Research on Medicine Original Article

The Quarterly journal of School of Medicine, Shahid Beheshti University of Medical Sciences Vol.42; No.1; 2018

Improved cardiac differentiation of human adipose tissue-derived stem cells using a combination of bFGF and BMP4

Sanaz Hasani Lialestani[1,2], Arash Javeri[1], Asadollah Asadi[2], Masoumeh Fakhr Taha[1*]

1. *Department of Stem Cells and Regenerative Medicine, Institute for Medical Biotechnology, National Institute of Genetic Engineering and Biotechnology (NIGEB), Tehran, Iran*
2. *Department of Biology, Faculty of Science, University of Mohaghegh Ardabili, Ardabil, Iran*

(Received: 2017/07/24 Accept: 2017/12/13)

Abstract

Backgroundm: *Adipose-Derived Stem Cells (ADSCs) represent a promising source of cells for cardiac tissue engineering and repair of the injured heart. However, better understanding of the factors affecting the cardiac differentiation of ADSCs is required before clinical application of these cells. The current study was designed to investigate the role of bFGF and BMP4 in cardiac differentiation of human ADSCs.*

Materials and Methods: *ADSCs were isolated from human abdominal subcutaneous adipose tissue and were cultured. For cardiac differentiation, ADSCs were treated with 10 ng/ml bFGF and 20, 50 or 100 ng/ml BMP4 in a medium containing 10% FBS or 0.5% B27 for four days. Then, the induction factors were completely omitted, and the cells were maintained in 10% FBS-containing medium for up to three weeks. At the end of differentiation period, the expressions of some cardiac markers were assessed using RT-PCR, qPCR, and immunocytochemistry.*

Results: *The differentiated ADSCs expressed cardiac-specific genes. Based on qPCR analysis, the maximum expression level of ANF and MLC2A mRNAs was detected in the cells treated with 10 ng/ml bFGF and 20 ng/ml BMP4 in the FBS-containing medium. Moreover, FBS supplementation of induction medium was more effective than the B27-containing medium for cardiac differentiation of ADSCs by bFGF and BMP4. The cells treated with 10 ng/ml bFGF and 20 ng/ml BMP4 in FBS-containing medium expressed cardiac troponin I and α-actinin proteins.*

Conclusion: *It seems that a combination of bFGF and BMP4 improves cardiac differentiation of ADSCs. Moreover, bFGF and BMP4 are more effective for cardiac differentiation when the induction medium is supplemented with FBS compared with B27. This may be due to the presence of insulin in B27 supplement.*

Keywords: *ADSCs; Differentiation; Cardiomyocyte, bFGF; BMP4*

** Corresponding author: Masoumeh Fakhr Taha*
E-mail: mftaha@nigeb.ac.ir

[Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir on 2026-11-17]

پژوهش در پزشکی
فصلنامه علمی پژوهشی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی شهید بهشتی
مقاله پژوهشی
دور ۴۲، شماره ٤، ۱۳۹۷، صفحات ۲۱ تا ۲۷

بهبود تمایز قلبی سلول‌های بنیادی بافت چربی انسانی با استفاده از ترکیب bFGF و BMP4

ساناز حسنی لیالستانی[۱و۲]، آرش جاوری[۱]، اسداله اسدی[۲]، معصومه فخرطه[۱*]

۱- تهران، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست‌فناوری، پژوهشکده بیوتکنولوژی پزشکی، گروه سلول‌های بنیادی و پزشکی بازساختی
۲- اردبیل، دانشگاه محقق اردبیلی، دانشکده علوم پایه، گروه زیست‌شناسی

تاریخ دریافت مقاله: ۹۶/۵/۲ تاریخ پذیرش مقاله:۱۳۹۶/۹/۲۲

چکیده:

سابقه و هدف: سلول‌های بنیادی بافت چربی منبع سلولی امیدبخشی برای کاربرد در مهندسی بافت قلب و ترمیم قلب آسیب دیده هستند. با این حال، پیش از استفاده درمانی از این سلول‌ها، شناخت بهتر فاکتورهای موثر بر تمایز آن‌ها به کاردیومیوسیت لازم است. تحقیق حاضر برای مطالعه تاثیر *bFGF* و *BMP4* بر تمایز قلبی سلول‌های بنیادی بافت چربی انسانی طراحی شد.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه تجربی، سلول‌های بنیادی از بافت چربی زیر جلدی ناحیه شکمی انسان جداسازی و کشت داده شد. برای تمایز کاردیومیوسیتی، سلول‌ها به مدت چهار روز در محیط دارای ۱۰درصد *FBS* یا ۰/۵ درصد *B27* قرار گرفتند و با غلظت ۱۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر *bFGF* و یکی از غلظت‌های ۲۰، ۵۰ یا ۱۰۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر *BMP4* تیمار شدند. سپس تمایز سلول‌ها تا انتهای هفته سوم در محیط دارای ۱۰درصد *FBS* ادامه یافت. در انتهای تمایز، بیان ژن‌ها و پروتئین‌های قلبی با روش‌های *qPCR ,RT-PCR* و ایمونوسیتوشیمی بررسی شد.

یافته‌ها: سلول‌های بنیادی تمایز یافته ژن‌های اختصاصی قلب را بیان کردند. طبق نتایج *qPCR*، سلول هایی که در محیط دارای *FBS* با *bFGF* و ۲۰نانوگرم بر میلی‌لیتر *BMP4* القا شدند، بیشترین بیان ژن‌های *ANF* و *MLC2A* را نشان دادند. از طرفی، تیمار سلول‌ها با فاکتورهای تمایزی *BMP4* و *bFGF* در محیط دارای *FBS* نسبت به محیط دارای *B27* تمایز کاردیومیوسیت‌ها را بهتر القا کرد. سلول هایی که در محیط دارای *FBS* با *bFGF* و ۲۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر *BMP4* القا شدند، پروتئین‌های قلبی تروپونین *I* و آلفا-اکتینین را بیان کردند.

نتیجه‌گیری: به نظر می رسد ترکیب *bFGF* و *BMP4* تمایز سلول‌های بنیادی بافت چربی به کاردیومیوسیت را بهبود می‌بخشد. از طرفی، تیمار با این فاکتورهای تمایزی در محیط دارای *FBS* نسبت به محیط دارای *B27* تمایز کاردیومیوسیتی بهتری را به دنبال داشت که یکی از دلایل احتمالی آن وجود انسولین در *B27* است.

واژگان کلیدی: سلول‌های بنیادی بافت چربی، تمایز، کاردیومیوسیت، *BMP4*، *bFGF*.

مقدمه:

سلول‌های بنیادی بافت چربی (ADSCs)[1] دسته ای از سلول‌های بنیادی مزانشیمی چندتوان هستند که از نظر ریخت‌شناسی و فنوتیپ به سلول‌های بنیادی مشتق از مغز استخوان شبیه هستند(۱) و توان تمایز به رده‌های مزودرمی مانند آدیپوسیت، کندروسیت، استئوسیت و میوسیت و رده‌های غیر مزودرمی مانند نورون را دارند(۲). بافت چربی نسبت به بافت‌های مزانشیمی دیگر، از جمله مغز استخوان، با روش‌های کمتر تهاجمی به دست می‌آید و تعداد سلول‌های بنیادی بیشتری دارد(۳). این سلول‌ها توانایی تمایز به کاردیومیوسیت را دارند(۴) که شاید به دلیل بیان ژن‌های اختصاصی قلب *NKX2.5* و *MLC2V* در طول تمایز است. به علاوه، این سلول‌ها فاکتور رشد VEGF[2] را ترشح می‌کنند که هم اثر اتوکرین/ پاراکرین بر تمایز قلبی دارد(۵) و هم توانایی رگ‌زایی مناسبی را به این سلول‌ها اعطا می‌کند(۶، ۷). مطالعه‌های پیشین نشان می‌دهد که سلول‌های بنیادی بافت چربی پس از پیوند به قلب به لایه‌ای از کاردیومیوسیت‌ها و سلول‌های اندوتلیال تمایز می‌یابند. این لایه به بافت آسیب دیده قلب ملحق می‌شود و عروق خونی جدیدی در این بافت

1 . Adipose – drived stem cells

2 . Vascular Endothelial Growth factor (VEGF)

نویسنده مسئول: دکتر معصومه فخرطه
پست الکترونیک: *mftaha@nigeb.ac.ir*

[Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir on 2026-11-17]

شکل می‌گیرد(۸). این ویژگی‌ها در مجموع نشان می‌دهد که سلول‌های بنیادی بافت چربی منبع سلولی مناسبی برای کاربرد در مهندسی بافت قلب و ترمیم قلب آسیب دیده هستند(۴). با این حال، برای استفاده درمانی از این سلول‌ها فهم درستی از نحوه تمایز و هدایت تمایز این سلول‌ها به کاردیومیوسیت لازم است. به این دلیل می‌توان تاثیر عوامل گوناگون از جمله تاثیر فاکتورهای رشد و تمایز، ماده زمینه‌ای خارج سلولی و هورمون‌ها را بررسی کرد.

BMPها[3] و bFGF[4] فاکتورهای رشد مهمی هستند که نقش‌های شناخته شده‌ای در تکوین قلب دارند. BMPها به فوق خانواده TGF-β[5] تعلق دارند و در اندودرم خارجی و اکتودرم بیان می‌شوند(۹, ۱۰). BMPها در انواع روندهای زیستی، مانند تکثیر، آپوپتوز، تمایز و ریخت‌زایی، نقش دارند و در طی تکوین جنین در تمایز و تشکیل به‌طورتقریبی تمام بافت‌ها و ارگان‌ها، از جمله سیستم عصبی، سومیت‌ها، ریه، کلیه، دندان، روده و غدد جنسی، دخالت دارند(۱۱). تشکیل کاردیومیوسیت‌ها را می‌توان به ۴ مرحله تشکیل سلول‌های بنیادی پرتوان، مرحله پری‌کاردیوبلاست، مرحله کاردیوبلاست و مرحله تشکیل کاردیومیوسیت تقسیم کرد که در هر کدام از این مراحل BMPها نقش مهمی برعهده دارند(۱۲).

bFGF فاکتور دیگری است که نقش‌های شناخته شده‌ای در تمایز قلبی دارد. مطالعه‌ها نشان داده است که bFGF از همان مراحل ابتدایی رویان‌زایی تا دوران پس از تولد در قلب موش صحرایی بیان می‌شود و نقش مهمی را در تمایز و ریخت‌زایی بر عهده دارد که لازمه تکوین عضله، عروق و دریچه‌های قلبی است(۱۳). تیمار مزودرم پیش‌قلبی جوجه با ترکیبی از bFGF و BMP2/4 برای القای بیان Nkx2.5 و القای فنوتیپ انقباض ضروری است. در واقع، هر دوی FGFها و BMPها به عنوان فاکتورهای تخصص‌یافتگی قلبی عمل می‌کنند، به طوری که BMP باعث تمایز سلول‌های مزودرمی پیش‌قلبی به دودمان قلبی می‌شود، در حالی که FGF، به احتمال زیاد با فراهم کردن امکان بقای سلول‌ها، باعث حمایت از تمایز انتهایی آن‌ها می‌شود(۱۴).

با توجه به نقش FGFها و BMPها در تمایز قلبی، انتظار می‌رود که این فاکتورها در القای تمایز سلول‌های بنیادی بافت چربی به کاردیومیوسیت و بیان فاکتورهای نسخه‌برداری، ژن‌های قلبی و پروتئین‌های سارکومری مؤثر واقع شوند. بنابراین، پژوهش حاضر برای تعیین تاثیر فاکتورهای رشد bFGF و BMP4 بر تمایز سلول‌های بنیادی بافت چربی انسانی به کاردیومیوسیت طراحی شد.

مواد و روش‌ها:

این پژوهش تجربی در سال ۱۳۹۵ در آزمایشگاه گروه سلول‌های بنیادی و پزشکی بازساختی پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست‌فناوری انجام شد.

جداسازی سلول‌های بنیادی بافت چربی انسانی

برای تهیه سلول‌های بنیادی بافت چربی، از چربی زیر جلدی ناحیه شکمی خانم‌هایی استفاده شد که برای ابدومینوپلاستی و لیپوساکشن به بیمارستان‌های عرفان یا شریعتی مراجعه کردند. این خانم‌ها در سنین ۴۰تا۵۰ سالگی بودند و سابقه بیماری نداشتند. پس از جراحی و اخذ رضایت از بیمار، نمونه‌ها در ظروف شیشه‌ای سترون و روی یخ به آزمایشگاه کشت سلول منتقل شد. مراحل کار با نمونه از سوی کمیته اخلاق پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست‌فناوری تایید شد (کد تأییدیه IR.NIGEB.۹۳/۸-۸-۷). ۵ گرم بافت چربی با تیغ جراحی استریل ریز و به درون یک بشر کوچک استریل حاوی مگنت و آنزیم کلاژناز ۰/۲ درصد (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific آمریکا) منتقل شد و در انکوباتور کشت سلول روی استیرر قرار گرفت. به این ترتیب، سلول‌ها در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد و به مدت ۱۰تا۱۵ دقیقه جداسازی شدند. پس از متلاشی شدن بافت چربی، کلاژناز حاوی سلول‌ها به یک لوله سانتریفوژ ۱۵ میلی‌لیتری منتقل شد و توسط محیط DMEM۶ حاوی ۲۰درصد FBS۷ رقیق شد. سوسپانسیون سلولی با ۱۲۰۰ rpm به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ شد تا کسر استرومایی عروقی (SVF۸) به دست آید. ته‌نشست سلولی در محیط تازه حاوی DMEM و ۲۰درصد سرم جنینی گاوی و یک درصد آنتی‌بیوتیک پنیسیلین و استرپتومایسین (همه از شرکت Gibco, Thermo Fisher Scientific آمریکا) معلق و پس از عبور از فیلترهای (استرینر) ۱۰۰ میکرومتری و شمارش، با تراکم ۵×۱۰^{۴} سلول در میلی‌لیتر به فلاسک‌های T25 منتقل شد و در انکوباتور، تحت شرایط دمایی ۳۷ درجه سانتیگراد، ۵ درصد $CO_۲$ و ۹۵ درصد رطوبت قرار گرفت. پس از ۳ تا ۴ ساعت، سلول‌ها به کف فلاسک چسبیدند. در این زمان، برای حذف سلول‌های خونی، محیط کشت سلول‌ها با محیط تازه تعویض شد. سلول‌ها پس از رسیدن به تراکم ۸۰تا۹۰ درصد پاساژ داده شدند(۱۵).

آنالیز فلوسیتومتری برای تشخیص سلول‌های بنیادی بافت چربی

در این پروژه سلول‌های بنیادی بافت چربی در مرحله پاساژ ۴ برای مارکرهای مزانشیمی و خونی بررسی شدند. به این دلیل، سلول‌های بنیادی بافت چربی با Trypsin–EDTA جداسازی و با پارافرمالدئید ۴درصد ثابت شدند. سلول‌ها ابتدا به مدت ۳۰ دقیقه در ۴ درجه سانتیگراد با آنتی‌بادی علیه مارکرهای CD۷۳، CD۹۰، CD۱۰۵ و CD۴۵ (همه از شرکت Abcam انگلستان) و پس از شست‌وشو به مدت ۳۰دقیقه در دمای اتاق با آنتی‌بادی ثانویه FITC-labeled rat anti-mouse IgG (Sigma-Aldrich آمریکا) انکوبه شدند. سلول‌هایی که فقط با FITC–labeled rat anti-mouse IgG رنگ‌آمیزی شدند، به عنوان کنترل منفی به کار رفتند. سپس، بررسی فلوسیتومتری با استفاده از دستگاه Attune® Acoustic Focusing (Cytometer (Applied Biosystems, Life Technologies, Grand Island, USA انجام و نتایج حاصله با استفاده از نرم‌افزار FlowJo vX.0.6 (Tree Star Inc., Ashland, USA) آنالیز شد.

تمایز سلول‌های بنیادی بافت چربی به کاردیومیوسیت‌ها

سلول‌های بنیادی بافت چربی در مرحله پاساژ چهارم برای القای تمایز کاردیومیوسیت استفاده شد. سلول‌ها با تراکم $۱۰^{۵}$ سلول بر میلی‌لیتر به ظروف کشت ژلاتینه ۶ ۲۴ یا ۹۶ خانه منتقل و به مدت ۲۴ ساعت در محیط DMEM حاوی ۲۰درصد FBS کشت داده شدند. سپس محیط سلول‌ها با محیط کشت تمایزی جایگزین شد. ۷ گروه در این مطالعه بررسی شد که در جدول ۱ نشان داده شده است.

به طور خلاصه، سلول‌ها به مدت ۴روز در محیط کشت DMEM دارای ۱۰درصد FBS یا ۰/۵درصد B27(Gibco, Thermo Fisher Scientific آمریکا) در معرض ۱۰نانوگرم بر میلی‌لیتر bFGF و غلظت‌های مختلفی (۲۰، ۵۰ یا ۱۰۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر) از BMP4 (هر دو از شرکت Sigma-Aldrich آمریکا) قرار گرفتند. سپس فاکتورها به طور کامل حذف شد و تمایز سلول‌ها در محیط کشت DMEM دارای ۱۰درصد FBS تا انتهای هفته سوم ادامه یافت.

آزمون MTT[9]

سلول‌ها در ظروف کشت ۹۶ چاهکی ژلاتینه کشت داده شدند و به مدت ۴ روز در معرض فاکتورهای تمایزی (طبق جدول ۱) قرار گرفتند. سپس فاکتورهای تمایزی حذف و سلول‌ها به مدت ۲۴ ساعت در محیط DMEM دارای ۱۰درصد FBS کشت داده شدند. برای آزمون MTT از کیت MTT شرکت ایده زیست استفاده شد. محیط سلول‌ها خالی و ۱۰۰ میکرولیتر محیط RPMI۱۰ و ۱۰ میکرولیتر MTT با غلظت ۱۲ میلی مولار اضافه شد و سلول‌ها به مدت ۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. سپس محیط چاهک‌ها خالی و به هر چاهک ۵۰ میکرولیتر DMSO۱۱ اضافه و به آرامی پیپتاژ شد. سلول‌ها ۱۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه

3 . Bone morphogenetic proteins
4 . Basic fibroblast growth factor
5 . Transforming growth factor-β
6 . Dulbecco's Modified Eagles Medium
7 . Fetal bovine serum
8 . Stromal vascular fraction
9 . 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide
10 . Roswell Park Memorial Institute medium
11 . Dimethyl sulfoxide

[Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir on 2026-11-17]

جدول ۱. گروه‌های تمایزی بررسی شده در این تحقیق و محیط کشت و فاکتورهای استفاده شده در هر گروه.

گروه های تمایزی	مرحله القای تمایز قلبی (۴ روز اول تمایز)			ابتدای روز ۵ تا انتهای هفته سوم تمایز
	محیط کشت	غلظت bFGF (ng/ml)	غلظت BMP۴ (ng/ml)	
Control	DMEM + 10% FBS	_	_	DMEM + ۱۰% FBS
FBS-10 bFGF-20 BMP4	DMEM + 10% FBS	۱۰	۲۰	DMEM + 10% FBS
FBS-10 bFGF-50 BMP4	DMEM + 10% FBS	۱۰	۵۰	DMEM + 10% FBS
FBS-10 bFGF-100 BMP4	DMEM + 10% FBS	۱۰	۱۰۰	DMEM + 10% FBS
B27-10 bFGF-20 BMP4	DMEM + 0.5% B27	۱۰	۲۰	DMEM + 10% FBS
B27-10 bFGF-50 BMP4	DMEM + 0.5% B27	۱۰	۵۰	DMEM + 10% FBS
B27-10 bFGF-100 BMP4	DMEM + 0.5% B27	۱۰	۱۰۰	DMEM + 10% FBS

سانتی‌گراد قرار گرفتند. پس از این مرحله، جذب نوری محیط با استفاده از دستگاه الایزا در طول موج ۵۷۰ نانومتر خوانش شد. برای بررسی اختلاف بین گروه‌ها از آنالیز یک‌طرفه ANOVA و آزمون Paired t-test استفاده شد و سطح معناداری کمتر از $P<0.05$ در نظر گرفته شد.

بررسی بیان ژن‌ها با روش RT-PCR و Quantitative real–time PCR

RNA کل سلول‌های تمایز یافته با استفاده از کیت High Pure RNA Isolation Kit (شرکت Roche آلمان) استخراج شد. یک میکروگرم از RNA برای ساخت cDNA با استفاده از کیت سنتز cDNA (Thermo Fisher Scientific آمریکا) به‌کار رفت. برای انجام واکنش PCR از پرایمرهای اختصاصی ژن‌های هدف به شرح جدول ۲ و PCR Master Mix (Ampliqonدانمارک) استفاده شد که شامل آنزیم Taq DNA polymerase، MgCl2، مخلوط dNTP و بافر تکثیر است.

برای انجام qPCR از RealQ PCR Master (Ampliqonدانمارک)، پرایمرهای اختصاصی ژن‌های هدف و ژن‌های GAPDH و ACTB به‌عنوان کنترل داخلی استفاده شد.

واکنش‌ها در حجم ۱۰میکرولیتر، طبق برنامه توصیه شده از سوی شرکت ارائه‌کننده کیت تهیه و با استفاده از دستگاه Rotor-Gene™ 6000 (Corbett Research, Australia) real-time analyzer برای ۴۵ سیکل انجام شد. برای بررسی کمی بیان ژن‌ها از ۴ تکرار مختلف استفاده شد. میزان بیان ژن‌ها با استفاده از نرم‌افزار(Qiagen) REST ۲۰۰۹ محاسبه و با آزمون Pair Wise Fixed Reallocation Randomization Test® بین گروه‌ها مقایسه شد(۱۶). نمودار نهایی با استفاده از نرم‌افزار Microsoft Excel رسم شد.

بررسی بیان پروتئین‌های قلبی با روش ایمونوسیتوشیمی

سلول‌های تمایز یافته به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد با پارافرمالدهید ۴درصد ثابت شدند. برای نفوذپذیر کردن سلول‌ها از بافر فسفات سالین (PBS\۱۲) حاوی ۰/۲ درصد Triton X-100 به مدت ۵ دقیقه استفاده شد و پروتئین‌های غیراختصاصی با سرم بزی ۱۰درصد بلوکه شدند. سپس سلول‌ها به مدت ۴۵ دقیقه در معرض آنتی‌بادی اولیه مونوکلونال علیه α-actinin (Sigma-Aldrich آمریکا) و Cardiac troponin I (SantaCruz آمریکا) و پس از شست‌وشو به مدت ۴۵ دقیقه در معرض آنتی‌بادی ثانویه FITC-labeled rat anti-mouse IgG قرار گرفتند. سلول‌های رنگ‌آمیزی شده با میکروسکوپ فلورسنت (Nikon, Japan)مشاهده شدند.

جدول ۲. توالی و مشخصات پرایمرهای ستفاده شده برای RT-PCR و qPCR.

Target	Reverse	Forward	Size (bp)	Accession
GATA4	5›-CTGTGCCCGTAGTGAGATGA-3›	5›-ACCAGCAGCTCCTTCAGGCA-3›	141	NM_002052
MEF2C	5›-AGACCACCTGTGTTACCTGCA-3›	5›-AGATTGTGTGCTGTTCCACCT-3›	203	NM_002397
TBX5	5›-CCCGTCACAGACCATTTATTATC-3›	5›-AAGGCTGGAAGGCGGATGTTT-3›	143	NM_000192
MLC2A	5›-GGTCTGTCCCATTGAGCTTCT-3›	5›-AGCTGGGGAAGGTGAGTGT-3›	120	NM_021223
MLC2V	5›-GGTCCGCTCCCTTAAGTTTCT-3›	5›-CTTGGGCGAGTGAACGTGAA-3›	118	NM_000432
ANF	5›-CGCTTCTTCATTCGGCTCAC-3›	5›-GGATTTCAAGAATTTGCTGGACC-3›	97	NM_006172
GAPDH	5›-CAAATGAGCCCCAGCCTTCT-3›	5›-TCACCATCTTCCAGGAGCGA-3›	116	NM_002046
ACTB	5›-CCTGGGCATGGAGTCCTGT-3›	5›-ATCTCCTTCTGCATCCTGTCG-3›	153	NM_001101

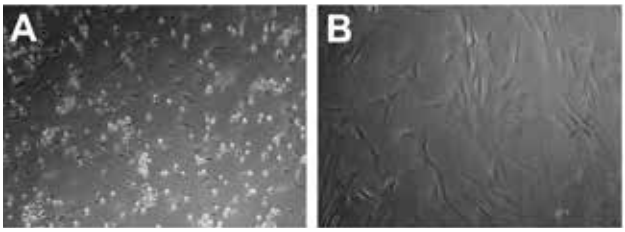
12 . Phosphate buffered saline

[Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir on 2026-11-17]

یافته‌ها:

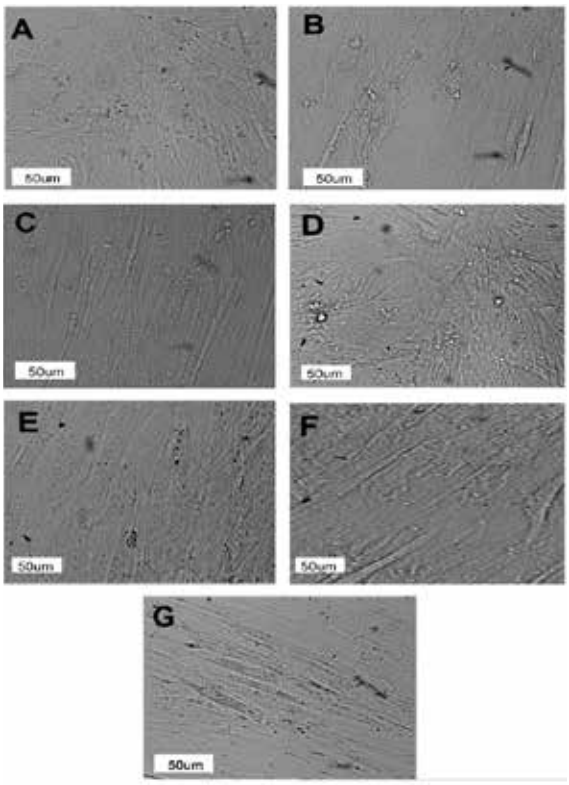
جداسازی، کشت و تمایز سلول‌های بنیادی بافت چربی

سلول‌های بنیادی بافت چربی پس از جداسازی طی ۳ تا ۴ ساعت به سطح ظروف کشت سلولی اتصال پیدا کردند (شکل ۱، پانل A). سلول‌ها پس ازدو یا سه پاساژ ریخت فیبروبلاست‌مانند نشان دادند(شکل ۱، پانل B).



شکل ۱. تصویر میکروسکوپ نوری فازکنتراست. (A) سلول‌های بنیادی بافت چربی چند ساعت پس از جداسازی. (B) سلول‌های بنیادی بافت چربی در مرحله پاساژ سوم.

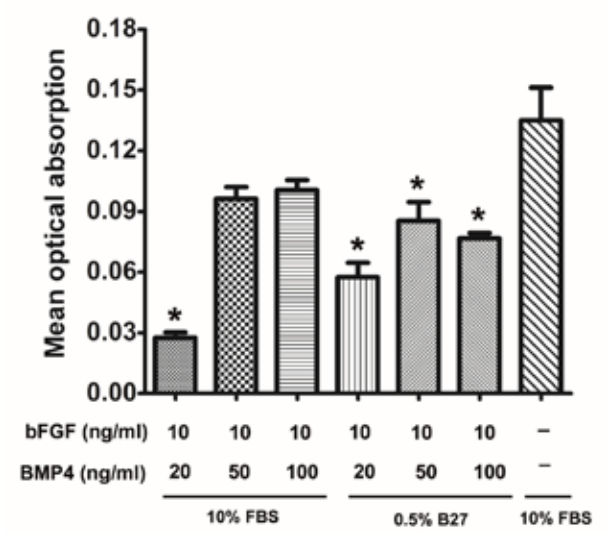
ما پیشتر با بررسی فلوسیتومتری نشان دادیم که ۸۷/۳، ۹۸/۴ و ۹۹/۷ درصد از سلول‌ها در مرحله پاساژ سوم به ترتیب مارکرهای مزانشیمی CD۷۳، CD۹۰ و CD۱۰۵ را بیان کردند، درحالی که مارکر هماتوپویتیک CD۴۵ در کمتر از یک درصد از سلول‌ها بیان شد(۱۵). در تمامیه گروه‌های تمایزی، ریخت سلول‌ها به تدریج تغییر کرد. در بیشتر گروه‌ها سلول‌ها ظاهر کشیده و نواری شکل نشان دادند(شکل ۲).



شکل ۲. تصویر فازکنتراست سلول‌ها در روز ۲۱ تمایز. (A) سلول‌های تیمار شده با 10 ng/ml bFGF و 20 ng/ml BMP4 در محیط حاوی ۱۰درصد FBS. Bسلول‌های تیمار شده با 10 ng/ml bFGF و 50 ng/ml BMP4 در محیط حاوی ۱۰درصد FBS. (C) سلول‌های تیمار شده با 10 ng/ml bFGF و 100 ng/ml BMP4 در محیط حاوی ۱۰درصد FBS. (D) سلول‌های تیمار شده با 10 ng/ml bFGF و 20 ng/ml BMP4 در محیط حاوی B27. (E) سلول‌های تیمار شده با 10 ng/ml bFGF و 50 ng/ml BMP4 در محیط حاویB27. (F) سلول‌های تیمار شده با 10 ng/ml bFGF و 100 ng/ml BMP4 در محیط حاوی B27. (G) گروه کنترل. از روز ۵ تا ۲۱ تمایز، محیط کشت کلیه گروه‌ها فقط دارای ۱۰درصد FBS بود

بررسی میزان زیست‌پذیری و تکثیر سلول‌ها با آزمون MTT

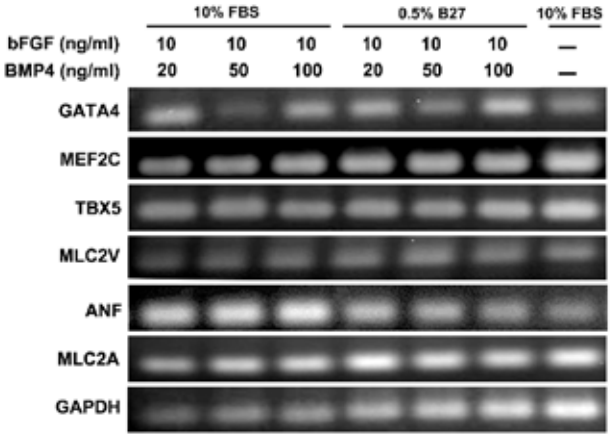
سلول‌های گروه کنترل که در محیط حاوی FBS تمایز یافتند و فاکتورهای تمایزی را دریافت نکردند، بالاترین میزان زیست‌پذیری و تکثیر را نشان دادند، در حالی که در گروه‌های دیگر کاهش معناداری در زیست‌پذیری و تکثیر سلول‌ها مشاهده شد. سلول‌هایی که در محیط حاوی B27 با ۱۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر bFGF و ۲۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر BMP4 تیمار شدند، بیشترین کاهش را در میزان زیست‌پذیری و تکثیر نشان دادند (شکل ۳).



شکل ۳. نتایج آزمون MTT که زیست‌پذیری و تکثیر سلول‌ها را پس از ۴ روز تیمار با فاکتورهای تمایزی bFGF و BMP4 نشان می‌دهد.

بیان ژن‌های قلبی به روش RT-PCR

پس از پایان دوره تمایز، بیان ژن‌های قلبی شامل *GATA4*، *MEF2C*، *TBX5*، *MLC2V*، MLC2A و ANF به روش RT-PCR بررسی شد. با توجه به شکل ۴، این ژن‌ها در تمام گروه‌های تمایزی بیان شدند.



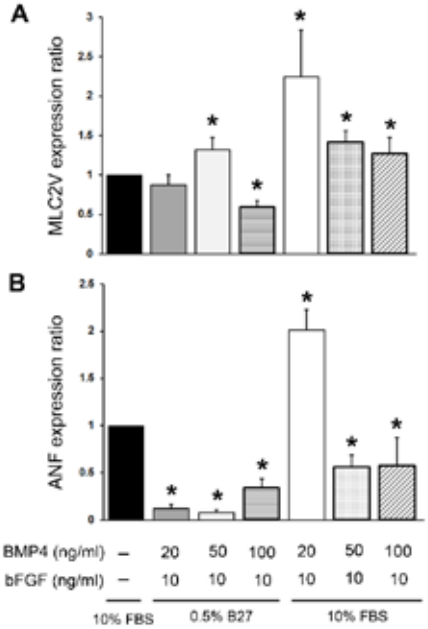
شکل ۴. بیان ژن‌های قلبی در سلول‌های بنیادی بافت چربی تمایز یافته پس از ۲۱ روز تمایز به روش RT-PCR. A گروه کنترل. (B) سلول‌های تیمار شده با 10 ng/ml bFGF و 20 ng/ml BMP4 در محیط حاوی ۱۰درصد C.FBS سلول‌های تیمار شده با 10 ng/ml bFGF و 50 ng/ml BMP4 در محیط حاوی ۱۰درصد D .FBS سلول‌های تیمار شده با 10 ng/ml bFGF و 100 ng/ml BMP4 در محیط حاوی ۱۰درصد FBS. (E) سلول‌های تیمار شده با 10 ng/ml bFGF و 20 ng/ml BMP4 در محیط حاوی B27. (F) سلول‌های تیمار شده با 10 ng/ml bFGF و 50 ng/ml BMP4 در محیط حاوی B27. (G) سلول‌های تیمار شده با 10 ng/ml bFGF و 100 ng/ml BMP4 در محیط حاوی B27.

[Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir on 2026-11-17]

بررسی کمی بیان ژن‌های قلبی در گروه‌های مطالعه شده با روش qPCR

مقایسه کمی بیان ژن MLC2V

سطح بیان ژن *MLC2V* در گروه‌های مختلف با گروه کنترل مقایسه شد. در این پروژه، سلول‌هایی که در محیط دارای B27 با ۱۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر bFGF و ۲۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر BMP4 تیمار شدند، تغییر بیان معناداری را نسبت به گروه کنترل نشان ندادند، در حالی که تیمار سلول‌ها با ۱۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر bFGF و ۵۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر BMP4 باعث افزایش معنادار ۱/۳ برابری در بیان *MLC2V* شد (P=0.005) و تیمار سلول‌ها با ۱۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر bFGF و ۱۰۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر BMP4 بیان *MLC2V* را به طور معنادار کاهش داد (۱۷درصد برابر، (P=0.005)). سلول‌هایی که در محیط دارای ۱۰ درصد FBS با ۱۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر bFGF و ۲۰، ۵۰ یا ۱۰۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر BMP4 تیمار شدند، به ترتیب افزایش معنادار ۲/۲۵ برابری (P=0.001)، ۱/۴ برابری (P=0.01) و ۱/۲۷ برابری (P<0.035) را در بیان ژن *MLC2V* نشان دادند (شکل ۵، پانل A). به طور کلی، بیشترین افزایش بیان ژن *MLC2V* در گروهی مشاهده شد که در محیط دارای FBS با ۱۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر bFGF و ۲۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر BMP4 تیمار شدند.



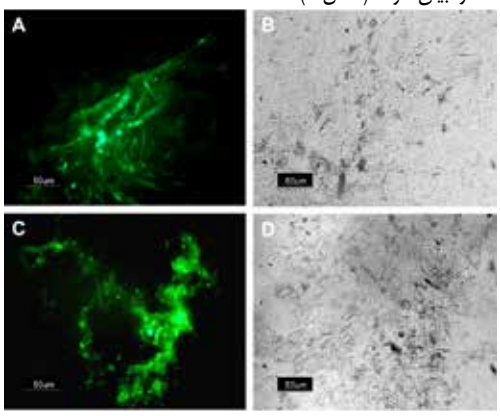
شکل ۵. مقایسه کمی بیان ژن‌های قلبی *Mlc2v* (پانل A) و Anf (پانل B) در گروه‌های تیمار شده با bFGF و BMP4 نسبت به گروه کنترل (محیط دارای ۱۰درصد FBS، بدون فاکتورهای تمایزی) با روش qPCR. *: اختلاف با گروه کنترل معنادار است (P<0.05).

مقایسه کمی بیان ژن *ANF*

بیان ژن *ANF* در تمامی گروه هایی که در محیط دارای B27 با فاکتورهای تمایزی bFGF و BMP4 تیمار شدند، نسبت به گروه کنترل کاهش معنادار نشان داد. این کاهش در گروه‌های تیمار شده با ۲۰، ۵۰ یا ۱۰۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر BMP4 به ترتیب به ۰/۱۲ برابر (P= 0.011) ، ۸درصد برابر (P= 0.018) و ۰/۳۴ برابر (P= 0.018) رسید. بیان ژن *ANF* در سلول‌هایی که در محیط دارای ۱۰ درصد FBS با ۱۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر bFGF و ۵۰ یا ۱۰۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر BMP4 تیمار شدند نیز نسبت به گروه کنترل کاهش یافت و به ترتیب به ۰/۵۶ برابر (P= 0.001) و ۰/۵۸ برابر (P= 0.063) رسید. در هر حال، بیان ژن *ANF* در سلول‌هایی که در محیط دارای ۱۰ درصد FBS با ۱۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر bFGF و ۲۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر BMP4 تیمار شدند، به میزان ۲/۰۲ برابر (P= 0.018) افزایش یافت (شکل ۵، پانل B).

بررسی بیان پروتئین‌های قلبی با روش ایمونوسیتوشیمی

سلول‌هایی که در محیط دارای ۱۰ درصد FBS با ۱۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر bFGF و ۲۰نانوگرم بر میلی‌لیتر BMP4 تیمار شدند، هر دو پروتئین قلبی تروپونین I و α-actinin را بیان کردند(شکل ۶).



شکل ۶. بررسی بیان پروتئین‌های قلبی cardiac troponin I (CTNI) و α-actinin در سلول‌هایی که در محیط دارای ۱۰درصد FBS با ۱۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر bFGF و ۲۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر BMP4 تیمار شدند به روش ایمونوسیتوشیمی. A و C به ترتیب رنگ‌آمیزی ایمنی علیه پروتئین‌های CTNI و α-actinin (رنگ سبز) و B و D تصویر فازکنتراست آن‌ها را نشان می‌دهد.

بحث:

مسیر پیام‌رسانی BMP4 نقش مهمی در القای تمایز مزانشیمی و تکوین قلب دارد(۱۷). پیشتر Khaleghi و همکاران(۱۸) نقش القایی BMP4 را در تمایز قلبی سلول‌های بنیادی بافت چربی موش نشان دادند. از طرفی، bFGF یکی از اعضای خانواده فاکتورهای رشد فیبروبلاستی است(۱۹) که در همراهی با BMP4 می‌تواند سبب پیشروی تمایز سلول‌های بنیادی به رده مزودرمی شود(۲۰). در تحقیق حاضر، تاثیر همزمان فاکتورهای bFGF و BMP4 روی تمایز سلول‌های بنیادی بافت چربی انسانی به کاردیومیوسیت بررسی شد. طبق نتایج RT-PCR، سلول‌های بنیادی بافت چربی در تمام گروه‌های تمایزی، از جمله گروه کنترل و گروه‌های تیمار با bFGF و BMP4، پس از ۳ هفته تمایز فاکتورهای نسخه‌برداری قلبی، شامل *GATA4*، MEF2C و Tbx5، و ژن‌های اختصاصی قلب، شامل *MLC2V*، MLC2A و *ANF*، را بیان کردند. همان‌طور که می‌دانیم، *GATA4* یک فاکتور نسخه‌برداری قلبی است که نقش مهمی در بیان ژن‌های اختصاصی قلب مانند تروپونین I دارد(۲۱). همچنین این فاکتور باعث پیشروی ریخت‌زایی قلب می‌شود (۲۲). MEF2C یکی دیگر از فاکتورهای نسخه‌برداری قلبی است که مانند *GATA4* در ریخت‌زایی قلب و نیز در تشکیل ماهیچه و تکوین عروق نقش دارد(۲۳). TBX5 نیز یکی از فاکتورهای نسخه‌برداری قلبی است که در نواحی دهلیزی شامل گره دهلیزی–بطنی بیان می‌شود(۲۴). MLC2A و *ANF* دو ژن اختصاصی قلب هستند که در مراحل نهایی تکوین قلب در دهلیز بیان می‌شوند(۲۵)، در حالی که *MLC2V* در حفرات بطنی بیان می‌شود و برای ریخت‌زایی این حفره‌ها در پستانداران ضروری است (۲۵). بیان این ژن‌ها در مجموع نشان‌دهنده توان تمایزی سلول‌های بنیادی بافت چربی به سلول‌های قلبی در محیط کشت است. در این مطالعه، القای تمایز قلبی با bFGF و BMP4 در یکی از محیط‌های دارای FBS یا B27 انجام شد. طبق نتایج qPCR، ژن‌های *ANF* و MLC2A در سلول‌هایی که در محیط دارای FBS با ۱۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر bFGF و ۲۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر BMP4 القا شدند، بیشترین بیان را داشتند که اثر وابسته به غلظت BMP4 را در القای تمایز قلبی نشان می‌دهد. از طرفی، نتایج qPCR نشان داد که تیمار سلول‌ها با فاکتورهای تمایزی bFGF و BMP4 در محیط دارای FBS نسبت به محیط دارای B27 تمایز کاردیومیوسیت‌ها را بهتر القا می‌کند که می‌تواند از وجود برخی فاکتورهای کمک‌کننده تمایز در FBS یا وجود انسولین در B27 ناشی شده باشد. در واقع B27 دارای فاکتورهای مشخصی مانند رتینوئیک اسید، پوترسین، پروژسترون، سلنیوم و ترنسفرین است و به دو شکل پایه دارای انسولین و بدون انسولین در دسترس است(۲۶). محققان معتقدند انسولین ممکن است تمایز به سمت مزودرم و اندودرم را مهار کند و به نفع تمایز رده‌های

[Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir on 2026-11-17]

نورواکتودرمی باشد(۲۷) که نتایج ما نیز آن را تایید می‌کند. بهتر است در مطالعه بعدی تاثیر B27 فاقد انسولین بر تمایز قلبی سلول‌های بنیادی بافت چربی بررسی شود. طبق نتایج ایمونوسیتوشیمی، سلول‌هایی که در محیط دارای FBS با ۱۰نانوگرم بر میلی‌لیتر bFGF و ۲۰نانوگرم بر میلی‌لیتر BMP4 القا و به عنوان گروه تمایزی مطلوب در این مطالعه انتخاب شدند، پروتئین‌های ساختمانی cardiac troponin I (CTNI) و α-actinin را بیان کردند که تایید دیگری بر تمایز قلبی سلول‌های بنیادی بافت چربی انسانی است. با این وجود، باید خاطر نشان کرد که سلول‌های تمایز یافته در این مطالعه ضربان نداشتند که نشان می‌دهد بلوغ کاردیومیوسیت‌های به دست آمده به فاکتورهای القا کننده دیگر نیاز دارد.

نتیجه‌گیری:

سلول‌های بنیادی بافت چربی پتانسیل خوبی برای تمایز به کاردیومیوسیت دارند. ترکیب bFGF و BMP4 تمایز سلول‌های بنیادی بافت چربی به کاردیومیوسیت‌ها را بهبود می‌بخشد، اما اثر وابسته به غلظت این فاکتورها نباید فراموش شود. از طرفی، تیمار با با فاکتورهای تمایزی bFGF و BMP4 در محیط دارای FBS نسبت به محیط دارای B27 تمایز کاردیومیوسیتی بهتری را به دنبال داشت که یکی از دلایل احتمالی آن وجود انسولین در B27 است و بهتر است در مطالعه بعد از B27 فاقد انسولین استفاده شود.

منابع:

1. Markarian CF, Frey GZ, Silveira MD, Milani AR, Ely PB, Horn AP, et al. Isolation of adipose-derived stem cells: a comparison among different methods. Biotechnology letters. 2014;36(4):693-702.

2. Strem BM, Hicok KC, Zhu M, Wulur I, Alfonso Z, Schreiber RE, et al. Multipotential differentiation of adipose tissue-derived stem cells. Keio J Med. 2005;54(3):132-41.

3. 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(5):1294-301.

4. Choi YS, Dusting GJ, Stubbs S, Arunothayaraj S, Han XL, Collas P, et al. Differentiation of human adipose-derived stem cells into beating cardiomyocytes. Journal of cellular and molecular medicine. 2010;14(4):878-89.

5. Mazo M, Gavira JJ, Pelacho B, Prosper F. Adipose-derived stem cells for myocardial infarction. Journal of cardiovascular translational research. 2011;4(2):145-53.

6. Fraser JK, Wulur I, Alfonso Z, Hedrick MH. Fat tissue: an underappreciated source of stem cells for biotechnology. Trends Biotechnol. 2006;24(4):150-4.

7. Sugii S, Kida Y, Kawamura T, Suzuki J, Vassena R, Yin Y-Q, et al. Human and mouse adipose-derived cells support feeder-independent induction of pluripotent stem cells. Proceedings of the National Academy of Sciences. 2010;107(8):3558-63.

8. Miyahara Y, Nagaya N, Kataoka M, Yanagawa B, Tanaka K, Hao H, et al. Monolayered mesenchymal stem cells repair scarred myocardium after myocardial infarction. Nature medicine. 2006;12(4):459-65.

9. Ducy P, Karsenty G. The family of bone morphogenetic proteins. Kidney international. 2000;57(6):2207-14.

10. Sachinidis A, Fleischmann BK, Kolossov E, Wartenberg M, Sauer H, Hescheler J. Cardiac specific differentiation of mouse embryonic stem cells. Cardiovascular research. 2003;58(2):278-91.

11. Hogan BL. Bone morphogenetic proteins: multifunctional regulators of vertebrate development. Genes & development. 1996;10(13):1580-94.

12. Van Wijk B, Moorman AF, van den Hoff MJ. Role of bone morphogenetic proteins in cardiac differentiation. Cardiovascular research. 2007;74(2):244-55.

13. Spirito P, Fu YM, Yu ZX, Epstein SE, Casscells W. Immunohistochemical localization of basic and acidic fibroblast growth factors in the developing rat heart. Circulation. 1991;84(1):322-32.

14. Barron M, Gao M, Lough J. Requirement for BMP and FGF signaling during

11. cardiogenic induction in non-precardiac mesoderm is specific, transient, and cooperative. Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists. 2000;218(2):383-93.

15. Faghih H, Javeri A, Taha MF. Impact of early subcultures on stemness, migration and angiogenic potential of adipose tissue-derived stem cells and their resistance to in vitro ischemic condition. Cytotechnology. 2017.

16. Pfaffl MW, Horgan GW, Dempfle L. Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. Nucleic acids research. 2002;30(9):e36.

17. Takei S, Ichikawa H, Johkura K, Mogi A, No H, Yoshie S, et al. Bone morphogenetic protein-4 promotes induction of cardiomyocytes from human embryonic stem cells in serum-based embryoid body development. American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology. 2009;296(6):H1793-H803.

18. Khaleghi M, Taha MF, Jafarzadeh N, Javeri A. Atrial and ventricular specification of ADSCs is stimulated by different doses of BMP4. Biotechnology letters. 2014;36(12):2581-9.

19. Kim H-S. Assignment1 of the human basic fibroblast growth factor gene FGF2 to chromosome 4 band q26 by radiation hybrid mapping. Cytogenetic and Genome Research. 1999;83(1-2):73.

20. Lee TJ, Jang J, Kang S, Jin M, Shin H, Kim DW, et al. Enhancement of osteogenic and chondrogenic differentiation of human embryonic stem cells by mesodermal lineage induction with BMP-4 and FGF2 treatment. Biochem Biophys Res Commun. 2013;430(2):793-7.

21. Shibbani K, Nemer G. GATA4 Novel Role in Dilated Cardiomyopathy: Is the Drastic Zinc Finger Mutation Hiding a Non-DNA Binding Role for Zinc Finger Transcription Factors. Enliven: J Genet Mol Cell Biol. 2014;1(1):e2.

22. Perrino C, Rockman HA. GATA4 and the two sides of gene expression reprogramming. Circulation research. 2006;98(6):715-6.

23. Bi W, Drake CJ, Schwarz JJ. The transcription factor MEF2C-null mouse exhibits complex vascular malformations and reduced cardiac expression of angiopoietin 1 and VEGF. Developmental biology. 1999;211(2):255-67.

24. Christoffels VM, Hoogaars WM, Tessari A, Clout DE, Moorman AF, Campione M. T-box transcription factor Tbx2 represses differentiation and formation of the cardiac chambers. Developmental dynamics. 2004;229(4):763-70.

25. Small EM, Krieg PA. Molecular regulation of cardiac chamber-specific gene expression. Trends in cardiovascular medicine. 2004;14(1):13-8.

26. Schwartz CM. Derivation, enrichment and characterization of dopaminergic neurons from pluripotent stem cells: Institutionen for medicinsk biokemi och biofysik (MBB)/Department of Medical Biochemistry and Biophysics; 2010.

27. Freund C, Ward-van Oostwaard D, Monshouwer-Kloots J, van den Brink S, van Rooijen M, Xu X, et al. Insulin redirects differentiation from cardiogenic mesoderm and endoderm to neuroectoderm in differentiating human embryonic stem cells. Stem cells 2008;26(3)724-33.

[Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir on 2026-11-17]