مقاله اصیل پژوهشی

اثر عصاره آبی زعفران (Crocus sativus L) بر تمایز استئوژنیکی در سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق‌شده از مغز استخوان رت

طیبه رمضانی[1]، جواد بهارآرا[2]، نگار صغیری[3]

چکیده

زمینه و هدف: کلاله زعفران، به‌طور گسترده، بر ضدّ بیماری‌های مختلف انسان استفاده می‌شود. با توجه به خواص و موادّ تشکیل‌دهنده این گیاه، در مطالعه حاضر، اثرات عصاره آبی زعفران بر القای تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق‌شده از مغز استخوان موش صحرایی به سمت استئوبلاست، بررسی شد.

روش تحقیق: در این مطالعه تجربی، سلول‌های مغز استخوان ران موش‌های صحرایی جدا شد و فلوسایتومتری برای شناسایی سلول‌ها انجام گرفت. در گروه تجربی، سلول‌های بنیادی، با غلظت‌های مختلف 0/5، 1، 1/5 و 2 میلی‌گرم در میلی‌لیتر عصاره آبی زعفران، تیمار شدند. اثر سیتوتوکسیک عصاره آبی زعفران، به‌روش MTT و اثرات تمایزی آن، با رنگ‌آمیزی آلیزارین قرمز و سنجش فعالیت آلکالین‌فسفاتاز بررسی شد.

یافته‌ها: نتایج فلوسایتومتری با استفاده از آنتی‌بادی بر ضدّ CD44، بنیادی‌بودن سلول‌های مورد استفاده را تأیید نمود. یافته‌های حاصل از سنجش MTT نشان داد، این عصاره با غلظت حدود 1/5 میلی‌گرم در میلی‌لیتر ، در مدت 24 ساعت منجر به مرگ 50 درصد سلول‌های بنیادی مشتق از مغز استخوان رت می‌شود (P<0/001). نتایج رنگ‌آمیزی نشان داد، عصاره آبی زعفران، به‌صورت وابسته به دوز (بیشترین تمایز در غلظت 700µg/ml)، در مدت 21 روز منجر به تمایز این سلول‌ها به استئوبلاست می‌گردد؛ همچنین فعالیت آلکالین‌فسفاتازی بالاتر در گروه آزمون نسبت به گروه کنترل ، در روز 14 مشاهده گردید (P<0/001).

نتیجه‌گیری: یافته‌های این مطالعه نشان داد که سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق‌شده از مغز استخوان رت تیمارشده با عصاره آبی زعفران، در مسیر تمایز، به استئوبلاست وارد می‌شوند.

واژه‌های کلیدی: سلول‌های بنیادی مزانشیمی؛ زعفران؛ استئوبلاست؛ موش صحرایی

مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی بیرجند. 1393؛ 21 (2): 169-178.

دریافت: 1392/03/12 **پذیرش: 1392/08/28**

[1] دانشجوی دکترای تخصصی زیست‌شناسی تکوین جانوری، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه خوارزمی، تهران، ایران.

[2] نویسنده مسؤول؛ دانشیار، دکترای تخصصی زیست‌شناسی تکوین جانوری، گروه زیست‌شناسی ومرکز تحقیقات بیولوژی کاربردی تکوین جانوری، دانشگاه آزاد اسلامی واحد مشهد، مشهد، ایران.
آدرس: مشهد- خیابان راهنمایی 24- مرکز تحقیقات بیولوژی کاربردی تکوین جانوری، دانشگاه آزاد اسلامی مشهد
تلفن:0511-38437092 نمابر: 0511-38437092 پست الکترونیکی: baharara@yahoo.com

[3] کارشناسی ارشد زیست‌شناسی سلولی تکوینی، مرکز تحقیقات بیولوژی کاربردی تکوین جانوری و عضو باشگاه پژوهشگران جوان، دانشگاه آزاد اسلامی واحد مشهد، مشهد، ایران.

مقدمه

زعفران با نام علمی *Crocus sativus L*، نوعی گیاه بوته‌ای است که از مناطق مختلف جهان از جمله: ایران، چین، اسپانیا و ایتالیا جمع‌آوری می‌شود (1).گیاه زعفران، کاربردهای متنوّع دارویی دارد و به‌عنوان ادویه در صنایع غذایی به‌کار می‌رود (2). مادگی این گیاه، در طبّ سنتی چین به‌عنوان آرام‌بخش و تسکین‌دهنده دردهای قاعدگی استفاده می‌گردد. در کلاله‌های رنگی زعفران، حدود 150 نوع ترکیب فعّال و غیر فعّال وجود دارد که مهمترین ترکیبات فعّال بیولوژیکی در این گیاه شامل: کروسین، پیکروکروسین، کاروتنوئید، سافرانال و ویتامین‌ها می‌باشد. تحقیقات در زمینه‌های طبّ مدرن، نشان داده است که عصاره تام و یا موادّ تشکیل‌دهنده این گیاه، به‌صورت خالص، خواصّ ضدّ توموری و ضدّ التهابی دارند؛ همچنین این گیاه برای درمان آترواسکلروزیس و آسیب‌های کبدی اهمیت دارد (3- 7).

سلول‌های بنیادی مزانشیمی را می‌توان از مغز استخوان، بافت چربی و خون بند ناف جدا کرد (5). این سلول‌ها، سلول‌هایی چندتوان و دارای توانایی خودنوسازی و تمایز به رده‌های مختلف سلولی هستند؛ بنابراین این سلول‌ها برای سلول‌درمانی بسیارمهم هستند و نیز مدلی برای درک بهتر وقایع تمایزی می‌باشند (8، 9). از آنجا که دسترسی به منبعی مناسب از سلول‌های بنیادی، یک اصل مهم در سلول‌درمانی است و مغز استخوان، منبعی در دسترس از این سلول‌ها می‌باشد، تحقیقات فراوان در زمینه استفاده از سلول‌های بنیادی مغز استخوان در سلول‌درمانی انجام گرفته است (10، 11). همان‌طور که بیان شد، سلول‌های بنیادی، توانایی تمایز به رده‌های مختلف سلولی را دارند که از بین آنها، تمایز به سمت رده‌های آدیپوسیت و استئوبلاست، بیشتر مورد بررسی قرار گرفته است (10)؛ همچنین رابطه دوطرفه بین تمایز استئوبلاستی و آدیپوسیتی وجود دارد (12). تمایز استئوژنیک سلول‌های بنیادی مزانشیمی در شرایط برون‌تنی، معمولاً با پدیدارشدن ریخت سلول‌های استئوبلاستی، افزایش فعالیت آلکالین فسفاتازی، تشکیل دانه‌های معدنی شبیه به استخوان که محتوی کلاژن تیپ یک است و نیز بیان برخی ژن‌های اختصاصی از جمله: استئوکلسین، استئونکتین، سیالوپروتئین استخوانی 2 و استئوپونتین، شناسایی می‌شود (13). با توجه به ضرورت شناسایی عوامل مؤثّر بر القای تمایز سلولی‌های بنیادی به سمت رده‌های مختلف نظیر: بافت‌های استخوانی و چربی برای اهداف درمانی از جمله درمان پوکی استخوان، تحقیق حاضر با هدف بررسی اثرات تمایزی عصاره آبی کلاله‌های زعفران بر تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق‌شده از مغز استخوان رت انجام شد.

روش تحقیق

این مطالعه از نوع تجربی آزمایشگاهی بود که در سال تحصیلی 92-1391، در مرکز تحقیقاتی بیولوژی کاربردی تکوین جانوری دانشگاه آزاد اسلامی مشهد انجام شد.

تهیه عصاره آبی کلاله‌های رنگی زعفران

کلاله زعفران، از شرکت نوین زعفران خراسان رضوی تهیه گردید. 3 گرم از کلاله‌های خشک زعفران، کاملاً ساییده شد و عصاره‌گیری با استفاده از دستگاه سوکسیله و آب مقطر انجام گرفت؛ سپس برای خشک‌کردن عصاره زعفران، از دستگاه انجماد در خلاء استفاده شد. برای تهیه غلظت‌های مورد نیاز، پودر حاصل از عصاره‌گیری کلاله‌های زعفران، توزین و در محیط کشت DMEM[1] حل شد.

حیوانات آزمایشگاهی

رت‌های نژاد ویستار نر، از مؤسّسه سرم‌سازی رازی مشهد با محدوده وزنی 180 تا 120 گرم تهیه و در مرکز پرورش و نگهداری حیوانات مرکز تحقیقات بیولوژی کاربردی تکوین جانوری، در شرایط استاندارد 12 ساعت نور و 12 ساعت تاریکی و دمای 2±22 نگهداری شدند. حیوانات، غذا و آب به مقدار کافی در اختیار داشته و از سلامت کامل، برخوردار بودند؛ همچنین در کلیه مراحل انجام آزمایش‌ها بر روی

[1] *Medium Dulbeco's Modified Eagle*

حیوانات، مقرّرات کمیته اخلاق کار با حیوان دانشگاه رعایت گردید.

استخراج و کشت سلول‌های بنیادی مزانشیمی از مغز استخوان رت

در هر مرتبه استخراج سلول بنیادی، یک سر رت با سن تقریبی 6-8 هفته، به‌وسیله کلروفرم کشته شد و استخوان‌های ران آن جدا گردید. پس از جداسازی عضلات و بافت‌های نرم اطراف آن، مغز استخوان، با عمل Flushing خارج گردید. سلول‌های خارج‌شده، سانتریفیوژ (Sigma, USA) شدند. در مرحله بعد، سلول‌ها به فلاسک کشت سلولی حاوی محیط کشت DMEM همراه با FBS (Fetal bovine serum) 10درصد و پنی‌سیلین-استرپتومایسین یک درصد انتقال داده شدند.

شناسایی سلول‌های بنیادی با نشانگر CD44

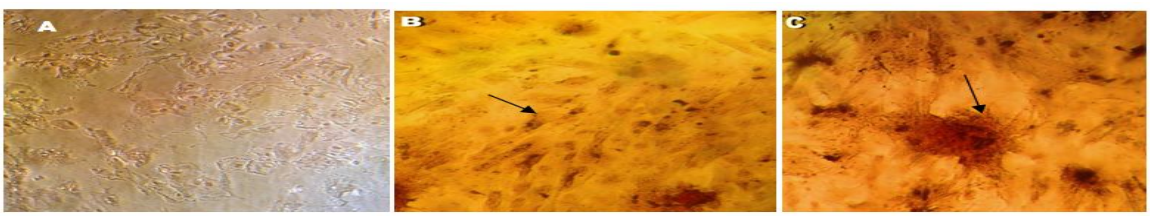
برای اثبات بنیادی‌بودن سلول‌ها، از روش فلوسایتومتری استفاده شد. سلول‌ها بعد از جداکردن از کف فلاسک، سانتریفیوژ شدند. سپس آنتی‌بادی اولیه CD44 کونژوگه با فیکواریترین، به سلول‌ها اضافه گردید و برای کنترل منفی نیز از آنتی‌بادی PE-IgG2a استفاده شد؛ سپس شستشو با PBS صورت پذیرفت و سلول‌ها با فرمالین 1%، ثابت و با دستگاه فلوسایتومتری آنالیز شدند (شکل 1).

سنجش میزان سمّیت عصاره آبی زعفران

برای سنجش میزان سمّیت عصاره آبی زعفران بر سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق‌شده از مغز استخوان رت، از سنجش MTT (4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) استفاده گردید. به‌طور خلاصه، تعداد 5×10^4 سلول، در پلیت‌های 96 خانه کشت داده شد و بعد از گذشت 24 و 48 ساعت، با 0/5، 1، 1/5 و 2 میلی‌گرم در میلی‌لیتر عصاره کلاله زعفران تیمار شدند. پس از سپری‌شدن زمان مورد نظر، به هر خانه، 10 میکرولیتر محلول MTT اضافه گردید و سلول‌ها به مدت 4 ساعت، دور از نور انکوبه شده و سپس 100 میکرولیتر dimethyl sulfoxide (DMSO) به آنها اضافه شد. جذب محلول رنگی در طول موج 560 نانومتر، با اسپکتوفتومتر (Epoch, USA)اندازه‌گیری شد و نیز درصد بقای سلول‌ها در مقایسه با گروه کنترل محاسبه گردید.

القای تمایز در سلول‌های مزانشیمی مشتق‌شده از مغز استخوان

برای تعیین غلظت مناسب برای القای تمایز در سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق‌شده از مغز استخوان، از غلظت‌های پایین‌تر از دوز کشنده استفاده گردید. سلول‌ها با تعداد 10^3 عدد، در پلیت‌های 96 خانه کشت داده شدند و بعد از 24 ساعت، با عصاره آبی کلاله گیاه زعفران با دوزهای 200، 300، 400، 500، 600 و 700 میکروگرم در میلی‌لیتر، به مدت 3 هفته تیمار شدند. در طی این مدت، تغییرات این سلول‌ها، به‌طور روزانه با استفاده از میکروسکوپ فاز متضاد، با دقت (INV3, Italy) تحت نظر قرار گرفت.



شکل 1- مقایسه میزان رنگ‌پذیری ماتریکس خارج‌سلولی با رنگ‌آمیزی آلیزارین قرمز. A) گروه کنترل که هیچ نوع تیماری دریافت نکرده بود؛ B) گروه تیمار با دوز 400 میکروگرم بر میلی‌لیتر عصاره زعفران؛ C) گروه تیمار با دوز 700 میکروگرم بر میلی‌لیتر عصاره زعفران در بازه زمانی 21 روز. رنگ‌پذیری ماتریکس به‌وسیله آلیزارین قرمز با علامت پیکان مشخص گردیده است. تمایز به‌صورت وابسته به دوز می‌باشد و دوز 700 میکروگرم بر میلی‌لیتر، بیشترین میزان تمایزیافتگی را نشان داده است. میکرسکوپ فاز متضاد 100×10.

بررسی تمایز به سمت استئوبلاست با رنگ‌آمیزی آلیزارین قرمز

تک‌لایه‌های سلولی تحت تیمار با عصاره زعفران، به مدت 21 روز، با PBS شسته و به‌مدت 10 دقیقه با متانول خالص (Sigma, USA) تثبیت شد؛ سپس رنگ‌آمیزی با محلول رنگی آلیزارین قرمز (Merck, Germany) در زمان 5 دقیقه صورت گرفت؛ سپس نمونه‌ها با آب مقطر شستشو داده شدند و با میکروسکوپ فاز متضاد (INV3, Italy) مورد ارزیابی قرار گرفتند.

بررسی تمایز به‌سمت آدیپوسیت با رنگ‌آمیزی Red Oil

سلول‌های تحت تیمار با عصاره زعفران، به‌مدت 21 روز در دمای اتاق، با فرمالین 4 درصد تثبیت شدند و سپس با اتانول 70 درصد، شستشو و به‌مدت 20 تا 30 دقیقه با محلول Oil Red (Sigma, USA) رنگ‌آمیزی شدند. در پایان، محلول رنگی، خارج و سلول‌ها سه‌بار با الکل 70 درصد شستشو و با میکروسکوپ فاز متضاد، مورد مطالعه قرار گرفتند.

سنجش فعالیت آلکالین فسفاتازی

سلول‌ها بعد از 14 روز تیمار با عصاره زعفران، با استفاده از PBS سرد، از سطح پلیت جدا شدند و به‌وسیله تریتون 100X، لیز شده و با استفاده از پیپتاژ، هموژنایز گردیدند. محلول حاصل، با استفاده کیت سنجش آلکالین‌فسفاتاز (Pars Azmoon, Iran) و با روش رنگ‌سنجی، مورد آزمایش قرار گرفت.

تجزیه و تحلیل آماری

به‌منظور بررسی وجود یا عدم وجود اختلاف بین میانگین بیش از دو گروه، از آزمون آنالیز واریانس یک‌عاملی استفاده شد؛ همچنین برای مشخص‌نمودن اختلاف بین گروه‌ها، از آزمون Tukey استفاده شد. داده‌های کمّی، توسط نرم‌افزار SPSS (ویرایش 16) در سطح $P<0/05$ تجزیه و تحلیل گردید.

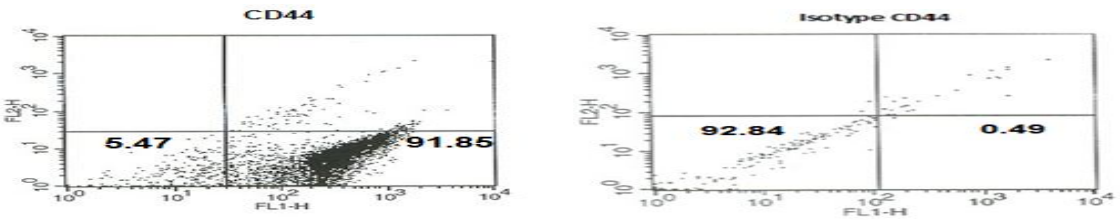
یافته‌ها

ارزیابی مورفولوژی سلول‌های کشت‌شده

در کشت اولیه سلول‌های بنیادی مزانشیمی جداشده از مغز استخوان، رت‌های نژاد ویستار بسیار هتروژن و ناهمگن بودند. در طی تعویض محیط، سلول‌های خون‌ساز که نچسبیده بودند، حذف شدند و در طی پاساژ سلولی، سلول‌های تمایزیافته چسبنده نیز که مورفولوژی متفاوت از سلول‌های مزانشیمی دارند، حذف گردیدند؛ به‌طوری‌که در پاساژ دوم، تعداد سلول‌های دوکی نسبت به پاساژ اول بیشتر و در طی پاساژ چهار، اغلب سلول‌ها دوکی شکل بودند.

نتایج فلوسایتومتری سلول‌های بنیادی مزانشیمی

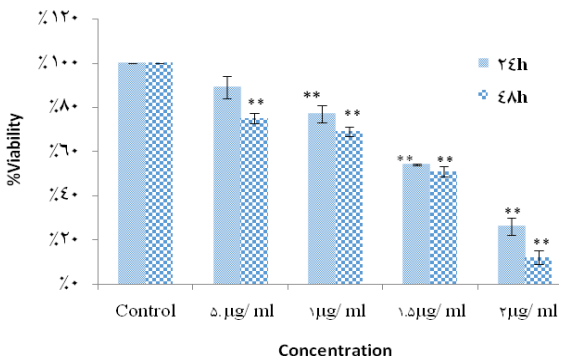
بررسی نتایج فلوسایتومتری سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان نشان داد که این سلول‌های استخوان، 91/85درصد، نشانگر سطحی CD44 را بیان می‌کنند (نمودار 1).



نمودار 1- نتایج حاصل از فلوسایتومتری سلول‌های مزانشیمی استخراج‌شده از مغز استخوان رت. 91 درصد سلول‌ها برای نشانگر سطحی اختصاصی سلول‌های بنیادی CD44، مثبت می‌باشند (الف)؛ درحالی‌که سلول‌های مذکور نسبت به ایزوتایپ آنتی‌بادی CD44 بیش از 92 درصد منفی می‌باشند (ب). بررسی نتایج فلوسایتومتری سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان با نشانگر سطحی CD44: سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان مشتق از مغز استخوان رت‌های نژاد ویستار، بیش از 90درصد این نشانگر را بیان می‌کنند؛ درحالی‌که بیان ایزوتایپ CD44 در همین سلول‌ها کمتر از یک درصد می‌باشد.

بررسی میزان سمّیت عصاره زعفران

یافته‌ها نشان داد که عصاره آبی زعفران به‌صورت وابسته به دوز، منجر به مهار تکثیر و مرگ سلولی در سلول‌های مزانشیمی مشتق‌شده از مغز استخوان رت می‌شود. غلظتی که موجب مرگ نیمی از سلول‌ها می‌شود، حدود 1/5 میلی‌گرم بر میلی‌لیتر می‌باشد. دوزهای پایین‌تر از این غلظت، مهار رشد را به دنبال دارد و غلظت‌های بالاتر، موجب لیزشدن سلول‌ها در چند ساعت اولیه تیمار می‌گردد (نمودار 2).



نمودار 2- بررسی میزان سمیت 24 یا 48 ساعت مجاورت با دوزهای مختلف عصاره زعفران بر روی سلول‌های بنیادین. اثر عصاره آبی کلاله زعفران بر سلول‌های مزانشیمی مغز استخوان. این نمودار نشان می‌دهد که زعفران به‌صورت وابسته به دوز و زمان، منجر به مهار تکثیر سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از مغز استخوان رت‌های نژاد ویستار می‌گردد؛ به‌طوری‌که قابلیت سلول‌های زنده در گروه تیمار نسبت به کنترل، به‌صورت معنی‌داری کاهش می‌یابد (**P<0/001، *P<0/05).

تأثیر عصاره آبی کلاله زعفران در تمایز سلول‌های مزانشیمی مشتق‌شده از مغز استخوان رت

در این مطالعات، از غلظت‌های مختلف عصاره آبی زعفران، برای القای تمایز در سلول‌های مزانشیمی مشتق‌شده از مغز استخوان، در مدت 3 هفته استفاده گردید. نتایج بررسی‌های مورفولوژیک نشان داد که در دوزهای 500، 600 و 700 میکرولیتر بر میلی‌لیتر، سلول‌ها از روز 8 تیمار، شروع به جهت‌گیری منظم می‌کنند؛ به‌طوری‌که در روز 14، تفاوت آرایش فضایی سلول‌ها در نمونه‌های کنترل و تیمار کاملاً مشخص بود. این تغییرات، نشان‌دهنده اثرگذاری عصاره زعفران بر سلول‌ها و در نتیجه تغییر مورفولوژی آنها می‌باشد.

رنگ‌آمیزی آلیزارین قرمز

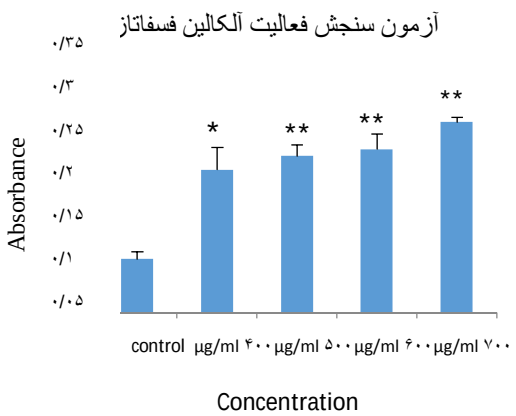
بعد از مدت 21 روز، رنگ‌آمیزی آلیزارین قرمز صورت گرفت. بررسی نتایج رنگ‌آمیزی آلیزارین قرمز نشان داد که عصاره کلاله‌های زعفران، قادر به ایجاد تمایز در سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق‌شده از مغز استخوان به سمت استئوبلاست‌ها می‌باشد. با بالارفتن دوز عصاره، میزان رسوب‌گذاری و در نتیجه رنگ‌پذیری ماتریکس خارج سلولی نیز بیشتر می‌شود (شکل 1).

رنگ‌آمیزی Oil Red

سلول‌های مزانشیمی که به مدت 3 هفته، با غلظت‌های مختلف عصاره آبی کلاله زعفران تیمار شده بودند، با محلول Oil Red رنگ نگرفتند.

بررسی نتایج آزمون آلکالین‌فسفاتاز

نتایج حاصل از اندازه‌گیری کمّی فعالیّت آلکالین‌فسفاتاز نشان داد که میزان فعالیت این آنزیم در گروه‌های تیمار، در مقایسه با گروه کنترل به‌صورت معنی‌دار و وابسته به غلظت، افزایش یافته است (P=0/05)(نمودار 3).



نمودار 3- مقایسه میزان فعالیت آلکالین‌فسفاتاز در سلول‌های تیمارشده با دوزهای مختلف

نمودار 3 نشان می‌دهد که میزان جذب نوری در سلول‌های تیمارشده با عصاره کلاله زعفران، به‌صورت

معنی‌داری نسبت به گروه کنترل افزایش یافته است که نشان‌دهنده میزان فعالیت آلکالین‌فسفاتازی بیشتر در گروه‌های تیمار در مقایسه با گروه کنترل می‌باشد (P<0/05*، P<0/001**).

بحث

در این پژوهش، توانایی عصاره آبی کلاله‌های رنگی زعفران برای القای تمایز استئوبلاستی در سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق‌شده از مغز استخوان رت، مورد بررسی قرار گرفت. مغز استخوان، حاوی زیرمجموعه‌ای از سلول‌های چندتوانه با توانایی تمایز به استئوبلاست، آدیپوسیت، میوسیت و کندروسیت می‌باشد. سلول‌های مشتق‌شده از مغز استخوان، بیشتر از 30 سال است که در پیوند مغز استخوان مورد استفاده قرار می‌گیرند (14). مطالعات پیش‌کلینیکی، شواهدی مبنی بر توانایی این سلول‌ها برای پیوند و ترمیم ارائه نموده است (15). با توجه به روش ساده جداسازی و کشت سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق‌شده از مغز استخوان و قابلیّت دسترسی آسان به این سلول‌ها، در مطالعه حاضر، از این سلول‌ها برای القای تمایز استفاده گردید (16)؛ از طرف دیگر، تحقیقات قبلی نشان داده‌اند که زعفران و یا ترکیب عمده آن-سافرانال- قادر به مهار تکثیر و القای تمایز در برخی از رده‌های سلولی می‌باشد (6)، ولی تاکنون اثرات این گیاه درمانی، بر تمایز سلول‌های بنیادی، مورد بررسی قرار نگرفته است؛ لذا در تحقیق حاضر، به‌منظور استفاده از ترکیبات طبیعی گیاهی در جهت اهداف درمانی، اثر عصاره آبی کلاله زعفران بر تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان، مورد بررسی قرار گرفت.

در مطالعه Wexler و همکاران، سلول‌های جداشده از مغز استخوان رت، بعد پاساژ سوم خالص شدند. این سلول‌ها دوکی شکل بودند و ظاهری شبیه فیبروبلاست داشتند (16). در مطالعه حاضر برای اثبات بنیادی‌بودن سلول‌ها، از آنتی‌ژن CD44 و روش فلوسایتومتری استفاده گردید.

مطالعات قبلی نشان داده‌اند که سلول‌های بنیادی جداشده از مغز استخوان، نشانگرهایی نظیر: CD166، CD29، CD106، CD105 و CD44 را بیان می‌کنند (17). نتایج حاصل از فلوسایتومتری نشان داد که بیش از 95% این سلول‌ها، آنتی‌ژن CD44 را بیان می‌کنند. در تحقیقات قبلی بر روی سلول‌های بنیادی نیز از این نوع آنتی‌ژن، برای اثبات بنیادی‌بودن استفاده شده است (18)؛ برای مثال، Amani و همکاران در سال 2009 برای شناسایی سلول‌های مزانشیمی استخراج‌شده از مغز استخوان، از نشانگر CD44 استفاده نمودند (18). در این تحقیق، برای بررسی میزان سمّیت زعفران بر سلول‌های بنیادی مزانشیمی، از سنجش MTT استفاده گردید. نتایج حاصل از این آزمون نشان داد، عصاره آبی کلاله‌های رنگی زعفران، دارای توانایی مهار تکثیر سلول‌های بنیادی به‌صورت وابسته به دوز و زمان (24 و 48 ساعت) می‌باشند؛ به‌طوری‌که دوزهای پایین‌تر از غلظت 1mg/ml، منجر به مهار تکثیر این سلول‌ها در 24 ساعت می‌گردد. مرگ 50% سلول‌ها در غلظت 1/5 میلی‌گرم بر میلی‌لیتر مشاهده شد؛ درحالی‌که غلظت‌های بالاتر، مرگ سلولی را به‌دنبال داشت. در مطالعات سایر محققین نیز برای بررسی میزان سمّیت مواد بر سلول‌های مختلف، از این آزمون استفاده شده است (19)؛ همچنین برخی مطالعات دیگر نیز که در مورد بررسی اثرات عصاره کلاله رنگی این گیاه بر سلول‌های غیربنیادی و یا سرطانی صورت گرفته‌اند، بر قدرت مهار تکثیری زعفران تأکید دارند؛ به‌عنوان مثال، Tavakkol-Afshari در سال 2008 نشان داد که سافران - از ترکیبات مهم زعفران- باعث مهار تکثیر و در دوزهای بالا، باعث القای آپوپتوز سلول‌های HepG2 و HeLa می‌گردد (20). Aung و همکاران در سال 2007، اثرات کروسین را بر مهار تکثیر سلول‌های سرطانی روده بزرگ گزارش نمودند (21).

به‌منظور تأیید تمایز سلول‌ها به سلول‌های استئوبلاست، از رنگ‌آمیزی آلیزارین قرمز استفاده شد. نتایج حاصل از

رنگ‌آمیزی آلیزارین قرمز در مطالعه حاضر نشان داد که عصاره آبی کلاله زعفران، به‌صورت وابسته به دوز، قادر به القای تمایز سلول‌های بنیادی مغز استخوان به سمت دودمان استئوسیت می‌باشد؛ به‌طوری‌که رسوب مواد معدنی در مدت 21 روز، به‌وسیله رنگ آلیزارین قرمز آشکار شد؛ ماتریکس خارج سلولی، قرمزرنگ گردید و با افزایش دوز، میزان رنگ‌پذیری ماتریکس افزایش یافت. Eskildsen و همکاران در سال 2011 نیز برای اثبات تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی به استئوبلاست، از رنگ‌آمیزی آلیزارین قرمز استفاده نمودند (22). ریخت‌شناسی سلول‌ها در این مطالعه پس از رنگ‌آمیزی با آلیزارین قرمز، مشابه ریخت‌شناسی سلول‌های تمایزیافته توسط Trompeter و همکاران در 2013 بود (23).

در پژوهش ما، آزمون سنجش فعالیت آلکالین‌فسفاتاز، افزایش فعالیت این آنزیم را در گروه‌های تجربی نسبت به گروه کنترل به‌صورت وابسته به دوز نشان داد؛ همچنین شروع تعهّد سلول‌های بنیادی به استئوبلاست، منجر به افزایش فعالیت آلکالین‌فسفاتازی در این سلول‌ها می‌شود (23). در تحقیق حاضر نیز میزان فعالیت آلکالین‌فسفاتاز در سلول‌ها، با افزایش دوز، بعد از 14 روز بیشتر شد؛ به‌طوری‌که بیشترین میزان فعالیت آلکالین‌فسفاتازی، در دوز 700 میکروگرم بر میلی‌لیتر مشاهده گردید که بیان‌کننده تمایز بیشتر سلول‌ها در دوزهای افزایش‌یافته می‌باشد؛ بنابراین نتایج حاصل از این بررسی، تأکیدی دیگر بر پتانسیل تمایزدهندگی عصاره زعفران به‌سمت بافت استخوانی، علاوه بر رنگ‌آمیزی آلیزارین قرمز می‌باشد. Masoum و همکاران نیز از آزمون آلکالین‌فسفاتاز برای اثبات تمایز استئوژنیک در سلول‌های بنیادی مشتق از پالپ دندان شیری استفاده نمودند. این گروه نشان دادند، تمایز استئوژنیک، منجر به افزایش فعالیت آنزیم مذکور می‌گردد (24). با توجه به سوابق مطالعاتی موجود، می‌توان اینگونه استدلال نمود که طبق نتایج حاصل از سنجش قابلیّت بقای سلول‌های تحت تیمار با عصاره زعفران، این ماده باعث مهار تکثیر این سلول‌ها می‌شود و این امر، می‌تواند مقدمه ورود سلول‌های بنیادی به فاز تمایزی باشد. غلظت‌های کمتر از 400 میکروگرم بر میلی‌لیتر، اثر تمایزدهندگی قابل‌ملاحظه‌ای با رنگ‌آمیزی آلیزارین قرمز نشان نداد که این امر می‌تواند به‌علت کاهش ماده در دسترس برای القای تمایز و تغییر پروفایل ژنی سلول‌ها باشد. این دوز، باعث اثرات معنی‌داری در مهار تکثیر سلولی در 24 ساعت پس از تیمار نشد؛ درحالی‌که دوز 700 میکروگرم بر میلی‌لیتر، منجر به تمایز قابل ملاحظه سلولی گردید؛ اگرچه این دوز نیز پایین‌تر از دوز کشندگی زعفران بر این سلول‌ها می‌باشد، ولی قابلیت مهار تکثیر این نوع سلول‌های بنیادی با افزایش دوز، زیاد می‌گردد؛ بنابراین در این حالت، موادّ مؤثّر بیشتر در محیط سلولی وجود داشته و بنابراین اثرات تمایزدهندگی آن نیز افزایش می‌یابد.

همان‌طور که ذکر گردید، نتایج تحقیق حاضر نشان داد که عصاره آبی زعفران می‌تواند منجر به افزایش تمایز استئوبلاستی شود؛ درحالی‌که اثری بر تمایز به سمت رده‌های سلول‌های آدیپوسیت ندارد. این نتیجه مورد انتظار بود، به این دلیل که تمایز سلول‌های بنیادی مغز استخوان به بافت چربی و استخوانی، تحت کنترل اثرات متقابل سیگنال‌ها قرار دارد (12)؛ بنابراین با تعهد سلول‌ها برای تمایز به سمت استئوبلاست، تعهد برای تمایز به آدیپوسیت مهار می‌گردد. با توجه به این نتایج، زعفران به‌عنوان یک ماده طبیعی، می‌تواند گزینه مناسبی برای تحقیقات بیشتر برای استفاده در درمان برخی بیماری‌ها نظیر پوکی استخوان باشد و همچنین در مطالعات مهندسی بافت نیز می‌تواند مورد توجه قرار گرفته و مفید باشد.

نتیجه‌گیری

نتایج حاصل از مطالعه حاضر، بیانگر آنست که عصاره آبی کلاله‌های زعفران، توانایی مهار تکثیر و القای تمایز در سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق‌شده از مغز استخوان

رت‌های نژاد ویستار را دارد. مطالعات بیشتر برای شناخت دقیق‌تر اثرات این گیاه بر سلول‌های بنیادی مزانشیمی و نیز استفاده از این گیاه برای اهداف درمانی ضروری است.

تقدیر و تشکر

از همکاران مرکز تحقیقات و بیولوژی کاربردی تکوین جانوری دانشگاه آزاد اسلامی واحد مشهد، صمیمانه سپاسگزاری می‌شود.

منابع:

1- Pitsikas N, Sakellaridis N. Crocus sativus L. Extracts antagonize memory impairments in different behavioural tasks in the rat. Behav Brain Res. 2006; 173(1): 112-5.

2- Baharara J, Ramezani T, Nejhad Shahrokhabadi K, Nazemi M. Effects of Crocus sativus L. extract and vitamin D3 on in vitro osteogenesis of mecenchymal stem cells. International Journal of Cellular & Molecular Biotechnology. 2014; 2014. Article ID ijcmb-00012.

3- Escribano J, Alonso GL, Coca-Prados M, Fernandez JA. Crocin, safranal and picrocrocin from saffron (Crocus sativus L.) inhibit the growth of human cancer cells in vitro. Cancer Lett. 1996; 100 (1-2): 23-30.

4- Nair SC, Pannikar B, Panikkar KR. Antitumor activity of saffron (Crocus sativus). Cancer Lett. 1991; 57(2): 109-14.

5- Kang C, Lee H, Jung ES, Seyedian R, Jo M, Kim J, et al. Saffron (Crocus sativusL.) increases glucose uptake and insulin sensitivity in muscle cells via multipathway mechanisms. Food Chem. 2012; 135(4): 2350-8.

6- Abdullaev FI. Cancer chemopreventive and tumoricidal properties of saffron (crocus sativus l.). Exp Biol Med (Maywood). 2002; 227(1): 20-5.

7- Zarei Jaliani H, Riazi GH, Ghaffari SM, Karima O, Rahmani A. The effect of the crocus sativus L. Carotenoid, crocin, on the polymerization of microtubules, in vitro. Iran J Basic Med Sci. 2013; 16(1): 101-7.

8- Wang HS, Hung SC, Peng ST, Huang CC, Wei HM, Guo YJ, et al. Mesenchymal stem cells in the Wharton□s jelly of the human umbilical cord. Stem cells. 2004; 2(7): 1330-7.

9- Lee OK, Kuo KT, Chen WM, Lee KD, Hsieh SL, Chen TH. Isolation of multipotent mesenchymal stem cells from umbilical cord blood. Blood. 2004; 103(5): 1669-75.

10- Aghaei Shafi Abadi A, Jaafari SS. Differentiation of human placenta-derived chrionic stem cells in to osteoblast. Journal of guilan university of medical sciences, 2009; 18(71): 1-6. [Persian]

11- Minguell J, Erices A, Conget P. Mesenchymal stem cell. Exp Biol Med (Maywood). 2001; 226(6): 507-20.

12- Fu L, Tang T, Miao Y, Zhang S, Qu Z, Dai K. Stimulation of osteogenic differentiation and inhibition of adipogenic differentiation in bone marrow stromal cells by alendronate via erk and jnk activation.Bone. 2008;43(1): 40-7.

13- Friedman MS, Long MW, Hankenson KD. Osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells is regulated by bone morphogenetic protein-6. J Cell Biochem. 2006; 98(3): 538-54.

14- Ponte AL, Marais E, Gallay N, Langonné N, Delorme B, Hérault O, et al. The in vitro migration capacity of human bone marrow mesenchymal stem cells:comparison of chemokine and growth factor chemotactic activities. Stem Cells. 2007; 25(7): 1737-45.

15- Studeny M, Marini FC, Champlin RE, Zompetta C, Fidler IJ, Andreeff M. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells as vehicles for interferon- β delivery into tumors. Cancer Res. 2002; 62(13): 3603-8.

16- Wexler SA, Donaldson C, Denning-Kendall P, Rice C, Bradley B, Hows JM. Adult bone marrow is a rich source of human mesenchymal 'stem' cells but umbilical cord and mobilized adult blood are not. Br J Haematol. 2003; 121(2): 368-74.

17- Dennis JE, Carbillt JP, Caplan AI, Charbord P. The STRO-1+marrow cell population is multipotential. Cells Tissues Organs. 2002; 170(23): 73-82.

18- Amani M, Amirizadeh N, Soleimani M, Malekan H, Habibi Roudkenar M, Bashtar M. Effect of growth factors of platelet gel on proliferation and differentiation of mesenchymal stem cells. Sci J Iran Blood Transfus Organ. 2009; 6(2): 71-83. [Persian]

19- Lysdahl H, Baatrup A, Nielsen AB, Foldager CB, Bünger C. Phenol red inhibits chondrogenic differentiation and affects osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells in vitro. Stem Cell Rev. 2013; 9(2): 132-9.

20- Shimizu T, Tanaka T, Iso T, Matsui H, Ooyama Y, Kawai-Kowase K. Notch signaling pathway enhances bone morphogenetic protein 2 (BMP2) responsiveness of Msx2 gene to induce osteogenic differentiation and mineralization of vascular smooth muscle cells. J Biol Chem. 2011; 286(21): 19138-48.

21- Tavakkol-Afshari J, Brook A, Mousavi SH. Study of cytotoxic and apoptogenic properties of saffron extract in human cancer cell lines. Food Chem Toxicol. 2008; 46(11): 3443-7.

22- Eskildsen T, Taipaleenm?ki H, Stenvang J, Abdallah BM, Ditzel N, Nossent AY, et al. MicroRNA-138 regulates osteogenic differentiation of human stromal (mesenchymal) stem cells in vivo. Proc Natl Acad Sci U S A. 2011; 108(15): 6139-44.

23- Trompeter HI, Dreesen J, Hermann E, Iwaniuk KM, Hafner, Renwick N, et al. MicroRNAs miR-26a, miR-26b, and miR-29b accelerate osteogenic differentiation of unrestricted somatic stem cells from human cord blood. Trompeter et al. BMC Genomics. 2013;14: 111.

24- Masoum T, Amiri I, Rafatjou R. Effect of chitosan on osteogenic properties of mesenchymal stem cell of exfoliated deciduous teeth. Journal of Dental Medicine. 2013; 26(1): 55-63. [Persian]

Abstract *Original Article*

The Effect of Saffron Aqueous Extract(Crocus sativus L) on Osteogenic Differentiation of Rat Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells

Tayebe Ramezani[1], Javad Baharara[2], Negar Saghiri[3]

Background and Aim: Stigmas of *Crocus sativus L.* is widely used against different human diseases. Regarding the properties of this plant, in the present study the effects of saffron extract on inducing cell differentiation of a rat's bone marrow-derived mesenchymal stem cells (MSCs) into osteoblasts was examined.

Materials and Methods: Bone marrow cells collected from Bone of Wistar rat's femor and flowcytometry were used to identify them. In the experimental group (n=4) MSCs treatment was done with various concentrations of saffron extract (i.e.0.5, 1, 1.5, and 2 mg/ml). Cytotoxic effect of saffron extract was evaluated using MTT assay and its aqueous extract effect on cell differentiation was investigated by means of Alizarin staining and alkaline phosphates activity.

Results: Flowcytometry results confirmed the presence of stem cells using CD44 antibody. MTT assay results showed that the extract concentration of 1.5 mg/ml resulted in the death of 50 percent of stem cells derived from therats' bone marrow during 24 hours ($P<0.001$). Alizarin staining showed saffron aqueous extract increased osteogenic s cell differentiation in a dose dependent manner in 21 days. (The maximum cell differentiation achieved by 700?g/ml concentration). Besides, higher alkaline phosphates activity was evident in the experimental group compared to the control group (n=4) in the 14th day ($P<0.001$).

Conclusion: According to the findings of the current study, MSCs derived from the rat's bone marrow transform into osteoblasts when treated with saffron aqueous extract.

Key Words: Mesenchymal Stem Cells; Osteoblast; Saffron; Rat

Journal of Birjand University of Medical Sciences. 2014; 21 (2): 169-178.

Received: June 2, 2013 Accepted: November 19, 2013

[1] *PhD Student in Animal Developmental Biology, Department of Biology,Biological Science faculty, Kharazmi University, Tehran, Iran;*

[2] *Corresponding author, Associate Professor, Animal Developmental Biology,Department of Biology & Research center for Animal Development Applied Biology,Mashhad Branch, Islamic Azad University, Mashhad, Iran baharara@yahoo.com*

[3] *MSc in cell & developmental biology, Research center for Animal Development Applied Biology & Young Researchers Club, Mashhad Branch, Islamic Azad University, Mashhad, Iran.*