DOI: 10.22100/jkh.v11i2.1367

مجله دانش و تندرستی، دوره ۱۱، شماره ۲، تابستان ۱۳۹۵

دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی شاهرود

مقاله پژوهشی

تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی حاصل از بند ناف به سمت سلول‌های شبه عصبی با استفاده Activin A و Nicotinamide

داریوش بیژن‌نژاد[۱]، سعید آزنده[۱]، صادق صارمی[۱]، آنه محمدغراوی[۲*]

۱- دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور- دانشکده پزشکی- گروه علوم تشریحی- مرکز تحقیقات سلولی مولکولی.

۲- دانشگاه علوم پزشکی شاهرود- دانشکده پزشکی- مرکز تحقیقات سلول‌های بنیادی و مهندسی بافت.

تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۱۰/۳۰، **تاریخ پذیرش:** ۱۳۹۴/۱۲/۲۵

چکیده

مقدمه: *سلول‌های بنیادی مزانشیمی حاصل از بند ناف یکی از بهترین منابع برای درمان‌های مبتنی بر سلول هستند. این سلول‌ها در شرایط کشت تمایزی، مورفولوژی سلول عصبی را نشان می‌دهند و مارکرهای عصبی را بیان می‌کنند. هدف از مطالعه حاضر تمایز سلول‌های بنیادی با استفاده از Activin A و Nicotinamide به سمت سلول‌های شبه عصبی می‌باشد.*

مواد و روش‌ها: *بند ناف نزدیک به جفت بریده، نمونه‌های کوچک‌تر (۲-۴ سانتی‌متری) تهیه شد و ژله وارتون جدا گردید. سلول‌های بنیادی از طریق روش اکسپلنت استحصال گردید و فنوتیپ سطح سلول توسط دستگاه فلوسیتومتری Dako و با نرم‌افزار FlowJo مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. سپس تمایز ادیپوژنیک و استئوژنیک سلول‌ها صورت گرفت. سلول‌ها در شرایط کشت تمایز عصبی قرار داده شد و به مدت ۳ روز در محیط کشت RPMI تحت تیمار با Activin ۲۰ µg/ml و ۰/۱٪FBS قرار گرفته و سپس به مدت ۷ روز تحت القای ۱۰ میلی‌مولار nicotinamide، ۲٪B27 و ۰/۱٪FBS قرار گرفتند.*

نتایج: *۱۰-۷ روز پس از کشت اکسپلنت، سلول‌های بنیادی مزانشیمی دوکی شکل مشاهده شد. ایمونوفنوتیپ سلول‌های بنیادی کشت شده برای مارکرهای مزانشیمی مانند CD 105 و CD 90 مثبت بود اما برای مارکرهای خون‌ساز CD34 و CD45 منفی بود.پس از القا در محیط کشت تمایزی ادیپوژنیک و استئوژنیک، قطرات چربی و رسوبات کلسیم در سلول‌ها مشاهده شد. سلول‌های شبه عصبی تمایزیافته به شکل سلول‌های هرمی شکل با زوائد نورونی ظاهر گردید. در طی القای عصبی، زوائد شبه اکسونی و دندریتی در برخی از سلول‌های دو قطبی و چند قطبی مشاهده گردید. همچنین در بین سلول‌ها تماس سلولی مستقیم شبه سیناپسی مشاهده گردید.*

نتیجه‌گیری: *نتایج مطالعه حاضر نشان داد که Activin A و nicotinamide باعث القای تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی به سمت دودمان عصبی گردید.*

واژه‌های کلیدی: بند ناف، سلول‌های بنیادی مزانشیمی، Activin A، nicotinamide.

***نویسنده مسئول:** دانشگاه علوم پزشکی شاهرود- دانشکده پزشکی، گروه علوم پایه، استادیار، **تلفن:** ۳۲۳۹۵۰۵۴-۰۲۳، **نمابر:** ۳۲۳۹۴۸۵۲ -۰۲۳،

Email: Gharravi@shmu.ac.ir

ارجاع: بیژن‌نژاد داریوش، آزنده سعید صارمی صادق، محمدغراوی آنه. تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی حاصل از بند ناف به سمت سلول‌های شبه عصبی با استفاده Activin A و Nicotinamide. مجله دانش و تندرستی ۱۳۹۵؛۱۱(۲):۳۲-۳۸.

مقدمه

سلول‌های بنیادی مزانشیمی از منابع مختلفی مانند مغز استخوان و بافت چربی استحصال می‌گردد. این روش‌های استخراج بالقوه تهاجمی هستند و با افزایش سن استحصال، تکثیر و تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی حاصل از آنها کاهش می‌یابد. مطالعات متعددی نشان داده است که تکثیر و پتانسیل تمایزی سلول‌های بنیادی مزانشیمی حاصل از بند ناف نتایج بهتری نسبت‌به دیگر منابع دارند (۱ و ۲). در بسیاری از مطالعات جهت بررسی منشأ مزانشیمی و توانایی تمایز، این سلول‌ها در محیط‌های القایی ادیپوژنیک و استئوژنیک قرار می‌گیرند و تمایز به دودمان چربی و استخوان بررسی می‌گردد. قدرت تمایزی آنها از آنجایی‌که این سلول‌های مزانشیمی در محیط‌های کشت تمایز عصبی، مورفولوژی ومارکرهای عصبی مانند Nestin گلیال فیبریلاراسیدیک پروتئین (GFAP) و NeuN و... را نشان دادند، به‌عنوان یکی از بهترین منابع برای تکثیر و تمایز عصبی و درمان مبتنی بر سلول معرفی شده است(۳).

Activin A عضوی از خانواده عامل رشد TGF بتا است که در القاء و نگهداری تمایز بسیاری از سلول‌ها در مراحل مختلف جنینی و بلوغ شرکت می‌کند. اما نقش Activin A به‌دلیل الگوی مختلف بیان ژن، در طی تکامل و مورفوژنز مغز، هنوز چالش برانگیز است (۴).

Nicotinamide یک جزء محلول در آب از گروه ویتامین‌های کمپلکس B است و به‌عنوان متابولیت فیزیولوژیکی توسط سلول‌ها برای سنتز کوآنزیم-B نیکوتین آمید آدنین دی نوکلئوتید (NAD) و نیکوتین آمید آدنین دی نوکلئوتید فسفات (NADPH) استفاده می‌شود. مطالعات متعددی نشان داده است که نیکوتین امید در تعیین سرنوشت سلول‌های عصبی نقش داشته و باعث تمایز سلول‌های بنیادی به سمت سلول‌های عصبی می‌گردد (۵ و۶).

اگرچه عامل رشد و سیتوکین‌های متنوعی برای القای عصبی سلول‌های بنیادی پیشنهاد و استفاده شده است، اما در متون علمی القای عصبی سلول‌های بنیادی مشتق از بند ناف انسان از طریق Activin A و nicotinamide گزارش نشده است. بنابراین هدف از مطالعه حاضر تمایز سلول‌های بنیادی با استفاده از Activin A و nicotinamide به سمت سلول‌های شبه عصبی در محیط کشت دو بعدی می‌باشد.

مواد و روش‌ها

پس از کسب رضایت آگاهانه از مادران واجد شرایط و گرفتن موافقت از کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز طی عمل سزارین بند ناف از نوزادان سالم ترم متولد شده برداشته شد. تمامی آزمایشات حداقل ۵ بار تکرار گردید.

پس از سزارین، حدود ۱۵ تا ۲۰ سانتی‌متر از بند ناف نزدیک به جفت، بریده شد. جهت تخلیه خون اضافی در داخل عروق، بند ناف توسط قیچی فشرده شد. سپس قطعات بند ناف در یک ظرف استریل سرد حاوی محیط کشت باگلوکز بالا به آزمایشگاه منتقل شد. تمام روش‌های جمع‌آوری و حمل و نقل بند ناف تحت شرایط استریل صورت گرفت.

به‌طور خلاصه، بند ناف به نمونه‌های کوچکتر با طول ۲-۴ سانتی‌متر طول بریده شد و به آرامی سه بار با PBS شستشو گردید. به‌منظور حذف خون داخل رگ‌های خونی، بند ناف با فورسپس فشرده شد. با یک چاقوی کوچک جراحی، برشی در طول سطح خارجی هر قطعه صورت گرفته و با یک قیچی استریل از طول باز شد. پرده آمنیوتیک از بندناف به‌دقت جدا گردید و ژله وارتون جمع‌آوری شد. ژله وارتون به قطعات ۳-۵ میلی‌متری با وزن ۱۰-۲۰ میلی‌گرم تقسیم گردید و دو بار با PBS شستشو گردید (۷).

۶ الی ۹ قطعه از ژله وارتون جدا شده، در داخل فلاسک‌های کشت سلولی گذاشته شده و به انکوباتور انتقال داده شد و به مدت ۳ الی ۵ دقیقه جهت چسبیدن ژله وارتون به کف فلاسک دست نخورده باقی‌ماند. سپس محیط کشت DMEM حاوی ال گلوتامین، همراه با ۲۰ درصد FBS و ۱۰۰ واحد پنی سیلین-استرپتومایسین اضافه شد. فلاسک‌های کشت سلولی به مدت ۳-۴ روز در داخل انکوباتور با دمای ۳۷°C و ۵٪ CO 2 بدون هیچ‌گونه دستکاری نگهداری گردید (۸).

سلول‌های بنیادی مزانشیمی طی ۷ الی۱۰ روز کم کم از ژله خارج شدند و پس از آنکه ۷۰٪- ۸۰٪ از فلاسک کشت سلولی را پر کردند، با PBS شستشو شده در ۰/۲۵٪ تریپسین –EDTA در دمای ۳۷°C انکوبه گردید. پس از کنده شدن سلول‌ها، محیط کشت به لوله فالکون انتقال داده شده و در دور۲۰۰-۳۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ شد. مایع رویی دور ریخته شده و پلت (Cell pellets) سلولی در محیط کشت DMEM حاوی ال گلوتامین، همراه با ۲۰ درصد FBS و ۱۰۰ واحد پنی‌سیلین-استرپتومایسین قرار داده شد و به فلاسک جدید با تراکم سلولی 2 103 × 250 cm انتقال داده شد (۹).

جهت ارزیابی توانایی تمایز ادیپوژنیک، سلول‌ها در پاساژ دوم تا چهارم استفاده شدند. بدین منظور، سلول‌ها در محیط کشت DMEM حاوی ۱۵۰ µg/m اسید ال اسکوربیک ۲ فسفات، ۱۰۰ نانومولاردگزامتازون و ۱۵۰ µg/m ایندومتاسین قرار گرفتند. محیط کشت هر ۳ روز تا تشکیل واکوئل لیپید تعویض شد. رنگ‌آمیزی اویل رد جهت شناسایی و اکوئل‌های چربی در سلول استفاده شد. برای رنگ‌آمیزی نیز پس از تثبیت کردن سلول‌ها به‌مدت ۵۰ دقیقه در مجاورت رنگ (۰/۳۶ گرم پودر رنگ اویل رد در ۱۰۰ میلی‌لیتر

ایزوپروپانول ۶۰ درصد حل و فیلتر شد) قرار گرفته و پس از شستشو با PBS در زیر میکروسکوپ مشاهده شدند (۹).

به‌منظور ارزیابی توانایی تمایز استئوژنیک، سلول‌ها در پاساژ دوم تا چهارم استفاده شدند. بدین منظور سلول‌ها در محیط کشت DMEM-HG حاوی ۱۰ نانومولار دگزامتازون، ۱۰ نانومولار بتا گلیسروفسفات، ۰/۰۵ نانومولار اسید ال اسکوربیک ۲ فسفات و ۱۰٪ FBS قرار گرفتند. محیط کشت هر ۳ روز تعویض شد و پس از بیست و یک روز با روش آلیزارین رد اس جهت مشاهده رسوبات کلسیم رنگ‌آمیزی شد. بدین منظور پس از تخلیه محیط رویی، سلول‌ها توسط PBS شستشو شد و به‌مدت یک ساعت با پارافرمالدئید تثبیت گردید. رنگ الیزارین رد ۲ گرم در ۱۰۰ میلی‌لیتر با Ph حدود ۴ الی۴/۳ بر روی سلول‌ها به‌مدت ۳۰ دقیقه نگه داشته شد. سپس با PBS در زیر میکروسکوپ مشاهده شدند (۹).

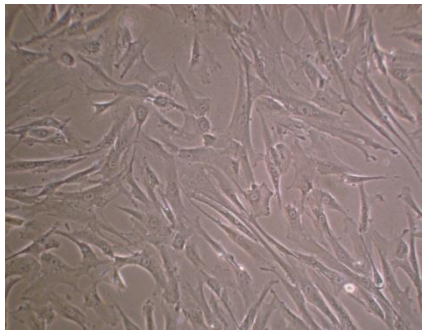
سلول‌های بنیادی مزانشیمی در فلاسک‌های کشت سلولی ۲۵ سانتی‌متری و در محیط کشت DMEM-HG حاوی ۱۰٪ FBS کشت داده شدند تا زمانیکه ۸۰٪ – ۹۰٪ سطح فلاسک کشت را پر کنند. در مرحله اول، سلول‌ها به مدت ۳ روز در محیط کشت RPMI حاوی ۲۰ Activin Aμg/ml و ۰/۱٪ FBS قرار گرفتند. سپس به‌مدت ۷ روز تحت القای ۱۰ میلی‌مولار nicotinamide، B27 ۲٪ و ۰/۱٪ FBS قرار گرفتند.

نتایج

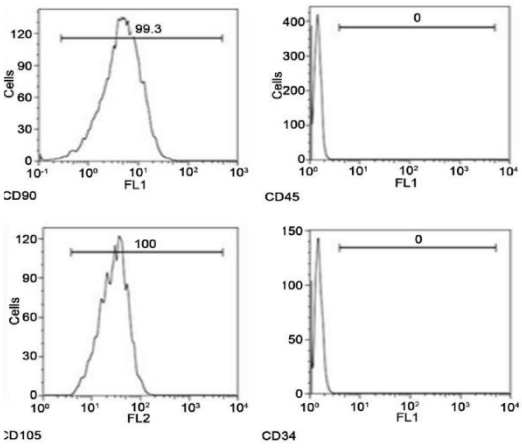
۷ الی۱۰ روز پس از کشت اکسپلنت، سلول‌های دوکی شکل در اطراف ژله وارتون قابل مشاهده بود. این سلول‌های بنیادی مزانشیمی پس از دو هفته ۸۰٪ سطح فلاسک کشت سلولی را پوشانده بودند. طی دو هفته، تغییر مورفولوژیکی سلول از شکل گرد و چند وجهی به سمت مورفولوژی فیبروبلاست ستاره‌ای شکل مشاهده شد. یافته‌های کشت سلولی نشان داد که اتصال سلول به سلول برای حفظ و تقسیم زنده ماندن سلول‌ها لازم است، به‌طوری‌که در تراکم سلول کم، کاهش تکثیر سلولی مشاهده شد. علاوه‌بر این، سلول‌های بنیادی مزانشیمی طی پاساژ اول، به سرعت هر ۳ تا ۵ روز به تراکم سلولی رسید (شکل ۱).

ایمونوفنوتیپ ۹۰ درصد سلول‌های بنیادی کشت شده برای مارکر مزانشیمی مانند CD 105 و CD 90 مثبت بود اما برای مارکرخون‌ساز CD34 و CD45 منفی بود. بنابراین، یافته‌های فلوسیتومتری نشان داد که سلول‌های بنیادی حاصل از بند ناف، مشابه سلول‌های بنیادی مزانشیمی حاصل از مغز استخوان و بافت چربی است (شکل ۲).

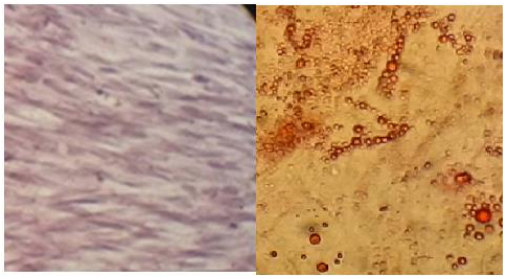
پس از ۲۱ روز القا در محیط کشت تمایزی ادیپوژنیک، قطرات چربی در سلول‌ها مشاهده شد که به‌وسیله رنگ‌آمیزی اویل رد به رنگ قرمز مشخص شدند (شکل ۳).



شکل ۱- مورفولوژی سلول‌های بنیادی حاصل از بند ناف پس از ۷ تا ۱۰ روز کشت. سلول‌های شبه فیبروبلاستی و چند وجهی با اتصالات سلولی و هسته‌های درشت و یوکروماتین مشهود است. بزرگنمایی ۲۰۰×



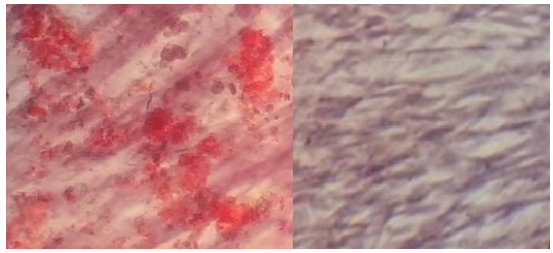
شکل ۲- نتایج فلوسیتومتری سلول‌های بنیادی حاصل از بند ناف که دارای مارکرهای مزانشیمی مانند CD 105 و CD 90 بودند بود اما فاقد مارکرهای خون‌ساز CD34 و CD45 هستند.



شکل ۳- تمایز سلول‌های بنیادی حاصل از بند ناف به سمت سلول‌های چربی. قطرات چربی در داخل سلول‌ها مشخص است (راست)

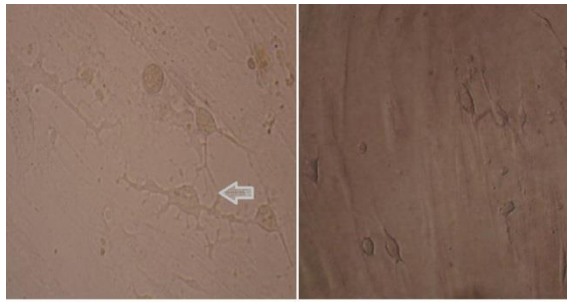
سلول‌های گروه کنترل که تحت تمایز ادیپوژنیک قرار نگرفته بودند بدون واکوئل چربی مشهود است (چپ). بزرگنمایی ۲۰۰×

پس از ۲۱ روز القا در محیط کشت تمایزی استئوژنیک، در طی رنگ‌آمیزی آلیزارین رد اس، رسوبات کلسیم با رنگ قرمز در داخل سلول‌ها مشاهده شد (شکل ۴). نتایج تمایز ادیپوژنیک و استئوژنیک نشان داد که سلول‌های استخراج شده از بند ناف ویژگی سلول‌های بنیادی مزانشیمی را دارا هستند.



شکل ٤- تمایز سلول‌های بنیادی حاصل از بند ناف به سمت سلول‌های استخوانی. رسوبات کلسیم در داخل سلول‌ها مشخص است (چپ). سلول‌های گروه کنترل که تحت تمایز استئوژنیک قرار نگرفته بودند بدون رسوبات کلسیم مشهود است (راست). بزرگنمایی ۲۰۰×

پس از ۳ روز کشت در محیط القا عصبی، سلول‌های شبه عصبی دارای یک جسم سلولی هرمی شکل با زوائد نورونی مشاهده شد. در طی تمایز، مراحلی از تغییرات مورفولوژی سلول‌های دو قطبی و چند قطبی ظاهر گردید. در برخی از سلول‌ها ظاهر دو قطبی با نشانه‌هایی از اکسون و دندریت سلولی مشاهده شد و برخی از سلول‌ها مورفولوژی چندقطبی با تعداد زیادی دندریت را نشان دادند. همچنین در بین سلول‌ها نشانه‌هایی از تماس سلولی شبه سیناپسی مشاهده شد (شکل ۵).



شکل ٥- اتصالات سلولی (فلش) و مورفولوژی شبه عصبی سلول‌های بنیادی حاصل از بند ناف پس از القا توسط activin A و nicotinamide. بزرگنمایی ٤٠٠×

بحث

نتایج مطالعه حاضر نشان داد که Activin A و nicotinamide امید باعث القای تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی به سمت دودمان عصبی می‌گردد.

تمایز عصبی یک هدف مهم سلول‌های بنیادی مزانشیمی است. سلول‌ها مزانشیمی بند ناف منبعی بسیار مناسبی برای سلول درمانی، بیولوژی تکوینی و مطالعات دارویی ارایه می‌دهد. شاخص‌های متعددی برای تمایز این سلول‌ها به سمت دودمان عصبی پیشنهاد شده است. مطالعات پیشین نشان داد که مهار پروتئین ریخت زای استخوان برای القای عصبی سلول‌های مزانشیمی لازم است. در مقابل، عملکرد شاخص‌های رشد فیبروبلاستی و سیگنالینگ اکتیوین/نودال متضاد است (۳).

مطالعه میمورا و همکاران نشان داد که ترکیبی از FGF-2 و Activin A با اثر سینرژیکی در غلظت‌های مختلف باعث تمایز عصبی سلول‌های بنیادی جنینی انسان می‌گردد (۱۱).Activin A باعث نوروژنز مغز قدامی در زمان جنینی می‌شود. در تکامل سیستم عصبی پس از تولد، سیگنالینگ Activin باعث تغییر در ترکیب مدارهای عصبی می‌گردد.

خانواده TGFB متشکل از دو گروه اصلی است، یکی پروتئین مورفوژنتیک استخوان/ (BMP) عامل رشد تمایز (GDF) و دوم TGF بتا Activin گروه اول باعث مهار نوروژنز و گروه دوم باعث القای نوروژنز می‌گردد (۱۲ و ۱۳). رودریگز مارتینز و همکاران (۲۰۱۲) که به مطالعه اثر Activin A بر تکثیر، تمایز و بقا سلول‌های پیش‌ساز سربروکورتیکال رت پرداخته بودند مشاهده کردند Activin A اثر تحریکی بر این سلول‌ها دارد (۱۴).

مطالعات مختلفی نشان دادند که nicotinamide بر تمایز عصبی سلول‌های بنیادی جنینی موش در شرایط in vitro اثر دارد و باعث افزایش جمعیت نورونیمی گردد (۵ و ۶). ژانگ و همکاران (۲۰۱۱) روشی برای تمایز عصبی پیشنهاد کردند که در طی آن تشکیل نورون‌های حرکتی از سلول‌های بنیادی جنینی به‌دنبال القای nicotinamide افزایش یافت (۱۵).

Nicotinamide یک متابولیت فیزیولوژیکی و مهارکننده طبیعی PARP1 است PARP1 در طی مراحل اولیه نورالیزاسیون سلول‌های بنیادی جنینی، نقش مهمی در مکانیسم مولکولی مرگ سلولی در سلول‌های نوروایپتلیال ایفا می‌کند. از آنجایی‌که nicotinamide ویتامین است و به‌عنوان یک مهارکننده PARP1 عمل می‌کند، بنابراین ویتامین‌ها و متابولیت‌های آنها باعث القای مستقیم سلول‌های بنیادی به سمت سلول‌های عصبی می‌گردد (۱۵). مطالعات مشابه دیگر نشان داد که که نیکوتین در تمایز عصبی در مراحل اولیه تکوین مؤثر است و سلول‌های پیش‌ساز را به سمت سلول‌های عصبی القا می‌کند (۵ و ۶).

در متون علمی اطلاعات بسیار کمی در مورد مکانیسمی اثر Activin A و نیکوتین امید بر تمایز سلول‌های بنیادی به سمت سلول‌های شبه عصبی وجود دارد. یک مکانیسم احتمالی شاید این باشد که Activin A و nicotinamide به شکل سینرژیکی اثرات خود را نشان می‌دهند.

References

1. Kern S, Eichler H, Stoeve J, Klüter H, Bieback K. Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, or adipose tissue. Stem Cells 2006;24:1294-301.
2. Ding D-C, Chang Y-H, Shyu W-C, Lin S-Z. Human umbilical cordmesenchymal stem cells: a new era for stem cell therapy. Cell Transplantation 2015;24:339-47. doi: 10.3727/096368915X686841.
3. Ko T-L, Fu Y-Y, Shih Y-H, Lin Y-H, Ko M-H, Fu T-W, et al. A High efficiency induction of dopaminergic cells from human umbilical mesenchymal stem cells for the treatment of hemiparkinsonian rats. Cell Transplantation 2015;24:2251-62. doi: 10.3727/096368914X685078.
4. Arber C, Precious SV, Cambray S, Risner-Janiczek JR, Kelly C, Noakes Z, et al. Activin A directs striatal projection neuron differentiation of human pluripotent stem cells. Development 2015;142:1375-86. doi: 10.1242/dev.117093.
5. Griffin SM, Pickard MR, Orme RP, Hawkins CP, Fricker RA. Nicotinamide promotes neuronal differentiation of mouse embryonic stem cells in vitro. Neuroreport 2013;24:1041-6. doi: 10.1097/WNR.0000000000000071.
6. Cimadamore F, Curchoe CL, Alderson N, Scott F, Salvesen G, Terskikh AV. Nicotinamide rescues human embryonic stem cell-derived neuroectoderm from parthanatic cell death. Stem Cells 2009;27:1772-81. doi: 10.1002/stem.107.
7. Nazari-Shafti TZ, Bruno IG, Martinez RF, Coleman ME, Alt EU, McClure SR. High yield recovery of equine mesenchymal stem cells from umbilical cord matrix/wharton's jelly using a semi-automated process. Methods Mol Biol 2015;1235:131-46. doi: 10.1007/978-1-4939-1785-3_12.
8. Azandeh S, Orazizadeh M, Hashemitabar M, Khodadadi A, Shayesteh AA, Nejad DB, et al. Mixed enzymatic-explant protocol for isolation of mesenchymal stem cells from Wharton's jelly and encapsulation in 3D culture system. J. Biomedical Science and Engineering 2012;5:580-6. doi: 10.4236/jbise.2012.510071.
9. Hashemitabar M, Allahbakhshi E, Bijan-Nejad D, Nezhad Dehbashi F, Azandeh S. Isolation and characterization of mesenchymal stem cells from human umbilical cord wharton's jelly. Jundishapur Sci Med J 2014;13:135-45.[Persian].
10. Zhang L, Coulson-Thomas VJ, Dong F, Chang S-H, Call MK, Kao WW. Biological function evaluation of cultured mesenchymal stem cells derived from human umbilical cord. Investigative Ophthalmology & Visual Science 2014;55:519.
11. Mimura S, Suga M, Liu Y, Kinehara M, Yanagihara K, Ohnuma K, et al. Synergistic effects of FGF-2 and Activin A on early neural differentiation of human pluripotent stem cells. In Vitro Cell Dev Biol Anim 2015;51:769-75. doi: 10.1007/s11626-015-9909-8.
12. Sekiguchi M, Hayashi F, Tsuchida K, Inokuchi K. Neuron type-selective effects of activin on development of the hippocampus. Neurosci lett 2009;452:232-7. doi: 10.1016/j.neulet.2009.01.074.
13. Abdipranoto-Cowley A, Park JS, Croucher D, Daniel J, Henshall S, Galbraith S, et al. Activin A is essential for neurogenesis following neurodegeneration. Stem Cells 2009;27:1330-46. doi: 10.1002/stem.80.
14. Rodriguez-Martinez G, Velasco I. Activin and TGF-β effects on brain development and neural stem cells. CNS Neurol Disord Drug 2012;11:844-55.
15. Zhang Y, Wang J, Chen G, Fan D, Deng M. Inhibition of Sirt1 promotes neural progenitors toward motoneuron differentiation from human embryonic stem cells. Biochem Biophys Res Commun 2011;404:610-4. doi: 10.1016/j.bbrc.2010.12.014.

Journal of Knowledge & Health 2016; Vol 11, No 2
Shahroud University of Medical Sciences

DOI: 10.22100/jkh.v11i2.1367

Original Article

Differentiation of Umbilical Cord Derived Mesenchymal Stem Cells into Neuron-Like Cells Using Activin a and Nicotinamide

Darioush Bijan Nejad (Ph.D.)[1], Saeed Azandeh (Ph.D.)[1], Sadegh Saremi (M.Sc.) [1], Anneh Mohammad Gharravi (Ph.D.)[2*]

1- Dept. of Anatomical Sciences, Cellular and Molecular Research Center (CMRC), School of Medicine, Ahvaz Jundishapur University of Medical Sciences (AJUMS), Ahvaz, Iran.
2- Stem Cells and Tissue Engineering Research Center, Shahroud University of Medical Sciences, Shahroud, Iran.

Received: 20 January 2016**, Accepted:** 15 March 2016

Abstract:

Introduction: *Umbilical cord derived mesenchymal stem cells (MSCs) are one of the best sources for cell-based therapies. MSCs reveal the neuronal morphology and expression of neuronal marker in differentiation conditions. The aim of the present study was to differentiate of MSCs into neuron-like cells using Activin A and nicotinamide.*

Methods: *Umbilical cords were cut close to the placenta and smaller pieces (2-4 cm) of umbilical cords prepared and Wharton's jelly extracted. MSCs were isolated by an explant culture method and surface phenotype of cells analyzed by Dako flow cytometry and the FlowJo software. MSCs were then induced for osteogenic and adipogenic differentiation. Cells were exposed to neuronal differentiation condition and treated with 20 µg / ml Activin A and 0.1% FBS for 3 days in RPMI,then with 10 mMnicotinamide, 2% B27 and 0.1% FBS for 7 days.*

Results: *spindle-shaped MSCs were observed after 7-10 days of explants culture. Immunophenotype of cultured MSCs were positive for mesenchymal markers such as CD105 and CD90 but negative for hematopoietic markers such as CD34 and CD45. After MSCs differentiation to the osteogenic or adipogenic lineage, lipid droplets and calcium deposition were observed. The differentiated neural-like MSCs were appeared as pyramidal nerve-like cells with neuritis.*
Some of th cells. During neuronal differentiation, axon and dendritic like process wereosbserved in some of Bipolar and mulipolarmulipolar cells. Furthermore direct synaptic like contacts were observed between cells.

Conclusion: *The present study showed that Activin A and nicotinamide could induce differentiation of MSCs into neural lineage.*

Keywords: Umbilical cord, Mesenchymal stem cells, Neuron-like cells, Activin A, Nicotinamide.

Conflict of Interest: No

***Corresponding author:** A.M. Gharravi**, Email:** Gharravi@shmu.ac.ir*

Citation: Bijan Nejad D, Azandeh S, Saremi S, Gharravi AM. Differentiation of umbilical cord derived mesenchymal stem cells into neuron-like cells using Activin A and nicotinamide. Journal of Knowledge & Health 2016;11(2):32-37.