

جدا سازی و تکثیر سلول های بنیادی مزانشیمی موشی : تاثیر تراکم سلولی بر مورفولوژی ، تمایز و بیان مارکر های سطح سلولی

محمد رضا باغبان اسلامی نژاد^ک Ph.D، صمد ندری^{*} M.Sc

چکیده

هدف: مطالعه حاضر کشت و جدا سازی سلول های مزانشیمی موش با دو روش کشت با تراکم زیاد و کم سلولی و مطالعه تاثیر آن بر مورفولوژی ، تمایز و بیان برخی مارکر های سطحی در سلول های حاصل است.

مواد و روش ها: سلول های مغز استخوان موش های Balb/c با متوسط سن ۸-۶ هفته ، با تراکم $2/5 \times 10^6$ سلول در سانتیمتر مربع کشت شد. کشت اولیه تریپسینه شد و دو سیستم کشت با تراکم کم (۵۰ سلول در سانتیمتر مربع) و تراکم زیاد (8×10^4 سلول در سانتیمتر مربع) ایجاد گردید. در انتها، سلول های پاساژ ۳ حاصل از دو سیستم کشت ، از لحاظ مورفولوژی، تمایز به استخوان و چربی و همچنین از نظر بیان برخی مارکر سطحی نظیر CD۱۳۵، CD۴۴، CD۳۱، Thy۱، CD۴۵، CD۱۱b، CD۳۴، Vcam۱، Sca-۱ و c-Kit مقایسه گردیدند.

یافته ها: در سیستم کشت با تراکم کم ، بر خلاف سیستم کشت با تراکم زیاد، کلون زایی اتفاق افتاد و اغلب سلول ها مورفولوژی فیروبلستی داشتند. نتایج تمایز نشان داد که در صد بیشتری از سلول های حاصل از روش کشت با تراکم کم، در مقایسه با روش کشت با تراکم زیاد ، به استخوان و چربی تمایز یافته اند. مارکر های خونساز و آندوتلیال نظیر CD۱۳۵ ، CD۳۴ ، CD۳۱ و Vcam در سلول های حاصل از روش کشت با تراکم کم اصلا بیان نشد و آنتی ژن Thy ۱،۲ در سیستم کشت با تراکم زیاد بیان نشد. این تفاوت ها از لحاظ آماری معنی دار بود.

نتیجه گیری: روی هم رفته می توان گفت جدا سازی و تکثیر سلول های بنیادی مزانشیمی با سیستم کشت با تراکم کم روش مناسبی برای تخلیص سلول های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان موش محسوب می شود.

واژه های کلیدی: سلول بنیادی مزانشیمی موشی، تراکم سلولی ، تمایز ، آنتی ژن سطحی.

مقدمه

مدل ارزشمند فیزیولوژیک و پاتوفیزیولوژیک پستانداران، مطالعه سلول‌های مزانشیمی با مشکلاتی از قبیل آلودگی به سلول‌های غیر مزانشیمی (خونساز، اندوتلیال و ماکروفاژ) و توقف تکثیر سلولی همراه است (۲۴ و ۲۵). به همین دلیل، محققین همواره درصدد یافتن راهی مناسب برای جداسازی، تخلیص و تکثیر سلول‌های مزانشیمی از مغز استخوان موش بوده‌اند و در این رابطه روش‌های مختلفی پیشنهاد شده است (۳۲-۲۵).

نکته مهم در ارتباط با سلول‌های بنیادی مزانشیمی که در اولین توصیف آنها نیز به آن اشاره شده است، خاصیت کلون زایی آنهاست، به این معنی که یک سلول بنیادی مزانشیمی قادر است در شرایط مناسب تکثیر شود و جمعیتی از سلول‌های یکسان (کلون) ایجاد نماید. بدیهی است که یکی از پارامترهای لازم برای کلون زایی، وجود سطح کافی در محیط کشت است. سلول‌های بنیادی مزانشیمی نظیر سایر سلول‌ها در شرایطی که با تراکم زیادی کشت شوند در اثر مهار تماسی (contact inhibition) رشدشان متوقف می‌شود که این موضوع اهمیت تراکم سلولی را در زمان کشت سلول‌های بنیادی مزانشیمی نشان می‌دهد. این در حالیست که تقریباً تمام مطالعات انجام شده، سلول‌های بنیادی مزانشیمی موشی با روش کشت با تراکم زیاد جداسازی شده است.

شاید فراوانی سلول‌های غیر مزانشیمی در کشت سلول‌های بنیادی مزانشیمی موش که در مطالعات پیشین نیز به آن اشاره شده است، بدلیل روش جدا سازی آنها بوده باشد که احتمالاً شرایط مناسب برای تکثیر سلول‌های بنیادی مزانشیمی (کلون زایی) را فراهم نکرده است. لذا در مطالعه حاضر به منظور بررسی بهتر تاثیر تراکم سلول در جدا سازی و تکثیر سلول‌های بنیادی مزانشیمی، سلول‌های فوق با دو روش تراکم کم و تراکم زیاد در طی چند پاساژ از مغز استخوان موش جدا شده‌اند و مورفولوژی سلول‌های حاصل از دو روش کشت، تمایز آنها و بیان ده مارکر در سطح سلول‌های حاصل از دو روش فوق مورد بررسی قرار گرفته است.

روش کار

استخراج سلول‌ها مغز استخوان موش

سلول‌های بنیادی مزانشیمی، سلول‌های چند توانی هستند که توانایی تمایز به دودمان‌های بافت همبند از جمله آدیپوسیت، کندروسیت و استئوسیت را دارا باشند. این سلول‌ها قادرند برای مدت طولانی تقسیمات خود تجدیدی داشته و در عین حال توانایی تمایز را حفظ نمایند (۱-۲). وجود سلول‌های بنیادی مزانشیمی با ظرفیت تمایز به استخوان و دیگر سلول‌های بافت همبند برای اولین بار توسط Frie-denstein عنوان شد. این محقق خصوصیتی را برای این سلول‌ها برشمرد از جمله اینکه درصد بسیار کوچکی از سلول‌های مغز استخوان را تشکیل می‌دهند، خاصیت تکثیر بالایی در *in vitro* دارند، کلون‌ها را تشکیل می‌دهند، کلونی‌هایی با اشکال نامنظم و متراکم تشکیل می‌دهند و توان تشکیل استخوان را حتی پس از گذراندن پاساژهای متعدد حفظ می‌نمایند (۳-۴).

سلول‌های بنیادی مزانشیمی به دلیل دارا بودن خاصیت خود تجدیدی (self renewal) و توان تمایز به بافت‌های اسکلتی به عنوان یک منبع مناسب برای استراتژی‌های سلول و ژن درمانی محسوب می‌شوند (۵). کارایی این سلول‌ها در درمان بیماری ژنتیکی *osteogenesis imperfecta*، بهبود خونسازی، باز سازی استخوان، ترمیم محل نکروز در بیماران انفارکتوس و درمان بیماری‌های مفصلی به خوبی نشان داده شده است (۱۱-۵). همچنین تحقیقات پیشین انعطاف و شکل‌پذیری (plasticity) سلول‌ها را در تمایز به سلول‌های عصبی، پوششی پوست، ریه، کبد، روده، کلیه و طحال به اثبات رسانده است (۱۳-۱۲).

با وجود اهمیت سلول‌های مزانشیمی در سلول درمانی هنوز بعضی از جنبه‌های بیولوژیکی آن از قبیل ماهیت سلولی، منشا تکاملی و عملکرد در *in vivo* ناشناخته باقی مانده است (۱۴). پاسخ به این گونه مسایل و کاربردی کردن سلول‌های بنیادی مزانشیمی در درمان بیماری‌های انسان مستلزم مطالعات پیش کلینیکی روی مدل‌های حیوانی است.

برای مطالعه سلول مزانشیمی اولین قدم، جداسازی و تکثیر آنها از نمونه‌های مغز استخوان است که این امر در تعدادی رده حیوانی با موفقیت انجام گرفته (۲۳-۱۵) در حالیکه در مورد موش، به عنوان

گردید که حاصل آن تراکم 8×10^4 سلول در سانتیمتر مربع را فراهم آورد. ۴۸ ساعت پس از آغاز کشت، محیط سلولها تعویض شد و کشت تا زمانیکه کف ظرف توسط سلولها پر شود، نگهداری شد و در طی این مدت هر ۳ روز یکبار محیط سلولها با محیط تازه جایگزین شد. در پایان این مدت، کشت اولیه با استفاده از تریپسین - EDTA پاساژ داده شد و سلولهای حاصل با تراکم 8×10^4 سلول در سانتیمتر مربع در فلاسک ۷۵ سانتی متر مربع کشت شدند. کشت سلول تا پاساژ ۳ ادامه یافت و سلولهای حاصل از پاساژ ۳ برای بررسیهای بیشتر استفاده شد.

تمایز به استخوان و چربی

در این مطالعه، بمنظور اطمینان از ماهیت مزانشیمی سلولهای مورد بررسی و نیز بررسی توان تمایزی آنها، از تست تمایز به استخوان و چربی استفاده شد. بدین ترتیب که 100000 سلول پاساژ ۴، در ظروف ۶ خانه ای در داخل محیط DMEM حاوی ۱۵ درصد سرم گاوی و آنتی بیوتیک کشت داده شد. پس از مرحله confluency محیط سلولها با محیط تمایز به استخوان و یا چربی جایگزین شد و کشت تمایزی سلول به مدت ۲۱ روز نگهداری شد. محیط تمایز به استخوان شامل DMEM حاوی ۵۰ میکروگرم در میلی لیتر اسکوربیک اسید ۳ فسفات، ۱۰ نانومولار دکزامتازون و ۱۰ میلی مولار بتا-گلیسرول فسفات (Sigma, USA) و محیط چربی شامل DMEM حاوی ۱۰۰ نانومولار دکزامتازون و ۵۰ میکروگرم در میلی لیتر ایندومتاسین (Sigma, USA) بود.

ارزیابی تمایز

در پایان هفته سوم، تمایز سلولها با روش هیستوشیمی و RT-PCR مورد ارزیابی قرار گرفت. برای استخوان از رنگ آمیزی آلیزارین رد و برای چربی از رنگ آمیزی اوایل رد استفاده شد. در بررسی RT-PCR تمایز به استخوان از پرایمرژنهای استخوانی نظیر استئوکالسن (OC)، استئوپونین (OP) و رسپتور هورمون پاراتیروئید (PTH) استفاده شد و برای تمایز به چربی از پرایمر ژنهای چربی از قبیل آدیپسین (AD) و لیپوپروتئین لیپاز (LPL) استفاده شد.

تعداد ۱۰ سر موش، نژاد Balb/c با سن تقریبی ۶-۸ هفته با روش در رفته کردن مهره‌های گردنی (cervical dislocation) قربانی شدند، استخوانهای ران و درشت نی آنها جدا گردید و عضلات و بافت نرم اطراف پاک شد و داخل محیط DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) قرار داده شد. لوله محتوی استخوانهای ران و درشت نی بر روی یخ قرار داده شده و به زیر هود استریل منتقل گردید. دو انتهای استخوانها قطع و با استفاده از سرنگ و سر سوزن شماره ۲۲ مغز استخوان خارج گردید و در ۲ میلی لیتر HBSS معلق گردید. سلولهای مغز استخوان با استفاده از لام نتوبار شمارش شد و با تراکم $2/5 \times 10^6$ سلول در هر سانتیمتر مربع در فلاسکهای ۷۵ سانتیمتر مربع کشت شد. برای ایجاد سیستمهای کشت با تراکم پایین و بالا از سلولهای پاساژ اول استفاده شد.

کشت با تراکم پایین سلول (Low density)

برای این منظور، سلولهای پاساژ اول شمارش شدند و بصورت ۵۰ سلول در سانتیمتر مربع در فلاسکهای ۷۵ سانتیمتر مربع کشت شدند. محیط مورد استفاده DMEM حاوی ۱۵٪ FBS و آنتی بیوتیکهای پنی سیلین و استرپتومایسین بود. بعد از ۴۸ ساعت محیط روی سلولها که حاوی سلولهای خونی شناور و سلولهای نجسبیده بود دور ریخته شد و محیط جدید اضافه شد. هر ۳ روز یکبار محیط سلولها تعویض شد و این کار تا زمانی که کف پلیت بوسیله سلولها پر شود، تکرار گردید. در این زمان، سلولها پاساژ داده شدند و با تراکم ۵۰ سلول در سانتیمتر مربع کشت شدند. ۲۱ روز پس از آغاز کشت، پاساژ بعدی انجام شد بدین ترتیب که سلولها با تریپسین - EDTA جدا شدند و با تراکم ۵۰ سلول در سانتیمتر مربع کشت شدند. این کار تا پاساژ سوم ادامه یافت و از سلولهای این پاساژ برای بررسیهای بیشتر استفاده شد.

کشت با تراکم بالای سلول (High density)

برای کشت با تراکم بالا سلولهای حاصل از کشت اولیه سه قسمت شد و هر بخش در ظرف جداگانه (فلاسک ۷۵ سانتیمتر مربع) کشت

نشان داده شده است) در دمای ۹۳ درجه سانتی گراد بمدت ۵ دقیقه، دمای ۹۳ درجه سانتی گراد بمدت ۴۵ ثانیه، دمای Annealing بمدت ۴۵ ثانیه، دمای ۷۲ درجه سانتی گراد بمدت ۳۰ در ۳۰ سیکل انجام شد. در پایان محصول PCR درون چاهک‌های ژل ۱/۵٪ آگاروز ریخته شد و پس از الکتروفورز با رنگ اتیدیوم بروماید رنگ آمیزی و سپس ارزیابی شد.

فلوسایتومتری

تعداد ۲۰۰۰۰۰ سلول پاساژ ۴، در لوله‌های فالكون ریخته و به هر کدام ۱۰۰ میکرون سرم رت ۳٪ اضافه و بمدت ۳۰ دقیقه در دمای ۴°C نگهداری شد. سلولها با ۵۰۰ میکرون بافر شستشو حاوی یک میلی لیتر (Fetal Bovine serum: FBS) در صد میلی لیتر (Phosphate Buffer Solution: PBS) شسته شدند و پس از سانتریفوژ (۴۰۰ g بمدت ۱۰ دقیقه) به مدت ۳۰ دقیقه روی یخ و در یخچال با آنتی بادی‌های اولیه، Vcam-1, Sca-1, CD34, CD31, c-Kit, CD45, CD11b, Thy 1.2, کونژوگه با FITC (فلورسنس ایزوتیوسیانات) (ebioscience) و با CD135, CD44 کونژوگه با PE (فیکواریترین) انکوبه شدند و برای کنترل منفی سلولها با آنتی بادی‌های PE-IgG2a, IgG2b و FITC-IgG2a, IgG2b انکوبه شدند. در مرحله بعد سلولها پس از شستشو بمدت ۱۰ دقیقه با ۴۰۰ g سانتریفوژ شدند. سپس به سلولها بافر فیکس کننده (پارافرم آلدئید ۱٪ و FBS ۱ درصد در PBS) اضافه شد و با دستگاه FACS (Callibur cytometer Becton Dickenson) و نرم افزار WinMDI آنالیز شدند. میانگین درصد سلول‌های بیان کننده هر مارکر در ده بار تکرار تعیین گردید و با آزمون آماری Repeated Measure مورد مقایسه قرار گرفت.

نتایج

کشت با تراکم پایین سلول

کشت اولیه، پس از دو هفته به مرحله **confluency** رسید. در این زمان تک لایه ای از سلول‌های عمدتاً کشیده فیروبلاستی و تعدادی سلول گرد، پهن و گاهی ستاره ای در کف ظرف کشت

رنگ آمیزی آلزارین رد

تک لایه سلولی با PBS شسته و بمدت ۱۰ دقیقه با متانول (Merck; Germany) فیکس شد و سپس رنگ آمیزی با محلول رنگی (۱٪) آلزارین رد در آب آمونیاکی (۲۵٪) (Sigma, USA) به مدت ۲ دقیقه انجام شد. در ادامه سلولها با آب مقطر شسته شدند و پس از خشک شدن با میکروسکوپ معکوس مشاهده شدند. پس از رنگ آمیزی با آلزارین رد، با استفاده از میکرومتر چشمی (Eyepiece micrometer) درصد مناطق رنگی (معدنی شده) در دو گروه تعیین شد و میانگین آنها برای ده سر موش محاسبه گردید و با روش T-test، مقایسه شد.

رنگ آمیزی اوایل رد

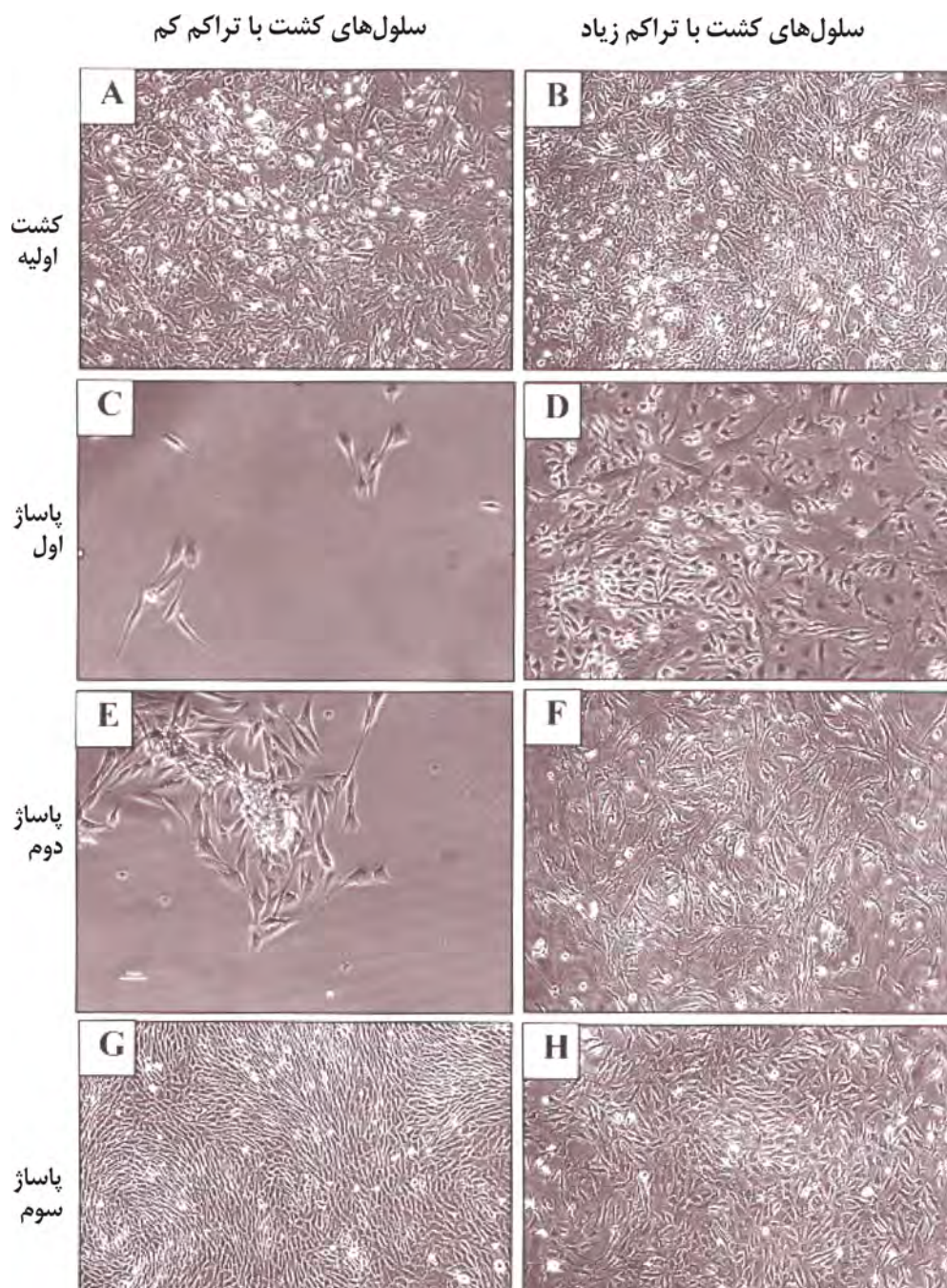
سلولها بمدت یک ساعت در دمای اتاق با فرمالین ۴ درصد فیکس شدند و سپس با الکل ۷۰ درصد شسته و بمدت ۱۰-۱۵ دقیقه با محلول ۰/۵ درصد Oil red ۹۹٪ الکل ایزوپروپانل (Sigma, USA) رنگ آمیزی شد و در انتها محلول رنگی خارج و سه بار با الکل ۷۰ درصد شستشو داده و با میکروسکوپ مشاهده شد. پس از رنگ آمیزی با اوایل رد، با استفاده از میکرومتر چشمی (Eyepiece micrometer)، درصد مناطق رنگی (قطره چربی) در دو گروه تعیین شد و میانگین آنها از لحاظ آماری مورد مقایسه قرار گرفت.

RT-PCR

برای این منظور، RNA سلولهای مورد نظر با استفاده از پروتکل شرکت Fermentas جدا سازی شد. در ادامه ساخت cDNA در واکنش رونویسی معکوس (RT) با استفاده از کیت Revert Aid H minus first strand cDNA synthesis kit (Fermentas) و ۰/۰۵ پرایمر oligo(dt)18 انجام شد. در ادامه واکنش PCR با، 2.5 μL cDNA, 1×PCR buffer (AMSTM, Cinagen), 200 μM dNTPs, 1 unit/25 μL Tag DNA polymerase (Fermentas), 0.75 μL Mgcl2 و ۰/۵ میکرولیتر از پرایمرهای ژنهای اختصاصی بافت استخوان، چربی و بتا-توبولین (در جدول یک

در سانتیمتر مربع، بطور مشابه با پاساژ اول، تعدادی کلون تشکیل شد (شکل E1) و در طی سه هفته، کشت به مرحله confluency رسید. در این زمان نیز تعدادی سلول با مورفولوژی گرد بر روی کلون‌ها سوار بود (شکل E1). در پاساژ سوم، نیز در طی سه هفته تک

تشکیل شده بود (شکل A1). با انجام اولین پاساژ و کشت ۵۰ سلول در سانتیمتر مربع، تعدادی کلون متشکل از چند سلول فیبروبلاستی تشکیل شد (شکل C1). این کلون‌ها رشد کردند و پس از سه هفته ظرف کشت را پر کردند. با انجام پاساژ دوم، و کشت ۵۰ سلول



شکل ۱ - نمای میکروسکوپ فاز کنتراست دو سیستم کشت با تراکم کم و زیاد. در مجموع سلول‌های حاصل از سیستم کشت با تراکم کم در پاساژ سوم مورفولوژی بهتری در مقایسه با سلول‌های مشابه از سیستم کشت با تراکم زیاد دارند.

سوم، کشت سلول‌ها از لحاظ مورفولوژی یکنواخت تر شده بود ولی با این وجود تعداد زیادی سلول گرد بر تک لایه فیبروبلاستی سوار بود (شکل H1).

لایه ای از سلول‌های خالص فیبروبلاستی تشکیل شد. در این تک لایه دستجات مختلف فیبروبلاستی در جهات مختلف کشیده شده بودند (شکل G1).

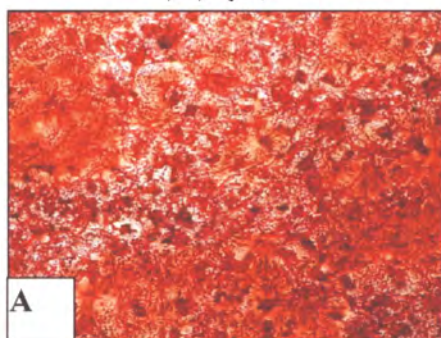
تمایز به استخوان

سلولهای پاساژ سوم که بمدت ۳ هفته در محیط استخوانساز قرار گرفته بودند، به طور چند روز در میان با میکروسکوپ فاز کنتراست معکوس مورد مشاهده قرار گرفتند. در طی این مدت، مورفولوژی سلولها در محیط تمایز دستخوش تغییر شد. بدین ترتیب که این سلولها با ادامه دوره تمایز در بعضی نقاط متراکم تر شدند و مناطق ندول مانند ایجاد گردید. در پایان دوره تمایز، تمایز سلولی با روش رنگ آمیزی آلیزارین رد و RT-PCR مورد ارزیابی قرار گرفت. نتیجه رنگ آمیزی قرمز شدن مواد خارج سلولی معدنی شده در کشت تمایز به استخوان بود. کشت سلول‌های حاصل از سیستم تراکم پائین بطور تقریباً یکنواخت ($3/4 \pm 96\%$) قرمز رنگ شد (شکل A2) در

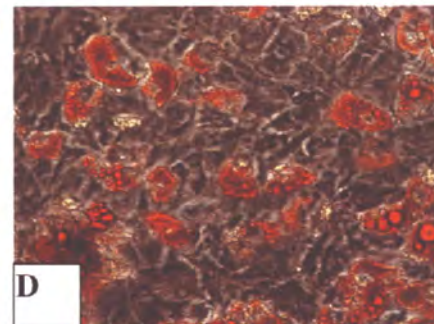
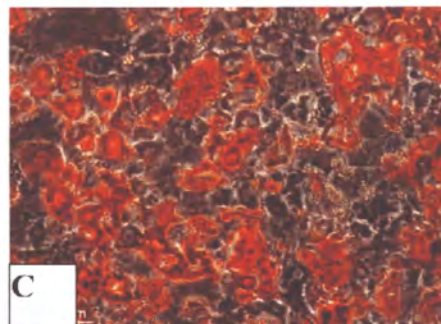
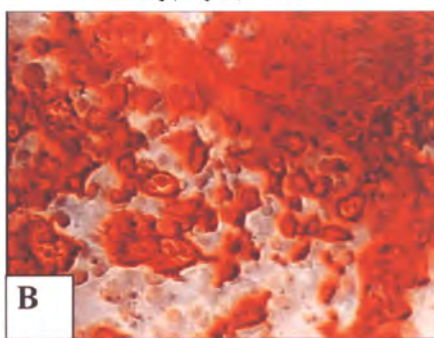
کشت با تراکم بالای سلولی

کشت اولیه پس از ۱۴ روز به مرحله confluency رسید در این زمان تک لایه ای از سلول‌های عمدتاً کشیده فیبروبلاستی و تعدادی سلول گرد، پهن و گاه ستاره ای در کف ظرف کشت تشکیل شده بود (شکل B1). با انجام اولین پاساژ و کشت 8×10^4 سلول در سانتیمتر مربع کلونی مشاهده نشد و کشت سلول در طی یک هفته، به مرحله confluency رسید. در این زمان، تک لایه سلولی حاوی مورفولوژی‌های متنوعی شامل سلول‌های چند وجهی، کشیده و ستاره ای شکل بود (شکل D1). با انجام پاساژ دوم، جمعیت سلول‌های کشیده فیبروبلاستی افزایش یافت. در این پاساژ سلول‌ها در طی یک هفته به مرحله confluency رسید (شکل F1). در پاساژ

تمایز سلول‌های حاصل از سیستم کشت با تراکم کم



تمایز سلول‌های حاصل از سیستم کشت با تراکم زیاد



شکل ۲- نمای میکروسکوپ نوری تمایز به استخوان (A و B) و چربی (C و D) سلول‌های حاصل از دوسیستم کشت با تراکم کم و زیاد. در صد تمایز در کشت سلول‌های حاصل از سیستم کشت با تراکم کم بطور معنی داری بیش از سلول‌های حاصل از سیستم کشت با تراکم بالا بود.

تمایز برای اثبات چربی بودن این قطرات از رنگ آمیزی اوایل رد و RT-PCR استفاده شد. در گروه سلول‌های جدا شده به روش تراکم پائین، تعداد سلول‌های چربی بطور معنی داری ($69 \pm 2/3\%$) بیش از سلول‌های جدا شده به روش تراکم بالا ($25 \pm 3/7\%$) بود (شکل 2 و C2). نتایج RT-PCR این یافته را تأیید کرد بطوریکه در گروه تراکم پایین ژن‌های آدیپسین و لیپو پروتئین لیپاز با شدت بیشتری بیان شدند (شکل 3).

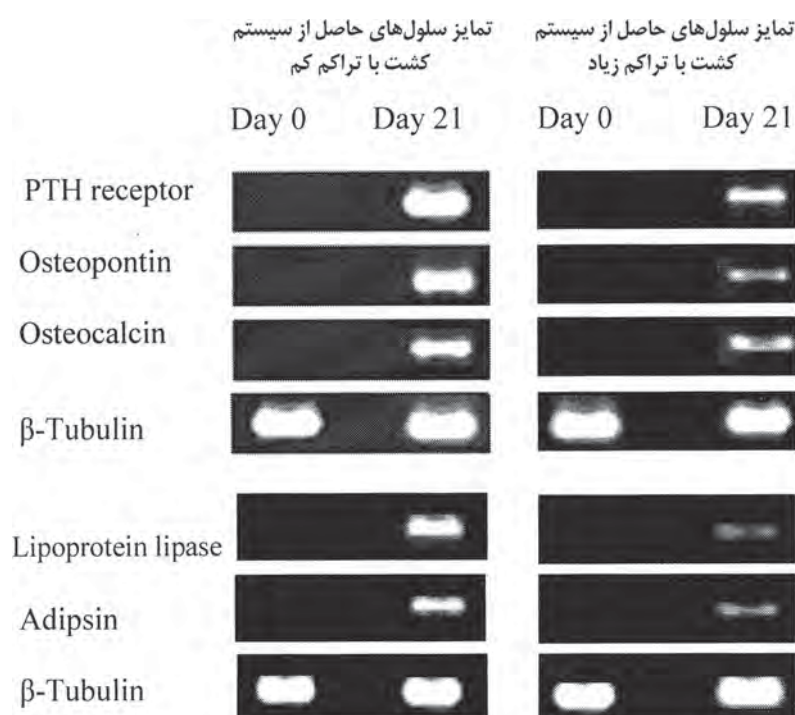
بررسی مارک‌های سطح سلولی

سلول‌های پاساژ سوم از دو گروه تراکم پایین و تراکم بالا، از نظر بیان ۱۰ مارکر سطح سلولی مورد بررسی قرار گرفتند. میانگین درصد سلول‌های بیان کننده هر آنتی ژن در جدول دو نشان داده شده است. تفاوت دو گروه از نظر بیان CD31، Vcam، CD34، D135 و Thy 1.2 از نظر آماری معنی دار بود.

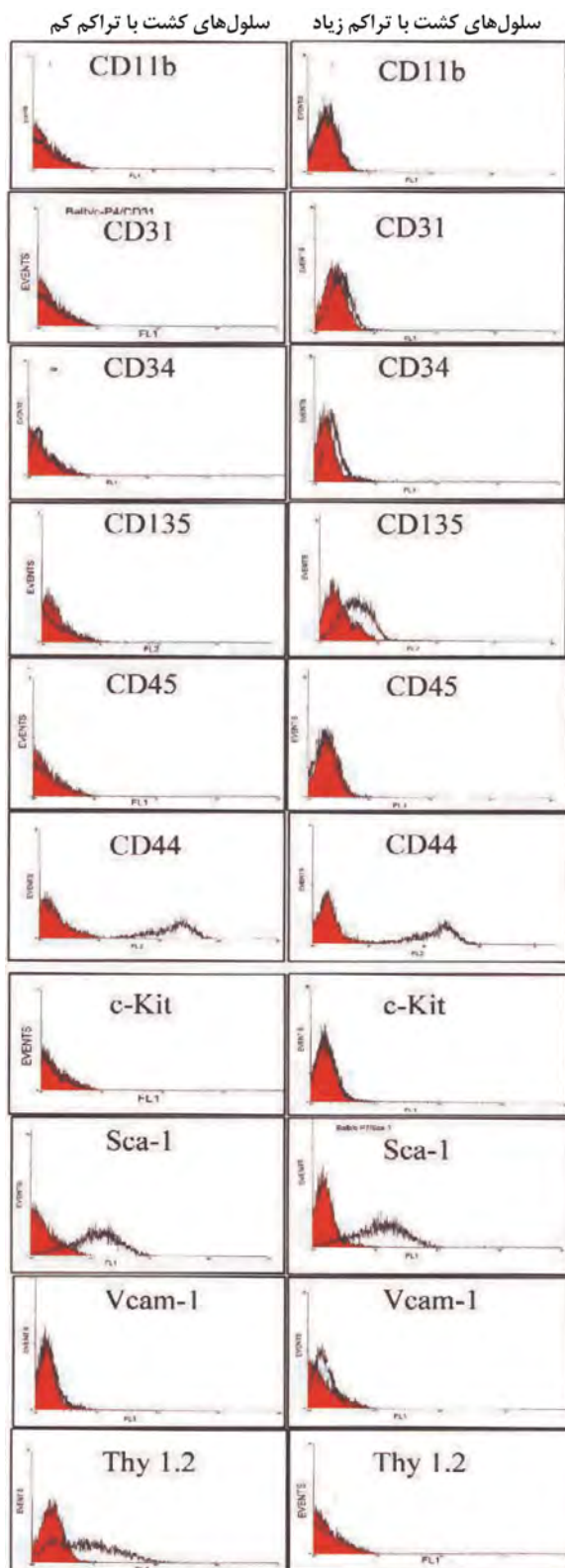
حالی که در سلول‌های جدا شده با روش تراکم بالا، تنها $68 \pm 1/7\%$ مناطق کشت رنگ گرفت (شکل B2). که این تفاوت‌ها از لحاظ آماری معنی دار بود ($P < 0.05$). نتایج RT-PCR موافق یافته‌های رنگ آمیزی آلیزارین رد بود. باندهای RT-PCR مربوط به mRNA استئوکالسین، استئوپونتین و گیرنده هورمون پاراتیروئید (PTH) در سلول‌های حاصل از جدا سازی به روش تراکم پائین، روشن تر از باندهای مشابه از سلول‌های جدا شده به روش تراکم بالا بود (شکل 3).

تمایز به چربی

سلول‌های پاساژ سوم که بمدت ۳ هفته در محیط آدیپوژنیک قرار گرفته بودند، به طور چند روز در میان با میکروسکوپ فاز کنتراست معکوس مورد مشاهده قرار گرفتند. قطرات ریز چربی از روز ۳-۴ دوره تمایز ظاهر شدند و بتدریج بزرگ گردیدند. در پایان دوره



شکل ۳- آنالیز RT-PCR تمایز سلول‌های حاصل از دو سیستم کشت با تراکم کم و زیاد.



شکل ۴- بررسی برخی آنتی ژن سطحی در سلول‌های حاصل از دو سیستم کشت با روش فلوسایتومتری. مارکرهای سلول‌های رده خونی نظیر CD31, CD135, CD34 در سلول‌های حاصل از سیستم کشت با تراکم کم بیان نشده است.

مارکر سلول‌های تخلیص شده با روش تراکم پایین سلولی

سلول‌های حاصل از جدا سازی با روش تراکم پایین سلولی، مارکرهای سطحی CD11b, CD34, Vcam, CD45, CD31, C-kit, CD135 را بیان نکردند در حالی که بیش از ۹۰ درصد سلول‌ها مارکر CD44، در حدود نیمی از سلول‌ها مارکر Sca-1 و حدود ۳۶٪ سلول‌ها، Thy 1.2 را بیان کردند (شکل ۴).

مارکر سلول‌های تخلیص شده با روش تراکم بالای سلولی

سلول‌های حاصل از جداسازی با روش تراکم بالا از نظر مارکرهای سطح سلولی CD11b, CD45, C-kit, Thy 1.2 را بیان نکردند. مارکر CD44 در بیش از ۹۰ درصد سلول‌ها و مارکر Sca-1 در بیش از نیمی از سلول‌ها بیان شد. این گروه بر خلاف گروه قبل، CD135, CD31, Vcam, CD34 را تا حدود بیان کردند و Thy 1.2 را بیان نکردند (شکل ۴).

بحث

در مطالعه حاضر سلول‌های مغز استخوان موش نژاد Balb/c، در دو سیستم تراکم کم و تراکم زیاد کشت شدند و سلول‌های چسبنده حاصل از پاساژ سوم، از لحاظ مورفولوژی، تمایز به استخوان و چربی و بیان برخی مارکرهای سطحی مورد مطالعه قرار گرفتند. نتایج ما اولین گزارش مبنی بر وجود برخی تفاوت‌های معنی دار بین سلول‌های حاصل از دو روش کشت بود.

در مجموع نتایج ما نشان داد که در مقایسه با روش کشت با تراکم بالا، سلول‌های مزانشیمی حاصل از روش کشت با تراکم پایین شباهت زیادی به سلول‌های فیبروبلاستی دارند و در شرایط تمایز، در صد بیشتری از آنها به استخوان و چربی تبدیل می‌شوند که این نشان دهنده این است که در روش کشت با تراکم کم، کشت سلول‌های مزانشیمی خلوص بیشتری را کسب کرده است و یا به عبارتی کشت سلول، کمتر با سلول‌های غیر مزانشیمی نظیر سلول‌های خونساز، سلول‌های اندوتلیال و ماکروفاژ آلوده شده است.

غیر مزانشیمی در کشت سلول‌های بنیادی مزانشیمی با استفاده از کشت با تراکم کم است.

از دیگر تفاوت‌های دو کشت سلول، بیان مارکر سطحی Thy1.2 در کشت سلول‌های حاصل از روش تراکم کم و عدم بیان آن در سطح سلول‌های حاصل از روش تراکم زیاد بود. مطالعه پیشین ما نشان داده است که در کشت سلول‌های بنیادی مزانشیمی موش، بیان مارکر سطحی Thy1.2 بطور معنی داری افزایش می‌یابد (۳۴). با در نظر گرفتن این یافته و با توجه به اینکه سلول‌های حاصل از روش کشت با تراکم کم از لحاظ مورفولوژی شباهت زیادی به سلول‌های فیروبلاستی داشتند و در صد زیادی از آنها پتانسیل تمایز به استخوان و چربی داشتند می‌توان این مارکر سطحی را که در لنفوسیت‌های T نیز بیان می‌شود به عنوان مارکر سطح سلولی در سلول‌های مزانشیمی نیز در نظر گرفت و از آن، در غنی سازی این سلول‌ها از مغز استخوان استفاده کرد.

روی هم رفته نتایج ما نشان داد که روش کشت با تراکم کم روش مناسبی برای کشت و جداسازی سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان موش است بطوریکه سلول‌های حاصل از این روش مورفولوژی بهتری داشته‌اند و در صد بیشتری از آنها توان تمایز به استخوان و چربی دارند. در کشت این سلولها، مارکرهای سلول‌های خونساز از جمله CD31، CD34 و CD135 بیان نشد. این سلول‌ها از نظر موارد بالا با سلول‌های حاصل از سیستم کشت با تراکم بالا، تفاوت معنی دار داشتند.

تشکر و قدردانی

این تحقیق با حمایت‌های مالی سازمان گسترش و نوسازی صنایع ایران انجام شده است.

برای ایجاد دو سیستم کشت، ابتدا سلول‌های مغز استخوان به صورت تراکم بالا ($2/5 \times 10^6$) کشت شدند و سیستم‌های کشت با تراکم پایین و بالای سلول در پاساژ اول ایجاد شدند. در واقع تعریف دو سیستم کشت در کشت اولیه انجام نشد زیرا کشت با تراکم کم در کشت اولیه (50 سلول در سانتیمتر مربع) شانس کمتری از لحاظ چسبیدن و رشد سلول مزانشیمی دارد. مطالعات پیشین نشان داده است که سلول‌های مزانشیمی به تعداد خیلی اندکی ($10-5$ سلول به ازای هر میلیون سلول هسته دار مغز استخوان) در مغز استخوان حضور دارند (۳۳) و به همین دلیل در کشت با تراکم کم (50 سلول در سانتیمتر مربع) در کشت اولیه، شانس مزانشیمی بودن سلول‌های فوق بسیار اندک (نزدیک به صفر) بوده است و در نتیجه احتمال کمی در برقراری کشت وجود دارد.

خلوص بیشتر سلول‌های مزانشیمی در روش کشت با تراکم کم، عوامل متنوعی می‌تواند داشته باشد. به نظر می‌رسد این عوامل در ارتباط با خاصیت کلون زایی این سلول‌ها باشد. سلول مزانشیمی که برای اولین بار توسط Freidenstein و همکاران جدا سازی شد با خاصیت کلون زایی توصیف گردید (۳-۴) و بدنبال آن مطالعات زیادی وجود این خاصیت سلول بنیادی مزانشیمی را به اثبات رسانده است (۲۷-۲۴). در شرایط کشت با تراکم کم که سطح کافی در اختیار سلول مزانشیمی منفرد قرار می‌گیرد خاصیت کلون زایی سلول که نتیجه آن تکثیر و افزایش جمعیت سلولی است، بروز پیدا می‌کند در حالیکه در شرایط کشت با تراکم بالا، سلول مزانشیمی فرصت بروز کامل خاصیت کلون زایی را بدلیل Contact Inhibition پیدا نمی‌کند و در نتیجه جمعیت آنها رشد نکرده باقی می‌ماند.

مطالعه برخی مارکر سطحی در سلول‌های حاصل از دو روش کشت نیز بیانگر برخی تفاوت‌ها بود. در حالیکه برخی مارکرهای سلول‌های خونی نظیر CD135، CD34 و CD31 در سلول‌های حاصل از تراکم پایین تا حدودی بیان شد، این مارکرها در سلول‌های حاصل از روش کشت با تراکم کم دیده نشد که این یافته با نتایج تمایز به استخوان و چربی دو نوع سلول همخوانی دارد (در مقایسه در صد بیشتری از سلول‌های حاصل از روش کشت با تراکم کم به استخوان و چربی متمایز شدند). این یافته‌ها حاکی از عدم حضور سلول‌های

Genes	Primer sequences	Size(bp)	Annealing temperature(C°)
Lipoprotein lipase (LP)	F 5' GAG GAC ACT TGT CAT CTC ATT C3' R 5' CCT TCT TAT TGGTCA GAC TTC C 3'	376	62
Adipsin	F 5' ATG GTA TGA TGT GCA GAG TGT AG 3' 5' CAC ACA TCA TGT TAA TGG TGA C3'	309	57
Osteocalcin (OC)	F 5' GAC CAT CTT TCT GCT CAC TCT G 3' R 5' GTG ATA CCA TAG ATG CGT TTG TAG 3'	276	60
Osteopontin (OP)	F 5' CAG TGA TTT GCT TTT GCC TGT TTG 3' R 5' GGT CTC ATC AGA CTC ATC CGA ATG 3'	377	67
PTH receptor	F 5' GAC AAG CTG CTC AAG GAA GTT CTG 3' R 5' GGA ATA TCC CAC GGT GTA GAT CAT G 3'	448	67
B-Tubulin	F 5' GGAACATAGCCG TAAACTGC 3' R 5' TCACTGTGCCTGAACTTACC 3'	317	63

جدول ۱: پرایمرهای مورد استفاده در آنالیز RT-PCR

Markers	LD	HD
CD11b	-	
CD34	-	%۱۱/۲۰±۰/۵۳
CD45	-	-
Sca-1	%۵۶/۹۵±۳/۶	%۵۵/۹۸±۳/۷
CD106(Vcam-1)	-	% ۱۵/۳۲±۰/۶
CD31	-	۸/۴۳±۰/۷۱
CD90.2(Thy1.2)	%۳۶/۶±۲/۷	-
c-Kit	-	-
CD135	-	%۱۹/۷۱±۰/۶۵
CD44	%۹۱/۹۳±۴/۱	%۹۶/۹۲±۴/۲

جدول ۲: بیان آنتی ژن‌ها در سلول‌های حاصل از سیستم کشت با تراکم کم (LD: low density) و تراکم زیاد (HD: high density)

hematopoietic recovery after confusion of autologous - blood stem cells in advanced breast cancer patients receiving high dose chemotherapy. *J Clin Oncol* 2000; 18:307-16.

8. Petite H, Viateau V, Bensaid W, Meunier A, Depollak C, Bourguignon M, Oudina K, Sedel L, Guillemain G: Tissue engineered bone regeneration. *Nat Biotechnol*, 2000; 18: 959-63.

9. Quarto R, Mastrogiacomo M, Cancedda R, Kutepdda SM, Mukhachev V, Lavroukov A, Kon E, Marcacci M. Repair of large bone defect with the use of autogenic bone marrow stromal cell. *N Engl J Med* 2001, 344: 385-6.

10. Grinnemo KH, Månsson A, Dellgren G, Klingberg D, Wardell E, Drvota V, Tammik C, Holgersson J, Ringdén O, Sylvén C, Le Blanc K. Xenoreactivity and engraftment of human mesenchymal stem cells transplantation into infarcted rat myocardium. *J ThoraccCardiovasc Surg* 2004; 127: 1293-300.

11. Barry FP. Mesenchymal stem cell therapy in joint disease. *Novartis found symp* 2003; 249:86-96.

12. Sugaya K. Potential use of stem cells in neuro-replacement therapies for neurodegenerative diseases. *Int Rev Cytol* 2003; 228: 1-30.

13. Chapel A, Bertho JM, Bensidhoum M, Fouillard L, Young RG, Frick J, Demarquay C, Cuvelier F, Mathieu E, Trompier F, Dudoignon N, Germain C, Mazurier C, Aigueperse J, Borneman J, Gorin NC, Gourmelon P, Thierry D. Mesenchymal stem cells home to injured tissues when co-infused with hematopoietics cells to treat a radiation- induced multi- organ failure syndrome. *J Gene Med* 2003; 5: 1028- 38.

14. Bianco P, Riminucci M, Gronthos S, Robey PG:

References

1. Majumdar MK, Thiede MA, Mosa JD, Moorman M, Gerson SL. Phenotypic and functional comparison of cultures of marrow-derived mesenchymal stem cells (MSCs) and stromal cells. *J Cell Physiol* 1998; 176: 57-66.

2. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S, Marshak DR. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 1999; 248:143-7.

3. Friedenstein AJ, Deriglasova UF, Kulagina NN, Panasuk AF, Rudakowa SF, Luriá EA, Ruadkow IA. Precursors for fibroblasts in different populations of hematopoietic cells as detected by the in vitro colony assay methods. *Exp Hematol* 1974; 2: 83-92.

4. Friedenstein AJ, Chailakhyan RK, Latsinik NV, Panansyuk AF, Keiliss-Borok IV. Stromal cells responsible for transferring the microenvironment of the hematopoietic tissues. *Cloning in vitro and retransplantation in vivo. Transplantation* 1974; 17: 331-40.

5. Baksh D, Song L, Tuan RS: Adult mesenchymal stem cells. Characterization, differentiation and application in cell therapy. *Mol Med* 2004; 8: 301-136.

6. Horwitz EM, Gordon PL, Koo WK, Marx JC, Neel MD, McNall RY, Muul L, Hofmann T: Isolated allogenic bone marrow- driven mesenchymal cells engraft and stimulate growth in children with osteogenesis imperfecta: Implications for cell therapy of bone. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002; 99:8932-37.

7. Koe ON, Gerson SL, Cooper BW, Dyhonse SM, Haynesworth SE, Caplan AI, Lazarus HM. Rapid

- Induction of distinct mesenchymal cell lineages. *Cell Tissue Res* 2002; 307: 321-7.
22. Mosca JD, Hendricks JK, Buyaner D, Davis-Sproul J, Chuang LC, Majumdar MK, Chopra R, Barry F, Murphy M, Thiede MA, Junker U, Rigg RJ, Forestell SP, Böhnlein E, Storb R, Sandmaier BM. Mesenchymal stem cells as vehicles for gene delivery. *Clin Orthop* 2000; 379: 71-90.
23. Jessop HL, Noble BS, Cryer A. The differentiation of a potential mesenchymal stem cells population within ovine bone marrow. *Biochem Soc Trans* 1994; 22: 248.
24. Arnhold SJ, Goletz I, Klein H, Stumpf G, Beluche LA, Rohde C, Addicks LF. Isolation and characterization of marrow derived equine mesenchymal stem cells. *Am J Vet Res* 2007; 68: 1095-105.
25. Gao K, Lu Y, Li S, Cong C, Yuan Y, Zhang J, et al. Isolation, culturing and growth characteristics of mesenchymal stem cells from bone marrow of rhesus monkey, macaca mulatta. *Sheng Wu Yi Xue Gong Cheng Xue Za Zhi* 2007; 24: 1343-7.
26. Tropel P, Noel D, Platet N, Legrand P, Benabid AL, Berger F. Isolation and characterization of mesenchymal stem cells from adult mouse bone marrow. *Exp Cell Res* 2004; 295: 395-406.
27. Nadri S, Soleimani M. Isolation murine mesenchymal stem cells by positive selection. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 2007; 43: 276-82.
28. Nadri S, Soleimani M, Hosseini RH, Massumi M, Atashi A. An efficient method for isolation of murine bone marrow mesenchymal stem cells. *Int J Dev Biol* 2007; 51: 723-9.
29. Baddoo M, Hill K, Wilkinson R, Gaupp D, Hughes Bone marrow stromal stem cells. *Nature, Biology, and potential applications. Stem cells* 2001; 19: 180-92.
15. Eslaminejad MB, Mirzadeh H, Mohamadi Y, Aghbibi N. Bone differentiation of the marrow-derived mesenchymal stem cells using β -tricalcium phosphate/alginate/gelatin hybrid scaffolds. *J Tiss Eng Reg Med* 2007; 6: 417-24.
16. Martin DR, Cox NR, Hathcock TL, Niemeyer GP, Baker HJ. Isolation and characterization of multipotential mesenchymal stem cells from feline bone marrow. *Exp Hematol* 2002; 3: 879-6.
17. Kadiyala S, Young RG, Thiede MA, Bruder SP. Culture expanded canine mesenchymal stem cells possess osteochondrogenic potential in vivo and in vitro. *Cell Transplant* 1997; 6: 125-34.
18. Devine SM, Bartholomew AM, Mahmud N, Nelson M, Patil S, Hardy W, Sturgeon C, Hewett T, Chung T, Stock W, Sher D, Weissman S, Ferrer K, Mosca J, Deans R, Moseley A, Hoffman R. Mesenchymal stem cells are capable of homing to the bone marrow of non-human primates following systemic infusion. *Exp Hematol* 2001; 29: 244-55.
19. Shao X, Goh JC, Huttmacher DW, Lee EH, Zigang G. Repair of large articular osteochondral defects using hybrid scaffolds and bone marrow-derived mesenchymal stem cells in rabbit model. *Tissue Eng* 2006; 12: 1539-51.
20. Abdallah BM, Kassem M. Human mesenchymal stem cells: from basic biology to clinical applications. *Gene Ther* 2007; 15: 109-16.
21. Ringe J, Kaps C, Schmitt B, Buscher K, Bartel J, Smolian H, Schultz O, Burmester GR, Haupt T, Sittlinger M. Porcine mesenchymal stem cells.

- C, Kopen GC, Phinney DG. Characterization of mesenchymal stem cells isolated from murine bone marrow by negative selection. *J Cellul Biochem* 2003; 89: 1235-49.
30. Peister A, Mellad JA, Larsen LL, Hall BM, Gibson LF, Prockop DJ. Adult stem cells from bone marrow (MSCs) isolated from different strains of inbred mice vary in surface epitopes, rates of proliferation, and differentiation potential. *Blood* 2004; 103: 1662-8.
31. Eslaminejad MB, Nikmahzar A, Taghiyar L, Nadri S, Massumi M. Murine mesenchymal stem cells isolated by low density primary culture system. *Dev Growth Differ* 2006; 48:361-70.
32. Sun S, Guo Z, Xiao X, Liu B, Liu X, Tang PH, Mao N. Isolation of mouse marrow mesenchymal progenitors by a novel and reliable method. *Stem cells* 2003; 21: 527-35.
33. Koc ON, Peters C, Aubourg P, Raghavan S, Dyhouse S, DeGasperi R, Kolodny EH, Yoseph YB, Gerson SL, Lazarus HM, Caplan AI, Watkins PA, Krivit W. Bone marrow derived mesenchymal stem cells remained host-derived despite successful hematopoietic engraftment after allogenic transplantation in patient with lysosomal and peroxisomal storage diseases. *Exp Hematol* 1999; 27: 1675-81.
34. Eslaminejad MB, Nadri S, Hosseini RH. Expression of Thy 1.2 surface antigen increases significantly during the murine MSCs cultivation period. *Dev Growth Differ* 2007; 49: 351-64.

