مجله دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، اسفند ۱۳۹۵، دوره ۷۴، شماره ۱۲، صفحه‌های ۸۶۱ تا ۸۶۸

مقاله اصیل

تمایز سلول‌های بنیادی اندومتر رحم به نورون حرکتی با استفاده از ریزمولکول پورمورفامین

هما محسنی کوچصفهانی[1*]، سمیه ابراهیمی باروق[2]، جعفر آی[2]
اعظم رحیمی[3]

۱- گروه علوم جانوری، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه خوارزمی، تهران، ایران.
۲- گروه مهندسی بافت و علوم سلولی کاربردی، دانشکده فناوری‌های نوین پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران.
۳- گروه علوم جانوری، سلولی تکوینی جانوری، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه خوارزمی، تهران، ایران.

[*] نویسنده مسئول: تهران، خیابان شهید مفتح، شماره ۴۳، دانشگاه خوارزمی
تلفن: ۸۶۰۷۲۷۰۹ -۰۲۱
E-mail: kouchesfehani@yahoo.com

چکیده

دریافت: ۱۳۹۵/۰۹/۲۸ ویرایش: ۱۳۹۵/۱۲/۱۹ پذیرش: ۱۳۹۵/۱۲/۲۷ آنلاین: ۱۳۹۵/۱۲/۲۸

زمینه و هدف: ریزمولکول پورمورفامین آگونیست پروتیین Smoothened در مسیر سیگنالینگ سونیک هچ‌هاگ (Sonic hedgehog) است. استفاده از سونیک هچ‌هاگ باعث پیشروی تمایز عصبی می‌شود و سلول‌های تمایز یافته، پروتیین‌های ویژه‌ی بافت عصبی را بیان می‌کنند. نوروفیلامنت و استیل کولین ترانسفراز، پروتیین‌های ویژه نورون‌های حرکتی هستند که بیان آن‌ها در سلول‌های در حال تمایز نشان‌دهنده تبدیل آن‌ها به نورون‌های حرکتی است. هدف از این مطالعه بررسی توانایی مولکول پورمورفامین در تمایز سلول‌های بنیادی اندومتریال به نورون حرکتی است.

روش بررسی: در این مطالعه تحلیلی که در مهر ماه ۱۳۹٤ در دانشگاه علوم پزشکی تهران انجام گرفت، سلول‌های بنیادی به روش آنزیمی از بافت اندومتریوم رحم جداسازی شدند. پس از پاساژ سوم فلوسایتومتری برای مارکرهای مزانشیمی انجام شد. سپس سلول‌ها به دو گروه کنترل و تمایزی تقسیم شدند. در گروه تمایزی، سلول‌ها با محیط تمایزی حاوی پورمورفامین تیمار شدند. سپس تست ایمونوسیتوشیمی (ICC) و همچنین Real-time PCR برای بیان مارکرهای سلول‌های عصبی انجام شد.

یافته‌ها: آنالیز فلوسایتومتری نشان داد که سلول‌های بنیادی اندومتریال برای CD90, CD105 و CD146 مثبت و برای CD31, CD34 منفی هستند. نتایج ICC و Real-time PCR نشان داد که سلول‌های تیمار شده با پورمورفامین، مارکرهای نورون‌های حرکتی نوروفیلامان و استیل کولین ترانسفراز را بیان می‌کنند.

نتیجه‌گیری: بر اساس یافته‌های این پژوهش می‌توان نتیجه گرفت که ریزمولکول پورمورفامین با فعال نمودن مسیر سیگنالینگ سونیک هچ‌هاگ توانایی القای تمایز سلول‌های بنیادی به سلول‌های عصبی، به‌ویژه نورون‌های حرکتی را دارد.

کلمات کلیدی: تمایز، سلول‌های بنیادی اندومتریال، پورمورفامین، مسیر سونیک هچ‌هاگ.

مقدمه

سلول بنیادی سلولی است که دارای خاصیت خود تجدیدی (Self-renewal) بوده و ظرفیت تولید انواع سلول‌های دیگر را دارد.[۱-۳] سلول‌های بنیادی به‌طور کلی دارای دو منشا جنینی و بالغند.[٤] سلول‌های بنیادی بالغ در تعداد زیادی از بافت‌های افراد بالغ شامل: بیضه، ماهیچه، پوست، خون، سیستم عصبی، قلب، ریه، پالپ دندان، بافت چربی، غشای سینوویال، خون بندناف، مایع آمنیوتیک و اندومتریوم یافت می‌شود.[۵-۷] استفاده از سلول‌های بنیادی بالغین در مقایسه با سلول‌های بنیادی جنینی و سلول‌های پرتوان القا شده، فاقد مشکلاتی چون، ایجاد تراتوما و عدم سازش‌پذیری بافتی است.[۸] مشخص شده است که اندومتر انسان شامل جمعیت کوچکی از سلول‌های بنیادی اندومتریال است که ممکن است یک منبع در دسترس از سلول‌های بنیادی مزانشیمی برای مهندسی بافت برای

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2024-07-16]

ترمیم استخوان، غضروف، ماهیچه و چربی باشد.[۹-۱۱] افزون بر این به‌تازگی مشخص شده است که سلول‌های بنیادی اندومتریال می‌توانند به سلول‌های شبه نورون تمایز یابند. با توجه به پتانسیل تمایزی آن‌ها به نورون و دیگر مشخصات ویژه‌ی این سلول‌ها از آن‌ها برای به‌دست آوردن نورون‌های حرکتی در تجربه کنونی بهره گرفته شد. ریزمولکول‌ها دسته‌ای از موادند که عموما با هدف قرار دادن یک مسیر سیگنالینگ خاص عمل کرده و القای با دوام و طولانی‌مدت ایجاد می‌کنند و بنابراین ابزار مفیدی برای تنظیم سرنوشت سلولی می‌باشند.[۱۲] ریزمولکول پورمورفامین آگونیست Smoothened در سیگنالینگ سونیک هچ‌هاگ (Sonic hedgehog) است. جایگزینی پورمورفامین با سونیک هچ‌هاگ تاثیر مشابهی روی بلوغ نورون‌ها دارد.[۱۳] مطالعات انجام شده برای تمایز سلول‌های بنیادی اندومتریال به سلول‌های عصبی به‌ویژه نورون حرکتی با استفاده از فاکتور تمایزی رتینوییک اسید و همچنین سونیک هچ‌هاگ بوده است.[۱۴]

هدف از مطالعه حاضر بررسی توانایی مولکول پورمورفامین در تمایز سلول‌های بنیادی اندومتر به نورون حرکتی می‌باشد.

روش بررسی

مطالعه‌ی حاضر که از نوع مطالعه تجربی می‌باشد، در بهمن ماه ۱۳۹۳ تا خرداد ماه ۱۳۹٤ در آزمایشگاه دانشکده فناوری‌های نوین پزشکی دانشگاه علوم پزشکی تهران انجام گرفته است.

در این مطالعه ابتدا نمونه بافت اندومتر از زنانی که برای درمان نازایی به بیمارستان ولیعصر (عج) امام‌خمینی (ره) در تهران مراجعه کرده بودند با رضایت فرد اهدا کننده به‌دست آمد. تکه‌های بافت اهدایی در مایع Hanks به آزمایشگاه کشت سلولی منتقل شد و توسط فسفات بافر سالین حاوی پنی‌سلین و استرپتومایسین ۱٪ شستشو شد. پس از آن به منظور هضم بافتی به مدت دو ساعت در محلول کلاژناز نوع I در انکوباتور در دمای $37^{\circ}C$ و ۵٪ CO_2 قرار گرفتند. سپس فیلتراسیون با فیلترهای µm ۷۰ و ٤۰ صورت پذیرفت تا تکه‌های هضم نشده بافتی جدا گردند. از محلول فایکول برای هضم سلول‌های تک‌هسته‌ای استفاده گردید. سپس سلول‌های جدا شده به محیط کشت DMEMF12 حاوی ۱۵٪ سرم و پنی‌سلین و استرپتومایسین منتقل شدند. پس از پاساژ سوم سلول‌ها برای مارکرهای سطح سلولی از طریق فلوسایتومتری مورد بررسی قرار گرفتند. در این روش از مارکرهای مزانشیمی CD105, CD146, CD90 و مارکر CD31 به عنوان مارکر سلول‌های اندوتلیالی و CD34 به‌عنوان مارکر سلول‌های هماتوپویتیک استفاده گردید.

بدین منظور سلول‌ها پس از شستشو با فسفات‌بافرسالین و سرم ۱٪، به‌مدت ۳۰ دقیقه با پارافرمالدیید فیکس شدند و سپس با آنتی‌بادی‌های مورد نظر شامل: CD31, CD34, CD105, CD90, CD146 که به یک آنتی‌بادی ثانویه‌ی فلورسانس متصل بودند به‌مدت یک ساعت انکوبه شدند. سپس سلول‌ها مجددا به‌مدت یک ساعت با پارافرمالدیید ۱٪ فیکس شدند و پس از آن نمونه‌ها برای بررسی بیان مارکرهای سطحی توسط Flow cytometry (FACStar Plus@, Becton Dickinson, Mountain View, CA, USA) در موسسه‌ی رویان بررسی شدند.

برای تمایز به سلول‌های عصبی سلول‌های بنیادی اندومتریال را که به پاساژ سوم رسیده‌اند در پلیت‌های ۲٤ خانه‌ای کشت داده شدند. در این آزمایش دو گروه مورد بررسی قرار گرفت: گروه کنترل که به آن‌ها محیط DMEM\F12+FBS 2% افزوده شد، گروه تمایزی که به آن‌ها محیط تمایزی حاوی پورمورفامین بدون سرم اضافه گردید.

سلول‌ها به تعداد cell/well ۵۰۰۰ در ظروف ۲٤ خانه‌ای حاوی محیط DMEM/F12 و سرم ۱۰٪ کشت داده شدند. پس از ۲٤ ساعت به گروه تمایزی، محیط تمایزی عصب اضافه شد. دوره تمایز ۲۱ روز بوده و مراحل تمایزی به چهار مرحله تقسیم شدند. در مرحله اول محیط تمایزی شامل: DMEM\F12, FBS 20%, B27, IBMX, 2ME, FGF2 به سلول‌ها اضافه گردید. پس از یک روز محیط تمایزی اول از چاهک‌ها خارج شد و محیط تمایزی دوم اضافه گردید. این محیط شامل: DMEM\F12, N2, B27, PMA بود که به مدت چهار روز سلول‌ها به‌وسیله آن تیمار شدند. این محیط هر دو روز یک مرتبه تعویض گردید. سپس محیط دوم را خارج کرده و محیط سوم شامل: DMEM\F12, RH, PMA به چاهک‌ها اضافه گردید. سلول‌ها به مدت هشت روز با این محیط تیمار شدند و محیط به‌صورت یک روز در میان تعویض شد. پس از آن محیط سوم خارج گردید و محیط چهارم به چاهک‌های حاوی سلول‌ها اضافه شد. این محیط شامل: DMEM\F12, N2, B27, BDNF بود. محیط هر دو روز یک بار تعویض شد و مورفولوژی سلول‌ها در روز هشتم به‌وسیله

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2024-07-16]

میکروسکوپ مورد بررسی و تایید قرار گرفت. سلول‌های گروه کنترل تا پایان مراحل تمایزی با DMEM\F12 حاوی سرم ۲٪ تعویض محیط شدند. بررسی بیان مارکرهای NF, Chat به‌وسیله‌ی ایمونوسیتوشیمی انجام شد. بدین منظور سلول‌ها با پارافرمالدیید ٤٪ به‌مدت ۱۰ دقیقه تثبیت شدند، سپس با محلول تریتون X100 2% به‌مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق نفوذپذیر شدند. پس از آن محلول بلاک‌کننده حاوی Goat serum 5% در محلول بافر سالین به مدت ۳۰ دقیقه به سلول‌ها اضافه شد. سپس آنتی‌بادی اولیه NF (غلظت یک به ۲۰۰)، Chat (غلظت یک به ۲۰۰) به‌مدت دو ساعت به سلول‌ها اضافه شد. آنتی‌بادی ثانویه Anti rabit IgG با غلظت یک به ۷۰۰ بر علیه آنتی‌بادی‌های اولیه اضافه گردید و به‌مدت یک ساعت در دمای اتاق نگهداری شد. هسته‌ی سلول‌ها با DAPI رنگ‌آمیزی گردید.

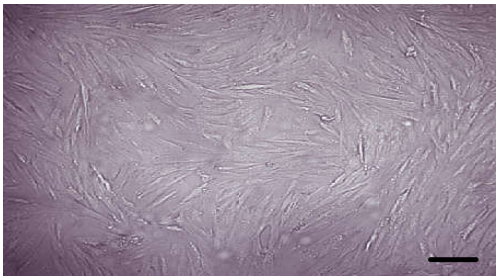
به‌منظور بررسی میزان بیان ژن‌های Chat و NF، تکنیک Real-time PCR انجام شد. استخراج RNA از سلول‌ها با کیت RNeasy plus mini kit (Qiagen, Hilden, Germany) انجام گردید. سپس cDNA با استفاده از کیت cDNA Synthesis Kit First strand (Fermentas, St Leon-Rot, Germany) به‌دست آمد و از نظر بیان ژن‌های NF و Chat در گروه کنترل و تیمار شده مورد آنالیز Real-time PCR قرار گرفت. ژن GAPDH به‌عنوان کنترل درونی در نظر گرفته شد و نتایج بیان ژن‌های تمایزی در گروه تمایز یافته نسبت به گروه کنترل آنالیز گردید.

همهٔ آزمایش‌ها حداقل با سه بار تکرار مجزای بیولوژیک انجام پذیرفتند. داده‌ها به‌صورت میانگین±انحراف‌معیار (Mean±SD) گزارش گردیدند. آنالیز داده‌ها با SPSS software, version 16 (IBM SPSS, Armonk, NY, USA) انجام شد و تست آنالیز One-way ANOVA مورد استفاده قرار گرفتند و نمودارهای مربوطه از طریق Microsoft Excel 2013 (Microsoft Corp., Redmond, WA, USA) رسم گردید P<۰/۰۵ معنادار تلقی گردید.

یافته‌ها

سلول‌های اندومتریال در کشت‌های اولیه به‌صورت جمعیت‌های ناخالص می‌باشند که در پاساژهای بعد به‌صورت خالص در می‌آیند. سلول‌های اندومتریال خالص کشت داده شده شبیه به سلول‌های فیبروبلاستی هستند و نمای دوکی شکل دارند (شکل ۱). بر اساس نتایج نشان داده شده در فلوسایتومتری این سلول‌ها پس از پاساژ سوم نسبت به مارکرهای CD90, CD105, CD146 که مارکرهای مزانشیمی هستند، مثبت و نسبت به مارکر اندوتلیالی CD31 و مارکر هماتوپویتیک CD34 منفی می‌باشند (شکل ۲).

بررسی مورفولوژی سلول‌ها در طی مطالعه نشان داد که اولین تغییرات مورفولوژیک در سلول‌های رده‌ی تمایزی در روز هفت از

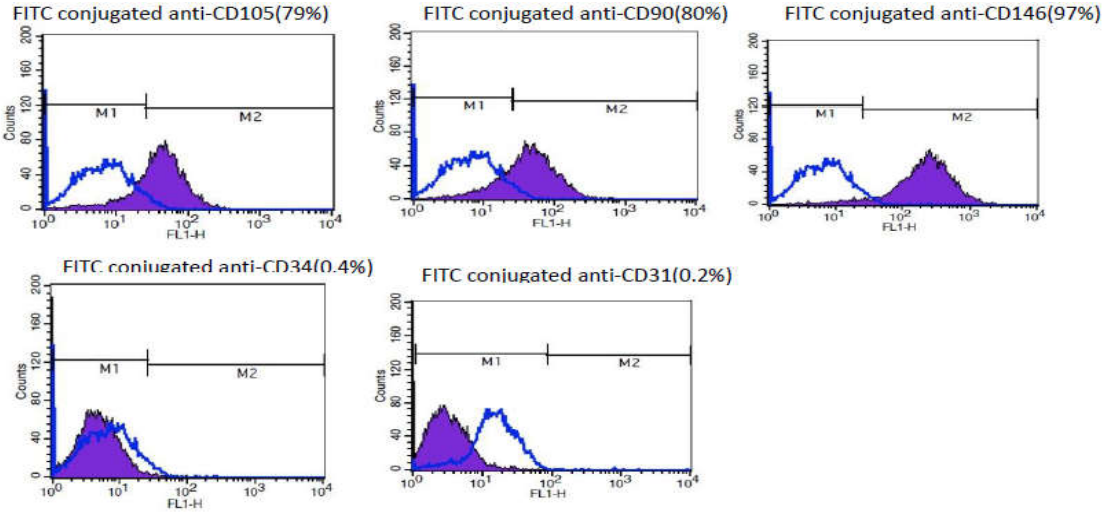


شکل ۱: فتومیکروگراف نمای سلول‌های بنیادی اندومتریال، پس از پاساژ سوم. سلول‌ها دارای نمای دوکی شکل هستند و شبیه سلول‌های فیبروبلاستی می‌باشند (Scale bar: 100µm)

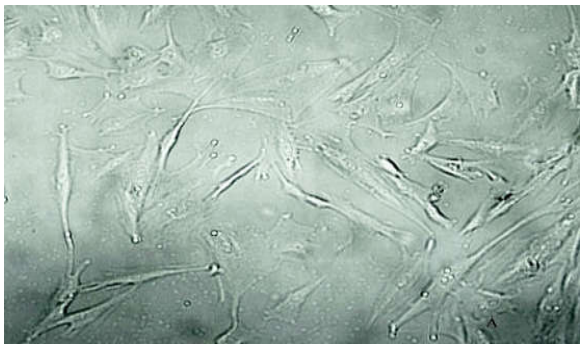
جدول ۱: پرایمرهای استفاده شده

ژن	توالی پرایمرها	دمای ذوب (°c)
Chat	F GCAGGAGAAGACAGCCAACT R AAACCTCAGCTGGTCAT	۵۵
NF	F CAGAGCTGGAGGCACTGAAA R CTGCTGAATGGCTTCCTGGT	۵۵
GAPDH	F TCGCCAGCCGAGCCA R CCTTGACGGTGCCATGGAAT	۵۵

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2024-07-16]



شکل ۲: نتایج فلوسایتومتری که بیان مثبت مارکرهای CD90, CD105, CD146 و بیان منفی مارکرهای CD31, CD34 را نشان می‌دهد.



شکل ۳: فتومیکروگراف از تغییرات مورفولوژیکی سلول‌ها در روز ۱۸ (مرحله چهار) از تمایز. (Scale bar: 100µm)

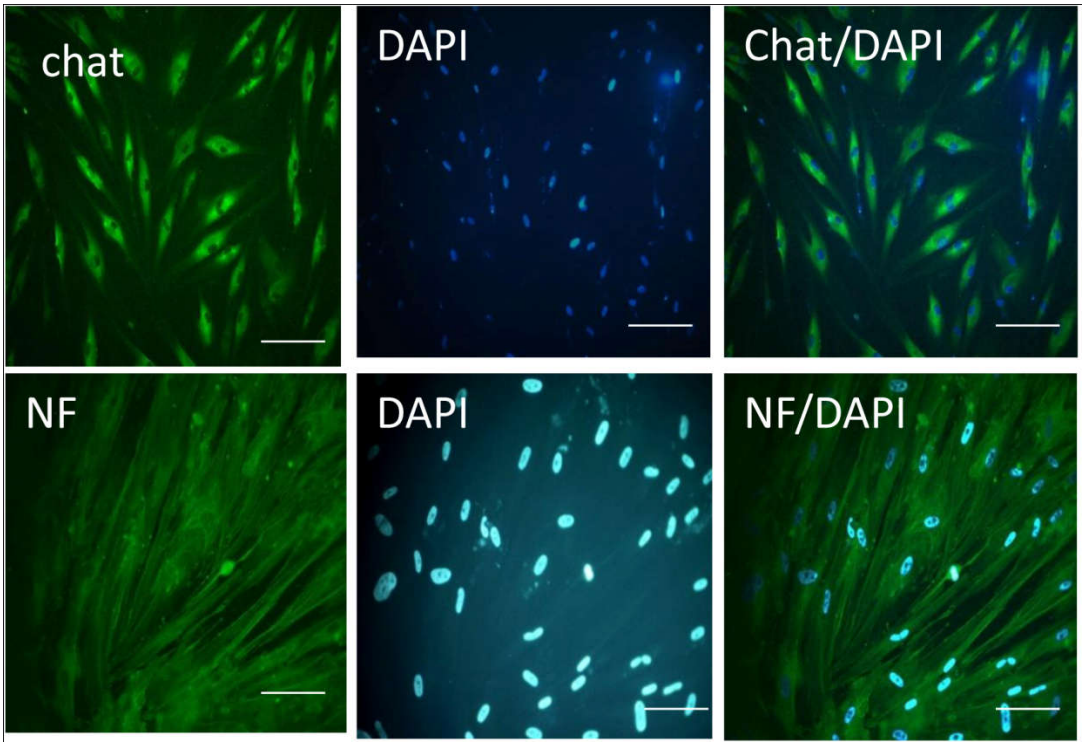
تمایز، یعنی از آغاز مرحله سوم تمایزی دیده شد که تا ۲۱ روز ادامه یافت. این تغییرات شامل طویل شدن تدریجی سلول‌ها و ایجاد زواید در آن‌ها بود. این تغییرات در حالی دیده شد که گروه کنترل همچنان با سرعت به تقسیم ادامه می‌دادند و هیچ تغییری در آن‌ها مشاهده نشد (شکل ۳). نتایج ایمونوسیتوشیمی نشان داد که سلول‌های اندومتریال دارای توان تمایز به نورون‌های حرکتی به‌وسیله‌ی اثر تحریکی ریزمولکول پورمورفامین هستند. این نتایج نشان داد که نورون‌های تمایزیافته با اثر تحریکی پورمورفامین دارای بیان مارکرهای عصبی نوروفیلامان و استیل‌کولین‌ترانسفراز می‌باشند (شکل ٤).

نتایج حاصل از Real-time PCR نشان‌دهنده افزایش بیان نسبی ژن‌های نوروفیلامان و استیل‌کولین‌ترانسفراز پس از تمایز عصبی سلول‌های بنیادی اندومتریال نسبت به گروه کنترل می‌باشد (نمودار ۱) و (جدول ۱).

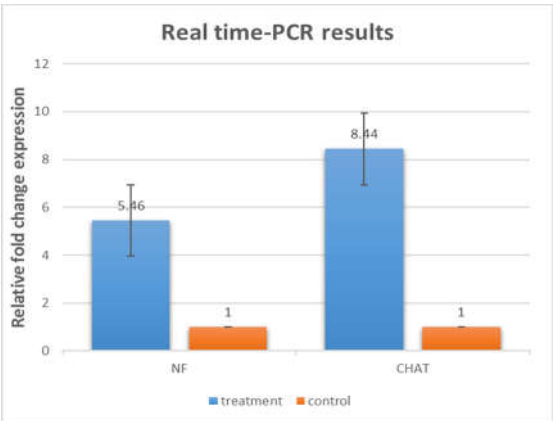
بحث

یافته‌های مطالعه حاضر نشان داد که سلول‌های به‌دست آمده از بافت اندومتریال رحم انسان با بیان مارکرهای سطحی مزانشیمی CD90, CD105 و مارکر اصلی سلول‌های بنیادی اندومتریال رحم یعنی CD146 ویژگی بنیادی بودن را نشان می‌دهند. این سلول‌ها همچنین نسبت به مارکرهای CD31, CD34 منفی بودند. این نتایج با یافته‌های پیشین در این زمینه همخوانی دارد.[۲۰و۳۰] در پژوهش حاضر از محیط القایی عصب برای تمایز این سلول‌ها مطابق با روشی که

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2024-07-16]



شکل ٤: نتایج ایمونوسیتوشیمی برای مارکرهای NF, Chat که نشان‌دهنده بیان این مارکرهای عصبی پس از گذشت ۲۱ روز از تمایز است (Scale bar: 100µm)



نمودار ۱: نتایج تکنیک Real-time PCR که بیانگر افزایش معنادار بیان ژن‌های استیل کولین ترانسفراز (Chat) و نوروفیلامنت NF در سلول‌های تمایز یافته نسبت به گروه کنترل می‌باشد. نتایج با روش آماری One-way ANOVA مورد آنالیز قرار گرفتند و P<۰/۰۵ معنادار محسوب گردید.

برای تمایز سلول‌های مزانشیمی به‌کار می‌رود استفاده گردید. تمایز سلول‌های بنیادی اندومتریال به سلول‌های عصبی اولین بار توسط Wolff و همکارانش انجام گرفت که در مطالعات آن‌ها تنها از فاکتورهای القایی FGF2, EGF, RA استفاده گردید.[۳۰] در تحقیق حاضر علاوه بر این فاکتورهای القا کننده تمایز عصبی از ریزمولکول پورمورفامین استفاده شد. در مطالعه پیشین انجام شده توسط Ebrahimi-Barough و همکاران از سلول‌های بنیادی اندومتریال برای تمایز به نورون‌های حرکتی استفاده شده است اما در آن مطالعه از فاکتور سونیک هچ‌هاگ استفاده شده بود که در مطالعه حاضر به جای فاکتور سونیک هچ‌هاگ از کوچک مولکول پورمورفامین استفاده گردید. نتایج مطالعه حاضر مطابق با نتایج تمایز سلول‌های بنیادی اندومتریال به نورون حرکتی توسط فاکتور سونیک هچ‌هاگ بود.[۱٤] نتایج حاصل از مطالعه حاضر از نظر بیان نوفیلامنت NF و استیل

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2024-07-16]

کولین ترانسفراز Chat در سطح پروتیین و mRNA با کارهای انجام شده و پیش‌بینی‌های صورت گرفته همخوانی داشت.[۳۷-۳۲] نتایج مطالعه حاضر نشان داد که ۲۱ روز القای سلول‌های بنیادی اندومتر رحم انسان به‌وسیله‌ی محیط دارای ریزمولکول پورمورفامین، همانند تیمار با سونیک هچ‌هاگ سرنوشت سلولی را به‌سمت تمایز عصبی به پیش می‌برد به‌طوری که در پایان این دوره‌ی ۲۱ روزه بیان مارکرها و ژن‌های ویژه نورون حرکتی نوروفیلامان و استیل‌کولین ترانسفراز وجود داشت.

در یک مطالعه از سلول‌های بنیادی مزانشیمی بندناف برای تمایز به نورون‌های حرکتی با استفاده از پورمورفامین استفاده شد. نتایج نشان داد که پورمورفامین توان تمایز دادن سلول‌های بندناف را به نورون حرکتی دارد که این مطالعه در محیط دو بعدی و سه بعدی انجام شده است.[۳۷]

در این مطالعه نیز از مارکرهای نوروفیلامنت و استیل‌کولین ترانسفراز برای اثبات نورون حرکتی تمایز یافته استفاده شد که مطالعه حاضر نیز مطابق با مطالعه انجام شده می‌باشد.[۳۷] در مطالعه حاضر از سلول‌های بنیادی اندومتریال استفاده شد و تمایز در محیط دو بعدی صورت گرفت و با معرفی ریزمولکول پورمورفامین به‌عنوان یک جایگزین مناسب برای سیگنالینگ سونیک هچ‌هاگ، راهکار مناسبی برای تمایز آسان‌تر سلول‌های بنیادی به سلول‌های عصبی معرفی نمود. در مطالعه دیگر انجام شده توسط Ebrahimi-Barough و همکاران نشان داده‌اند که سلول‌های بنیادی اندومتریال قدرت تمایز به نورون حرکتی را با استفاده از کوچک مولکول ly294002 دارد.[۱۶] در نهایت بر اساس یافته‌های تحقیق حاضر می‌توان نتیجه گرفت که ریزمولکول پورمورفامین توانایی القای تمایز سلول‌های بنیادی اندومتر رحم به سلول‌های عصبی، به‌ویژه نورون‌های حرکتی را دارد.

سپاسگزاری: این مقاله حاصل بخشی از پایان‌نامه تحت عنوان "تمایز سلول‌های بنیادی اندومتریال رحم به سلول‌های عصبی با استفاده از کوچک مولکول پورمورفامین" مصوب دانشگاه خوارزمی در سال ۱۳۹٤ می‌باشد که با حمایت گروه مهندسی بافت و علوم سلولی کاربردی دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی تهران اجرا شده است.

References

1. Hombach-Klonisch S, Panigrahi S, Rashedi I, Seifert A, Alberti E, Pocar P, et al. Adult stem cells and their trans-differentiation potential--perspectives and therapeutic applications. *J Mol Med (Berl)* 2008;86(12):1301-14.
2. Lakshmipathy U, Verfaillie C. Stem cell plasticity. *Blood Rev* 2005;19(1):29-38.
3. Sakaki-Yumoto M, Katsuno Y, Derynck R. TGF-β family signaling in stem cells. Biochimica et biophysica acta. *Biochim Biophys Acta* 2013;1830(2):2280-96.
4. Ding S, Schultz PG. A role for chemistry in stem cell biology. *Nat Biotechnol* 2004;22(7):833-40.
5. Raufi A, Amini A, Azadbakht M, Nikkhoo B, Aboozari M, Fathi F . In vitro differentiation of human umbilical vein mesenchymal stem cells into hepatocyte-like cells. *Sci Iran Blood Transfus Organ* 2011;8(2):79-87.
6. da Silva Meirelles L, Chagastelles PC, Nardi NB. Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues. *J Cell Sci* 2006;119(Pt 11):2204-13.
7. Navaei-Nigjeh M, Amoabedini G, Noroozi A, Azami M, Asmani MN, Ebrahimi-Barough S, et al. Enhancing neuronal growth from human endometrial stem cells derived neuron-like cells in three-dimensional fibrin gel for nerve tissue engineering. *J Biomed Mater Res A* 2014;102(8):2533-43.
8. Ma S, Xie N, Li W, Yuan B, Shi Y, Wang Y. Immunobiology of mesenchymal stem cells. *Cell Death Differ* 2014;21(2):216-25.
9. Gargett CE, Schwab KE, Zillwood RM, Nguyen HP, Wu D. Isolation and culture of epithelial progenitors and mesenchymal stem cells from human endometrium. *Biol Reprod* 2009;80(6):1136-45.
10. Schwab KE, Gargett CE. Co-expression of two perivascular cell markers isolates mesenchymal stem-like cells from human endometrium. *Hum Reprod* 2007;22(11):2903-11.
11. Ai J, Shahverdi AR, Barough SE, Kouchesfehani HM, Heidari S, Roozafzoon R, et al. Derivation of Adipocytes from Human Endometrial Stem Cells (EnSCs). *J Reprod Infertil* 2012;13(3):151-7.
12. Song H, Chang W, Sang B, Hwang K. Specific differentiation of mesenchymal stem cells by small molecules. *Am J Stem Cells* 2012;1(1):22-30.
13. Roberg-Larsen H, Strand MF, Krauss S, Wilson SR. Metabolites in vertebrate Hedgehog signaling. *Biochem Biophys Res Commun* 2014;446(3):669-74.
14. Ebrahimi-Barough S, Norouzi Javidan A, Saberi H, Joghataei MT, Rahbarghazi R, Mirzaei E, et al. Evaluation of motor neuron-like cell differentiation of hEnSCs on biodegradable PLGA nanofiber scaffolds. *Mol Neurobiol* 2015;52(3):1704-13.
15. Verdi J, Tan A, Shoae-Hassani A, Seifalian AM. Endometrial stem cells in regenerative medicine. *J Biol Eng* 2014;8:20.
16. Ebrahimi-Barough S, Hoveizi E, Yazdankhah M, Ai J, Khakbiz M, Faghihi F, et al. Inhibitor of PI3K/Akt signaling pathway small molecule promotes motor neuron differentiation of human endometrial stem cells cultured on electrospun biocomposite polycaprolactone/collagen scaffolds. *Mol Neurobiol* 2016 Mar 18.
17. Gargett CE, Masuda H. Adult stem cells in the endometrium. *Mol Hum Reprod* 2010;16(11):818-34.
18. Schwab KE, Chan RW, Gargett CE. Putative stem cell activity of human endometrial epithelial and stromal cells during the menstrual cycle. *Fertil Steril* 2005;84 Suppl 2:1124-30.

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2024-07-16]

19. Hoveizi E, Tavakol S, Ebrahimi-Barough S. Neuroprotective effect of transplanted neural precursors embedded on PLA/CS scaffold in an animal model of multiple sclerosis. *Mol Neurobiol* 2015;51(3):1334-42.
20. Ebrahimi-Barough S, Hoveizi E, Norouzi Javidan A, Ai J. Investigating the neuroglial differentiation effect of neuroblastoma conditioned medium in human endometrial stem cells cultured on 3D nanofibrous scaffold. *J Biomed Mater Res A* 2015;103(8):2621-7.
21. Ai J, Shahverdi AR, Ebrahimi S, Mohseni Kouchesfehani H, Heidari S, Roozafzoon R, et al. Derivation of adipocytes from human endometrial stem cells (EnSCs), *J Reprod Infertil* 2012;13(3):151-7.
22. Niknamasl A, Ostad SN, Soleimani M, Azami M, Salmani MK, Lotfibakhshaiesh N, et al. A new approach for pancreatic tissue engineering: human endometrial stem cells encapsulated in fibrin gel can differentiate to pancreatic islet beta-cell. *Cell Biol Int* 2014;38(10):1174-82.
23. Baheiraei N, Yeganeh H, Ai J, Gharibi R, Ebrahimi-Barough S, Azami M, et al. Preparation of a porous conductive scaffold from aniline pentamer-modified polyurethane/PCL blend for cardiac tissue engineering. *J Biomed Mater Res A* 2015;103(10):3179-87.
24. Woodbury D, Schwarz EJ, Prockop DJ, Black IB. Adult rat and human bone marrow stromal cells differentiate into neurons. *J Neurosci Res* 2000;61(4):364-70.
25. Taha MF, Javeri A, Kheirkhah O, Majidizadeh T, Khalatbary AR. Neural differentiation of mouse embryonic and mesenchymal stem cells in a simple medium containing synthetic serum replacement. *J Biotechnol* 2014;172:1-10.
26. Choi YK, Cho H, Seo YK, Yoon HH, Park JK. Stimulation of sub-sonic vibration promotes the differentiation of adipose tissue-derived mesenchymal stem cells into neural cells. *Life Sci* 2012;91(9-10):329-37.
27. Yan ZJ, Hu YQ, Zhang HT, Zhang P, Xiao ZY, Sun XL, et al. Comparison of the neural differentiation potential of human mesenchymal stem cells from amniotic fluid and adult bone marrow. *Cell Mol Neurobiol* 2013;33(4):465-75.
28. Zhao P, Ise H, Hongo M, Ota M, Konishi I, Nikaido T. Human amniotic mesenchymal cells have some characteristics of cardiomyocytes. *Transplantation* 2005;79(5):528-35.
29. Kim EY, Lee KB, Kim MK. The potential of mesenchymal stem cells derived from amniotic membrane and amniotic fluid for neuronal regenerative therapy. *BMB Rep* 2014;47(3):135-40.
30. Wolff EF, Gao XB, Yao KV, Andrews ZB, Du H, Elsworth JD, et al. Endometrial stem cell transplantation restores dopamine production in a Parkinson's disease model. *J Cell Mol Med* 2011;15(4):747-55.
31. Ebrahimi-Barough S, Ai J, Mohseni Kouchesfahani H, Nabiyuni M. Isolation and characterization of human endometrial stem cells and evaluation of their differentiation potential. *J Exp Biol* 2012;4:12-28.
32. Fu L, Zhu L, Huang Y, Lee TD, Forman SJ, Shih C-C. Derivation of neural stem cells from mesenchymal stem cells: evidence for a bipotential stem cell population. *Stem Cells Dev* 2008;17(6):1109-21.
33. Wu B, LI W, Wang L, Liu ZH, Zhao XY. Stem cells and small molecule screening: haploid embryonic stem cells as a new tool. *Acta Pharmacol Sin* 2013;34(6):725-31.
34. Schugar RC, Robbins PD, Deasy BM. Small molecules in stem cell self-renewal and differentiation. *Gene Ther* 2008;15(2):126-35.
35. Faghihi F, Baghaban Eslaminejad M, Nekookar A, Najar M, Salekdeh GH. The effect of purmorphamine and sirolimus on osteogenic differentiation of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Biomed Pharmacother* 2013;67(1):31-8.
36. Lu B, Atala A. Small molecules and small molecule drugs in regenerative medicine. *Drug Discov Today* 2014;19(6):801-8.
37. Bahrami N, Bayat M, Mohamadnia A, Khakbiz M, Yazdankhah M, Ai J, et al. Purmorphamine as a Shh signaling activator small molecule promotes motor neuron differentiation of mesenchymal stem cells cultured on nanofibrous PCL scaffold. *Mol Neurobiol* 2016 Sep 14.

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2024-07-16]

TUMJ Tehran University Medical Journal, March 2017; Vol. 74, No. 12: 861-868 Original Article

Differentiation of endometrial stem cells into motor neurons by the use of purmorphamin small molecule

Homa Mohseni Kouchesfahani Ph.D.[1*]
Somayeh Ebrahimi-Barough Ph.D.[2]
Jafar Ai Ph.D.[2]
Azam Rahimi M.Sc.[3]

1- Department of Animal Biology, School of Biological Sciences, Kharazmi University, Tehran, Iran.
2- Department of Tissue Engineering and Applied Cell Sciences, School of Advance Technologies in Medicine, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran.
3- Department of Animal Biology, Cell & Developmental Biology, School of Biological Sciences, Kharazmi University, Tehran, Iran.

[*]Corresponding author: Kharazmi University, No. 43, Shahid Mofatteh Ave., Tehran, Iran.
Tel: +98- 21- 86072709
E-mail: kouchesfehani@yahoo.com

Abstract

Received: 18 Dec. 2016 Revised: 09 Mar. 2017 Accepted: 17 Mar. 2017 Available online: 18 Mar. 2017

Background: Small molecule Purmorphamin (PMA) is the agonist of smoothened protein in Sonic hedgehog (Shh) signaling pathway. Effect of purmorphamin small molecule on differentiation of mesenchymal cells into bone tissue has been studied previously. Use of Shh causes progression of neural differentiation, and the differentiated cells express specific neural markers. Neurofilament (NF) and acetylcholine esterase (Chat) are specific markers of motor neurons and their expression in differentiated cells indicates their conversion into motor neurons. The aim of this study was to evaluate the ability of PMA to differentiate the human endometrial stem cells (hEnSCs) into motor neurons.

Methods: This analytical study was done in Tehran University of Medical Sciences laboratory on September of 2015. In this study hEnSCs were enzymatically extracted from endometrial tissue. After third passages, the flow cytometry was done for mesenchymal stem cells markers. The mesenchymal stem cells were divided into control and differentiated groups. FBS 10%+DMEM/F12 was added to the culture medium of control group and the differentiating group was treated with differentiating medium containing N2, PMA, DMEM/F12, FBS, B27, IBMX, 2ME, FGF2, RA, BDNF. After 21 days immunocytochemistry (ICC) test was done for the expression of NF and Chat proteins and Real-time PCR analysis for expression of neural markers such as NF, Chat, Nestin and GFAP (as glial marker) at mRNA level.

Results: The flow cytometry analysis showed that hEnSCs were positive for mesenchymal markers CD90, CD105 and CD146 and negative for endothelial marker CD31, and hematopoietic marker CD34. The immunocytochemistry and Real time-PCR results showed that the cells treated with PMA expressed motor neuron markers of NF and Chat.

Conclusion: According to the results of this study, it can be concluded that small molecule PMA has the potency to induce the differentiation of hEnSCs into neural cells, specifically motor neurons by activating Shh signaling pathway.

Keywords: differentiation, endometrial stem cells, purmorphamin, sonic hedgehog pathway.

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2024-07-16]