

بررسی تاثیر عصاره هیدروالکلی گل قاصدک بر روی روند تکثیر سلول‌های بنیادی عصبی

علیرضا عبدانی پور^۱ Ph.D.*، سیده مهسا خاتمی^۲ M.Sc.، محسن سقا^۲ Ph.D.، فرشید سلیمی ننه کران^۱ Ph.D.،
داوود نقی زاده^۱ M.Sc.، رضا بناجی^۱ M.Sc.

- ۱- دانشگاه آزاد اسلامی واحد اردبیل، دانشکده پزشکی، آزمایشگاه سلول‌های بنیادی، اردبیل، ایران
- ۲- دانشگاه آزاد اسلامی، واحد اردبیل، باشگاه پژوهشگران جوان و نخبگان، اردبیل، ایران
- ۳- دانشگاه علوم پزشکی اردبیل، دانشکده پزشکی، گروه علوم تشریحی و پاتولوژی، آزمایشگاه تحقیقاتی جنین شناسی و سلول‌های بنیادی

* پست الکترونیک نویسنده مسئول: abdani.anatomy@yahoo.com

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۳/۱۰/۲۴

تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۸/۲۸

چکیده

هدف: هدف از این مطالعه بررسی تاثیر عصاره هیدروالکلی گل قاصدک (*Cirsium vulgare*) بر روی تکثیر و رشد سلول‌های بنیادی عصبی موش صحرایی در شرایط آزمایشگاهی (*In vitro*) می‌باشد.

مواد و روش‌ها: سلول‌های بنیادی عصبی از هیپوکمپ مغز نوزاد موش صحرایی استخراج شد. به‌منظور تعیین بهترین غلظت، سلول‌ها به مدت ۴۸ ساعت با غلظت‌های ۲۰۰، ۴۰۰، ۶۰۰، ۸۰۰ و ۱۰۰۰ میکروگرم به‌ازای هر میلی‌لیتر محیط کشت تیمار شدند و میزان تکثیر سلولی با روش MTT بررسی گردید. همچنین میزان بیان ژن Sox2 در سلول‌های بنیادی عصبی تیمار شده با روش Real-time PCR بررسی گردید.

نتایج: نتایج به‌دست آمده در این مطالعه نشان داد که در حضور عصاره گل قاصدک تکثیر سلول‌های بنیادی عصبی و بیان ژن Sox2 به‌طور معنی‌داری نسبت به گروه کنترل افزایش یافت.

نتیجه‌گیری: با توجه به تاثیر عصاره گل قاصدک بر روی روند تکثیر سلول‌های بنیادی عصبی، استفاده از این عصاره گیاهی می‌تواند جهت مقاصد کلینیکی به‌منظور درمان برخی از بیماری‌های سیستم عصبی از جمله ایسکمی مغزی و ضایعات نخاعی مفید باشد.

واژگان کلیدی: تکثیر سلولی، گل قاصدک، سلول‌های بنیادی عصبی

مقدمه

بیشترین مکان حضور سلول‌های بنیادی عصبی در نواحی ساب و نتریکولار می‌باشد (۱). سلول‌های بنیادی عصبی توانایی تبدیل به اکثر سلول‌های تخصص یافته مغزی را دارا می‌باشند و در بیماری‌های سیستم عصبی این سلول‌ها قادرند به نقاط آسیب دیده مهاجرت کرده و در ترمیم شرکت کنند (۲). این سلول‌ها بعد از تولد با حفظ توانایی خود تجدیدی می‌توانند در عمل‌کردهایی مانند یادگیری، حافظه و پاسخ به آسیب، تاثیرگذار باشد (۳). استفاده از ظرفیت طبیعی بدن برای بازسازی و ترمیم یکی از اصول مهمی است که دانش سلول‌های بنیادی برای درمان بیماری‌ها دنبال می‌نماید (۴). سلول‌های عصبی بعد از تولد مراحل پایانی تمایز خود را طی می‌کنند و توانایی خود تجدیدی را ندارند. بنابراین حضور سلول‌هایی که نوروژنایی می‌کنند، در درمان ضایعات سیستم عصبی دارای اهمیت ویژه‌ای خواهد بود (۵). یکی از مهم‌ترین مسائل در سلول درمانی استفاده از یک محرک مناسب برای افزایش سرعت تکثیر سلول‌های بنیادی عصبی در شرایط *In vitro* می‌باشد. ژن Sox2 به میزان زیادی در نوروایی تلوم سیستم عصبی در حال تکوین بیان می‌شود. بر اساس مطالعات انجام شده این ژن در حفظ و تکثیر سلول‌های بنیادی عصبی نقش بسیار مهمی ایفا می‌نماید (۶). گیاه سیرسیوم ولگار *Cirsium vulgare* که در زبان فارسی به قاصدک و در زبان انگلیسی به *Spear Thistle* شناخته می‌شود، در مناطق مختلفی از اروپا، غرب آسیا و شمال غرب آفریقا یافت می‌گردد. تمام بخش‌های این گیاه به‌ویژه ریشه آن به‌عنوان دارو مورد استفاده قرار می‌گیرد. این گیاه به‌عنوان ضد تهوع، ضد رماتیسم، ضد درد، ضد التهاب و آنتی‌اکسیدانت مورد استفاده قرار می‌گیرد (۷ و ۸). بیشتر بررسی‌های انجام شده در رابطه با گیاهان متعلق به رده *Cirsium* مربوط به گیاه *Cirsium japonicum* می‌باشد. مطالعات انجام شده روی این گیاه نشان‌دهنده وجود فعالیت آنتی‌اکسیدانتی، ضدسرطانی (۹) و ضد دیابتی (۱۰) در این گیاه می‌باشد. تاکنون هیچ‌گونه مطالعه‌ای درباره اثر گیاه قاصدک بر روی سلول‌های بنیادی عصبی صورت نگرفته است. در این مطالعه برای اولین بار تاثیر عصاره هیدروالکلی گل این گیاه بر روی تکثیر سلول‌های بنیادی عصبی و بیان ژن Sox2 مورد بررسی قرار گرفته است.

مواد و روش‌ها

تهیه عصاره هیدروالکلی گل گیاه گل قاصدک: عصاره *Cirsium vulgare* به‌روش سوکسله تهیه و اثر غلظت‌های مختلف آن بر روی رشد و تکثیر سلولی بنیادی عصبی (NSCs) مورد بررسی قرار گرفت. برای این منظور گیاه مورد نظر از اطراف شهر اردبیل در خرداد ماه جمع‌آوری و در سایه و جریان هوا خشک و توسط آسیاب پودر شدند. از پودر تهیه شده برای عصاره‌گیری به‌روش سوکسله استفاده شد. بدین‌صورت که ۱۰۰ گرم از پودر آماده در کارتوش‌هایی که از کاغذ صافی معمولی با اندازه مناسب تهیه شده بود ریخته شد. سپس کارتوش‌ها را درون دستگاه سوکسله قرار داده و تقریباً به‌میزان ۳۰۰ میلی‌لیتر مخلوط متانول و آب مقطر به‌عنوان حلال به آن اضافه گردید. عصاره‌گیری به‌مدت ۱۲ ساعت ادامه یافت. عصاره به‌دست آمده به ظرف‌های شیشه‌ای منتقل شده و به‌مدت ۲۴ ساعت بدون درپوش در آن ۵۰ درجه نگهداری شد تا حلال باقی مانده تا حد امکان تبخیر شود. سپس عصاره تهیه شده برای آزمایش‌های بعدی در یخچال نگهداری شد.

جداسازی سلول‌های بنیادی عصبی: برای جداسازی سلول‌های بنیادی عصبی از نوزاد موش صحرایی نژاد Sprague استفاده گردید. مراقبت و نگهداری از موش‌ها مطابق با آیین نامه مصوب کار با حیوانات آزمایشگاهی تصویب شده در دانشگاه تربیت مدرس تهران انجام گردید. بعد از بی‌هوشی کامل، بخش هیپوکامپ از دو نیمکره مغز جدا شده و پس از له کردن مکانیکی به‌میزان دو برابر بافت از آنزیم‌های Accutase و کلاژناز برای مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به‌منظور هضم آنزیمی استفاده گردید. در مرحله بعدی به‌منظور خنثی کردن آنزیم‌ها از سرم FBS (Fetal bovine serum) استفاده شد. سپس سوسپانسیون حاصله از فیلتر مش ناپلونی ۷۰ میکرومتری (Falcon 352350) عبور داده شد و به‌مدت ۱۰ دقیقه در ۳۰۰۰ دور سانتی‌فوژ گردید. رسوب سلولی به‌دست آمده با محیط کشت DMEM/F12 حاوی فاکتورهای رشد Epidermal, BFGF human recombinant (Millipore), GrowthFactor (sigma), B-27 supplement (GIBCO)، پنی‌سیلین-استرپتومایسین (سیگما) یک درصد به‌همراه ۳ درصد سرم FBS در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و ۵ درصد CO₂ کشت داده شد. محیط کشت سلول‌ها پس از ۲۴ ساعت تعویض شد و سلول‌های بنیادی عصبی که به کف فلاسک

هر میلی لیتر که به صورت تازه تهیه شده بود تعویض شد. بعد از ۴ ساعت انکوباسیون در ۳۷ درجه سانتی گراد محلول روی سلول‌ها به آهستگی حذف شد و کریستال‌های فورمازون ایجاد شده در اثر واکنش با MTT در ۱۰۰ میکرولیتر DMSO حل شد. پس از چند دقیقه انکوباسیون در دمای اتاق و حل شدن کامل کریستال‌ها، جذب در ۵۷۰ نانومتر توسط دستگاه الیزا (BioTek) محاسبه شد.

Real-time PCR برای بررسی مقایسه‌ای بیان ژن Sox2 و ژن 2M- به عنوان کنترل داخلی در گروه کنترل و سلول‌های تیمار شده با ۸۰۰ میکرو گرم بر میلی لیتر عصاره گل قاصدک از تکنیک Real-time PCR استفاده شد. برای این منظور سلول‌ها در پاساژ سوم برای آزمون انتخاب شدند. در این تکنیک استخراج RNA کل از سلول‌ها با استفاده از کیت Pure link RNA (Invitrogen) mini kit و دستورات شرکت سازنده انجام گرفت و با استفاده از آنزیم کپی برداری معکوس به cDNA تبدیل شد. در مطالعه حاضر، جهت ساخت cDNA از پرایمر oligo dT موجود در کیت Revert aid H Minus-First Strand cDNA Synthesis, K1632 مربوط به شرکت Fermentas استفاده شده است و مطابق با دستور شرکت سازنده mRNA به cDNA تبدیل شد. ۵۰۰ نانوگرم cDNA برای تعیین کمیت بیان mRNA ژن Sox2 استفاده شد. تمامی پرایمرها در جدول شماره یک طبقه بندی شده‌اند. واکنش‌های PCR در حجم ۲۵ میکرولیتر (Sybergreen) و در ۴۰ چرخه توسط دستگاه (Applied Biosystem cycler) انجام گردید. آنالیز نسبی در سطح mRNA با روش Pfaffl1 و با استفاده از فرمول ((CT نمونه هدف) - (CT کالیبره کننده)) = CT انجام شد. عبارت است از CT ژن هدف (یا کالیبراتور) که از CT ژن خانه‌زاد کسر شده است. این عدد بازگو می‌کند که تیمار ما موجب افزایش چند برابری ساخت mRNA هدف شده است (۱۰).

چسبیده بودند پس از رسیدن به تراکم ۷۰ تا ۸۰ درصد با استفاده از تریپسین از کف فلاسک جدا و با نسبت ۱ به ۲ پاساژ داده شدند. در این مطالعه از سلول‌های پاساژ سوم استفاده گردید. جهت تایید هویت سلول‌های بنیادی عصبی از آنتی‌بادی نستین و روش ایمونوسیتوشیمی استفاده شد. به این ترتیب که سلول‌ها توسط پارافرمالدهید ۴ درصد در دمای اتاق و برای نیم‌ساعت فیکس شدند و پس از فیکساسیون و شستشو توسط PBS (Phosphate buffered saline) با triton-۱۰۰/۳۱۰۰X/PBS ۰٫۳ درصد نفوذ پذیر شدند و سپس برای مدت یک ساعت با ۱۰ سرم ضد بز در PBS انکوبه می‌گردند. پس از شستشو، سلول‌ها توسط آنتی‌بادی اولیه برای مدت ۱۲ ساعت در یخچال با دمای ۴ درجه سانتی گراد قرار داده شد. پس از شستشوی کامل توسط PBS با آنتی‌بادی ثانویه کونژوگه به FITC (Isothiocyanate Fluorescein) انکوبه و پس از ۲ ساعت سلول‌ها با PBS شسته شده و توسط میکروسکوپ فلورسانس اینورت مشاهده شدند. هسته‌ها نیز مانند قبل با اتیدیوم بروماید رنگ آمیزی شدند.

تیمار سلول‌های بنیادی عصبی با عصاره Cirsium vulgare: سلول‌های بنیادی عصبی ایزوله شده از هیپوکمپ نوزاد موش صحرایی در یک گروه کنترل و پنج گروه تیمار شده با عصاره مورد نظر در پلیت های ۹۶ خانه با غلظت‌های ۲۰۰، ۴۰۰، ۶۰۰، ۸۰۰ و ۱۰۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر به مدت ۴۸ ساعت تیمار و مورد مطالعه قرار گرفتند. تیمار سلول‌ها در محیط کشت سلول‌های بنیادی عصبی و فاقد سرم انجام شد. به منظور بررسی‌های آماری دقیق ۵ تکرار در نظر گرفته شد.

آزمون MTT برای ارزیابی میزان تکثیر از روش (4,5-3) Dimethylthiazol-2-YI)-2,5-Diphenyltetrazolium (MTT Bromide) استفاده گردید. پس از ۴۸ ساعت تیمار با عصاره هیدروالکلی گل گیاه قاصدک محیط کشت سلول‌ها با ۲۰ میکرولیتر محلول MTT (سیگما) با غلظت ۵ میلی گرم به ازای

جدول ۱: توالی پرایمرهای مورد استفاده در Real-time PCR

Gene	Accession no.	Sense 5 3	Anti-sense 5 3	Size (bp)
Sox2	NM_001109181	TGCCTCTTTAAGACTAGGGCTG	CTGGCGGAGAATAGTTGGGG	۱۹۷
B2M	NM_012512	CCCAACTTCCTCAACTGCTACG	TTACATGTCTCGGTCCAGGTG	۲۴۳

آنالیز آماری:

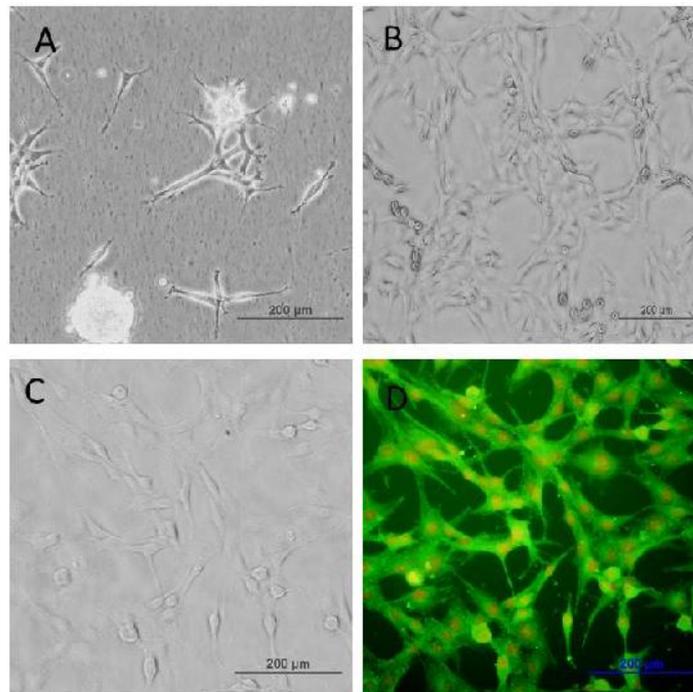
آنالیز آماری با استفاده از نرم افزار *SPSS 15.0* انجام گردید و تمامی داده‌ها به صورت $\text{Mean} \pm \text{SEM}$ ارائه شد. مقایسه آماری بین گروه‌ها با استفاده از *Tukey's post hoc test* انجام شد و $P < 0.05$ معنی‌دار در نظر گرفته شد.

نتایج

نتایج حاصل از کشت سلول‌های بنیادی عصبی

سلول‌ها وقتی در محیط مناسب کشت سلول بنیادی عصبی قرار گرفتند زوائد و استتاله‌هایی در سلول ایجاد گردید که گاهی چند برابر جسم سلولی مشاهده شد و با سلول‌های جانبی ارتباط برقرار نمود هسته‌ها کشیده‌تر به نظر می‌رسید و سلول‌ها دوکی‌تر شده و در حالی که مرز بین سلول‌ها منظم‌تر و مشخص‌تر دیده شد. در روز اول ابتدا این سلول‌ها به صورت کلونی بودند که به

کف پلیت چسبیده‌اند در روز دوم و سوم به مرور از حجم کلونی کاسته شد و سلول‌ها کم کم پخش شدند و این در حالی بود که همچنان سلول‌ها قدرت تقسیم داشتند به این ترتیب تا حدودی ظاهر سلول‌ها ویژگی‌های یک سلول شبه عصبی را به دست آوردند که قدرت تقسیم داشتند. سلول‌های بنیادی عصبی بعد از ۷ روز کاملاً فلاسک را پر کردند و نمای کشیده و دوکی شکل با زوائد سیتوپلاسمی به خود گرفتند (شکل ۱ A و B). این سلول‌ها قدرت تکثیر داشتند که برای اثبات عصبی بودن سلول‌های NSCs و تعیین خلوص آن‌ها در پاساژ سوم از آنتی‌بادی Nestin استفاده گردید. در سلول‌هایی که پروتئین مربوطه وجود داشت به دلیل استفاده از آنتی‌بادی ثانویه کنژوکه به FITC سیتوپلاسمشان سبز رنگ دیده شد. برای تعیین درصد سلول‌های مثبت، هسته سلول‌ها توسط اتیدیوم بروماید قرمز رنگ شدند (شکل ۱ C و D). میانگین درصد سلول‌های مثبت برای پروتئین نستین $95/12 \pm 0/46$ ارزیابی شد.

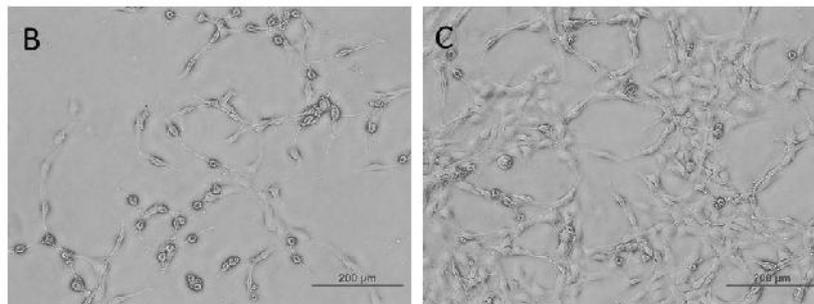
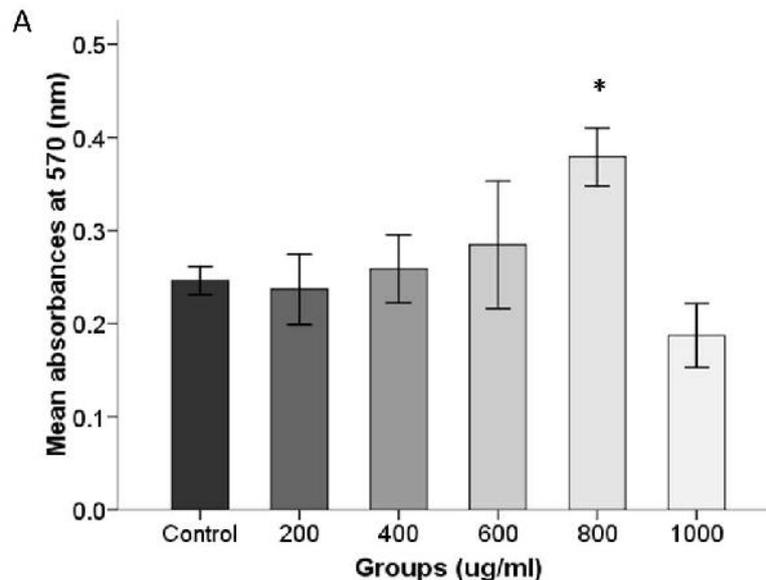


شکل ۱: سلول‌های بنیادی عصبی. (A) سلول‌های بنیادی عصبی را پس از یک روز نشان می‌دهد که به صورت کلونی‌های چسبیده به کف پلیت دیده می‌شود. (B) سلول‌های بنیادی عصبی را پس از یک هفته روز نشان می‌دهد. این سلول‌ها کف فلاسک را پر کرده و حالت کشیده و دوکی شکل می‌باشند. (C و D) ایمونوسیتوشیمی از سلول‌های بنیادی عصبی به ترتیب فاز کنتراست و فلورسنت. رنگ سبز نشان‌دهنده آنتی‌بادی نستین و رنگ قرمز اتیدیوم بروماید می‌باشد. بزرگنمایی $\times 200$.

نتایج MTT

مورفولوژی سلول‌های بنیادی عصبی پس از تیمار با عصاره گیاهی تغییری نداشت. نتایج تست MTT نشان‌دهنده افزایش تکثیر سلول‌های بنیادی عصبی در گروه تیمار شده نسبت به گروه کنترل بود (شکل ۲). سلول‌های تیمار شده با غلظت ۸۰۰ میکروگرم (۰/۳۷±۰/۰۱) بالاترین میانگین رشد را نشان داد که نسبت به گروه کنترل (۰/۲۴±۰/۰۷) اختلاف معنی‌داری را نشان

می‌دهد ($P < 0/05$). نتایج به‌دست آمده نشان می‌دهد که افزایش سرعت تکثیر در سلول‌های بنیادی عصبی به غلظت عصاره موجود در محیط کشت دارد. غلظت‌های بالای ۸۰۰ میکروگرم برای سلول‌ها توکسیک محسوب می‌شوند و کاهش تعداد سلول به دلیل مرگ سلول‌ها می‌باشد.

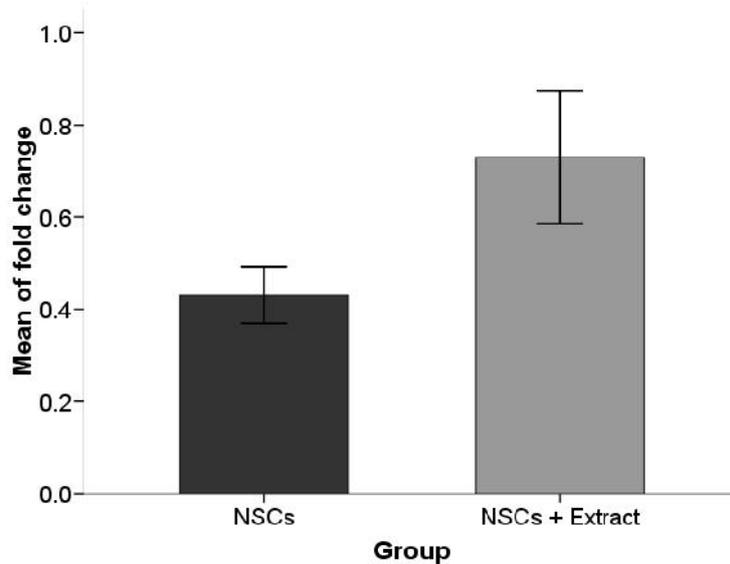


شکل ۲: A) نمودار مقایسه آماری سلول‌های بنیادی عصبی در غلظت‌های مختلف با روش MTT: A) نمودار نشان‌دهنده وجود اختلاف معنی‌دار میان گروه کنترل و سلول‌های بنیادی عصبی تیمار شده با غلظت ۸۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر می‌باشد. B و C) میکروگراف‌های سلول‌های بنیادی عصبی قبل و بعد از تیمار با غلظت ۸۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر عصاره گل قاصدک. خطای معیار (SEM)، نشان‌دهنده وجود اختلاف معنی‌دار با گروه کنترل ($P < 0/05$). بزرگنمایی $\times 200$.

نتایج حاصل از Real-time PCR

بیان کمی mRNA ژن مربوط به رشد و تکثیر سلول‌های بنیادی عصبی که با غلظت ۸۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر و زمان ۴۸ ساعت تیمار شده بودند با روش Quantitative real-time RT-PCR بررسی شد. الگوی بیان کمی ژن Sox2 در شکل ۳ نشان داده شده است. در این مطالعه با استفاده از روش آستانه نسبی

(مقایسه نسبی) مقدار داده‌های توسط ژن B2M نرمالایز شد و با استفاده از فرمول 2^{-CT} (طبق مقاله Pfaffle و همکارانش) افزایش ساخت mRNA محاسبه شد. نتایج نشان داد که میزان کمی mRNA مربوط به این ژن در سلول‌های تیمار شده با عصاره گل قاصدک (۰/۷۳±۰/۰۷) نسبت به نمونه کنترل یا تیمار نشده (۰/۴۳±۰/۰۳) افزایش داشت (شکل ۳).



شکل ۳: نمودار مقایسه نسبی بیان ژن *Sox2* نرمالایز شده با ژن *B2M* در سلول‌های بنیادی عصبی با بهترین غلظت عصاره گل قاصدک (۸۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر) برای مدت ۴۸ ساعت.

بحث

رابطه با گیاهان متعلق به رده *Cirsium* مربوط به گیاه *Cirsium japonicum* می‌باشد. این گیاه به‌عنوان داروی ضد دیابت (۱۷)، ضد اضطراب (۱۸) آنتی‌اکسیدانت و ضدسرطان (۱۹) معرفی شده است. همچنین گزارش شده است که استفاده از عصاره این گیاه جذب گلوکز را در سلول‌های بدن افزایش می‌دهد (۲۰). مطالعه‌ای دیگر نشان دهنده تاثیر عصاره متانولی گیاه بر روی مهار رشد و القا آپوپتوزیس در سلول‌های سرطانی پستان می‌باشد (۲۱). همچنین مطالعات نشان می‌دهد که عصاره متانولی این گیاه تاثیر قابل توجهی بر روی چرخه دو رده سلولی *K562* و سلول‌های *Jurkat* ندارد (۲۲). با توجه به بررسی‌های انجام شده، این تحقیق اولین مطالعه بر روی تاثیر عصاره گل قاصدک در تکثیر سلول‌های بنیادی عصبی می‌باشد. نتایج به‌دست آمده نشان می‌دهد که تیمار سلول‌های بنیادی عصبی با غلظت ۸۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر باعث افزایش معنی‌دار در رشد و تکثیر این سلول‌ها می‌شود. مطالعات انجام شده توسط محققین نشان داده است که عصاره گل قاصدک دارای خاصیت ضدالتهابی می‌باشد (۳ و ۱۶). بنابراین با توجه به نتایج به‌دست آمده از این تحقیق و با در نظر گرفتن خاصیت ضدالتهابی می‌توان به تاثیرات مثبت استفاده از این گیاه در درمان بیماری‌های مخرب سیستم عصبی از قبیل آسیب‌های نخاعی به‌ویژه در فاز اولیه امیدوار بود.

نتایج حاصل از این مطالعه نشان‌دهنده تاثیر افزایش دهنده عصاره هیدروالکلی گل قاصدک در روند تکثیر سلول‌های بنیادی عصبی می‌باشد. همچنین افزایش بیان ژن *Sox2* در سلول‌های بنیادی عصبی تاییدی بر نتایج *MTT* می‌باشد. استراتژی سلول درمانی در بیماری‌های مخرب سیستم عصبی توسط لیندوال و همکارانش (۱۱) مطرح شد. هم‌اکنون سلول‌های بنیادی (سوماتیک) به‌عنوان منبع قابل دسترس و مناسب برای سلول درمانی محسوب می‌شوند. این سلول‌ها در بیشتر بافت‌های در بالغین حضور دارند (۱۲). هرمن و همکارانش (۲) به‌منظور تایید هویت سلول‌های بنیادی عصبی ایجاد شده نشان دادند که سلول‌های بنیادی عصبی می‌توانند نسبت به نشانگر عصبی نستین واکنش مثبت نشان دهند. نتایج به‌دست آمده در این مطالعه که بر روی سلول‌های بنیادی عصبی مشتق از هیپوکمپ مغز نوزاد موش صحرایی انجام شد تاییدی بر کار هرمن و همکارانش (۲) بود. سلول‌های بنیادی عصبی دارای ظرفیت خود تکثیری و تمایز به سلول‌های عصبی، آستروسیت و الیگودندروسیت هستند (۱۳ و ۱۴ و ۱۵). در حال حاضر استفاده از عصاره‌های گیاهی در درمان بسیاری از بیماری‌ها گسترش یافته است. در طب سنتی از عصاره گیاه گل قاصدک به‌منظور ضدتهوع، ضد درد و ضدالتهاب استفاده می‌شود (۱۶). با این حال در رابطه با اثر این گیاه روی سلول‌های بنیادی هیچ‌گونه مطالعه‌ای صورت نگرفته است. بیشتر بررسی‌های انجام شده در

نتیجه گیری

Extracts from Leaves of *Cirsium japonicum*. J. Appl. Biol. Chem. 2008; 51(4), 160-164.

10. Yin J, Heo SI, Wang MH. Antioxidant and antidiabetic activities of extracts from *Cirsium japonicum* roots. Nutr Res Pract. 2008; 2(4): 247-51.

11. Lindvall O, Björklund A. Cell replacement therapy: helping the brain to repair itself. NeuroRx. 2004; 1(4): 379-81.

12. Dazzi F, Ramasamy R, Glennie S, Jones SP, et al. The role of mesenchymal stem cells in haemopoiesis. Blood Rev. 2006; 20(3): 161-171.

13. Li L, Xie T. Stem cell niche: structure and function. Annu Rev Cell Dev Biol. 2005; 21: 605-31.

14. Bai L, Caplan A, Lennon D, Miller RH. Human mesenchymal stem cells signals regulate neural stem cell fate. Neurochem Res. 2007; 32(2): 353-62.

15. Cao Q, Benton RL, Whittemore SR. Stem cell repair of central nervous system injury. J Neurosci Res. 2002; 68: 501-510.

16. Alvarez-Buylla A, Lim DA. For the long run: maintaining germinal niches in the adult brain. Neuron. 2004; 4; 41(5): 683-6.

17. Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, et al. Global cancer statistics. CA Cancer J Clin. 2011; 61(2): 69-90.

18. Felling RJ, Snyder MJ, Romanko MJ, Rothstein RP, et al. Neural stem/progenitor cells participate heregenerative response to perinatal hypoxia/ischemia. J. Neurosci. 2006; 26: 4359-4369.

19. Daadi MM, Hu S, Klausner J, Li Z, et al. Imaging neural stem cell graft-induced structural repair in stroke. Cell Transplant. 2013; 41: 516-526.

20. Sommer L, Rao M. Neural stem cells and regulation of cell number. Prog. Neurobiol. 2002; 66(1): 1-18.

21. Kim DY, Kang SH, Ghil SH. *Cirsium japonicum* extract induces apoptosis and anti-proliferation in the human breast cancer cell line MCF-7. Mol Med Rep. 2010; 3(3): 427-32.

22. Amirghofran Z, Bahmani M, Azadmehr A, Javidnia K. Anticancer effects of various Iranian native medicinal plants on human tumor cell lines. Neoplasma. 2006; 53(5): 428-433.

با توجه به نتایج به دست آمده عصاره گیاه *Cirsium vulgare* می تواند ماده موثری برای افزایش تکثیر سلول های بنیادی عصبی در محیط *In vitro* باشد.

تشکر و قدردانی

این تحقیق در آزمایشگاه سلول های بنیادی دانشگاه آزاد اسلامی واحد اردبیل انجام شده است. لذا لازم می دانیم از حمایت های بی دریغ جناب آقای دکتر سید سعید هاشمین (معاون پژوهشی دانشگاه آزاد اسلامی واحد اردبیل) نهایت تقدیر و سپاس را داشته باشیم.

منابع

1. Bonilla S, Silva A, Valdes L, Geijo E, et al. Functional neural stem cells derived from adult bone marrow. Neuroscience. 2005; 133(1): 85-95.
2. Hermann A, Gastl R, Liebau S, Popa MO, et al. Efficient generation of neural stem cell-like cells from adult human bone marrow stromal cells. J Cell Sci. 2004; 117(19): 4411-22.
3. Tamm C, Duckworth J, Hermanson O, Ceccatelli S. High susceptibility of neural stem cells to methylmercury toxicity: effects on cell survival and neuronal differentiation. J Neurochem. 2006; 97:69-78.
4. Serakinci N, Keith WN. Therapeutic potential of adult stem cells. Eur J Cancer. 2006; 42(9):1243-6.
5. Gregg CT, Shingo T, Weiss S. Neural stem cells of the mammalian forebrain. Symp Soc Exp Biol. 2001; (53):1-19.
6. Episkopou V. SOX2 functions in adult neural stem cells. Trends Neurosci. 2005; 28(5): 219-21.
7. Nazaruk J. Antioxidant activity and total phenolic content in *Cirsium* five species from north-east region of Poland. Fitoterapia. 2008; 79(3): 194-6.
8. Nazaruk J, Czechowska SK, Markiewicz R, Borawska MH. Polyphenolic compounds and in vitro anti-microbial and antioxidant activity of aqueous extracts from leaves of some *Cirsium* species. Nat Prod Res. 2008; 22(18):1583-8.
9. Yu Yin, Seong-II H, Myeong-HW. Antioxidant and Anticancer Activities of Methanol and Water

Investigating the effect of *Cirsium vulgare* hydroethanolic extract on neural stem cells proliferation

Abdanipour AR, Ph.D.^{1*}, Khatami SM, M.Sc.², Sagha M, Ph.D.³, Salimi Nanekaran F, Ph.D.¹, Naghizadeh D, MSc.¹, Bonabi R, MSc.¹

1. Department of Medical Science, Stem Cells Research Laboratory, Ardabil Branch, Islamic Azad University, Ardabil, Iran.

2. Young Researchers and Elite Club, Ardabil Branch, Islamic Azad University, Ardabil, Iran

3. Department. of Medical Science, Stem Cells and Embryology Research Laboratory, Anatomical Group, Ardabil University, Ardabil, Iran.

* Email corresponding author: abdani.anatomy@yahoo.com

Received: 19 Nov. 2013

Accepted: 14 Jan. 2015

Abstract

Aim: In vitro investigation of hydroethanolic extraction of *Cirsium vulgare* on growth rates of neonate rat neural stem cells.

Material and Methods: Neural stem cells were isolated from hippocampus of neonatal rat brain. To determine optimal concentration of *Cirsium vulgare* extraction, isolated neural stem cells were treated with 200, 400, 600, 800 and 1000 µg/ml for 48 h and then cells proliferation rate were evaluated by MTT assay. In addition Sox2 mRNA expression in neural stem cells was evaluated using quantitative real-time PCR.

Results: The results of this study showed that the *Cirsium vulgare* extract caused significant increase in cell proliferative activity and Sox2 mRNA expression when compared with the control group.

Conclusion: with respect to the effect of *Cirsium vulgare* extract on the proliferation rate of neural stem cells, the use of hydroethanolic extraction of *Cirsium vulgare* can be used for clinical purposes to treat some of the neurodegenerative disorders such as ischemic stroke and spinal cord injury.

Key words: Cell proliferation, *Cirsium vulgare*, Neural stem cells