View metadata, citation and similar papers at core.ac.uk
brought to you by CORE
provided by shahrekord university of medical scinces

مجله دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد/ دوره ۱۹، شماره ۱/ فروردین و اردیبهشت ۱۳۹۶/ ۵۱-۴۲

**مقاله پژوهشی**

# تأثیر اولئورزین زردچوبه بر افزایش تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمال انسانی به سلول‌های استخوانی

ندا غلامی[۱]، صدیقه عسگری[۲*]، محمد فضیلتی[۳]

[۱]گروه بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشگاه پیام نور اصفهان، اصفهان، ایران؛ [۲]مرکز تحقیقات قلب و عروق اصفهان، پژوهشکده قلب و عروق، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران؛ [۳]گروه بیوشیمی، دانشگاه پیام نور اصفهان، اصفهان، ایران.

تاریخ دریافت: ۹۴/۶/۳۰ تاریخ پذیرش: ۹۵/۴/۱۳

## چکیده:

***زمینه و هدف:*** **به منظور ترمیم ضایعات و نقایص استخوانی می‌توان از امکانات مهندسی بافت بهره جست. اخیراً، سلول‌های بنیادی مزانشیمی به خاطر کاربردهایشان در مهندسی بافت از اهمیت بالایی برخوردار شده‌اند. این سلول‌ها توانایی تمایز به استئوبلاست‌ها را دارا می باشند. فاکتورهای رشد متعددی تمایز سلول‌های بنیادی به استئوبلاست را کنترل می‌کنند. متابولیت‌های گیاهی نیز می‌توانند همانند فاکتورهای رشد تمایز را کنترل کنند. از این رو، هدف از انجام این مطالعه، بررسی اثر اولئورزین گیاه زردچوبه (*Curcuma longa* L.) بر افزایش تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمال انسانی به سلول‌های استخوانی بود.**

***روش بررسی:*** **سلول‌های بنیادی مزانشیمال انسانی به دست آمده از مغز استخوان انسان با غلظت‌های ۵ و۱۵ میکرومولار از اولئورزین زردچوبه تیمار شدند. اثر سیتوتوکسیک اولئورزین به روش *MTT* و اثرات تمایزی آن با سنجش فعالیت آلکالین فسفاتاز و رنگ آمیزی آلیزارین قرمز بررسی شد.**

***یافته ها:*** **با توجه به نتایج تست *MTT* مشخص شد که بعد از گذشت ۲۴ ساعت از تیمار سلول‌ها، اولئورزین زردچوبه سبب افزایش معنی‌داری (در سطح ۵٪) در تکثیر سلول‌های مورد مطالعه در غلظت‌های ۵ و ۱۵ میکرومولار شده است و هیچ گونه اثر سمی بر سلول‌های مورد نظر نداشته است. فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز در نمونه‌های تیمار شده بیش از نمونه شاهد بود که نشان می‌دهد اولئورزین سبب افزایش معنی دار (در سطح ۵٪) فعالیت این آنزیم شده که بیانگر شروع فرایند تمایز در سلول‌ها است. رنگ‌آمیزی آلیزارین قرمز نشان داد که تیمار اولئورزین نتوانسته موجب افزایش رسوب یون‌های معدنی بر ماتریکس خارج سلولی شود.**

***نتیجه گیری:*** **نتایج این پژوهش نشان می‌دهد که اولئورزین فقط در مراحل ابتدایی تمایز می‌تواند نقش داشته باشد و به دلیل دارا بودن ترکیبات فعالی مثل کورکومین و روغن‌های فرار سبب افزایش تمایز سلول‌های بنیادی به سلول‌های استئوبلاست می‌شود.**

***واژه های کلیدی:*** **اولئورزین زردچوبه، کورکومین، سلول‌های بنیادی مزانشیمال، تمایز، سلول‌های استخوانی.**

## مقدمه:

بیماری‌ها و آسیب‌های استخوانی مانند شکستگی‌های استخوانی در طی تصادفات، در همه جوامع شیوع فراوانی دارد. اکثر شکستگی‌های استخوان با درمان‌های ارتوپدی و حمایتی بهبود می‌یابند؛ اما این توانایی با افزایش وسعت صدمات استخوان محدود می‌شود و در برخی موارد استخوان خرد شده قادر به ترمیم نیست. برای ترمیم ضایعات و نقایص استخوانی می‌توان از امکانات مهندسی بافت بهره برد. در این ارتباط می‌توان از پیوند بافت استخوانی اتولوگ استفاده کرد یا با طراحی داربست مناسب و گذاشتن سلول‌های دارای

*نویسنده مسئول: اصفهان- دانشگاه علوم پزشکی اصفهان- مرکز تحقیقات قلب و عروق- تلفن: ۰۹۱۳۷۸۱۰۳۲۲، E-mail: sasgary@yahoo.com*

پتانسیل تولید استخوان بر روی آن‌ها و پیوند در محل ضایعه، آن را ترمیم نمود. در مطالعات مختلف پتانسیل بالای سلول‌های استخوانی استئوبلاست (Osteoblasts) برای استفاده در روش‌های مهندسی بافت و ترمیم بافت استخوان تأیید شده است. سلول‌های استئوبلاست، حاصل تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان می‌باشند (۱).

سلول‌های بنیادی مزانشیم به عنوان سلول‌های زمینه‌ای مغز استخوان و یا سلول‌های پیش‌ساز مزانشیم شناخته شده‌اند، این سلول‌ها قابل تکثیر و پرتوان هستند که قابلیت تمایز به انواع مختلفی از سلول‌های رده مزانشیمی را دارند و از آن ها به عنوان سلول‌های بنیادی بزرگسال نام برده می‌شود. سلول‌های بنیادی مزانشیم در ترمیم بافت‌هایی با منشاء مزانشیمی مثل استخوان، غضروف، ماهیچه، تاندون و چربی شرکت می‌کنند و همچنین این سلول‌ها به عنوان سلول‌های حمایت کننده برای سلول‌های همائوپویتیک در مغز استخوان نیز شناخته می‌شوند (۲).

تمایز استئوژنیک (Osteogenic Differentiation) سلول‌های بنیادی مزانشیمی در شرایط برون تنی، 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 ۲ و استئوپونتین شناسایی می‌شود (۲). در طول تمایز استئوبلاست‌ها بیان ۸۳ پروتئین حداقل به مقدار دو برابر افزایش یافته و مقدار ۲۱ پروتئین دیگر کاهش پیدا می‌کند. این تمایز در شرایط آزمایشگاه نیازمند فاکتورهایی مثل دگزامتازون، اسید آسکوربیک و بتاگلیسروفسفات است (۳).

اکثر مطالعات انجام شده بر روی فرایند تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی محدود به استفاده از فاکتورهای رشد مختلف و یا استفاده از تکنیک‌های دست ورزی ژن‌ها به منظور تغییر فعالیت ژن‌ها و پروتئین‌های درگیر در مسیر تمایز بوده است. تحقیقات متعدد نشان داده که ترکیبات و متابولیت‌های گیاهی قادرند مسیرهای سیگنال‌دهی وابسته به تمایز استئوژنیک را تحت تأثیر قرار دهند (۴). همچنین، فیتواستروژن‌ها (Phytoestrogens) و سایر مشتقات گیاهی مثل ساپونین‌ها توانایی این را دارند که بر روی تعادل بین تمایز استئوژنیک و آدیپوژنیک سلول‌های مزانشیم مغز استخوان تأثیر بگذارند، این تأثیرات می‌تواند از طریق اتصال فیتوهورمون‌ها به گیرنده‌های اختصاصی استروژن اتفاق افتد و یا این که تأثیر مستقیم یا غیر مستقیم بر روی مسیر سیگنال‌دهی PPAR (Peroxisome Proliferator-Activated Receptor) داشته باشند. بنابراین، با استفاده از متابولیت‌های ثانویه گیاهان دارویی و یا مشتقات آن‌ها می‌توان به تمایز استئوژنیک سلول‌های بنیادی مزانشیمال دست یافت (۴).

یکی از گیاهانی که از دیرباز مورد توجه بوده است و امروزه جنبه‌های درمانی مختلف آن مشخص شده است، گیاه زردچوبه (*Curcuma longa* L.) می‌باشد. تاکنون بیش از ۱۰۰ ترکیب از زردچوبه جدا شده است. ترکیبات شیمیایی اصلی گیاه زردچوبه شامل روغن زردچوبه، اولئورزین و کورکومینوئید (Curcuminoid) می‌باشند (۵). اولئورزین (Oleoresin) زردچوبه از پودر ریشه گیاه به دست می آید که در واقع محصولی روغنی و چسپناک و دارای رنگ نارنجی متمایل به قهوه‌ای می‌باشد که با استفاده از یک یا ترکیبی از حلال‌هایی مثل استون، اتیل الکل، اتیلن دی کلروید، هگزان، ایزوپروپیل الکل، متیل الکل، متیلن کلراید یا تری کلرواتیلن استخراج می‌شود و به عنوان عامل رنگی و طعم دهنده به غذا افزوده می‌شود.

محققان یکی از فعال‌ترین اجزاء اولئورزین زردچوبه را کورکومین (Curcumin) معرفی کرده‌اند. کورکومین دارای ویژگی‌های عملکردی چشمگیری است و در تحقیقات خواص متعددی از این ترکیب از جمله فعالیت ضد تومور و ضد سرطان گزارش شده است (۵،۳). همچنین تأثیر مثبت کورکومین بر روند پوکی استخوان نیز گزارش شده است. در سطح سلولی، کورکومین بر روی هدف‌های مولکولی مختلف مثل

فاکتورهای رونویسی، آنزیم‌ها، پروتئین‌های چرخه سلولی، سیتوکین‌ها، گیرنده‌ها و مولکول‌های متصل به سطح سلول تأثیر می‌گذارد (۶).

در مسیر تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمال به سلول‌های استئوبلاست و همچنین در تمامی فرایندهایی که منجر به تشکیل سلول‌های استخوانی و یا ترمیم یک بافت استخوانی می‌شوند، فرایندهای سلولی مختلفی دخیل هستند که عوامل و فاکتورهای زیادی این مسیرها را دستخوش تغییر قرار می‌دهند. برای بیان ژن‌های درگیر در مسیر تمایز استئوبلاستی فاکتورهای رونویسی زیادی دخالت دارند که فعالیت این فاکتورها در اثر ترکیباتی مثل استروژن یا متابولیت‌های ثانویه و ترکیبات شبه استروژنی گیاهان تغییر می‌کند. در واقع با اعمال ترکیبات گیاهی مختلف می‌توان مسیرهای تمایزی سلول‌های مزانشیمی مغز استخوان را تحت تأثیر قرار داد. مطالعات مختلفی تأثیر متابولیت‌های گیاهی را بر روی مسیرهای تمایزی سلول‌های بنیادی مورد بررسی قرار داده‌اند. در مطالعه‌ای نقش کورکومین حاصل از زردچوبه بر روی تمایز سلول‌های رت بررسی شده است (۷)، ولی نقش سایر ترکیبات این گیاه، مثل اولئورزین بر روی تمایز سلول‌های بنیادی در انسان بررسی نشده است، از این رو در مطالعه حاضر، اثر اولئورزین این گیاه بر افزایش تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمال انسانی به سلول‌های استخوانی بررسی شده است.

## روش بررسی:

برای بررسی فرایند تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمال مغز استخوان، پودر اولئورزین زردچوبه از دانشگاه فردوسی مشهد تهیه گردید. برای تهیه اولئورزین، عصاره موجود در ریزوم گیاه زردچوبه (*Curcuma Longa* L.) با استفاده از اتانول ۹۵٪ استخراج شد. پس از حذف حلال، اولئورزین حاصله با زئین مخلوط گردید و مخلوط به دست آمده اسپری- درای (Spray-Dry) شد تا پودر ریز با جریان مناسب به دست آید. از آن جایی که پودر اولئورزین حاصل در آب نامحلول می‌باشد، از دی میتل سولفوکساید (DMSO: Dimethyl sulfoxide) به عنوان حلال اولئورزین استفاده شد.

سلول‌های بنیادی مزانشیمال مغز استخوان انسان از پژوهشکده رویان اصفهان تهیه شدند. رویال محتوی سلول‌های بنیادی مغز استخوان به آرامی در بن ماری $37\ ^0C$ قرار داده شد تا انجماد سلول‌ها از بین رود. زمانی که مقدار بسیار کمی از سلول‌ها در حالت فریز هستند ویال‌ها خارج شدند و محتویات آن در فلاسک‌های ۲۵ سانتی متری در محیط DMEM (Dulloecco Modified Eagle Medium) حاوی ۱۰٪ سرم جنین گاوی همراه با آنتی‌بیوتیک‌های پنی‌سیلین و استرپتومایسین در انکوباتور ۵٪ $CO_2$ کشت داده شد. برای ادامه مطالعه از سلول‌های پاساژ ۳ استفاده شد. برای کشت سلول‌های بنیادی مزانشیمی به منظور القای تمایز، سلول‌های پاساژ ۳ در پلیت‌های ۱۲چاهکی و به میزان $1\times10^5$ در هر چاهک حاوی محیط تمایز، کشت داده شدند. پس از رسیدن به تراکم ۸۰٪، محیط رویی سلول‌ها با محیط تمایز به استخوان جایگزین شد، محیط تمایز به استخوان محیط DMEMحاوی ۱۰٪ بافر فسفات، بتاگلیسروفسفات ۱۰ میلی مولار، دگزامتازون ۱۰ نانومولار و ۵۰ میکروگرم در میلی لیتر آسکوربیک اسید- ۳ فسفات بود. به منظور بررسی تأثیر اولئورزین زردچوبه بر تمایز، در تیمارهایی جداگانه غلظت‌های ۵ و ۱۰ میکرومولار این ماده به محیط تمایز اضافه شد و بررسی سلول‌های تیمار شده به مدت ۳ هفته انجام گرفت. این غلظت‌ها بر اساس مطالعات دیگری که بر روی سایر ترکیبات مشابه انجام گرفته است، انتخاب شده‌اند (۷). در طول آزمایش، محیط کشت هر ۳ روز یکبار تعویض شد. در طی این مدت تغییرات این سلول‌ها به طور روزانه با استفاده از میکروسکوپ فاز متضاد به دقت تحت نظر قرار گرفت و مورفولوژی آن ها بررسی شد. جهت مقایسه، یک تیمار به عنوان شاهد در نظر گرفته شد. به منظور حذف اثر DMSO، تیمار شاهد فاقد

اولئورزین و حاوی DMSO بود. تمامی تیمارها و آزمایش‌ها در سه تکرار انجام پذیرفتند.

در بررسی توان زیستی، به منظور بررسی سمیت احتمالی اولئورزین زردچوبه در سلول های بنیادی انسان از آزمون متیل تیازول تترازولیوم (MTT) استفاده شد. ابتدا در چاهک‌های پلیت ۹۶ خانه‌ای، میزان ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون سلولی که حاوی $۵\times۱۰^{۳}$ سلول بود، کشت شد. پس از گذشت ۲۴ ساعت محیط کشت قبلی با محیط کشت تازه به همراه غلظت‌های ۵ و ۱۵ میکرومولار اولئورزین زردچوبه تعویض شد. پلیت های آماده شده به مدت یک روز در دمای $^{0}C$ ۳۷ و فشار ۵٪ $CO_2$ قرار گرفتند. پس از اتمام زمان انکوباسیون، محیط رویی سلول‌ها خارج و به هر چاهک ۱۰ میکرولیتر محلول MTT به همراه ۹۰ میکرولیتر محیط کشت اضافه شد و به مدت ۳ ساعت در دمای $^{0}C$ ۳۷ انکوبه شد. در ادامه به هر چاهک ۱۰۰ میکرولیتر محلول DMSO جهت حل کردن بلورهای فورمازان افزوده شد و میزان جذب توسط دستگاه ELISA reader (SCO diagnostic, Germany) در طول موج ۵۷۰ نانومتر قرائت شد و نتایج بر اساس تعداد سلول‌ها گزارش شد. همچنین درصد بقا سلول‌ها نیز محاسبه شد. این آزمایشات نیز در سه تکرار انجام پذیرفتند.

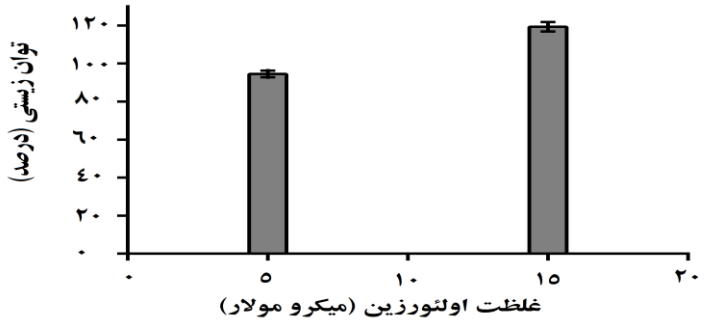
یکی از فاکتورهای بررسی میزان فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز که در طی تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی به سلول‌های استئوبلاست تحت تأثیر قرار می‌گیرد، تغییر در میزان فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز است. به منظور بررسی تأثیر اولئورزین زردچوبه بر میزان فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز در بازه‌های زمانی مختلف در طول دوره تمایز، تیمارهای مختلف از لحاظ میزان آنزیم آلکالین فسفاتاز با یکدیگر مقایسه شدند. بدین منظور سلول‌های مورد نظر با غلظت‌های ۵ و ۱۵ میکرومولار اولئورزین تیمار شدند و در ادامه کل پروتئین موجود سلول‌های تیمار شده با استفاده از محلول ۲۰۰ میکرولیتر ریپا (Ripa) استخراج شد و میزان پروتئین کلی موجود در سلول با روش براد فورد اندازه‌گیری شد. فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز با استفاده از کیت تجاری ساخت شرکت درمان کاو ایران که حاوی سوبسترای این آنزیم (پارانیتروفنول) بود، اندازه گیری شد. با افزودن سود ۰/۲ نرمال واکنش آنزیم متوقف و میزان جذب در طول موج ۵۷۵ نانومتر اندازه گیری گردید. با استفاده از رسم منحنی استاندارد میزان فعالیت آنزیم (U/L) با توجه به میزان کلی پروتئین (میلی گرم بر دسی لیتر) محاسبه شد.

در بررسی فرایند معدنی شدن ماتریکس خارج سلولی در طی تمایز با استفاده از رنگ آمیزی آلیزارین قرمز برای بررسی فرایند رسوب کلسیم بر سطح سلول‌ها که در طی تمایز رخ می‌دهد از آزمون رنگ آمیزی آلیزارین قرمز استفاده شد. برای این منظور، تک لایه های سلولی به مدت ۲۱ روز با غلظت‌های ۵ و ۱۵ میکرومولار اولئورزین زردچوبه تیمار شدند. بعد از تیمار با اولئورزین، تک لایه های سلولی با بافر فسفات شسته و به مدت ۱۰ دقیقه با فرمالدهید ۱۰٪ تثبیت شدند. تک لایه های سلولی تثبیت شده، با محلول رنگی آلیزارین قرمز در زمان ۵۰ دقیقه رنگ آمیزی شدند. بعد از خارج کردن اضافه رنگ از پلیت و شستشوی آن ها با آب مقطر، نمونه‌ها توسط میکروسکوپ معکوس بررسی و مورد عکسبرداری قرار گرفتند.

## یافته ها:

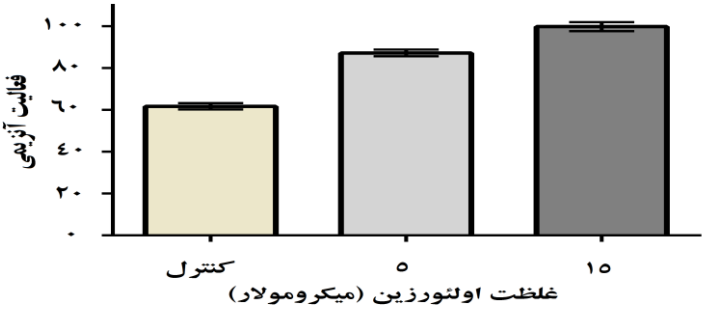
به منظور بررسی سمیت احتمالی الئورزین زردچوبه بر روی سلول‌های مورد آزمایش، تأثیر غلظت‌های مختلف اولئورزین بر این سلول‌ها مطالعه شد و درصد بقا سلولی با استفاده از رابطه زیر محاسبه شد. نتایج نشان داد که تیمار سلول‌های مزانشیمی با غلظت‌های ۵ و ۱۵ میکرومولار اولئورزین پس از طی زمان ۲۴ ساعت سبب افزایش معنی داری (در سطح ۵٪) در روند تکثیر سلولی در مقایسه با نمونه شاهد شده است. همچنین نتایج نشان داد که درصد بقا سلولی با افزایش غلظت اولئورزین افزایش پیدا کرده است (نمودار شماره ۱).

$$\text{درصد بقا سلولی} = \frac{\text{متوسط جذب کنترل} - \text{جذب متوسط نمونه}}{\text{متوسط جذب کنترل}} \times ۱۰۰$$




**نمودار شماره ۱:** بررسی توانایی زیستی سلول‌های بنیادی مزانشیمال مغز استخوان انسانی پس از ۲۴ ساعت از تیمار با عصاره اولئورزین با استفاده از تست MTT

اندازه گیری فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز به خوبی می‌تواند نشان دهنده تمایز سلول‌های مزانشیمی باشد. نتایج نشان داد که در نمونه‌های تیمار شده با اولئورزین فعالیت این آنزیم به طور معنی داری (در سطح ۵٪) بیشتر از نمونه شاهد می‌باشد (نمودار شماره ۲). همچنین افزایش غلظت اولئورزین سبب افزایش فعالیت این آنزیم شد.

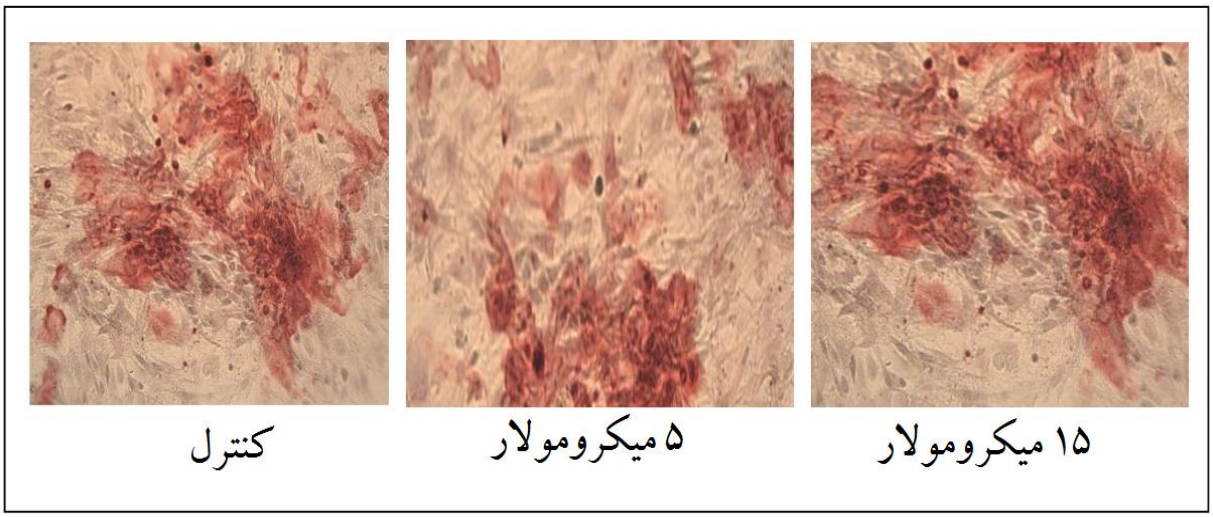



**نمودار شماره ۲:** تأثیر اولئورزین بر تغییرات فعالیت آنزیم الکالین فسفاتاز در طی تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمال مغز استخوان

در سلول‌های بنیادی مزانشیمی تمایز نیافته هیچ گونه رسوب خارج سلولی کلسیم مشاهده نمی‌شود، در مقابل در طول تمایز استئوبلاست در منطقه خارج سلولی رسوب کلسیم به وفور در شرایط درون و برون سلولی انجام می‌گیرد. رسوب کلسیم به عنوان یک نشانه مثبت در تمایز موفقیت آمیز سلول‌های بنیادی مزانشیم به استئوبلاست و تشکیل استخوان شناخته می‌شود. رسوب کلسیم به طور مخصوص می‌تواند با رنگ روشن نارنجی- قرمز با استفاده از آلیزارین قرمز رنگ آمیزی شود. با استفاده از رنگ آمیزی آلیزارین قرمز می‌توان وجود رسوبات ذکر شده بر سطح ماتریکس خارج سلولی را مشاهده کرد که در صورت وجود رسوب، الگوی رنگ پذیری نمونه‌های تیمار شده با نمونه شاهد متفاوت می‌باشد.

بررسی نتایج نشان داد که الگوی رنگ پذیری سلول‌های تیمار شده با غلظت‌های مختلف اولئورین تفاوت چندانی با نمونه شاهد نداشتند (تصویر شماره ۱).

بنابراین به نظر می‌رسد که اولئورزین در مراحل انتهایی تمایز (مرحله معدنی شدن ماتریکس خارج سلولی) نقش چندانی ندارد.




**تصویر شماره ۱: بررسی معدنی شدن ماتریکس خارج سلولی سلول‌های تیمار شده با اولئورزین با استفاده از آزمون آلیزارین قرمز**

## بحث:

سلول‌های بنیادی توانایی تمایز به رده‌های سلولی مختلف را دارا می‌باشند. اخیراً، مطالعات زیادی بر روی تمایز این سلول‌ها به سمت سلول‌های استخوانی انجام شده است. یکی از مسیرهای تمایزی که این سلول‌ها در راه تبدیل شدن به سلول‌های استخوانی طی می‌کنند، مسیر تمایز استئوژنیک می‌باشد. در طی این مسیر فاکتورهای زیادی تحت تأثیر قرار می‌گیرند که نهایتاً منجر به انجام این تمایز می‌شوند و یا ممکن است برخی تغییرات سبب سرکوب مسیرهای منتهی به این تمایز شوند. در این مطالعه، نقش اولئورزین زردچوبه بر روی تمایز سلول‌های بنیادی با استفاده از روش‌های مختلف مثل بررسی توان زیستی، بررسی میزان فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز و بررسی فرایند معدنی شدن ماتریکس خارج سلولی مورد مطالعه قرار گرفت. در ابتدا، سلول‌های مزانشیمی از لحاظ ساختار مطالعه شدند که بررسی‌ها نشان داد، این سلول‌ها به شکل دوکی تا فیبروپلاستی هستند که پس از ۷ روز شکل فیبروبلاستی آن ها بیشتر نمایان شد. این مشاهدات با نتایج مطالعات گذشته مطابقت داشت. Wexler و همکاران گزارش کردند که سلول‌های جدا شده از مغز استخوان رت که بعد از پاساژ سوم خالص شده بودند، دوکی شکل و ظاهری شبه فیبروبلاستی داشتند (۸).

در ابتدا، اثر اولئورزین بر روی فعالیت متابولیکی و توان زیستی سلول‌های مورد مطالعه از طریق سنجش متیل تیازول تترازولیوم بررسی شد. MTT از نمک های تترازولیوم به رنگ زرد و محلول در آب است که توسط آنزیم‌های دهیدروژناز موجود در میتوکندری احیا شده و به فرم کریستال‌های فورمازان غیر محلول در سلول‌های زنده رسوب می‌نماید. این کریستال‌ها به رنگ بنفش بوده و میزان تولید کریستال غیر محلول متناسب با

فعالیت سلول می باشد، از طرفی سلول‌هایی که از نظر متابولیکی فعال هستند، روند احیای MTT را انجام داده که به عنوان سلول زنده در نظر گرفته می‌شوند (۹). با استفاده از این آزمون مشخص شد که اولئورزین بر روی سلول‌های مورد مطالعه اثر سمی نداشت بلکه افزایش معنی داری در تعداد سلول‌های تیمار شده با این دو ماده مشاهده شد. همچنین مشخص شد که توان زیستی سلول‌ها به غلظت این ماده نیز بستگی دارد. در مطالعه‌ی Zhou و همکاران مشخص شد که ماده رسوراتول که یکی از متابولیت‌های گیاهی می‌باشد، در غلظت‌های پایین (۰/۱ میکرومولار) دارای اثر تحریکی بر تکثیر سلولی می‌باشد و با افزایش غلظت در ۱۰ میکرومولار سبب بازدارندگی در رشد سلولی می‌شود (۱۰). همچنین، در پژوهشی دیگر اثر عصاره زعفران و ویتامین D3 بر روی تمایز استئوبلاست سلول‌های بنیادی مزانشیمی انسان بررسی شد. نتایج نشان داد که بقای زیستی سلول‌های تیمار شده با غلظت‌های کمتر از $۱۰^{-۷}$ مولار ویتامین D3 و غلظت‌های کمتر از ۴۰۰ میکروگرم/ میلی‌لیتر عصاره زعفران ثابت ماند که نشان می‌دهد این دو اثر سمی بر روی سلول‌های مورد مطالعه نداشته‌اند (۱۱).

سلول‌های بنیادی مزانشیمی تمایز نیافته فعالیت آلکالین فسفاتازی پایینی دارند، در مقابل در طول تمایز استئوبلاست این فعالیت به شدت افزایش می‌یابد. افزایش فعالیت این آنزیم به عنوان یک شاخص زود هنگام استخوانی شدن در سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان گزارش شده است (۱۲). فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز را می‌توان در مراحل اولیه تمایز استئوژنیک سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشاهده کرد. در این مرحله این سلول‌ها هنوز ظاهر استئوبلاست بالغ را به دست نیاورده‌اند. فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز به وسیله یک تست رنگ سنجی انجام می‌گیرد که در آن تبدیل آنزیمی پارانیترو فنیل فسفات به یک ترکیب زرد رنگ با نام پارانیترو فنیل در حضور آلکالین فسفاتاز بررسی می‌گردد. سرعت تولید پارانیترو فنیل با مقدار آلکالین فسفاتاز موجود رابطه مستقیم دارد، از این رو، با استفاده از این تست می‌توان به طور مستقیم میزان آلکالین فسفاتاز را اندازه‌گیری کرد که این میزان می‌تواند نشان دهنده فعالیت سلول‌های استئوبلاست باشد (۱۱).

بررسی‌های انجام گرفته در این پژوهش نشان داد که فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز در سلول‌های تیمار شده با اولئورزین به طور معنی‌داری بیشتر از سلول‌های شاهد می‌باشد. همچنین افزایش غلظت اولئورزین تا ۱۵ میکرومولار سبب افزایش فعالیت آنزیم شد. از آن جایی که بالا بودن میزان فعالیت آنزیم نشان دهنده شروع فرایند تمایز در سلول‌ها می‌باشد، می‌توان نتیجه‌گیری کرد که اولئورزین اثر مثبتی بر القای تمایز در سلول‌های بنیادی مزانشیمال انسانی به سلول‌های استخوانی داشته است.

در مطالعه‌ای که اثر کورکومین بر فرایند تمایز سلول‌های مزانشیمال انسانی به سلول‌های استخوانی را بررسی کرده است، مشخص شده که کورکومین در غلظت‌های ۱۰ و ۱۵ میکرومولار فعالیت آلکالین فسفاتازی را افزایش داده است (۷).

بافت استخوانی انسان از ماتریکسی معدنی شده به همراه سلول‌های استخوانی تشکیل شده است. فعالیت استئوبلاست‌ها سبب ساختن این ماتریکس آلی و همچنین مسئول معدنی کردن آن می‌باشند. بنابراین با بررسی میزان معدنی شدن ماتریکس خارج سلولی می‌توان به میزان فعالیت استئوبلاست‌ها پی برد که متعاقب آن می‌توان تأیید کرد که فرایند تمایز در حال انجام می‌باشد.رسوب کلسیم به عنوان یک نشانه مثبت در تمایز موفقیت آمیز سلول‌های بنیادی مزانشیم به استئوبلاست و تشکیل استخوان مطرح می‌باشد. رسوب کلسیم به طور مخصوص می‌تواند با رنگ روشن نارنجی- قرمز با استفاده از آلیزارین قرمز رنگ آمیزی شود. Eskildsen و همکاران نیز برای اثبات تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی به

استئوبلاست، از رنگ‌آمیزی آلیزارین قرمز استفاده نمودند (۱۳). در مطالعه رمضانی و همکاران، عصاره آبی کلاله زعفران به صورت وابسته به مقدار، قادر به القای تمایز سلول‌های بنیادی مغز استخوان به سمت استئوسیت بود؛ به طوری که رسوب مواد معدنی در مدت ۲۱ روز، به وسیله رنگ آلیزارین قرمز آشکار شد؛ ماتریکس خارج سلولی، قرمزرنگ گردید و با افزایش میزان عصاره، میزان رنگ‌پذیری ماتریکس افزایش یافت (۱۴).در مطالعه حاضر نتایج نشان داد که تیمار سلول‌های مزانشیمی با اولئورزین تأثیری بر رسوب یون‌های معدنی در سطح ماتریکس خارجی نداشت و نمونه‌های تیمار شده با نمونه شاهد بعد از رنگ‌آمیزی آلیرازین تفاوتی نداشتند. این مطلب نشان می‌دهد که اولئورزین نتوانسته است معدنی شدن سلول‌های استخوانی که در سلول‌های بالغ اتفاق می افتد را بهبود ببخشد. با توجه به این که فعالیت آلکالین فسفاتازی در حضور اولئورزین افزایش یافته است، می‌توان چنین نتیجه‌گیری کرد که اولئورزین تنها می‌تواند در مراحل ابتدایی تمایز نقش داشته باشد. پودر اولئورزین حاوی ترکیبات مختلفی از جمله کورکومین و روغن‌های فرار می‌باشد، بنابراین فرایند تمایز را می‌توان به اثرات این مواد موجود در اولئورزین نسبت داد.

در مطالعه ای که Gu و همکاران انجام دادند اثر کورکومین روی افزایش تمایز سلول‌های مزانشیمی مغز استخوان رت مورد بررسی قرار گرفت که در آن، کورکومین به میزان ۱۵ و ۱۰ میکرومولار سبب افزایش تمایز سلول های مزانشیمی مغز استخوان رت شده است، همچنین آن ها نشان دادند که استفاده از کورکومین سبب افزایش بیان ژن‌های درگیر در مسیر تمایز استئوبلاست می‌شود و بیان ژن‌های مسیر آدیپوژنیک را سرکوب می‌کند (۷). در پژوهش دیگر که توسط Mujoo و همکاران انجام شد، کورکومین سبب افزایش تمایز سلول های بنیادی جنینی (ES) به پروتئین های خاص قبلی شده است (۱۵).

ترکیبات و متابولیت‌های ثانویه گیاهان هر کدام از طریق مسیرهای مختلف می‌توانند بر روی فرایند تمایز اثرگذار باشند. مطالعات نشان داده که تمایز سلول‌های بنیادی مغز استخوان به فاکتور رونویسی Runx2 بستگی دارد. کورکومین می‌تواند بیان Runx2 و استئوکلسین که برای تمایز استئوژنیک ضروری می‌باشند را افزایش دهد (۱۶). همچنین، مشخص شده است که کورکومین بیان ژن‌های درگیر در مسیر آدیپوژنیک مثل ژن‌های PPARγ2 و C/EBPα را کاهش می‌دهد. کورکومین نیز بیان HO-1 را افزایش می‌دهد که سبب افزایش تمایز استئوژنیک می‌شود (۷). از آن جایی که کورکومین جزئی از اولئورزین زردچوبه است، می‌توان نتیجه‌گیری کرد که استفاده از اولئورزین ممکن است بیان ژن‌های درگیر در مسیر تمایز را تغییر دهد و فرایند تمایز را تحت تأثیر قرار دهد.

## نتیجه گیری:

در این مطالعه با استفاده از روش‌های مختلفی همچون بررسی توان زیستی، بررسی فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز و رنگ آمیزی آلیزارین قرمز پتانسیل اولئورزین زردچوبه در روند تکثیر و تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمال استخراج شده از مغز استخوان انسانی به رده استخوانی بررسی شد. نتایج نشان داد که اولئورزین قابلیت القای تمایز در این سلول‌ها را در مراحل اولیه تمایز دارا می‌باشد که این اثرات را از طریق تغییر در بیان ژن‌های مسیر تمایز اعمال می‌کند.

## تشکر و قدردانی:

این مطالعه با کد ۹۴۱۲۱ در تاریخ ۱۳۹۴/۹/۱۴ در مرکز تحقیقات قلب و عروق دانشگاه علوم پزشکی اصفهان به تصویب رسیده است. از همکاران مرکز تحقیقات قلب و عروق، خانم صدیقه طاهره و مرکز تحقیقات فیزیولوژی دانشگاه علوم پزشکی اصفهان صمیمانه سپاسگزاری می‌شود.

## منابع:


1. Rauch F, Glorieux FH, Osteogenesis imperfecta. The Lancet.2004; 363: 1375-1388.
2. 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.
3. Collas P, Sørensen AL, Noer A. Epigenetic basis for the differentiation potential of mesenchymal and embryonic stem cells. Transfus Med Hemother. 2008; 35(3): 205–215.
4. Schilling T, Ebert R, Raaijmakers N, Schutze N, Jakob F. Effects of phytoestrogens and other plant-derived compounds on mesenchymal stem cells, bone maintenance and regeneration. J Steroid Biochem Mol Biol. 2014; 139: 252-61.
5. Zhang JS, Guan J, Yang FQ, Liu HG, Cheng XJ, Li SP. Qualitative and quantitative analysis of four species of Curcuma rhizomes using twice development thin layer chromatography. J Pharm Biomed Anal. 2008; 48(3): 1024-8.
6. Moran JM, Roncero-Martin R, Rodriguez-Velasco FJ, Calderon-Garcia JF, Rey-Sanchez P, Vera V, et al. Effects of curcumin on the proliferation and mineralization of human osteoblast-like cells: Implications of nitric oxide. Int J Mol Sci. 2012; 13(12): 16104-18.
7. Gu Q, Cai Y, Huang C, Shi Q, Yang H. Curcumin increases rat mesenchymal stem cell osteoblast differentiation but inhibits adipocyte differentiation. Pharmacogn Mag. 2012; 8(31): 202-8.
8. 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.
9. Momeni H, Soliemani Mehranjani M, Shariatzadeh S, Jarahzadeh M. The inhibitory effect of calcium chelators on the apoptosis of motor neurons in cultured adult mouse spinal cord slices. J Cell Tissue. 2010; 1(1): 69-73.
10. Zhou H, Shang L, Li X, Zhang X, Gao G, Guo C, et al. Resveratrol augments the canonical Wnt signaling pathway in promoting osteoblastic differentiation of multipotent mesenchymal cells. Exp Cell Res. 2009; 315(17): 2953-62.
11. Baharara J, Ramezani T, Shahrokhabadi K, Nazemi M. Effects of *Crocus sativus* L. extract and vitamin D3 on in vitro osteogenesis of mecenchymal stem cells. Int J Cell Mol Biotechnol. 2014; 1: 10-3.
12. Dang ZC, van Bezooijen RL, Karperien M, Papapoulos SE, Lowik CW. Exposure of KS483 cells to estrogen enhances osteogenesis and inhibits adipogenesis. J Bone Miner Res. 2002; 17(3): 394-405.
13. Eskildsen T, Taipaleenmaki 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 USA. 2011; 108(15): 6139-44.
14. Ramezani T, Baharara J, Saghiri N. The effect of safferon aqueous extract (*Crocous Sativous* L.) onosteogenic differentiation of rat bone marrow-derived mesenchymal stem cell. J Birjand Univ Med Sci. 2014; 21(2): 169-178.
15. Mujoo K, Nikonoff LE, Sharin VG, Bryan NS, Kots AY, Murad F. Curcumin induces differentiation of embryonic stem cells through possible modulation of nitric oxide-cyclic GMP pathway. Protein Cell. 2012; 3(7): 535-44.
16. Hucklnbroich J, Klein R, Neumaier B, Graf R, Rudolf Fink G, Schroter M, et al. Aromatic-turmeron induce neural stem cell prolifration *in vitro* and *in vivo*. Stem Cell Res Ther. 2014; 5: 10.

*Journal of Shahrekord University of Medical Sciences*
*(J Shahrekord Univ Med Sci) 2017; 19(1): 42-51.*

***Original article***

# The effect of oleoresin from turmeric plant (*Curcuma longa* L.) on the increase of differentiation of human mesenchymal stem cell to bone cells

Golami N[1], Asgari S[2*], Faziliti M[3]
[1]Cultural Biotechnology Dept., Payame Noor University, Isfahan, Iran; [2]Cardiovascular Research Center, Cardiovascular Institute, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, I.R. Iran;
[3]Biochemistry Dept., Payame Noor University, Isfahan, I.R. Iran.
Received: 21/Sep/2015 Accepted: 3/Jul/2016

**Background and aims:** Tissue engineering facilities can be used for repair of bone defects. Recently mesenchymal stem cells have continued to draw considerable interests due to their applications in tissue engineering. These cells have ability to distinct to osteoblasts. Several growth factors control to distinct stem cells to osteoblasts. Plant metabolites also like growth factors can control differentiation process. Hence, the aim of this study was to investigate the effect of oleoresin from turmeric plant (*Curcuma longa* L.) on the increase of differentiation of human mesenchymal stem cell to bone cells.
**Methods:** The human mesenchymal stem cells obtained from bone cells were treated by 5 and 15 µM of oleoresin .The cytotoxic effect of oleoresin was studied by MTT test, and the role of oleoresin on differentiation was investigated by alkaline phosphatase assay and alizarin red staining.
**Results:** The results of MTT test showed that 24 h after treatment of cells by oleoresin, oleoresin significantly increase the proliferation of cells and had no toxic effect ($P<0.05$). The activity of alkaline phosphatase in treated cells was higher than the control which attributed to the start of differentiation process ($P<0.05$). The results of alizarin red staining showed that the oleoresin has no effect on increase of precipitation of mineral ions on extracellular matrix.
**Conclusion:** The results showed that the oleoresin has positive role only at initial stages. Oleoresin has several active components such as curcumin and volatile oils which promote the differentiation of stem cells to osteoblasts cells.

***Keywords*: Turmeric oleoresin, Curcumin, Mesenchymal stem cells Differentiation, Bone cells.**

**Cite this article as:** Golami N, Asgari S, Fazility M. The effect of oleoresin from turmeric plant (*Curcuma longa* L.) on the increase of differentiation of human mesenchymal stem cell to bone cells. J Shahrekord Univ Med Sci. 2017; 19(1): 42-51.

[*]**Corresponding author:**
*Cardiovascular Research Center, Isfahan University of Medical Science, Isfahan, I.R. Iran. Tel: 00989137810322, E-mail: sasgary@yahoo.com*