

## بررسی اثرات Resveratrol بر تکثیر و شکل گیری کلنی سلول‌های بنیادی جنینی انسانی

### منفرد شده

زهرا صفایی نژاد، Ph.D. Candidate<sup>۱</sup>، محمد نبیونی، Ph.D.<sup>۲\*</sup>، مریم پیمانی، Ph.D.<sup>۳</sup>، کامران قائدی، Ph.D.<sup>۴\*</sup>، محمد

حسین نصر اصفهانی، Ph.D.\*

- ۱- دانشگاه خوارزمی، دانشکده‌ی علوم زیستی، گروه علوم جانوری، تهران، ایران
- ۲- دانشگاه خوارزمی، دانشکده‌ی علوم زیستی، گروه سلولی و مولکولی، تهران، ایران
- ۳- دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد، دانشکده‌ی علوم پایه، گروه زیست شناسی، شهرکرد، ایران
- ۴- دانشگاه اصفهان، دانشکده‌ی علوم، گروه زیست شناسی، اصفهان، ایران
- ۵- پژوهشگاه روبان، پژوهشکده‌ی زیست فناوری جهاد دانشگاهی، مرکز تحقیقات علوم سلولی، گروه بیوتکنولوژی سلولی، اصفهان، ایران

\* پست الکترونیک نویسنده مسئول: kamranghaedi@royaninstitute.org و mh\_nasr@royaninstitute.org

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۸/۲۳

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۶/۷

### چکیده

**هدف:** هدف از این مطالعه بررسی اثر Resveratrol (RSV) به‌عنوان یک پلی‌فنول طبیعی دارای اثرات بیولوژیکی مختلف، بر تکثیر و توانایی تشکیل کلنی سلول‌های بنیادی جنینی انسانی (hESCs) منفرد شده می‌باشد.

**مواد و روش‌ها:** در مطالعه‌ی حاضر از رده‌ی hESCs به‌نام RH6 استفاده شد. سلول‌ها بر ماتریژل و در محیط غنی شده‌ی اختصاصی hESCs کشت شدند. میزان تکثیر سلولی با استفاده از روش شمارش سلولی و تکنیک الحاقی BrdU سنجیده شد. میزان بیان عوامل دخیل در تشکیل کلنی (E-cadherin و  $\beta$ -catenin) با استفاده از وسترن بلات مورد ارزیابی قرار گرفت و مکان قرارگیری  $\beta$ -catenin نیز با رنگ آمیزی ایمنوسیتوشیمی بررسی شد.

**نتایج:** نتایج نشان دادند که RSV بدون تاثیر بر توانایی تشکیل کلنی موجب پیشبرد تکثیر hESCs منفرد شده می‌شود.

**نتیجه‌گیری:** با توجه به افزایش میزان تکثیر hESCs در حضور RSV می‌توان این ترکیب را به‌عنوان مکمل جدیدی برای محیط کشت hESCs معرفی نمود.

**واژگان کلیدی:** سلول‌های بنیادی جنینی انسانی، تشکیل کلنی، تکثیر، Resveratrol

## مقدمه

سلول‌های بنیادی جنینی (ESCs) سلول‌های پرتوانی هستند که از توده سلولی داخلی (ICM) بلاستوسیت منشا می‌گیرند. این سلول‌ها با دو ویژگی اصلی یعنی خود نوزایی و پرتوانی توصیف می‌شوند (۱، ۲ و ۳). سلول‌های بنیادی جنینی انسانی (hESCs) بر خلاف همتای موشی خود (mESCs) در حالت منفرد قابلیت زیست ندارند و پس از منفرد شدن متحمل مرگ برنامه ریزی شده می‌شوند (۴). در نتیجه این امر، hESCs بایستی جهت تکثیر و حتی تمایز به صورت کلنی و متصل به هم کشت داده شوند (۵). در سال ۲۰۰۷ مولکول کوچکی به نام Y-27632 به عنوان مهار کننده آپوپتوزیس hESCs معرفی شد (۴). این مولکول کوچک مهار کننده پروتئین کیناز وابسته به Rho (Rock) است. در سال ۲۰۱۰ مشخص شد که از دست رفتن مولکول‌های چسبنده سطحی E-cadherin در hESCs منفرد شده علت اصلی وقوع مرگ در این سلول‌ها است. از دست رفتن این مولکول موجبات تشکیل فرم فعال مولکول Rho را فراهم می‌آورد (Rho-GTP) فعال شده نیز فعال شدن Rock را میانجی‌گری می‌کند. نتیجه فعال شدن این آبشار، فسفریلاسیون بیش از حد اجزای اسکلت داخل سلولی نظیر میوزین‌ها، انقباض بواسطه اکتین-میوزین و در نهایت blebbing غشایی و وقوع مرگ سلولی است (۵). با توجه به اهمیت hESCs جهت فهم مراحل اولیه رشد و نمو جنین انسان و همچنین کاربرد داشتن در زمینه‌ی سلول درمانی، امروزه تلاش‌ها جهت افزایش میزان خود نوزایی و پرتوانی (۹-۶) و همچنین بهبود شرایط کشت این سلول‌ها در حالت منفرد (۱۰ و ۱۱) هم‌چنان ادامه دارد. Resveratrol (RSV) یا trans-3,5,4'-trihydroxystibene یک فیتوالکسین طبیعی با خاصیت ضدقارچی و ساختار پلی‌فنولی است که از منابع گیاهی از جمله پوست انگور قرمز مختلف استخراج می‌شود (۱۲). در سال ۲۰۰۳، RSV به عنوان فعال کننده

1) SIRT1 (silent information regulator) معرفی شد (۱۳). در سال‌های اخیر مطالعات زیادی به بررسی نقش RSV و SIRT1 در سلول‌های بنیادی پرداخته‌اند (۱۹-۱۴). به علاوه پاره‌ای از مطالعات نیز نقش SIRT1 را در فرآیندهای مختلفی که مولکول E-cadherin در آن‌ها دخیل است را آشکار می‌سازند. به طور مثال در سلول‌های سرطان سینه با ویژگی‌های مزانشیمی مانند رده سلولی MDA-MB-231 و هم‌چنین در رده سلول‌های سرطان گاستریک نشان داده شده است که miRNAs ویژه‌ای از طریق کاهش بیان SIRT1 موجب افزایش بیان E-cadherin و کاهش فرآیند گذر از اپی تلیوم به مزانشیم (EMT) می‌شود (۲۰ و ۲۱). بر مبنای مطالعه‌ی سیمیک و همکاران SIRT1 در سرطان سینه و فیبروز کلیوی با لوکالیزه نمودن E-cadherin در غشای سلولی موجب کاهش EMT می‌شود (۲۲). در مطالعه دیگری نیز که در سال ۲۰۱۲ انجام شد، اثبات شد که هم افزایش بیان SIRT1 و هم استفاده از RSV به عنوان فعال کننده این داستیلاز موجب افزایش بیان E-cadherin می‌شود. در این مطالعه که محققین مراحل اولیه پذیرش اندومتری جنین را در *in vitro* شبیه سازی کرده‌اند به علاوه اثبات شد که RSV علاوه بر این که می‌تواند از طریق SIRT1 موجب افزایش بیان E-cadherin شود قادر است بر قرارگیری E-cadherin در غشای سلولی نیز مؤثر باشد (۲۳). بر مبنای این یافته‌ها و با در نظر گرفتن این نکته که تاکنون گزارشی در مورد تاثیر RSV بر hESCs صورت نگرفته است. هدف از مطالعه‌ی حاضر بررسی اثر RSV بر تکثیر و توان شکل‌گیری کلنی hESCs منفرد شده می‌باشد.

## مواد و روش‌ها

**کشت سلول:** در این بررسی از رده‌ی سلول‌های بنیادی جنینی انسانی با نام RH6 استفاده شد (۲۴). این سلول‌ها در ظروف کوت شده با ماتریزل (Sigma-ECM)

توسط خطوط سه تایی احاطه شده اند با بزرگنمایی  $\times 200$  شمارش شدند، پس از شمارش، میانگین سلول-های شمارش شده در چهار میدان دید محاسبه شد.

**تست الحاق BrdU** تاثیر RSV بر میزان تکثیر hESCs با استفاده از تست الحاق BrdU سنجیده شد. جهت انجام این بررسی پس از اتمام زمان تیمار (۷۲ ساعت) سلول‌ها با نشان‌گر هسته‌ای BrdU (Sigma-Aldrich) با غلظت نهایی ۱۰ میکرولیتر به مدت ۱ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. در ادامه پس از حذف محیط رویی و آنزیمه کردن، سلول‌ها سانتریفیوژ و سپس با پارافرمالدهید ۴ درصد (Sigma-Aldrich) به مدت ۲۰ دقیقه در دمای اتاق فیکس شدند. پس از سانتریفیوژ و شست و شو با PBS، سلول‌ها با تریتون ۰/۲ درصد (Sigma-Aldrich) به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق نفوذپذیر شدند. بعد از سانتریفیوژ و شست و شو، نمونه‌ها به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد با اسید هیدروکلریک ۲ نرمال انکوبه شدند و سپس بورات سدیم (Merck) ۰/۱ مولار با  $\text{pH}=8/5$  به مدت ۵ دقیقه به نمونه‌ها اضافه شد. پس از سانتریفیوژ و شست و شو، سلول‌ها با محلول PBS/BSA به مدت ۱ ساعت بلوک شدند و سپس به مدت یک شب با آنتی بادی مونوکلونال anti-BrdU (Sigma-Aldrich, B2531) و دو ساعت با آنتی بادی ثانویه کوئزوگه با (FITC) Millipore, AP (124F) انکوبه شدند. در پایان با اضافه نمودن ۵۰۰ میکرولیتر PBS-، نمونه‌ها جهت بررسی به دستگاه فلوسیتومتری منتقل شدند.

**ایمونوسیتوشیمی:** در ارزیابی اثر RSV بر تشکیل کلنی سلول‌های بنیادی منفرد شده، جایگاه قرارگیری  $\beta$ -catenin به عنوان مارکر تشکیل اسکلت سلولی با تکنیک رنگ آمیزی بررسی شد. به این ترتیب که ابتدا محیط کشت رویی سلول‌ها که در هر یک از چاهک-های Chamber slides کشت داده شده بودند خارج و

(Knock-out Serum و DMEM/F12 حاوی Aldrich)  $0/1 \text{ mM Non-Essential Amino Acids}$ ،  $0/1 \text{ Insulin-transferrin-selenite}$ ،  $100 \text{ ng/ml Penicillin/streptomycin}$  و  $100 \text{ ng/ml bFGF}$  (جهت جلوگیری از تمایز) کشت داده شدند. (تمامی اجزای محیط کشت از شرکت Gibco خریداری شد). محیط سلول‌ها روزانه تعویض شده و سلول‌ها در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و رطوبت ۹۵ درصد و  $5\% \text{ CO}_2$  درصد نگه‌داری شدند. hESCs را می‌توان به دو صورت کلنی یا منفرد کشت داد. با توجه به این که یکی از اهداف این پژوهش بررسی نقش RSV در بهینه سازی شرایط زیست hESCs بود که تحت استرس منفرد شدن قرار گرفته‌اند hESCs در تمامی مراحل به صورت منفرد کشت داده شدند و در زمان پاساژ از مهار کننده‌ی (Y-27632) ROCK استفاده شد.

**شمارش سلولی:** به منظور ارزیابی تاثیر RSV (Sigma-Aldrich-R5010) بر تعداد hESCs تست شمارش سلولی با استفاده از رنگ تریپان بلو انجام گرفت. بدین منظور  $10^5 \times 2$  از سلول‌های RH6 در هر یک از چاهک‌های پلیت ۶ خانه‌ای کشت شدند پس از گذشت یک شب، سلول‌ها به مدت ۷۲ ساعت با غلظت‌های مختلف RSV (۱، ۱۰، ۲۵، ۵۰،  $100 \mu\text{M}$ ) و یا با دی متیل سولفوکساید (DMSO) (Sigma-Aldrich) به عنوان حلال RSV تیمار شدند. جهت شمارش سلولی سلول‌های آنزیمه شده سانتریفیوژ شدند. پس از دور ریختن محیط رویی و تهیه سوسپانسیون سلولی با ۱ میلی لیتر محیط کشت تازه، ۱۰ میکرولیتر از محلول حاوی سلول به یک میکروتیوب ۵۰۰ میکرولیتری منتقل شد و ۱۰ میکرولیتر تریپان بلو ۴ درصد به آن اضافه شد. سپس ۱۲ میکرولیتر از محلول فوق به زیر لامل قرار گرفته بر روی لام هموسایتومتر (نتوبار) تزریق شد. به منظور شمارش سلولی، سلول‌های زنده که در چهار مربع بزرگ اطراف لام که هر کدام از ۱۶ مربع کوچکتر تشکیل شده‌اند و از هر طرف

ویال‌ها اضافه و نمونه‌ها به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند و سپس به مدت ۱۵ دقیقه در دور ۱۶۰۰۰g در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شدند. در نهایت پس از دور ریختن فاز رویی، مقدار ۳۰ تا ۱۰۰ میکرولیتر بافر لیز کننده به هر یک از نمونه‌ها افزوده شد. در نهایت نیز غلظت پروتئین‌ها با استفاده از روش بردفورد محاسبه شد.

**الکتروفورز به روش SDS-PAGE**: در این تکنیک ژل مورد استفاده دارای دو بخش به نام‌های ژل بالایی (Stacking gel) و ژل پایینی (Running gel) یا (Resolving gel) است. این دو ژل در میزان خلل و فرج و pH با هم تفاوت دارند. مواد تشکیل دهنده‌ی این دو ژل شامل محلول آکریل آمید-بیس آکریل آمید، SDS، باز تریس، آمونیوم پرسولفات و TEMED می‌باشد. پس از آماده سازی ژل دو بخشی و قرار دادن آن در تانک حاوی بافر الکتروفورز ۳۰ میکروگرم از نمونه‌ی پروتئینی با حجم مناسبی از بافر بارگذاری مخلوط شده و پس از ۴ دقیقه حرارت دادن در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد در هر یک از چاهک‌های ژل بارگذاری شدند (علاوه بر نمونه‌های مورد بررسی یک شناساگر اندازه‌ی پروتئین نیز در یکی از چاهک‌ها بارگذاری شد). تانک الکتروفورز به دستگاه مولد برق با ولتاژ ۷۰ و ۱۲۰ ولت (به ترتیب برای ژل بالایی و پایینی) متصل شد.

**وسترن بلات**: پس از انجام الکتروفورز جهت انتقال پروتئین‌ها از ژل به غشای برگه‌های واتمن، غشای PVDF (Bio Rad) و ژل درون کاست چیده شدند و ساندویچ حاصل در بانک حاوی بافر انتقال قرار داده شد. پس از اتمام فرآیند انتقال، غشا PVDF به مدت یک شب توسط محلول ۱۰ درصد شیر خشک بدون چربی (Millipore) بلوکه شد. غشا بعد از بلوکه شدن و شست و شو، به مدت ۱/۵ الی ۲ ساعت با آنتی بادی‌های اولیه  $\beta$ -catenin (Santa Cruz, SC-7963)، E-cadherin (Abcam, 76055) و GAPDH (Santa

سلول‌ها ۳ مرتبه با PBS شست و شو شدند. در مرحله بعد سلول‌ها با پارافرمالدهید ۴ درصد به مدت ۲۰ دقیقه در دمای اتاق فیکس شدند. پس از شست و شو، سلول‌ها با استفاده از تریتون ۰/۲ درصد به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق نفوذپذیر شدند. سپس عمل بلوکه کردن توسط محلول PBS/BSA با غلظت ۱۰mg/mL به مدت ۱ ساعت انجام شد. در ادامه پس از خروج محلول بلوکه کننده ابتدا سلول‌ها به مدت ۲ ساعت در آنتی بادی اولیه  $\beta$ -catenin (Santa Cruz Biotechnology, SC-7963) و پس از شست و شو به مدت ۱ ساعت با آنتی بادی ثانویه کونژوگه با FITC انکوبه شدند پس از حذف آنتی بادی ثانویه و شست و شو به منظور رنگ‌آمیزی هسته به هر چاهک رنگ DAPI (با غلظت نهایی ۳ng/mL) اضافه شد و پس از ۱ الی ۲ دقیقه چاهک‌ها با PBS شست و شو شدند. دیواره‌های chamber slides به آرامی جدا و لامل بزرگ به کمک چسب انتلان بر روی لام چسبانده شد. پس از خشک شدن چسب، از لام‌ها به کمک میکروسکوپ فلورسانس (Olympus) و با نرم افزار Olysia عکس گرفته شد.

**استخراج پروتئین**: در این بررسی جهت استخراج پروتئین از محلول تریزول (Thermo Scientific) استفاده شد. بدین منظور پس از هموزن نمودن سلول‌ها در تریزول، به هر یک از نمونه‌ها ۲۰۰ میکرولیتر کلروفرم اضافه و نمونه‌ها به مدت ۱۵ دقیقه در دور ۱۲۰۰۰g در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شدند. در این مرحله ۳ فاز تشکیل می‌شود: فاز رویی محتوی RNA، فاز وسط محتوی DNA و فاز زیرین محتوی پروتئین است. پس از انتقال محلول رویی حاوی RNA به یک ویال جدید، به ویال محتوی DNA و پروتئین ۳۰۰ میکرولیتر اتانول ۱۰۰ درصد اضافه و نمونه‌ها به مدت ۵ دقیقه در دور ۲۰۰۰g در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شدند. در این مرحله، فاز رویی که محتوی پروتئین بود به یک ویال جدید منتقل شد. به منظور رسوب پروتئین‌ها، ۱ میلی‌لیتر استون DTT به هر یک از

گرفت. همه داده‌ها به صورت میانگین  $\pm$  خطای استاندارد میانگین گزارش شدند.

### نتایج

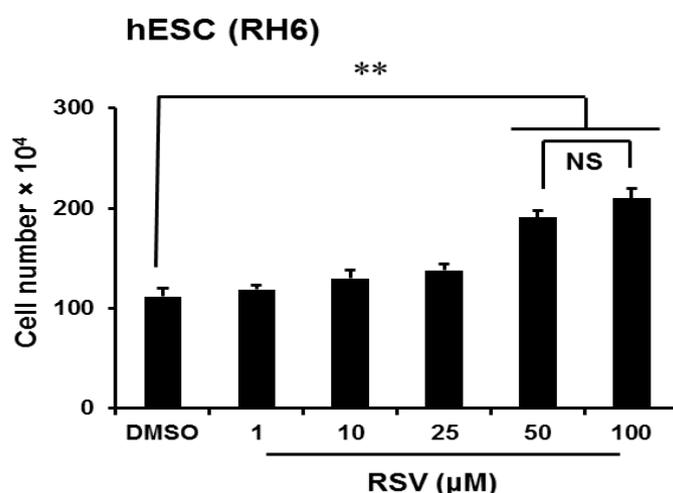
#### نتایج حاصل از بررسی اثر RSV بر تعداد hESCs

به منظور ارزیابی تاثیر RSV بر تعداد hESCs تست شمارش سلولی با استفاده از رنگ تریپان بلو انجام گرفت. نتایج این بررسی نشان داد کهاز میان غلظت‌های مختلف RSV (۱، ۱۰، ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ میکرومول) تعداد سلول‌های RH6 تنها در حضور غلظت‌های ۵۰ و ۱۰۰ میکرومول از RSV به صورت معنی داری نسبت به گروه کنترل (گروه تیمار شده با دی متیل سولفوکساید) افزایش یافت. با توجه به این که تفاوت معنی داری در تعداد سلول‌های تیمار شده با دو غلظت ۵۰ و ۱۰۰ میکرومول، RSV مشاهده نشد، غلظت ۵۰ میکرومول به عنوان غلظت بهینه‌ی این ترکیب انتخاب شد و سایر بررسی‌ها تنها با این غلظت RSV انجام گرفت (شکل ۱).

Cruz) سپس به مدت ۱ ساعت با آنتی‌بادی ثانویه کونژوگه با HRP (HRP-conjugated goat anti-mouse IgG) (Dako, P0477) سوبسترای مورد استفاده برای آنزیم HRP در این بررسی، سوبسترای ECL شرکت Amersham بود که شامل دو محلول A و B است که به نسبت ۱:۱ با هم ترکیب و در تاریکی روی سطح غشا ریخته شدند. در نهایت پس از ظهور باندها بر روی فیلم رادیولوژی، از فیلم‌ها عکس گرفته شد.

### آنالیز آماری

نتایج به دست آمده در این مطالعه به طور نسبی با سه بار تکرار مستقل آزمایش‌ها به دست آمده است. تعیین معنی داری اختلاف میانگین‌های بیش از دو گروه با روش One way ANOVA و آزمون Tukey انجام گرفت. برای تعیین معنی داری اختلاف میانگین‌ها بین دو گروه از Student's t test استفاده شد. آنالیزها با نرم افزار SPSS (version 17) و در سطح معنی داری  $p < 0/05$  انجام

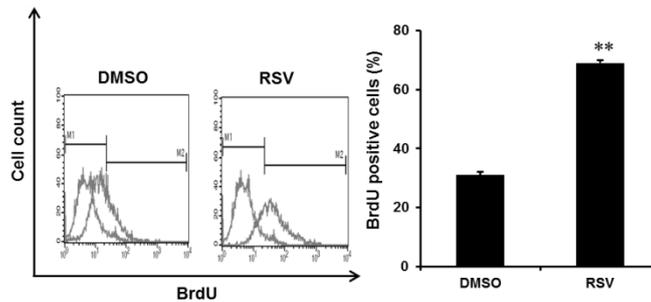


شکل ۱: نتایج آزمون شمارش سلولی. اثر غلظت‌های مختلف Resveratrol (RSV) بر تعداد سلول‌های RH6 پس از گذشت ۷۲ ساعت از تیمار در مقایسه با گروه کنترل دی متیل سولفوکساید (DMSO). خط شاخص نشان دهنده میانگین  $\pm$  خطای استاندارد میانگین است و \*\*\* نشان دهنده اختلاف معنی دار بین نمونه‌ی تیمار شده و کنترل در سطح  $p < 0/01$  می‌باشد. NS به معنی عدم معنی داری است.

### نتایج حاصل از بررسی اثر RSV بر میزان تکثیر hESCs

جهت انجام این بررسی سلول‌های RH6 به مدت ۷۲ ساعت با غلظت ۵۰ میکرومول از RSV تیمار شدند. سلول‌ها پس از اتمام زمان تیمار به مدت ۱ ساعت در

معرض BrdU قرار گرفتند و در نهایت پس از گذراندن مراحل تست الحاق BrdU، با دستگاه فلوسیتومتری بررسی شدند. همان‌گونه که در شکل ۲ نشان داده شده است تعداد سلول‌های BrdU+ در حضور RSV به صورت معنی‌داری افزایش یافته است.

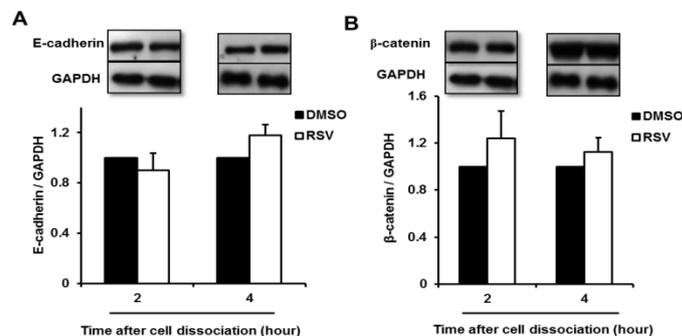


شکل ۲: اثر Resveratrol (RSV) بر میزان الحاق BrdU و تکثیر hESCs. درصد سلول‌های BrdU+RH6 که به مدت ۷۲ ساعت با غلظت ۵۰ میکرومول از RSV تیمار شده‌اند در مقایسه با گروه کنترل دی متیل سولفوکساید (DMSO). یک نمونه از سه تکرار به همراه نتایج کمی شده‌ی سه تکرار نشان داده شده است. خط شاخص نشان دهنده‌ی میانگین  $\pm$  خطای استاندارد میانگین است و \*\*\* نشان دهنده‌ی اختلاف معنی‌دار بین نمونه‌ی تیمار شده و کنترل در سطح  $p < 0.01$  می‌باشد.

### نتایج حاصل از بررسی اثر RSV بر بیان E-cadherin و $\beta$ -catenin

با توجه به این که یکی از علل شناخته شده‌ی قدرت زیست پایین hESCs منفرد شده، کاهش بیان اجزای تشکیل دهنده‌ی اسکلت سلولی در سطح پروتئین است (۵)، باید تاثیر RSV بر بیان ژن‌های مؤثر در شکل‌گیری کلنی نظیر E-cadherin و  $\beta$ -catenin در مدت زمان

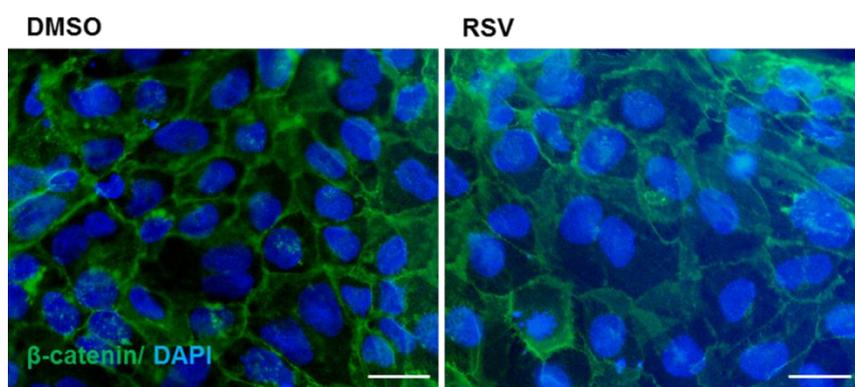
کوتاهی پس از منفرد شدن ارزیابی شوند. بدین‌منظور سلول‌های RH6 بلافاصله پس از منفرد شدن به مدت ۲ و ۴ ساعت با غلظت ۵۰ میکرومول از RSV تیمار شدند و در ادامه پروتئین آنها جهت بررسی بیان دو فاکتور مذکور استخراج شد. بنابر داده‌های حاصل از تکنیک وسترن بلات اثر RSV بر بیان E-cadherin و  $\beta$ -catenin معنی‌دار نبود (شکل ۳).



شکل ۳: اثر Resveratrol (RSV) بر میزان بیان عوامل دخیل در تشکیل کلنی. الگوی بیان E-Cadherin (A) و  $\beta$ -Catenin (B) و ۲ و ۴ ساعت پس از منفرد شدن سلول‌های RH6 در حضور RSV در مقایسه با گروه کنترل دی متیل سولفوکساید (DMSO) توسط تکنیک وسترن بلات. یک نمونه از سه تکرار به همراه نتایج کمی شده سه تکرار نشان داده شده است. اختلاف بین گروه تیمار شده و تیمار نشده معنی‌دار نبود.

قرارگیری این پروتئین در غشا شود. جهت بررسی این احتمال، جایگاه قرارگیری  $\beta$ -catenin با استفاده از رنگ‌آمیزی ایمونوفلوروسنت بر روی سلول‌هایی که بلافاصله پس از منفرد شدن و به مدت ۲۴ ساعت با RSV تیمار شده بودند مورد بررسی قرار گرفت. داده‌های حاصل از این آزمایش عدم تغییر در میزان  $\beta$ -catenin استقرار یافته در غشاء را نشان داد (شکل ۴).

$\beta$ -catenin بر اساس جایگاه قرارگیری در سلول (ناحیه‌ی هسته‌ای یا غشایی)، نقش‌های متفاوتی را ایفا می‌کند. این نقش حیطه‌ی گسترده‌ای از شرکت در مسیر سیگنالینگ Wnt/ $\beta$ -catenin تا برقراری ارتباط با E-cadherin را شامل می‌شود (۲۵). لذا اگرچه داده‌های حاصل از مرحله‌ی قبل عدم تغییر بیان  $\beta$ -catenin را نشان داد این احتمال داده شد که ممکن است RSV بدون تغییر در میزان بیان  $\beta$ -catenin تنها موجب افزایش



شکل ۴: اثر Resveratrol (RSV) بر جایگاه قرارگیری  $\beta$ -catenin در hESCs. محل قرارگیری  $\beta$ -catenin در hESCs تیمار شده با RSV به مدت ۲۴ ساعت پس از منفرد شدن با استفاده از تکنیک رنگ‌آمیزی ایمونوفلوروسنت. هسته‌ها با رنگ DAPI رنگ‌آمیزی شده‌اند. تصاویر به صورت منطبق بر هم (Merged) گرفته شده‌اند. یک نمونه از سه تکرار نشان داده شده است. اختلاف بین گروه‌های تیمار شده و تیمار نشده معنی‌دار نبود. خط معیار: ۱۰۰ میکرومتر.

پرتوان القا شده انسانی ندارد. در واقع این محققین بر پایه‌ی روش رنگ‌سنجی که تحت تاثیر عوامل مختلفی مانند محتویات محیط، سرم آلبومین و اسیدهای چرب قرار می‌گیرد (۲۷ و ۲۸) عدم تاثیر RSV بر تکثیر سلول‌های پرتوان انسانی را گزارش نموده‌اند. فعالیت تکثیری RSV در مطالعات دیگر نیز اثبات شده است. لی و همکاران (۲۹) به بررسی اثر RSV بر پرتوانی و خود نوزایی mESCs و سلول‌های پرتوان القا شده موشی (miPSCs) که با رتینوئیک اسید به سمت تمایز هدایت شده بودند پرداختند. بر مبنای یافته‌های این محققین، در حضور غلظت‌های ۵۰ و ۵۰۰ نانومول از RSV بیان مارکرهای پرتوانی OCT4، NANOG و SOX2، بیان مارکرهای تنظیم‌کننده سیکل سلولی PcnA، Cyclin و Cyclin A، D و میزان تکثیر سلولی در سلول‌های مذکور

## بحث

با توجه به اهمیت hESCs در حوزه‌های تحقیقاتی و بالینی مختلف، امروزه تلاش‌های زیادی جهت بهبود شرایط کشت این سلول‌ها و فهم دقیق مکانیسم‌های دخیل در خودنوزایی و پرتوانی این سلول‌ها در حال انجام است. در پژوهش حاضر به بررسی اثرات RSV بر تکثیر و کارایی شکل‌گیری کلنی hESCs منفرد شده پرداخته شد. در نخستین گام این پژوهش افزایش تعداد hESCs در حضور RSV نشان داده شد. در ادامه با استفاده از آزمون BrdU اثبات شد که افزایش مشاهده شده در تعداد سلول ناشی از افزایش میزان تکثیر hESCs بوده است. در تناقض با یافته‌های ما، Liu و همکاران (۲۶) نشان دادند که RSV تاثیر بر توان تکثیری سلول‌های

کلیواژ E-cadherin از یک سو و با لوکالیزه نمودن  $\beta$ -catenin در غشای سلول از سوی دیگر موجب کاهش EMT می‌شود. تناقض مشاهده شده بین یافته‌های پژوهش پیش رو با دو بررسی مذکور احتمالاً ناشی از عملکرد وابسته به نوع سلول SIRT1 می‌باشد.

#### نتیجه‌گیری

بر مبنای نتایج مطالعه‌ی حاضر این گونه نتیجه‌گیری شد که اگرچه RSV نقش چشمگیری در تشکیل کلنی و بهبود شرایط زیست hESCs منفرد شده ندارد اما قادر به افزایش میزان تکثیر این سلول‌ها است. بر این اساس می‌توان RSV را به‌عنوان یکی از اجزای محیط کشت hESCs که قادر به بهبود شرایط رشد و تولید انبوه سلول‌های مذکور در بازه زمانی کوتاه است معرفی نمود.

#### تشکر و قدردانی

این تحقیق در قالب پایان نامه دکتری در پژوهشکده رویان اصفهان انجام گرفت لذا نویسندگان قدردان حمایت‌های این مجموعه جهت فراهم نمودن امکانات اجرایی و مالی این طرح می‌باشند.

#### منابع

1. Wobus AM, Boheler KR. Embryonic stem cells: prospects for developmental biology and cell therapy. *Physiol. Rev.* 2005; 85(2): 635-78.
2. Smith AG. Embryo-derived stem cells: of mice and men. *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.* 2001;17: 435-462.
3. YH YU, Zhang L, Wu DS, Zhang Z, et al. MiR-223 Regulates Human Embryonic Stem Cell Differentiation by Targeting the IGF-1R/Akt Signaling Pathway. *Plos One.* 2013;8:11.
4. Watanabe K, Ueno M, Kamiya D, Nishiyama A, et al. A ROCK inhibitor permits

افزایش می‌یابد. این دانشمندان اذعان داشتند که RSV اثرات مثبت خود بر پر توانی و خود نوزایی سلول‌های پر توان موشی را از طریق فعال نمودن مسیر JAK/STAT3 و مهار مسیر mTOR اعمال می‌کند. کاربرد ۱۰ میکرومول از RSV در محیط کشت پروژنیوتورهای نرونی با فعال نمودن مسیرهای ERK و P38 موجب پیشبرد تکثیر این سلول‌ها شده است (۱۸). RSV همچنین موجب پیشبرد تکثیر و تمایز استئوژنیکی در سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق شده از مغز استخوان موش و انسان به ترتیب از طریق مسیرهای ER/NO/cGMP و ER/ERK می‌شود (۱۴، ۱۵). در این پژوهش تاثیر RSV بر توانایی تشکیل کلنی hESCs که متحمل استرس منفرد شدن قرار گرفته بودند نیز بررسی شد. بر مبنای یافته‌های ما بیان E-cadherin و  $\beta$ -catenin به‌عنوان عوامل اصلی دخیل در اتصالات سلولی در حضور RSV تغییر نمی‌یابد. به‌علاوه بر اساس نتایج حاصل از رنگ آمیزی ایمونوفلوروسنت میزان  $\beta$ -catenin غشایی نیز به‌دنبال تیمار با RSV افزایش نمی‌یابد. یافته‌های ما در تناقض با مطالعاتی است که SIRT1 را به‌عنوان تنظیم‌کننده‌ی مثبت بیان E-cadherin معرفی می‌نمایند. به‌طور مثال در مطالعه‌ای که در سال ۲۰۱۲ انجام شد (۲۳) مشخص شد که RSV قادر است از طریق فعال نمودن SIRT1 موجب افزایش بیان E-cadherin در سلول‌های کارسینومای اندومتر انسانی شود. بر مبنای یافته‌های این مقاله، افزایش بیان E-cadherin ناشی از اتصال یافتن SIRT1 به نواحی E-box پروموتور ژن E-cadherin است. در سال ۲۰۱۳ نیز سیمیک و همکاران (۲۲) نشان دادند که SIRT1 از طریق داستیله نمودن Smad4 مانع از بیان ماتریکس متالوپروتئیناز ۷ (MMP7) می‌شود. به‌دنبال کاهش بیان MMP7، E-cadherin کلیواژ نشده و در اتصال به  $\beta$ -catenin غشای سلول باقی می‌ماند. بر مبنای این بررسی SIRT1 در سرطان سینه و فیبروز کلیوی با ممانعت نمودن از

- survival of dissociated human embryonic stem cells. *Nat. Biotechnol.* 2007; 25: 681–686.
5. Ohgushi M, Matsumura M, Eiraku M, Murakami K, et al. Molecular pathway and cell state responsible for dissociation-induced apoptosis in human pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell.* 2010; 7(2): 225–239.
  6. Ren-He X, Peck RM, Li DS, Feng X, et al. Basic FGF and suppression of BMP signaling sustain undifferentiated proliferation of human ES cells. *Nature methods.* 2005; 2(3): 185.
  7. Armstrong L, Hughes O, Yung S, Hyslop L, et al. The role of PI3K/AKT, MAPK/ERK and NF $\kappa$ B signalling in the maintenance of human embryonic stem cell pluripotency and viability highlighted by transcriptional profiling and functional analysis. *Human molecular genetics.* 2006; 15(11): 1894-1913.
  8. Li J, Wang G, Wang C, Zhao Y, et al. MEK/ERK signaling contributes to the maintenance of human embryonic stem cell self-renewal. *Differentiation.* 2007; 75(4): 299-307.
  9. Esmailpour T, Huang T. TBX3 promotes human embryonic stem cell proliferation and neuroepithelial Differentiation in a differentiation stage dependent manner. *Stem Cells.* 2012; 30(10): 2152-2163.
  10. Xua T, Zhua X, Hahma H, Wei W, et al. Revealing a core signaling regulatory mechanism for pluripotent stem cell survival and self-renewal by small molecules. *PNAS.* 2010; 107(18): 8129–8134.
  11. Kajabadi NS, Ghoochani A, Peymani M, Ghaedi K, et al. The synergistic enhancement of cloning efficiency in individualized human pluripotent stem cells by peroxisome proliferative-activated receptor- $\gamma$  (PPAR $\gamma$ ) activation and Rho-associated Kinase (ROCK) inhibition. *JBC.* 2015; 290(43): 26303-26313.
  12. Burns J, Yokota T, Ashihara H, Lean ME, et al. Plant foods and herbal sources of resveratrol. *Journal of agricultural and food chemistry.* 2002; 50(11): 3337-3340.
  13. Howitz KT, Bitterman KJ, Cohen HY, Lamming, DW, et al. Small molecule activators of sirtuins extend *Saccharomyces cerevisiae* lifespan. *Nature.* 2003; 425: 191-196.
  14. Song LH, Pan W, Yu YH, Quarles LD, et al. Resveratrol prevents CsA inhibition of proliferation and osteoblastic differentiation of mouse bone marrow-derived mesenchymal stem cells through an ER/NO/cGMP pathway. *Toxicology in Vitro.* 2006; 20(6):915-922.
  15. Dai Z, Li Y, Quarles L, Song T, et al. Resveratrol enhances proliferation and osteoblastic differentiation in human mesenchymal stem cells via ER-dependent ERK1/2 activation. Howitz KT, Bitterman KJ, Cohen HY, Lamming, DW, et al. Small molecule activators of sirtuins extend *Saccharomyces cerevisiae* lifespan. *Nature.* 2003; 425: 191-196.
  16. Jablonska B, Gierdalski M, Chew LJ, Hawley T, et al. Sirt1 regulates glial progenitor proliferation and regeneration in white matter after neonatal brain injury. *Nature communications* 7. 2016; 13866: 1-16.
  17. Wang L, Xue R, Sun C, Yang C, et al. SIRT1 regulates C2C12 myoblast cell proliferation by activating Wnt signaling pathway. *IntJ Clin Exp Pathol.* 2016; 9(3): 2857-2868.
  18. Kumar V, Pandey A, Jahan S, Shukla RK, et al. Differential responses of Trans-Resveratrol on proliferation of neural progenitor cells and aged rat hippocampal neurogenesis. *Scientific reports.* 2016; 6: 28142.
  19. Calvanesea V, Larab E, AlvarezcBS, AbuDawudd R, et al. Sirtuin 1 regulation of developmental genes during differentiation of stem cells. *PNAS.* 2010; 107(31): 1-6.
  20. Tryndyak PV, Beland AF, Pogribny PI. E-cadherin transcriptional down-regulation by epigenetic and microRNA-200 family alterations is related to mesenchymal and drug-resistant phenotypes in human breast cancer cells. *Int. J. Cancer.* 2010; 126: 2575–2583.
  21. Zhang L, Wang X, Chen P. MiR-204 down regulates SIRT1 and reverts SIRT1-induced epithelial- mesenchymal transition, anoikis resistance and invasion in gastric cancer cells. *BMC.Cancer.* 2013;14(13): 290.

22. Simic P, Williams OE, Bell LE, Gong J, et al. SIRT1 suppresses the epithelial-to-mesenchymal transition in cancer metastasis and organ fibrosis. *Cell.Rep.* 2013; 3(4): 1175–1186.
23. Shirane A, Wada-Hiraike O, Tanikawa M, Seikia T, et al. Regulation of SIRT1 determines initial step of endometrial receptivity by controlling E-cadherin expression. *Biochem.Biophys. Res. Commun.* 2012; 424(3): 604–610.
24. Baharvand H, Ashtiani SK, Tae A, Massumi M, et al. Generation of new human embryonic stem cell lines with diploid and triploid karyotypes. *Development, growth & differentiation.* 2006; 48(2): 117-128.
25. Huang G, Ye S, Zhou X, Liu D, et al. Molecular basis of embryonic stem cell self-renewal: from signaling pathways to pluripotency network. *Cellular and molecular life sciences.* 2015; 72(9): 1741-1757.
26. Liu H, Zhang S, Zhao L, Zhang Y, et al. Resveratrol enhances cardiomyocyte differentiation of human induced pluripotent stem cells through inhibiting canonical WNT signal pathway and enhancing serum response factor-miR-1 axis. *Stem cells international* 2016; 1-11.
27. Huang KT, Chen YH, Walker AM. Inaccuracies in MTS assays: major distorting effects of medium, serum albumin, and fatty acids. *Biotechniques.* 2004; 37(406): 410-402.
28. Wang P, Henning SM, Heber D. Limitations of MTT and MTS-based assays for measurement of antiproliferative activity of green tea polyphenols. *PloS one.* 2010; 5(4): e10202.
29. Li N, Du Z, Shen Q, Lei Q, et al. Resveratrol enhances self Renewal of mouse embryonic stem cells. *JCB.* 2017; 118(7): 1928-1935.

## Investigating the effects of Resveratrol on proliferation and colony formation of dissociated human embryonic stem cells

Safaeinejad Z, Ph.D candidate<sup>1</sup>, Nabiuni M, Ph.D.<sup>2\*</sup>, Peymani M, Ph.D.<sup>3,5</sup>, Ghaedi K  
Ph.D.<sup>4,5\*</sup>, Nasr-Esfahani MH, Ph.D.<sup>5\*</sup>

1. Department of Animal Biology, Faculty of Biological Sciences, Kharazmi University, Tehran, Iran
2. Department of Cell and Molecular Biology, Faculty of Biological Sciences, Kharazmi University, Tehran, Iran
3. Department of Biology, Sharekord Branch, Islamic Azad University, Sharekord, Iran.
4. Department of Biology, School of Sciences, University of Isfahan, Isfahan, Iran.
5. Department of Cellular Biotechnology, Cell Science Research Center, Royan Institute for Biotechnology, ACECR, Isfahan, Iran

\* Email corresponding author: kamranghaedi@royaninstitute.org , mh\_nasr@royaninstitute.org

Received: 29 Aug. 2017

Accepted: 14 Nov. 2017

---

### Abstract

**Aim:** The aim of this study was study the role of Resveratrol (RSV) on proliferation and colony efficiency of dissociated human embryonic stem cells (hESCs).

**Material and methods:** In the current study, we used HESC line, RH6. Cells were cultured on the matrigelin supplemented hESC specific medium. Cell proliferation was estimated using cell counting and Brdu incorporation assays. The expression of colony efficiency markers (E-cadherin and  $\beta$ -catenin) was evaluated by western blot technique and  $\beta$ -catenin localization examined by immunocytochemistry staining.

**Results:** We have shown that RSV promoted hPSCs proliferation without affecting their colony efficiency.

**Conclusion:** According to these observations, RSV can be suggested as a new supplement for hESCs culture.

**Key words:** Human embryonic stem cells, Colony formation, Proliferation, Resveratrol