ORIGINAL ARTICLE

Effect of Hydroethanolic Extract of Stachys Byzantina on Cell Proliferation and Apoptosis in Hippocampus-Derived Neural Stem Cells

Ali Nikfar[1],
Mojdeh Mansouri[1],
Alireza Abdanipour[2]

[1] MSc Student of Human Genetics, Department of Genetics and Molecular Medicine, Faculty of Medicine, Zanjan University of Medical Sciences, Zanjan, Iran
[2] Assistant Professor, Department of Anatomy, Faculty of Medicine, Zanjan University of Medical Sciences, Zanjan, Iran

(Received June 26, 2016; Accepted November 5, 2016)

Abstract

Background and purpose: The use of an appropriate stimulus for increasing the rate of neural stem cell proliferation is one of the most important issues in cell therapy. This study aimed to investigate the effect of hydroethanolic extract of *Stachys byzantina* on hippocampus-derived neural stem cell proliferation and apoptosis.

Materials and methods: In this experimental study, the neural stem cells were isolated from the hippocampus region of brain using enzymatic digestion. The neurospheres were dissociated to single cells and cultured on adherent plates. For these cells, immunocytochemical evaluation was performed for marker nestin. The isolated neural stem cells were pretreated with different doses of hydroethanolic extract of *Stachys byzantina* for 48 h, and then exposed to 125 µM of H_2O_2 for 30 min. The effects of this extract on cell survival and apoptosis were evaluated using MTT and TUNEL, respectively. To analyze the data, ANOVA and Tukey's tests were run in SPSS, version 15.

Results: In the current study, 800 µg/ml of *Stachys byzantina* extract significantly increased the proliferation rate of the neural stem cells. Furthermore, the results of the TUNEL staining demonstrated that *Stachys byzantina* extract did not have any protective effect on hydrogen peroxide-induced apoptosis.

Conclusion: *Stachys byzantina* extract increases the rate of neural stem cell proliferation. However, further studies are required to determine the effect of this extract on the treatment of neurodegenerative diseases.

Keywords: cell proliferation, cell therapy, neural stem cell, *Stachys byzantina*

J Mazandaran Univ Med Sci 2017; 27(147): 1-10 (Persian).

پژوهشی

مجله دانشگاه علوم پزشکی مازندران
دوره بیست و هفتم شماره ۱۴۷ فروردین سال ۱۳۹۶ (۱۰-۱)

بررسی تأثیر عصاره هیدروالکلی گیاه زبان‌بره بر روی تکثیر و آپوپتوز در سلول‌های بنیادی عصبی مشتق از هیپوکمپ

علی نیک‌فر[۱]
مژده منصوری[۱]
علیرضا عبدانی پور[۲]

چکیده

سابقه و هدف: یکی از مهم‌ترین موضوعات در زمینه سلول درمانی، استفاده از یک محرک مناسب برای افزایش تکثیر سلول‌های بنیادی عصبی است. این مطالعه، به‌منظور ارزیابی تأثیر عصاره هیدروالکلی گیاه زبان‌بره بر روی روند تکثیر و آپوپتوز سلول‌های بنیادی عصبی هیپوکمپ نوزاد موش صحرایی انجام شده است.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه تجربی، سلول‌های بنیادی عصبی به روش هضم آنزیمی از هیپوکمپ مغز نوزاد سه روزه موش صحرایی جداسازی و سپس نوروسفرها به سلول‌های انفرادی شکسته شدند و در پلیت‌های کشت چسبنده، کشت انجام شد. بررسی نشانگر اختصاصی نستین به روش ایمنوسیتوشیمی صورت گرفت. سلول‌های بنیادی عصبی به مدت ۴۸ ساعت با غلظت‌های گوناگون از عصاره هیدروالکلی گیاه زبان‌بره و سپس ۱۲۵ μM هیدروژن پراکساید به مدت ۳۰ دقیقه تیمار شدند. میزان بقای سلولی و آپوپتوز به‌ترتیب با روش MTT و کیت تانل ارزیابی گردید. آنالیز داده‌ها با کمک نرم‌افزار آماری SPSS 15 و آزمون‌های ANOVA و Tukeys صورت گرفت.

یافته‌ها: نتایج به‌دست‌آمده در این مطالعه نشان داد که تیمار سلول‌های بنیادی عصبی با ۸۰۰ μg/ml از عصاره هیدروالکلی گیاه زبان‌بره، موجب افزایش معنی‌دار تکثیر سلول‌های بنیادی عصبی در مقایسه با گروه کنترل می‌شود. همچنین، نتایج رنگ‌آمیزی تانل نشان داد که این عصاره، تأثیر حمایتی در برابر آپوپتوز القاشده توسط پراکسید هیدروژن ندارد.

استنتاج: عصاره هیدروالکلی گیاه زبان‌بره می‌تواند سبب افزایش تکثیر سلول‌های بنیادی عصبی در شرایط آزمایشگاهی شود؛ ولی تحقیقات بیشتری نیاز است تا ارزش این عصاره گیاهی، در زمینه درمان برخی بیماری‌های تحلیل‌برنده عصبی استنباط شود.

واژه‌های کلیدی: تکثیر سلولی، سلول بنیادی عصبی، سلول درمانی، زبان‌بره

مقدمه

سلول‌های بنیادی عصبی، سلول‌هایی چندتوان با قدرت خودنوسازی هستند که توانایی ایجاد سلول‌های نورون، آستروسیت و اولیگودندروسیت را دارند و زیرمجموعه‌ای از سلول‌های بنیادی بزرگ‌سالان به‌شمار می‌آیند. این سلول‌ها در دوران جنینی سبب تشکیل و تکامل سیستم عصبی می‌شوند (۱). سلول‌های بنیادی در بسیاری از بافت‌های بزرگ‌سالان وجود دارند و سبب حفظ هوموستاز سلولی و ترمیم صدمات وارده آمده به بافت می‌شوند (۲). برخلاف دیگر بافت‌های بدن، سیستم عصبی مرکزی توانایی محدودی در بهبود ضایعات و

مولف مسئول: علیرضا عبدانی‌پور–زنجان: دانشگاه علوم پزشکی، دانشکده پزشکی، گروه آناتومی Email: abdani.anatomy@yahoo.com
۱. دانشجوی کارشناسی ارشد ژنتیک انسانی، گروه ژنتیک و پزشکی مولکولی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی زنجان، زنجان، ایران
۲. دکتری علوم تشریح، استادیار گروه علوم تشریح، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی زنجان، زنجان، ایران
تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۴/۶ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات: ۱۳۹۵/۵/۳۰ تاریخ تصویب: ۱۳۹۵/۸/۱۵

آسیب‌های واردآمده و جایگزین کردن سلول‌های از بین رفته دارد. همین امر موجب شد که تا مدت‌ها، بسیاری از دانشمندان اعتقاد بر نبود سلول‌های بنیادی عصبی در بزرگ‌سالان داشته باشند (۳).

نتایج تحقیقات Altman و Das در سال ۱۹۶۵، به نخستین شواهد مبنی بر وجود نورون‌زایی در مغز پستانداران بالغ تبدیل شد. ایشان در آن مطالعه توانستند با استفاده از [H^3]- تیمیدین، تولید سلول‌های نورونی جدید را در جیروس دندانه‌دار هیپوکمپ موش صحرایی بالغ به اثبات رسانند (۴). تحقیقات Reynolds و Weiss در سال ۱۹۹۲ که منجر به شناسایی سلول بنیادی عصبی گردید، انقلاب بزرگی در زمینه علوم اعصاب به‌وجود آورد. آن‌ها موفق شدند سلول‌های تخصص نیافته‌ای از ناحیه ساب ونتریکولار مغز موش را جداسازی کنند که در شرایط آزمایشگاهی، توانایی تکثیر و تمایز به انواع سلول‌های عصبی را داشتند (۵). به‌طور عمده، سلول‌های بنیادی عصبی در پستانداران بالغ در ناحیه ساب گرانولار در جیروس دندانه‌دار هیپوکمپ و ناحیه ساب ونتریکولار بطن‌های جانبی مغز مشاهده می‌شوند. این دو دسته سلولی، انواعی از نورون‌ها را به‌وجود می‌آورند و در مقابل فاکتورهای نوروتروفیک، شرایط فیزیولوژیک و عوامل پاتولوژیک، پاسخ‌های متفاوتی از خود نشان می‌دهند (۶). این سلول‌ها، سلول‌های پیش‌ساز عصبی نیز نامیده می‌شوند که نستین، نشانگر اختصاصی آن‌ها است (۷).

سلول‌های عصبی پس از تولد تقسیم نمی‌شوند. پس از مرگ این سلول‌ها نیز، هیچ جایگزین مناسبی برای آن‌ها وجود ندارد. به همین دلیل، در سال‌های اخیر تحقیقات انجام‌شده به‌منظور کاربرد سلول‌های بنیادی عصبی در درمان بیماری‌های نورولوژیک، پیشرفت چشمگیری داشته است؛ زیرا استفاده از ظرفیت طبیعی بدن برای بازسازی و ترمیم ضایعات، یکی از اصول مهمی است که دانش سلول‌های بنیادی برای درمان بیماری‌ها را دنبال می‌کند (۸).

استفاده از یک محرک مناسب برای افزایش سرعت رشد و تکثیر سلول‌های بنیادی عصبی در شرایط آزمایشگاهی، یکی از پراهمیت‌ترین مسائل در زمینه سلول درمانی با این سلول‌ها است. گیاه زبان‌بره با نام علمی *Stachys byzantina* که در زبان انگلیسی با نام lamb's ear نیز شناخته می‌شود، از گیاهان بومی ایران است که در مناطق مدیترانه‌ای، جنوب غرب آسیا، آمریکای شمالی، آمریکای جنوبی و آفریقای جنوبی نیز می‌روید (۹،۱۰). گیاه مورد نظر در دانشگاه گلستان گرگان با کد هرباریومی ۶۲۴۲ شناسایی و نام علمی آن تأیید گردید. وجه‌تسمیه این گیاه، برگ‌های نوک‌تیز، ضخیم و خزدار سفید و خاکستری می‌باشد (۱۱). برگ‌های آن قرن‌ها برای بستن زخم مجروحان در جنگ‌ها استفاده شده است؛ زیرا با وجود خواص ضدباکتریایی، ضدالتهابی و ضدعفونی‌کنندگی، به‌دلیل پرزهای فراوان روی برگ‌هایش قدرت جذب بالایی دارد و سبب لخته شدن خون و قطع خون‌ریزی می‌شود. همچنین، این گیاه دارویی، در درمان تب، اسهال، زخم‌های دهان، عارضه‌های چشمی مثل گل‌مژه، بیماری‌های قلبی، بیماری‌های کبدی و خونریزی‌های داخلی کاربرد دارد (۱۲). تاکنون، هیچ مطالعه‌ای در ارتباط با تأثیر این دارو روی سلول‌های بنیادی عصبی صورت نگرفته است. این مطالعه به‌عنوان نخستین پژوهش در راستای بررسی تأثیر عصاره هیدروالکلی گیاه زبان‌بره بر روی رشد و تکثیر سلول‌های بنیادی عصبی مشتق از هیپوکمپ نوزاد موش صحرایی، در شرایط آزمایشگاهی انجام پذیرفته است.

مواد و روش‌ها

تهیه عصاره هیدروالکلی گیاه زبان‌بره

گیاه زبان‌بره در ماه اردیبهشت از منطقه کوهستانی حیران در استان اردبیل جمع‌آوری و به دور از تابش

مستقیم نور خورشید، خشک گردید. سپس با آسیاب کردن، برگ‌های خشک‌شده آن به پودر تبدیل شدند. برای تهیه عصاره از روش سوکسله استفاده گردید؛ به‌طوری‌که مقدار g ۱۰۰ پودر در کارتوش‌های تهیه‌شده از کاغذ صافی ریخته و داخل دستگاه سوکسله قرار داده شدند. سپس ml ۳۰۰ مخلوط متانول و آب مقطر به‌عنوان حلال اضافه گردید. عصاره‌گیری به مدت ۱۲ ساعت انجام شد. عصاره به‌دست‌آمده، به ظروف شیشه‌ای منتقل و به مدت ۲۴ ساعت بدون درپوش در آون ۵۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند تا حلال باقی‌مانده نیز تبخیر شود. درنهایت، برای ذخیره و نگهداری، عصاره تهیه‌شده به یخچال منتقل شد.

جداسازی سلول‌های بنیادی عصبی

در این مطالعه تجربی، با رعایت اصول و مقررات آیین‌نامه کار با حیوانات آزمایشگاهی تصویب‌شده در دانشگاه علوم پزشکی زنجان، برای تهیه سلول‌های بنیادی عصبی از نوزاد سه روزه موش صحرایی نژاد ویستار استفاده گردید. ابتدا نوزاد موش با کمک کلروفورم بی‌هوش و کشته شد. سپس مغز نوزاد در شرایط کاملاً استریل برداشته شد و به پتری دیش حاوی فسفات بافر سالین (ساخت شرکت Sigma) و آنتی‌بیوتیک پنی‌سیلین G انتقال یافت. پس از جداسازی، مغز به زیر هود استریل کشت سلول منتقل و قسمت هیپوکمپ جدا شد. بافت هیپوکمپ تا حد امکان به قطعات کوچک‌تر تبدیل شد و به‌منظور هضم آنزیمی، به لوله فالکون ۱۵ میلی‌لیتری استریل حاوی آنزیم‌های کلاژناز (ساخت شرکت Sigma) و اکیوتاز (ساخت شرکت Sigma) انتقال یافت. سپس به مدت ۳۰ دقیقه در دستگاه تکان‌دهنده خودکار در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. خنثی‌سازی آنزیم‌های مذکور با استفاده از FBS (ساخت شرکت Gibco) صورت گرفت. در این مرحله، یک سوسپانسیون سلولی شیری‌رنگ به‌دست آمد. در مرحله بعد، سوسپانسیون به‌دست‌آمده از فیلتر مش نایلونی ۷۰ میکرومتری (ساخت شرکت Biofil) عبور داده شد. سپس مایع فیلترشده به مدت ۵ دقیقه با سرعت g ۸۰۰ و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ گردید. پس از سانتریفیوژ، مایع رویی خارج شد و رسوب سلولی به‌دست‌آمده با محیط کشت DMEM/F12 (ساخت شرکت Sigma) حاوی فاکتورهای رشد bFGF (Invitrogen)، EGF (Invitrogen)، B27 (ساخت شرکت Gibco) و پنی‌سیلین- استرپتومایسین ۱ درصد، به همراه ۳ درصد سرم FBS در پلیت غیرچسبنده کشت داده شد.

کشت نوروسفر

به‌منظور تشکیل نوروسفر، سلول‌های استخراج‌شده به پلیت غیرچسبنده منتقل شدند و به مدت یک هفته درون انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، ۹۵ درصد رطوبت و ۵ درصد CO_2 قرار گرفتند. جهت در دسترس بودن محیط کشت تازه برای سلول‌ها، روزانه محیط کشت جدید به محیط کشت قدیمی اضافه شد.

شکست نوروسفرها

پس از یک هفته، نوروسفرهای شناور از فلاسک جمع‌آوری شدند و به فالکون ۱۵ میلی‌لیتری انتقال یافتند. سپس به مدت ۵ دقیقه در g ۳۰۰ و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ گردیدند. محیط رویی تخلیه و توده‌های سلولی با استفاده از آنزیم تریپسین (ساخت شرکت Sigma) از یکدیگر جدا شدند و به‌صورت سلول‌های منفرد درآمدند. در ادامه، سلول‌های به‌دست‌آمده به فلاسک سلولی پوشانده شده از پلی-ال-لیزین (ساخت شرکت Biofil) منتقل و با استفاده از محیط کشت حاوی فاکتورهای رشد و در شرایطی مشابه با مرحله تشکیل نوروسفر، کشت داده شدند. به‌منظور همگن‌سازی سلول‌ها، کشت اولیه سلول‌ها تا پاساژ سوم ادامه داشت.

ایمنوسیتوشیمی

جهت اطمینان از هویت سلول‌های استخراج‌شده، وجود نشانگر اختصاصی نستین در سلول‌های کشت داده‌شده بررسی گردید. بدین منظور، از سلول‌های پاساژ چهارم دارای تراکم ۷۰ درصد استفاده شد. پس از شستشو با PBS، سلول‌ها با پارافرمالدهید ۴ درصد به مدت ۴۰ دقیقه در دمای اتاق تثبیت شدند. به‌منظور رنگ‌آمیزی عناصر سیتوپلاسمی، سلول‌ها برای مدت ۳۰ دقیقه در معرض تریتون ۰/۳ درصد نیز قرار گرفتند. بدین ترتیب، ازهم‌پاشیدگی غشا سبب افزایش نفوذ آنتی‌بادی‌ها به داخل سلول‌ها گردید. در مرحله بعد، با اضافه کردن سرم جنینی گوساله ۱۰ درصد، از واکنش‌های غیراختصاصی جلوگیری شد. سپس سلول‌ها به مدت ۱۲ ساعت و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد در معرض آنتی‌بادی اولیه Mouse anti-nestin، monoclonal antibody (Abcam) قرار گرفتند. پس از گذشت این زمان، سلول‌ها سه مرتبه با PBS شستشو داده شدند. در ادامه، به مدت دو ساعت در دمای اتاق و محیط تاریک در معرض آنتی‌بادی ثانویه ضدموشی کونژوگه با FITC (Abcam) و با غلظت ۱/۱۰۰ قرار گرفتند. به‌منظور مشخص شدن هسته سلول‌ها در هنگام شمارش، به مدت یک دقیقه از محلول اتیدیوم بروماید ۱۰۰ μg/ml استفاده شد. درنهایت، سلول‌ها با میکروسکوپ فلورسانس معکوس بررسی شدند. پنج ناحیه از هر چاهک به‌طور تصادفی انتخاب و درصد سلول‌های مثبت محاسبه گردیدند.

تیمار سلول‌های بنیادی عصبی با عصاره زبان‌بره

سلول‌های بنیادی عصبی، طی پاساژ سلولی از فلاسک سلولی جدا شدند و در هر چاهک پلیت ۹۶ خانه، حدود ۵۰۰۰ سلول کشت داده شدند. سلول‌ها در پنج غلظت گوناگون از عصاره هیدروالکلی زبان‌بره شامل: ۲۰۰، ۴۰۰، ۶۰۰، ۸۰۰ و ۱۰۰۰ μg/ml از محیط، کشت و به مدت ۴۸ ساعت تیمار شدند. سلول‌های بنیادی عصبی بدون تیمار با عصاره نیز، به‌عنوان گروه کنترل استفاده شدند. به‌منظور بررسی‌های آماری دقیق‌تر، هر آزمون پنج‌بار تکرار گردید.

آزمون MTT

به‌منظور بررسی میزان تکثیر سلول‌های بنیادی عصبی با روش 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT)، تعداد ۵۰۰۰ سلول بنیادی عصبی در هر چاهک از پلیت ۹۶ خانه کشت داده شد. درصد سلول‌های زنده در دوزهای ۲۰۰، ۴۰۰، ۶۰۰، ۸۰۰ و ۱۰۰۰ μg/ml بررسی گردید. پس از ۴۸ ساعت تیمار با عصاره، چاهک‌ها تخلیه شدند و شستشو انجام پذیرفت. سپس به هر چاهک ۲۰ μl محلول MTT (۱ μg/ml) اضافه شد و به مدت چهار ساعت در تاریکی و دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه گردید. سپس محیط کشت چاهک‌ها به‌آرامی تخلیه و با ۱۰۰ μl محلول DMSO جایگزین شد تا کریستال‌های فورمازان ایجادشده در اثر واکنش با MTT به حالت محلول درآیند. درنهایت، جذب نوری محلول با استفاده از دستگاه الایزا و در طول موج ۵۷۰ nm قرائت و به کمک منحنی استاندارد، درصد سلول‌های زنده محاسبه شد. گفتنی است که آزمون هر غلظت، پنج‌بار تکرار گردید.

بررسی میزان آپوپتوز با استفاده از روش تانل

ارزیابی سلول‌های آپوپتوتیک با استفاده از TUNEL assay صورت گرفت. سلول‌های بنیادی عصبی در پلیت ۴۸ خانه کشت داده شدند. سلول‌ها به مدت ۴۸ ساعت با دوز ۸۰۰ μg عصاره تیمار و سپس به مدت ۳۰ دقیقه در معرض هیدروژن پراکساید ۱۲۵ μM قرار گرفتند. به‌منظور بررسی میزان آپوپتوز، ابتدا سلول‌ها توسط پارافرمالدهید ۴ درصد به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق تثبیت شدند. برای

افزایش نفوذپذیری سلول‌ها از محلول تریتون ۰/۱ درصد استفاده گردید. سلول‌ها مطابق با دستورالعمل کیت In-Situ Cell Death Detection (Roche)، تحت تأثیر محلول‌های گوناگون قرار گرفتند. سپس سلول‌های تانل مثبت توسط ماده رنگ‌زای دی آمینو بنزیدین (DAB) رنگ‌آمیزی شدند. به‌منظور تسهیل در بررسی سلول‌های مثبت، رنگ‌آمیزی با هماتوکسیلین نیز انجام شد. درنهایت، درصد سلول‌های تانل مثبت محاسبه گردید.

تجزیه و تحلیل آماری

همه داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار آماری SPSS 15 انجام و به‌صورت SEM± ارائه شد. مقایسه آماری بین گروه‌ها با کمک آزمون ANOVA و آزمون تعقیبی Tukeys post hoc test و در سطح معنی‌داری P<۰/۰۵، تجزیه و تحلیل شدند.

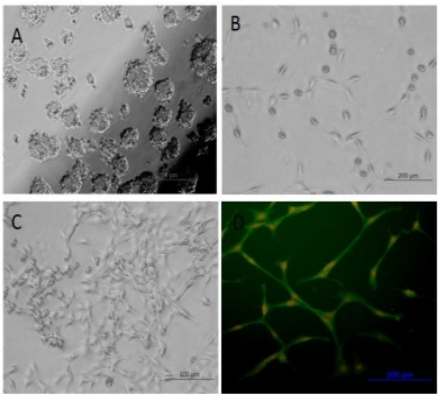
یافته‌ها

نتایج کشت سلول‌های بنیادی عصب

سلول‌های استخراج‌شده با قرار گرفتن در محیط القایی مناسب، به‌صورت شناور در محیط درآمدند. این سلول‌های منفرد با گذشت زمان و به‌مرور در کنار یکدیگر قرار گرفتند و با گذشت یک ساعت، به کلونی‌های کوچک، نامنظم و شناور در محیط (نوروسفر) تبدیل شدند. به‌مرور کلونی‌های کوچک با یکدیگر متحد شدند و کلونی‌های بزرگ‌تر را تشکیل دادند (تصویر شماره ۱A). پس از شکست نوروسفرها و کشت آن‌ها در فلاسک، سلول‌های بنیادی عصبی به کف فلاسک چسبیدند و زوائد و استطاله‌هایی در آن‌ها به‌وجود آمد که گاهی چند برابر جسم سلولی و در ارتباط با سلول‌های اطراف بودند (تصویر شماره ۱B). در نخستین روز، سلول‌ها به‌صورت کلونی به کف فلاسک چسبیده بودند. به‌مرور در روزهای دوم و سوم، از حجم کلونی‌ها کم شد و سلول‌ها در کف فلاسک پخش شدند. سلول‌ها قدرت تقسیم داشتند و از نظر مورفولوژی، ویژگی‌های سلول شبه‌عصبی را به‌دست آوردند. پس از یک هفته، سلول‌های بنیادی عصبی، فلاسک سلولی را به‌طور کامل پر کردند و نمایی کشیده و دوکی‌شکل با زوائد سیتوپلاسمی به خود گرفتند (تصویر شماره ۱C).

تأیید ماهیت سلول‌های بنیادی عصبی با نشانگر نستین به روش ایمنوسیتوشیمی

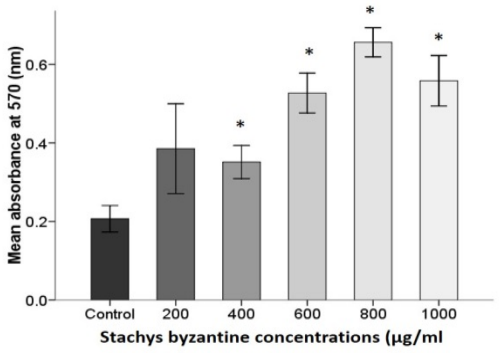
استفاده از روش ایمنوسیتوشیمی برای بررسی نشانگر نستین به‌منظور اثبات ماهیت سلول‌های بنیادی عصبی، نشان داد که صد در صد سلول‌های کشت‌شده، این نشانگر اختصاصی را دارند؛ به‌طوری‌که سیتوپلاسم سلول‌های نستین مثبت، به‌دلیل استفاده از آنتی‌بادی ثانویه کونژوگه با FITC به رنگ سبز و هسته سلول‌ها توسط اتیدیوم بروماید به رنگ قرمز مشاهده شدند (تصویر شماره ۱D). بدین ترتیب، صحت سلول‌های استخراج و کشت‌شده تأیید گردید.



تصویر شماره ۱: جداسازی و کشت سلول‌های بنیادی عصبی مشتق‌شده از هیپوکمپ نوزاد موش با روش آنزیماتیک. A) تشکیل توده‌های سلولی نوروسفر، B) سلول‌های دوکی‌شکل چسبیده به کف فلاسک، C) تراکم بالای سلول‌ها پس از یک هفته و D) ایمنوسیتوشیمی برای نشانگر نستین (رنگ سبز نشان‌دهنده نستین و رنگ قرمز نشان‌دهنده هسته سلول‌های رنگ‌آمیزی‌شده با اتیدیوم بروماید است). بزرگنمایی ۲۰۰ برابر

نتایج آزمون MTT

تیمار با عصاره هیدروالکلی زبان‌بره، هیچ تغییری در شکل ظاهری سلول‌های بنیادی عصبی ایجاد نکرد. نتایج بررسی‌های انجام‌شده با آزمون MTT حاکی از افزایش تکثیر سلول‌های بنیادی عصبی تیمار شده در مقایسه با گروه کنترل بود. سلول‌های تیمار شده با غلظت ۸۰۰ µg (۰/۶۶±۰/۰۲)، بالاترین میانگین رشد را نشان دادند که نسبت به گروه کنترل (۰/۲±۰/۰۲) اختلاف معنی‌داری داشت (P<۰/۰۵). افزایش رشد و تکثیر سلول‌های بنیادی عصبی، به غلظت عصاره زبان‌بره در محیط کشت سلول‌ها بستگی دارد. غلظت‌های ۴۰۰ و ۶۰۰ µg، اختلاف معناداری با گروه کنترل داشتند؛ ولی با گروه ۸۰۰ µg، اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد. این در حالی است که در غلظت‌های بالای ۸۰۰ µg، تعداد سلول‌ها کاهش داشت که این امر احتمالاً به‌دلیل غلظت بالا و افزایش سمیت ناشی از عصاره و متعاقباً مرگ سلول‌ها بود. نتایج آزمون MTT برای غلظت‌های ۲۰۰، ۴۰۰، ۶۰۰ و ۱۰۰۰ µg، به‌ترتیب ۰/۳۹±۰/۰۶، ۰/۳۵±۰/۰۲، ۰/۵۳±۰/۰۳ و ۰/۵۶±۰/۰۳ به‌دست آمد (تصویر شماره ۲).

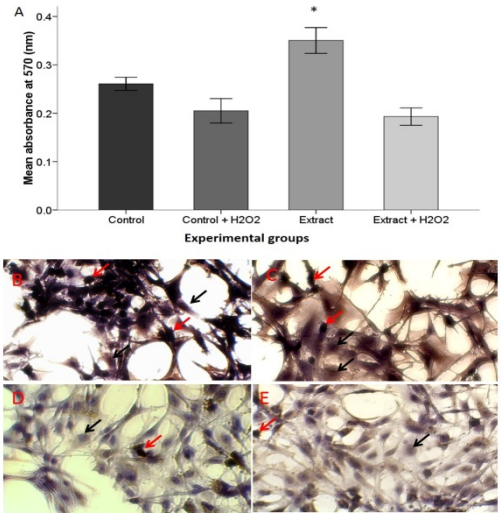


تصویر شماره ۲: مقایسه سلول‌های بنیادی عصبی تیمارشده با غلظت‌های گوناگون عصاره زبان‌بره به روش MTT.

- اختلاف معنی‌دار با گروه کنترل در سطح P<۰/۰۵

نتایج آزمون تانل

نتایج به‌دست‌آمده از آزمون MTT متعاقب القای آپوپتوز با هیدروژن پراکسید، نشان داد که گروه تیمارشده با عصاره با جذب نوری (۰/۳۵±۰/۰۱) اختلاف معنی‌داری با همه گروه‌های مورد بررسی داشت که حاکی از کاهش آپوپتوز در سلول‌های این گروه بود. این در حالی است که گروه عصاره + پراکسید هیدروژن (۰/۱۹±۰/۰۱) با گروه کنترل + پراکسید هیدروژن جذب نوری (۰/۲±۰/۰۱) اختلاف معنی‌داری نداشت (تصویر شماره ۳A). همچنین، نتایج نشان می‌دهند گروهی که عصاره گیاه زبان‌بره را دریافت کرده‌اند (۰/۳۵±۰/۰۱)، نسبت به گروه کنترل (۰/۲۶±۰/۰۶) جذب نوری بالاتری دارند که حاکی از تأثیر عصاره بر روی تکثیر سلول‌ها است. در آزمون تانل، سلول‌های آپوپتوتیک به رنگ قهوه‌ای تیره تا روشن مشاهده شدند (تصویر شماره ۳B-E).



تصویر شماره ۳: A) مقایسه سلول‌های بنیادی عصبی در چهار گروه کنترل، کنترل + H_2O_2، عصاره، عصاره +H_2O_2 به روش MTT. B و C) میکروگراف‌های سلول‌های بنیادی عصبی پس از آزمون تانل (B) گروه کنترل + H_2O_2 (C) گروه عصاره + H_2O_2، (D) گروه عصاره، (E) گروه کنترل. پیکان‌های قرمز نشان‌دهنده سلول‌های تانل مثبت و پیکان‌های سیاه نشان‌دهنده سلول‌های تانل منفی هستند.

- اختلاف معنی‌دار با گروه کنترل در سطح P<۰/۰۵

بحث

نتایج این مطالعه نشان داد که عصاره هیدروالکلی گیاه زبان‌بره می‌تواند سبب افزایش سرعت رشد و تکثیر سلول‌های بنیادی عصبی موش صحرایی در شرایط آزمایشگاهی شود؛ اما تأثیر محافظتی قابل‌توجهی در برابر مرگ آپوپتوتیک القاشده به‌وسیله پراکسید هیدروژن ندارد. در حال حاضر، درمان قطعی برای بسیاری بیماری‌های سیستم عصبی وجود ندارد و از آنجا که هیچ جایگزین مناسبی برای سلول‌های عصبی پس از مرگ آنان وجود ندارد، سلول درمانی به‌عنوان یکی از رویکردهای مهم درمانی و تحقیقاتی استفاده شده است (۱۳). استراتژی سلول درمانی در بیماری‌های تحلیل‌برنده سیستم عصبی، برای نخستین بار توسط Lindvall و Bjorklund مطرح شد (۱۴). سلول‌های بنیادی بالغین به‌عنوان منبعی مناسب و قابل‌دسترس برای مقاصد سلول درمانی به‌شمار می‌آیند. در این میان، سلول‌های بنیادی عصبی می‌توانند کاندید مناسبی برای پیوند جهت جایگزینی سلول‌های عصبی از بین رفته باشند (۱۳). بررسی‌های Hermann و همکاران نشان داد که سلول‌های بنیادی عصبی می‌توانند نسبت به نشانگر عصبی نستین، واکنش مثبت داشته باشند که از این ویژگی می‌توان برای تأیید هویت سلول‌های بنیادی عصبی استفاده کرد (۱۵). نتایج به‌دست‌آمده از این مطالعه بر روی سلول‌های بنیادی عصبی مشتق از هیپوکمپ مغز نوزاد موش صحرایی نیز، تأییدی بر نتایج Hermann و همکاران است.

امروزه استفاده از عصاره‌های گیاهی برای درمان بیماری‌ها رو به افزایش است. گیاه زبان‌بره در طب سنتی استفاده‌های متعددی داشته است. مطالعات انجام‌شده نشان داده‌اند که این گیاه تأثیرات آنتی‌اکسیدانی (۱۶)، آنتی‌توکسیک، ضدالتهابی (۱۷) و ضدمیکروبی دارد (۱۹،۱۸). عصاره و دم‌نوش این گیاه برای مقاصد درمانی بیماری‌های پوستی، گوارشی، مفاصل و آسم کاربرد دارد. همچنین، بررسی‌های انجام‌شده حاکی از تأثیرات ضدسرطان این گیاه است (۲۰،۱۷). تحقیقات صورت‌گرفته توسط Tundis و همکاران در سال ۲۰۱۵ بر روی یکی از گونه‌های نزدیک به زبان‌بره (*Stachys byzantina*) از جنس *Stachys* به نام *Stachys lavandulifolia* که در زبان فارسی به چای کوهی معروف است، نشان داد که عصاره این گیاه با تغییر پروفایل متابولیتی و مهار آنزیم‌های کلیدی در بیماران مبتلا به پارکینسون و آلزایمر، سبب القای تأثیرات آنتی‌اکسیدانی شده و در جهت بهبود ضایعات مؤثر است (۲۱). این گیاه ترکیبات مشابهی مثل ترکیبات دیترپن با زبان‌بره دارد (۲۳،۲۲)؛ بنابراین، می‌توان زبان‌بره را نیز به‌عنوان کاندیدی مناسب برای تحقیقات در درمان بیماری‌های تحلیل‌برنده سیستم عصبی به‌شمار آورد.

افزون بر دیترپن، ترکیبات دیگری مثل فلاوونوئید، ساپونین و فنیل اتانوئید گلیکوزید در این گیاه وجود دارد (۹). فلاوونوئیدهای موجود در گیاهان، تأثیرات فارماکولوژیک وسیعی ازجمله ممانعت از اکسیداسیون لیپوپروتئین‌های با وزن مولکولی پایین، جلوگیری از تجمع پلاکت‌ها و همچنین پایداری سلول‌های ایمنی دارند؛ بنابراین، در درمان ناراحتی‌های روانی، عفونت‌های ویروسی، تورم و آلرژی استفاده می‌شوند (۲۴). از آنجا که تاکنون هیچ مطالعه مشابهی در ارتباط با تأثیر عصاره گیاه زبان‌بره بر روی سلول‌های بنیادی عصبی انجام نشده است، ارائه نظرات قطعی‌تر درباره چگونگی مکانیسم عمل این عصاره بر روند تکثیر سلول‌ها، مستلزم انجام آزمایش‌های تکمیلی

ازجمله بررسی تأثیر ترکیبات موجود در این عصاره به‌صورت مجزا بر روی تکثیر سلول‌های بنیادی عصبی است. با توجه به نتایج به‌دست‌آمده از مطالعه حاضر، این عصاره می‌تواند با افزایش تکثیر سلول‌های بنیادی عصبی تأثیر مثبتی در روند سلول درمانی داشته باشد. از طرفی، با در نظر گرفتن خواص ضدالتهابی این گیاه می‌توان به تأثیرات مثبت آن در درمان بیماری‌های تحلیل‌برنده سیستم عصبی و آسیب‌های نخاعی امیدوار بود. نتایج این مطالعه نشان داد که عصاره هیدروالکلی زبان‌بره تأثیرات میتوژنیک دارد و سبب افزایش روند تکثیر سلول‌های بنیادی عصبی مشتق از هیپوکمپ موش صحرایی در شرایط آزمایشگاهی می‌شود.

سپاسگزاری

این تحقیق در آزمایشگاه سلول‌های بنیادی دانشگاه آزاد اسلامی واحد اردبیل انجام شده است؛ بنابراین لازم می‌دانیم از حمایت‌های بی‌دریغ دکتر سید سعید هاشمین (معاونت پژوهشی دانشگاه آزاد اسلامی واحد اردبیل) نهایت تقدیر و سپاس را داشته باشیم.

References

1. Temple S. The development of neural stem cells. Nature. 2001; 414(6859):112-117.
2. Kornblum HI. Introduction to neural stem cells. Stroke. 2007; 38(suppl2):810-816.
3. Breunig JJ, Haydar TF, Rakic P. Neural stem cells: historical perspective and future prospects .Neuron. 2011; 70(4):614-625.
4. Altman J, Das GD. Autoradiographic and histological evidence of postnatal hippocampal neurogenesis in rats. J Comp Neurol. 1965; 124(3):319-335.
5. Reynolds BA, Weiss S. Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system. Science. 1992; 255(5052):1707-1710.
6. Guo W, Patzlaff NE, Jobe EM, Zhao X. Isolation of multipotent neural stem or progenitor cells from both the dentate gyrus and subventricular zone of a single adult mouse. Nat Protoc. 2012; 7(11):2005-2012.
7. Matsuda Y, Yoshimura H, Suzuki T, Ishiwata T. Nestin: neural stem/progenitor cell marker in brain tumors. Evolution of the molecular biology of brain tumors and the therapeutic implications InTech. Croatia. 2013:623-638.
8. Serakinci N, Keith WN. Therapeutic potential of adult stem cells. Europ J Cancer. 2006; 42(9):1243-1246.
9. Piozzi F, Bruno M. Diterpenoids from roots and aerial parts of the genus Stachys. Rec Nat Prod. 2011; 5(1):1-11.
10. Gören AC. Use of Stachys Species (Mountain Tea) as Herbal Tea and Food. Rec Nat Prod. 2014; 8(2):71-82.
11. Erkara P, Koyuncu O. A study of the anatomy and pollen morphology of two economically important species of Stachys L. (Lamiaceae) in Turkey. J Appl Biol Sci. 2007; 1(3):49-56.
12. Tundis R, Peruzzi L, Menichini F. Phytochemical and biological studies of Stachys species in relation to chemotaxonomy: a review. Phytochemistry. 2014; 102:7-39.
13. Taylor CJ, Jhaveri DJ, Bartlett PF. The therapeutic potential of endogenous hippo-

campal stem cells for the treatment of neurological disorders. Front Cell Neuroscie. 2013; 7:5.

14. Lindvall O, Björklund A. Cell replacement therapy: helping the brain to repair itself. NeuroRx. 2004; 1(4):379-381.
15. Hermann A, Gastl R, Liebau S, Popa MO, Fiedler J, Boehm BO, et al. Efficient generation of neural stem cell-like cells from adult human bone marrow stromal cells. J Cell Sci. 2004; 117(19):4411-4422.
16. Conforti F, Menichini F, Formisano C, Rigano D, Senatore F, Arnold NA, et al. Comparative chemical composition, free radical-scavenging and cytotoxic properties of essential oils of six Stachys species from different regions of the Mediterranean Area. Food Chem. 2009; 116(4):898-905.
17. Goren AC, Piozzi F, Akcicek E, Kılıç T, Çarıkçı S, Mozioğlu E, et al. Essential oil composition of twenty-two Stachys species (mountain tea) and their biological activities. Phytochemistry Letters. 2011; 4(4):448-453.
18. Stamatis G, Kyriazopoulos P ,Golegou S, Basayiannis A, Skaltsas S, Skaltsa H. In vitro anti-Helicobacter pylori activity of Greek herbal medicines. J Ethnopharmacol. 2003; 88(2):175-179.
19. Ugur A, Sarac N, Varol O. Antimicrobial activities of the essential oils of endemic Stachys rupestris and Stachys amanica against multi-resistant bacteria. Indian J Pharmacol. 2013; 45(2):201-202.
20. Gören AC, Akçicek E, Dirmenci T, Kilic T, Mozioğlu E, Yilmaz H. Fatty acid composition and chemotaxonomic evaluation of species of Stachys. Nat Prod Res. 2012; 26(1):84-90.
21. Tundis R, Bonesi M, Pugliese A, Nadjafi F, Menichini F, Loizzo MR. Tyrosinase, acetyl-and butyrylcholinesterase inhibitory activity of Stachys lavandulifolia Vahl (Lamiaceae) and its major constituents. Rec Nat Prod. 2015; 9(1):81-93.
22. Piozzi F, Bruno M. Diterpenoids in the essential oils from the genus Stachys. Rec Nat Prod. 2009; 3(3):120-125.
23. Morteza-Semnani K, Akbarzadeh M, Changizi S. Essential oils composition of Stachys byzantina, S. inflata, S. lavandulifolia and S. laxa from Iran. Flavour Frag J. 2006; 21(2):300-303.
24. da-Silva V, De-Freitas J, Mattos A, Paiva-Gouvea W, Presgrave O, Fingola F, et al. Neurobehavioral study of the effect of beta-myrcene on rodents. Braz J Med Biol Res. 1990; 24(8):827-831.