تاریخ چاپ تابستان ۱۳۹۲

بررسی اثرات زهر زنبورعسل و ویتامین D3 بر سلول‌های بنیادی مزانشیمی بندناف و تمایز به سمت استئوبلاست

*محمد نبیونی؛ دانشگاه خوارزمی، دانشکدهٔ علوم زیستی
عبدالحسین شیروی، الهام عظیمی؛ دانشگاه آزاد اسلامی واحد دامغان، دانشکدهٔ علوم
زهرا نظری؛ دانشگاه خوارزمی، دانشکدهٔ علوم زیستی

چکیده

بند ناف از مهم‌ترین منابع سلول‌های بنیادی مزانشیمی است. این سلول‌ها در صورتی که تحت شرایط خاص قرار گیرند، توان تمایز به بافت‌های مختلف را دارند. در پژوهش‌های گذشته اثر تمایزی ویتامین D3 بر روی سلول‌های بنیادی استخوان اثبات شده است. همچنین نشان داده شده است که زهر زنبور (BV) سبب تمایز سلول‌های سرطانی می‌گردد. در بررسی حاضر اثر تمایزی BV و ویتامین D3 بر روی سلول‌های بنیادی بند ناف استئوبلاست بررسی شد. برای انجام این تحقیق بافت‌های بندناف حاصل از ۱۲-۱۰ جنین موش پس از هضم آنزیمی در محیط DMEM کشت داده شدند. برای اثبات بنیادی بودن این سلول‌ها فاکتور OCT4 جنینی و برای اثبات مزانشیمی بودن آن‌ها حضور مارکرهای سطحی CD29، CD44 و CD73 به‌روش فلوسیتومتری بررسی شد. نتایج بیان بالای فاکتورهای فوق را در این سلول‌ها نشان داد. پس از پاساژ دوم، برای بررسی تمایز، سلول‌ها با غلظت‌های مختلف BV، ویتامین D3 و هم افزایی این دو ترکیب به‌مدت ۲۱ روز تیمار شدند. در ابتدا برای به‌دست آوردن دوزهای مناسب BV، اثرات کشندگی آن بر سلول‌ها با روش MTT بررسی شد و مشخص شد که BV در غلظت‌های بیش‌تر از ۶μg/ml موجب مهار رشد سلول‌های مزانشیمی می‌گردد. سپس سطح کلسیم سلول‌ها توسط رنگ‌آمیزی آلیزارین‌رد بررسی شد. علاوه بر این میزان آلکالین فسفاتاز به‌عنوان یک مارکر استخوانی اندازه‌گیری شد. با استفاده از رنگ‌آمیزی آلیزارین‌رد و تست آلکالین فسفاتاز اثبات شد که BV با غلظت‌های غیرسمی (۲μg/ml، ۴μg/ml و ۶μg/ml) موجب تمایز اندکی در سلول‌های بنیادی بند ناف به سمت استخوان موجب می‌شود. در صورتی که استفاده توأم BV با ویتامین D3 موجب افزایش قدرت تمایزی این ویتامین می‌گردد. در نتیجه، پیشنهاد می‌شود سلول‌های بنیادی بند ناف در صورتی که تحت تیمار همزمان BV و ویتامین D3 قرار بگیرند توانایی تمایز به سمت سلول‌های استخوان ساز را داشته و در نتیجه می‌توانند در سلول درمانی کاربرد داشته باشند.

واژه‌های کلیدی: سلول‌های بنیادی مزانشیمی، زهر زنبورعسل، ویتامین D3، استئوبلاست.
دریافت ۹۱/٤/۲٦ پذیرش ۹۱/۱۲/۸
*نویسنده مسئول nabiuni@tmu.ac.ir

[Downloaded from system.khu.ac.ir on 2024-05-19]

مقدمه

سلول‌های بنیادی سلول‌های اولیه‌ای هستند که دارای دو ویژگی مهم یعنی پرتوانی و خودنوسازی هستند. منابع اصلی این سلول‌ها شامل مغز استخوان، بندناف و جفت است [۱]. محققان برای اهداف درمانی و پژوهشی از سلول‌های بنیادی جنینی و بالغ استفاده می‌کنند. سلول‌های بنیادی مزانشیمی سلول‌های چند توانی هستند که قابلیت تمایز به انواع دودمان‌های بافت همبند از جمله آدیپوسیت، کندروسیت و استئوسیت را دارند [۲]. در میان منابع سلول‌های بنیادی مزانشیمی می‌توان به خون بند ناف، بافت مغز استخوان، پانکراس، کبد، بافت چربی و مایع آمنیوتیک اشاره کرد [۳]. درمان‌هایی که با انواع سلول‌های بنیادی انجام گرفته است غالباً آنتی‌ژنیک نیستند و می‌توانند بدون هر گونه تأثیر متقابل، پس‌زنی، عدم جواب به درمان دارویی یا هر گونه تأثیر سوءجانبی به هر بیماری، اعمال شوند [۴]. ازهمین رو، سلول‌های مذکور در درمان بیماری‌هایی نظیر ضعف سیستم ایمنی، سرطان، ایدز، دیابت، اسکلروزیس، فلج مغزی، التهاب و درد مفاصل و بیماری کرونیک کاربرد دارند [۵]. خون بند ناف به‌عنوان منبعی غنی از سلول‌های بنیادی می‌تواند برای پیوند سلول‌های بنیادی خون‌ساز به‌جای مغز استخوان به‌کار رود. بیماری‌هایی نظیر اختلالات سیستم ایمنی مادرزادی، نقص ارثی پلاکتی، آلزایمر، دیابت، پارکینسون، صدمات نخاعی، سکته‌های قلبی و مغزی، بیماری‌های کبدی و دیستروفی عضلانی با استفاده از سلول‌های بنیادی خون بندناف قابل درمان هستند [٦]، [۷]. استخوان بافتی پیوندی است که به‌همراه غضروف اسکلت بدن را تشکیل می‌دهد. این بافت از سلول‌های استئوسیت و ماتریکس استخوانی تشکیل شده است. استئوسسیت‌ها سلول‌های تمایز یافته‌ای هستند که شاخص‌های استئوکلسین، استئوپونتین، آلکالین فسفاتاز استخوانی را بیان می‌کنند. یکی از ویژگی‌های تمایز استئوبلاستی ایجاد کلسیم است [۸]. هدف این تحقیق جداسازی سلول‌های بنیادی مزانشیمی از بند ناف و تمایز آزمایشگاهی این سلول‌ها به سلول‌های استئوبلاستی با استفاده از فاکتورهای تمایزی و در نهایت بررسی کارایی تمایزی این فاکتورها با استفاده از مارکرهای مولکولی شامل رنگ‌آمیزی آلیزلرین‌رد و بررسی سطح آلکالین فسفاتاز است. ۲۵- هیدروکسی ویتامین D3 نوعی ویتامین محلول در چربی است که در پیش‌برد رشد و تراکم استخوان نقش مهمی را ایفا می‌کند. پژوهش‌های قبلی نشان داده‌اند که ویتامین D_3 علاوه بر نقش مهم خود در هموستازی کلسیم در بدن دارای توانایی ضدتکثیری و تمایزی است [۹]. از آن‌جا که به‌کار بردن غلظت‌های بالای این ویتامین سمی است و همچنین باعث به‌وجود آمدن اثرات جانبی افزایش غلظت یون کلسیم می‌شود، برای مقابله با این محدودیت راه‌کارهایی ارائه شده است، از جمله این‌که موادی همراه با غلظت‌های کم ویتامین D_3 به‌کار برده شود تا اثرات تمایزی آن را افزایش دهند [۱۰]، [۱۱]. زهر زنبور (BV) مایعی است شفاف و به‌رنگ روشن که در آب و اسید قابل حل است. BV محتوی پپتیدها (ملیتین، آپامین، آدولاپین و پپتید دگرانوله کننده مست‌سل[1])، آنزیم‌ها (فسفولیپاز A2) و آمین‌های فعال بیولوژیکی (هیستامین و اپی‌نفرین) است و همچنین اثرات ضد دردی، ضد التهابی و ضد سرطانی را نشان داده است [۱۲].

mast cell

[Downloaded from system.khu.ac.ir on 2024-05-19]

پژوهش‌های انجام شده نشان داده‌اند که دو ترکیب ملیتین و فسفولیپاز A2 نقش مهمی را در تمایز نورونی و افزایش رشد آن‌ها ایفا می‌کنند [۱۳]. بنا بر این با توجه به این‌که ویتامین D_3 و BV هر دو دارای وجه اشتراک ایجاد تمایز هستند در تحقیق حاضر اثر تمایزی هر یک از مواد ذکر شده به تنهایی و توأم با هم بررسی شد. سعی بر این بود که بتوان با استفاده از BV سلول‌های بنیادی مزانشیمی بند ناف جنینی را به سلول‌های استئوبلاست تمایز داده و همچنین بتوان با استفادهٔ توأم BV و ویتامین D3 دوز تمایزی این ویتامین را کاهش داد.

مواد و روش‌ها

کشت سلول

در این تحقیق تجربی سلول‌های بنیادی از بند ناف جنین موش استخراج شدند. ابتدا بافت‌های بند ناف جدا شده از تمامی جنین‌های تعداد ۲ موش سوری باردار نژاد NMRI جدا شده و در سرم PBS استریل شست‌شو داده شدند. پس از شست‌شو بافت‌های حاصل به‌روش مکانیکی به قطعات ۲-۱ میلی‌متر تقسیم شدند. سپس به‌منظور هضم آنزیمی با تریپسین ۰/۲۵٪ انکوبه شده و به‌دنبال آن به‌طریق مکانیکی عمل پیپت کردن انجام شد. به‌منظور متوقف کردن عمل آنزیمی به سلول‌های حاصل محیط کشت DMEM اضافه شده و با دور ۱۵۰۰rpm سانتریفیوژ شدند. به پلیت سلولی حاصل محیط کشت DMEM حاوی ۱۰٪FBS اضافه شد و در نهایت سوسپانسیون سلولی در فلاسک‌های کشت $۲۵cm^2$ کشت داده و در انکوباتور قرار داده شدند. در روز دوم کشت تعویض محیط انجام شده و در روز چهارم سلول‌ها پاساژ داده شدند. بعد از پاساژ دوم سلول‌ها به پلیت کشت ۲۴ خانه منتقل شدند.

فلوسیتومتری

در این تحقیق به‌منظور اثبات بنیادی و همچنین مزانشیمی بودن آن‌ها از روش فلوسیتومتری استفاده شد. به این ترتیب که برای اثبات بنیادی بودن آن‌ها حضور مارکر OCT4 جنینی و برای اثبات مزانشیمی بودن آن‌ها حضور مارکرهای سطحی CD29، CD44 و CD73 بررسی شد. برای این منظور ابتدا نمونه‌ها از کف پلیت جدا شده و پس از شست‌شو و سانتریفیوژ، به‌منظور نفوذپذیر کردن غشاء سلول، نمونه‌ها به‌مدت ۱۵ دقیقه در محلول ۱% تریتون[۱]-x۱۰۰ در دمای اتاق قرار داده شدند. سپس حجم سلول‌ها را با PBS به ۱۰۰۰µl رسانده و به‌مدت ۱۰ دقیقه در ۲۰۰۰rpm سانتریفیوژ شدند. پس از سانتریفیوژ، محیط رویی دور ریخته شد. سپس تمامی نمونه‌ها به‌مدت ۵ ساعت در دمای ٤ درجه با ۵۰µl از آنتی‌بادی اولیه (رقیق شده با محلول بلوکه‌کنندهٔ BSA-۳%PBS به نسبت۱:۱۰۰) و پس از شست‌شو با آنتی‌بادی ثانویه آنتی‌رابیت[۲] IgG کونژوگه با رنگ FITC انکوبه شدند. در نهایت به آن‌ها ۳۰۰µl فرمالین ۱% اضافه شده و با دستگاه فلوسیتومتری آنالیز شدند.

۱. Triton ۲. Anti-rabbit

[Downloaded from system.khu.ac.ir on 2024-05-19]

تست MTT

در ابتدا از BV (آزمایشگاه دکتر ایمانی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم تحقیقات) استوک ۱mg/ml در PBS تهیه شد. بعد از گذشت ۲۴ ساعت کشت در پلیت ۲۴ خانه، سلول‌ها با غلظت‌های مختلف BV شامل ۱، ۶، ۵، ۴، ۳، ۲، ۷μg/ml به‌مدت ۲۴ ساعت تیمار شدند. برای بررسی تأثیر این ماده بر میزان بقاء سلولی از روش رنگ‌سنجی MTT استفاده شد. پس از ۲۴ ساعت به هر چاهک ۵۰μl محلول MTT اضافه کرده و سلول‌ها به‌مدت ۴-۳ ساعت در دمای ۳۷°C انکوبه شدند. پس از گذشت این مدت زمان به هر چاهک ۱ml ایزوپروپانول اسیدی اضافه شده و به‌مدت۱۰-۸ ساعت در دمای اتاق و در تاریکی نگه‌داری شدند. در نهایت دانسیتهٔ نوری هر نمونه در طول موج ۵۷۰ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفوتومتر سنجیده شده و درصد بقای سلول‌های زنده از فرمول زیر محاسبه شد.

درصد بقاء هر نمونهٔ تیمار= جذب نمونهٔ تیمار/جذب نمونهٔ کنترل×۱۰۰

رنگ‌آمیزی آلیزارین رد

پس از تیمار سلول‌ها با BV در غلظت‌های ۲μg/ml، ۴μg/ml و ۶μg/ml و ویتامین D3 با غلظت‌های nM ۱۰، ۱۵nM و همچنین تیمار همزمان این دو ترکیب در غلظت کم ویتامین D3 (۵nM) و غلظت‌های متغیر BV (۲μg/ml، ۴μg/ml و ۶μg/ml) به‌مدت ۲۱ روز، سلول‌های تیمار و گروه کنترل برای رنگ‌آمیزی آلیزارین‌رد استفاده شدند. ابتدا محیط رویی سلول‌ها خارج شده و چاهک‌های پلیت با محلول PBS شست‌شوداده شد. سپس سلول‌ها با پارافرمالدئید ۴% به‌مدت ۴۰ دقیقه تثبیت شدند. سپس سلول‌ها به‌مدت ۵ ساعت در تاریکی با محلول آلیزارین رد انکوبه شدند. پس از انکوباسیون، سلول‌ها دو بار با PBS شست‌شو داده شده و در نهایت رنگ شدن سلول‌ها که نشان‌دهندهٔ میزان رسوب کلسیم است در گروه‌های کنترل و تیمار با میکروسکوپ معکوس مقایسه شد.

تست آلکالین فسفاتاز

آلکالین فسفاتاز آنزیم هیدرولیتیکی است که در بافت‌های کبد و استخوان به‌مقدار فراوان یافت می‌شود. در نتیجه اندازه‌گیری سطح آن به‌عنوان یک مارکر تمایزی استئوبلاستی کاربرد وسیعی دارد. در تحقیق حاضر علاوه بر بررسی کیفی رنگ‌آمیزی آلیزارین‌رد، تمایز سلول‌های استخوان با بررسی کمی سطح آلکالین فسفاتاز نیز در گروه‌های کنترل و تیمار ارزیابی شد. به این صورت که پس از تیمار سلول‌ها با دوزهای مناسب BV، ویتامین D3 و ترکیب این دو، به‌منظور تهیهٔ عصاره‌های پروتئینی از بافر لیزکننده NP40 استفاده شد. برای تعیین غلظت نمونه‌های مختلف پروتئینی و در نهایت برداشتن مقادیر یکسان پروتئین از آن‌ها برای انجام تست آلکالین فسفاتاز، آزمون بردفورد انجام شد. برای بررسی مقایسه‌ای سطح آلکالین فسفاتاز از کیت آلکالین فسفاتاز (شرکت پارس آزمون۹۰۰۱۰) استفاده شد و در نهایت جذب نوری نمونه‌ها با استفاده از دستگاه اسپکتروفوتومتر در ٤٠٥ نانومتر سنجیده شد.

[Downloaded from system.khu.ac.ir on 2024-05-19]

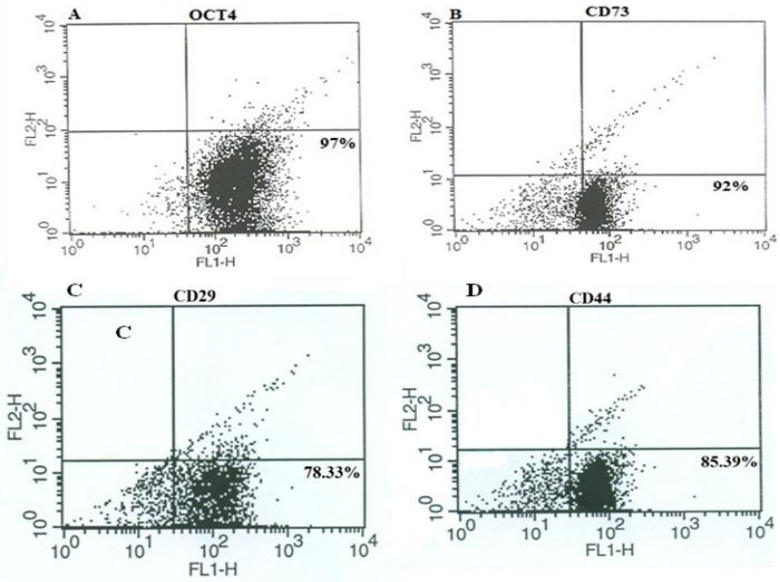
نتایج

نتایج حاصل از سنجشMTT

در این پژوهش تجربی برای به‌دست آوردن غلظت‌های سمی و غیرسمی زهر زنبورعسل از تست MTT استفاده شد. نتایج حاصل از بررسی تأثیر BV بر میزان بقاء سلول‌های بنیادی حاصل از بند ناف موش سوری نژاد NMRI نشان داد که BV در غلظت‌های زیاد و سمی موجب مرگ سلولی و در غلظت‌های پایین و غیر-سمی موجب مهار تکثیر سلول‌های بنیادی مزانشیمی می‌شود. کاهش بقاء سلول‌ها نسبت به نمونهٔ کنترل در دوز ۱µgr/ml با P<۰/۰۵، دوز ۳µgr/ml با P<۰/۰۱ و دوزهای ۶،۹،۱۲ و۱۵(µgr/ml) با P<۰/۰۱ معنی‌دار بود. همچنین غلظتی از این ترکیب که منجر به القا پنجاه درصد مرگ سلولی پس از گذشت مدت زمان ۲۴ ساعت می‌شود ۷/۵ µgr/ml تشخیص داده شد. بنا بر این دوزهای مناسبی از BV با کشندگی کمتر از IC_{50} (۲µg/ml، ۴µg/mlو ۶µg/ml) برای تیمار سلول‌ها به‌منظور بررسی اثر تمایزی آن انتخاب شدند.

نتایج حاصل از فلوسیتومتری

بررسی میزان بیان مارکر OCT4 جنینی در سلول‌های بنیادی مشتق شده از بند ناف به‌روش فلوسیتومتری نشان داد که پس از پاساژ اول این سلول‌ها OCT4 را به مقدار زیادی (۹۷%) بیان می‌کنند (شکل۱). همچنین این سلول‌ها مارکرهای سطحی CD29، CD44 و CD73 را که به‌ترتیب به میزان ۷۸.۳۳%، ۸۵.۳۹% و ۹۲% بیان می‌کنند که حاکی از مزانشیمی بودن این سلول‌های بنیادی است.



شکل۱. نتایج حاصل از بررسی بیان مارکرهای OCT4، CD73، CD29 و CD44 در سلول‌ها بنیادی مزانشیمی مشتق شده از بند ناف به‌روش فلوسیتومتری. نتایج نشان داد که این مارکرهای فوق به‌ترتیب به میزان۹۷%،۹۲%، ۷۸/۳۳% و۸۵/۳۹% و در این سلول‌ها بیان می‌شوند

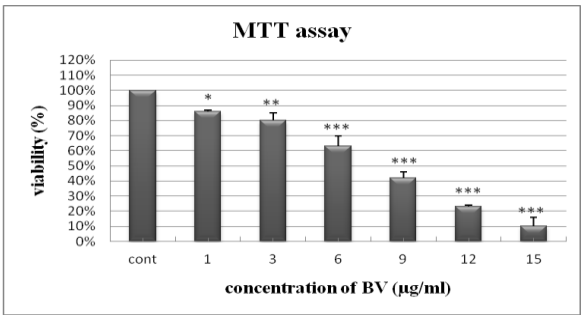
[Downloaded from system.khu.ac.ir on 2024-05-19]

نتایج حاصل از تست آلیزارین رد

نتیجهٔ این تست نشان‌دهندهٔ رسوب کلسیم و تأیید تمایز استئوبلاستی است. نتایج حاصل از این رنگ‌آمیزی نشان داد که بر اثر تیمار سلول‌های بنیادی مزانشیمی بند ناف با BV در غلظت‌های۲ µg/ml، ۴µg/ml و ۶µg/ml این سلول‌ها رسوب کلسیم را به میزان کمی نشان می‌دهند. این امر نشان می‌دهد BV تا حدی توانایی تمایز این سلول‌ها را به سمت سلول‌های استخوان داراست. از طرفی از آن‌جایی که ویتامین D3 یک فاکتور تمایزی قوی به سمت استخوان است، هنگامی که این سلول‌ها با غلظت‌های ۱۰nM و ۱۵nM این ویتامین تیمار شدند شدت رنگ بیش‌تری را در مقایسه با BV از خود نشان دادند. این در حالی بود که در سلول‌های تیمار شده با غلظت‌های مناسب BV (۲µg/ml، ۴µg/mlو ۶µg/ml) به‌همراه غلظت کم ویتامین D3 (۵nM) شدت رنگ افزایش یافت (شکل۲). این نتایج نشان می‌دهند که اثر تمایزی ویتامین D3 در حضور BV افزایش می‌یابد. هم‌چنین در شکل ۲ نشان داده شده است که سلول‌های بنیادی مزانشیمی بند ناف قبل از تمایز به شکل دوکی شکل و کشیده (شبیه فیبروبلاست) هستند در حالی که پس از تمایز شکل آن‌ها پهن و مسطح ب می‌شود.

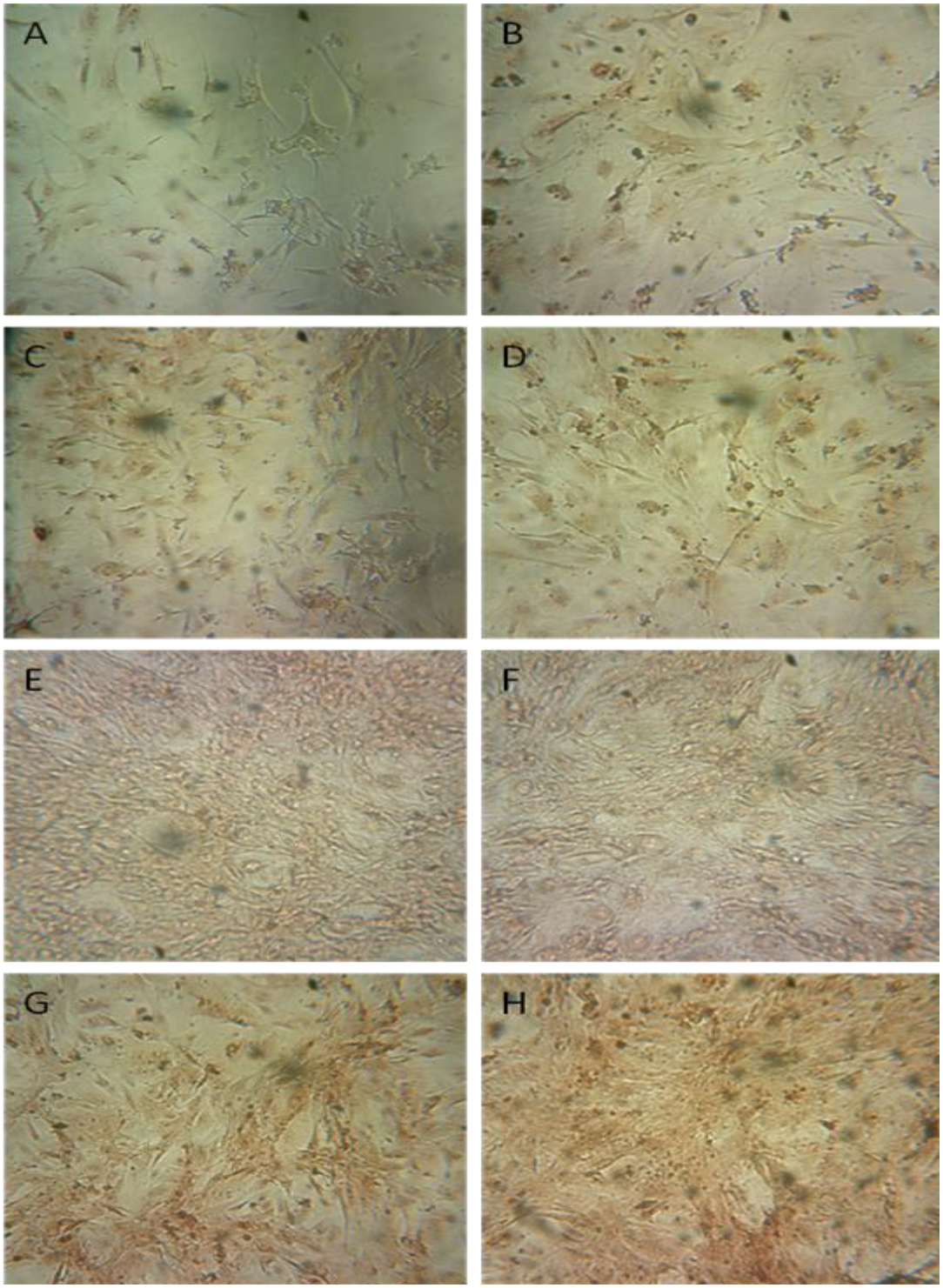
نتایج حاصل از تست آلکالین فسفاتاز

آلکالین فسفاتاز شاخص ابتدایی سلول‌های استئوبلاستی است. نتایج حاصل از سنجش آلکالین فسفاتاز در سلول‌های تمایز یافته با BV، سلول‌های تمایز یافته با ویتامین D3 و هم‌چنین سلول‌های تمایز یافته در اثر هم‌افزایی BV/vit D3 نسبت به گروه کنترل در نمودار ۱ نشان داده شده است. به‌علاوه در جدول ۱ به‌صورت مقایسه‌ای میزان جذب هریک از نمونه‌ها در ۴۰۵nM نتایج نشان داد که سلول‌هایی که به‌صورت توأم با BV (۶µgr/ml) و ویتامین D3 (۵nM) تیمار شده بودند بیش‌ترین میزان جذب را برای آلکالین فسفاتاز نشان دادند. این در حالی است که در هم‌افزایی این دو ترکیب غلظت کم ویتامین D3 (۵nM) به‌کار رفته است.



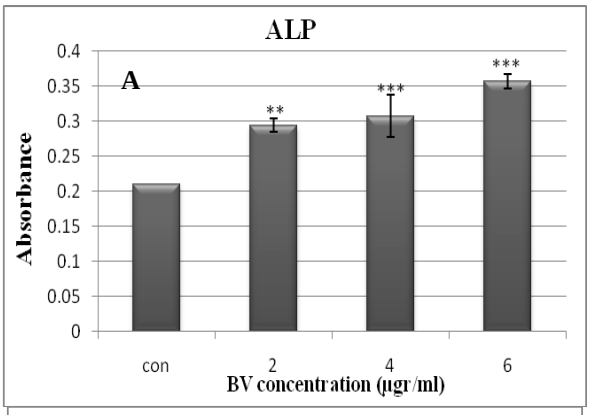
نمودار ۱. مقایسهٔ اثر غلظت‌های مختلف BV بر درصد بقاء (%Viability) سلول‌های بنیادی حاصل از بند ناف موش سوری نژاد NMRI پس از طی ۲۴ ساعت تیمار بر اساس سنجش MTT. میزان IC_{50} این ترکیب پس از ۲۴ ساعت ۷/۵µgr/ml برآورد شد. * P< ۰/۰۵ ، ** P<۰/۰۱ ، *** P< ۰/۰۰۱ . Mean± SEM

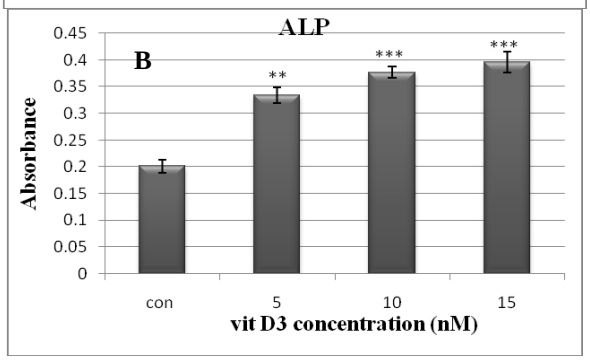
[Downloaded from system.khu.ac.ir on 2024-05-19]

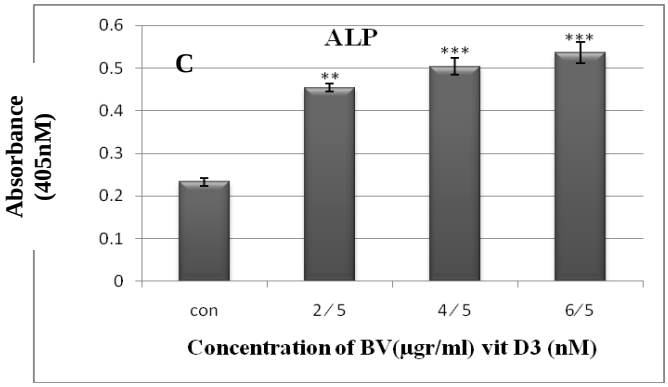


شکل۲. تصاویر میکروسکوپ نوری معکوس از رنگ‌آمیزی آلیزارین‌رد سلول‌های بنیادی مزانشیمی بند ناف، A) نمونهٔ کنترل، B) سلول‌های تیمار شده با غلظت ۲µg/ml زهر زنبور، C) نمونه سلول‌های تیمار شده با غلظت ۴µg/ml زهر زنبور، D) سلول‌های تیمار شده با غلظت ۶µg/ml زهر زنبور، E) نمونهٔ تیمار شده با غلظت ۱۰nM ویتامین D3، F) نمونهٔ تیمار شده با غلظت ۱۵nM ویتامینD3، G) نمونهٔ تیمار شده با هم‌افزایی BV/vit (۳µg/ml زهر زنبور و ۵nM ویتامین)، H) نمونهٔ تیمار شده با هم‌افزایی BV/vit (۵µg/ml زهر زنبور و ۵nM ویتامین) بزرگ‌نمایی۲۰۰ x

[Downloaded from system.khu.ac.ir on 2024-05-19]







نمودار۲. A) بررسی سطح آلکالین فسفاتاز در سلول‌های تمایز یافته توسط زهر زنبور نسبت به گروه کنترل، B) سلول‌های تمایز یافته توسط ویتامین D3 نسبت به گروه کنترل، C) سلول‌های تمایز یافته به‌وسیلهٔ هم‌افزایی این دو ترکیب. ** P<۰/۰۱ ، *** P<۰/۰۰۱ . Mean± SEM

جدول ۱. بررسی مقایسه‌ای سطح آلکالین فسفاتاز در سلول‌های تمایز نیافته (گروه کنترل) و سلول‌های تمایز یافته با زهر زنبور، ویتامین D3 و هم‌افزایی این دو ترکیب. اعداد ارائه شده میانگین سه بار تکرار آزمایش هستند .Mean± SEM . *** P< ۰/۰۰۱ ، ** P<۰/۰۱

con	BV	vit D۳	BV, vit D۳
۰/۲۰۳	۰/۲۹٤ (۲µgr/ml)**	۰/۳۳٤ (۵nM)**	۰/٤٥٤ (۲ µgr/ml , 5nM)**
۰/۲۱۱	۰/۳۰۷ (٤µgr/ml)***	۰/۳۷۷ (۱۰nM)***	۰/۵۰٤ (٤ µgr/ml , nM)***
۰/۲۱۸	۰/۳۵۷ (٦µgr/ml)***	۰/۳۹٦ (۱۵nM)***	۰/۵۳٦ (٦µgr/ml , 5nM)***

[Downloaded from system.khu.ac.ir on 2024-05-19]

بحث

زنبور درمانی در طب قدیم در درمان بیماری‌های مختلفی از جمله دردهای مفصلی، بیماری‌های عفونی، بیماری‌های پوستی وغیره رواج داشته است؛ امروزه به زهر زنبور در درمان بیماری‌هایی از قبیل آرترید روماتوئید، مالتیپل اسکلروزیس، دردهای التهابی و احشایی و همچنین سرطان توجه شده است [۱۳]، [۱۴]. در تحقیق حاضر اثرات تمایزی زهر زنبورعسل و همچنین اثر هم‌افزایی این ترکیب و ویتامین D3 بر تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق شده از بند ناف سمت سلول‌های استخوان‌ساز بررسی شد. در این بررسی به‌وسیلهٔ رنگ‌آمیزی آلیزارین‌رد که بر پایهٔ رسوب کلسیم استوار است و همچنین سنجش آلکالین فسفاتاز اثبات شد که سلول‌های مزانشیمی بنیادی تحت تیمار با BV به سمت سلول‌های استئوبلاستی تمایز می‌یابند. از آن‌جاکه به‌کار بردن غلظت‌های زیاد ویتامین D3 سمی است و همچنین باعث به‌وجود آمدن اثرات جانبی افزایش غلظت یون کلسیم می‌شود در این بررسی نشان داده شد که BV قادر است توان تمایزی ویتامین D3 را افزایش داده و دوز مؤثر این ویتامین را برای تمایز کاهش دهد. پژوهش‌های انجام شده نشان داده اند که دو ترکیب ملیتین و فسفولیپاز A2 دو ترکیب اصلی زهرزنبور است که نقش مهمی را در تمایز سلول‌ها و افزایش رشد آن‌ها ایفا می‌کند [۱۵]، [۱۶]. در سال ۲۰۱۱ نبیونی و همکارانش نشان دادند که BV در حضور فاکتور رشد عصبی NGF موجب تمایز نورونی ردهٔ سلولی PC12 می‌شود [۱۷]. همچنین در سال ۱۳۸۸ محسنی کوچصفهانی و همکارانش نشان دادند که سلول‌های سرطانی پرومیلوسیتی HL60 در حضور BV و ویتامین D3 به مونوسیت تمایز می‌یابند [۱۸]. همچنین این محققان در بررسی دیگری اثبات کردند که زهر زنبور موجب تمایز نورون‌های کولینرژیک می‌گردد [۱۹]. به‌علاوه تحقیقات گذشته نشان داده اند که هم‌افزایی زهر زنبور و رتینوئیک اسید موجب تمایز ردهٔ سلولی HL60 به سمت نوتروفیل می‌شود [۲۰]. ویتامین D3 بر تکثیر و تمایز تعداد زیادی از دودمان‌های سلولی نظیر کراتینوسیت‌ها، مونوسیت‌ها و پیش سازهای استئوبلاست‌ها اثر دارد [۲۱]، [۲۲]، [۲۳]. این ویتامین با افزایش فعالیت آلکالین فسفاتازی سلول‌ها، افزایش ندول‌های استخوانی و افزایش نشت کلسیم در محیط باعث معدنی شدن ماتریکس و تمایز سلول‌ها به سمت استئوبلاست‌ها می‌شود [۲۴]. در این پژوهش جداسازی سلول‌های بنیادی مزانشیمی بند ناف و تمایز آن‌ها به سمت استئوبلاست انجام شده و زمینه‌ای برای انجام تحقیقات بیش‌تر در خصوص اثر BV در پیشبرد تمایز سلول‌های بنیادی فراهم شد.

تشکر و قدردانی

این تحقیق در آزمایشگاه تحقیقاتی سلولی- تکوینی دانشکدهٔ علوم زیستی دانشگاه خوارزمی انجام شده و از امکانات مرکز تکثیر و پرورش حیوانات آزمایشگاهی این دانشکده استفاده شده است. بدین‌وسیله از مدیریت محترم این دانشکده تقدیر و تشکر می‌کنیم.

[Downloaded from system.khu.ac.ir on 2024-05-19]

منابع

1. D. Baksh, L. Song, R. S. Tuan, "Adult mesenchymal stem cells: characterization, differentiation, and application in cell and gene therapy", J Cell Mol Med;8(3) (2004) 301-16.
2. A. Pansky, B. Roitzheim, E. Tobiasch, "Differentiation potential of adult human mesenchymal stem cells", Clin Lab;531(2) (2007) 81-4.
3. F. Barry, J. M. Murphy, "Mesenchymal stem cells: clinical application and biological characterization", Int. J. Biochem. Cell. Biol; 36 (2004) 568-84.
4. Y. A. Romanov, V. A. Svintsitskaya, V. N. Smirnov, "Searching for alternative sources of postnatal human mesenchymal stem cells: candidate MSC-like cells from umbilical cord",Stem Cells; 21(1) (2003)105-110.
5. R. J. Deans, A. B. Moseley, "Mesenchymal stem cells: biology and potential clinic uses", Exp Hematol; 28(8) (2000) 875-84.
6. H. S. Wang, S. C. Hung, S. T. Peng, C. C. Huang, Y. J. Wei HM, Guo, Y. S. Fu, M. C. Lai, C. C. Chen, "Mesenchymal stem cells in the Wharton's jelly of the human umbilical cord", Stem Cells; 22(7) (2004) 1330-7.
7. Z. Miao, J. Jin, L. Chen, J. Zhu, W. Huang, J. Zhao, et al, "Isolation of mesenchymal stem cells from human placenta: Comparison with human bone marrow mesenchymal stem cell", Cell Bio. Inter; 30 (2006) 681-687.
8. D. Thomas, M. Kansara, "Epigenetic modifications in osteogenic differentiation and transformation", J Cell Biochem;98(4) (2006) 757-69.
9. M. Liue, M. H. Lee, M. Cohen, M. Bommakanti, L. P. Freedman, "Transcriptional activation of the Cdk inhibitor p21 by vitamin D3 leads to the induced differentiation of the myelomonocytic cell line U937", Genes Dev;10 (1998) 142-153.
10. H. S. Kim, J. H. Kim, S. T. Kim, "Differential in-volvement of protein kinase C in human promyelocytic leukemia cell differentiation en-hanced by artemisinin", Eur J Pharmacol, 482 (2003) 67-76.
11. H. S. Kim, W. S. Kim, J. S. Choi, C. Y. Kim, S. T. Kim, "Enhancing effect of indirubin derivative on 1,25 dihydroxyvitamin D3 and all-trans retinoic acid- induced differentiation of HL-60 leukemia cells", Leuk Res, 22 (2006) 153-161.

[Downloaded from system.khu.ac.ir on 2024-05-19]

12. M. H. Jang, M. C. Shin, S. Lim, S. M. Han, H. J. Park, I. Shin, et al, "Bee venom induces apoptosis and inhibits expression of cyclooxygenase-2 mRNA in human lung cancer cell line NCI-H1299", J. Pharmacal. Sci 91(2003) 95-104.

13. S. J. Suh, K. S. Kim, M. J. Kim, Y. C. Chang, S. D. Lee, M. S. Kim, et al, "Effects of bee venom on protease activities and free radical damages in synovial fluid from type II ollagen-induced rheumatoid arthritis rats", Toxico. in Vitro 20 (8) (2006) 1465-1471.

14. D. J. Son, J. W. Lee, Y. H. Lee, S. H. Song, C. K. Lee, J. T. Hong, "Therapeutic application of anti arthritis, pain-releasing and anti cancer effects of bee venom and its constituent compounds", Pharmaco & Therap, 115 (2007) 361-763.

15. Y. J. Lee, S. J. Kang, B. M. Kim, Y. J. Kim, H. D. Woo, H. V. Chun, "Cytotoxicity of honeybee (Apis mel-lifera) venom in normal human lymphocytes and HL-60 cells", Chem Biol Interact; 169 (2007) 189-197.

16. X. Liu, D. Chen, L. Xie, R. Zhang, "Effect of honey bee venom on proliferation of K1735M2 mouse melanoma cells in vitro and growth of murine B16 melanomas in vivo", Pharm Pharmacol; 54 (8) (2002) 1083-1089.

17. M. Nabiuni, E. Hoveizi, K. Parivar, M. Azarnia, S. Khodadadi, "Neural Differentiation and developmental Effects of Honey Bee Venom on PC12 Cells"; A Comparison to Nerve Growth Factor (NGF). Journal of Adv. Lab. Res. in Bio. ISSN 0976-7614.2 (2011) 3.

۱۸. هما محسنی کوچصفهانی، کاظم پریور، محمد نبیونی، مریم رحیمی، *اثر هم‌افزایی کاربرد توام زهر زنبور عسل و ۱، ۲۵-دی‌هیدروکسی ویتامین D_3 بر القای تمایز ردهٔ سلولی سرطانی پرومیلوسیتی HL-60*، مجلهٔ علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی همدان، دوره شانزدهم ، شماره ٤ مسلسل ٥٤ (١٣٨٨) ١٢-٥.

19. H. Kouchesfahani, M. Nabiuni, K. Parivar, S. Ebrahimi, "Effect of honey bee venom on differentiation of cholinergic neurons", J Venom Res; 1 (2010) 29-36.

۲۰. کاظم پریور، محمد نبیونی، هانیه جلالی، فاطمه نادعلی، *اثر زهر زنبور عسل و رتینوئیک اسید تمام ترانس بر تکثیر و تمایز رده سلولی HL60*، مجلهٔ دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان. دوره دهم، شماره دوم ، (١٣٩٠) ١٢٢-١٢٦.

21. C. G. Bellow, J. E. Aubin, J. N. Heersche, "physiological concentration of glucocorticoids stimulate formation of bone nodules from isolated rat calvarial cell invitro", Endocrinology; 121(6) (1987) 1985-1992.

22. P. C. Maniato, J. Sodek, A. H. Melcher, "Bone formation in vitro by stromal cells obtained from bone marrow of young adult rats", Cell tissue res; 254 (1998) 317-330.

[Downloaded from system.khu.ac.ir on 2024-05-19]

23. T. Suda, Y. Uenom, G. Fujiik, T. Shinki, "Vitamin D and bone", J Cell Biochem; 88 (2003) 259-266.

24. B. H. Asma, "Human bone tissue engineering using umbilical cord and differentiated osteoblasts from drived-mesenchymal stem cells", University sains Malasya; 52 (2008)122-156.

[Downloaded from system.khu.ac.ir on 2024-05-19]