

## اثر عصاره الکلی خیار دریایی گونه خلیج فارس بر تمایز اوستئوژنیک و آدیپوژنیک سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان موش صحرایی

جواد بهار آرا<sup>۱\*</sup>، الهه امینی<sup>۲</sup> Ph.D. Student، فریده نامور<sup>۳</sup> Ph.D، مژگان سلطانی<sup>۴</sup> Ph.D. Student

۱- دانشگاه آزاد اسلامی واحد مشهد، گروه زیست شناسی و مرکز تحقیقات بیولوژی کاربردی تکوین جانوری، مشهد، ایران  
 ۲- دانشجوی دکتری تخصصی زیست شناسی تکوین جانوری، دانشگاه خوارزمی، دانشکده علوم زیستی، تهران، ایران  
 ۳- دانشجوی دکتری تخصصی زیست شناسی تکوین جانوری دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم تحقیقات، تهران، ایران  
 \* پست الکترونیک نویسنده مسئول: baharara@yahoo.com

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۲/۱۰/۲۴

تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۸/۲۲

### چکیده

**هدف:** خیار دریایی به دلیل دارا بودن ترکیبات بیواکتیو مانند کندروئیتین سولفات در درمان بیماری‌های استخوانی مورد توجه است. در زمینه به کارگیری سلول‌های بنیادی مزانشیمی در ترمیم آسیب‌های استخوانی در سال‌های اخیر پیشرفت‌های خوبی انجام شده است. بنابراین پژوهش حاضر با هدف بررسی تمایز اوستئوژنیک و آدیپوژنیک عصاره الکلی خیار دریایی گونه خلیج فارس روی سلول‌های بنیادی مغز استخوان موش صحرایی نر نژاد ویستار صورت گرفت.

**مواد و روش‌ها:** در این تحقیق تجربی آزمایشگاهی، سلول‌های بنیادی مغز استخوان موش صحرایی نر توسط فلاشینگ جداسازی و توسط ایمنوسیتوشیمی تایید گردیدند. سلول‌ها در ۹ گروه تجربی با دوزهای مختلف عصاره الکلی خیار دریایی ۳/۵، ۶/۲۵، ۱۲/۵، ۲۵، ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰، ۴۰۰ و ۸۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر تیمار شده و با روش MTT سیتوتوکسیسیته عصاره مشخص گردید. ۲۱ روز بعد، تمایز اوستئوژنیک و آدیپوژنیک توسط رنگ‌آمیزی آلیزارین رد، اوایل رد و کیت آکالین فسفاتاز بررسی شد. داده‌های کمی توسط نرم افزار SPSS، آزمون ANOVA در سطح  $P < 0/05$  تحلیل شدند.

**نتایج:** دوز مناسب برای تیمار سلول‌های بنیادی غلظت‌های کمتر از ۵۰ میکروگرم بر میلی لیتر تعیین شد. رنگ‌آمیزی اوایل رد نشان داد خیار دریایی قابلیت تمایز سلول‌های بنیادی به دودمان آدیپوژنیک ندارد. رنگ‌آمیزی آلیزارین رد و فعالیت آکالین فسفاتاز نشان دادند دوز ۲۵ میکروگرم بر میلی لیتر عصاره الکلی خیار دریایی موثرترین دوز تمایز سلول‌های بنیادی به دودمان اوستئوژنیک است.

**نتیجه‌گیری:** نتایج این پژوهش بیان گر پتانسیل تمایزی اوستئوژنیک عصاره خیار دریایی خلیج فارس بر سلول‌های مزانشیمی مغز استخوان موش صحرایی می‌باشد.

**واژگان کلیدی:** خیار دریایی، اوستئوژنیک، موش صحرایی، آدیپوژنیک، تمایز

## مقدمه

بیماری‌های استخوانی ایجاد شده توسط هومئوستازی غیر طبیعی استخوان می‌توانند از طریق القا عمل کرد اوستئوبلاستی درمان شوند. از این رو شناسایی داروهایی که موجب تسریع شکل‌گیری استخوان شوند، ابزار کلیدی در درمان بیماری‌های استخوانی به‌شمار می‌رود (۱). سلول‌های بنیادی مزانشیمی چند توان به‌دلیل دارا بودن ظرفیت بالای تکثیر و تمایز منبع سلولی ارزشمندی در پزشکی ترمیمی به‌شمار رفته و می‌توانند به چند نوع سلول از جمله اوستئوبلاست، آدیپوسیت و کندروسیت تمایز یابند (۲). مطالعات نشان داده‌اند این سلول‌ها به‌عنوان منبع سلول‌های پیش ساز استخوانی می‌باشند و تمایز اوستئوبلاستی توسط فاکتورهای مختلفی از جمله (bone morphogenetic proteins), BMPs (transforming growth factor  $\beta$ ), TGF (insulin , FGF-2 (fibroblast growth factor-2), IGF-1 growth factor-1) و برخی عوامل دیگر تنظیم می‌شود (۳).

تمایز اوستئوبلاستی رویداد کلیدی در شکل‌گیری استخوان است و می‌تواند به سه مرحله تکثیر، مرحله بلوغ و سنتز ماتریکس خارج‌سلولی و مرحله معدنی شدن تقسیم شود که نشان‌گرهای فنوتیپی به‌طور متمایزی در هر مرحله بیان می‌شوند، به‌عنوان مثال اوستئوبلاست‌های فعال، مارکرهای اولیه تمایز اوستئوبلاستی یعنی بیان فراوان آلکالین فسفاتاز و کلاژن نوع ۱ را نشان می‌دهند، این در حالی است که به‌نظر می‌رسد اوستئوکلسین و اوستئوپوننتین در مراحل دیرتر همزمان با معدنی شدن بیان می‌شوند (۴).

تا به امروز داروهای فراوانی در درمان بیماری‌های استخوانی گزارش شده‌اند که در هر حال اکثر این داروها متوقف‌کننده بازجذب استخوان هستند و اثرات جانبی زیادی دارند، برای مثال درمان جایگزینی استروژن که از دژنره شدن توده استخوان در زنان، پس از دوره یائسگی پیشگیری می‌نماید، علی‌رغم وجود فواید بسیار موجب افزایش بروز سرطان تخمدان و پستان می‌شود، از این‌رو پژوهشگران سعی دارند ترکیباتی را شناسایی کنند که بتوانند بدون ایجاد عارضه جانبی خاص، شکل‌گیری استخوان را افزایش دهد (۵).

سلول‌های بنیادی مزانشیمی پتانسیل قابل توجه درمانی زیادی را در زمینه درمان بیماری‌های مختلف دارا هستند (۶)، از طرفی

با توجه به توان بالای سلول‌های مزانشیمی مشتق از مغز استخوان در تمایز به رده‌های سلولی متفاوت و استفاده از این رده‌های سلولی در درمان بسیاری از بیماری‌ها از جمله نقایص استخوانی و غضروف، فراهم نمودن شرایطی که روند تمایز و ترمیم بافت‌های سخت و اسکلتی بهبود یا تسهیل یابد از اهمیت ویژه‌ای برخوردارند (۷). یکی از غنی‌ترین منابع حاوی چنین ترکیباتی اکوسیستم‌های آبی است که در آنها گونه‌های مختلفی از جانوران، گیاهان و میکروارگانیسم‌ها زیست می‌نمایند، این اکوسیستم‌ها به‌دلیل وجود تنوع بالای مواد طبیعی دارای فعالیت بیولوژیک منحصر به‌فرد هستند و توجه دانشمندان را در دهه‌های اخیر به‌شدت معطوف خود کرده‌اند، به‌عنوان مثال فراورده‌های طبیعی نظیر عصاره‌های استخراج شده از جلبک‌های دریایی دارای ترکیباتی هستند که می‌توان آن‌ها را برای سنتز داربست‌ها و نیز تمایز استفاده نمود (۱). موجودات دریایی همچون اسفنج‌ها، مرجان‌های دریایی، تونیکات‌ها، نرم‌تنان دریایی و میکروارگانیسم‌های دریایی امروزه برای مطالعه و جستجوی کاندیداهای دارویی جدید مورد توجه قرار گرفته‌اند و بسیاری از ترکیبات مشتق شده از موجودات زنده دریایی دارای فعالیت‌های بیولوژیک امید بخشی در زمینه درمان بیماری‌ها هستند (۸).

محققین در حدود ۷۰۰۰ فراورده دریایی را جداسازی نموده‌اند که ۲۰ درصد آن مربوط به جلبک‌ها، ۳۳ درصد اسفنج‌ها، ۱۸ درصد مرجانیان و ۲۴ درصد مربوط به سایر بی‌مهرگان از جمله اکینودرم‌ها می‌باشند (۹). کشور ایران از لحاظ دارا بودن چنین منابعی در زمینه فراورده‌های طبیعی غنی به‌شمار می‌آید (۱۰). بررسی ترکیبات موجود در اکینودرم‌ها نشان می‌دهد که این جانوران حاوی ترکیبات فعال زیستی با خواص دارویی می‌باشند که در بسیاری از فرایندهای زیستی نقش ایفا می‌کنند (۱۱). خیار دریایی در طب سنتی برای درمان بیماری‌های مختلف مورد استفاده قرار گرفته است و یکی از ارگانیزم‌های دریایی با ارزش غذایی و درمانی بالا به‌شمار می‌آید که خواص دارویی آن به‌دلیل حضور ترکیبات عمل‌کردی با فعالیت بیولوژیکی چند گانه نسبت داده می‌شود (۱۲).

خیار دریایی به‌عنوان یک بی‌مهره دریازی دارای پروفایل با ارزش منحصر به‌فرد، از مواد مغذی دارای خاصیت دارویی همانند تیامین، ریبوفلاوین، نیاسین و مواد معدنی از جمله کلسیم است که دارای خواص بیولوژیک نظیر مهار رگ‌زایی، ضد سرطان، ضد

مراحل انجام تحقیق، موارد اخلاقی کار با حیوان مطابق مقررات کمیته اخلاق دانشگاه رعایت گردید.

تکنیک ایمنوسیتوشیمی جهت اثبات بنیادی بودن سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان: برای این منظور دو هفته پس از جداسازی و تخلیص سلول‌های مزانشیمی و حذف سایر سلول‌های موجود در مغز استخوان، سلول‌های مزانشیمی در پلیت ۹۶ خانه‌ای کشت داده شد و پس از چسبیدن سلول‌ها به کف فلاسک، سلول‌ها سه مرتبه با PBS سرد شستشو داده شده، سپس در معرض پارافرمالدئید سرد ۴ درصد قرار گرفته و با آنتی‌بادی اولیه بر علیه مارکر سطحی سلول‌های بنیادی CD44 (Abcam, England) به مدت یک ساعت انکوبه شدند. پس از طی زمان مذکور، سلول‌ها در معرض آنتی‌بادی ثانویه کونژوگه با FITC (Sigma, USA) برای نشان دادن سلول‌ها و همچنین رنگ DAPI (Sigma, USA) جهت رنگ‌آمیزی هسته سلول‌ها قرار داده شدند و سپس با میکروسکوپ فلورسنت (Labomed, Korea) بررسی انجام شد.

آماده سازی عصاره الکلی خیار دریایی: نمونه‌های خیار دریایی از آب‌های خلیج فارس مجاور جزیره قشم جمع‌آوری و به مرکز تحقیقات بیولوژی کاربردی تکوین جانوری، دانشگاه آزاد اسلامی مشهد منتقل و پس از بررسی‌های مورفومتریک اولیه محتویات داخلی بدن آن‌ها تخلیه و بخش بیرونی بدن آن‌ها را خشک کردیم، سپس به ازای هر گرم وزن خشک بدن، ۱۰ میلی‌لیتر متانول استفاده شد و به مدت سه شبانه روز بر روی شیکر چرخشی قرار داده شد. پس از طی زمان مذکور، عصاره با استفاده از کاغذ واتمن ۱۰ صاف گردیده و توسط دستگاه وکیوم تبخیری (Heidolph, Germany) عصاره گیری و تغلیظ انجام و درون آون (Memmert, Germany) ۴۰ درجه سانتی‌گراد خشک و سپس در دمای ۲۰- درجه نگهداری شدند.

تعیین سیتوتوکسیسیته عصاره الکلی خیار دریایی با استفاده از روش MTT: به منظور بررسی دوز مناسب عصاره خیار دریایی بر روی سلول‌های بنیادی مغز استخوان موش صحرایی نژاد ویستار، ۲۴ ساعت پس از کشت سلول‌های مذکور، این سلول‌ها با دوزهای متفاوت میکروگرم بر میلی لیتر ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰، ۴۰۰ و ۸۰۰ رقیق شد، در DMSO ۱۰ درصد عصاره تام الکلی خیار دریایی تیمار شد و پس از ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت از تیمار، محیط رویی تخلیه و ۲۰ میکرولیتر محلول ۵ میلی گرم در میلی لیتر MTT (Sigma, USA) به سلول‌ها اضافه شده و پس از ۴

التهاب، آنتی اکسیدانت است. همچنین این جانور حاوی ترکیبات فعال زیستی نظیر گلیکوزآمینوگلیکان، کندروئیتین سولفات، گلیکوزیدهای تری‌ترپنه، ترکیبات فنلی و اسیدهای چرب می‌باشد و امید می‌رود در جهت تمایز سلول‌ها و تسهیل و پیشبرد این فرایند با هدف تولید رده‌های سلولی گوناگون و استفاده از آن‌ها در درمان بسیاری از بیماری‌ها مفید واقع شود (۱۳). با توجه به رویکرد نو و اقبال جامعه جهانی به فراورده‌های طبیعی و از آنجایی که در طب سنتی از موجودات دریایی نظیر خیار دریایی برای التیام دردهای مفصلی و استخوانی استفاده می‌شود و کشور ایران نیز دارای ذخایر دریایی غنی از این گروه جانوری می‌باشد که تا کنون مطالعه‌ای در زمینه اثرات ترکیبات آن‌ها بر تمایز سلول‌های بنیادی و سلول درمانی انجام نشده است لذا در پژوهش حاضر اثر عصاره تام الکلی خیار دریایی گونه خلیج فارس در پیشبرد تمایز سلول‌های مزانشیمی مغز استخوان موش صحرایی نژاد ویستار به سمت دودمان‌های اوستئوژنیک و آدیپوژنیک بررسی شده است.

## مواد و روش‌ها

جداسازی و کشت سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان: موش‌های صحرایی نژاد ویستار با سن تقریبی ۴ تا ۶ هفته و با وزن تقریبی ۱۰۰ تا ۱۳۰ گرم از انستیتو رازی مشهد خریداری و در اتاق حیوانات دانشگاه آزاد اسلامی مشهد، در شرایط طبیعی و با پریرود نوری ۱۲ ساعت تاریکی و ۱۲ ساعت روشنایی نگهداری شدند. برای انجام تجربیات، موش‌ها با استفاده از کلروفورم کشته شدند، استخوان‌های ران و درشت نی آن‌ها جدا گردید و داخل PBS (PAA, Germany) سرد قرار داده شد. پس از پاک‌سازی بافت‌های اطراف و قطع دو سر استخوان، مغز استخوان با روش Flushing از درون استخوان تخلیه گردید. پس از سانتریفیوژ، به پلیت سلولی حاصل ۲ میلی لیتر DMEM (Bio idea, Iran) حاوی ۱۵ درصد FBS (GIBCO, USA) و یک درصد پنی‌سیلین استرپتومایسین اضافه شده و درون انکوباتور (Memmert, Germany) با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و CO2 پنج درصد قرار داده شدند. بعد از ۲ روز محیط رویی تخلیه و هر ۳ روز یکبار تعویض محیط صورت گرفت. زمانی که تراکم سلول‌ها به ۸۰ درصد رسید، پاساژ سلولی انجام و سلول‌ها پس از پاساژ سوم جهت کشت استفاده شدند. در کلیه

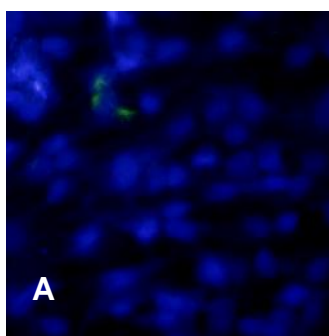
۶/۲۵، ۱۲/۵ و ۲۵ میکروگرم بر میلی لیتر تحت تیمار قرار گرفتند. پس از طی زمان مورد نظر، محیط رویی خارج و دو مرتبه با PBS شستشو شد و توسط تریتون X-100 یک درصد لیز شدند. سپس با استفاده از کیت سنجش آلکالین فسفاتاز (پارس آزمون) فعالیت آنزیمی در طول موج ۴۰۵ نامتر به کمک اسپکتروفتومتر مورد بررسی قرار گرفت.

تعیین تمایز به آدیپوسیت توسط رنگ آمیزی اوایل رد: جهت بررسی میزان تمایز به آدیپوسیت‌ها تحت تاثیر محیط القایی عصاره تام خیار دریایی، سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان ۲۱ روز پس از تیمار با عصاره تام خیار دریایی، به مدت ۴۵ دقیقه با فرمالین ۴ درصد تثبیت شد و در ادامه پس از شستشو با الکل ۷۰ درصد، با محلول اوایل رد (Bio Idea, Iran) رنگ آمیزی شدند. پس از طی این زمان، سلول‌ها سه تا چهار مرتبه با الکل ۷۰ درصد شستشو و با میکروسکوپ اینورت (Bio Photonic, Brazil) بررسی شدند.

**آنالیز آماری:** داده های کمی حاصل توسط نرم افزار SPSS. آزمون آماری ANOVA در سطح  $P < 0.05$  تحلیل شد و نمودارها توسط نرم‌افزار EXCEL رسم گردیدند.

### نتایج

**بنیادی بودن سلول‌های مزانشیمی مغز استخوان موش صحرایی نر نژاد ویستار**  
بررسی مورفولوژیک سلول‌ها توسط میکروسکوپ فلورسانس نشان داد که وجود مارکر سطحی CD44 بر سطح سلول‌های مزانشیمی مغز استخوان موش صحرایی، دال بر اثبات بنیادی بودن سلول‌های مزانشیمی مغز استخوان موش صحرایی است (شکل ۱).



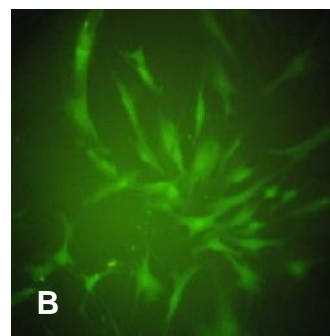
ساعت انکوباسیون درون انکوباتور، DMSO به سلول‌ها افزوده شده، سپس جذب در ۵۶۰ نانومتر با استفاده از اسپکتروفتومتر (Epoch, USA) اندازه گیری و طبق فرمول ذیل میزان سمیت سلولی تحت تاثیر تیمار با عصاره خیار دریایی تعیین شد:

$$\times 100 = \frac{\text{متوسط جذب کنترل} - \text{متوسط جذب نمونه}}{\text{متوسط جذب کنترل}} = \text{درصد بقا سلولی}$$

القا تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان: جهت القا تمایز، سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان موش صحرایی پس از پاساژ سوم به تعداد ۱۰۳ تا ۱۰۴ درون پلیت‌های ۹۶ خانه‌ای کشت داده شد و پس از ۲۴ ساعت با دوزهای مختلف عصاره خیار دریایی ۳/۵، ۶/۲۵، ۱۲/۵ و ۲۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر تیمار گردید و تا ۲۱ روز، هر سه روز یک بار با محیط تیماری تازه تعویض انجام شد.

تعیین تمایز به اوستئوسیت با استفاده از رنگ آمیزی آلیزارین رد: برای رنگ‌آمیزی آلیزارین رد و اندازه گیری سطح ذخایر کلسیمی در ماتریکس خارج سلولی، سلول‌های بنیادی مغز استخوان موش صحرایی به مدت ۲۱ روز با دوزهای ۳/۵، ۶/۲۵، ۱۲/۵ و ۲۵ میکروگرم بر میلی لیتر عصاره تام الکلی خیار دریایی تیمار شد و پس از طی زمان مورد نظر، محیط رویی تخلیه و با PBS شستشو داده شد و پس از ۵ دقیقه با فرمالین ۴ درصد تثبیت انجام شد، سپس ۳۰ دقیقه در معرض رنگ‌آمیزی آلیزارین رد (Bio Idea, Iran) قرار داده شدند.

تعیین تمایز به اوستئوسیت با استفاده از سنجش فعالیت آلکالین فسفاتاز: به منظور سنجش فعالیت آلکالین فسفاتاز، سلول‌های بنیادی مغز استخوان به تعداد  $2 \times 10^4$  در پلیت کشت ۹۶ خانه‌ای کشت داده شده و به مدت ۱۴ روز تحت تاثیر محیط کشت DMEM با دوزهای متفاوت عصاره خیار دریایی ۳/۵،

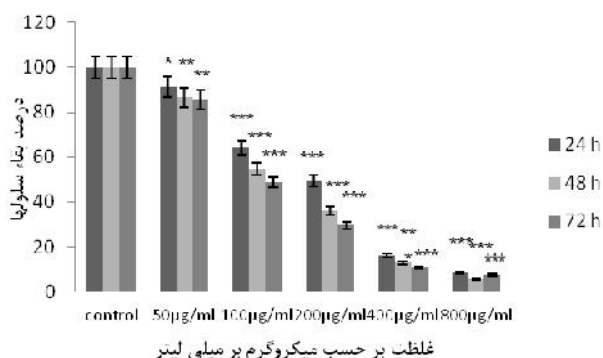


شکل ۱: (A) رنگ‌آمیزی DAPI جهت نشان دادن هسته سلول‌های بنیادی، (B) وجود آنتی ژن سطحی CD44 بر سطح سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان موش صحرایی

در دوزهای ۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر تا ۲۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر به صورت وابسته به دوز منجر به مهار تکثیر سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق شده از مغز استخوان موش صحرایی می‌شوند. از این رو غلظت مناسب برای بررسی تمایز عصاره الکلی خیار دریایی کمتر از ۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر تعیین شد (نمودار ۱).

تعیین دوز مناسب عصاره تام الکلی خیار دریایی بر تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان موش صحرایی نر نژاد ویستار

یافته‌های حاصل از آزمون MTT نشان داد که عصاره تام الکلی خیار دریایی گونه خلیج فارس در دوزهای بالاتر از ۴۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر باعث تجزیه سلولی می‌شوند. همچنین



نمودار ۱: اثر عصاره الکلی خیار دریایی خلیج فارس بر روی بقاء سلول‌های بنیادی مغز استخوان موش صحرایی در ظرف ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت پس از تیمار توسط MTT ANOVA،  $P < 0.05$ ،  $P < 0.01$ ،  $P < 0.001$  (Mean ± S.E). نتایج نشان داد که دوزهای بالاتر از ۴۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر عصاره منجر به تجزیه سلول‌ها می‌شود و عصاره الکلی خیار دریایی در دوز میکروگرم بر میلی‌لیتر ۵۰ تا ۲۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر مهار تکثیر سلول‌ها را در پی دارد.

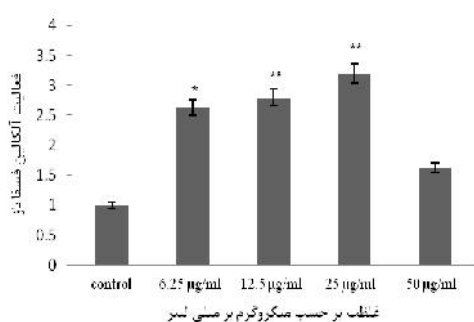
شدن دارند. رنگ‌آمیزی آلیزارین رد پس از ۲۱ روز از تمایز نیز نشان داد که عصاره خیار دریایی به طور چشمگیری در دوزهای بین ۶/۲۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر تا ۲۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر معدنی شدن و میزان ذخایر کلسیمی سلول‌های مغز استخوان را تحریک نموده است (شکل ۲ و نمودار ۲).

اثر عصاره تام الکلی خیار دریایی بر تمایز اوستئوژنیک سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از مغز استخوان موش صحرایی نر نژاد ویستار

نتایج حاصل از تست آلکالین فسفاتاز نشان داد که سلول‌های بنیادی مغز استخوان موش صحرایی نر تیمار شده با عصاره الکلی خیار دریایی پس از طی ۱۴ روز از تمایز، به طور چشمگیری نسبت به گروه شاهد افزایش فعالیت آلکالین فسفاتاز و معدنی



شکل ۲: تصاویر میکروسکوپ معکوس از معدنی شدن سلول‌های مغز استخوان موش صحرایی ۲۱ روز پس از تیمار با عصاره الکلی خیار دریایی خلیج فارس در غلظت‌های ۶/۲۵ تا ۲۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر در مقایسه با گروه کنترل. (A) کنترل، (B) ۶/۲۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر، (C) ۱۲/۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر، (D) ۲۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر، (E) ۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر. (رنگ‌آمیزی آلیزارین رد، بزرگنمایی ۱۰۰×)



نمودار ۲: نمودار فعالیت آلکالین فسفاتازی عصاره الکلی خیار دریایی خلیج فارس در غلظت های ۶/۲۵ تا ۵۰ میکروگرم بر میلی لیتر بر سلول های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان موش صحرایی نر در مقایسه با گروه کنترل  $P < 0.05$ ،  $P < 0.01$ ،  $P < 0.001$ ،  $(Mean \pm SE)$ \*\*\*

مورد توجه فراوان قرار گرفته است (۱۵). با توجه به اینکه در طب سنتی خیار دریایی به دلیل دارا بودن ترکیبات زیستی فراوان دارای خاصیت درمانی، در درمان بیماری های مربوط به مفاصل، استخوان و مهره ها در طب سنتی مورد استفاده زیاد بوده است (۱۳). از این رو بررسی اثر خیار دریایی در پیشبرد روند تمایز سلول های بنیادی می تواند اهمیت ویژه ای در درمان بیماری های استخوانی داشته باشد.

بررسی ها نشان می دهند که عوامل متعددی نظیر محرک های شیمیایی، اتصال سلول به ماتریکس خارج سلولی و کشت توام با سایر سلول ها بر تمایز سلول های بنیادی مزانشیمی در شرایط آزمایشگاه اثر می گذارند، به عنوان مثال تمایز سلول های مزانشیمی به دودمان های استخوان و چربی تحت تاثیر محرک های شیمیایی از قبیل دگزامتازون و انسولین صورت می پذیرد. به طوری که وقتی سلول های بنیادی مزانشیمی در حضور اسکوربیک اسید - ۲ - فسفات، B-گلیسروفسفات و دگزامتازون کشت شوند سلول ها فنوتیپ استخوانی به خود گرفته و ماتریکس خارج سلولی از جنس فسفات کلسیم از خود ترشح می کنند که به صورت کریستال های هیدروکسی آپاتیت رسوب می کند (۱۶).

در بخش بیرونی بدن خیار دریایی مواد و ترکیباتی همانند گلیکوزآمینو گلیکان، کلسیم، گلیکوزیدهای تری ترپنه و کندروئیتین سولفات وجود دارند که در طب سنتی در درمان دردهای مفصلی، استخوانی و آرتروز نقش دارند (۱۳). یافته های حاصل از تجربه حاضر نشان داد که عصاره خیار دریایی می تواند به عنوان یک منبع ارزشمند حاوی مواد دارای ظرفیت استخوان سازی در عدم حضور فاکتورهای مغذی موجود در محیط اوستئوژنیک از جمله دگزامتازون اسکوربیک اسید، B-گلیسروفسفات در آینده پس از بررسی در مدل های جانوری به

### اثر عصاره تام الکلی خیار دریایی بر تمایز آدیپوژنیک سلول های بنیادی مزانشیمی مشتق از مغز استخوان موش صحرایی نر نژاد ویستار

اثر عصاره خیار دریایی بر تمایز آدیپوژنیک با استفاده از رنگ آمیزی اوایل رد ۲۱ روز پس از تمایز مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج حاصل از رنگ آمیزی اوایل رد نشان داد که سلول های مزانشیمی که به مدت ۳ هفته تحت تیمار با دوزهای ۶/۲۵ تا ۲۵ میکروگرم بر میلی لیتر عصاره الکلی خیار دریایی قرار گرفته بودند به سلول چربی تمایز نیافتند.

### بحث

در پژوهش حاضر، پتانسیل تمایزی عصاره الکلی خیار دریایی به تنهایی و بدون استفاده از محیط تمایزی به دودمان های اوستئوژنیک و آدیپوژنیک ارزیابی شد. نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که از آنجایی که بیان بالای آلکالین فسفاتاز به عنوان یکی از شاخص های تمایز اولیه دودمان اوستئوژنیک و بیان اوستئوپونین از علائم تمایز پابانی دودمان اوستئوژنیک در نظر گرفته می شود، دوز مناسب عصاره الکلی خیار دریایی به تنهایی به دلیل افزایش فعالیت آلکالین فسفاتاز و حضور گرانول های معدنی نسبت به گروه کنترل موجب تمایز سلول های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان به دودمان اوستئوژنیک می شود که با نتایج سایر پژوهشگران مثل Byuna و همکاران (۱۴) دال بر وجود ترکیبات موثر در اکوسیستم دریایی درگیر در تمایز به دودمان اوستئوژنیک مطابقت دارد.

به دلیل وجود ترکیبات فعال زیستی در منابع دریایی، در سال های اخیر بحث استفاده از این ترکیبات فعال در حوزه فارماکولوژیک و درمانی به دلیل دارا بودن عوارض جانبی کمتر

اوستئوژنیک است و با توجه به نتایج Jeong و همکاران (۲۳) ساپونین به عنوان ترکیبی پیشنهاد می‌شود که از طریق افزایش فعالیت آلکالین فسفاتاز می‌تواند تسریع کننده پتانسیل اوستئوژنیک باشد. برخی مطالعات اثر عصاره خیار دریایی را بر روی بارداری و اسپرم کشی بررسی و گزارش شده است که گلیکوزیدهای تری ترپنوئید موجود در عصاره خیار دریایی تحت عنوان holotoxin A1, B1 اثر ضد بارداری دارند و ترکیبی به نام cucumariosid استخراج شده از خیار دریایی در لانه‌گزینی تداخل نموده و اثر ضد بارداری دارد، همچنین یکی از ترکیبات استخراج شده از خیار دریایی ترکیبی تحت عنوان Bivittoside استخراج شده از گونه *Bohadschia vitiensis* فعالیت اسپرم کشی قوی دارد که در استفاده از این عصاره بایستی به این موارد منع توجه نمود (۲۴).

### نتیجه گیری

بر اساس یافته‌های حاصل از پژوهش، ترکیبات موجود در بخش بیرونی بدن خیار دریایی با مهار تمایز به دودمان آدیپوژنیک موجب تسریع تمایز به دودمان اوستئوژنیک بر روی سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان موش صحرایی نژاد ویستار می‌شوند. لذا جهت استفاده از این منبع طبیعی مفید در درمان بیماری‌ها و اختلالات استخوانی در شرایط بالینی و پتانسیل درمانی آن می‌بایست مطالعات بیشتری به‌ویژه بر روی مدل‌های جانوری صورت پذیرد.

### تشکر و قدردانی

از تلاش‌ها و مساعدت‌های همکاران محترم مرکز تحقیقات بیولوژی کاربردی تکوین جانوری دانشگاه آزاد اسلامی مشهد که در اجرای این پروژه مشارکت داشتند، صمیمانه سپاسگزاریم.

### منابع

1. Thi Nguyen MH, Jung WK, Kim SK. Marine Algae Possess Therapeutic Potential for Ca Mineralization via Osteoblastic Differentiation. *Adv in Food & Nutri Res*, 2011; 64: 429-441.
2. Pansky A, Roitzheim B, Tobiasch E. Differentiation potential of adult human mesenchymal stem cells. *Clin Lab*. 2007; 53(1-2):81-4.

منظور درمان بیماری‌های استخوانی از جمله اوستئوپورزیس مورد توجه قرار گیرد.

Zhang و همکارانش (۱۷) اثرات فلاونوئیدها را بر تکثیر و تمایز استئوبلاست‌های اولیه مورد بررسی قرار دادند و یافته‌های آن‌ها نشان داد، فلاونوئیدها با بهبود فعالیت آلکالین فسفاتاز سبب پیشبرد تکوین استئوبلاست‌ها می‌شوند که می‌توانند به عنوان تسهیل کننده در روند تمایز استئوبلاست‌ها به کار روند. این نتایج با یافته‌های حاصل پژوهش حاضر که نشان داد عصاره خیار دریایی به عنوان منبعی از فراورده‌های طبیعی از طریق افزایش فعالیت آلکالین فسفاتاز و بیان اوستئوپوننتین پیش‌برنده تمایز اوستئوژنیک است، مطابقت دارد. Park و همکارانش (۱۸) نشان دادند پلی ساکارید سولفات ه فوکوئیدان به عنوان یک نوع فراورده طبیعی تمایز اوستئوژنیک سلول‌های بنیادی مشتق شده از بافت چربی انسانی را تحریک می‌کند. Song و همکاران (۱۹) نیز نشان دادند، حضور ویتامین D3 به صورت سینرژیک با BMP2 در غلظت‌های پایین موجب تسریع تمایز اوستئوژنیک سلول‌های بنیادی چربی می‌شود که با نتایج به دست آمده در این پژوهش مبنی بر به کارگیری دوزهای پایین عصاره متانولی خیار دریایی بر تمایز اوستئوژنیک سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان همخوانی دارد.

Kim (۲۰) گزارش کرد که Quercetin به عنوان یک فلاونوئید بر روی متابولیسم استخوان تاثیر گذاشته و موجب تمایز و تکثیر اوستئوژنیک سلول‌های بنیادی استرومایی مشتق از بافت چربی به صورت وابسته به دوز می‌شود. همچنین Lee (۲۱) شش بیفلاونوئید را از گیاه *Cephalotaxus koreana* جداسازی نموده و میزان تاثیر آن‌ها را بر روند تمایز اوستئوبلاست بررسی کرد. وی چنین گزارش نمود که وجود گروه‌های متوکسیل در حلقه‌های B بیفلاونوئیدها ممکن است در تمایز اوستئوبلاستی نقش داشته باشد. Ryu و همکاران (۲۲) نیز توالی پپتیدی تحت عنوان (LEDPFDKDDWDNWK (1821Da) را از seahorse (نوعی ماهی استخوانی) جداسازی و تخلیص نمود. نتایج آن‌ها نشان داد که پپتید استخراج شده از طریق افزایش فعالیت آلکالین فسفاتاز، معدنی شدن و سنتز کلاژن موجب القا تمایز سلول‌های اوستئوبلاستی MG-63 و سلول‌های کندروسیتی SW-1353 می‌شود. یافته‌های حاصل از این پژوهش، نیز نشان می‌دهد که عصاره الکلی خیار دریایی به صورت وابسته به دوز در یک محدوده خاص تسریع کننده تمایز

3. Cho YS, Jung WK, Kim JA, Choi IW, et al. Beneficial effects of fucoidan on osteoblastic MG-63 cell differentiation. *Food Chem*, 2009; 116 (4): 990-994.
4. Zamurovic N, Cappellen D, Rohner D, Susa M. Coordinated activation of Notch, Wnt, and transforming growth factor- $\beta$  signaling pathways in bone morphogenic protein 2-induced osteogenesis. Notch target gene *Hey1* inhibits mineralization and *Runx2* transcriptional activity. *J. Biol. Chemical*, 2004; 279(36): 37704-37715.
5. Glorieux FH. Osteogenesis imperfecta, *Best Prac & Res Clin Rheuma*, 2008; 22(1): 85-100.
6. Fernández Vallone VB, Romaniuk MA, Choi H, Labovsky V, et al. Mesenchymal stem cells and their use in therapy : What has been achieved?, *Differentiation*. 2013; 85(1-2): 1-10.
7. Donzelli E, Salvadè A, Mimo P, Viganò M, et al. Mesenchymal stem cells cultured on a collagen scaffold : In vitro osteogenic differentiation, *Arch Oral Biol*. 2007; 52(1): 64-73.
8. Venugopal V. Marine Products for Healthcare: Functional and Bioactive Nutraceutical Compounds from the Ocean. *J. of Aqu Food ProTech*. 2010; 19:48-54.
9. Newman DJ , Cragg GM. Natural Products as Sources of New Drugs over the 30 Years from 1981 to 2010. *J. Nat. Prod*. 2012; 75 (3): 311-335.
10. Keshavarz M, Mohammadikia D, Dabbagh AR. The Echinoderms Fauna in Intertidal zone of Southern Oli village coast (Boushehr, Persian Gulf). *J Anim Sci Adv*, 2012; 2(5): 495-498.
11. Haefner B. Drugs from the deep: marine natural product as drug candidates, *Drug Dis Today*, 2003; 8(12) : 536-544.
12. Park SY, Lim HK, Lee S, Cho SK, et al. Biological Effects of Various Solvent Fractions Derived from Jeju Island Red Sea Cucumber (*Stichopus japonicus*). *J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem*, 2011; 54(5):718-724.
13. Bordbar S, Anwar F, Saari N. High-Value Components and Bioactives from Sea Cucumbers for Functional Foods — A Review, *Mar. Drugs*. 2011; 9: 1761-1805.
14. Byuna MR, Kim AR, Hwang JH, Sung MK, Lee YK, Hwang BS, et al. Phorbaketal A stimulates osteoblast differentiation through TAZ mediated *Runx2* activation. *FEBS Lett* 2012; 586:1086-1092.
15. Wijesekara I, Pangestuti R, Kim S. Biological activities and potential health benefits of sulfated polysaccharides derived from marine algae. *Carbo Poly*, 2011; 84(1): 14-21.
16. Ahn SE, Kim S, Park KH, Moon SH, et al. Primary bone-derived cells induce osteogenic differentiation without exogenous factors in human embryonic stem cells. *Biochem & Bioph Res Comm*, 2006; 340(2) : 403-408.
17. Zhang DW, Cheng Y, Wang NL, Zhang JC, et al. Effects of total flavonoids and flavonol glycosides from *Epimedium koreanum* Nakai on the proliferation and differentiation of primary osteoblasts. *Phytomedicine*, 2008; 15: 55-61.
18. Park SJ, Lee KW, Lim DS, Lee S. The Sulfated Polysaccharide Fucoidan Stimulates Osteogenic Differentiation of Human Adipose-Derived Stem Cells. *Stem Cells & Dev*. 2011; 21(12): 2204-2211.
19. Song I, Kim BS, Kim CS, Im G. Biochemical and Biophysical Research Communications Effects of BMP-2 and vitamin D 3 on the osteogenic differentiation of adipose stem cells. *Biochem & Bioph. Res Comm*. 2011; 408: 126-131.
20. Kim YJ, Bae YC, Suh KT, Jung JS. Quercetin , a flavonoid , inhibits proliferation and increases osteogenic differentiation in human adipose stromal cells, *biochem pharma*. 2006; 72(10): 1268-1278.
21. Lee MK, Lim SW, Yang H, Sung SH, et al. Osteoblast differentiation stimulating activity of biflavonoids from *Cephalotaxus koreana*, *Bio& Medi Chem Letters*. 2006; 16: 2850-2854.
22. Ryu B, Qian ZJ, Kim SK. Chemico-Biological Interactions Purification of a peptide from seahorse , that inhibits TPA-induced MMP , iNOS and COX-2 expression through MAPK and NF- $\kappa$ B activation , and induces human osteoblastic and chondrocytic differentiation. *Chemico-Bio Interactions*. 2010; 184(3): 413-422.
23. Jeong HM, Han EH, Jin YH, Hwang YP, et al. Saponins from the roots of *Platycodon grandiflorum* stimulate osteoblast differentiation via p38 MAPK- and ERK-dependent *RUNX2* activation. *Food & Chem Toxic*. 2010; 48: 3362-3368.
24. Lakshmi V, Saxena A, Mishra SK, Raghurir R, et al. Spermicidal Activity of Bivittoside D from *Bohadschia vitiensis*. *Archives of Medical Research*, 2008; 39(7): 631-638.



## The Effect of Persian Gulf Sea Cucumber Alcoholic Extract on Osteogenic and Adipogenic Differentiation of Rat Mesenchymal Stem Cells

Baharara J. Ph.D. <sup>1\*</sup>, Amini E. Ph.D. Student. <sup>2</sup>, Namvar F. Ph.D. <sup>1</sup>, Soltani M. Ph.D. Student <sup>3</sup>

1. Developmental Biology, Department Biology & Research Center for Animal Development Applied Biology, Mashhad Branch, Islamic Azad University, Mashhad, Iran

2. Ph.D. Student, Developmental Animal Biology, Faculty of Biological Sciences, Kharazmi University, Tehran, Iran

3. Ph.D. Student of Developmental Biology, research science Islamic Azad University, Tehran, Iran

\* Email corresponding author: baharara@yahoo.com

Received: 13 Nov. 2013

Accepted: 14 Jan. 2014

---

### Abstract

**Aim:** Sea cucumber has been paid attention in treatment of bone defects due to possessing bioactive compound such as chondroitin sulfate. There were done successful researches in the field of application of mesenchymal stem cells for treatment of bone injury recently. Therefore, this study performed to define the osteogenic and adipogenic potency of Persian Gulf sea cucumber alcoholic extract on differentiation rat bone marrow derived stem cells into osteogenic and adipogenic.

**Material and Methods:** In this experimental study, bone marrow stromal cells were isolated by flushing from male Wistar rat and demonstrated stemness by immunocytochemistry. The cells in 9 experimental group were exposed to various concentration (3.5, 6.25, 12.5, 25, 50, 100, 200, 400, 800 µg/ml) of sea cucumber alcoholic extract and cytotoxicity of sea cucumber alcoholic extract determined by MTT assay. Eventually, after 21 day, osteogenic and adipogenic differentiation were evaluated with alizarin red, oil red staining and alkaline phosphatase kit. Data were analyzed by SPSS software, ANOVA and the level of  $p < 0.05$  was considered significant.

**Result:** An appropriate dosage for treatment of mesenchymal stem cells was determined less than 50 µg/ml. Also, oil red staining showed that sea cucumber alcoholic extract does not have capacity of adipogenic induction while alizarin red staining and alkaline phosphatase revealed that concentration of 25 µg/ml sea cucumber alcoholic extract was most efficient concentration into osteogenic differentiation.

**Conclusion:** Sea cucumber extract was able to differentiate rat bone marrow mesenchymal stem cells into osteogenic lineage.

**Keywords:** Sea cucumber, Osteogenic, Rat, Adipogenic, Differentiation