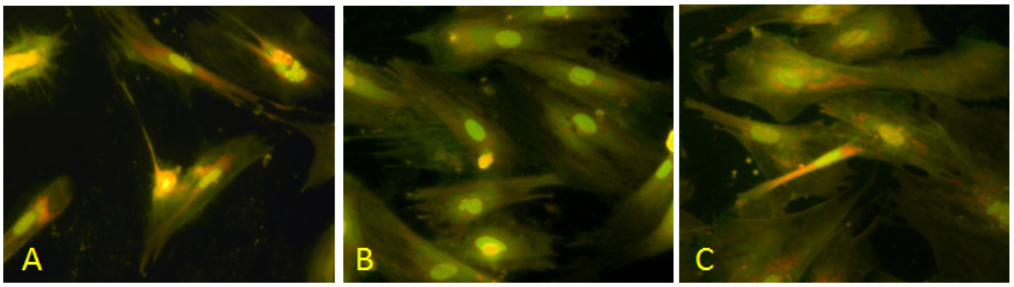
دوز	زمان	میزان فعالیت آنزیم آلکالین‌فسفاتاز (واحد بر لیتر)	میزان کلسیم (میلی گرم بر دسی لیتر)
۰		۶۳/۲۵^{h}(۲/۲)	۳۸/۳^{g}(۰/۷)
۱		۶۷/۱۷^{gh}(۰/۹)	۳۹/۵^{fg}(۰/۴)
۵		۷۱/۷۴^{fg}(۱/۲)	۴۱/۲^{f}(۰/۵)
۱۰		۷۷/۰۶^{ef}(۱/۱)	۴۵/۳^{e}(۰/۵)
۱۵		۸۱/۸۸^{de}(۱/۲)	۴۷/۴^{de}(۱/۱)
۲۰		۸۶/۷۰^{cd}(۱/۳)	۴۹/۸^{cd}(۰/۸)
۲۵		۹۰/۸۷^{bc}(۱/۸)	۵۲/۱^{bc}(۱/۱)
۳۰		۹۶/۱۰^{b}(۱/۷)	۵۴/۷^{b}(۱/۳)
۵۰		۱۰۶/۸۱^{a}(۳/۸)	۶۱/۱^{a}(۱/۶)



شکل ۴- بررسی سطح بیان پروتئین‌های استئوکلسین و آلکالین فسفاتاز در سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان موش صحرایی پس از تیمار با اپی‌گالوکاتچین‌گالات و با کمک آنالیز RT-PCR . a) گروه کنترل. b) گروه تیمار با دوز ۱۰ میکرومولار اپی‌گالوکاتچین‌گالات. c) گروه تیمار با دوز ۵۰ میکرومولار اپی‌گالوکاتچین‌گالات.



شکل ۵- رنگ آمیزی فلورسنت هوخست در سلول‌های بنیادی مزانشیمی تمایز یافته به استئوبلاست پس از ۲۱ روز تیمار با اپی‌گالوکاتچین‌گالات. A) گروه کنترل. B) گروه تیمار با دوز ۱۰ میکرومولار اپی‌گالوکاتچین‌گالات. C) گروه تیمار با دوز ۵۰ میکرومولار اپی‌گالوکاتچین‌گالات.



شکل ۶- رنگ آمیزی فلورسنت آکریدین اورانژ در سلول‌های بنیادی مزانشیمی تمایز یافته به استئوبلاست پس از ۲۱ روز تیمار با اپی‌گالوکاتچین-گالات. A) گروه کنترل. B) گروه تیمار با دوز ۱۰ میکرومولار اپی‌گالوکاتچین‌گالات. C) گروه تیمار با دوز ۵۰ میکرومولار اپی‌گالوکاتچین‌گالات.

بنیادی مزانشیمی به استئوبلاست، شکل سیتوپلاسم تغییر کرده و سیتوپلاسم دارای زوائد بزرگ تر و پهن‌تر و هسته‌ها نسبت به گروه کنترل بزرگ‌تر بود (شکل ۶).

بحث و نتیجه‌گیری

در مطالعه حاضر اپی‌گالوکاتچین‌گالات در رفتاری وابسته به دوز، باعث افزایش توانایی زیستی و میزان

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2024-12-27]

معدنی شدن ماتریکس استخوانی در سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان موش صحرایی گردید. این یافته‌ها در راستای نتایج تحقیقات دیگر محققین نیز می‌باشد. به‌عنوان مثال یی و همکاران در سال ۲۰۱۱ نشان دادند که ۱۰ میکرومولار اپی‌گالوکاتچین‌گالات باعث افزایش تکثیر سلولی در سلول‌های فیبروبلاست می‌شود (۱۸). همچنین کوستا و همکاران نیز درسال ۲۰۰۷ نشان دادند که دوز ۳۰ میکرومولار اپی‌گالوکاتچین‌گالات بر روی سلول‌های کلیه باعث افزایش توانایی زیستی و تکثیر سلولی در این سلول‌ها می‌شود (۱۹).

اپی‌گالوکاتچین‌گالات یکی از پلی‌فنول‌های موجود در چای سبز است که سبب مهار تشکیل رادیکال‌های آزاد اکسیژن (Reactive Oxygen Species-ROS) در میتوکندری سلول می‌گردد. در ساختار اپی‌گالوکاتچین‌گالات سه حلقه‌ی فنول دیده می‌شود که گروه‌های هیدروکسیل این حلقه‌ها، باعث احیاء رادیکال‌های آزاد و غیرفعال سازی آن ها می‌گردد. در حقیقت اپی‌گالوکاتچین‌گالات با اهدای هیدروژن فنولیک خود، باعث شکستن زنجیره رادیکال‌های آزاد شده و پراکسیداسیون لیپیدهای سلول و فسفولیپیدهای غشا را به حداقل می‌رساند و بدین طریق توانایی حیات و بقای سلولی را افزایش می‌دهد (۹).

علاوه بر این اپی‌گالوکاتچین‌گالات با خاصیت آنتی‌اکسیدانتی خود و با برقراری تعادل در قابلیت نفوذپذیری انتخابی غشای سلول‌ها، باعث ورود کلسیم و فعال شدن کانال‌های کلسیمی در سلول می‌شود و به برقراری و حفظ همئوستاز کلسیم و در نتیجه تعادل سلولی کمک می‌کند; چرا که کاهش یا فقدان کلسیم در سلول باعث مهار پمپ‌های سدیم-پتاسیمی وابسته به کلسیم می‌گیرد و سلول را در مسیر مرگ سلولی برنامه‌ریزی شده قرار می‌دهد. از سوی دیگر کلسیم برای تشکیل بلورهای هیدروکسی آپاتیت، که بخش عمده ماتریکس معدنی شده‌ی سلول استخوانی را تشکیل می‌دهد، لازم و ضروری است، بنابراین اپی-گالوکاتچین‌گالات با افزایش ورود کلسیم به سلول به معدنی شدن ماتریکس و القای تمایز استئوژنیک در سلول کمک می‌کند (۲۰).

در مطالعه حاضر نیز اپی‌گالوکاتچین‌گالات باعث افزایش سطح کلسیم داخل سلولی، رسوبات فسفات کلسیمی ماتریکس خارج سلولی و القای تمایز استئوژنیک در سلول‌های بنیادی مزانشیم مغز استخوان گردید. از دیگر یافته‌های این پژوهش افزایش میزان فعالیت آنزیم آلکالین‌فسفاتاز و همچنین افزایش سطح بیان ژن آلکالین‌فسفاتاز در سلول‌های تیمار شده با اپی-گالوکاتچین‌گالات، در مسیر القای تمایز استئوژنیک بود; که این یافته در راستای نتایج تحقیقات ین لین و همکاران می‌باشد. ایشان اثر اپی‌گالوکاتچین‌گالات را بر سطح بیان ژن‌های دخیل در فرآیند استئوژنزیس در سلول‌های بنیادی مزانشیمی مورد بررسی قرار دادند و مشاهده کردند که این ترکیب آنتی‌اکسیدانتی باعث افزایش معنی‌دار سطح بیان این ژن‌ها می‌شود (۲۱).

در این پژوهش علاوه بر آلکالین‌فسفاتاز، سطح بیان ژن استئوکلسین نیز مورد بررسی قرار گرفت. استئوکلسین در تمایز استئوژنیک نقش دارد و برای معدنی شدن بافت استخوان ضروری است. آلکالین فسفاتاز و استئوکلسین نقش مهمی در میزان معدنی شدن ماتریکس استخوانی سلول‌ها و تشکیل استخوان دارند، بنابراین می‌توان سطح بیان آن‌ها، میزان فعالیت آلکالین‌فسفاتاز و همچنین میزان رسوب کلسیم را یکی از مهم‌ترین شاخص‌های تمایز استئوژنیک دانست. آنزیم آلکالین فسفاتاز از طریق آماده کردن یون‌های فسفات در جایگاه‌های معدنی شدن، نقش مهمی ایفا می‌کند. علاوه بر این آلکالین فسفاتاز دفسفریله شدن فسفوپروتئین‌های متصل به انتهای کلاژن را بر عهده دارد و در تجزیه پیروفسفات و رشد کریستال‌های هیدروکسی آپاتیت نقش دارد (۲۲).

ژن‌های استئوکلسین و آلکالین‌فسفاتاز به‌واسطه‌ی پروتئین Runx-2 بیان می‌شوند و از طبق مطالعات صورت گرفته اپی‌گالوکاتچین‌گالات باعث افزایش سطح بیان ژن Runx-2، می‌گردد (۲۱). اپی‌گالوکاتچین‌گالات باعث افزایش سطح بیان ژن‌های BMP2، MMP2 و MSX2 می‌شود که برای حفظ شبکه استخوانی و معدنی شدن ماتریکس استخوان ضروری هستند. همچنین این ترکیب آنتی‌اکسیدانتی باعث افزایش سطح بیان FGFR می‌شود و از این طریق موجب افزایش بیان ژن‌های مرتبط با تمایز استئوژنیک نظیر

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2024-12-27]

BMP2، Runx2 و کلاژن در سطح رونویسی و ترجمه می‌گردد (۲۳). بنابراین اپی‌گالوکاتچین‌گالات به‌طور غیرمستقیم با افزایش سطح بیان ژن‌های Runx-2 و FGFR باعث افزایش بیان ژن‌های استئوکلسین و آلکالین فسفاتاز، افزایش میزان فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز و همچنین میزان رسوب کلسیم در ماتریکس خارج سلولی می‌شود (۲۱).

از طرف دیگر بر طبق نتایج حاصل از این مطالعه، اپی‌گالوکاتچین‌گالات در سلول‌های بنیادی مزانشیم مغز استخوان، باعث ایجاد تغییرات مورفولوژیکی در راستای تمایز استئوژنیک گردید. نتایج رنگ آمیزی هوخست نشان داد که اپی‌گالوکاتچین‌گالات با تأثیری که بر روی هسته‌های سلول‌های بنیادی مزانشیمی می‌گذارد باعث افزایش قطر هسته‌ها در این سلول‌ها می‌شود. نتایج رنگ آمیزی آکریدین اورنژ نیز نشان داد که ناحیه سیتوپلاسم که در سلول‌های بنیادی مزانشیم حالت دوکی شکل یا چند وجهی داشت در سلول‌های تمایز یافته گرد شده بود و هسته سلول از حالت مرکزی در سلول‌های بنیادی مزانشیم در سلول‌های استئوبلاست در گوشه‌ای از سلول قرار گرفته بود. از آنجاکه اپی-گالوکاتچین‌گالات یک آنتی اکسیدانت قوی است و آنتی‌اکسیدانت‌ها نیز باعث مهار پراکسیداسیون لیپیدی و تخریب پروتئین‌های سایتواسکلتون مثل اکتین می‌گردند، بنابراین اپی‌گالوکاتچین‌گالات نیز می‌تواند باعث کاهش آسیب‌های مورفولوژیکی در سلول‌ها شود (۲۴) و احتمال می‌رود که این ترکیب پلی‌فنولی نیز از طریق افزایش میزان سنتز پروتئین اکتین، توانسته سبب گسترش سیتوپلاسم، کاهش زوائد چندوجهی سلول و خارج کردن هسته از موقعیت مرکزی خود گردد که به‌عنوان تغییرات مورفولوژیکی در راستای تمایز استئوژنیک در سلول‌های بنیادی مزانشیمی شناخته می‌شود، گردیده است (۲۵).

با توجه به نتایج حاصل از این تحقیق مشخص شد که اپی‌گالوکاتچین‌گالات ضمن افزایش توانایی زیستی و تکثیر سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان موش صحرایی، موجب افزایش معنی‌دار میزان معدنی شدن ماتریکس استخوانی این سلول‌ها در محیط استئوژنیک نیز گردید. بنابراین می‌توان از این آنتی اکسیدانت ارزشمند در مهار مرگ سلولی، افزایش تکثیر و بقای سلولی و در نتیجه در فناوری‌های پیشرفته سلول درمانی و مهندسی بافت استفاده کرد.

References

1. Romanov YA, Darevskaya AN, Merzlikina NV, Buravkova LB. Mesenchymal stem cells from human bone marrow and adipose tissue: isolation, characterization, and differentiation potentialities. Bull Exp Biol Med. 2005;140:138-43.
2. Barry F, Murphy JM. Mesenchymal stem cells: clinical application and biological characterization. Cell Biol. 2004;36:568-84.
3. Schwartz L, Maitournam H, Stolz JM, Ho Ba Tho MC, Halphen B. Growth and cellular differentiation: a physicobiochemical conundrum? The example of the hand. Med Hypotheses. 2003;61:45-51.
4. Armesilla-Diaz A, Elvira G, Silva A. Regulates the proliferation differentiation and spontaneous transform of mesenchymal stem cells. Exp Cell Res. 2009;13:4-7.
5. Sethe S, Scutt A, Stolzing A. Aging of mesenchymal stem cells. Ageing Res Rev 2006;5:91-116.
6. Thomas D, Kansara M. Epigenetic modifications in osteogenic differentiation and transformation. J Cell Biochem. 2006;98(4):757-69.
7. Bedrood Z, Rameshrad M, Hosseinzadeh H. Toxicological effects of Camellia sinensis (green tea): A review. Phytother Res. 2018 Jul;32(7):1163-80.
8. Young SR, Dyson M. Effect of therapeutic ultrasound on the healing of full-thickness excised skin lesions. Ultrasonics. 1990;28(3):175-80.
9. Bayer J, Gomer A, Demir Y, Amano H, Kish DD, Fairchild R, et al. Effects of green tea polyphenols on murine transplant-reactive T cell immunity. Clin Immunol. 2004;110(1):100-8.
10. Hsu S. Green tea and the skin. J Am Acad Dermatol. 2005;52(6):1049-59.
11. Nie Sh, Xie, Zhihong Fu, Wan Y, Yan A. Study on the purfication and chemicalcompostions of tea glycoprotein. Carbohydrate Polymers. 2009;71(4):626-33.
12. Fujiki H, Suganuma M, Okabe S, Sueoka N, Komori A, Sueoka E, et al. Cancer inhibition by green tea. Mutat Res. 1998;402(1-2):307-10.
13. Khaksari M, Rezvani ME, Sajadi MA. Study of the effect water extract rhazya stricta on skin wound healing. J Semnen Univ Med Sci. 1998;1:1-10.
14. Bitar MS. Insulin-like growth factor-1 reverses diabetes-induced wound healing impairment in rats. Horm Metab Res. 1997;29(8):383-6.
15. 15- Khan N, Mukhtar H. Tea polyphenols for

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2024-12-27]

health promotion. Life Sci. 2007;81(7):519-33.
16. Hegarty VM, Helen MM, Khaw K. Tea drinking and bone mineral density in older women. Am J Clin Nutr. 2000;71:1003-7.
17. Hoover PA, Webber CE, Beaumont LF, Blake JM. Postmenopausal bone mineral density: relationship to calcium intake, calcium absorption, residual estrogen, body composition and physical activity. Can J Physiol Pharmacol. 1996;74:911-7.
18. Lee YJ, Kim SJ, Heo TH. Protective effect of catechin in type I Gaucher disease cells by reducing endoplasmic reticulum stress. Biochem Biophys Res Commun. 2011;413(2):254-8.
19. Costa S, Utan A, Cervellati R, Speroni E, Guerra MC. Catechins: natural free-radical scavengers against ochratoxin A-induced cell damage in a pig kidney cell line (LLC-PK1). Food Chem Toxicol. 2007;45(10):1910-7.
20. Almeida M, Han L, Millan MM, OBRien CA, Manolgas SC. Oxidative stress antagonizes Wnt signaling in osteoblast precursors by diverting catenin from T cell factor to forkhead box O-mediated transcription. J Biol Chem. 2007; 282(37):27298-305.
21. Yen Lin S, L. Kang, C. Zen Wang, H. Hsiang Huang, T. Lin Cheng, et al. Epigallocatechin-3-Gallate (EGCG) enhances osteogenic differentiation of human bone marrow mesenchymal stem cells. Molecules. 2018;23(12):3221.
22. Ducy P, Karsenty G. Two distinct osteoblast-specific cis-acting elements control expression of a mouse osteocalcin gene. Mol Cell Biol. 1995;15:1858-69.
23. Karsenty G, Ducy P, Starbuck M, Priemel M, Shen J, Geoffroy V, et al. Cbfa1 as a regulator of osteoblast differentiation and function. Bone. 1999;25:107-8.
24. Wyllie AH, Kerr JF, Currie AR. Cell death: the significance of apoptosis. Int Rev Cytol. 1990;68:251-306.
25. Abnosi MH, Dehdehi L. Study of morphology and biochemistry of rat bone marrow mesenchymal stem cells before and after osteogenic differentiation: A comparative study. JCT. 2012;3(2):103-111.

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2024-12-27]