مقاله تحقیقی

مجلهٔ دانشگاه علوم پزشکی بابل
دوره شانزدهم، شماره ۱۲، آذر ۱۳۹۳، صفحه ۳۱-۲۳

جداسازی و تمایز سلول‌های بنیادی پالپ دندان به سمت ادونتوبلاست

مریم رئوف (DDS,MS)[1*]، علی محمدی کمال آبادی (DDS)[2]، محمد مهدی یعقوبی (PhD)[2]، راضیه کوشکی (MSc)[3]، مهدی عباس نژاد (PhD)[3]، علی درخشانی (MSc)[4]

۱-گروه اندودانتیکس، دانشکده دندانپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی کرمان
۲-گروه بیوتکنولوژی، پژوهشگاه علوم و تکنولوژی پیشرفته و علوم محیطی، دانشگاه تحصیلات تکمیلی صنعتی و فناوری پیشرفته کرمان
۳-گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه شهید باهنر کرمان
۴-گروه پاتولوژی، مرکز تحقیقات سلول های بنیادی، دانشگاه علوم پزشکی کرمان

دریافت: ۹۳/۴/۳۰، اصلاح:۹۳/۵/۱۵ ، پذیرش:۹۳/۷/۲

خلاصه

سابقه و هدف: با توجه به منابع محدود سلول های بنیادی یافتن راهکارهای مناسب برای جداسازی و تکثیر و تمایز این سلول ها حائز اهمیت می باشد. یکی از منابع سهل الوصول سلول های بنیادی بالغ، پالپ دندان مولر سوم انسان می‌باشد که معمولا بدون استفاده می ماند. این سلول ها قابلیت تمایز به انواع سلول ها را دارند. هدف از این پژوهش جداسازی سلول های بنیادی از پالپ دندان مولر سوم انسان با روشی نوین، کشت این سلول ها و سپس القاء تمایز سلول های کشت داده شده به سمت ادونتوبلاست بود.

مواد و روشها: در این مطالعه تجربی تعداد ۲۰ عدد دندان نهفته عقل جهت استخراج سلول‌های بنیادی مورد استفاده قرار گرفت. از روش کشت قطعات بافت پالپ هضم شده برای جدا سازی سلول های بنیادی استفاده شد. بیان برخی ژن های مارکر سلول بنیادی با روش RT-PCR در این سلول ها بررسی شد. سپس این سلول‌ها با استفاده از دگزامتازون و پروتئین شکل زای استخوان (BMP-2) تحت القاء برای تمایز ادونتوبلاستی قرار گرفتند و بیان ژن‌های مارکر ادونتوبلاست در سلول‌های تحت القاء با روش‌های RT-PCR و ایمیونوسیتوشیمی بررسی شد.

یافته‌ها: سلول‌های بنیادی با بازدهی بالا از پالپ دندان جداسازی شدند و بررسی RT-PCR نشان داد این سلول‌ها برخی مارکرهای سلول بنیادی رویانی را بیان می‌کنند. سلول‌های تحت القاء، مارکرهای ادونتوبلاستی مثل DSPP، DMP-1، BMP_7 و Osteopontin را بیان نکردند. همچنین پروتئین های DSPP و DMP-1 در سلول‌های تحت القاء تولید نشدند.

نتیجه گیری: علی رغم جداسازی موفقیت آمیز سلول های بنیادی، با روش به‌کار رفته، سلول‌های القاء شده به سمت ادونتوبلاست تمایز نیافتند که این امر می تواند به خاطر روش تمایز، پاساژ دادن حین القاء و یا کشت تک لایه باشد.

واژه های کلیدی: سلول های بنیادی پالپ دندان، ادونتوبلاست، پروتئین شکل زای استخوان (BMP-2)، دگزامتازون.

مقدمه

سلول بنیادی به سلول تمایز نیافته‌ای اطلاق می‌گردد که توانایی تقسیمات مکرر، خودبازسازی و قدرت تمایز به بیش از یک نوع سلول را داشته باشد. این سلول‌ها از دو منبع سلول‌های بنیادی جنینی و سلول‌های بنیادی بالغ مشتق می‌شوند. محدودیت‌های کاربرد سلول‌های بنیادی جنینی از جمله تومورزا بودن، دسترسی سخت و ملاحظات اخلاقی تمایل به استفاده از سلول‌های بنیادی بالغ را افزایش داده است (۳-۱). سلول های بنیادی بالغ سلول‌های تمایز نیافته در بین سلول‌های تمایز یافته می‌باشد که می‌توانند به نوع خاصی از سلول‌های تخصص یافته تمایز یابند (۴). از مهمترین منابع سلول بنیادی بالغ، سلول های بنیادی پالپ دندان (Dental Pulp Stem Cells=DPSCs) می‌باشد. این سلول های چند پتانسیلی برای کاربردهای کلینیکی در مقایسه با دیگر سلول‌های مزانشیمی مشتق از مغز استخوان، بافت چربی و خون بند ناف دارای مزیت هایی می‌باشند. منبع تامین این سلول‌ها از دندان‌های خارج شده که معمولا دور ریخته می‌شوند با عوارض و محدویت های اخلاقی کم می‌باشد. بررسی‌ها نشان می‌دهند این سلول‌ها تحت اثر محیط‌های القائی ویژه در شرایط آزمایشگاه می‌توانند به

این مقاله حاصل پایان نامه علی محمدی کمال آبادی دانشجوی دندانپزشکی و طرح تحقیقاتی به شماره ۸۶/۴۸ دانشگاه علوم پزشکی کرمان می‌باشد.
* مسئول مقاله: دکتر مریم رئوف
آدرس: کرمان، بلوار جمهوری اسلامی، خ شفا، دانشگاه علوم پزشکی کرمان، دانشکده دندانپزشکی، گروه اندودانتیکس. تلفن: ۰۳۴-۳۲۱۱۸۰۷۱ E-mail:Maryam.raoof@gmail.com

[DOR: 20.1001.1.15614107.1393.16.12.3.5]
[DOI: 10.18869/acadpub.jbums.16.12.23]

سلول‌های مختلفی از جمله چربی، عصب، استئوبلاست، میوسیت و کندروسیت تمایز یابند (۷-۵). دیگر مشخصه سلول های بنیادی پالپ دندان ظرفیت تمایز به سلول‌های شبه ادنتوبلاست می‌باشد. در طی رشد و تکامل دندان ها ادنتوبلاست‌ها عاج اولیه را تشکیل می‌دهند و بعد از آن وارد فاز استراحت شده و می‌توانند در پاسخ به محرک‌های خارجی خفیف عاج ثانویه تحریکی را در طول عمر با سرعت کمتر ترشح کنند. در صورتی که شدت محرک به حدی باشد که منجر به مرگ ادونتوبلاست ها گردد ترشح عاج ثالثیه ترمیمی توسط یک نسل جدید از سلول‌های شبه ادونتوبلاست انجام می شود که در بسیاری از مطالعات منشاء این سلول ها سلول های بنیادی پالپ دندان گزارش شده است (۱۰-۸).

در واقع در پوسیدگی های عمیق یکی از درمان های مؤثر حفظ پالپ دندان و تحریک آن برای ساختن عاج تحریکی به کمک سلول های ادونتوبلاست می‌باشد. با توجه به نقش مهم ادونتوبلاست ها القاء تمایز سلول های بنیادی به این سلول ها از اهمیت ویژه ای برخوردار می باشد. تاکنون مطالعات مختلفی در خصوص چگونگی استخراج، تکثیر و تمایز این سلول‌ها صورت گرفته است و بسیاری از محققان سعی در بهینه سازی شرایط کشت سلول‌های بنیادی برای القای تمایز این سلول‌ها به سمت سلول‌های ادنتوبلاست را دارند (۱۳-۱۱). همچنین با توجه به محدود بودن منابع استخراج سلول‌های بنیادی روش استخراج این سلول‌ها نیز حائز اهمیت می‌باشد.

در اکثر مطالعات جداسازی سلول های بنیادی از پالپ دندان با دو روش انجام می‌شود. هضم آنزیمی که طی آن بافت هضم شده دور ریخته می شود و سلول‌هایی که طی فرآیند هضم از بافت خارج می‌شوند کشت داده می شوند و روش کشت بافت پالپ که طی آن قطعات پالپ دندان کشت داده می‌شود و سلول ها به مرور زمان محیط از بافت پالپ خارج شده و به سطح ظرف کشت می چسبند. هر یک از این روش‌ها دارای معایب و مزایای می باشد و یافتن راهکارهای برای استخراج بهینه این سلول ها موضوع بسیاری از مطالعات می باشد (۱۴). باتوجه به اینکه دندان مولر سوم انسان اغلب به دلیل ارتودنسی و یا دلایل پروفیلاکتیک کشیده و بدون استفاده هستند استخراج سلول های بنیادی از این دندان ها مقرون به صرفه می باشد. در این مطالعه استخراج سلول های بنیادی از پالپ دندان مولر سوم انسان با روشی متفاوت و القای تمایز در آنها به سمت ادنتوبلاست بررسی گردید.

مواد و روشها

روش نمونه‌گیری: در این مطالعه تجربی تعداد ۲۰ عدد دندان عقل نهفته سالم از بیماران با سن بین ۳۰-۱۸ سال با رضایت قبلی تحت بی حسی موضعی به دلایل ارتودنسی یا عدم رویش دندان خارج شد و در محلول سالین بر روی قطعات یخ سریعاً به آزمایشگاه منتقل شد. در آزمایشگاه دندان توسط محلول یدین به مدت ۵ دقیقه ضدعفونی شد. سپس دندان توسط سپراتور از محل برش به دو نیم شده و بافت پالپ توسط پنس استریل از اتاقک پالپ و توسط باربروچ از کانال ریشه ها خارج شد و داخل ۱μ ۱۰۰ محیط کشت در یک ظرف mm ۳۵ قرار گرفت و توسط تیغ جراحی استریل قطعه قطعه شد.

جدا سازی و کشت سلول: قطعات بافتی پالپ به یک لوله ml ۱/۵ استریل که حاوی ml ۱ کلاژناز/دیسپاز بود منتقل شده و در بن ماری $37^{\circ}c$ به مدت ۴۰-۳۰ دقیقه قرار داده شد. سپس قطعه های هضم شده پالپ با لامل استریل در ظرف کشت mm ۳۵ ثابت شدند. آنگاه ml ۳ محیط کشت کامل به آنها اضافه شد و به انکوباتور مرطوب با دمای $36/5^{\circ}c$ و ٪۵ CO_2 منتقل شدند. از این مرحله به بعد هر سه روز یک بار محیط کشت ظرف تعویض شد. کشت ها هر روز با میکروسکوپ معکوس اختلاف فاز مشاهده شدند. زمانی که تعداد سلول ها به حد مناسبی رسید، قطعات پالپ جدا شده و دور ریخته شد و سلولها به کمک تریپسین جدا شده و پاساژ داده شدند.

بعد از شمارش سلول ها توسط لام نئوبار و تریپان بلو، مقدار سلول لازم در ظروف کشت اعم از فلاسک $25\ cm^2$ یا ظروف کشت گرد mm ۶۰ روی لامل شیشه‌ای ریخته شدند. به منظور شناسایی آلودگی احتمالی سلول های بنیادی پالپ دندان به انگل داخل سلولی، به خصوص مایکوپلاسما، از رنگ Hoechst برای رنگ آمیزی DNA در سلول ها استفاده شد. سلول‌ها به روش استاندارد منجمد شده و در تانک ازت مایع نگهداری شدند.

القاء تمایز ادونتوبلاستی در سلول های بنیادی پالپ دندان انسان: برای القاء تمایز در سلول های جدا شده از پالپ دندان انسان، سلول ها از پاساژ چهارم در ۴ ظرف کشت داده شدند. به ظرف اول BMP_2، به ظرف دوم دگزامتازون (DEX)، به ظرف سوم مخلوط هر دو و به ظرف چهارم فقط محیط کشت استاندارد اضافه شد. این سلول ها هر ۶-۵ روز با نسبت ۱:۳ پاساژ داده شدند به این صورت که دو قسمت از سلول ها برای استخراج RNA مصرف شد و یک قسمت آن‌ها مجدداً با همان شرایط قبلی کشت داده شد. در آخرین پاساژ $۰/۳\times۱۰^{۶}$ سلول از سلول هایی که مجدداً کشت داده شدند روی لامل ریخته شده و تحت همان شرایط القاء تمایز برای آن‌ها ادامه یافت. این آزمایش پنج بار و هر بار با غلظت‌های متفاوت BMP_2 و دگزامتازون و مدت زمان های متفاوت تکرار شد (جدول۱). محیط کشت سلول‌ها هر دو روز یک بار تعویض شد. پس از سپری شدن زمان تمایز سلول‌های ظروف کشت برای استخراج RNA لیز شدند و سلول‌های روی لامل برای ایمیونوسیتوشیمی ثابت شدند.

جدول ۱. مقدار القا کننده های تمایز ادنتوبلاستی در گروهها و تکرارهای مختلف

گروه / مراحل آزمایش	BMP_2	DEX	BMP_2+DEX		مدت آزمایش
			BMP_2	DEX	
اول	۱۰ng/ml	10^{-8}M	۱۰ng/ml	10^{-8}M	۲ هفته
دوم	۱۰ng/ml	10^{-7}M	۱۰ng/ml	10^{-7}M	۴ هفته
سوم	۲۵ng/ml	2×10^{-7}M	۲۵ng/ml	2×10^{-7}M	۴ هفته
چهارم	۵۰ng/ml	10^{-7}M	۵۰ng/ml	10^{-7}M	۲ هفته
پنجم	۱۰۰ng/ml	10^{-7}M	۱۰۰ng/ml	10^{-7}M	۲ هفته

استخراج RNA و آنالیز RT-PCR سلول و بافت پالپ دندان: استخراج RNA از سلول و یا پالپ دندان به کمک کیت RNX^{plus} شرکت سیناژن صورت گرفت. پس از اطمینان از کیفیت RNA به روش مشاهده روی الکتروفرز ژل آگارز و تعیین میزان RNA با کمک دستگاه اسپکتروفتومتر، مقدار یک میکروگرم RNA ابتدا به مدت ۳۰ دقیقه تحت تیمار با آنزیم DNase I عاری

[DOR: 20.1001.1.15614107.1393.16.12.3.5]
[DOI: 10.18869/acadpub.jbums.16.12.23]

از RNaseFermentas قرار گرفته و سپس به همراه ۰/۲ میکروگرم از پرایمر شش‌تایی تصادفی برای سنتز cDNA با استفاده از آنزیم M-MuLV-RT طبق دستورالعمل کیت (Fermentas) مورد استفاده قرار گرفت. برای ژن‌های انتخاب شده با استفاده از نرم افزار primer3 و برنامه Gene Runner پرایمرهای بالا دست و پایین دست طراحی شد به منظور اختصاصی بودن پرایمرها، آن‌ها در برنامه BLAST بررسی شدند. پس از این مرحله، پرایمرها برای سنتز به شرکت هلندی Isogen سفارش داده شدند. در نهایت واکنش PCR با پرایمرهای طراحی شده انجام شد(جدول ۲). از ژن بتا اکتین (actb) به عنوان کنترل در واکنش RT-PCR استفاده شد. دو میکرولیتر از DNA مکمل ساخته شده در مرحله قبل به عنوان الگو برای تکثیر در واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با ۱/۵ میلی‌مولار منیزیوم، ۲۰۰ میکرومولار مخلوط dNTP، ۰/۴ میکرومولار از هر پرایمر تخصصی و ۱/۲۵ واحد از آنزیم پلیمراز Taq (سیناژن) در حجم ۲۵ میکرولیتر بکار رفت. تکثیر در دستگاه Mastercycler® (شرکت Eppendorf) و با شرایط ذیل انجام شد:

واسرشتگی اولیه (جدایی دو رشته DNA)، ۹۴°C، ۵ دقیقه

واسرشتگی هر چرخه، ۹۴°، ۳۰ ثانیه

اتصال پرایمر به توالی هدف در cDNA، ۵۷°C، ۲۵ ثانیه

امتداد و ساخت رشته جدید، ۷۲°C، ۳۰ ثانیه

امتداد نهایی، ۷۲°C، ۵ دقیقه

مراحل ۴-۲ به صورت متوالی ۳۵ مرتبه تکرار و پس از اتمام واکنش PCR، محصول از دستگاه برداشته شده و به فریزر C°۲۰- منتقل شد. محصولات PCR روی ژل الکتروفورزآگارز ۱٪ جاری شده و پس از رنگ آمیزی با اتیدیوم بروماید در دستگاه G BOX HR (Syngene)مشاهده و از آن عکس گرفته شد.

رنگ آمیزی اختصاصی سلول به کمک آنتی بادی ویژه: به منظور بررسی بیان ژن‌ها در سطح پروتئین و نیز تأیید نتایجRT-PCR، رنگ آمیزی اختصاصی سلول بنیادی پالپ دندان انسان قبل و پس از تمایز با آنتی بادی های ویژه برای پروتئین های DSPP وDMP-1 انجام گرفت. جهت رنگ آمیزی ایمونوسیتوشیمی سلول های کشت داده شده روی لامل ابتدا با محلول استون- متانول به مدت۲ دقیقه تثبیت شد.

سپس غشاء سلول در محلول نفوذپذیر کننده تریتون X100 تراوا گشت و پراکسیداز داخل سلول با H_2O_2 غیرفعال گشت. انکوباسیون در آنتی بادی اولیه در دمای ۴°c در محفظه مرطوب به مدت یک شب انجام شد و سپس انکوباسیون در آنتی بادی ثانویه در دمای ۴°c در محفظه مرطوب به مدت ۴-۲ ساعت صورت گرفت. تیمار لامل ها در محلول سوبسترای DAB انجام شد. پس از شستشو در آب مقطر بگیری در اتانول مطلق صورت گرفت. در این مرحله لامل با کمک چسب انتالن به صورت معکوس روی لام چسبانده و زیر میکروسکوپ نوری مشاهده شد.

جدول۲. توالی پرایمرهای استفاده شده و طول محصول RT-PCR

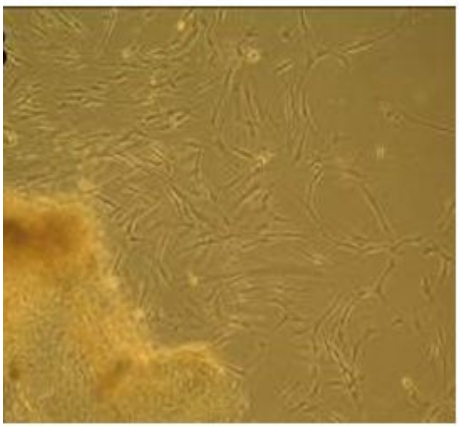
نام ژن و شماره دستیابی	توالی پرایمر	تکثیرشده‌طول قطعه
NucleosteminNM_014366.4 Nucleostemin	F: GTGATTGAAGCCTCCGATGT R: AGCCAGCTCTCCAAATTCTC	167bps
Oct-4 NM_002701	F: AGTGAGAGGCAACCTGGAGA R: TTACAGAACCACACTCGGACC	120bps
Nanog NM_024865	F: TGATTTGTGGGCCTGAAGAA R: AGTGGGTTGTTTGCCTTTGG	155bps
ACTB NM-001101	F: GGACTTCGAGCAAGAGATGG) R: GACAGCACTGTGTTGGCGTA	237bps
DSPP NM_014208.3	F:GAATAGAGGACACCCAGAAG R:TGTCTTGACATTGCCTTTGC	230bps
DMP-1 NM_004407	F:CAGGAGCACAGGAAAAGGAG R:CTGGTGGTATCTTGGGCACT	213bps
BMP_2 NM_001200	F:TGTATCGCAGGCACTCAGGT R:GGTGATAAACTCCTCCGTGG	194bps
BMP_7 NM_001719	F:CGGATCAGCGTTTATCAGGT R:AACTTGGGGTTGATGCTCTG	212bps
Osteopontin NM_000582.2	F:GCCGAGGTGATAGTGTGGTT R:GTGGGTTTCAGCACTCTGGT	242bps

[DOR: 20.1001.1.15614107.1393.16.12.3.5]
[DOI: 10.18869/acadpub.jbums.16.12.23]

رنگ آمیزی اختصاصی بافت به کمک آنتی بادی ویژه: پس از آبدهی برش‌ها، برای غیرفعال کردن پراکسیداز داخلی، برش‌های بافتی در متانول حاوی H_2O_2 ٪۰/۱v/v به مدت ۳۰ دقیقه قرار داده شدند. سپس مراحل رنگ آمیزی مشابه ایمونوسیتوشیمی انجام گرفت.

یافته ها

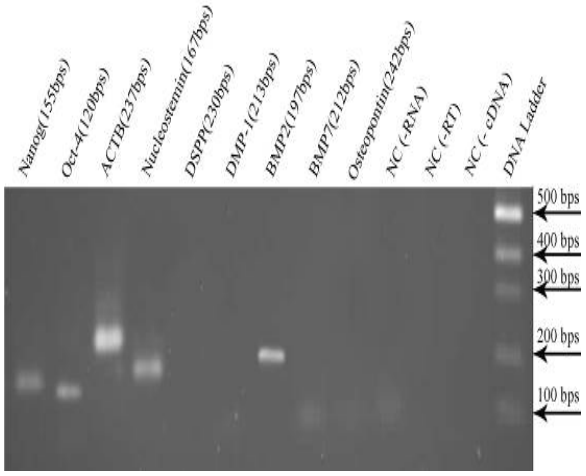
جداسازی سلول های بنیادی از پالپ دندان انسان: در این مطالعه جداسازی سلول‌های بنیادی پالپ دندان عقل انسان با روشی که بازدهی بیشتری دارد انجام شد. در این روش قطعات پالپ که مورد هضم آنزیمی قرار گرفته بودند زیر لامل ثابت شده و کشت داده شدند. در این روش سلول‌ها زودتر (بعد از ۲-۱ روز) از روشهای متداول مشاهده شدند. سلول‌ها در این روش شکل‌های متنوع‌تری نسبت به روش کشت بافت پالپ بدون هضم آنزیمی داشتند. این روش جداسازی بازدهی بیشتری نسبت به سایر روش‌های رایج داشت (شکل۱).



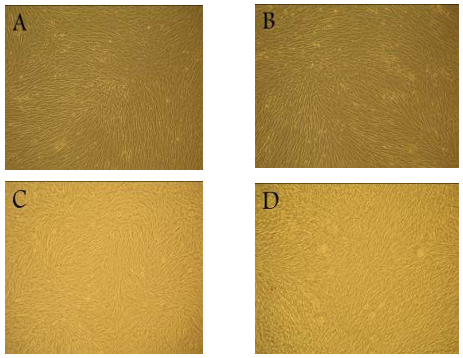
شکل ۱. شکل سلول های بنیادی استخراج شده به شیوه کشت بافت پالپ هضم شده (بزرگنمایی×۱۰۰)

در رنگ آمیزی با رنگ Hoechst نیز هیچ آلودگی داخل سلولی شناسایی نگردید. سلول‌های جدا شده تا بیش از ۱۵ پاساژ ۱:۵ (معادل تقریبی ۷۵ دو برابر شدن جمعیت) در شرایط آزمایشگاهی رشد کردند. این در حالی بود که تغییر مشهودی در سرعت تقسیم آنها دیده نشد. همچنین انجماد و ذوب سلول‌ها اثر قابل ملاحظه ای روی رشد آنها نمی‌گذاشت و سلول‌های منجمد پس از ذوب و کشت مجدد رشد و تکثیر خود را آغاز کردند. نتایج RT-PCR و مشاهده محصول آن روی الکتروفورز ژل آگارز نشان داد که ژن‌های Nucleostemin، OCT-۴ و Nanog در سلول‌های بنیادی پالپ دندان انسان بیان می‌شود. بیان این ژن‌ها پس از القاء تمایز نیز ادامه داشت. همچنین بررسی بیان مارکرهای سلول ادونتوبلاست شامل BMP7، BMP2، DMP1، DSPP و Osteopontin نشان داد که پیش از شروع تمایز فقط مارکر BMP2 در سلول‌ها بیان می شود (شکل۲). این سلول ها همه مارکر های بنیادی رویانی که در این مطالعه مورد بررسی قرار گرفتند را بیان می کنند. همچنین ژن BMP_2 نیز در این سلول ها بیان می شود. اما سایر مارکرهای ادونتوبلاستی را بیان نمی کنند. در کنترل منفی اول از چپ به راست در مرحله ساخت cDNA به جای RNA از آب استفاده شده است. در کنترل منفی دوم از RNA به عنوان الگو در PCR استفاده شده تا آلودگی ژنومی در RNA استخراج شده خود را نشان دهد. در کنترل منفی سوم همه اجزا PCR به جز الگو وجود دارند. این کنترل آلودگی اجزای PCR را نشان می دهد. در موارد کنترل از پرایمر های ACTB استفاده شده است. در کنترل ها باندی مبنی بر وجود آلودگی وجود ندارد.

القاء تمایز ادونتوژنیک: در طی زمان تمایز هیچگونه تفاوتی در ظاهر سلول‌ها در هیچ یک از محیطهای القائی مشاهده نشد. هم چنین سرعت نسبی تکثیر سلول‌ها در ظروف مختلف تفاوت محسوسی نداشت (شکل ۳).



شکل ۲. الکتروفورز ژل آگارز محصولات RT-PCR ژن های Nanog، Oct-4، Actb، Nucleostemin، DSPP، DMP-1، BMP2، BMP7 و Osteopontin در سلول های بنیادی پالپ دندان انسان



شکل ۳. تصویر سلول های بنیادی پالپ دندان انسان ۴ هفته پس از القاء تمایز (بزرگنمایی ×۱۰۰). A: سلول های تحت القاء با BMP_2، B: سلول های تحت القاء با دگزامتازون، C: سلول‌های تحت القاء با مخلوط BMP_2و دگزامتازون، D: گروه شاهد شامل سلول هایی که هیچ القاء کننده ای دریافت نکرده‌اند

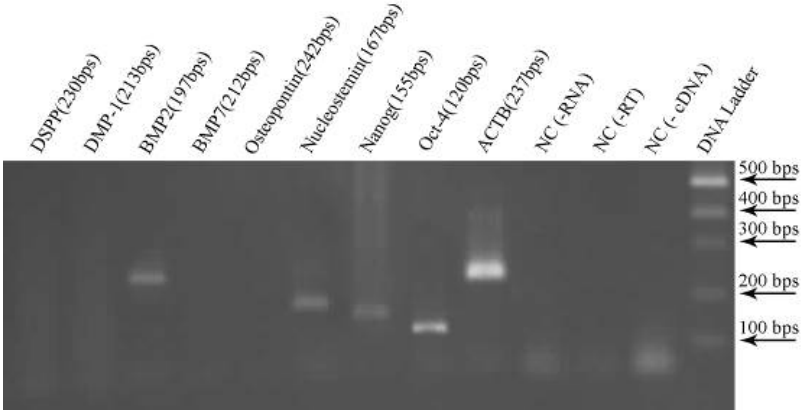
با بررسی‌های RT-PCR مشخص شد که هیچ کدام از ژن‌های مارکر ادونتوبلاستی به غیر از BMP2 در سلول‌های تحت القاء در هیچ کدام از غلظت‌ها و هیچ یک از بازه های زمانی بیان نمی‌شوند. BMP2 نیز از قبل از القاء و در حالت بنیادی بیان می‌شد (شکل ۴).

نتایج رنگ آمیزی اختصاصی سلول ها: به منظور بررسی بیان ژن‌ها در سطح پروتئین و نیز تأیید نتایج RT-PCR، رنگ آمیزی اختصاصی سلول

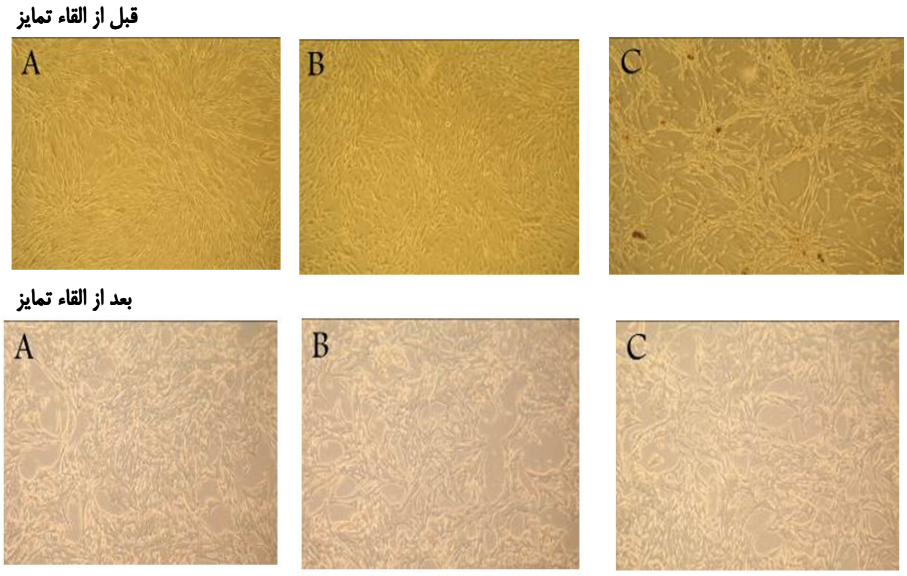
[DOR: 20.1001.1.15614107.1393.16.12.3.5]
[DOI: 10.18869/acadpub.jbums.16.12.23]

بنیادی پالپ دندان انسان قبل و پس از القاء تمایز با آنتی بادی های ویژه برای پروتئین‌های DSPP و DMP-1 انجام گرفت اما هیچ پروتئینی با آنتی بادی ویژه DSPP و DMP-1 شناسایی نگردید (شکل ۵).

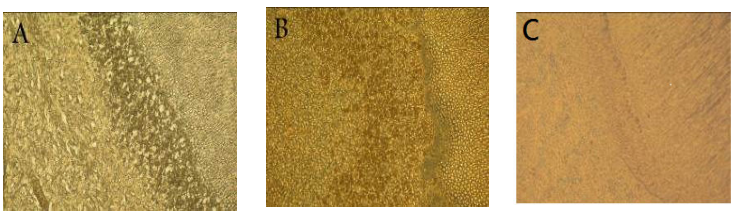
نتایج رنگ آمیزی اختصاصی بافت پالپ: از آنجایی که هیچ پروتئینی در مرحله رنگ آمیزی اختصاصی سلول‌ها شناسایی نشد، برای اطمینان از صحت عملکرد آنتی بادی ها، درستی روش کار و همچنین به عنوان کنترل مثبت بافت پالپ با استفاده از آنتی‌بادی‌های اختصاصی DSPP،DMP-1 رنگ آمیزی شد و هر دو پروتئین در بافت پالپ شناسایی شد، همچنین کنترل منفی در این آزمایش رنگ نگرفت که نشان دهنده صحیح بودن روش کار و سالم بودن آنتی بادی ها می‌باشد (شکل ۶).



شکل ۴. الکتروفورز ژل آگارز محصولات RT-PCR ژن های Nanog، Oct-۴، ACTB، Nucleostemin، DSPP، DMP-1، BMP_2، BMP_7 و Osteopontin در سلول‌های پالپ دندان انسان که به مدت ۴ هفته تحت القاء تمایز ادونتوژنیک بوده اند. همانطور که مشاهده می شود بیان ژنهای مارکر سلول بنیادی و همچنین ژن BMP_2 کماکان ادامه دارد و هیچ یک از مارکر های ادونتوبلاستی بیان نمی شوند



شکل ۵. رنگ آمیزی ایمینوسیتوشیمی سلول های بنیادی پالپ دندان انسان قبل و بعد از القاء تمایز به سمت ادنتوبلاست به وسیله آنتی بادی بر علیهDSPP و DMP-1. A: DSPP (بزرگنمایی×۵۰)، B:DMP-1(بزرگنمایی×۵۰)، C: کنترل منفی که در آن به جای آنتی بادی اولیه از بافر سد کننده استفاده شده است (بزرگنمایی×۱۰۰). نقاط قهوه ای در این عکس باقی مانده سوبسترای DAB می باشد که به طور کامل شسته نشده است



شکل۶. رنگ آمیزی ایمیونوهیستوشیمی پالپ دندان انسان به وسیله آنتی‌بادی‌های DSPP، DMP-1A: DSPP(بزرگنمایی ×۳۲۰)، B: DMP-1 (بزرگنمایی ×۳۲۰)، C: کنترل منفی که در آن به جای آنتی بادی اولیه از بافر سد کننده استفاده شده است (بزرگنمایی×۴۰۰)

[DOR: 20.1001.1.15614107.1393.16.12.3.5]
[DOI: 10.18869/acadpub.jbums.16.12.23]

بحث و نتیجه گیری

در پژوهش حاضر سلول‌های بنیادی با بازدهی بالا از پالپ دندان انسان جداسازی شد و نشان داده شد که این سلول ها خصوصیات سلول بنیادی را دارند یکی از مسائلی که در کشت سلول‌های بنیادی باید رعایت شود پاساژ این سلول‌ها می‌باشد. در واقع، سلول‌ها باید قبل از اینکه کل سطح ظرف کشت را پر کنند پاساژ داده شوند، زیرا در غیر این صورت ممکن است قدرت تکثیر را از دست داده و یا به صورت خود به خود تمایز یابند (۱۵).

اما بررسی‌ها نشان می‌دهد سلول‌های بنیادی پالپ دندان انسان از این قاعده تبعیت نمی‌کنند و پس از پوشاندن کامل سطح ظرف کشت، باز هم مارکرهای سلول بنیادی مثل Oct-۴ و Nanog را بیان می کنند (۱۶). در مطالعه حاضر نیز این امر از دو طریق نشان داده شد. اول اینکه در برخی موارد که سلول ها به این مرحله رسیدند و پاساژ داده شدند (در طی این آزمایش همیشه تلاش می‌شد که وقتی سلول‌ها ۸۰٪-۷۰٪ از سطح ظرف را پر کرده‌اند پاساژ داده شوند)، باز هم سرعت رشد خود را حفظ کرده و با سرعت زیاد تکثیر شدند. دوم اینکه پس از رسیدن به این مرحله سلول‌های مذکور باز هم مارکر های بنیادی مورد مطالعه مثل Oct-۴، Nanog و Nucleostemin را بیان کردند. بررسی بیان ژن های مارکر ادنتوبلاست Nanog، Nucleostemin و Oct-۴ در مطالعه حاضر با روش RT-PCR نشان داد که سلول‌های جدا شده از پالپ دندان انسان هر سه ژن فوق را بیان می‌کنند. در یک مطالعه در این زمینه Agha-Hosseini و همکاران نیز سلول‌های بنیادی را از پالپ دندان عقل جدا کرده و مارکرهای CD۱۳، CD۴۴، CD۹۰، CD۱۶۶ و CD۱۰۵ را در این سلول ها شناسایی کردند (۱۷).

همچنین Kerkis و همکارانش توانستند به روش کشت بافت بیان ژن‌های مارکر سلول‌های بنیادی رویانی از جمله TRA-۱-۶۰، SSEA-۳، TRA-۱-۸۱، Oct-۴ و Nanog را در سلول‌های جداسازی شده از پالپ دندان شیری مشخص کنند (۱۸). در دیگر مطالعه در این زمینه بیان Oct۳و۴ در سلول‌های بنیادی استخراج شده از دندان های شیری در کشت جمعیت اولیه و جمعیت تأخیری گزارش شده است (۱۹).

از ویژگی‌های بارز سلول های بنیادی سرعت رشد بالا و نیز دو برابر شدن جمعیت سلولی به دفعات زیاد می باشد. در مطالعه حاضر سلول‌ها تا ۴۵ بار دو برابر شدن جمعیت سلولی رشد داده شدند و هیچ تغییر شکلی در ظاهر سلول‌ها بوجود نیامد. همچنین سلول‌ها تا این مرحله مارکرهای سلول بنیادی را کماکان بیان می‌کردند که این نتیجه در تطابق با یافته‌های نتایج مطالعه Kerkis و همکاران (۱۸) و Suchánek و همکاران (۲۰) می‌باشد. جهت بررسی القاء تمایز ادونتوژنیک در سلول‌های بنیادی پالپ دندان انسان در پژوهش حاضر از BMP_2 و دگزامتازون در غلظت‌ها و مدت زمان‌های متفاوت استفاده شد. نتایج نشان داد در هیچ یک از غلظت‌ها و زمان‌ها، با استفاده از هر یک از دو ماده القاء کننده یا مخلوط هر دوی آنها با هم تمایز سلول‌های تحت القاء شناسایی نشد. عدم بیان مارکرهای ادنتوبلاستی در مطالعه حاضر می‌تواند به دلیل روش مورد استفاده برای جداسازی سلول بنیادی باشد. بررسی‌ها نشان می‌دهند در هر روش جداسازی سلول از بافت، سلول‌های خاصی به دست می آید. برای مثال Kerkis و همکاران گزارش کردند که سلول‌های جدا شده از پالپ دندان شیری به دو روش هضم آنزیمی و کشت بافت با هم تفاوت اساسی دارند تا آنجا که این گروه برای سلول‌های جداسازی شده از کشت بافت نام جدیدی (Immature Dental Pulp Stem Cells=IDPSCs) گزارش کردند (۱۸). بنابراین ممکن است در مطالعه کنونی با این روش استخراج سلول که کاملاً بدیع است، سلول‌هایی به دست آید که تحت شرایط متفاوت یا زمان بیشتری به ادونتوبلاست تمایز پیدا می‌کنند.

همچنین القاء در شرایط کشت سه بعدی یا تک لایه می‌تواند بر تمایز DPSC ها تأثیر گذار باشد. نتایج مطالعه Iohara و همکاران نشان داد القاء سلول‌ها توسط BMP_2 در کشت سه بعدی بسیار مؤثرتر از کشت تک لایه است و آنها ۲۱ روز پس از القاء بیان DMP-1 را تنها در کشت سه بعدی مشاهده کردند (۲۱). در دیگر بررسی مشخص گردید که فعالیت الکالین فسفاتازی و سطح بیان ژن‌های DSPP و DMP1 در کشت سه بعدی با استفاده از مکمل ادنتوبلاست شامل ویتامین D3 در مقایسه با کشت سه بعدی بدون مکمل و کشت تک لایه با مکمل بالاتر می‌باشد (۲۲).

این امر می‌تواند به خاطر بر هم کنش بهتر سلول‌ها و اثرات مواد ترشحی و رد و بدل مواد بین سلول‌ها در این شرایط باشد. بنابراین القاء در شرایط کشت تک لایه در مطالعه حاضر می تواند دلیلی بر عدم تمایز DPSC ها باشد. پاساژ دادن سلول‌ها نیز ممکن است در روند القاء تمایز به سمت ادنتوبلاست اختلال ایجاد نموده باشد. پاساژ دادن از چند لایه شدن سلول‌ها جلوگیری می‌کند بررسی‌ها نشان می‌دهد سلول‌ها برای ایجاد بافت معدنی باید چند لایه باشند. همچنین این احتمال وجود دارد که سلول‌ها طی انجام مراحل پاساژ تحت استرس قرار گیرند و اثر القاء کننده‌ها بر آنها از بین برود (۲۳).

در این مطالعه سرعت رشد سلول‌های تحت القاء به قدری زیاد بود که هر ۶-۵ روز پاساژ می خوردند و از سرعت رشد آنها کاسته نشده بود. بنابراین ما برای اینکه غلظت القاء کننده برای تمام سلول‌ها کافی باشد، زمانی که سطح ظرف پر می‌شد آنها را پاساژ دادیم. در مجموع در این مطالعه سلول بنیادی با یک روش نوین با بازدهی بالا از پالپ دندان انسان جداسازی شد و نشان داده شد که این سلول‌ها خصوصیات سلول بنیادی را دارند و سه مارکر سلول‌های بنیادی شامل Nanog، OCT-۴ و Nucleostemin را بیان می‌کنند. با این وجود سلول-های تحت القاء تمایز نیافته بودند که این امر می‌تواند به خاطر روش جداسازی، پاساژ دادن حین القاء و یا کشت تک لایه باشد.

تقدیر و تشکر

بدینوسیله از معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی کرمان به دلیل حمایت مالی از این تحقیق تشکر و قدردانی می گردد.

[DOR: 20.1001.1.15614107.1393.16.12.3.5]
[DOI: 10.18869/acadpub.jbums.16.12.23]

Isolation and Differentiation of Dental Pulp Stem Cells into Odontoblastic Lineage

M. Raoof (DDS,MS)*[1], A. Mohammadi Kamal-Abadi (DDS)[2], M.M. Yaghoobi (PhD)[2], R. Kooshki (MSc)[3], M. Abbasnejad (PhD)[3], A. Derakhshani (MSc)[4]

1.Department of Endodontics, School of Dentistry, Kerman University of Medical Sciences, Kerman, I.R.Iran.
2.Department of Biotechnology, Institute of Science and High Technology and Environmental Sciences, Graduate University of Advanced Technology, Kerman, I.R.Iran.
3.Department of Biology, Faculty of Sciences, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, I.R.Iran.
4.Department of Pathology, Stem Cell Research Center, Kerman University of Medical Sciences, Kerman, I.R.Iran.

J Babol Univ Med Sci; 16(12); Dec 2014; PP:23-31
Received: Jul 21th 2014, Revised: Aug 6th 2014, Accepted: Sep 24th 2014.

ABSTRACT

BACKGROUND AND OBJECTIVE: Limited resources for adult stem cells necessitate appropriate methods for isolation, proliferation and differentiation of these cells. Human third molar is an easily available source in this regard that usually remains unused. The aim of this study was to investigate the isolation, culture and odontogenic differentiation of human dental pulp stem cells.

METHODS: In this experimental study, twenty human third molars were used for stem cell isolation. The digested pulp tissue culture approach was used to isolate stem cells. Some markers of stem cells were studied by RT-PCR. Stem cells were then induced towards odontoblast cells by use of BMP-2 and Dexamethasone. Expression of odontoblastic markers was investigated in induced cells by RT-PCR and immunocytochemistry methods.

FINDINGS: The human dental pulp stem cells were isolated with high efficiency. RT-PCR analysis showed that these cells express some markers of embryonic stem cells. However, the induced cells did not expressed odontoblastic markers such as DSPP, DMP-1, BMP7 and Osteopontin. Also the induced cells did not produce DSPP and DMP-1 proteins.

CONCLUSION: Despite the successful isolation of stem cells, the induced cells failed to differentiate into odontoblasts. This may be due to the differentiation method as well as the passage during induction or monolayer culture.

KEY WORDS: *Dental Pulp Stem Cells,Odontoblasts, BMP-2,Dexamethasone.*

Please cite this article as follows:

Raoof M, Mohammadi Kamal-Abadi A, Yaghoobi MM, Kooshki R, Abbasnejad M, Derakhshani A. Isolation the Stem Cells from Human Third Molars Dental Pulp and Survey Differentiation them Toward Odontoblastic Lineage. J Babol Univ Med Sci 2014; 16(12):23-31.

* **Corresponding Author; M. Raoof (DDS,MS)**
Address: Department of Endodontics, Dental School, Shafa St, Jomhoori Eslami Blvd, Kerman, I.R.Iran.
Tel: +98 34 32118071
E-mail: Maryam.raoof@gmail.com

[DOR: 20.1001.1.15614107.1393.16.12.3.5]
[DOI: 10.18869/acadpub.jbums.16.12.23]

References

1.Wagers A, Weissman I. Plasticity of Adult Stem Cells. Cell. 2004; 116(5):639-48.

2.Conley BJ, Young JC, Trounson AO, Mollard R. Derivation, propagation and differentiation of human embryonic stem cells. Int J Biochem Cell Biol 2004; 36(4): 555-567.

3.Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS, et al. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. Science. 1998;282(5391):1145-7.

4.Bongso A, Fong CY, Ng SC, Ratnam S. Isolation and culture of inner cell mass cells from human blastocysts. Hum Reprod 1994;9(11):2110-7.

5.Gronthos S, Brahim J, Li W, Fisher LW, Cherman N, Boyde A, et al. Stem cell properties of human dental pulp stem cells. J Dent Res. 2002;81(8):531-5.

6.d'Aquino R, Graziano A, Sampaolesi M, Laino G, Pirozzi G, De Rosa A, et al. Human postnatal pulp cells co-differentiate into osteoblast and endotheliocytes:a pivotal synergy leading to adult bone tissue formation. Cell Death Differ. 2007;14(6):1162-71.

7.Zhang W, Walboomers XF, Shi S, Fan M, Jansen JA. Multilineage differentiation potential of stem cells derived from human dental pulp after cryopreservation. Tissue Eng. 2006;12(10):2813-23.

8.Sveen OB, Hawes RR. Differentiation new odantoblasts and dentine bridge formation in rat molar teeth after tooth grinding. Arch Oral Biol. 1968;13(12):1399-409.

9.Ruch JV. Odontoblast commitment and differentiation. Biochem Cell Biol. 1998;76(6):923-38.

10.Peng L, Ye L, Zhou XD. Mesenchymal stem cells and tooth engineering. Int J Oral Sci. 2009;1(1):6-12.

11.Liu M, Sun Y, LiuY, Yuan M, Zhang Z, Hu W. Modulation of the differentiation of dental pulp stem cells by different concentrations of β-glycerophosphate. Molecules. 2012;17(1):1219-32.

12.Zhang W, Zhang X, Ling J, Liu W, Zhang X, Ma J, et al. Proliferation and odontogenic differentiation of BMP2 gene-transfected stem cells from human tooth apical papilla: an in vitro study. Int J of Mol Med. 2014;34(4):1004-12.

13.Almushayt A, Narayanan K, Zaki AE, George A. Dentin matrix protein 1 induces cytodifferentiation of dental pulp stem cells into odontoblasts. Gene Ther. 2006;13(7):611-20.

14.Cordeiro MM, Dong Z, Kaneko T, Zhang Z, Miyazawa M, Shi S, et al. Dental pulp tissue engineering with stem cells from exfoliated deciduous teeth. J Endod. 2008;34(8):962-9.

15.Paula-Silva FW, Ghosh A, Silva LA, Kapila YL. TNF-alpha promotes an odontoblastic phenotype in dental pulp cells. J Dent Res. 2009;88(4):339-44.

16.Suri L, Damoulis PD, Le T, Gagari E. Expression of MMP-13 (collagenas 3) in long-term cultures of human dental pulp cells. Arch Oral Biol. 2008;53(8):791-9.

17.Agha-Hosseini F, Jahani MA, Jahani M, Mirzaii-Dizgah I, Ali-Moghaddam K. In vitro isolation of stem cells derived from human dental pulp. Clin Transplant. 2010;24(2):E23-8.

18.Kerkis I, Kerkis A, Dozortsev D, Stukart-Parsons GC, Gomes Massironi SM, Pereira LV, et al. Isolation and characterization of a population of immature dental pulp stem cells expressing OCT-4 and other embryonic stem cell markers. Cells Tissues Organs. 2006;184(3):105-16.

19.Otaki S, Ueshima S, Shiraishi K, Sugiyama K, Hamada S, Yorimoto M, et al. Mesenchymal progenitor cells in adult human dental pulp and their ability to form bone when transplanted into immunocompromised mice. Cell Biol Int. 2007; 31(10):1191-7.

20.Suchánek J, Soukup T, Ivancaková R, Karbanová J, Hubková V, Pytlík R, et al. Human dental pulp stem cell – isolation and long term cultivation. Acta Medica (Hradec Kralove). 2007;50(3):195-201.

[DOR: 20.1001.1.15614107.1393.16.12.3.5]
[DOI: 10.18869/acadpub.jbums.16.12.23]

21.Iohara K, Zheng L, Wake H, Ito M, Nabekura J, Wakita H, et al. A novel stem cell source for vasculogenesis in ischemia: subfraction of side population cells from dental pulp. Stem Cells. 2008;26(9):2408-18.
22.Baghaban Eslaminejad M, Bordbar S, Nazarian H. Odontogenic differentiation of dental pulpderived stem cells on tricalcium phosphate scaffolds. J Dent Sci. 2013;8(3):306-13.
23.Yang X, Van Den Dolver J, Walboomers X F, Zhang W, Bian Z, Fan M, et al. The odontogenic potential of Stro-1 sorted rat dental pulp stem cells in vitro. J Tissue Eng Med. 2007;1(1):66-73.

[DOR: 20.1001.1.15614107.1393.16.12.3.5]
[DOI: 10.18869/acadpub.jbums.16.12.23]