



## The effect of lovastatin on cell proliferation and neurotrophic factor expression of bone marrow mesenchymal stem cells in vitro

bageri A <sup>a</sup>, Ghorbanian MT<sup>b\*</sup>, Kosha A<sup>c</sup>

<sup>a</sup> MSc Student in Department of Cellular and Molecular Biology

<sup>b\*</sup> Associate Professor, Department of Cellular and Molecular Biology

<sup>c</sup> PhD Student and Laboratory employee in Department of Cellular and Molecular Biology

### Original Article

Use your device to scan and read the article online



**Citation:** bageri A a, Ghorbanian MT<sup>b\*</sup>, Kosha Ac. The effect of lovastatin on cell proliferation and neurotrophic factor expression of bone marrow mesenchymal stem cells in vitro. Journal of Cell and Tissue. 2022;13(2):107-120.

 <https://10.52547/JCT/13.2.107>

### KEYWORDS

Mesenchymal stem cells, Berberis, integrin, Osteoblast, Differentiation.

### ABSTRACT

**Aim:** In recent years using of Bone marrow mesenchymal stem cells (BMSC) in regenerative medicine, tissue engineering and gene therapy is highly regarded. Convenient access, ability to expand and MSC differentiation capacity along with the ability of adhesion to plastic surfaces and in-vitro growth and development are considered as the characteristic feature of these cells. Bone marrow mesenchymal stem cells possess the ability to differentiate into mesodermal lineage, among other adult cells, can be used in tissue engineering and are good candidates for transplantation. Lovastatin as a lowering cholesterol agent and reducing inflammation, as well as antioxidant and, in particular, neuroprotective effects can be effective in the treatment of neurogenic diseases. The aim of this study was to evaluate the effect of lovastatin on survival, proliferation and expression of GDNF and oct4 genes of Bone marrow mesenchymal stem cells. Lovastatin is presumed to exert their neuroprotective effects by inducing neurotrophic factor gene expression and cell proliferation.

**Material and methods:** In this experimental study, we used 4-6 week adult Wistar rats. The BMSCs were isolated from rat femurs and tibias and cultured in  $\alpha$ -MEM. The cell pellet was resuspended in  $\alpha$ -MEM supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS), 1% penicillin and streptomycin and cultured in 25-cm<sup>2</sup> culture flasks at a density of  $2 \times 10^4$  cells and incubated at 37°C and 5% CO<sub>2</sub>. For lovastatin treatment, we exposed MSCs to 1  $\mu$ M, 5  $\mu$ M, 10  $\mu$ M and 15  $\mu$ M of lovastatin for 24 h. The survival rate of cells was measured by MTT assay. The growth rate and proliferation of cells at 24 hours after culture were assessed by staining with DAPI. The expression of Oct4 and GDNF factors was also evaluated by RT-PCR.

\* Corresponding author. Tel.: +98- 23-35220418 ; Fax: +98- 23-35220418

E-mail address: ghorbanian@du.ac.ir

DOI: <https://10.52547/JCT/13.2.107>

Received: December 30, 2021; Received in revised form: May 11, 2022; Accepted: May 29, 2022

Original Article

© Author



**Results:** MSCs were attached to culture plate and were quickly proliferated. In the culture plate, these cells were usually appeared in three forms: small spherical, fusiform and fibroblast-like and flattened. The results of this study indicate that the proliferation rate at 5, 10 and 15  $\mu\text{M}$  lovastatin showed a significant increase compared to control groups ( $P < 0.5$ ). Gene expression density of gelial derived neurotrophic factors (GDNF) and oct4 genes showed that, there were significant differences between MSCs treatment groups and control group ( $P < 0.5$ ). Cell viability and proliferation rate indicate that experimental groups has a higher proliferation rate than control group. Moreover, results showed an increase in mRNA expression for GDNF and Oct4 compared to the control group ( $P < 0.05$ ).

**Conclusion:** Therefore, lovastatin can be used to improve the culture of mesenchymal stem cells, which is used for transplantation and cell therapy. BMSCs may be a useful therapeutic agent for the treatment of neurodegenerative disorders.



## اثر لوواستاتین بر تکثیر سلولی و بیان فاکتور نوروتروفیک سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان در شرایط آزمایشگاهی

افسانه باقری<sup>۱</sup>، محمدتقی قربانیان<sup>۲\*</sup>، ابوطالب کوشا<sup>۳</sup>

<sup>۱</sup> دانش‌آموخته کارشناسی ارشد، گروه زیست‌شناسی سلولی و مولکولی، دانشکده زیست‌شناسی، دانشگاه دامغان

<sup>۲</sup> دانشیار، گروه زیست‌شناسی سلولی و مولکولی، دانشکده زیست‌شناسی، دانشگاه دامغان [ghorbanian@du.ac.ir](mailto:ghorbanian@du.ac.ir)

<sup>۳</sup> دانشجوی دکتری و کارشناس گروه زیست‌شناسی سلولی و مولکولی، دانشکده زیست‌شناسی، دانشگاه دامغان

### چکیده

### واژگان کلیدی

**هدف:** در سال‌های اخیر استفاده از سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از مغز استخوان (BMSCs) در پزشکی بازساختی، مهندسی بافت و ژن درمانی بسیار مورد توجه محققان قرار گرفته است. دسترسی آسان، قابلیت تکثیر و ظرفیت تمایز BMSC به همراه قابلیت چسبندگی به سطح پلاستیکی و رشد و گسترش در شرایط کشت آزمایشگاهی از ویژگی‌های این سلول‌ها به شمار می‌رود. سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان سلول‌های بزرگسالی هستند که توانایی تمایز به دودمان مزودرمی دارند و در میان سایر سلول‌های بزرگسال، می‌توانند در مهندسی بافت استفاده شوند و کاندیدای مناسبی برای پیوند هستند. داروی لوواستاتین به عنوان یک عامل کاهش‌دهنده کلسترول و با اثرات آنتی‌اکسیدانت و به ویژه نوروتروفیک و ضد التهابی می‌تواند در درمان اختلالات عصبی موثر واقع شود. هدف از این مطالعه بررسی بقا، تکثیر و بیان ژن‌های GDNF و oct4 با دوزهای مختلف داروی لوواستاتین در سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان است. فرض بر این است که لوواستاتین اثرات محافظت‌کننده عصبی خود را با القای بیان ژن فاکتور نوروتروفیک و ژن فاکتور نسخه برداری تکثیر سلولی اعمال می‌کند. **مواد و روش‌ها:** در این مطالعه تجربی از موش صحرایی بالغ نژاد ویستار (wistar) استفاده گردید. در مطالعه حاضر سلول‌های بنیادی مزانشیمی از استخوان ران و ساق موش صحرایی استخراج و در محیط  $\alpha$ -MEM کشت شد. BMSCs پس از استخراج در محیط  $\alpha$ -MEM (Gibco) غنی شده با ۱۰ درصد سرم (Gibco) و پنی سیلین-استرپتومایسین (Gibco) یک درصد در فلاسک 25cm<sup>2</sup> و تراکم 2x10<sup>4</sup> کشت داده شده و در شرایط دمایی ۳۷ درجه سانتی‌گراد و ۵ CO<sub>2</sub> درصد نگهداری شدند. سلول‌های بنیادی مزانشیمی به مدت ۲۴ ساعت در معرض ۱ میکرومولار، ۵ میکرومولار، ۱۰ میکرومولار و ۱۵ میکرومولار لوواستاتین به‌عنوان تیمار قرار داده شدند. میزان بقا و حیات با روش MTT و تکثیر سلولی با شمارش سلولی توسط رنگ‌آمیزی با DAPI ارزیابی شد. همچنین با روش RT-PCR بیان فاکتور نسخه برداری تکثیر سلول‌های بنیادی Oct4 و فاکتور نوروتروفیک GDNF بررسی شد. **نتایج:** سلول‌های بنیادی مزانشیمی به کف ظرف کشت پلاستیکی چسبیدند و به سرعت تکثیر شدند. در ظرف کشت، این سلول‌ها معمولاً به سه شکل سلول‌های کروی کوچک، دوکی شکل و فیبروبلاست مانند ظاهر شدند. نتایج این مطالعه نشان می‌دهد که میزان تکثیر در غلظت‌های ۵، ۱۰ و ۱۵ میکرومولار لوواستاتین نسبت به گروه‌های کنترل افزایش معنی‌داری را نشان می‌دهد (p<0/05). بیان نیمه کمی ژن فاکتورهای نوروتروفیک مشتق از گلیال (GDNF) و ژن‌های oct4 نشان داد که بین گروه‌های تیمار سلول‌های

سلول‌های بنیادی  
مزانشیمی، بهبود  
شرایط کشت، لوو  
استاتین، نوروتروفین

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۹/۰۹

تاریخ بازنگری: ۱۴۰۱/۰۲/۲۱

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۳/۰۸

بنیادی مزانشیمی و گروه کنترل تفاوت معنی‌داری وجود دارد. بنابراین داروی لوواستاتین موجب افزایش حیات و تکثیر سلولی و همچنین بیان mRNA ژن Oct4 و GDNF در گروه لوواستاتین نسبت به گروه کنترل، گردید ( $p < 0.05$ ). نتیجه‌گیری: بنابراین استفاده از داروی لوواستاتین برای بهبود شرایط کشت سلول‌های بنیادی مزانشیمی که برای پیوند و سلول درمانی به کار می‌رود، پیشنهاد می‌شود. نتیجه دیگر این است که سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از مغز استخوان برای درمان بیماری‌های تحلیل برنده مغز (نورودژنرتیو) مفید خواهند بود.

## ۱- مقدمه

در بین داروهای مطالعه شده داروی لوواستاتین به‌عنوان یک عامل کاهش دهنده کلسترول می‌تواند با اثر نوروتروفیک، تعدیل‌کننده پاسخ ایمنی و اثر ضدالتهابی در بیماری‌های نورودژنرتیو (تحلیل‌برنده عصبی) مانند آلزایمر کاربرد داشته باشد (۱). تحقیقات نشان می‌دهد که لوواستاتین با مهار سیتوکین‌های التهابی قادر به محافظت از عصب می‌باشد و شواهد نشان داده است که کاربرد بالقوه استاتین برای درمان بیماری‌های عصبی و عضلانی لازم و مفید است. همان‌طور که پیش‌تر اشاره شد استاتین‌ها عوامل کاهش دهنده کلسترول هستند، اما اثرات دیگر استاتین‌ها، محافظت از عصب، ایمن‌سازی و ضد التهاب بودن آن‌هاست (۱ و ۲). گزارش شده است که استاتین‌ها اثرات آنابولیک (Anabolic) بر روی استخوان دارند و ممکن است تاثیرات مثبتی بر روی تمایز و معدنی شدن سلول‌های پیش‌ساز استئوبلاستی داشته باشند (۳-۵). استاتین‌ها را می‌توان از قارچ و یا به صورت مصنوعی تولید نمود. لوواستاتین، پراواستاتین و سیمواستاتین، استاتین‌های مشتق شده از قارچ هستند، در حالی که آتورواستاتین، سریواستاتین، فلوواستاتین، پراواستاتین، پیتاواستاتین و روزواستاتین ترکیبات کاملاً مصنوعی به‌شمار می‌آیند. استاتین‌ها اثرات متفاوتی بر روی پروفایل لیپیدی دارند که به دوز و نوع استاتین بستگی دارد (۶).

سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان (Bone marrow mesenchymal stem cells - BMSCs) سلول‌های بزرگسالی هستند که به دودمان مزودرمی تعلق دارند در میان سایر سلول‌های بنیادی بزرگسال، قابلیت استفاده شدن در مهندسی بافت را دارند، کاندیدای مناسبی برای پیوند هستند. این سلول‌ها مشخصه‌های ویژه‌ای برای استفاده درمانی دارند، از جمله: سهولت استخراج، تکثیر سریع، ظرفیت بالای تمایزی، ترشح طیف گسترده‌ای از فاکتورهای رشد، خواص ضدآپوپتوز، ضد التهاب و فعالیت ایمنی پایین پس از پیوند آلوژنیک است. همچنین این سلول‌ها به سهولت در شرایط کشت تکثیر می‌شوند. سلول‌های بنیادی دارای ظرفیت قابل توجهی در درمان بیماری‌ها است و به‌عنوان نوعی سیستم ترمیمی داخلی عمل می‌کند، در نتیجه سلول درمانی با استفاده از این سلول‌ها یک رویکرد مثبت برای جایگزینی و ترمیم بافت‌های آسیب دیده می‌باشد (۷-۹).

تکثیر و نگره زایی، هدش مهارفی صاصتخا دش ری اهروتکاف ا ب ص ا خ ت ش د ک ط ی ح م ط ی ار ش ه ب ی ها گ ش با م ز آ ط ی ح م ر د MSCs ی راد دارد تا سلول‌ها بتوانند، مورفولوژی فیبروبلاستی (fibroblastoid) و ویژگی‌های اساسی MSCs، از جمله پتانسیل تمایزی خود را حفظ و ارتقا بخشند (۱۰). انتخاب یک محیط کشت پایه بهینه به طور گسترده در مقالات مورد بحث قرار گرفته است، اما فقدان مطالعاتی در خصوص بقا و تکثیر در کنار بیان فاکتور نوروتروفیک در سلول‌های بنیادی مزانشیمی وجود دارد. هدف این مطالعه بررسی اثر دوزهای مختلف داروی لوواستاتین بر MSCs برای تعیین میزان بقا و تکثیر سلولی در کنار قابلیت نوروتروفیک MSCs، می‌باشد.

## ۲- مواد و روش‌ها

به‌منظور رعایت اصول اخلاقی کار بر روی حیوانات، کلیه مراحل تحقیق حاضر براساس دستور کار کمیته اخلاقی

دانشکده زیست‌شناسی دانشگاه دامغان انجام شد (کد اخلاق: ۲۰۳۷-۹۷/۲/۱۱). در این مطالعه تجربی از موش صحرایی بالغ نژاد ویستار (wistar) استفاده شد. موش‌ها تحت شرایط کنترل شده، دوازده ساعت روشنایی و دوازده ساعت تاریکی قرار داشتند و در دمای ۲۰ تا ۲۵ درجه سانتی‌گراد و رطوبت، آب و غذای کافی نگه‌داری شدند. سپس حیوانات توسط کلروفرم (Merck) به‌صورت عمیق بی‌هوش شده و با رعایت شرایط استریل MSCs از مغز استخوان‌های ران (Femur) و ساق (Tibia) استخراج شد (۱۱). BMSCs پس از استخراج در محیط  $\alpha$ -MEM (Gibco) غنی شده با ۱۰ درصد سرم (Gibco) و پنی‌سیلین-استرپتومایسین (Gibco) یک درصد در فلاسک  $25\text{cm}^2$  کشت داده شده و به انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و  $5\text{ CO}_2$  درصد انتقال داده شد. پس از ۲۷ ساعت با تعویض محیط سلول‌های شناور از سلول‌های چسبیده به کف فلاسک جدا شدند. پس از رسیدن سلول‌ها به تراکم ۸۰ تا ۹۰ درصد، به‌کمک تریپسین ۰/۲۵ درصد همراه با EDTA ۰/۰۲ درصد (Merck) سلول‌ها از کف فلاسک جدا شده و با تراکم  $5 \times 10^5$  در کشت‌های بعدی تکثیر شدند. ارزیابی حیات سلولی به‌روش هموسایتومتر انجام شد (۱۱ و ۱۲).

گروه‌های مورد بررسی عبارتند از گروه کنترل و چهار گروه تیمار با دوزهای ۱، ۵، ۱۰ و ۱۵ میکرومولار داروی لوواستاتین که به‌مدت ۲۴ ساعت در معرض سلول‌ها قرار داده شدند. برای تیمار سلولی با داروی لوواستاتین، سلول‌های پاساژ چهارم برای ارزیابی حیات سلولی (MTT) به پلیت ۹۶ خانه و برای رنگ‌آمیزی DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) به پلیت ۲۴ خانه و برای ارزیابی RT-PCR به ظرف کشت منتقل شده پس از چسبیدن سلول به کف ظرف، داروی لوواستاتین با غلظت‌های مذکور به محیط کشت فاقد سرم اضافه شد. با گذشت ۲۴ ساعت محیط حاوی دارو برداشته شده و محیط کشت  $\alpha$ -MEM فاقد سرم اضافه گردید و ۲۴ ساعت بعد ارزیابی‌های سلولی انجام شد.

**ارزیابی بقا و تکثیر سلولی به روش MTT:** پس از انتقال  $2 \times 10^4$  سلول به پلیت ۹۶ خانه و تیمار سلول‌ها با داروی لوواستاتین، محیط قبلی برداشته شد و به هر کدام از چاهک یا خانه‌ها ۱۰۰ میکرولیتر محیط کشت  $\alpha$ -MEM فاقد سرم به همراه ۱۰ میکرولیتر محلول (sigma) MTT  $5\text{ mg/ml}$  افزوده و در شرایط ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. پس از ۴ ساعت ۸۵ میکرولیتر از محیط رویی را برداشته و ۵۰ میکرولیتر دی‌متیل‌سولفوکساید (DMSO) اضافه شد. مدت ۱۰ دقیقه انکوبه شده و سپس جذب نمونه‌ها در طول موج  $540\text{ nm}$  با دستگاه (BioTek ELISA reader) اندازه‌گیری و پس از آن برای رسم منحنی بقای سلولی، محاسبه شد. درصد بقای سلولی به صورت (مقدار جذب نوری گروه تیمار شده / مقدار جذب نوری گروه کنترل)  $\times 100$  محاسبه شد (۱۲).

**شمارش سلولی با DAPI:** برای رنگ‌آمیزی با DAPI سلول‌های کشت شده در پلیت‌های ۲۴ خانه با PBS شستشو داده شده و سپس توسط پارافرمالدئید ۴ درصد ثبوت انجام شد. سلول‌ها با میکروسکوپ فلورسنس (Nikon Eclipse, E 600, Japan) و به‌کمک سیستم تصویر برداری دوربین دیجیتال (Nikon, DXM 120, USA) مشاهده و در بیست میدان دید میکروسکوپی شمارش شدند. DAPI یک نوع رنگ فلورسنت است که به نواحی غنی از آدنوزین-تیمیدین در DNA متصل می‌شود. DAPI می‌تواند از غشای سلول‌های سالم عبور کرده و بنابراین برای رنگ‌آمیزی سلول‌های زنده و ثابت شده مورد استفاده قرار گیرد. برای شمارش سلول‌ها از این روش رنگ‌آمیزی استفاده شد (۱۳).

**بیان ژن:** برای بررسی ژن‌ها، از روش RT-PCR (Reverse transcription polymerase chain reaction) استفاده شد. به این منظور RNA کل سلول‌های مورد نظر با استفاده از RNX-Plus و مطابق با دستور کار سیناژن جداسازی شد. پس از

اطمینان از کیفیت RNA استخراج شده با انجام الکتروفورز روی ژل آگارز و اسپکتروفتومتری، برای تهیه cDNA تک زنجیره‌ای با نیم میکروگرم RNA و با استفاده از پرایمر oligo(dt) و آنزیم ترانس کریپتاز معکوس [Revert Aid First Strand cDNA synthesis Kit(K1622, Fermentas, EU)] انجام شده و جهت تهیه حجم مذکور، علاوه بر DNA الگو از کیت PCR سیناکلون و ۱۰ پیکومولار پرایمرهای بالادست و پایین دست استفاده شد. پس از آماده ساختن حجم مورد نظر برای ادامه کار، واکنش PCR با شرایط باز شدن اولیه ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲ دقیقه، و سیکل‌های با شرایط باز شدن ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، اتصال ۵۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، گسترش ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه و پس از اتمام ۳۴ سیکل، مرحله گسترش نهایی در دمای ۲۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه انجام شد.

بعد از اتمام واکنش، ۸ میکرولیتر از محصول واکنش PCR توسط الکتروفورز ژل آگارز ۱/۵ درصد بررسی شد. شدت باندهای ژنی با استفاده از نرم افزار Image J آنالیز شد. ژن GAPDH به عنوان ژن کنترل داخلی استفاده شد. توالی و شماره دستیابی پرایمرها در جدول شماره ۱ آمده است (۱۴). توالی و شماره دستیابی پرایمرها در جدول ۱ آمده است.

جدول ۱: پرایمرهای استفاده شده در RT-PCR

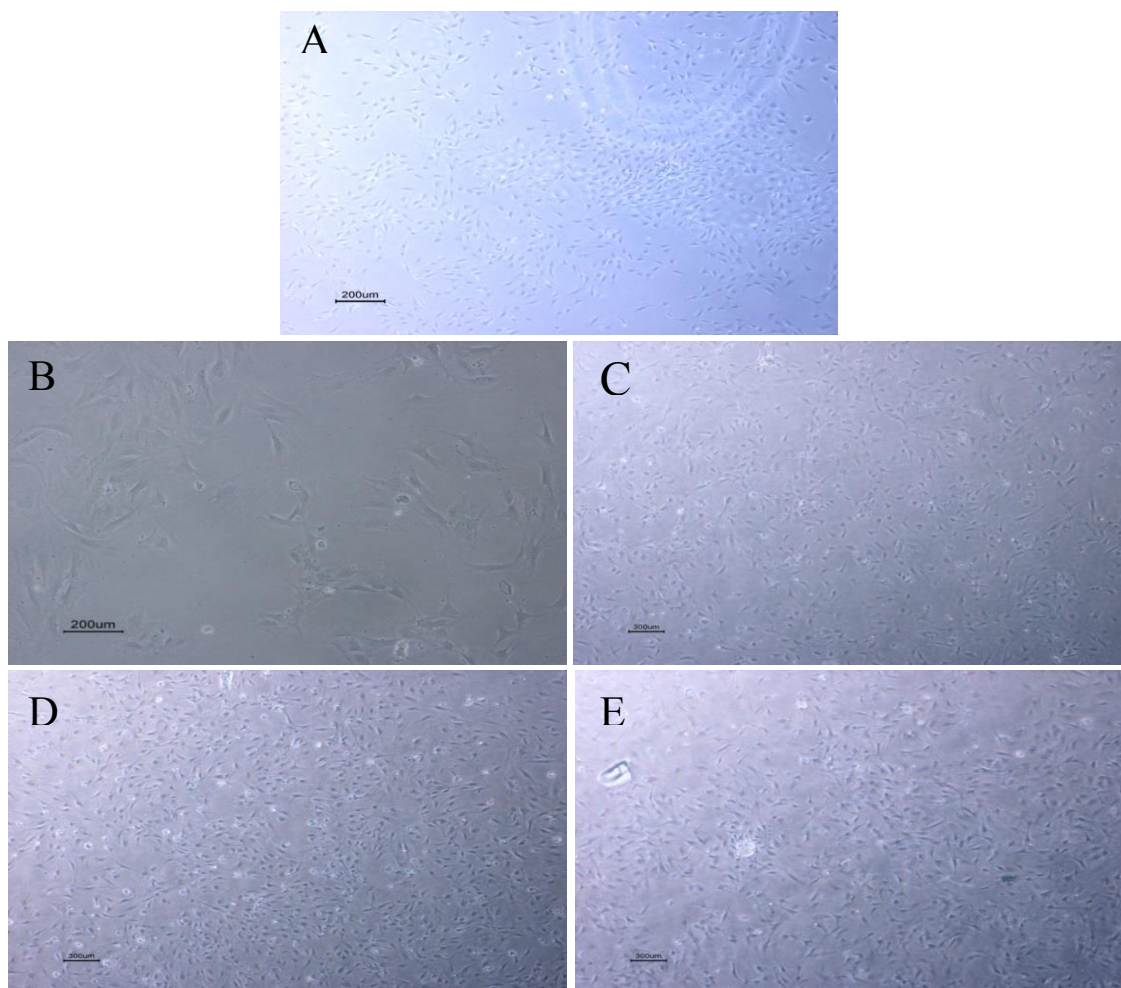
ردیف	نام ژن	توالی پرایمر	اندازه (bp)	دمای آنیلینگ
1	Oct4 Reverse	5-TgT-TcT-TAA-ggC-TgA-gCT-gCA-<A>-3	280	60
2	Oct4 forward	5-CCT-gCA-gAA-ggA-gCT-AgA-g-<T>-3	280	60
3	Gdnf Reverse	5-TAG-CCC-AAA-CCC-AAG-TCA-GT-3	242	55
4	Gdnf Forward	5-GAC TCC AAT ATG CCC GAA GA-3	242	55
5	GAPDH Reverse	5-CCC TGT TGC TGT AGC CGT ATT c-3	203	55
6	GAPDH Forward	5-TGA CAT CAA GAA GGT GGT GAA GC-3	203	55

### ۳- آنالیز آماری

تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه ۱۶ و برای مقایسه بین گروهی و بررسی اختلاف بین گروه‌ها از آزمون واریانس یک‌طرفه (One Way ANOVA) و به دنبال آن آزمون تکمیلی Tukey استفاده شد، داده به صورت میانگین و انحراف استاندارد از میانگین  $Mean \pm S.E.M$  ارائه شد و سطح معنی‌داری  $p < 0.05$  در نظر گرفته شد و نمودارها با نرم افزار Excel ترسیم شد.

### ۴- نتایج

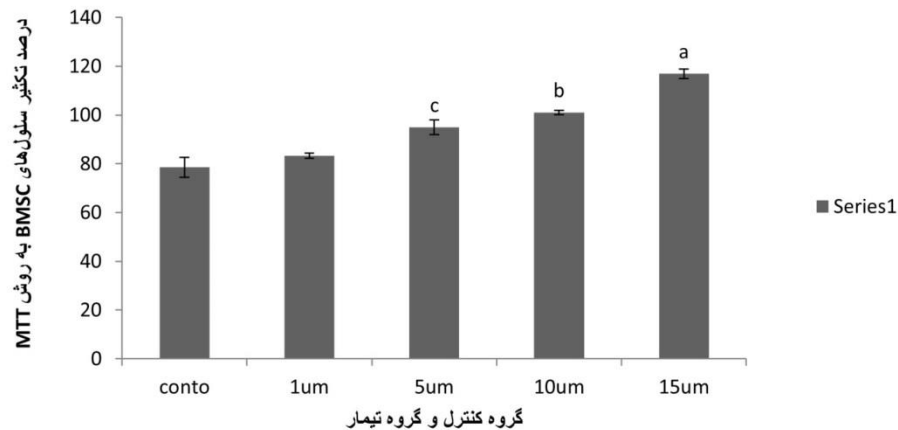
سلول‌های MSCs در پاساژ چهارم در زیر میکروسکوپ به صورت کروی شکل و دوکی شکل و فیبرو بلاستی مانند دیده شدند. بیشتر سلول‌ها دوکی و با زوائد کشیده و یا ستاره‌ای شکل مشاهده شدند. با تیمار توسط لوواستاتین تعداد سلول‌ها با افزایش غلظت دارو در هر میدان دید افزایش یافت و ظاهر سلول‌ها یکدست‌تر شد. مورفولوژی سلول‌های مزانشیمی در گروه‌های کنترل و تیمار با لوواستاتین در شکل ۱ دیده می‌شود.



شکل ۱: نمای میکروسکوپ فازکنتراست سلول‌های بنیادی مزانشیمی. در گروه‌های مختلف. A: گروه کنترل در شرایط کشت بدون تیمار، B: گروه سلولی تیمار با دوز ۱ میکرومولار لوواستاتین C: گروه سلولی تیمار با دوز ۵ میکرومولار لوواستاتین D: گروه سلولی تیمار با دوز ۱۰ میکرومولار لوواستاتین E: گروه سلولی تیمار با دوز ۱۵ میکرومولار لوواستاتین. گروه‌های تیمار شده با داروی لوواستاتین تکثیر سلولی بیشتری را نشان می‌دهد.

#### بقا و تکثیر سلولی به روش MTT

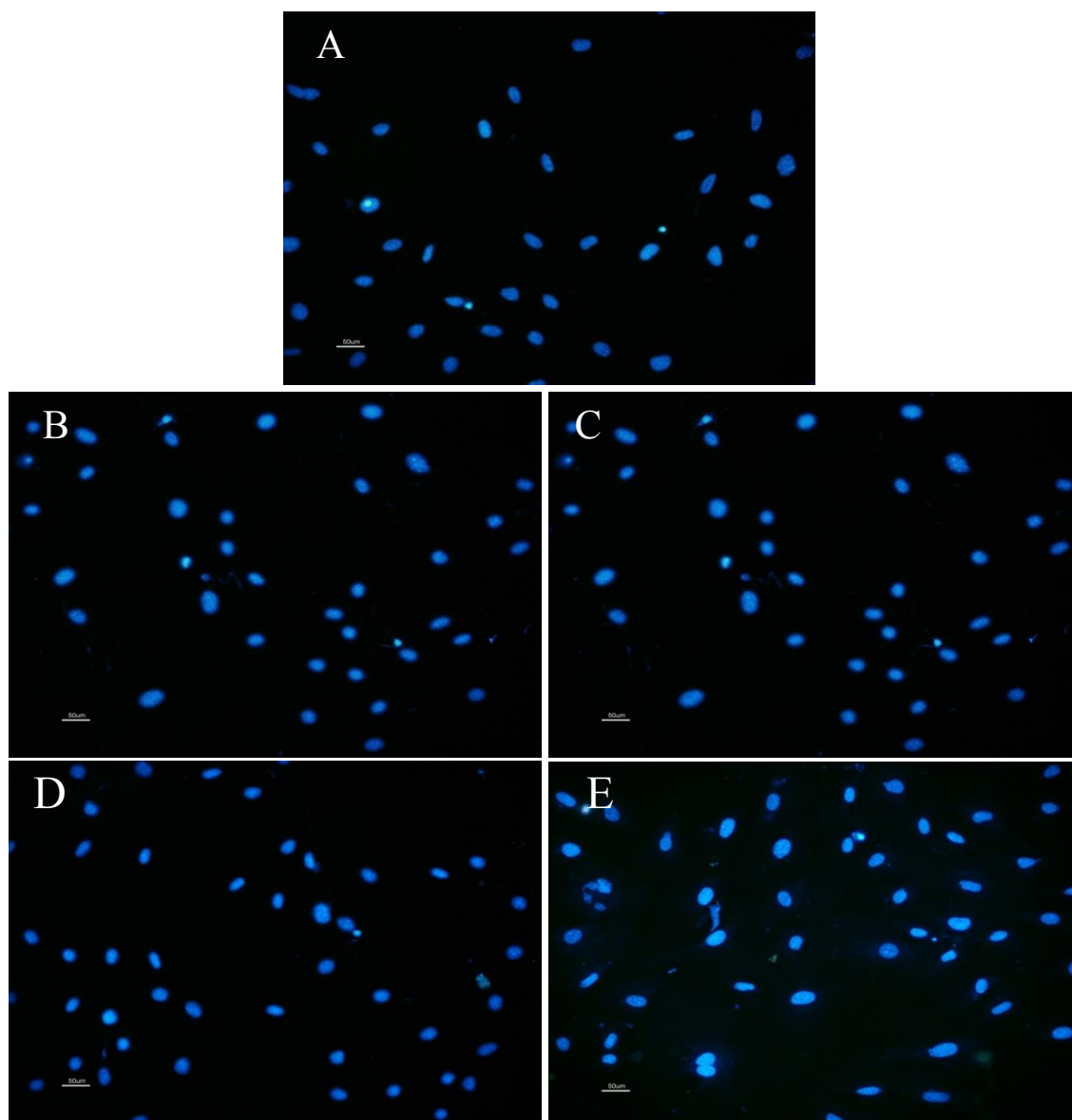
بقا و حیات سلولی توسط روش MTT ارزیابی و نتایج آن در جدول ۱ نشان می‌دهد که همه گروه‌های تیمار بجز غلظت ۱ میکرومولار لوواستاتین با یکدیگر و با گروه کنترل اختلاف معنی‌داری دارند ( $p < 0.05$ ). این نشان دهنده افزایش بقا سلولی و نیز تعداد سلول‌ها در طی زمان آزمایش و همچنین ارتباط با افزایش دوز دارو است.



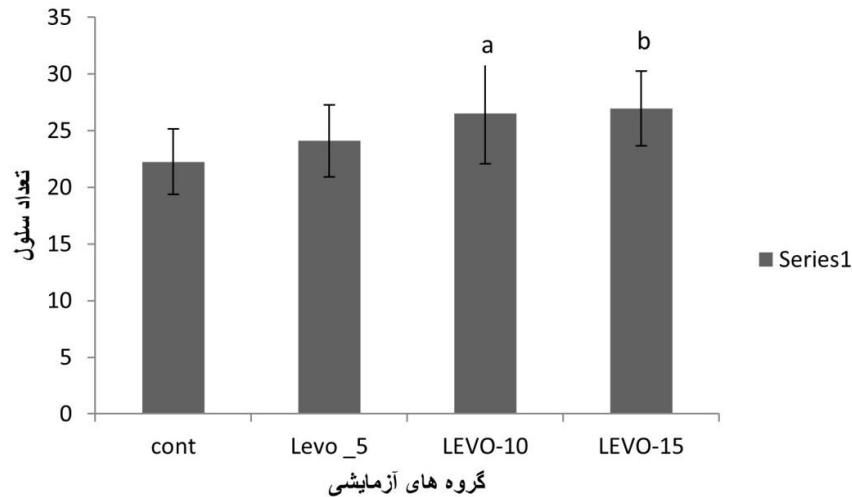
نمودار ۱: مقایسه تکثیر سلول‌های سلول‌های بنیادی مزانشیمی به روش MTT در گروه‌های تیمار و کنترل. گروه‌های تیمار در معرض دوزهای ۱، ۵، ۱۰ و ۱۵ میکرومولار لوواستاتین بوده‌اند. با افزایش دوز دارو بر تعداد سلول‌ها افزوده می‌شود. گروه‌های ۵، ۱۰ و ۱۵ میکرومولار لوواستاتین با یکدیگر و با گروه کنترل اختلاف معنی‌دار دارند ( $p < 0.05$ ). ستون‌های a، b و c با یکدیگر و با ستون‌های فاقد علامت معنی دارند. مقایسه بین گروهی و بررسی اختلاف بین گروه‌ها با آزمون واریانس یک‌طرفه انجام شده است.

#### نتایج تکثیر سلولی به روش رنگ‌آمیزی با DAPI

نمای میکروسکوپ فلورسنس رنگ‌آمیزی هسته سلول‌ها با DAPI در شکل ۲ مشاهده می‌شود. این رنگ از غشای سلول عبور می‌کند و هسته سلول‌های زنده به رنگ آبی دیده می‌شود. میزان تکثیر و رشد سلول‌های MSC در گروه‌های کنترل و تیمار شده نشان می‌دهد که همه گروه‌های تیمار نسبت به گروه کنترل افزایش داشته و غلظت‌های ۱۰ و ۱۵ میکرومولار نسبت به سایر گروه‌ها اختلاف معنی‌داری را نشان می‌دهد ( $p < 0.05$ ). همانگونه که در شکل ۲ و نمودار ۲ مشاهده می‌شود با افزایش دوز داروی لوواستاتین بر تعداد سلول‌ها افزوده می‌شود. مطالعه حاضر نشان داد که داروی لوواستاتین موجب افزایش بقا، تکثیر MSCs می‌شود.



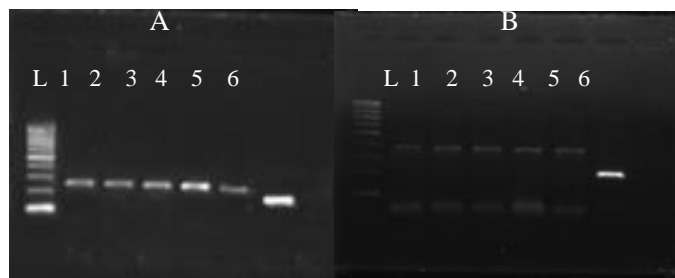
شکل ۲: نمای میکروسکوپ فلورسنس سلول‌های بنیادی مزانشیمی در گروه‌های مختلف. A: گروه کنترل در شرایط کشت بدون تیمار، B: گروه سلولی تیمار با دوز ۱ میکرومولار لوواستاتین C: گروه سلولی تیمار با دوز ۵ میکرومولار لوواستاتین D: گروه سلولی تیمار با دوز ۱۰ میکرومولار لوواستاتین E: گروه سلولی تیمار با دوز ۱۵ میکرومولار لوواستاتین. گروه‌های تیمار شده با داروی لوواستاتین تعداد سلولی بیشتری را در هر میدان دید نشان می‌دهد.



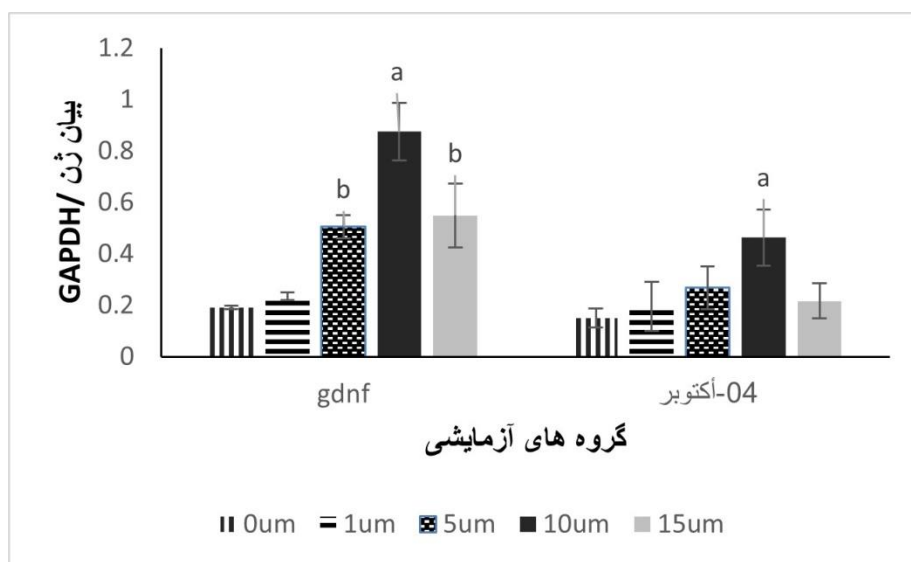
نمودار ۲: مقایسه تکثیر سلول‌های BMSC رنگ شده با DAPI در گروه‌های تیمار و کنترل. گروه‌های تیمار در معرض دوز های ۱، ۵، ۱۰ و ۱۵ میکرومولار لوواستاتین بوده‌اند. گروه‌های ۱۰ و ۱۵ میکرومولار با گروه کنترل اختلاف معنی دار دارند ( $p < 0/05$ ). افزایش دوز دارو با افزایش تعداد سلولی ارتباط دارد. ستون‌های a و b با یکدیگر و با ستون‌های فاقد علامت معنی دارند ( $p < 0/05$ ). مقایسه بین گروهی و بررسی اختلاف بین گروه‌ها با آزمون واریانس یک‌طرفه انجام شده است.

### نتایج RT-PCR

نتایج الکتروفورز محصول PCR گروه‌ها در شکل ۳ نشان می‌دهد که علاوه بر بیان فاکتور نوروتروفیک (Glial cell line- GDNF) (derived neurotrophic factor) و فاکتور نسخه‌برداری تکثیر سلول‌های بنیادی Oct4 (octamer-binding transcription factor Oct4) (4) در همه گروه‌های مورد آزمایش، تاثیر دوز دارو لوواستاتین بر میزان بیان مشاهده شد. بیان نیمه کمی ژن GDND در گروه‌های ۵، ۱۰ و ۱۵ میکرومولار نسبت به گروه کنترل معنی دار است ( $p < 0/05$ ). همچنین بیان ژن Oct4 در مقایسه با یکدیگر و گروه کنترل فقط در دوز ۱۰ میکرومولار اختلاف معنی دار دارد ( $p < 0/05$ ) (نمودار ۳).



شکل ۳: ژل الکتروفورز محصول بیان ژن GDNF (A) و ژن Oct4 (B) در گروه‌های سلولی کنترل و تیمار با دوز های ۱، ۵، ۱۰ و ۱۵ میکرومولار لوواستاتین به ترتیب از چپ به راست با ۱، ۲، ۳، ۴ و ۵ شماره گذاری شده است. ستون اول Ladder با اندازه ۱۰۰bp انتخاب شده و ستون ۶ ژن خانگی (housekeeping gene) است. میزان بیان متناسب با شدت باندها در تصویر مشاهده می‌شود.



نمودار ۳: مقایسه نیمه کمی بیان ژن GDNF و ژن Oct4 در گروه‌های، کنترل و تیمار با دوز های ۱، ۵، ۱۰ و ۱۵ میکرومولار لوواستاتین در سلول‌های BMSC. برای ژن GDNF دوز ۱۰ میکرومولار نسبت به سایر گروه‌ها و دوز ۵ و ۱۵ با گروه کنترل و دوز ۱ میکرومولار اختلاف معنی‌دار دارد. برای ژن Oct4 دوز ۱۰ میکرومولار نسبت به سایر گروه‌ها اختلاف معنی‌داری را نشان می‌دهد ( $p < 0.05$ ). ستون‌های a و b با یکدیگر و با ستون‌های فاقد علامت معنی دارند ( $p < 0.05$ ). مقایسه بین گروهی و بررسی اختلاف بین گروه‌ها با آزمون واریانس یک‌طرفه انجام شده است.

## ۵- بحث

در مطالعات قبلی ماهیت سلول‌های بنیادی مزانشیمی با نشاگرهای سطحی اختصاصی سلولی و نیز ظرفیت تمایز آن‌ها به رده‌های سلولی مزانشیمی تایید و گزارش شد [۱۱، ۱۲]. در مطالعه حاضر نیز سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان بر روی سطح پلاستیک فلاسک چسبیده (کشت چسبیده) و به صورت یک‌دست و نمای مورفولوژیکی دوکی شکل تکثیر نمودند. همچنین در این مطالعه بهبود شرایط کشت، یک‌دست بودن سلول‌ها و افزایش قابلیت تکثیر سلولی با استفاده از دوزهای مختلف داروی لوواستاتین، نشان داده شد. بقا و حیات سلولی (به روش MTT) در حضور لوواستاتین به صورت وابسته به دوز افزایش معنی‌دار نشان داده و تکثیر سلولی به صورت وابسته به دوز رشد داشت که در غلظت‌های ۵ و ۱۰ میکرومولار افزایش معنی‌داری نشان داد (نمودار ۱ و ۲).

Kim و همکاران (۱۵) بیان داشتند که لوواستاتین به عنوان یک عامل کاهش دهنده کلاسترول اثر تکثیر سلولی و آپوپتوزیس دارد. آن‌ها در مطالعه خود اثرات لوواستاتین بر تکثیر و تمایز استخوانی اشکال کروی سلولی در کشت سه بعدی تشکیل شده از سلول‌های بنیادی مشتق (GDSCs - gingiva-derived stem cells) از لثه انسانی را بررسی کردند. نتایج آن‌ها نشان داد که لوواستاتین در غلظت ۲ و ۶ میکرومولار، بقای سلولی و قطر اشکال کروی (diameters of the cell spheroids) سلول‌های بنیادی را افزایش داد. در مقابل، Kupcsik و همکاران (۱۶) بقا و تکثیر سلولی را در محیط آزمایشگاهی (in vitro) بر روی سلول‌های بنیادی مزانشیمی انسانی با روش MTT و سنجش مقدار DNA (DNA content) بررسی و گزارش کردند که لوواستاتین در دوز ۱ و ۵ میکرومولار در کشت طولانی مدت اثر مهاری بر بقا و تکثیر سلولی دارد. در مطالعه ما علاوه بر بقا و تکثیر MSCs در شرایط کشت با دو روش MTT و شمارش سلول‌های رنگ‌شده، بیان Oct4 و GDNF نیز با روش مولکولی RT-PCR در سطح mRNA ارزیابی شد.

Oct4 یک فاکتور نسخه‌برداری مهم در تعیین سرنوشت سلول و حفظ پرتوانی سلولی و شبکه تنظیم کننده ژن در سلول‌های بنیادی پرتوان است (۱۷). در مطالعه حاضر بیان آن برای ارزیابی حفظ ظرفیت تکثیر MSCs پس از تیمار با لوواستاتین ضروری به نظر می‌رسید. از طرفی هدف این پژوهش بهبود شرایط کشت آزمایشگاهی است و برخی گزارش‌ها نشان می‌دهد که افزایش بیان این فاکتور در دست‌ورزی‌ها می‌تواند موجب تومورزایی شود (۱۸)، نتایج بیان نیمه کمی محصول PCR نشان داد که لوواستاتین در دوز ۱۰ میکرومولار، توانسته میزان بیان ژن Oct4 در سطح mRNA را افزایش دهد (شکل ۳ و نمودار ۳).

استاتین‌ها آسیب‌های مغزی را بهبود می‌بخشند و در پیشگیری از بیماری آلزایمر نتایج امیدوارکننده‌ای نشان دادند. با این حال، مکانیسم‌هایی که استاتین‌ها توسط آن موجب درمان بیماری‌های عصبی می‌شوند، به‌طور کامل شناخته نشده‌اند. در یک مطالعه، شواهد اولیه نشان داد که سیموواستاتین نورون‌زایی را در سلول‌های پیش ساز عصبی بالغ کشت شده و همچنین در شکنج دندان‌های موش های بالغ افزایش می‌دهد (۱۹). نتایج مطالعه دیگری نشان داد که اثر نورولوژیک سیموواستاتین می‌تواند از طریق فعال شدن مسیر پیام رسانی Akt، پس از آن افزایش بیان فاکتورهای رشد و القای نورون‌زایی در شکنج دندان‌های هیپوکامپ منجر به بازسازی عملکرد شناختی موش صحرایی مبتلا به آسیب مغزی می‌شود (۲۰ و ۲۱). نتایج مطالعه دیگری در سال ۲۰۱۹ بر روی مدل بیماری صرع در موش صحرایی که با لوواستاتین تحت درمان قرار گرفته بودند، افزایش بیان فاکتورهای نوروتروفیک GDNF و CNT و بدنبال آن کاهش مرگ سلول‌های هیپوکامپ و افزایش تعداد نورون‌ها و بهبود بیماری را نشان دادند (۲۲).

نتایج RT-PCR برای دو ژن GDNF و oct4 نشان داد که داروی لوواستاتین بر بیان این دو فاکتور اثر القایی داشته و بیشترین بیان در دوز ۱۰ میکرومولار دیده شد. یکی از اهداف پژوهش در حوزه سلول‌های بنیادی، بهبود شرایط کشت MSCs برای حفظ و تقویت توان خودتکثیری و قابلیت نوروتروفیک سلول‌ها پیش از استفاده برای مقاصد درمانی است. اخیراً گزارش شده که استاتین‌ها اثرات ضد التهابی و محافظتی عصبی دارند. نورون‌های دستگاه عصبی در زمان تکوین به عوامل نوروتروفیک برای رشد و بقا نیاز دارند (۲، ۲۳، ۲۴). مطالعات بیشماری گزارش کردند که فاکتورهای نوروتروفیک به‌طور گسترده در بقا، تکثیر و بلوغ جمعیت‌های سلول‌های عصبی، نقش حمایتی ایفا می‌کنند. این نقش حمایتی موجب بازسازی عصبی در بیماری‌های مانند آلزایمر، پارکینسون و هانتینگتون می‌شود (۲۷-۲۵). GDNF با افزایش میلینه‌شدن آکسون‌های آسیب دیده، نقش مهمی در بقای نورون‌ها بازی می‌کند و موجب ترمیم طناب نخاعی می‌گردد. اثرات درمانی GDNF در بیماری‌های مختلف سیستم عصبی مرکزی مانند پارکینسون، سگته مغزی و صرع، تایید شده است (۲۸، ۲۹). ما نیز در این مطالعه مشاهده کردیم که لوواستاتین بر بیان GDNF در سلول‌های بنیادی مزانشیمی، اثر القایی داشته و مقدار بیان را در دوزهای ۵، ۱۰ و ۱۵ میکرومولار افزایش داده است. در مطالعه‌ای مشابه در شرایط آزمایشگاهی لوواستاتین با غلظت‌های ۲، ۴، ۶، ۸ و ۱۰ میکرومولار بر سلول‌های بنیادی عصبی بررسی و علاوه بر افزایش بقا سلولی، افزایش بیان mRNA فاکتورهای نوروتروفیک گزارش شد (۱). همانگونه که پیشتر گفته شد، طراحی شرایط کشت بهینه برای MSCs قبل از پیوند، یکی از اهداف و برنامه‌های مهم بسیاری از پژوهش‌های سال‌های اخیر محسوب می‌شود (۱، ۱۰، ۳۰). Mukhamedshina و همکاران (۱۰) به منظور درمان آسیب طناب نخاعی (spinal cord injury-SCI) توسط پیوند MSCs با ایجاد شرایط کشت بهینه، قابلیت تکثیر و مهاجرت این سلول‌ها را در روند درمانی سرعت بخشیدند (۱۰). رشد و تکثیر مطلوب MSCs به همراه مورفولوژی یکدست فیبروبلاست مانند و نیز حفظ ویژگی‌های اصلی MSCs در شرایط *in vitro* نیاز به محیط کشت اختصاصی به همراه فاکتورهای رشد اختصاصی دارد.

## ۶- نتیجه‌گیری

نتایج این مطالعه نشان داد که داروی لوواستاتین قادر است شرایط کشت MSCs را بهبود بخشد و علاوه بر افزایش قابلیت بقا و تکثیر سلولی، ظرفیت نوروتروفیک MSCs را تقویت نماید. این نتایج در کنار شواهد گزارش شده قبلی به اثر سودمند و موثر ترکیب دارویی لوواستاتین برای درمان بیماری‌های تحلیل‌برنده عصبی مانند آلزایمر تاکید می‌نماید.

## 7- تشکر و قدردانی

از دانشگاه دامغان بابت تامین هزینه و امکانات آزمایشگاهی تشکر می‌گردد.

## 8- منابع

1. Fakheri F, Abdanipour A, Parivar K, Anarkooli IJ, Rastegar H. Lovastatin alters neurotrophin expression in rat hippocampus- derived neural stem cells in vitro. *Acta Neurobiol Exp (Wars)*. 2019; 79(4): 413-420.
2. Dolga AM, Nijholt IM, Ostroveanu A, Ten Bosch Q, Luiten PG, Eisel UL. Lovastatin induces neuroprotection through tumor necrosis factor receptor 2 signaling pathways. *Journal of Alzheimer's Disease*. 2008; 13(2): 111-22.
3. Kim BB, Tae JY, Ko Y, Park JB. Lovastatin increases the proliferation and osteoblastic differentiation of human gingiva-derived stem cells in three-dimensional cultures. *Exp Ther Med*. 2019; 18(5): 3425-3430.
4. Houshmand B, Hassanizade R, Eslami B, Amouei S, Dashti G, Morad G, Khojasteh A. Simvastatin and Lovastatin Induce Ectopic Bone Formation in Rat Subcutaneous Tissue. *J Periodontol Implant Dent*. 2010;2(1): 12-16.
5. Park, J.-B., et al., Simvastatin maintains osteoblastic viability while promoting differentiation by partially regulating the expressions of estrogen receptors  $\alpha$ . *Journal of Surgical Research*, 2012. 174(2): p. 278-283.
6. Meor Anuar Shuhaili MFR, et al. Effects of Different Types of Statins on Lipid Profile: A Perspective on Asians. *Int J Endocrinol Metab*. 2017; 15(2):e43319.
7. Han Y, Li X, Zhang Y, Han Y, Chang F, Ding J. Mesenchymal Stem Cells for Regenerative Medicine. *Cells*. 2019; 8(8): 886.
8. Dave JR, Tomar GB. Dental Tissue-Derived Mesenchymal Stem Cells: Applications in Tissue Engineering. *Crit Rev Biomed Eng*. 2018; 46(5): 429-468.
9. Samsonraj RM, Raghunath M, Nurcombe V, Hui JH, van Wijnen AJ, Cool SM. Concise Review: Multifaceted Characterization of Human Mesenchymal Stem Cells for Use in Regenerative Medicine. *Stem Cells Transl Med*. 2017; 6(12): 2173-2185.
10. Mukhamedshina Y, et al. Improving Culture Conditions, Proliferation, and Migration of Porcine Mesenchymal Stem Cells on Spinal Cord Contusion Injury Model in vitro. *Cells Tissues Organs*. 2020;209(4-6):236-247.
11. Mirzaeiyan L, Ghorbanian M T, Lashkarbolouki T, Haji-Ghasem-Kashani M, Dehghan R. Examination of antioxidant enzymes and matrix metalloproteinases in conditional medium of bone marrow mesenchymal stem cells and adipose-derived stem cells in vitro. *Koomesh*, 2014; 15 (3): 350-358.
12. Nikoozad Z, Ghorbanian MT, Rezaei A. Comparison of the liver function and hepatic specific genes expression in cultured mesenchymal stem cells and hepatocytes. *Iranian journal of basic medical sciences*. 2014; 17 (1), 27-33.
13. Azari M, Ghorbanian MT, Elah Dadi Salmani M Effect of exogenous estrogen treatment on hippocampal neurogenesis in ovariectomized mice. *Journal of Gorgan University of Medical Sciences* 2018; 20: 35-41.
14. Ghorbanian M T, Haji-Ghasem-Kashani M, Hossein-Pour L, Mirzaeiyan L. Expression of nestin and nerve growth factors in adipose-derived mesenchymal stem cells . *Feyz*. 2011; 15 (4) :322-330.
15. Kim BB, Tae JY, Ko Y, Park JB. Lovastatin increases the proliferation and osteoblastic differentiation of human gingiva-derived stem cells in three-dimensional cultures. *Exp Ther Med*. 2019; 18(5): 3425-3430.
16. Kupcsik L, Meurya T, Flury M, Stoddart M, Alini M.J. Statin-induced calcification in human mesenchymal stem cells is cell death related. *Cell Mol Med*. 2009;13(11-12): 4465-73.
17. Balboa D, Weltner J, Novik Y, Eurola S, Wartiovaara K, Otonkoski T Generation of an OCT4 reporter human induced pluripotent stem cell line using CRISPR/SpCas9. *Stem Cell Res*. 2017; 23: 105-108.
18. Mohiuddin IS, Wei SJ, Kang MH. Role of OCT4 in cancer stem-like cells and chemotherapy resistance. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*. 2020 ;1866(4):165432.
19. Robin NC, Agoston Z, Biechele TL, James RG, Berndt JD, Moon RT. Simvastatin promotes adult hippocampal neurogenesis by enhancing Wnt/beta-catenin signaling. *Stem Cell Reports*. 2013; 2(1): 9-17.
20. Wang C, Chen T, Li G, Zhou L, Sha S, Chen L. Simvastatin prevents beta-amyloid(25-35)-impaired neurogenesis in hippocampal dentate gyrus through  $\alpha 7nAChR$ -dependent cascading PI3K-Akt and increasing BDNF via reduction of farnesyl pyrophosphate. *Neuropharmacology*. 2015; 97: 122-32.
21. Lu D, Qu C, Goussev A, Jiang H, Lu C, Schallert and et al. Statins increase neurogenesis in the dentate gyrus, reduce delayed neuronal death in the hippocampal CA3 region, and improve spatial learning in rat after traumatic brain injury. *Neurotrauma*. 2007; 24(7):1132-46.

22. Moradi P, Ganjkhani M, Anarkooli IJ, Abdanipour A. Neuroprotective effects of lovastatin in the pilocarpine rat model of epilepsy according to the expression of neurotrophic factors. *Metab Brain Dis*. 2019; 34(4):1061-1069.
23. Ghayour MB, Abdolmaleki A, Rassouli MB. Neuroprotective effect of Lovastatin on motor deficit induced by sciatic nerve crush in the rat. *Eur J Pharmacol*. 2017; 812: 121-127.
24. Yan JQ, Ma YJ, Sun JC, Bai SF, Huang LN. Neuroprotective effect of lovastatin by inhibiting NMDA receptor1 in 6-hydroxydopamine treated PC12 cells. *Int J Clin Exp Med*. 2014; 7(10): 3313-9.
25. Xiao N, Le QT. Neurotrophic Factors and Their Potential Applications in Tissue Regeneration. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*. 2016; 64(2): 89-99.
26. Harvey AR, Lovett SJ, Majda BT, Yoon JH, Wheeler LP, Hodgetts SI. Neurotrophic factors for spinal cord repair: Which, where, how and when to apply, and for what period of time? *Brain Res*. 2015; 1619: 36-71.
27. Xiao N, Quynh Thu L. Neurotrophic factors and their potential applications in tissue regeneration. *Arch Immunol Ther Exp*. 2016; 64: 89-99.
28. Gao K, Wang G, Wang Y, Han D, Bi J, Yuan Y, Yao T, Wan Z, Li H, Mei X. Neuroprotective effect of simvastatin via inducing the autophagy on spinal cord injury in the rat model. *Biomed Res Int*. 2015: 260161.
29. Razavi S, Ghasemi N, Mardani M, Salehi H. Remyelination improvement after neurotrophic factors secreting cells transplantation in rat spinal cord injury. *Iran J Basic Med Sci*. 2017 20: 392-398.
30. Sun L, Zhang Y, Zhang J, Wang J, Xing S. Atorvastatin improves the proliferation and migration of endothelial progenitor cells via the miR-221/VEGFA axis. *Biosci Rep*. 2020; 40(11): BSR20193053.