مقاله تحقیقی

مجلهٔ دانشگاه علوم پزشکی بابل
دوره هجدهم، شماره ۳، اسفند ۱۳۹۴، صفحه ۴۴-۳۸

تاثیر ژل رویال بر تمایز سلول های بنیادی به سلول‌های شبه عصبی در شرایط آزمایشگاهی

مرضیه ابراهیمی (MSc)[۱]، سمیرا اصغرزاده (MSc)[۱]، هدایت اله شیرزاد (PhD)[۱]، نرگس ابراهیمی (BSc)[۱]، مسیح حسینی (MSc)[۱]، مسلم کریمیان کاکلکی (BSc)[۱]، محمود رفیعیان (PhD)[۱*]

۱-مرکز تحقیقات گیاهان دارویی، دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد

دریافت: ۹۴/۴/۱، اصلاح: ۹۴/۵/۷، پذیرش: ۹۴/۷/۶

خلاصه

سابقه و هدف: سلول‌های بنیادی کارسینومایی P۱۹ توانایی تمایز به سلولهای سه لایه جنینی را دارند. از آنجائیکه سلولهای تمایز یافته می توانند باعث کاهش عوارض ناشی از بیماریهای تحلیل برنده سیستم عصبی شوند. لذا این تحقیق با هدف بررسی تمایز سلولهای بنیادی P۱۹ به سلولهای عصبی تحت تاثیر ژل رویال صورت گرفت.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه بنیادی-کاربردی اجسام شبه جنینی حاصل از کشت معلق سلولهای P۱۹ به ظرفهای ژلاتینه منتقل شده و سپس در شش گروه با غلظتهای ۲۵، ۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰، ۲۰۰ و ۳۰۰ mg/ml ژل رویال قرار گرفتند. برای هر گروه پنج خانه در نظر گرفته شد. بررسی مورفولوژی سلولهای تمایز یافته با استفاده از رنگ آمیزی اختصاصی کرزیل ویوله انجام گرفت. ردیابی بیان پروتئینهای ویژه سلولهای عصبی مانند سیناپتوفیزین و بتاتوبولین III با استفاده از ایمنوفلورسنس انجام شده و نتایج مورد بررسی قرار گرفت.

یافته‌ها: بر اساس نتایج بدست آمده سلولهای تیمار شده با ژل رویال به رنگ آمیزی اختصاصی سلولهای عصبی پاسخ مثبت دادند. میانگین درصد تمایز سلولی در غلظتهای مختلف ژل رویال به طور معنی داری بیشتر از گروه کنترل منفی (با میانگین درصد تمایز سلولی۲/۳±۹) بوده است. بالاترین درصد تمایز سلولی در گروههای تیمار شده با غلظتهای mg/ml ۲۰۰و۳۰۰ (با میانگین در صد تمایز سلولی ۴/۸±۹۸ و ۲/۲±۹۹/۳) مشاهده شد (p<۰/۰۵). میانگین درصد سلولهای تمایز یافته گروه تیمار با غلظت ۲۰۰ mg/ml تفاوت معنی داری با گروه تیمار با غلظت ۳۰۰ mg/ml نداشت.

نتیجه گیری: نتایج این مطالعه نشان داد که سلولهای P۱۹ توانایی تمایز به سلولهای عصبی را دارند و می توانند به عنوان منبعی در سلول درمانی بیماریهای عصبی استفاده شوند.

واژه‌های کلیدی: سلولهای بنیادی کارسینومایی، تمایز عصبی سلولهای بنیادی، نشانگرهای عصبی.

مقدمه

بیماری‌های تحلیل برنده سیستم عصبی مانند آلزایمر در اثر تحلیل و از بین رفتن سلولهای عصبی و تجمع پروتئین های سمی در سیستم عصبی مرکزی ایجاد می شوند (۱). تاکنون روش های درمانی مختلفی از جمله کاهش سطح پروتئین های تجمع یافته با استفاده از روش های محدود سازی نفوذ پذیری سد خونی- مغزی برای درمان این بیماری ها ارائه شده است (۲). یکی از روش های درمانی که در سال های اخیر مورد توجه قرار گرفته سلول درمانی با استفاده از سلولهای بنیادی تمایز یافته به سلولهای عصبی می باشد. تاکنون تمایز سلولهای بنیادی مختلفی مانند سلولهای بنیادی جنینی تحت تاثیر عوامل القاگر مختلف مورد بررسی قرار گرفته است (۳). نتایج پژوهش‌ها نشان داد سلولهای عصبی میتوانند از تمایز سلولهای بنیادی رویانی انسان و موش بدست آیند (۴). سلولهای P۱۹ دودمانی از سلولهای کارسینومای جنینی چند استعدادی هستند که قادرند در محیط کشت حاوی سرم رشد نموده و برای تمایز به هر سه دودمان مزودرمی- اندودرمی و اکتودرمی القا شوند(۵). هنگامی که این سلولها با رتینوئیک اسید تیمار شوند، به نورو اکتودرم تمایز پیدا کرده و محیط کشت حاوی نورون ها و سلولهای گلیا می شود. (۶). مطالعاتی نیز روی پیوند سلولهای P۱۹ تیمار شده با رتینوئیک اسید به جسم مخطط رت بالغ که سیستم ایمنی آن ضعیف شده صورت گرفته است (۷). نتایج پژوهشی که به بررسی اثر داروی دپرنیل در القای تمایز سلولهای P۱۹ به سلولهای عصبی پرداخت نشان داد دپرنیل می تواند به صورت وابسته به دوز باعث القای این سلولها شود(۸). علاوه بر ترکیبات شیمیایی که برای کنترل و کاهش عوارض بیماریهای عصبی استفاده می شوند تعدادی ترکیب طبیعی نیز وجود دارند که توسط مردم بومی برای درمان و کنترل بیماریهای عصبی مورد استفاده قرار میگیرند(۶). یکی از ترکیباتی که اثرات حفاظتی و آنتی آپوپتاتیک آن

▣ این مقاله حاصل طرح تحقیقاتی به شماره ۱۳۳۲ مرکز تحقیقات گیاهان دارویی دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد می باشد.

* مسئول مقاله: دکتر محمود رفیعیان کوپایی
آدرس: شهرکرد، دانشگاه علوم پزشکی، مرکز تحقیقات گیاهان دارویی. تلفن: ۳۲۵۷۲۳۵۶-۰۳۸
E-mail: rafieian@yahoo.com

[DOR: 20.1001.1.15614107.1394.18.3.6.0]
[DOI: 10.22088/jbums.18.3.38]

بر سلولهای عصبی به اثبات رسیده، ژل رویال (Royal jelly) می باشد. ژل رویال ماده ژلاتینی سفید مایل به زرد روشن، کلوئیدی و چسبناک با بوی خاص و طعمی تند و زننده است (۱۰و۹). در پژوهشی نشان داده شد سلولهای تیمار شده با AMP N1-oxide توانایی بیان پروتئینهای اختصاصی سلولهای عصبی بالغ را دارند. Hattori و همکاران نشان دادند که ترکیب AMP N1-oxide رویال ژل باعث افزایش تکثیر پیش سازهای سلول عصبی /Neural Stem Cells NSCs= progenitor cells می شود(۱۱).

نتایج تحقیقات صورت گرفته در این زمینه پیشنهاد میکند AMP N1-oxide از طریق افزایش میزان فسفوریلاسیون فاکتورهای نسخه برداری STAT3 تولید استروسیت از سلول پروژنیتور عصبی را امکان پذیر می سازد. آسیبهای اجتماعی و اقتصادی ناشی از بیماری های تحلیل برنده سیستم عصبی در کشورهای در حال توسعه به شدت در حال افزایش است از این رو لزوم انجام پژوهشهایی در جهت کنترل گسترش و کاهش عوارض ناشی از این بیماریها اجتناب ناپذیر است. لذا این تحقیق با هدف القای فنوتیپ عصبی در سلولهای P۱۹ با استفاده از ژل رویال صورت گرفت.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه بنیادی-کاربردی تاثیر ژل رویال بر تمایز سلولهای بنیادی P۱۹ به سلول‌های شبه عصبی در شرایط آزمایشگاهمورد بررسی قرار گرفت.

کشت سلول: در پژوهش حاضر از سلولهای تراتوکارسینومایی رده P۱۹ استفاده گردید. این سلول ها به صورت کشت چسبنده از بانک سلولی انستیتوپاستور تهران تهیه و تکثیر شدند. سلولهای P۱۹ در محیط کشت α-MEM, (Gibco, cat: 11900-073) حاوی ده درصد FBS (Fetal bovine serum,) (Sigma,cat:10270-106)، پنی سیلین(۵۰µg/mL) (Sigma, cat: P3032) و استرپتومایسین(۵۰µg/mL) (Sigma, cat: S1277) کشت داده شدند. اولین گام در القای تمایز، تشکیل اجسام شبه جنینی است به این منظور سلولهای P۱۹ به مدت ۲۴ ساعت در پتری دیش های فاقد خاصیت چسبندگی کشت داده شدند. اجسام شبه جنینی بدست آمده به پتری دیشهای ۱۲ خانه ای ژلاتینه ویژه کشت سلول انتقال یافتند.

سپس با غلظت های ۲۵، ۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰، ۲۰۰ و ۳۰۰ میلی گرم بر میلی لیتر ژل رویال تیمار شدند. جهت بررسی مورفولوژی سلولهای حاصل از تمایز از رنگ آمیزی اختصاصی سلولهای عصبی با کرازیل ویوله (sigma, cat: 234-043-3) استفاده شد. برای تعیین بهترین غلظت ژل رویال که باعث تمایز سلولهای بیشتری به سلولهای شبه عصبی می شوند سلولهای رنگ آمیزی شده شمارش شدند جهت شمارش سلولهای عصبی که با کرزیل ویوله به رنگ بنفش در آمده بودند از گراتیکول شطرنجی استفاده شد. در پایان ردیابی بیان نشانگرهای اختصاصی سلولهای عصبی در سلول‌های تمایز یافته با استفاده از تکنیک ایمنوفلورسنس بررسی شد.

در این پژوهش از آنتی بادی های اولیه بتا توبولین anti β-III tubulin monoclonal antibod y (Abcam, ab7751) و آنتی بادی اولیه سیناپتو فیزین anti(Abcam, San Francisco, CA, ab8049) synaptophysin monoclonal antibody استفاده شد. آنتی بادی IgG کونژوگه با FITC(Sigma, cat: F9137) به عنوان آنتی بادی ثانویه در نظر گرفته شد.

تهیه غلظت های مختلف ژل رویال: ژل رویال خریداری شده از زنبورداران شهرکرد با بافر فسفات سالین (PBS) به نسبت (۰/۰۲۵) مخلوط و به مدت یک شبانه روز در انکوباتور شیکر دار در دمای ۴ درجه به آرامی شیک می شود. سپس مخلوط حاصل به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی گراد در دور ۱۲۰۰۰ g سانتریفیوژ می شود. محلول رویی حاصل از سانتریفیوژ جمع آوری و توسط بردفورد تعیین غلظت می شود. در پایان توسط محیط کشت غلظت های ۲۵، ۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰، ۲۰۰ و ۳۰۰ میلی گرم بر میلی لیتر آن تهیه شد.

تولید اجسام شبه جنینی: اولین گام در القای تمایز سلولهای بنیادی تشکیل اجسام شبه جنینی (Embryoid bodies: EB) است. به این منظور سلولهای P۱۹ به مدت بیست و چهار ساعت در پتری دیش های فاقد خاصیت چسبندگی کشت داده شدند. سپس EB به پتری دیش های ۶ خانه ای ژلاتینه مخصوص کشت سلول انتقال یافتند. سلولهای کشت داده شده به هفت گروه تقسیم و سلولهای هر گروه به ترتیب گروه یک تا هفت در معرض غلظتهای ۰، ۲۵، ۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰، ۲۰۰ و ۳۰۰ میلی گرم بر میلی لیتر ژل رویال قرار گرفتند. بعد از ۲۴ ساعت محیط کشت سلول ها تعویض شد و سپس به مدت دو هفته در محیط کشت حاوی ده درصد سرم کشت داده شدند. محیط کشت سلولها در تمام گروه ها هر دو روز یکبار تعویض شد. از حدود روز دهم بعد از تیمار فنوتیپ عصبی در سلولهای کشت داده شده ظاهر گردید.

رنگ آمیزی کرازیل ویوله: به منظور بررسی مورفولوژیک سلولهای تمایز یافته از رنگ‌آمیزی اختصاصی کرازیل ویوله استفاده شد. به این منظور سلولها با PBS شسته شدند سپس با استفاده از پارافرمآلدیید ۴ درصد فیکس شدند. آبگیری سلول ها در ترکیبی از اتانول و اسیداستیک انجام گرفت. بعد از آبگیری سلول ها سه بار با PBS شستشو داده شدند و به مدت ده دقیقه در ترکیبی محتوی کرزیل ویوله (sigma, cat: 234-043-3)(۰/۲۵ ٪)، اسیداستیک گلایسیال (۰/۸)، استات سدیم (۰/۶ میلی مولار) وآب (۱۰۰ میلی لیتر) انکوباسیون شدند. در نهایت سلولها با PBS شسته شدند و با استفاده از چسب کانادابالزام (Balsam canada) لامل سلولی روی لام چسبانده می شود.

تعیین بهترین غلظت ژل رویال: برای تعیین بهترین غلظت ژل رویال که باعث تمایز سلولهای بیشتری به سلولهای شبه عصبی می‌شوند سلولهای رنگ آمیزی شده شمارش شدند جهت شمارش سلولهای عصبی که با کرزیل ویوله به رنگ بنفش در آمده بودند از گراتیکول شطرنجی استفاده شد. به این منظور برای هر نمونه به طور تصادفی پنج میدان دید میکروسکوپ نوری با بزرگنمایی عدسی شئ بیست شمارش شد.

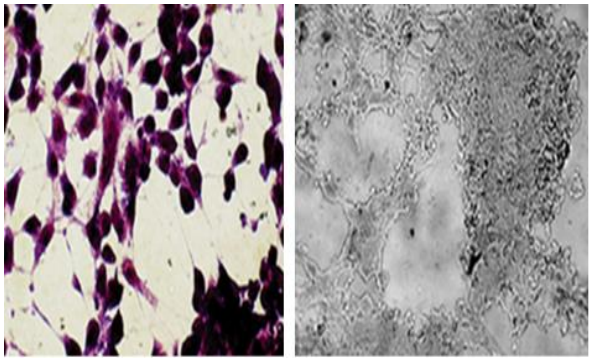
ایمنوفلورسنس: به منظور ردیابی بیان نشانگرهای سلولهای عصبی در سلولهای حاصل از تمایز از تکنیک ایمنوفلورسنس استفاده شد. در این پژوهش از آنتی بادی های اولیه بتا توبولین و آنتی بادی اولیه سیناپتو فیزین استفاده شد. آنتی بادی IgG کونژوگه به عنوان آنتی بادی ثانویه در نظر گرفته شد.برای انجام ایمنوفلورسانس سلولهای تیمار شده با رویال ژل به مدت ۳۰ دقیقه با محلول چهار درصد پارافرمآلدئید انکوبه شدند بعد از فیکس کردن سلولها سه بار با PBS (Phosphate-buffered saline) شسته شدند. سپس با محلول بلاک کننده حاوی ۰/۰۳ درصد تریتون ۱۰۰X و ۰/۰۱۰ سرم نرمال بز(Sigma, cat:

[DOR: 20.1001.1.15614107.1394.18.3.6.0]
[DOI: 10.22088/jbums.18.3.38]

G9023: NGS) در PBS به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه شد. این سلول ها به مدت دو ساعت با آنتی بادی های اولیه در دمای ۳۷ درجه انکوبه شدند. بعد از شستشو با PBS به مدت دو ساعت با آنتی بادی ثانویه انکوبه شدند. در نهایت بعد از شستشوی سلولها با PBS لامل سلولها توسط گلیسرول ۰/۰۷۰ روی لام چسبانده‌شدند. با استفاده از میکروسکوپ ایمنوفلورسنس بیان ژن های بتاتوبولین و سیناپتوفیزین در سلولهای تمایز یافته به اثبات رسید. آنالیز آماری داده ها با استفاده از برنامه SPSS انجام شد. جهت بررسی نرمال بودن توزیع داده ها از آزمون کلموگراف- اسمیرنوف و برای ارزیابی تفاوت بین گروهی میزان (PNI) از روش آنالیز واریانس یکطرفه (ANOVA)، آزمون تعقیبی Duncan استفاده گردید و $p<۰/۰۵$ معنی دار در نظر گرفته شد.

یافته ها

بررسی مورفولوژیک: اجسام شبه جنینی بعد از ۲۴ ساعت قرار گرفتن در معرض ژل رویال به مدت ده روز کشت داده شدند. سلولهای در حال تکثیر به صورت شعاعی از اطراف اجسام شبه جنینی بیرون زدند. (شکل ۱).



شکل۱. فتومیکروگراف سلولهای P۱۹ تمایز یافته به سلولهای شبه عصبی با رنگ آمیزی اختصاصی کرازیل ویوله.
A: سلولهای عصبی به رنگ بنفش دیده می شوند

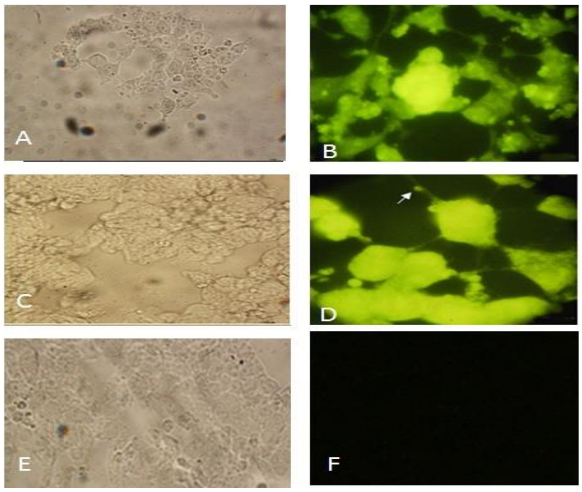
تعیین دوز مناسب ژل رویال جهت القای فنوتیپ عصبی: سلولهای شبه عصبی بعد از رنگ آمیزی با کرازیل ویوله به رنگ بنفش دیده می شوند. میانگین درصد القای عصبی در غلظت های مختلف ژل رویال به طور معنی داری بیشتر از گروه کنترل منفی (با میانگین درصد تمایز سلولی۳/۲±۹) بوده است. بر اساس نتایج بیشترین در صد تمایز در گروه های تیمار شده با غلظتهای ۲۰۰و۳۰۰ میلی گرم بر میلی لیتر ژل رویال (با میانگین در صد تمایز سلولی ۸/۴±۹۸ و ۲/۲±۳/۹۹) مشاهده شد. درصد تمایز سلولی در این گروهها به طور معنی داری نسبت به گروه تیمار شده با غلظت های۲۵ (با میانگین درصد تمایزی ۲/۲±۲۱)، ۵۰ (با درصد تمایزی۳/۲±۳۲) ، ۱۰۰ (بادرصد تمایز ۳/۵±۳/۷۱) و ۱۵۰ (با میانگین در صد تمایز۹/۵±۸۳) افزایش داشته است ($p<۰/۰۵$). میانگین درصد سلولهای تمایز یافته گروه تیمار با غلظت۲۰۰ میلی گرم بر میلی لیتر ژل رویال تفاوت معنی داری با گروه تیمار با غلظت۳۰۰ میلی گرم بر میلی لیتر ژل رویال ندارد ($p<۰/۰۵$)(جدول ۱).

جدول۱ تاثیر غلظت های مختلف ژل رویال بر القای فنوتیپ شبه عصبی در سلولهای P۱۹

غلظت عامل القاگر (mg/ml)	در صد القای عصبی (PNI) (Mean±SD)
۲۵	۲۱±۲/۲*b,c,d,e,f
۵۰	۳۲±۲/۳*a,c,d,e,
۱۰۰	۷۱/۳±۵/۳ *a,b,d,e,f
۱۵۰	۸۳±۵/۹ *a,b,c,e,f
۲۰۰	۹۸± ۴/۸* a,b,c,
۳۰۰	۹۹/۳±۲/۲ *a,b,c,d
کنترل	۹±۲/۳ a,b,c,d,e,f

PNI: میانگین درصد القای عصبی، RJ: ژل رویال. *$p<۰/۰۵$

تایید هویت سلولهای عصبی به روش ایمنوفلورسنس: ارزیابی ایمنوفلورسنس سلولهای P۱۹ تمایز یافته نشان می دهد که این سلول ها بعد از تیمار با ژل رویال نسبت به سیناپتوفیزین و بتا توبولین III واکنش ایمنی نشان می‌دهند. نورونهای مثبت نسبت به سیناپتوفیزین و بتا توبولین به صورت سلولهای منفرد یا توده های کوچک سلولی ردیابی شدند (شکل ۲).



شکل۲. تصویر میکروسکوپ فلورسنس از سلول های شبه عصبی حاصل از تمایز سلولهای P۱۹ تحت تأثیر ژل رویال.

A: تصویر میکروسکوپ‌نوری و B:تصویر میکروسکوپ فلورسنت سلول های تیمار شده باژل رویال در معرض آنتی بادی اولیه سیناپتوفیزین C: تصویر میکروسکوپ نوری و D: تصویر میکروسکوپ فلورسنت سلولهای تیمار شده با ژل رویال در معرض آنتی بادی اولیه بتا توبولین. E: تصویر میکروسکوپ نوری و F: تصویر میکروسکوپ فلورسنت سلولهای P ۱۹ بدون تیمار با ژل رویال در معرض آنتی بادی اولیه سیناپتوفیزین .

بحث و نتیجه گیری

در این مطالعه حدود ده روز بعد از تیمار اجسام شبه جنینی با ژل رویال تعدادی از سلول ها مورفولوژی سلولهای عصبی را پیدا کرده و به رنگ آمیزی اختصاصی سلولهای عصبی پاسخ مثبت می دهند. نتایج پژوهش نشان داد با افزایش غلظت ژل رویال در صد سلولهای تمایز یافته بصورت وابسته به دوز

[DOR: 20.1001.1.15614107.1394.18.3.6.0]
[DOI: 10.22088/jbums.18.3.38]

افزایش می‌یابد. این سلولها نشانگرهای اختصاصی سلولهای عصبی مانند سیناپتوفیزین و بتا توبولین را بیان می‌کنند. سلول‌های P۱۹ در مطالعات گسترده‌ای به منظور تمایز به سلول عصبی مورد استفاده قرار گرفته‌اند. Chou و همکارانش نشان دادند این سلولها تحت تأثیر رتینوئیک اسید به سلولهای عصبی تمایز می یابند. این سلولهای تمایز یافته در روز هشتم بیان ژن نستین را که مشخصه سلول عصبی است نشان می دهند (۱۲). در پژوهشی که توسط Martin و همکارانش انجام گرفت، مشخص گردید سلولهای P۱۹ در معرض غلظتهای غیر سمی DMSO (دی متیل سولفوکسید) مورفولوژی سلولهای عصبی را نشان می دهند (۱۳).

در مطالعه دیگری تمایز عصبی سلولهای P۱۹ تحت تاثیر فاکتورهای رشد گزارش شده است (۱۴). مطالعه Bakhshalizadeh و همکاران، نشان داد دپرنیل می‌تواند تمایز عصبی وابسته به دوز را در سلولهای P۱۹ ترانسفکت شده با GFP القا کند. همچنین نشان داد نورون های GFP مثبت مشتق شده از سلول های P۱۹ می تواند در سیستم عصبی جنین جوجه مهاجرت کرده و با سلول های بافت میزبان تشکیل سیناپس دهد (۱۵). Abdanipour و همکاران از طریق استخراج سلولهای بنیادی بزرگسالان و تحت القاء قرار دادن آن با داروی دپرونیل در غلظت$^{-6}$ ۱۰، $^{-11}$۱۰، موفق به تمایز این رده سلولی به سلولهای شبه عصبی شدند (۱۶). نتایج مطالعه Karadeniz و همکاران نشان داد داروی شیمی درمانی cisplatin منجر به افزایش قابل توجه در مرگ سلولهای کبدی میشود ولی ژل رویال با افزایش تولید سوپراکسید دیسموتاز در سلول های کبدی اثر محافظتی ضد اپاپتوز بر هپاتوسیت دارد (۱۷). مصرف cisplatin منجر به ظهور فاکتورهای نارسایی و کاهش فعالیت آنتی اکسیدان‌های سوپراکسید دسموتاز و گلوتاتیون پراکسیداز در خون می‌گردد. اما استفاده ژل رویال همراه با cisplatin، منجر به کاهش فاکتورهای استرس اکسیداتیو و افزایش آنتی اکسیدانها شده است (۱۸). استرس اکسیدتتیو نه تنها از عوامل ایجاد کننده سرطان بلکه از عوامل بسیاری دیگر از بیماریها هستند (۲۵-۱۹). آنتی اکسیدان ها نیز قادر به مهار اکثر بیماری های ناشی از استرس اسیداتیو هستند (۳۰-۲۶). Hashimoto نشان داد مصرف خوراکی ژل رویال باعث افزایش بیان فاکتورهای نوروتروفیک، گیرنده این فاکتورها و نشانگرهای سلولهای عصبی در هیپوکامپ موشهای بالغ می شوند (۳۱). مطالعه Hattori و همکاران نشان داد که Amp N1 oxide موجود در ژل رویال منجر به تمایز سلول عصبی از رده سلولی PC12 می شودو میزان فسفوریلاسیون و نسخه برداری فاکتورهای لازم برای بیان ژنهای اختصاصی استروسیتها را افزایش می دهد (۳۲). نتایج پژوهش ما نشان می دهد که رده سلولی P۱۹ مدلی مناسب و ارزان قیمت برای بررسی اثر عوامل القاگر مختلف بر رشد و تمایز نورون‌ها به صورت آزمایشگاهی و نیز سیستم جذابی برای تولید انبوه سلول‌های عصبی است. همچنین بررسی نتایج این پژوهش نشان داد ژل رویال می‌تواند تمایز سلولهای بنیادی P۱۹ را به سمت سلولهای عصبی القا کند.

تقدیر و تشکر

بدینوسیله از تمامی کسانی که در انجام این تحقیق همکاری نمودند، بویژه آقای دکتر مرتضی هاشم زاده چالشتری و خانم دکتر فریبا اسماعیلی تقدیر و تشکر می گردد.

[DOR: 20.1001.1.15614107.1394.18.3.6.0]
[DOI: 10.22088/jbums.18.3.38]

An Evaluation of the Influence of Royal Jelly on Differentiation of Stem Cells into Neuronal Cells Invitro

M. Ebrahimie (MSc)[1], S. Asgharzadih (MSc)[1], H. Shirzad(Phd)[1], N. Ebrahimie(Bsc)[1], M. Hoseini (MSc)[1], M. Karimian kakolake (BSc)[1], M. Rafieian-kopaei (PhD)[1*]

1.Medical Plants Research Center, Shahrkord University of Medical Sciences, Shahrkord, I.R. Iran

J Babol Univ Med Sci; 18(3); Mar 2016; PP: 38-44

Received: Jun 22th 2015, Revised: Jul 29th 2015, Accepted: Sep 28th 2016.

ABSTRACT

BACKGROUND AND OBJECTIVE: P19 carcinoma stem cells are able to differentiate into embryonic cells with three germ layers. Given the fact that differentiated cells can reduce complications associated with degenerative diseases of the nervous system, in this study, we aimed to investigate the differentiation of P19 stem cells into neuronal cells under the influence of royal jelly.

METHODS: In this basic-applied research, embryoid bodies, prepared in P19 cell suspension culture, were transferred to gelatinized containers and classified in six groups, receiving 25, 50, 100, 150, 200, and 300 mg/ml of royal jelly, respectively; five wells were allocated to each group of cells. Morphological evaluation of cell differentiation was performed via cresyl violet staining. Also, immunofluorescence technique was used to track the expression of neuronal marker proteins such as synaptophysin and β-tubulin III. Finally, the findings were analyzed.

FINDINGS: The present findings showed that cells exposed to royal jelly responded positively to specific staining of nerve cells. In groups receiving different concentrations of royal jelly, the mean percentage of cell differentiation was significantly higher than the negative control group (9±2.3). The highest percentage of cell differentiation was observed in groups treated with 200 and 300 mg/ml of royal jelly, respectively (98±4.8 and 99.3±2.2, respectively) ($p<0.05$). Based on the findings, the mean percentage of cell differentiation in the group receiving 200 mg/ml of royal jelly was not significantly different from the group receiving a concentration of 300 mg/ml.

CONCLUSION: The results of the present study showed that P19 cells are able to differentiate into neuronal cells, and therefore, they could be used in cell-based therapy for neurological diseases.

KEY WORDS: *Carcinomatous stem cells, Differentiation of neural stem cells, Neural markers.*

Please cite this article as follows:

Ebrahimie M, Asgharzadih S, Shirzad H, Ebrahimie N, Hoseini M, Karimian kakolake M, Rafieian-kopaei M. An Evaluation of the Influence of Royal Jelly on Differentiation of Stem Cells into Neuronal Cells Invitro. J Babol Univ Med Sci. 2015;18(3):38-44.

***Corresponding author: M.Rafieian- kopaei (PhD)**
Address: Medical Plants Research Center, Shahrkord University of Medical Sciences, Shahrkord, I.R.Iran
Tel: +98 38 32572356
E-mail: rafieian@yahoo.com

[DOR: 20.1001.1.15614107.1394.18.3.6.0]
[DOI: 10.22088/jbums.18.3.38]

References

1.Bossy-Wetzel E, Schwarzenbacher R, Lipton SA. Molecular pathways to neurodegeneration. Nature Med. 2004; 10, S2–9.

2.Ahlskog JE. Slowing parkinsonâ€™s disease progression recent dopamine agonist trials. Neurology. 2003;60(3):381-9.

3.Martin GR, Wiley LM, Damjanov I. The development of cystic embryoid bodies in vitro from clonal teratocarcinoma stem cells. Dev Biol. 1977;61(2):230-44.

4.Mansergh FC, Wride MA, Rancourt DE. Neurons from stem cells: implications for understanding nervous system development and repair. Biochem Cell Biol. 2000;78(5):613-28.

5.Rudnicki MA, McBumev MW. Cell culture methods and induction of differentiation of embryonal carcinoma cell lines. In Teratocarcinoma and Embryonic Stem Cells. A Practical Approach. Robertson EJ, ed.1987.p:19-50.

6.Berg RW, McBurney MW. Cell density and cell cycle effects on retinoic acid-induced embryonal carcinoma cell differentiation. Dev Biol. 1990;138(1):123-35.

7.Morshead CM, Reynolds BA, Craig CG, McBurney MW, Staines WA, Morassutti D, et al. Neural stem cells in the adult mammalian forebrain: a relatively quiescent subpopulation of subependymal cells. Neuron. 1994;13(5):1071-82.

8.Bakhshalizadeh S, Esmaeili F, Shirzad H, Houshmand F, Ebrahimi-Hafshejani M, Ghasemi S. Neuronal differentiation of GFP expressing 19P embryonal carcinoma cells by deprenyl, an antiparkinson drug. J Shahrekord Univ Med Sci. 2014;16(5):32-43.[In Persian]

9.Nagai T, Sakai M, Inoue R, Inoue H, Suzuki N. Antioxidative activities of some commercially honeys, royal jelly, and propolis. Food Chem. 2001;75(2):237-40.

10. Blum MS, Novak AF, Taber S. 10-Hydroxy-delta 2-decenoic acid, an antibiotic found in royal jelly. Science. 1959;130(3373):452-3.

11.Hattori N, Nomoto H, Mishima S, Inagaki S, Goto M, Sako M, et al. Identification of AMP N1-oxide in royal jelly as a component neurotrophic toward cultured rat pheochromocytoma PC12 cells. Biosci Biotechnol Biochem. 2006;70(4):897-906.

12.Chou DKH, Henion TR, Jungalwala FB. Regulation of expression of sulfoglucuronyl carbohydrate (HNK-1), amphoterin and RAGE in retinoic acid-differentiated P19 embryonal carcinoma cells. J Neurochem. 2003;86(4):917-31.

13.Martin GR, Evans MJ. Multiple differentiation of clonal teratocarcinoma stem cells following embryoid body formation in vitro. Cell. 1975;6(4):467-74.

14.Wobus A, Grosse R, Schöneich J. Specific effects of nerve growth factor on the differentiation pattern of mouse embryonic stem cells in vitro. Biomed Biochim Acta. 1988;47(12):965-73.

15.Bakhshalizadeh S, Esmaeili F, Houshmand F, Shirzad H, Saedi M. Effects of selegiline, a monoamine oxidase B inhibitor, on differentiation of 19P embryonal carcinoma stem cells, into neuron-like cells. In Vitro Cell Dev Biol-Anim. 2011;47(8):550-7.

16.Abdanipour A, Tiraihi T, Delshad A. Trans-differentiation of the adipose tissue-derived stem cells into neuron-like cells expressing neurotrophins by selegiline. Iran Biomed J. 2011;15(4):113-21.

17.Karadeniz A, Simsek N, Karakus E, Yildirim S, Kara A, Can I, et al. Royal jelly modulates oxidative stress and apoptosis in liver and kidneys of rats treated with cisplatin. Oxid Med Cell Longev. 2011;2011:981793.

18.Silici S, Ekmekcioglu O, Kanbur M, Deniz K. The protective effect of royal jelly against cisplatin-induced renal oxidative stress in rats. World J Urol. 2011;29(1):127-32.

19. Bahmani M, Sarrafchi A, Shirzad H, Rafieian-Kopaei M. Autism: Pathophysiology and promising herbal remedies. Curr Pharm Des. 2016; 22(3):277–85.

[DOR: 20.1001.1.15614107.1394.18.3.6.0]
[DOI: 10.22088/jbums.18.3.38]

20. Shirzad H, Taji F, Pourgheysari B, Raisi S. Rafieian-Kopaei M. Comparison of antitumour activities of heated and raw garlic extracts on fibrosarcoma in mice. J Babol Univ Med Sci. 2012;14(6): 77-83.[In Persian]

21. Shirani M, Alibabaei Z, Kheiri S, Shirzad H, Taji F, Asgari A, Rafieian M. Effect of Euphorbia Helioscopia extract on acute and chronic pain. J Babol Univ Med Sci. 2011;13(4):14-8. [In Persian]

22.Nasri H, Shirzad H, Baradaran A. Rafieian-kopaei M. Antioxidant plants and diabetes mellitus. J Res Med Sci. 2015; 20(5):491-50.

23.Rafieian-Kopaei M, Asgary S, Adelnia A, Setorki M, Khazaei M, Kazemi S, et al. The effects of cornelian cherry on atherosclerosis and atherogenic factors in hypercholesterolemic rabbits. J Med Plants Res. 2011; 5(13): 2670-6.

24.Nasri H, Hajian Sh, Ahmadi A, Baradaran A, Kohi G, Nasri P, Rafieian-Kopaei M. Ameliorative effect of green tea against contrast-induced renal tubular cell injury. Iran J Kid Dis. 2015;9(6):421-6.

25.Rafieian-Kopaei M, Setorki M, Doudi M, Baradaran A, Nasri H. Atherosclerosis: process, indicators, risk factors and new hopes. Int J Prev Med. 2014;5:927-46.

26.Mirhosseini M, Baradaran A, Rafieian-Kopaei M. Anethum graveolens and hyperlipidemia: a randomized clinical trial. J Res Med Sci.2014;19(8):758-61.

27.Rafieian-Kopaei M, Shahinfard N, Rouhi-Boroujeni H, Gharipour M, Darvishzadeh-Boroujeni P. Effects of Ferulago angulata extract on serum lipids and lipid peroxidation. Evid Based Complement Alternat Med. 2014;2014: Article ID 680856.

28. Baradaran A, Nasri H, Rafieian-Kopaei M. Oxidative stress and hypertension: Possibility of hypertension therapy with antioxidants. J Res Med Sci. 2014;19(4):358-67.

29. Sarrafchi A, Bahmani M, Shirzad H, Rafieian-Kopaei M. Oxidative stress and Parkinson's disease: New hopes in treatment with herbal antioxidants. Curr Pharm Des. 2016; 22(2): 238 -46.

30. Shayganni E, Bahmani M,, Asgary S, Rafieian-Kopaei M. Inflammaging and cardiovascular disease: Management by medicinal plants, Phytomedicine. Phytomedicine. 2015. pii: S0944-7113(15)00356-6.

31. Hashimoto M, Kanda M, Ikeno K, Hayashi Y, Nakamura T, Ogawa Y, et al. Oral administration of royal jelly facilitates mRNA expression of glial cell line-derived neurotrophic factor and neurofilament H in the hippocampus of the adult mouse brain. Biosci Biotechnol Biochem. 2005;69(4):800-5.

32. Hattori N, Nomoto H, Fukumitsu H, Mishima S, Furukawa S. AMP N 1-oxide potentiates astrogenesis by cultured neural stem/progenitor cells through STAT3 activation. Biomed Res. 2007;28(6):295-9.

[DOR: 20.1001.1.15614107.1394.18.3.6.0]
[DOI: 10.22088/jbums.18.3.38]