تأثیر محیط رویی سلول بنیادی مزانشیمی بر بیان ژن‌های تولید کلاژن سلول فیبروبلاست موش

مجید مؤمنی‌مقدم[1*]، رؤیا غلامی[2]

۱. استادیار سلولی مولکولی، گروه زیست‌شناسی، دانشکدهٔ علوم پایه، دانشگاه حکیم سبزواری، سبزوار، ایران
۲. دستیار تخصصی پزشکی خانواده، دانشگاه علوم پزشکی شیراز، شیراز، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۱۲/۱۶
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۰۹/۲۶

چکیده

زمینه و هدف سنتز کلاژن توسط سلول‌های فیبروبلاست به‌طور مستقیم در ترمیم بهینهٔ زخم نقش دارد؛ چراکه ایجاد این ماتریکس خارج‌سلولی به‌عنوان بستر مناسبی جهت جایگیری دیگر سلول‌ها بسیار اهمیت دارد؛ بنابراین هرگونه عاملی که بیان ژن کلاژن را تشدید کند، در مبحث ترمیم مورد توجه خواهد بود. در این پژوهش، اثر محیط رویی سلول بنیادی مزانشیمی بر بیان ژن‌های تولید کلاژن سلول فیبروبلاست موش بررسی شد.

مواد و روش‌ها از کشت سلول‌های مزانشیمی انسان جهت تهیهٔ فاکتورهای مؤثر استفاده شد. در این پژوهش، آزمایش‌ها بر روی سلول‌های فیبروبلاستی موش انجام گرفت و درنهایت با بررسی رشد سلول‌ها و واکاوی مولکولی بیان ژن‌های مؤثر، تأثیرات تأیید شد.

یافته‌ها ابتدا مقدار پروتئین تام محلول رویی توسط روش برد ـ فورد اندازه‌گیری شد. براساس منحنی استاندارد حاصل از پروتئین معین آلبومین سرم گاوی (**BSA**) این مقدار ۴۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر برآورد شد. در تست سمیت با روش **MTT** سمیت **OD** در غلظت‌های بالا منجر به سمیت نبود؛ اما در غلظت‌های رقیق‌تر افزایش رشد بیشتری را نشان داد. این مقدار در غلظت ۴۰ و ۲۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر نسبت به گروه کنترل کاملا معنادار بود.

نتیجه‌گیری بررسی نتایج تأثیر مایع رویی سلول‌های بنیادی انسانی تأییدکنندهٔ اثربخشی ترمیمی این مایع بوده و برطبق نتایج آزمایش‌های پژوهش حاضر، این مایع رویی هم رشد سلول‌های فیبروبلاست را تحریک می‌کند و هم می‌تواند به‌طور اثربخشی بیان ژن‌های تولیدکنندهٔ کلاژن را به مقدار زیادی افزایش دهد. از این خاصیت می‌توان با رعایت نکات کلینیکی در درمان زخم‌ها بهره برد؛ به‌خصوص زخم‌های گسترده‌تری که نیازمند مدیریت بالینی بیشتر هستند.

کلیدواژه‌ها:
ترمیم زخم، سلول بنیادی، کلاژن، فیبروبلاست.

۱. مقدمه

سلول‌های بنیادی سلول‌هایی با توانایی منحصربه‌فرد خودنوزایی و تمایز هستند که به‌طور گسترده‌ای در بافت‌ها و اندام‌های بدن پراکنده شده‌اند و وظیفهٔ حفظ و حمایت از بافت‌های بدن را برعهده دارند [۱]. یکی از اندام‌هایی که به‌طور مرتب به بازسازی و نوسازی نیاز دارد، پوست است. پوست بزرگ‌ترین اندام بدن است و هرگونه تغییر و تخریب در ساختار و عملکرد آن منجر به عفونت در بدن می‌شود و همچنین کاهش عملکرد صحیح بدن را به‌دنبال دارد [۲]. درعین حال، سلول‌های فیبروبلاست به‌طور اختصاصی می‌توانند در هنگام نیاز، مواد زمینه‌ای لازم برای ترمیم را تولید کنند. درواقع فیبروبلاست‌ها سلول‌های کلیدی درگیر در تولید ماتریکس خارج‌سلولی هستند. این سلول‌ها به همین دلیل نقش بسیار مهمی در ترمیم پوست آسیب‌دیده و بهبود زخم در پوست ایفا می‌کنند [۳]. اندکی پس

* **نویسندهٔ مسئول: مجید مؤمنی‌مقدم**
نشانی: گروه زیست‌شناسی، دانشکدهٔ علوم پایه، دانشگاه حکیم سبزواری، سبزوار، ایران

تلفن: ۰۵۱۴۴۰۱۳۳۳۶ **دورنگار:**
رایانه: Iranbioman@yahoo.com
شناسه ORCID: 0000-0001-8372-1310
شناسه ORCID نویسندهٔ اول: 0000-0001-8372-1310

مجلهٔ علمی ـ پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی سبزوار، دورهٔ ۲۶، شمارهٔ ۵، آذر و دی ۱۳۹۸، ص۶۵۱ـ۶۵۶
آدرس سایت: http://jsums.medsab.ac.ir رایانامه: journal@medsab.ac.ir
شاپای چاپی: ۷۴۸۷-۱۶۰۶

از ایجاد زخم، محل زخم غنی از فیبروبلاست‌هایی می‌شود که تولید کلاژن و فیبرونکتین می‌کنند که منجر به تشکیل بافت فیبروزی می‌شود. این بافت حاوی انواع مختلفی از پروتئین کلاژن است که به مرور زمان، تغییر آرایش ماتریکس خارج‌سلولی و تولید مناسب رشته‌های کلاژن ترمیم ملایم زخم را به‌همراه دارد [۴ـ۵]. در این مرحله از ترمیم، مقدار کلاژن نوع III بر نوع I غالب است و باعث استحکام کششی بافت‌های تازه‌تشکیل‌شده می‌شود که دارای جهت‌گیری فضایی تصادفی است [۶]. کلاژن نوع V نیز مورد نیاز است. وجود این کلاژن تشکیل فیبریل‌های اصلی کلاژن را تشدید و تنظیم می‌کند [۷]. هرگونه مشکل در این روند منجر به ایجاد بافت توده‌ای‌شکل، اسکار و فیبروز خواهد بود که در محل به‌جای می‌ماند. سلول‌های بنیادی مزانشیمی نیز پس از ایجاد زخم تحت تأثیر سیگنال‌های پاراکرین از جانب ماکروفاژها به محل زخم مهاجرت می‌کنند و می‌توانند در مراحل انتهایی ترمیم در بازسازی هرچه بهتر محل با تمایز به سلول‌های کراتینوسیت و همچنین توسط رها کردن مواد و سیگنال‌های مؤثری که هنوز به‌خوبی شناخته نشده‌اند، مؤثر باشند [۱، ۸]. از این رو با توجه به اینکه سنتز کلاژن یکی از مهم‌ترین مراحل در تشکیل ماتریکس خارج‌سلولی مناسب در ترمیم زخم است و می‌توان با القای بهتر و کنترل این فرایند ترمیم زخم را تسریع و بهبود بخشید، در این پژوهش تأثیر مایع رویی محیط کشت سلول‌های بنیادی مزانشیمی انسانی بر بیان تعدادی از ژن‌های کلاژن در سلول فیبروبلاست موشی بررسی شد.

۲. مواد و روش‌ها

کشت سلول‌های بنیادی مزانشیمی انسان: این سلول‌ها در جهاد دانشگاهی مشهد از نمونه‌های چربی حاصل لیپوساکشن به‌دست آمد و پس از احراز هویت در این آزمایش مورد استفاده قرار گرفت. این سلول‌ها در محیط کشت DMEM در شرایط دمایی ۳۷ درجه سانتی‌گراد و ۵٪ دی‌اکسیدکربن نگه‌داری شدند.

کشت سلول‌های فیبروبلاست موش: ردهٔ سلولی *NIH 3T3* به‌عنوان سلول فیبروبلاست موشی در محیط کشت DMEM تحت شرایط دمایی ۳۷ درجه سانتی‌گراد و ۵٪ دی‌اکسیدکربن رشد داده و نگه‌داری شدند.

استحصال مایع رویی کشت سلول بنیادی و تعیین غلظت: جهت برداشت مایع رویی از محیط بدون سرم استفاده شد و ۲۴ ساعت پس از تعویض محیط سلول‌های بنیادی مزانشیمی، از ۳ فلاسک T25 مقدار ۹ میلی‌لیتر محیط رویی آن برداشت شد و در ابتدا در دور ۱۲،۰۰۰ سانتریفیوژ شد تا دبریدمان و سلول‌ها رسوب یابند؛ سپس مایع رویی جمع‌آوری و جهت اطمینان از نبودِ دبریدمان توسط فیلتر سرنگی ۰/۴۵ میکرمتر فیلتر شد و در ویال‌های ۱/۵ میلی‌لیتری جمع‌آوری و در دمای ۷۰- درجه سانتی‌گراد فریز شد. مقداری از این عصاره توسط روش برد ـــ فورد و با استفاده از آلبومین سرم گاوی (BSA) به‌عنوان استاندارد غلظت‌سنجی شد.

بررسی عملکرد مایع رویی بر رشد سلول فیبروبلاستی: جهت بررسی در پلیت ۹۶ چاهکه، آزمون MTT با دوزهای متفاوت مایع رویی انجام شد. به‌ترتیب غلظت‌های ۴، ۸، ۲۰ و ۴۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر به‌عنوان تیمارها و همچنین بدون استفاده از مایع رویی به‌عنوان کنترل به‌کار گرفته و بر روی کشت سلول 3T3 اعمال و بین روزهای اول تا سوم بررسی شدند.

طراحی پرایمر: برای بررسی ژن‌ها طبق جدول ۱ پرایمرها طراحی شدند و پس از بررسی انفورماتیکی و تطبیقی به شرکت ماکروژن کره سفارش ساخت داده شد.

جدول ۱. توالی پرایمرها

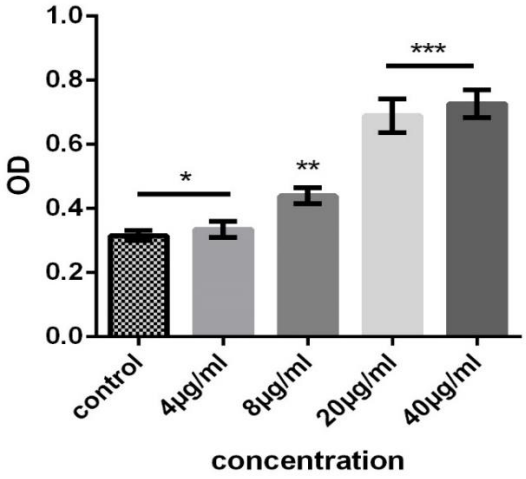
Series	primer name	Sequence	target organism	target gene
۱	m.b-actin/F	TTCTTTGCAGCTCCTTCGTT	Mus musculus	Actb
۲	m.b-actin/R	ATGGAGGGGAATACAGCCC	Mus musculus	Actb
۳	m.Col1a1/F	ACATGTTCAGCTTTGTGGACC	Mus musculus	Col1a1
۴	m.Col1a1R	GGTTTCCACGTCTCACCATT	Mus musculus	Col1a1
۵	m.Col3a1/F	GCTTTGTGCAAAGTGGAACC	Mus musculus	Col3a1
۶	m.Col3a1/R	TGGTTCTGGCTTCCAGACAT	Mus musculus	Col3a1
۷	m.Col5a1/F	CTGTCTTCGCCGCTACTCCT	Mus musculus	Col5a1
۸	m.Col5a1/F	AACCTGTGGTTTTCGTTACCC	Mus musculus	Col5a1

بررسی بیان ژن‌های کلاژن: برای بیان ژن‌ها پس از استخراج RNA کل از سلول‌ها (با استفاده از محلول tripure Bioneer)، سنتز cDNA توسط پرایمر oligodT انجام شد (کیت سنتز شرکت TAKARA) و در ابتدا بهرهٔ پرایمرها

محاسبه شد و سپس آزمایش real-time PCR (کیت سایبرگرین تکاپوزیست) برای نمونه‌ها اجرا گردید.

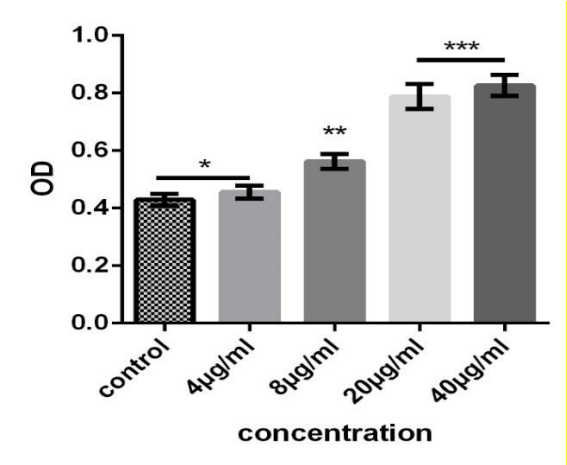
۳. یافته‌های پژوهش

ابتدا مقدار پروتئین تام محلول رویی توسط روش برد ـــــ فورد اندازه‌گیری شد. براساس منحنی استاندارد حاصل از پروتئین معین آلبومین سرم گاوی (BSA)، این مقدار ۴۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر برآورد شد. در تست سمیت با روش MTT، سمیت OD در غلظت‌های بالا منجر به سمیت نبود؛ اما در غلظت‌های رقیق‌تر القا افزایش رشد بیشتری را نشان داد. این مقدار در غلظت ۴۰ و ۲۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر در مقایسه با گروه کنترل کاملاً معنادار بود؛ اما خود این دو غلظت از نظر بررسی آماری تفاوت معناداری را نشان ندادند؛ گرچه در گروه ۴۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر اندکی رشد بیشتر بود. همچنین در رقیق‌ترین غلظت، یعنی ۴ میکروگرم در لیتر که حاوی رقت ده‌برابری مایع رویی بود، در مقایسه با گروه کنترل تفاوت معناداری مشاهده نشد. در گروه ۸ میکروگرم بر میلی‌لیتر در مقایسه با گروه کنترل تفاوت کاملاً معنادار رؤیت شد. همچنین این گروه به‌طور معناداری با دو گروه غلیظ‌تر، یعنی ۲۰ و ۴۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر، تفاوت نشان داد (شکل ۱ و ۲). در بحث بررسی بیان ژن‌ها، هر سه ژن کلاژن انتخاب‌شده نسبت به گروه کنترل افزایش بیان را نشان دادند (شکل ۳).



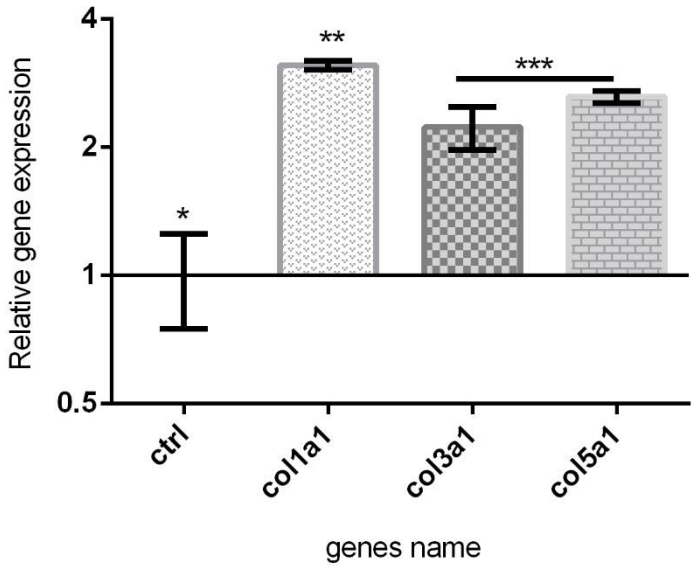
شکل ۱. نتایج بررسی روز اول اثر مایع رویی کشت سلول‌های بنیادی بر روی فیبروبلاست با روش MTT

محور عمودی مقدار جذب دستگاه اسپکتروفتومتر؛ محور افقی غلظت‌ها؛ ستاره‌ها مقدار معنادار بودن نتایج برحسب تحلیل واریانس یک‌عامله و آزمون توکی



شکل ۲. نتایج بررسی روز سوم اثر مایع رویی کشت سلول‌های بنیادی بر روی فیبروبلاست با روش MTT

محور عمودی مقدار جذب دستگاه اسپکتروفتومتر؛ محور افقی غلظت‌ها؛ ستاره‌ها مقدار معنادار بودن نتایج برحسب تحلیل واریانس یک‌عامله و آزمون توکی



شکل ۳. نتایج بررسی کمّی بیان ژن‌های کلاژن I، III و V

محور عمودی میزان تغییرات برحسب relative gene expression و محور افقی تیمارهای ۲۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر را درمورد ژن‌های کلاژن نشان می‌دهد. در این بررسی مشخص شد که این کلاژن‌ها نسبت به گروه کنترل به‌طور معناداری افزایش یافته‌اند؛ همچنین کلاژن نوع ۱ نسبت به دو کلاژن دیگر افزایش معناداری داشته است ($p<0.05$). معناداری با ستاره‌های مختلف نمایش داده شده است.

آنالیزها توسط نرم‌افزار پریزم صورت گرفت و گراف‌ها بر همین اساس و ارزش معناداری رسم شد.

۴. بحث و نتیجه‌گیری

سنتز کلاژن توسط سلول‌های فیبروبلاست به‌طور مستقیم در ترمیم زخم نقش دارد؛ زیرا ایجاد این ماتریکس خارج‌سلولی به‌عنوان بستر مناسب جهت جایگیری دیگر سلول‌ها بسیار اهمیت دارد. بنابراین هرگونه عامل تشدیدکنندهٔ بیان ژن کلاژن می‌تواند در مبحث ترمیم مورد توجه باشد. در این تحقیق، از مایع رویی کشت سلول بنیادی مزانشیمی استفاده شد که در پژوهش‌های متعددی به‌عنوان القاکنندهٔ رشد و تکثیر سلول‌ها مورد آزمایش واقع شده بود [۹-۱۱]. این موضوع به‌معنای ایجاد القای رشد و همچنین القای مهاجرت سلول‌هاست که هر دو می‌توانند در محل زخم بر سلول‌های فیبروبلاستی اثر القاکنندهٔ ترمیم را داشته باشند. بنابرین در گام اول نتایج تست MTT، با توجه به معنادار بودن غلظت ۲۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر این مایع رویی نسبت به گروه کنترل در ساعات ۲۴ و ۴۸ بعد از تیمار، نشان‌دهندهٔ تأثیر مثبت مایع رویی سلول‌های بنیادی مزانشیمی بر رشد سلول‌های فیبروبلاستی است.

در بخش مولکولی نیز نتایج بررسی بیان ژن‌های کلاژن به‌طور کلی نمودار اثر مثبت این مایع رویی بر تولید کلاژن توسط فیبروبلاست است. کلاژن نوع ۱ در ترمیم بسیاری از انواع زخم شناخته شده است [۴]. در این پژوهش نیز، با توجه به شکل ۱ و ۲، مایع رویی محیط کشت اثر مطلوبی بر رشد سلول‌ها داشته و مقدار بیان کلاژن نوع ۱، با توجه به آزمون ریل تایم، دارای افزایش معناداری ($p<0.05$) نسبت به گروه کنترل است.

همچنین در این تحقیق، ژن کلاژن ۳ مورد بررسی قرار گرفت. این ژن در بافت همبند بیان بالایی دارد و نقص آن می‌تواند موجِد بیماری‌های مختلفی شود [۱۲-۱۳]. بیان این ژن نیز افزایش معناداری را نسبت به گروه کنترل نشان داد ($p<0.05$)؛ اما به‌طور کلی نسبت به افزایش بیان کلاژن ۱، مقدار این افزایش به‌طور معناداری کمتر بود که نشان می‌دهد اهمیت کلاژن نوع ۱ بیشتر از کلاژن نوع ۳ است.

کلاژن نوع ۵ نیز در این پژوهش ارزیابی شد که رفتار مشابهی با کلاژن نوع ۱ و ۳ داشته و در گروه تیمار با ۲۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر افزایش بیان را نشان داده است. با توجه به حضور این کلاژن در بافت‌هایی که بیشتر نیاز به مقاومت دارند، می‌توان از این مورد در چنین بخش‌هایی بهره برد [۱۴].

بررسی نتایج تأثیر مایع رویی سلول‌های بنیادی انسانی تأییدکنندهٔ اثربخشی ترمیمی این مایع بوده است. برپایهٔ نتایج

آزمایش‌های این پژوهش، این مایع رویی هم رشد سلول‌های فیبروبلاست را تحریک می‌کند و هم می‌تواند به‌طور اثربخشی بیان ژن‌های تولیدکنندهٔ کلاژن را به مقدار زیادی افزایش دهد. از این خاصیت می‌توان با رعایت نکات کلینیکی در درمان زخم‌ها بهره گرفت؛ به‌خصوص زخم‌های گسترده‌تر که نیازمند مدیریت بالینی بیشتر هستند.

قدردانی و تشکر

در پایان نویسندگان از زحمات جناب آقای حجت نادری‌مشکین در بخش تحقیقات سلول‌های بنیادی جهاد دانشگاهی مشهد سپاس‌گزاری می‌کنند.

References

[1]. Timmers L, Lim SK, Hoefer IE, Arslan F, Lai RC, van Oorschot AA, et al. Human mesenchymal stem cell-conditioned medium improves cardiac function following myocardial infarction. Stem Cell Res. 2011; 6(3): 206-14.
[2]. Oh SY, Lee SJ, Jung YH, Lee HJ, Han HJ .Arachidonic acid promotes skin wound healing through induction of human MSC migration by MT3-MMP-mediated fibronectin degradation. Cell Death Dis. 2015; 6: e1750.
[3]. Chiarelli N, Carini G, Zoppi N, Ritelli M, Colombi M. Transcriptome analysis of skin fibroblasts with dominant negative COL3A1 mutations provides molecular insights into the etiopathology of vascular Ehlers-Danlos syndrome. PLoS One. 2018; 13(1): e0191220.
[4]. Almeida L, Oliveira J, Guimaraes LH, Carvalho EM, Blackwell JM, Castellucci L. Wound healing genes and susceptibility to cutaneous leishmaniasis in Brazil: role of COL1A1. Infect Genet Evol. 2015; 30: 225-29.
[5]. Li M, Luan F, Zhao Y, Hao H, Liu J, Dong L, et al. Mesenchymal stem cell-conditioned medium accelerates wound healing with fewer scars. Int Wound J. 2017; 14(1): 64-73.
[6]. Olczyk P, Mencner Ł, Komosinska-Vassev K. The role of the extracellular matrix components in cutaneous wound healing. BioMed research international. 2014; 2014.
[7]. Christner PJ, Ayitey S. Extracellular matrix containing mutated fibrillin-1 (Fbn1) down regulates Col1a1, Col1a2, Col3a1, Col5a1, and Col5a2 mRNA levels in Tsk/+ and Tsk/Tsk embryonic fibroblasts. Amino Acids. 2006; 30(4): 445-51.
[8]. Peng KY, Liu YH, Li YW, Yen BL, Yen ML. Extracellular matrix protein laminin enhances mesenchymal stem cell (MSC) paracrine function through alphavbeta3/CD61 integrin to reduce cardiomyocyte apoptosis. J Cell Mol Med. 2017; 21(8): 1572-83.
[9]. Abedi A, Azarnia M, Jamali Zahvarehy M, Foroutan T, Golestani S. Effect of Different Times of Intraperitoneal Injections of Human Bone Marrow Mesenchymal Stem Cell Conditioned Medium on Gentamicin-Induced Acute Kidney Injury. Urol J. 2016; 13(3): 2707-16.
[10]. Chen J, Li Y, Hao H, Li C, Du Y, Hu Y, et al. Mesenchymal Stem Cell Conditioned Medium Promotes Proliferation and Migration of Alveolar Epithelial Cells under Septic Conditions In Vitro via the JNK-P38 Signaling Pathway. Cell Physiol Biochem. 2015; 37(5): 1830-46.
[11]. Chen Q, Liang Q, Zhuang W, Zhou J, Zhang B, Xu P, et al. Tenocyte proliferation and migration promoted by rat bone marrow mesenchymal stem cell-derived conditioned medium. Biotechnol Lett. 2018; 40(1): 215-24.
[12]. Eder J, Laccone F, Rohrbach M, Giunta C, Aumayr K, Reichel C, et al. A new COL3A1 mutation in Ehlers-Danlos syndrome type IV. Exp Dermatol. 2013; 22(3): 231-4.
[13]. Lv W, Lin Y, Song W, Sun K, Yu H, Zhang Y, et al. Variants of COL3A1 are associated with the risk of stroke recurrence and prognosis in the Chinese population: a prospective study. J Mol Neurosci. 2014; 53(2): 196-203.
[14]. Henney AM, Tsipouras P, Schwartz RC, Child AH, Devereux RB, Leech GJ. Genetic evidence that mutations in the COL1A1, COL1A2, COL3A1, or COL5A2 collagen genes are not responsible for mitral valve prolapse. Br Heart J. 1989; 61(3): 292-99.

The Effect of the Mesenchymal Stem Cell Conditioned Media on Mouse Fibroblast Collagen Gene Expression

Madjid Momeni-Moghaddam[1*], Roya Gholami[2]

1. Assistant professor, Department of Biology, faculty of Sciences, Hakim Sabzevari University, Sabzevar, Iran
2. MD, resident, Shiraz Medical University, Shiraz, Iran

Abstract

Introduction: The synthesis of collagen by fibroblast cells is directly involved in optimal wound healing because it is important to create this extracellular matrix as a suitable substrate for the incorporation of other cells, so any factor that may enhance collagen gene expression may be of interest in the healing context. In this study, we evaluated the effect of mesenchymal stem cell conditioned media on expression of mouse fibroblast cell collagen genes..

Methods: Cultures of human mesenchymal cells were used to produce effective factors. This effect was also performed on mouse NIH 3T3 fibroblast cells and finally confirmed by cell growth and molecular analysis of expression of effector genes.

Results: In this study, the amount of total protein of supernatant was measured by the Brad-Ford method, based on the standard curve of bovine serum albumin (BSA) protein of 40 µg / ml. In the MTT toxicity test, OD toxicity at high concentrations did not lead to toxicity, but showed a higher growth than the diluted ones, this value being significantly higher at 40 and 20 µg / ml than in the control group.

Conclusion: Evaluation of the effects of human stem cell supernatant confirms the restorative efficacy of this fluid. According to the results, this conditioned media stimulates both the growth of fibroblast cells and can effectively express the expression of collagen genes this property can be exploited by clinical observations in the treatment of wounds, especially wounds that require more clinical management.

Received: 2018/03/07
Accepted: 2018/12/17

Keywords: Wound healing, Stem cell, Collagen, Fibroblast.