

بررسی تاثیر پروژسترون در بیان ژن های P0, S100, Krox20 در سلول های بنیادی برگرفته از بافت چربی در شرایط آزمایشگاهی

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۸۹/۱۱/۱۱ تاریخ پذیرش: ۱۳۸۹/۱۲/۱۵

چکیده

ندا خانلرخانی^۱

محمدعلی اطلسی،^{۱*} ایرج راگردی

کاشانی،^۲ همایون نادریان،^۱

علی اکبر طاهریان،^۱ حسین نیکزاد^۱

۱- مرکز تحقیقات علوم تشریحی، دانشگاه علوم پزشکی کاشان، کاشان، ایران.

۲- گروه آناتومی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران.

* نویسنده مسئول: کاشان، بلوار قطب راوندی، دانشگاه علوم پزشکی کاشان، مرکز تحقیقات علوم تشریحی، کد پستی: ۸۸۱۴۱-۸۷۱۵۹

تلفن: ۰۹۱۳۱۶۱۵۶۰۳
email: atlasima@gmail.com

مقدمه

امروزه گزارش های متعددی درباره به کارگیری سلول های بنیادی (Stem cells) برای درمان بیماران صعبالعلاج منتشر می شود. این امید وجود دارد که روزی بسیاری از بیماری های مهلک انسانی توسط سلول های بنیادی درمان شوند. سلول بنیادی سلولی است که دارای خاصیت خود ترمیمی بوده و قابلیت تمایز به انواع مختلف سلول ها را دارند. به طور ایده آل یک سلول بنیادی مناسب برای کاربردهای درمانی رزرناتیو باید در مقادیر زیاد یافت شود، تهیه و برداشت آن ها باید با کمترین میزان تهاجم همراه باشد، قابلیت تمایز به انواع مختلف سلولی را داشته باشد و به طور مطمئن و کارآمد قابل پیوند به میزبان اتولوگ و آلوژنیک را داشته باشد.^۱ امروزه سلول های بنیادی بافت

زمینه و هدف: سلول های بنیادی برگرفته از بافت چربی قابلیت ترایز زیادی داشته و به رده های مختلف سلولی همچون آدیپوسیت، استئوبلاست، کندروسیت و میوسیت تمایز داده شده اند. با توجه به نقش پروژسترون در میلین سازی سیستم اعصاب محیطی، ما در این مطالعه بر آن شدیم تا تاثیر آن را بر روی بیان ژن های P0, S100, Krox20 در سلول های بنیادی برگرفته از بافت چربی در شرایط آزمایشگاهی مورد بررسی قرار دهیم. **روش بررسی:** در این مطالعه تجربی سلول های بنیادی مزانشیمی گرفته شده از بافت چربی ناحیه اینگوینال موش صحرائی بالغ، جهت تایید با فلوسیتومتری مورد بررسی قرار گرفتند. سپس سلول های بنیادی مزانشیمی ابتدا تحت تاثیر بتا مرکاپتواتانول و سپس رتینویک اسید قرار گرفتند و در ادامه سلول های حاصله در چهار گروه مختلف شامل دو گروه کنترل مثبت و منفی حاوی فاکتورهای رشد بدون پروژسترون و دو گروه آزمایش حاوی فاکتورهای رشد و پروژسترون تقسیم شدند. بیان مارکرهای سلول شوان شامل S100, P0, Krox20 در با استفاده از واکنش زنجیره پلیمرز معکوس نیمه کمی (semi-quantitative PCR) بررسی گردیدند. **یافته ها:** سلول های بنیادی مزانشیمی برگرفته از بافت چربی آنتی ژن های سطحی CD90, CD73 و CD31 را بیان نمودند. در گروه های چهارگانه، ژن های S100, P0, Krox20 در گروه های حاوی پروژسترون بیان شدند. نسبت بیان ژن های S100 و Krox-20 در گروه های حاوی پروژسترون نسبت به گروه کنترل مثبت بدون پروژسترون کمتر بود ($P < 0.0001$). **نتیجه گیری:** پروژسترون به عنوان یک عامل القایی می تواند سبب بیان ژن های S100, P0, Krox20 در سلول های بنیادی چربی شود.

کلمات کلیدی: سلول بنیادی، پروژسترون، سلول شوان، بافت چربی، بیان ژن.

چربی به عنوان موضوعی جدید در بحث سلول های بنیادی مطرح و به عنوان جایگزینی اصلح برای سلول های بنیادی مغز استخوان مطرح شده است.^۲ دسترسی به سلول های بنیادی چربی در مقایسه با سلول های بنیادی مغز استخوان آسان تر، تعداد سلول های بیشتر و در عین حال با عوارض کمتری همراه است.^۳ پروژسترون یک نورواستروئید است، که به وسیله سلول های گلیال در سیستم عصبی مرکزی و محیطی سنتز می شود.^۴ پروژسترون یک حلقه سیگنالی اتوکراین/پاراکراین شکل می دهد که در تنظیم میلین سازی نقش دارد.^۵ گزارش شده است که پروژسترون بر رزرناسیون عصب سیاتیک تاثیر مثبت داشته^۴ و پس از آسیب به عصب سیاتیک تشکیل غلاف میلین جدید را تحریک می کند.^۵ مطالعات نشان داده است که پروژسترون

اتمام سانتریفیوژ مایع رویی دور ریخته شده و سلول‌های ته‌نشین شده (Pellet) موجود در ته لوله از فیلتر ۷۵ میکرومتر عبور داده و مجدداً سوسپانسیون به دست آمده به مدت هفت دقیقه و با سرعت ۱۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد. در این مرحله سلول رسوب یافته (Pellet) در انتهای لوله‌ها پس از تخلیه مایع رویی (Supernatant) با پیپت پاستور پیپتاژ شده و پس از شمارش سلولی، سلول‌های به دست آمده با تراکم $10^5 \times 10^6$ به فلاسک کشت فیلتردار ۷۵ سانتی‌متر مربع (75cm^2) حاوی محیط کشت DMEM/F12، ۱۰٪ سرم جنین گاو (FBS)، ۱۰۰ unit/ml پنی‌سیلین و $100\ \mu\text{g/ml}$ استرپتومایسین منتقل شدند. اولین تعویض محیط ۲۴ ساعت پس از به دست آوردن سلول‌ها انجام شد تا سلول‌های غیر چسبنده جدا گردند. پس از این مرحله محیط‌ها هر چهار روز یک بار تعویض شدند. این مرحله تا افزایش تعداد سلول‌ها ادامه یافت.^{۱۲،۱۳}

تعیین هویت سلول‌ها: برای این منظور سلول‌های بنیادی بافت چربی را بعد از ۳-۵ پاساژ با استفاده از تریپسین ۰/۲٪ از فلاسک کشت جدا نموده و سه بار با PBS شستشو داده شد. سپس آنتی‌بادی‌های همراه با FITC ضد CD31، CD44، CD73، CD45، CD90، VEGFR2 موش صحرایی (Chemicon, CA) به محیط افزوده و به مدت ۴۵ دقیقه و دور از نور خورشید در درجه حرارت اتاق انکوبه شدند. سلول‌های حاصل با استفاده از پارافرمالدیید ۱۰٪ به مدت ۱۵ دقیقه ثابت شده و سپس با PBS شستشو داده شدند. نمونه‌های حاصل با استفاده از فلوسیتومتر (FACScan, Bektom Dickinson, CA) مورد ارزیابی قرار گرفتند.^{۱۴} هم‌چنین مورفولوژی سلول‌ها با میکروسکوپ نوری مورد بررسی قرار گرفتند.

مرحله القای سلول‌های بنیادی: سلول‌های بنیادی برگرفته از بافت چربی پس از سه پاساژ از فلاسک برداشت شده و با تراکم $10^5 \times 10^6$ به پلیت ۱۲ خانه مخصوص کشت منتقل شدند. سپس این سلول‌ها وارد مرحله پیش‌القاه شده و محیط کشت آن‌ها با محیط کشت حاوی $1\ \text{mM}$ بتا-مرکاپتواتانول (BME, Sigma, USA) برای مدت ۲۴ ساعت تعویض شد. سپس محیط سلول‌ها با محیط کشت حاوی $35\ \text{ng/ml}$ اسید رتینویک (RA, Sigma, USA) به مدت ۷۲ ساعت نگهداری و در چهار گروه وارد مرحله القاه شدند: گروه اول (کنترل منفی) حاوی محیط کشت DMEM محتوی سرم جنینی گاوی ده درصد، $10\ \text{ng/ml}$ فاکتور رشد فیبروبلاست (bFGF Gibco, USA)، $5\ \text{ng/ml}$ فاکتور رشد

باعث القای سنتز P0 می‌گردد.^۴ P0 یک پروتیین غشایی است که بخشی از غلاف میلین در نظر گرفته می‌شود. پروژسترون به طور معنی‌داری سطح mRNA پروتیین P0 را در محیط کشت سلول‌های شوان افزایش داده^۷ و فعالیت آن را در این سلول‌ها زیاد می‌کند.^۸ S100 پروتیین سیتوپلاسمی است که در سلول‌های گلیالی سیستم اعصاب محیطی از جمله سلول شوان بیان می‌شود. سلول‌های بیان‌کننده S100 شامل سلول‌های اقماری گانگلیون‌های سمپاتیک و حسی، سلول‌های پشتیبان در مدولای غده فوق کلیوی و سلول‌های شوآن غیر میلین‌ساز می‌باشد.^۹ Krox20 در سلول‌های پیش‌میلین‌ساز بیان شده و بیان آن در طول دوره میلین‌سازی ادامه می‌یابد.^{۱۰} به علت این‌که پروژسترون در روند میلین‌سازی سلول‌های شوان در شرایط In vivo موثر است، احتمالاً بتواند در تمایز سلول‌های بنیادی همچون سلول‌های بنیادی برگرفته از بافت چربی به سلول‌های شبه شوان نقش داشته باشد.^{۱۱} با توجه به این‌که پروتیین‌های P0، S100، Krox20 از مشخصه‌های تمایزی سلول‌های میلین‌ساز شوان می‌باشند و از طرفی عدم وجود شواهد کافی برای نقش پروژسترون در بیان ژن‌های مذکور، در این مطالعه نقش این هورمون را در روند تمایزی سلول‌های بنیادی چربی در شرایط آزمایشگاهی بررسی شد.

روش بررسی

مطالعه حاضر از نوع تجربی بوده و در مرکز تحقیقات علوم تشریحی دانشگاه علوم پزشکی کاشان در سال ۱۳۸۹ انجام گردیده است. تهیه و کشت سلول‌های بنیادی چربی: برای تهیه بافت چربی از چهار سر موش نر صحرایی ۸-۶ هفته‌ای نژاد ویستار استفاده شد. ابتدا موش‌ها را با کلروفورم خالص کشته و سپس با رعایت شرایط استریل چربی ناحیه اینگوینال برداشته و به لوله فالکون ۵۰ میلی‌لیتری حاوی محلول کلاناز $0/5\ \text{mg/ml}$ (Sigma, USA) منتقل گردید. سپس لوله‌ها به مدت ۶۰ دقیقه در انکوباتور 37°C گذاشته شدند. پس از یک ساعت و اطمینان از هضم بافت‌ها جهت خنثی نمودن کلاناز به میزان حجم درون لوله، محیط DMEM/F12 (Gibco, UK) که حاوی ۱۰٪ فسفات بافر سالین (PBS, Invitrogene, UK)، $100\ \text{ui/ml}$ پنی‌سیلین (Penicillin, Sigma, USA) و $100\ \mu\text{g/ml}$ استرپتومایسین (Sterptomycin, Sigma, USA) بود، اضافه شد. سپس لوله‌ها به مدت هفت دقیقه و با سرعت ۱۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شدند. پس از

رویت گشتند. GAPDH به عنوان ژن Housekeeping مورد استفاده قرار گرفت. به منظور تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها از آنالیز واریانس یک طرفه (ANOVA) و جهت مقایسه میانگین‌ها بین گروه‌های مورد مطالعه از تست Tukey استفاده شد. مقدار $P < 0.05$ از لحاظ آماری معنی‌دار در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

کشت و تزیاد سلول‌های بنیادی مزانشیمی: همان‌طور که ذکر شد در این مطالعه محیط کشت سلول‌ها هر سه روز یک بار تعویض شد و سلول‌های غیرچسبنده در طی این تعویض‌ها و نیز در روند پاساژ محیط‌های کشت، از ظروف کشت حذف گردیدند. به طور طبیعی سلول‌های بنیادی برگرفته از بافت چربی در طی ۴-۵ روز به ۸۰-۹۰ درصد تراکم رسیدند. سلول‌های بنیادی مزانشیمی موش در محیط کشت دارای ظاهری دوکی شکل بودند (شکل ۱).

فلوسیتومتری مارکرهای سلول‌های بنیادی: نتایج حاصل از فلوسیتومتری نشان‌دهنده بیان مارکرهای سلول‌های بنیادی بود. مطابق شکل ۲ مارکرهای CD31 و CD73، CD90 در سلول‌های بنیادی بافت چربی مثبت و مارکرهای CD45، VEGFR2 و CD44 منفی بود که نشان دهنده تأیید هویت سلول‌های بنیادی مزانشیمی می‌باشد.

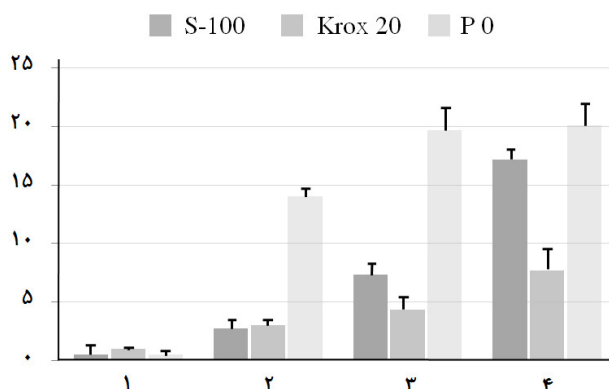
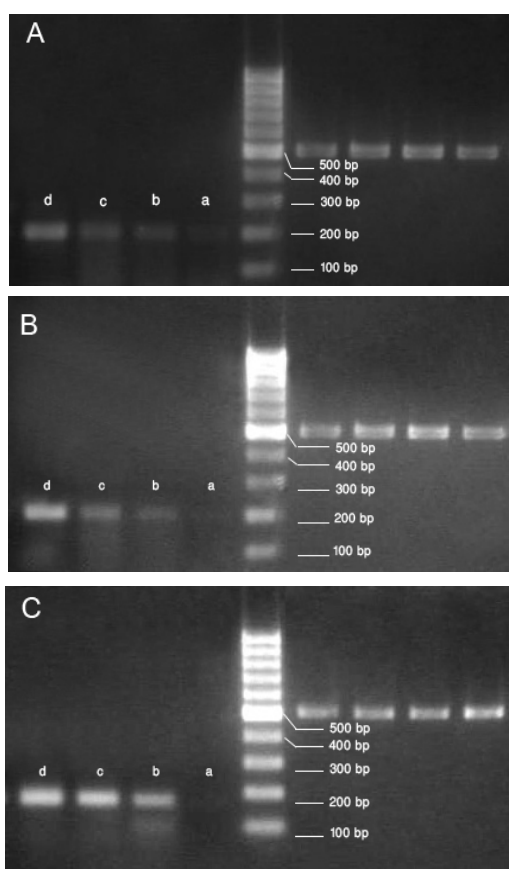
بیان ژن‌ها در گروه‌های مورد مطالعه: پس از پایان مرحله القا سلول‌های القا شده در گروه‌های مختلف جهت بررسی وجود یا عدم وجود و مقایسه نسبی mRNA ژن‌های P0، Krox20، S100 توسط تکنیک Semi-quantitative RT-PCR ارزیابی شدند.

mRNA مربوط به ژن‌های P0، Krox20، S100 در گروه‌های ۲، ۳ و ۴ که تحت محیط القایی قرار گرفته بودند مشاهده شدند. بیان ژن‌های مذکور در این گروه‌ها با درجات متفاوتی صورت گرفت. سلول‌ها در گروه ۱ (کنترل منفی) بیان هیچ‌یک از ژن‌ها را نشان ندادند. نتایج حاصل از Semi-quantitative RT-PCR سلول‌های بنیادی چربی در نمودار ۱ نشان داده شده است. آنالیز آماری نشان داد که اختلاف

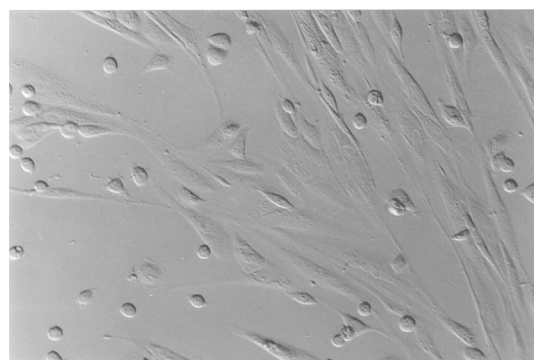
مشتق از پلاکت (PDGF, R&D, USA)، گروه دوم حاوی محیط کشت DMEM محتوی سرم جنینی گاوی ده درصد، ۱۰ng/ml فاکتور رشد فیبروبلاست، ۵ng/ml فاکتور رشد مشتق از پلاکت، ۵μM فورسکولین (FSK, Sigma, USA) و 10^{-6} M پروژسترون (Sigma, USA)، گروه سوم حاوی محیط کشت DMEM محتوی سرم جنینی گاوی ده درصد، ۱۰ng/ml فاکتور رشد فیبروبلاست، ۵ng/ml فاکتور رشد مشتق از پلاکت، ۲۰۰ng/ml هرگولین (HRG, Sigma, USA) و 10^{-6} M پروژسترون و گروه چهارم (کنترل القایی) حاوی محیط کشت DMEM محتوی سرم جنینی گاوی ده درصد، ۱۰ng/ml فاکتور رشد فیبروبلاست، ۵ng/ml فاکتور رشد مشتق از پلاکت، ۵μM فورسکولین و ۲۰۰ng/ml هرگولین. سلول‌ها در محیط‌های کشت القایی در گروه‌های چهارگانه فوق به مدت هشت روز انکوبه شدند. واکنش زنجیره پلیمراز معکوس نیمه کمی: بعد از تهیه پرایمرهای مناسب جهت ژن‌های P0، S100، krox-20 (جدول ۱) نمونه‌ها جهت ارزیابی و انجام RT-PCR طی مراحل زیر آماده شدند. پس از تخلیه محیط کشت از فلاسک با اضافه کردن محلول RNX-Plus (سیناژن، ایران) RNA موجود در سلول‌های موجود در فلاسک جمع‌آوری شدند. در ادامه با استفاده از دستورالعمل کیت RevertAid H Minus (DNA First Strand cDNA Synthesis (Fermentas, Canada) ساخته شد. سپس مخلوطی از ۲/۵ مایکرولیتر cDNA، ۲۰۰ مایکرومولار dNTP (Deoxyribonucleotide triphosphate)، ۰/۵ مایکرومولار پرایمر، یک واحد آنزیم taq DNA polymerase به تیوب مخصوص انتقال داده و نمونه جهت افزایش توالی ژن مورد نظر در دستگاه ترموسایکلر قرار گرفتند. برنامه هر سیکل دستگاه به صورت زیر تنظیم شد: دناتوراسیون (Denaturation) 95°C به مدت ۳۰ ثانیه، آنیلینگ (Annealing) 55°C به مدت ۳۰ ثانیه، اکستنشن (Extension) 72°C به مدت ۳۰ ثانیه. پس از ۳۵ سیکل محصولات نمونه‌ها جهت انجام الکتروفورز بر روی ژل آگاروز ۲٪ قرار داده شدند و پس از اتمام الکتروفورز با رنگ‌آمیزی اتیدیوم بروماید قابل

جدول ۱- توالی و اندازه پرایمرها مورد استفاده در واکنش PCR

Gene	Forward primer	Reverse Primer	Size
P0	CTTCAAAGGCTCTCAGGTG	ACGGTCACTTGTTTCG AGTCC	153
Krox20	AGATACCATCCCAGGCTCAGT	CTCTCCGGTCATGTCAATGTT	300
S100	ATAGCACCTCCGTTGGACAG	TCGTTTGACAGAGGACAAG	169
GAPDH	GCCACCCAGAAGACTGTGGAT	TGGTCCAGGGTTTCTTACTCC	500



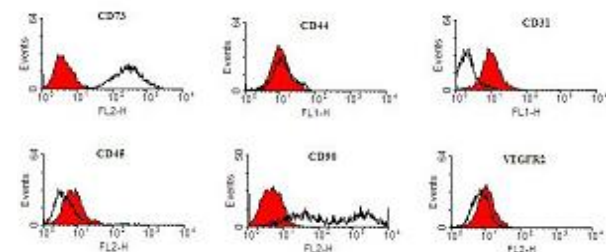
شکل- ۱: مقایسه میزان بیان ژن‌های S100, Krox20, P0 به وسیله Semi-quantitative RT-PCR. ۱: گروه کنترل منفی (bFGF, PDGF). ۲: گروه ۲ (فورسکولین، پروژسترون، PDGF، bFGF). ۳: گروه ۳ (هرگولین، پروژسترون، PDGF، bFGF). ۴: گروه کنترل القایی (هرگولین و فورسکولین (bFGF, PDGF).



شکل - ۱: ADSCs پیش از تمایز که دارای نمای دوکی شکل و شبه فیروبلستی می‌باشند (X20).

شکل - ۳: (A) تصویر باندهای تشکیل شده از بیان ژن Krox-20 در سلول‌های بنیادی چربی پس از تمایز به سلول‌های شبه شوآن. (B) تصویر باندهای تشکیل شده از بیان ژن S100 در سلول‌های بنیادی چربی پس از تمایز به سلول‌های شبه شوآن. (C) تصویر باندهای تشکیل شده از بیان ژن P0 در سلول‌های بنیادی چربی پس از تمایز به سلول‌های شبه شوآن. کنترل داخلی (Houskeeping) در این مطالعه GAPDH می‌باشد (باندهای سمت راست در هر شکل). a: گروه کنترل منفی (bFGF, PDGF). b: گروه ۲ (فورسکولین، پروژسترون، PDGF، bFGF). c: گروه ۳ (هرگولین و پروژسترون، PDGF، bFGF). d: گروه کنترل القایی (هرگولین و فورسکولین (bFGF, PDGF).

بین گروه‌ها معنی‌دار است. همان‌طور که در نمودار مشاهده می‌شود، بیشترین میزان نسبی بیان دو ژن S100 و Krox20 در گروه کنترل القایی (گروه چهارم) مشاهده گردید ($P < 0.0001$). بیان ژن S100 در گروه سوم (پروژسترون جایگزین فورسکولین) نسبت به گروه دوم (پروژسترون جایگزین هرگولین) بیشتر بود ($P < 0.0001$). تفاوت بیان ژن Krox20 بین گروه‌های دوم و سوم معنی‌دار نبود ($P < 0.683$). تفاوت بیان ژن P0 بین گروه‌های سوم و چهارم معنی‌دار دیده نشد اما بیان این ژن در گروه دوم به طور معنی‌دار کمتر از



شکل - ۲: مثبت بودن مارکرهای سطحی سلول‌های بنیادی CD90, CD31 و CD73 (منفی بودن مارکر سلول‌های خونی CD45, VEGFR2, CD44) نشان داده شده است.

بحث

گروه‌های دیگر مشاهده شد ($P < 0/0001$). نتایج PCR و باندهای تشکیل شده بعد از الکتروفورز آن‌ها در شکل ۳ آمده است.

مطالعه حاضر نشان داد که ژن‌های S100, P0, Krox20 در گروه‌های تحت القاء حاوی پروژسترون به صورت معنی‌داری بیان می‌شوند. یافته‌های به دست آمده در این مطالعه با مطالعات پیشین^{۱۵،۱۶} که نشان‌دهنده توانایی سلول‌های بنیادی چربی در بیان مارکرهای سلول‌های شوان پس از تمایز است، هماهنگی دارد. در مطالعه حاضر، سلول‌های حاصله از بافت چربی به دنبال تغییر مداوم محیط کشت، نمایی دوکی شکل و شبه فیروبلاست از خود نشان دادند و تعویض پی در پی محیط کشت، توانسته است مانع از چسبیدن سلول‌های غیر مزانشیمی و خونی به پلیت پلاستیکی کشت شوند تا سلول‌های بنیادی را به صورت سلول‌های چسبیده به کف پلیت جدا کرد. نتایج ما نشان داد مارکرهای CD45 و VGFR2 در سلول‌های کشت یافته، بیان نمی‌شوند. این آنتی‌ژن‌ها به عنوان آنتی‌ژن‌های سطحی سلول‌های آندوتلیال و خونی مطرح هستند.^{۱۷} از طرفی در این مطالعه مارکرهای CD73, CD90 و CD31 در حد قابل توجهی (۹۰٪) بیان شدند. نتایج حاصل از تحقیق حاضر، نتایج مطالعه انجام شده توسط Dominici و همکاران^{۱۸} را در بیان مارکرهای مذکور تایید می‌نماید و نشانگر بنیادی بودن سلول‌های حاصله می‌باشد. در مجموع عدم بیان مارکرهای شاخص سلول‌های خونی و آندوتلیال، مورفولوژی دوکی بودن سلول‌ها، کلونوزنیک بودن و توان تکثیر بالا نشان داد که سلول‌های به دست آمده در این مطالعه سلول‌های بنیادی مزانشیمی می‌باشند.^{۱۷} در این مطالعه طبق روش Dezawa برای القاء سلول‌های بنیادی برگرفته از بافت چربی از فاکتورهای رشد ویژه‌ای استفاده شد که مطالعات مختلف به ویژگی‌های آن پرداخته‌اند. در مرحله پیش القا از بتا مرکاپتو اتانول و اسید رتینوئیک استفاده گردید. بتامرکاپتواتانول می‌تواند شکل‌گیری زواید نوریت شکل را در سلول‌ها القا نماید و اسید رتینوئیک فاکتوری است که در آغاز نوروزن دخالت دارد^{۱۹} و از طرفی در تنظیم بیان فاکتورهای رونویسی مثل MASH1 دخالت داشته و باعث افزایش پاسخ‌دهی سلول‌ها به نوروتروفین‌ها می‌گردد.^{۲۰} نشان داده شده است که فاکتورهای رشد PDGF و bFGF استفاده شده در مرحله القاء، در تمایز و تکثیر

سلول‌های گلیالی و شوآن دخالت دارند و فعال‌کننده مسیر سیگنالی MAPK می‌باشند.^{۲۱} از سوی دیگر فورسکولین یک افزایشنده cAMP داخل سلولی می‌باشد که پاسخ‌های رشد و تمایز را احتمالاً به وسیله افزایش بیان گیرنده‌های فاکتورهای رشد، افزایش می‌دهد.^{۲۱} بنابراین کاربرد هم‌زمان فورسکولین با فاکتورهای رشد PDGF و bFGF می‌تواند به تأثیر بهتر این فاکتورها بر القاء سلول‌های بنیادی کمک کند. هم‌چنین هرگولین که از خانواده فاکتورهای رشد گلیالی است، در تصمیم‌گیری سرنوشت سلولی نقش داشته و باعث القا تمایز سلول‌های ستیغ عصبی به سلول‌های شوآن می‌گردد.^{۲۲} بنابراین مجموعه فاکتورهای القایی استفاده شده در مطالعه حاضر می‌توانند روند القای سلول‌های بنیادی به سلول‌های شبه شوآن را موجب شوند. در مطالعه حاضر بیان ژن S100 در گروه‌های القایی حاوی پروژسترون دیده شد. به نظر می‌رسد بیان ژن S100 ویژگی ذاتی سلول‌های شوآن می‌باشد که به مکان قرارگیری این سلول‌ها و توانایی میلین‌سازی آن‌ها وابسته نیست.^۹ میزان کم S100 در حد نانومولار می‌تواند سبب تحریک رشد جوانه‌های عصبی و افزایش بقای نوروون شود.^{۲۳} در مطالعه Moagher و همکاران بیان S100 در گروه‌های مورد مطالعه با استفاده از تکنیک ایمونوسیتوشیمی مورد بررسی قرار گرفت و بیشترین میزان بیان در گروهی که پروژسترون جایگزین هرگولین شده بود مشاهده شده بود.^{۱۱} در حالی که در مطالعه حاضر بیان S100 در گروه‌های ۳ و ۴ بیشتر از گروه ۲ (پروژسترون جایگزین هرگولین) مشاهده شد. به نظر می‌رسد وجود هرگولین در گروه‌های سه و چهار عامل مهمی در روند بیان ژن S100 می‌باشد به طوری که جایگزین کردن آن با پروژسترون در گروه دو در بیان این ژن تأثیرگذار می‌باشد. از طرفی وجود پروژسترون همراه با هرگولین همانند گروه کنترل القایی توانسته است در بیان ژن S100 موثر باشد و نشان‌دهنده آن است که ترکیب پروژسترون و هرگولین (گروه سه) همانند ترکیب فورسکولین و هرگولین (گروه چهار) توان تأثیرگذاری در بیان این ژن را دارد. در مطالعه حاضر نشان داده شد که پروژسترون در بیان ژن Krox20 در سلول‌های بنیادی چربی موثر است. به نظر می‌رسد که ژن Krox20 یک جزء کلیدی در انتقال سیگنال‌های آکسونی برای میلین‌سازی باشد.^{۲۴} عدم بیان ژن Krox20 باعث توقف تمایز سلول‌های شوآن در مرحله پیش میلین‌سازی شده و در نتیجه موجب توقف میلین‌سازی می‌گردد.^{۲۵} Guenuon و همکاران نشان داده‌اند که

هرگولین می‌باشد.^{۱۱} احتمال دارد که پاسخ سلول‌های بنیادی چربی و مغز استخوان در محیط کشت به پروژسترون متفاوت باشد که برای روشن شدن آن نیاز به مطالعات بیشتری است. با استناد به مطالعه حاضر و دیگر مطالعاتی که تاثیر مستقیم پروژسترون و مشتقات آن را در بیان پروتیین‌های میلین مطرح کرده‌اند،^{۱۱ و ۱۰} می‌توان این احتمال را مطرح کرد که پروژسترون باعث تنظیم و هماهنگی سلول شوان جهت استفاده از مسیرهای داخل سلولی مختلف برای تبدیل شدن به سلولی متمایز برای انجام روند میلینزاسیون گردد. احتمالا پروژسترون از طریق مکانیسم‌های مختلفی در سلول‌های گلیال از جمله از طریق تنظیم فاکتور رشد انسولینی (IGF) در سترز میلین نقش دارد،^{۲۹} بنابراین می‌تواند به عنوان یک عامل درمانی در درمان بیماری‌هایی هم‌چون مولتیپل اسکلروزیس که با تخریب میلین همراه هستند، مطرح گردد. مطالعه حاضر نشان داد که سلول‌های بنیادی چربی می‌توانند در محیط تمایزی مناسب ژن‌های S100, P0, Krox20 را بیان نمایند. بیشترین بیان این ژن‌ها در گروه کنترل القایی شامل فاکتورهای هرگولین و فورسکولین مشاهده شد. بیان این ژن‌ها با وجود عوامل القایی هرگولین و پروژسترون بیش از فورسکولین و پروژسترون رخ داد. به عبارتی پروژسترون در بیان ژن‌های مذکور در سلول‌های بنیادی چربی موثر است اما نقش آن به اندازه هرگولین نمی‌باشد. سپاسگزاری: این مطالعه بر اساس طرح تحقیقاتی به شماره ۸۸۵۹ و پایان‌نامه مربوطه، مصوب مرکز تحقیقات علوم تشریحی دانشگاه علوم پزشکی کاشان و حمایت مالی معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی کاشان صورت گرفته است. نویسندگان این مقاله مراتب سپاس خود را از این مراکز و همکاری‌های ارزشمند گروه علوم تشریح دانشگاه علوم کاشان، گروه علوم تشریح دانشگاه علوم پزشکی تهران و آقایان دکتر یداله شکیبیا، دکتر ابوالفضل اعظمی و سیدعلیرضا طلایی اعلام می‌دارند.

پروژسترون باعث تحریک بیان Krox20 در سلول‌های شوان می‌شود.^{۱۰} که با نتایج مطالعه ما هم‌خوانی دارد. در واقع Krox20 یک فاکتور ترجمه‌ای می‌باشد که بر روی ژن‌های مسئول میلین‌سازی اثر القایی دارد.^{۱۰} در مطالعه ما به دنبال استفاده از پروژسترون در محیط کشت همانند استفاده از فاکتورهای فورسکولین و هرگولین، mRNA ژن P0 مشاهده شد. Melcangi و همکاران نیز نشان داده‌اند که با وجود پروژسترون در محیط کشت سلول‌های شوان، میزان P0 افزایش می‌یابد.^۷ مطالعات نشان داده‌اند که این گلیکوپروتیین در مراحل مختلف تکامل سلول‌های شوان بیان می‌شود^{۲۶ و ۲۷} و در سلول‌های گلیال به عنوان یکی از مارکرهای ابتدایی در نظر گرفته می‌شود.^{۲۶} بنابراین تاثیر پروژسترون برای بیان این پروتیین در سلول‌های بنیادی چربی می‌تواند نقش احتمالی این نورواستروئید را در القاء این سلول‌ها را به سلول‌های شبه شوان را مطرح کند. در مطالعه حاضر پروژسترون علاوه بر بیان ژن‌های S100 و P0، باعث تحریک سلول‌های بنیادی چربی جهت بیان فاکتور ترجمه‌ای Krox20 در محیط کشت شده است. به نظر می‌رسد که پروژسترون با ازدیاد فاکتورهای ترجمه‌ای همانند Krox20 در تمایز سلول‌های شوان و میلین شدن نقش خود را اعمال می‌کند.^{۱۰ و ۲۸} بیان ژن Krox20 همراه با بیان ژن‌های P0 و S100 می‌تواند نشانه‌هایی از نقش القایی پروژسترون در تمایز سلول‌های بنیادی چربی به سلول شوان باشد. در مطالعه ما میزان بیان هر سه ژن در گروه چهار (گروه کنترل القایی) بیشتر از دو گروه دیگر القایی (دو و سه) دیده شد که نشان می‌دهد مجموعه فاکتورهای bFGF, PDGF, فورسکولین و هرگولین بهتر از مجموعه همین فاکتورها در شرایطی که پروژسترون جایگزین هرگولین یا فورسکولین شده باشد در بیان مارکرهای سلول شوان موثر می‌باشد. Moagher و همکاران نشان دادند که نقش پروژسترون در تمایز سلول‌های بنیادی مغز استخوان به سلول‌های شوان مشابه نقش

References

- Gimble J, Guilak F. Adipose-derived adult stem cells: isolation, characterization, and differentiation potential. *Cytotherapy* 2003;5(5):362-9.
- Strem BM, Hicok KC, Zhu M, Wulur I, Alfonso Z, Schreiber RE, et al. Multipotential differentiation of adipose tissue-derived stem cells. *Keio J Med* 2005;54(3):132-41.
- Banfi A, Bianchi G, Galotto M, Cancedda R, Quarto R. Bone marrow stromal damage after chemo/radiotherapy: occurrence, consequences and possibilities of treatment. *Leuk Lymphoma* 2001;42(5):863-70.
- Jung-Testas I, Do Thi A, Koenig H, Désarnaud F, Shazand K, Schumacher M, et al. Progesterone as a neurosteroid: synthesis and actions in rat glial cells. *J Steroid Biochem Mol Biol* 1999;69(1-6):97-107.
- Koenig HL, Schumacher M, Ferzaz B, Thi AN, Ressouches A, Guennoun R, et al. Progesterone synthesis and myelin formation by Schwann cells. *Science* 1995;268(5216):1500-3.

6. Jung-Testas I, Schumacher M, Robel P, Baulieu EE. The neurosteroid progesterone increases the expression of myelin proteins (MBP and CNPase) in rat oligodendrocytes in primary culture. *Cell Mol Neurobiol* 1996;16(3):439-43.
7. Melcangi RC, Magnaghi V, Cavarretta I, Zucchi I, Bovolín P, D'Urso D, et al. Progesterone derivatives are able to influence peripheral myelin protein 22 and P0 gene expression: possible mechanisms of action. *J Neurosci Res* 1999;56(4):349-57.
8. Mercier G, Turque N, Schumacher M. Early activation of transcription factor expression in Schwann cells by progesterone. *Brain Res Mol Brain Res* 2001;97(2):137-48.
9. Gonzalez-Martinez T, Perez-Piñera P, Díaz-Esnal B, Vega JA. S-100 proteins in the human peripheral nervous system. *Microsc Res Tech* 2003;60(6):633-8.
10. Guennoun R, Benmessahel Y, Delespierre B, Gouézou M, Rajkowski KM, Baulieu EE, et al. Progesterone stimulates Krox-20 gene expression in Schwann cells. *Brain Res Mol Brain Res* 2001;90(1):75-82.
11. Movaghar B, Tiraihi T, Mesbah-Namin SA. Transdifferentiation of bone marrow stromal cells into Schwann cell phenotype using progesterone as inducer. *Brain Res* 2008;1208:17-24. Epub 2008 Mar 6.
12. Halvorsen YC, Wilkison WO, Gimble JM. Adipose-derived stromal cells: their utility and potential in bone formation. *Int J Obes Relat Metab Disord* 2000;24 Suppl 4:S41-4.
13. Zaminy A, Ragerdi Kashani I, Barbarestani M, Hedayatpour A, Mahmoudi R, Farzaneh Nejad A. Osteogenic differentiation of rat mesenchymal stem cells from adipose tissue in comparison with bone marrow mesenchymal stem cells: melatonin as a differentiation factor. *Iran Biomed J* 2008;12(3):133-41.
14. Feller N, Kelder A, Westra G, Ossenkoppele GJ, Schuurhuis GJ. Positive selection for CD90 as a purging option in acute myeloid leukemia stem cell transplants. *Cytometry B Clin Cytom* 2008;74(1):9-16.
15. Wei Y, Gong K, Zheng Z, Liu L, Wang A, Zhang L, et al. Schwann-like cell differentiation of rat adipose-derived stem cells by indirect co-culture with Schwann cells in vitro. *Cell Prolif* 2010;43(6):606-16. doi: 10.1111/j.1365-2184.2010.00710.x.
16. Kingham PJ, Kalbermatten DF, Mahay D, Armstrong SJ, Wiberg M, Terenghi G. Adipose-derived stem cells differentiate into a Schwann cell phenotype and promote neurite outgrowth in vitro. *Exp Neurol* 2007;207(2):267-74. Epub 2007 Aug 2.
17. Sun S, Guo Z, Xiao X, Liu B, Liu X, Tang PH, et al. Isolation of mouse marrow mesenchymal progenitors by a novel and reliable method. *Stem Cells* 2003;21(5):527-35.
18. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 2006;8(4):315-7.
19. Appel B, Eisen JS. Retinoids run rampant: multiple roles during spinal cord and motor neuron development. *Neuron* 2003;40(3):461-4.
20. Takahashi J, Palmer TD, Gage FH. Retinoic acid and neurotrophins collaborate to regulate neurogenesis in adult-derived neural stem cell cultures. *J Neurobiol* 1999;38(1):65-81.
21. Léobon B, Roncalli J, Joffre C, Mazo M, Boisson M, Barreau C, et al. Adipose-derived cardiomyogenic cells: in vitro expansion and functional improvement in a mouse model of myocardial infarction. *Cardiovasc Res* 2009;83(4):757-67. Epub 2009 Jun 8.
22. Morrison SJ, White PM, Zock C, Anderson DJ. Prospective identification, isolation by flow cytometry, and in vivo self-renewal of multipotent mammalian neural crest stem cells. *Cell* 1999;96(5):737-49.
23. Korfiás S, Stranjalis G, Papadimitriou A, Psachoulia C, Daskalakis G, Antsaklis A, et al. Serum S-100B protein as a biochemical marker of brain injury: a review of current concepts. *Curr Med Chem* 2006;13(30):3719-31.
24. Murphy P, Topilko P, Schneider-Maunoury S, Seitanidou T, Baron-Van Evercooren A, Charnay P. The regulation of Krox-20 expression reveals important steps in the control of peripheral glial cell development. *Development* 1996;122(9):2847-57.
25. Zorick TS, Syroid DE, Arroyo E, Scherer SS, Lemke G. The transcription factors SCIP and Krox-20 mark distinct stages and cell fates in Schwann cell differentiation. *Mol Cell Neurosci* 1996;8(2-3):129-45.
26. Sommer L, Suter U. The glycoprotein P0 in peripheral gliogenesis. *Cell Tissue Res* 1998;292(1):11-6.
27. Lee M, Brennan A, Blanchard A, Zoidl G, Dong Z, Taberner A, et al. P0 is constitutively expressed in the rat neural crest and embryonic nerves and is negatively and positively regulated by axons to generate non-myelin-forming and myelin-forming Schwann cells, respectively. *Mol Cell Neurosci* 1997;8(5):336-50.
28. Magnaghi V, Ballabio M, Roglio I, Melcangi RC. Progesterone derivatives increase expression of Krox-20 and Sox-10 in rat Schwann cells. *J Mol Neurosci* 2007;31(2):149-57.
29. Chesik D, De Keyser J. Progesterone and dexamethasone differentially regulate the IGF-system in glial cells. *Neurosci Lett* 2010;468(3):178-82. Epub 2009 Oct 22.

The effects of progesterone on the in-vitro expression of P0, S100 and Krox20 genes in adipose-derived stem cells

Received: January 31, 2011 Accepted: March 06, 2011

Abstract

Neda Khanlarkhani MSc.¹
Mohammad Ali Atlasi PhD.^{1*}
Iraj Ragerdi Kashani PhD.²
Hodayoun Naderian PhD.¹
Ali Akbar Taherian PhD.¹
Hossein Nikzad PhD.¹

1- Anatomical Sciences Research Center, Kashan University of Medical Sciences, Kashan, Iran.
2- Department of Anatomy, School of Medicine, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

Background: Adipose-derived stem cells (ADSCs) have noticeable self-renewal ability and can differentiate into several cell lines such as adipocytes, osteoblasts, chondrocytes, and myocytes. Progesterone plays a significant role in the myelination of peripheral nerves. Regarding the role of progesterone on the myelination of peripheral nervous system, we evaluated its effects on the in-vitro expression of P0, S100 and Krox20 mRNA in adipose-derived stem cells.

Methods: In this experimental study, rat adipose-derived stem cells were isolated from the inguinal region of the animals and were evaluated by flow cytometry before culture. In preinduction phase, the cells were sequentially treated with various factors such as β -mercaptoethanol and all-trans-retinoic acid, followed by different induction mixtures. The cells were divided into four groups including two control groups (receiving either fibroblast and platelet derived-growth factors, or fibroblast growth factor, platelet derived-growth factor, forskolin and heregulin) and two experimental groups (receiving either fibroblast growth factor, platelet derived-growth factor, forskolin and progesterone, or fibroblast growth factor, platelet derived-growth factor, heregulin and progesterone). Expression of Schwann cell markers, S-100, P0 and Krox20 mRNA, was determined by semi-quantitative RT-PCR.

Results: ADSCs expressed CD90, CD73, and CD31 but showed lack of CD45, and VEGFR2 expression. After the induction stage, S-100, P0 and Krox20 mRNA were expressed in the progesterone receiving experimental groups, but expression of S-100 and Krox20 mRNA were less than the control group which was receiving forskolin and heregulin ($P < 0.0001$).

Conclusion: Progesterone can promote the in-vitro expression of S-100, P0, and Krox20 genes in adipose-derived stem cells.

Keywords: Adipose tissue, gene expression, progesterone, schwann cell, stem cell.

*Corresponding author: Anatomical Sciences Research Center, Kashan University of Medical Sciences, Kashan, Iran. Postal code: 87159-88141
Tel: +98- 913- 1615603
email: atlasima@gmail.com