

## تأثیر ژل رویال بر تمایز سلول‌های بنیادی به سلول‌های شبه عصبی در شرایط آزمایشگاهی

مرضیه ابراهیمی (MSc)<sup>۱</sup>، سمیرا اصغرزاده (MSc)<sup>۱</sup>، هدایت اله شیرزاد (PhD)<sup>۱</sup>، نرگس ابراهیمی (BSc)<sup>۱</sup>، مسیح حسینی (MSc)<sup>۱</sup>،  
مسلم کریمیان کاکلی (BSc)<sup>۱</sup>، محمود رفیعیان (PhD)<sup>۱\*</sup>

۱- مرکز تحقیقات گیاهان دارویی، دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد

دریافت: ۹۴/۴/۱، اصلاح: ۹۴/۵/۷، پذیرش: ۹۴/۷/۶

## خلاصه

**سابقه و هدف:** سلول‌های بنیادی کارسینومایی P19 توانایی تمایز به سلول‌های سه لایه جنینی را دارند. از آنجائیکه سلول‌های تمایز یافته می‌توانند باعث کاهش عوارض ناشی از بیماری‌های تحلیل برنده سیستم عصبی شوند. لذا این تحقیق با هدف بررسی تمایز سلول‌های بنیادی P19 به سلول‌های عصبی تحت تأثیر ژل رویال صورت گرفت. **مواد و روش‌ها:** در این مطالعه بنیادی-کاربردی اجسام شبه جنینی حاصل از کشت معلق سلول‌های P19 به ظرف‌های ژلاتینه منتقل شده و سپس در شش گروه با غلظت‌های ۲۵، ۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰، ۲۰۰ و ۳۰۰ mg/ml ژل رویال قرار گرفتند. برای هر گروه پنج خانه در نظر گرفته شد. بررسی مورفولوژی سلول‌های تمایز یافته با استفاده از رنگ آمیزی اختصاصی کرزبل ویوله انجام گرفت. ردیابی بیان پروتئین‌های ویژه سلول‌های عصبی مانند سیناپتوفیزین و بتاتوبولین III با استفاده از ایمونوفلورسنس انجام شده و نتایج مورد بررسی قرار گرفت.

**یافته‌ها:** بر اساس نتایج بدست آمده سلول‌های تیمار شده با ژل رویال به رنگ آمیزی اختصاصی سلول‌های عصبی پاسخ مثبت دادند. میانگین درصد تمایز سلولی در غلظت‌های مختلف ژل رویال به طور معنی داری بیشتر از گروه کنترل منفی (با میانگین درصد تمایز سلولی  $9 \pm 2/3$ ) بوده است. بالاترین درصد تمایز سلولی در گروه‌های تیمار شده با غلظت‌های ۲۰۰ و ۳۰۰ mg/ml (با میانگین درصد تمایز سلولی  $98 \pm 4/8$  و  $99/3 \pm 2/2$ ) مشاهده شد ( $p < 0/05$ ). میانگین درصد سلول‌های تمایز یافته گروه تیمار با غلظت ۲۰۰ mg/ml تفاوت معنی داری با گروه تیمار با غلظت ۳۰۰ mg/ml نداشت.

**نتیجه گیری:** نتایج این مطالعه نشان داد که سلول‌های P19 توانایی تمایز به سلول‌های عصبی را دارند و می‌توانند به عنوان منبعی در سلول درمانی بیماری‌های عصبی استفاده شوند.

**واژه‌های کلیدی:** سلول‌های بنیادی کارسینومایی، تمایز عصبی سلول‌های بنیادی، نشانگرهای عصبی.

## مقدمه

بیماری‌های تحلیل برنده سیستم عصبی مانند آلزایمر در اثر تحلیل و از بین رفتن سلول‌های عصبی و تجمع پروتئین‌های سمی در سیستم عصبی مرکزی ایجاد می‌شوند (۱). تاکنون روش‌های درمانی مختلفی از جمله کاهش سطح پروتئین‌های تجمع یافته با استفاده از روش‌های محدود سازی نفوذ پذیری سد خونی- مغزی برای درمان این بیماری‌ها ارائه شده است (۲). یکی از روش‌های درمانی که در سال‌های اخیر مورد توجه قرار گرفته سلول درمانی با استفاده از سلول‌های بنیادی تمایز یافته به سلول‌های عصبی می‌باشد. تاکنون تمایز سلول‌های بنیادی مختلفی مانند سلول‌های بنیادی جنینی تحت تأثیر عوامل القاگر مختلف مورد بررسی قرار گرفته است (۳). نتایج پژوهش‌ها نشان داد سلول‌های عصبی میتوانند از تمایز سلول‌های بنیادی رویانی انسان و موش بدست آیند (۴). سلول‌های P19 دودمانی از سلول‌های کارسینومای جنینی چند استعدادی هستند که قادرند در محیط کشت حاوی سرم رشد نموده و برای تمایز به هر سه دودمان مزودرمی- اندودرمی و اکتودرمی القا شوند (۵). هنگامی که این سلول‌ها با رتینوئیک اسید تیمار شوند، به نورو اکتودرم تمایز پیدا کرده و محیط کشت حاوی نورون‌ها و سلول‌های گلیا می‌شود. (۶). مطالعاتی نیز روی پیوند سلول‌های P19 تیمار شده با رتینوئیک اسید به جسم مخطط رت بالغ که سیستم ایمنی آن ضعیف شده صورت گرفته است (۷). نتایج پژوهشی که به بررسی اثر داروی دپرنیل در القای تمایز سلول‌های P19 به سلول‌های عصبی پرداخت نشان داد دپرنیل می‌تواند به صورت وابسته به دوز باعث القای این سلول‌ها شود (۸). علاوه بر ترکیبات شیمیایی که برای کنترل و کاهش عوارض بیماری‌های عصبی استفاده می‌شوند تعدادی ترکیب طبیعی نیز وجود دارند که توسط مردم بومی برای درمان و کنترل بیماری‌های عصبی مورد استفاده قرار می‌گیرند (۶). یکی از ترکیباتی که اثرات حفاظتی و آنتی آپوپتاتیک آن

بیماری‌های تحلیل برنده سیستم عصبی مانند آلزایمر در اثر تحلیل و از بین رفتن سلول‌های عصبی و تجمع پروتئین‌های سمی در سیستم عصبی مرکزی ایجاد می‌شوند (۱). تاکنون روش‌های درمانی مختلفی از جمله کاهش سطح پروتئین‌های تجمع یافته با استفاده از روش‌های محدود سازی نفوذ پذیری سد خونی- مغزی برای درمان این بیماری‌ها ارائه شده است (۲). یکی از روش‌های درمانی که در سال‌های اخیر مورد توجه قرار گرفته سلول درمانی با استفاده از سلول‌های بنیادی تمایز یافته به سلول‌های عصبی می‌باشد. تاکنون تمایز سلول‌های بنیادی مختلفی مانند سلول‌های بنیادی جنینی تحت تأثیر عوامل القاگر مختلف مورد بررسی قرار گرفته است (۳). نتایج پژوهش‌ها نشان داد سلول‌های عصبی میتوانند از تمایز سلول‌های بنیادی رویانی انسان و موش بدست آیند (۴). سلول‌های P19 دودمانی از سلول‌های کارسینومای جنینی چند استعدادی هستند که قادرند در

این مقاله حاصل طرح تحقیقاتی به شماره ۱۳۳۲ مرکز تحقیقات گیاهان دارویی دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد می‌باشد.

\* مسئول مقاله: دکتر محمود رفیعیان کوپایی

آدرس: شهرکرد، دانشگاه علوم پزشکی، مرکز تحقیقات گیاهان دارویی. تلفن: ۰۳۸-۳۲۵۷۲۳۵۶

E-mail: rafieian@yahoo.com

IgG کونژوگه با (Sigma, cat: F9137) FITC به عنوان آنتی بادی ثانویه در نظر گرفته شد.

**تهیه غلظت های مختلف ژل رویال:** ژل رویال خریداری شده از زنبورداران شهرکرد با بافر فسفات سالین (PBS) به نسبت (۰/۰۲۵) مخلوط و به مدت یک شبانه روز در انکوباتور شیکر دار در دمای ۴ درجه به آرامی شیک می شود. سپس مخلوط حاصل به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی گراد در دور ۱۲۰۰۰ سانتریفیوژ می شود. محلول رویبی حاصل از سانتریفیوژ جمع آوری و توسط بردفورد تعیین غلظت می شود. در پایان توسط محیط کشت غلظت های ۲۵، ۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰، ۲۰۰ و ۳۰۰ میلی گرم بر میلی لیتر آن تهیه شد.

**تولید اجسام شبه جنینی:** اولین گام در القای تمایز سلولهای بنیادی تشکیل اجسام شبه جنینی (Embryoid bodies: EB) است. به این منظور سلولهای P19 به مدت بیست و چهار ساعت در پتری دیش های فاقد خاصیت چسبندگی کشت داده شدند. سپس EB به پتری دیش های ۶ خانه ای ژلاتینه مخصوص کشت سلول انتقال یافتند. سلولهای کشت داده شده به هفت گروه تقسیم و سلولهای هر گروه به ترتیب گروه یک تا هفت در معرض غلظتهای ۰، ۲۵، ۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰، ۲۰۰ و ۳۰۰ میلی گرم بر میلی لیتر ژل رویال قرار گرفتند. بعد از ۲۴ ساعت محیط کشت سلول ها تعویض شد و سپس به مدت دو هفته در محیط کشت حاوی ده درصد سرم کشت داده شدند. محیط کشت سلولها در تمام گروه ها هر دو روز یکبار تعویض شد. از حدود روز دهم بعد از تیمار فنوتیپ عصبی در سلولهای کشت داده شده ظاهر گردید.

**رنگ آمیزی کرازیل ویوله:** به منظور بررسی مورفولوژیک سلولهای تمایز یافته از رنگ آمیزی اختصاصی کرازیل ویوله استفاده شد. به این منظور سلولها با PBS شسته شدند سپس با استفاده از پارافرمالیدید ۴ درصد فیکس شدند. آبیگری سلول ها در ترکیبی از اتانول و اسیداستیک انجام گرفت. بعد از آبیگری سلول ها سه بار با PBS شستشو داده شدند و به مدت ده دقیقه در ترکیبی محتوی کرزیل ویوله (sigma, cat: 234-043-3) (۰/۲۵٪)، اسیداستیک گلاسیال (۰/۸)، استات سدیم (۰/۶ میلی مولار) و آب (۱۰۰ میلی لیتر) انکوباسیون شدند. در نهایت سلولها با PBS شسته شدند و با استفاده از چسب کانادابالزام (Balsam canada) لامل سلولی روی لام چسبانده می شود. **تعیین بهترین غلظت ژل رویال:** برای تعیین بهترین غلظت ژل رویال که باعث تمایز سلولهای بیشتری به سلولهای شبه عصبی می شوند سلولهای رنگ آمیزی شده شمارش شدند جهت شمارش سلولهای عصبی که با کرزیل ویوله به رنگ بنفش در آمده بودند از گراتیکول شطرنجی استفاده شد. به این منظور برای هر نمونه به طور تصادفی پنج میدان دید میکروسکوپ نوری با بزرگنمایی عدسی شی بیست شمارش شد.

**ایمونوفلورسنس:** به منظور ردیابی بیان نشانگرهای سلولهای عصبی در سلولهای حاصل از تمایز از تکنیک ایمونوفلورسنس استفاده شد. در این پژوهش از آنتی بادی های اولیه بتا توبولین و آنتی بادی اولیه سیناپتو فیزین استفاده شد. آنتی بادی IgG کونژوگه به عنوان آنتی بادی ثانویه در نظر گرفته شد. برای انجام ایمونوفلورسنس سلولهای تیمار شده با رویال ژل به مدت ۳۰ دقیقه با محلول چهار درصد پارافرمالیدید انکوبه شدند بعد از فیکس کردن سلولها سه بار با PBS (Phosphate-buffered saline) شسته شدند. سپس با محلول بلاک کننده حاوی ۰/۰۳ درصد تریتون X-۱۰۰ و ۰/۱۰۰ سرم نرمال بز (Sigma, cat:

بر سلولهای عصبی به اثبات رسیده، ژل رویال (Royal jelly) می باشد. ژل رویال ماده ژلاتینی سفید مایل به زرد روشن، کلوئیدی و چسبناک با بوی خاص و طعمی تند و زننده است (۹۱۰). در پژوهشی نشان داده شد سلولهای تیمار شده با AMP N1-oxide توانایی بیان پروتئینهای اختصاصی سلولهای عصبی بالغ را دارند. Hattori و همکاران نشان دادند که ترکیب AMP N1-oxide رویال ژل باعث افزایش تکثیر پیش سازهای سلول عصبی Neural Stem Cells/ NSCs= progenitor cells می شود (۱۱).

نتایج تحقیقات صورت گرفته در این زمینه پیشنهاد میکند -AMP N1-oxide از طریق افزایش میزان فسفوریلاسیون فاکتورهای نسخه برداری STAT3 تولید استروسیت از سلول پروژنیاتور عصبی را امکان پذیر می سازد. آسیبهای اجتماعی و اقتصادی ناشی از بیماری های تحلیل برنده سیستم عصبی در کشورهای در حال توسعه به شدت در حال افزایش است از این رو لزوم انجام پژوهشهایی در جهت کنترل گسترش و کاهش عوارض ناشی از این بیماریها اجتناب ناپذیر است. لذا این تحقیق با هدف القای فنوتیپ عصبی در سلولهای P19 با استفاده از ژل رویال صورت گرفت.

## مواد و روش ها

در این مطالعه بنیادی-کاربردی تاثیر ژل رویال بر تمایز سلولهای بنیادی P19 به سلولهای شبه عصبی در شرایط آزمایشگاه مورد بررسی قرار گرفت. **کشت سلول:** در پژوهش حاضر از سلولهای ترانوکارسینومایی رده P19 استفاده گردید. این سلول ها به صورت کشت چسبنده از بانک سلولی انسیتوپاستور تهران تهیه و تکثیر شدند. سلولهای P19 در محیط کشت  $\alpha$ -MEM, Gibco, (cat: 11900-073) حاوی ده درصد FBS (Fetal bovine serum, Sigma, cat: 10270-106) (۵۰  $\mu$ g/mL) (Sigma, cat: P3032) و استرپتومایسین (۵۰  $\mu$ g/mL) (Sigma, cat: S1277) کشت داده شدند. اولین گام در القای تمایز، تشکیل اجسام شبه جنینی است به این منظور سلولهای P19 به مدت ۲۴ ساعت در پتری دیش های فاقد خاصیت چسبندگی کشت داده شدند. اجسام شبه جنینی بدست آمده به پتری دیشهای ۱۲ خانه ای ژلاتینه ویژه کشت سلول انتقال یافتند.

سپس با غلظت های ۲۵، ۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰، ۲۰۰ و ۳۰۰ میلی گرم بر میلی لیتر ژل رویال تیمار شدند. جهت بررسی مورفولوژی سلولهای حاصل از تمایز از رنگ آمیزی اختصاصی سلولهای عصبی با کرازیل ویوله (sigma, cat: 234-043-3) استفاده شد. برای تعیین بهترین غلظت ژل رویال که باعث تمایز سلولهای بیشتری به سلولهای شبه عصبی می شوند سلولهای رنگ آمیزی شده شمارش شدند جهت شمارش سلولهای عصبی که با کرزیل ویوله به رنگ بنفش در آمده بودند از گراتیکول شطرنجی استفاده شد. در پایان ردیابی بیان نشانگرهای اختصاصی سلولهای عصبی در سلولهای تمایز یافته با استفاده از تکنیک ایمونوفلورسنس بررسی شد.

در این پژوهش از آنتی بادی های اولیه بتا توبولین anti  $\beta$ -III tubulin monoclonal antibody (Abcam, ab7751) و آنتی بادی اولیه سیناپتو فیزین anti (Abcam, San Francisco, CA, ab8049) monoclonal antibody synaptophysin استفاده شد. آنتی بادی

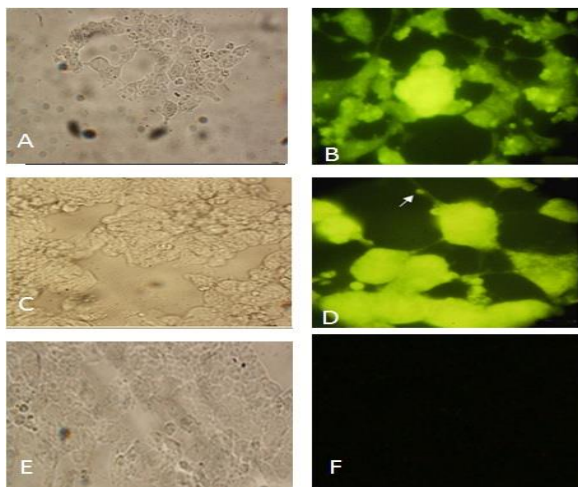
### جدول ۱ تاثیر غلظت های مختلف ژل رویال بر القای فنوتیپ شبه

#### عصبی در سلولهای P19

غلظت عامل القاگر (mg/ml)	در صد القای عصبی (PNI) (Mean±SD)
۲۵	۲۱±۲/۲* b,c,d,e,f
۵۰	۳۲±۲/۳* a,c,d,e,
۱۰۰	۷۱/۳±۵/۳ * a,b,d,e,f
۱۵۰	۸۳±۵/۹ * a,b,c,e,f
۲۰۰	۹۸± ۴/۸* a,b,c,
۳۰۰	۹۹/۳±۲/۲ * a,b,c,d
کنترل	۹±۲/۳ a,b,c,d,e,f

PNI: میانگین درصد القای عصبی، RJ: ژل رویال. \*p<۰/۰۵

تایید هویت سلولهای عصبی به روش ایمنوفلورسنس: ارزیابی ایمنوفلورسنس سلولهای P19 تمایز یافته نشان می دهد که این سلول ها بعد از تیمار با ژل رویال نسبت به سیناپتوفیزین و بتا توبولین III واکنش ایمنی نشان می دهند. نورونهای مثبت نسبت به سیناپتوفیزین و بتا توبولین به صورت سلولهای منفرد یا توده های کوچک سلولی ردیابی شدند (شکل ۲).



#### شکل ۲. تصویر میکروسکوپ فلورسنس از سلول های شبه عصبی حاصل از تمایز سلولهای P19 تحت تأثیر ژل رویال.

A: تصویر میکروسکوپ نوری و B: تصویر میکروسکوپ فلورسنس سلول های تیمار شده با ژل رویال در معرض آنتی بادی اولیه سیناپتوفیزین C: تصویر میکروسکوپ نوری و D: تصویر میکروسکوپ فلورسنس سلولهای تیمار شده با ژل رویال در معرض آنتی بادی اولیه بتا توبولین. E: تصویر میکروسکوپ نوری و F: تصویر میکروسکوپ فلورسنس سلولهای P19 بدون تیمار با ژل رویال در معرض آنتی بادی اولیه سیناپتوفیزین .

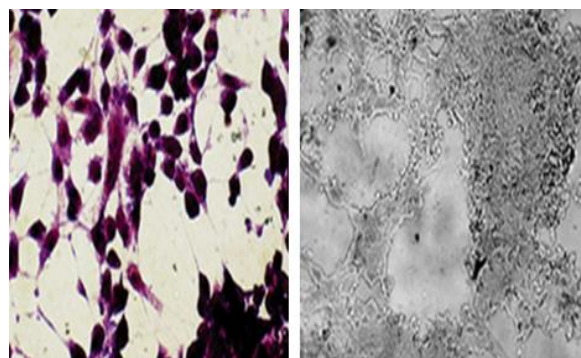
#### بحث و نتیجه گیری

در این مطالعه حدود ده روز بعد از تیمار اجسام شبه جنینی با ژل رویال تعدادی از سلول ها مورفولوژی سلولهای عصبی را پیدا کرده و به رنگ آمیزی اختصاصی سلولهای عصبی پاسخ مثبت می دهند. نتایج پژوهش نشان داد با افزایش غلظت ژل رویال در صد سلولهای تمایز یافته بصورت وابسته به دوز

(G9023: NGS) در PBS به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه شد. این سلول ها به مدت دو ساعت با آنتی بادی های اولیه در دمای ۳۷ درجه انکوبه شدند. بعد از شستشو با PBS به مدت دو ساعت با آنتی بادی ثانویه انکوبه شدند. در نهایت بعد از شستشوی سلولها با PBS لام سلولها توسط گلیسرول ۰/۰۷۰ روی لام چسبانده شدند. با استفاده از میکروسکوپ ایمنوفلورسنس بیان ژن های بتاتوبولین و سیناپتوفیزین در سلولهای تمایز یافته به اثبات رسید. آنالیز آماری داده ها با استفاده از برنامه SPSS انجام شد. جهت بررسی نرمال بودن توزیع داده ها از آزمون کلموگراف-اسمیرنوف و برای ارزیابی تفاوت بین گروهی میزان (PNI) از روش آنالیز واریانس یکطرفه (ANOVA)، آزمون تعقیبی Duncan استفاده گردید و p<۰/۰۵ معنی دار در نظر گرفته شد.

#### یافته ها

**بررسی مورفولوژیک:** اجسام شبه جنینی بعد از ۲۴ ساعت قرار گرفتن در معرض ژل رویال به مدت ده روز کشت داده شدند. سلولهای در حال تکثیر به صورت شعاعی از اطراف اجسام شبه جنینی بیرون زدند. (شکل ۱).



#### شکل ۱. فتومیکروگراف سلولهای P19 تمایز یافته به سلولهای شبه عصبی با رنگ آمیزی اختصاصی کرازیل ویوله. A: سلولهای عصبی به رنگ بنفش دیده می شوند

تعیین دوز مناسب ژل رویال جهت القای فنوتیپ عصبی: سلولهای شبه عصبی بعد از رنگ آمیزی با کرازیل ویوله به رنگ بنفش دیده می شوند. میانگین درصد القای عصبی در غلظت های مختلف ژل رویال به طور معنی داری بیشتر از گروه کنترل منفی (با میانگین درصد تمایز سلولی ۳/۲±۹) بوده است. بر اساس نتایج بیشترین در صد تمایز در گروه های تیمار شده با غلظتهای ۲۰۰ و ۳۰۰ میلی گرم بر میلی لیتر ژل رویال (با میانگین در صد تمایز سلولی ۹۸±۸/۴ و ۳/۹۹±۲/۲) مشاهده شد. درصد تمایز سلولی در این گروهها به طور معنی داری نسبت به گروه تیمار شده با غلظت های ۲۵ (با میانگین درصد تمایزی ۲۱±۲/۲)، ۵۰ (با درصد تمایزی ۳۲±۲/۳)، ۱۰۰ (با درصد تمایز ۳/۵±۷۱/۳) و ۱۵۰ (با میانگین در صد تمایز ۵/۵±۸۳) افزایش داشته است (p<۰۵/۰). میانگین درصد سلولهای تمایز یافته گروه تیمار با غلظت ۲۰۰ میلی گرم بر میلی لیتر ژل رویال تفاوت معنی داری با گروه تیمار با غلظت ۳۰۰ میلی گرم بر میلی لیتر ژل رویال ندارد (p<۰۵/۰) (جدول ۱).

و گلوکاتینون پراکسیداز در خون می‌گردد. اما استفاده ژل رویال همراه با **cisplatin**، منجر به کاهش فاکتورهای استرس اکسیداتیو و افزایش آنتی اکسیدانها شده است (۱۸). استرس اکسیداتیو نه تنها از عوامل ایجاد کننده سرطان بلکه از عوامل بسیاری دیگر از بیماریها هستند (۲۵-۱۹). آنتی اکسیدان ها نیز قادر به مهار اکثر بیماری های ناشی از استرس اسیداتیو هستند (۳۰-۲۶). **Hashimoto** نشان داد مصرف خوراکی ژل رویال باعث افزایش بیان فاکتورهای نوروتروفیک، گیرنده این فاکتورها و نشانگرهای سلولهای عصبی در هیپوکامپ موشهای بالغ می شوند (۳۱). مطالعه **Hattori** و همکاران نشان داد که **Amp N1 oxide** موجود در ژل رویال منجر به تمایز سلول عصبی از رده سلولی **PC12** می شود و میزان فسفوریلاسیون و نسخه برداری فاکتورهای لازم برای بیان ژنهای اختصاصی استروسیته را افزایش می دهد (۳۲). نتایج پژوهش ما نشان می دهد که رده سلولی **P19** مدلی مناسب و ارزان قیمت برای بررسی اثر عوامل القاگر مختلف بر رشد و تمایز نورون ها به صورت آزمایشگاهی و نیز سیستم جذابی برای تولید انبوه سلول های عصبی است. همچنین بررسی نتایج این پژوهش نشان داد ژل رویال می تواند تمایز سلولهای بنیادی **P19** را به سمت سلولهای عصبی القا کند.

### تقدیر و تشکر

بدینوسیله از تمامی کسانی که در انجام این تحقیق همکاری نمودند، بویژه آقای دکتر مرتضی هاشم زاده چالستری و خانم دکتر فریبا اسماعیلی تقدیر و تشکر می گردد.

افزایش می‌یابد. این سلولها نشانگرهای اختصاصی سلولهای عصبی مانند سیناپتوفیزین و بتا توبولین را بیان می‌کنند. سلولهای **P19** در مطالعات گسترده‌ای به منظور تمایز به سلول عصبی مورد استفاده قرار گرفته‌اند. **Chou** و همکارانش نشان دادند این سلولها تحت تأثیر رتینوئیک اسید به سلولهای عصبی تمایز می یابند. این سلولهای تمایز یافته در روز هشتم بیان ژن نستین را که مشخصه سلول عصبی است نشان می دهند (۱۲). در پژوهشی که توسط **Martin** و همکارانش انجام گرفت، مشخص گردید سلولهای **P19** در معرض غلظتهای غیر سمی **DMSO** (دی متیل سولفوکسید) مورفولوژی سلولهای عصبی را نشان می دهند (۱۳).

در مطالعه دیگری تمایز عصبی سلولهای **P19** تحت تأثیر فاکتورهای رشد گزارش شده است (۱۴). مطالعه **Bakhshalizadeh** و همکاران، نشان داد دپرنیل می‌تواند تمایز عصبی وابسته به دوز را در سلولهای **P19** ترانسفکت شده با **GFP** القا کند. همچنین نشان داد نورون های **GFP** مثبت مشتق شده از سلول های **P19** می تواند در سیستم عصبی جنین جوجه مهاجرت کرده و با سلول های بافت میزبان تشکیل سیناپس دهد (۱۵). **Abdanipour** و همکاران از طریق استخراج سلولهای بنیادی بزرگسالان و تحت القاء قرار دادن آن با داروی دپرونیل در غلظت  $10^{-6}$ ،  $10^{-11}$ ، موفق به تمایز این رده سلولی به سلولهای شبه عصبی شدند (۱۶). نتایج مطالعه **Karadeniz** و همکاران نشان داد داروی شیمی درمانی **cisplatin** منجر به افزایش قابل توجه در مرگ سلولهای کبدی میشود ولی ژل رویال با افزایش تولید سوپراکسید دیسموتاز در سلول های کبدی اثر محافظتی ضد اپاپتوز بر هیاتوسیت دارد (۱۷). مصرف **cisplatin** منجر به ظهور فاکتورهای نارسایی و کاهش فعالیت آنتی اکسیدان های سوپراکسید دسموتاز

## An Evaluation of the Influence of Royal Jelly on Differentiation of Stem Cells into Neuronal Cells Invitro

M. Ebrahimie (MSc)<sup>1</sup>, S. Asgharzadieh (MSc)<sup>1</sup>, H. Shirzad(Phd)<sup>1</sup>, N. Ebrahimie(Bsc)<sup>1</sup>, M. Hoseini (MSc)<sup>1</sup>,  
M. Karimian kakolake (BSc)<sup>1</sup>, M. Rafieian-kopaei (PhD)<sup>1\*</sup>

1. Medical Plants Research Center, Shahrkord University of Medical Sciences, Shahrkord, I.R. Iran

J Babol Univ Med Sci; 18(3); Mar 2016; PP: 38-44

Received: Jun 22<sup>th</sup> 2015, Revised: Jul 29<sup>th</sup> 2015, Accepted: Sep 28<sup>th</sup> 2016.

### ABSTRACT

**BACKGROUND AND OBJECTIVE:** P19 carcinoma stem cells are able to differentiate into embryonic cells with three germ layers. Given the fact that differentiated cells can reduce complications associated with degenerative diseases of the nervous system, in this study, we aimed to investigate the differentiation of P19 stem cells into neuronal cells under the influence of royal jelly.

**METHODS:** In this basic-applied research, embryoid bodies, prepared in P19 cell suspension culture, were transferred to gelatinized containers and classified in six groups, receiving 25, 50, 100, 150, 200, and 300 mg/ml of royal jelly, respectively; five wells were allocated to each group of cells. Morphological evaluation of cell differentiation was performed via cresyl violet staining. Also, immunofluorescence technique was used to track the expression of neuronal marker proteins such as synaptophysin and  $\beta$ -tubulin III. Finally, the findings were analyzed.

**FINDINGS:** The present findings showed that cells exposed to royal jelly responded positively to specific staining of nerve cells. In groups receiving different concentrations of royal jelly, the mean percentage of cell differentiation was significantly higher than the negative control group ( $9\pm 2.3$ ). The highest percentage of cell differentiation was observed in groups treated with 200 and 300 mg/ml of royal jelly, respectively ( $98\pm 4.8$  and  $99.3\pm 2.2$ , respectively) ( $p < 0.05$ ). Based on the findings, the mean percentage of cell differentiation in the group receiving 200 mg/ml of royal jelly was not significantly different from the group receiving a concentration of 300 mg/ml.

**CONCLUSION:** The results of the present study showed that P19 cells are able to differentiate into neuronal cells, and therefore, they could be used in cell-based therapy for neurological diseases.

**KEY WORDS:** *Carcinomatous stem cells, Differentiation of neural stem cells, Neural markers.*

### Please cite this article as follows:

Ebrahimie M, Asgharzadieh S, Shirzad H, Ebrahimie N, Hoseini M, Karimian kakolake M, Rafieian-kopaei M. An Evaluation of the Influence of Royal Jelly on Differentiation of Stem Cells into Neuronal Cells Invitro. J Babol Univ Med Sci. 2015;18(3):38-44.

\*Corresponding author: M.Rafieian- kopaei (PhD)

Address: Medical Plants Research Center, Shahrkord University of Medical Sciences, Shahrkord, I.R.Iran

Tel: +98 38 32572356

E-mail: rafieian@yahoo.com

## References

1. Bossy-Wetzel E, Schwarzenbacher R, Lipton SA. Molecular pathways to neurodegeneration. *Nature Med.* 2004; 10, S2–9.
2. Ahlskog JE. Slowing parkinson's disease progression recent dopamine agonist trials. *Neurology.* 2003;60(3):381-9.
3. Martin GR, Wiley LM, Damjanov I. The development of cystic embryoid bodies in vitro from clonal teratocarcinoma stem cells. *Dev Biol.* 1977;61(2):230-44.
4. Mansergh FC, Wride MA, Rancourt DE. Neurons from stem cells: implications for understanding nervous system development and repair. *Biochem Cell Biol.* 2000;78(5):613-28.
5. Rudnicki MA, McBumey MW. Cell culture methods and induction of differentiation of embryonal carcinoma cell lines. In *Teratocarcinoma and Embryonic Stem Cells. A Practical Approach.* Robertson EJ, ed. 1987.p:19-50.
6. Berg RW, McBurney MW. Cell density and cell cycle effects on retinoic acid-induced embryonal carcinoma cell differentiation. *Dev Biol.* 1990;138(1):123-35.
7. Morshead CM, Reynolds BA, Craig CG, McBurney MW, Staines WA, Morassutti D, et al. Neural stem cells in the adult mammalian forebrain: a relatively quiescent subpopulation of subependymal cells. *Neuron.* 1994;13(5):1071-82.
8. Bakhshalizadeh S, Esmaeili F, Shirzad H, Houshmand F, Ebrahimi-Hafshejani M, Ghasemi S. Neuronal differentiation of GFP expressing 19P embryonal carcinoma cells by deprenyl, an antiparkinson drug. *J Shahrekord Univ Med Sci.* 2014;16(5):32-43.[In Persian]
9. Nagai T, Sakai M, Inoue R, Inoue H, Suzuki N. Antioxidative activities of some commercially honeys, royal jelly, and propolis. *Food Chem.* 2001;75(2):237-40.
10. Blum MS, Novak AF, Taber S. 10-Hydroxy-delta 2-decenoic acid, an antibiotic found in royal jelly. *Science.* 1959;130(3373):452-3.
11. Hattori N, Nomoto H, Mishima S, Inagaki S, Goto M, Sako M, et al. Identification of AMP N1-oxide in royal jelly as a component neurotrophic toward cultured rat pheochromocytoma PC12 cells. *Biosci Biotechnol Biochem.* 2006;70(4):897-906.
12. Chou DKH, Henion TR, Jungalwala FB. Regulation of expression of sulfoglucuronyl carbohydrate (HNK-1), amphoterin and RAGE in retinoic acid-differentiated P19 embryonal carcinoma cells. *J Neurochem.* 2003;86(4):917-31.
13. Martin GR, Evans MJ. Multiple differentiation of clonal teratocarcinoma stem cells following embryoid body formation in vitro. *Cell.* 1975;6(4):467-74.
14. Wobus A, Grosse R, Schöneich J. Specific effects of nerve growth factor on the differentiation pattern of mouse embryonic stem cells in vitro. *Biomed Biochim Acta.* 1988;47(12):965-73.
15. Bakhshalizadeh S, Esmaeili F, Houshmand F, Shirzad H, Saedi M. Effects of selegiline, a monoamine oxidase B inhibitor, on differentiation of 19P embryonal carcinoma stem cells, into neuron-like cells. *In Vitro Cell Dev Biol-Anim.* 2011;47(8):550-7.
16. Abdanipour A, Tiraihi T, Delshad A. Trans-differentiation of the adipose tissue-derived stem cells into neuron-like cells expressing neurotrophins by selegiline. *Iran Biomed J.* 2011;15(4):113-21.
17. Karadeniz A, Simsek N, Karakus E, Yildirim S, Kara A, Can I, et al. Royal jelly modulates oxidative stress and apoptosis in liver and kidneys of rats treated with cisplatin. *Oxid Med Cell Longev.* 2011;2011:981793.
18. Silici S, Ekmekcioglu O, Kanbur M, Deniz K. The protective effect of royal jelly against cisplatin-induced renal oxidative stress in rats. *World J Urol.* 2011;29(1):127-32.
19. Bahmani M, Sarrafchi A, Shirzad H, Rafieian-Kopaei M. Autism: Pathophysiology and promising herbal remedies. *Curr Pharm Des.* 2016; 22(3):277–85.

20. Shirzad H, Taji F, Pourgheysari B, Raisi S, Rafieian-Kopaei M. Comparison of antitumour activities of heated and raw garlic extracts on fibrosarcoma in mice. *J Babol Univ Med Sci.* 2012;14(6): 77-83.[In Persian]
21. Shirani M, Alibabaei Z, Kheiri S, Shirzad H, Taji F, Asgari A, Rafieian M. Effect of *Euphorbia Helioscopia* extract on acute and chronic pain. *J Babol Univ Med Sci.* 2011;13(4):14-8. [In Persian]
22. Nasri H, Shirzad H, Baradaran A, Rafieian-kopaei M. Antioxidant plants and diabetes mellitus. *J Res Med Sci.* 2015; 20(5):491-50.
23. Rafieian-Kopaei M, Asgary S, Adelnia A, Setorki M, Khazaei M, Kazemi S, et al. The effects of cornelian cherry on atherosclerosis and atherogenic factors in hypercholesterolemic rabbits. *J Med Plants Res.* 2011; 5(13): 2670-6.
24. Nasri H, Hajian Sh, Ahmadi A, Baradaran A, Kohi G, Nasri P, Rafieian-Kopaei M. Ameliorative effect of green tea against contrast-induced renal tubular cell injury. *Iran J Kid Dis.* 2015;9(6):421-6.
25. Rafieian-Kopaei M, Setorki M, Doudi M, Baradaran A, Nasri H. Atherosclerosis: process, indicators, risk factors and new hopes. *Int J Prev Med.* 2014;5:927-46.
26. Mirhosseini M, Baradaran A, Rafieian-Kopaei M. *Anethum graveolens* and hyperlipidemia: a randomized clinical trial. *J Res Med Sci.* 2014;19(8):758-61.
27. Rafieian-Kopaei M, Shahinfard N, Rouhi-Boroujeni H, Gharipour M, Darvishzadeh-Boroujeni P. Effects of *Ferulago angulata* extract on serum lipids and lipid peroxidation. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2014;2014: Article ID 680856.
28. Baradaran A, Nasri H, Rafieian-Kopaei M. Oxidative stress and hypertension: Possibility of hypertension therapy with antioxidants. *J Res Med Sci.* 2014;19(4):358-67.
29. Sarrafchi A, Bahmani M, Shirzad H, Rafieian-Kopaei M. Oxidative stress and Parkinson's disease: New hopes in treatment with herbal antioxidants. *Curr Pharm Des.* 2016; 22(2): 238 -46.
30. Shayganni E, Bahmani M, Asgary S, Rafieian-Kopaei M. Inflammaging and cardiovascular disease: Management by medicinal plants, *Phytomedicine.* 2015. pii: S0944-7113(15)00356-6.
31. Hashimoto M, Kanda M, Ikeno K, Hayashi Y, Nakamura T, Ogawa Y, et al. Oral administration of royal jelly facilitates mRNA expression of glial cell line-derived neurotrophic factor and neurofilament H in the hippocampus of the adult mouse brain. *Biosci Biotechnol Biochem.* 2005;69(4):800-5.
32. Hattori N, Nomoto H, Fukumitsu H, Mishima S, Furukawa S. AMP N 1-oxide potentiates astrogenesis by cultured neural stem/progenitor cells through STAT3 activation. *Biomed Res.* 2007;28(6):295-9.