

مطالعه اثر سلول‌های بنیادی مزانشیمی رت به عنوان لایه تغذیه‌کننده در جداسازی و کشت سلول‌های بنیادی جنینی موش

نسیم فرقانی^{*۱} (M.Sc)، مهدی کدیور^۲ (Ph.D)، پریچهر یغمایی^۱ (Ph.D)، سعیده کارگر^۱ (M.Sc)، لیلی قاضی‌زاده^۱ (M.Sc)

۱- دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات تهران

۲- انستیتو پاستور ایران، بخش بیوشیمی

چکیده

سابقه و هدف: سلول‌های بنیادی جنینی سلول‌های پرتوانی هستند که از توده سلولی داخلی بلاستوسیست مشتق می‌شوند. برای سلول‌های بنیادی جنینی اکثر گونه‌ها، لایه تغذیه‌کننده و سایتوکاین‌ها جزء الزامات کشت است. هدف اصلی از این مطالعه، استفاده از سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان رت به عنوان لایه تغذیه‌کننده در جداسازی و کشت سلول‌های بنیادی جنینی موش بود.

مواد و روش‌ها: ابتدا سلول‌های بنیادی مزانشیمی از مغز استخوان رت استخراج شده و در محیط DMEM و ۱۰٪ سرم جنین گاوی کشت داده شدند. برای اطمینان از ماهیت مزانشیمی آن‌ها، سلول‌های کشت داده شده به مدت ۲۱ روز در حضور مواد القاکننده تمایز به استخوان کشت شدند و در پایان این مدت تمایز سلولی با رنگ‌آمیزی اختصاصی بررسی شد. بلاستوسیست‌ها از موش‌های حامله نژاد Balb/c به دست آمدند و بر روی لایه تغذیه‌کننده MSC و محیط DMEM و ۱۰٪ FBS کشت داده شدند. ۲ روز بعد از کشت، زونا پلوسیدا خارج شد، سلول‌های چسبیده به لایه تغذیه‌کننده ترپسینه شده و توده سلولی داخلی به خوشه‌های کوچک چند سلولی تبدیل شد. سپس توده‌های حاصل بر روی پلیت‌های ۱۲ خانه‌ای پوشیده شده با MSC ها قرار گرفت. هیچ‌گونه ماده رشد یا سایتوکاین به محیط اضافه نشد. ۲-۳ روز پس از پاساژ، کلونی‌هایی تشکیل شد که بر اساس مورفولوژی به کلونی‌های ESCs شباهت داشتند. مطابق روش فوق، کلونی‌های حاصل تا دو بار دیگر بر روی MSC ها پاساژ داده شدند و نهایتاً ماهیت کلونی‌های رشد کرده حاصل از طریق بررسی‌های مورفولوژیک و نیز رنگ‌آمیزی با آلکالین فسفاتاز مورد بررسی قرار گرفت.

یافته‌ها: در این مطالعه سلول‌های بنیادی مزانشیمی به راحتی با استفاده از محیط DMEM کشت داده شدند. ماهیت مزانشیمی سلول‌های حاصل که از لحاظ مورفولوژی، فیبروبلاستی بودند با تمایز به توده‌های استخوانی و رنگ‌پذیری با آلزلبین رد تایید شد. با استفاده از محیط DMEM و به‌کارگیری سلول‌های مزانشیمی کشت شده به عنوان لایه تغذیه‌کننده سلول‌های بنیادی جنینی موش بدون استفاده از هرگونه سایتوکاین و محرک رشد کشت شدند. پس از انجام پاساژ سلولی، کلونی‌هایی تشکیل شد، که این کلونی‌ها تا دو پاساژ دیگر هم کشت شدند که هر بار بر میزان تشکیل آن‌ها افزوده می‌شد و در نهایت ماهیت بنیادی این کلونی‌ها با رنگ‌آمیزی آلکالین فسفاتاز اثبات شد.

نتیجه‌گیری: نتایج حاصل از تحقیق نشان داد سلول‌های بنیادی مزانشیمی جدا شده از مغز استخوان رت توان تمایزی به رده‌های استخوانی را دارند و می‌توان از آن‌ها به عنوان لایه تغذیه‌کننده برای جداسازی و کشت و تشکیل کلونی‌های سلول‌های بنیادی جنینی استفاده کرد. این روش با حذف نیاز سایتوکاین‌ها و محرک‌های رشد، روشی ساده و کارا برای جداسازی و کشت کلونی‌های سلول‌های بنیادی جنینی می‌تواند باشد.

واژه‌های کلیدی: سلول‌های بنیادی مزانشیمی، سلول‌های بنیادی جنینی، لایه تغذیه‌کننده

مقدمه

هنگامی که سلول‌های بنیادی جنینی (Embryonic stem cells) (ESC) بر روی فیدرلایرها یا در حضور فاکتور بازدارنده لوسمی (LIF) کشت می‌شوند، آن‌ها در حالت عدم تمایز باقی می‌مانند [۲] و هنگامی که به سوسپانسیون کشت فاقد LIF

سلول‌های بنیادی جنینی از توده سلولی داخلی بلاستوسیست‌ها مشتق می‌شوند. این سلول‌ها هیچ محدودیتی برای خود تکثیری و تمایز به رده‌های گوناگون ندارند [۱].

مخصوصاً در کشت سلول‌های بنیادی خون‌ساز استفاده می‌کنند.

برای کشت سلول‌های بنیادی جنینی در اکثر گونه‌ها لایه تغذیه‌کننده لازم و ضروری است. از طرفی احتمالاً لایه‌های تغذیه‌کننده، سایتوکاین‌ها یا فاکتورهای رشدی ترشح می‌کنند، یا این‌که سوپرسترای مناسب برای اتصال را فراهم می‌نمایند. هم‌چنین با تکثیر ICM بر سلول‌های تغذیه‌کننده و پاساژ آن‌ها بر روی سلول‌های مذکور کلونی‌هایی تشکیل می‌شود که می‌توان آن‌ها را برای مدت طولانی کشت داد و یا منجمد کرد. لذا بر این اساس سلول‌های بنیادی جنینی در شرایط مطلوب حالت غیرتمیزی و کاریوتیپ خود را برای سال‌ها حفظ می‌کنند [۱۳، ۱۴]

با توجه به این‌که مکانیسم‌های نگهدارنده خود تجدیدی در سلول‌های بنیادی هنوز نامعلوم می‌باشد، لذا بهینه‌سازی یک سیستم کشت مناسب که بتواند به‌طور مؤثری جداسازی سلول‌های بنیادی را حمایت کند، آسان نیست [۱۵].

بنابراین در مطالعات پیشین برای بهبود وضعیت جداسازی و کشت سلول‌های بنیادی جنینی موشی از انواع لایه‌های تغذیه‌کننده استفاده شده است. به طوری که مارتین از سلول‌های بنیادی تراتوکارسینوما به عنوان لایه تغذیه‌کننده برای کشت سلول‌های بنیادی جنینی موشی استفاده کرد [۱۶]. بعد از این STO (MEF های نامیرا)، سلول‌های Buffalo rat liver، سلول‌های rat myocardial به عنوان لایه تغذیه‌کننده مورد استفاده قرار گرفتند [۱۷، ۱۸].

اخیراً بعضی از محققین تمایز سلول‌های بنیادی جنینی به همه دودمان‌های خونی مانند اریترئوئیدها، میلوئیدها، لنفوسیت‌ها و مگاکاریوسیت‌ها را در درون شیشه نشان داده‌اند [۱۹-۲۵]. برای مثال، ناکانو و همکارانش گزارش کردند که با رشد و هم‌کشتی سلول‌های بنیادی جنینی بر روی لایه تغذیه‌کننده‌ای که از مغز استخوان استرومایی مشتق شده، سلول‌های خونی به‌دست آمده است [۱۹].

در این تحقیق سعی بر آن شد تا پس از جداسازی سلول‌های بنیادی مزانشیمی (MSC)، از مغز استخوان ران رت

منتقل می‌شوند، سلول‌های بنیادی شروع به تمایز می‌کنند و توده چند سلولی سه بعدی را تشکیل می‌دهند که اجسام جنینی (EB) نامیده می‌شوند که سه لایه اصلی جنینی را تشکیل می‌دهد. سلول‌های بنیادی جنینی می‌توانند به انواع مختلف سلول‌ها مانند سلول‌های خون‌ساز، سلول‌های عصبی، قلبی، اندوتلیال، استخوان و... تمایز یابند [۳]. سلول‌های بنیادی جنینی و اجسام جنینی به عنوان مدل‌های تحقیقاتی مفیدی در جنین‌شناسی و مهندسی بافت می‌باشند و یک منبع بالقوه‌ای از سلول‌ها برای پیوند هستند [۱].

نخستین بار در سال ۱۹۸۱، سلول‌های بنیادی جنینی از توده سلولی داخلی بلاستوسیست موشی توسط اوآنس و کافمن تولید شدند [۴]. هم‌چنین تامسون و همکارانش هم در سال ۱۹۹۸ تولید سلول‌های بنیادی جنینی انسان را گزارش کردند [۵]. تا کنون سلول‌های بنیادی جنینی از گونه‌های مختلف جانوری مثل انسان، موش، میمون، نخستین‌ها و غیره بیش‌تر در مرحله بلاستوسیست تهیه شده [۶، ۷] و استفاده‌های وسیعی از آن‌ها در تحقیقات جدید بیوتکنولوژی حاصل شده است [۸، ۹]. سلول‌های جدا شده از توده سلولی داخلی یا تمایز می‌یابند و یا سلول‌هایی با مورفولوژی سلول‌های بنیادی جنینی تولید می‌کنند، که آلکالین فسفاتاز را بیان نموده و قادرند کاریوتیپ طبیعی خود را حفظ نمایند [۵].

سلول‌های بنیادی مزانشیمی که نوعی سلول بنیادی بزرگسال به شمار می‌روند، برای اولین بار توسط فریدنشتاین شناسایی و معرفی شدند. در آن زمان، مهم‌ترین ویژگی این سلول‌ها، توان تمایز آن‌ها به کلون‌هایی مشابه با استخوان و غضروف توصیف شد [۱۰]. از طرفی با توجه به این‌که سلول‌های بنیادی مزانشیمی به راحتی از نمونه‌های مغز استخوان قابل استخراج بوده و در شرایط کشت به راحتی تکثیر می‌یابند و سلول مناسبی برای استفاده در مطالعات مرتبط با ژن درمانی، سلول درمانی و مهندسی بافت به ویژه استخوان در نظر گرفته می‌شوند [۱۱، ۱۲]. به طوری‌که امروزه از سلول‌های بنیادی مزانشیمی به عنوان سلول‌های تغذیه‌کننده

رنگ آمیزی با آلیزارین رد به منظور تشخیص ذخایر کلسیمی صورت گرفت. برای این رنگ آمیزی، ابتدا پس از تخلیه محیط رویی، سلول‌ها با PBS شسته شده و با پارافرمالدئید ۴٪ به مدت یک ساعت فیکس شدند. سپس رنگ آلیزارین رد (۲ گرم پودر آلیزارین رد در ۱۰۰ ml آب حل شد و فیلتر گردید و مدت ۳۰ دقیقه بر روی سلول‌ها قرار گرفت و پس از این مدت سلول‌ها شسته شده و در زیر میکروسکوپ مشاهده شدند.

تهیه جنین. برای این منظور از موش‌های (Balb/c) ۸-۱۰ هفته‌ای استفاده شد. (موش‌ها از انستیتوی پاستور تهیه شدند). به منظور تحریک تخمک‌گذاری موش‌های ماده، مقدار IU ۱۰ هورمون گنادوتروپین سرم مادیان آبیستن (PMSG)، هم‌چنین پس از ۴۸ ساعت IU ۱۰ هورمون (HCG) از طریق داخل صفاقی تزریق شد و پس از جفت‌گیری و بررسی پلاک واژنی، ۴ روز بعد موش‌ها با جابه‌جایی مهره‌های گردنی کشته شدند و لوله‌های رحمی آن‌ها خارج شد و جنین‌ها با عمل فلاشینگ در محیط کشت DMEM که با روغن معدنی پوشیده شده بود قرار گرفتند و در زیر میکروسکوپ، بلاستوسیست‌ها شناسایی و با پیپت دهانی برداشته شدند و به داخل پلیت‌های ۱۲ خانه‌ای که قبلاً با سلول‌های تغذیه‌کننده MSC پوشیده شده بود، انتقال یافتند. البته باید ذکر شود که روش نمونه‌گیری تصادفی بود و ۱۵۰ جنینی را که در مرحله بلاستوسیست بودند بر روی لایه تغذیه‌کننده قرار دادیم و خروج زونا پلوسیدا، رشد، پاساژ و تشکیل کلونی سلول‌های بنیادی را با دقت بررسی کردیم.

کشت بلاستوسیست‌ها و جدا کردن توده سلولی داخلی. بلاستوسیست‌ها بعد از این‌که بر روی لایه تغذیه‌کننده مذکور قرار گرفتند، ۲ روز بعد زونا پلوسیدا خارج شده و توسط سلول‌های تروفو اکتودرمی به کف پلیت چسبیده و شروع به رشد می‌نمایند. به این صورت که سلول‌های تروفو اکتودرمی در سطح و توده سلولی داخلی (ICM) به صورت سه بعدی و گنبدی شکل رشد می‌کند، سپس توسط روش مکانیکی و به

و تمایز آن‌ها به سمت استئوسیتی - برای اطمینان از ماهیت مزانشیمی سلول‌های جدا شده و کشت یافته - بلاستوسیست‌ها را بر روی لایه تغذیه‌کننده MSC و بدون افزودن سایتوکاینی قرار دادیم، تا مراحل مختلف بیرون‌زدگی و رشد و گسترش سلولی و تشکیل کلونی‌های سلولی تمایز نیافته را بر روی لایه تغذیه‌کننده و بدون اثر کمکی مواد دیگر مورد مطالعه قرار دهیم.

مواد و روش‌ها

جداسازی و کشت سلول‌های بنیادی مزانشیمی. ابتدا ۴ سر رت نر، به وزن تقریبی ۱۵۰ تا ۲۰۰ گرم، که از انستیتوی پاستور تهیه شدند، به روش بی‌هوش کردن توسط کلروفورم کشته و در شرایط کاملاً استریل استخوان ران آن‌ها جدا شده و محتویات مغز استخوان آن‌ها با استفاده از فلاشینگ محیط (DMEM) به درون لوله‌های فالکون تخلیه شد. سپس آسیبهره حاصل به مدت ۴ دقیقه در دور ۱۴۰۰ rpm سانتریفوژ شد و رسوب سلولی حاصل درون فلاسک‌های کشت سلولی حاوی محیط DMEM به همراه ۱۰٪ سرم جنین گاوی (FBS) کشت داده شد. پس از ۲۴ ساعت محیط رویی خارج شده و سلول‌های چسبیده به کف فلاسک نگه داشته شدند. محیط کشت سلول‌ها هر ۳-۴ روز تعویض شد و پس از این‌که سلول‌ها تمام سطح ظرف را پر کردند پاساژ سلولی با استفاده از تریپسین ۰/۰۵٪ و EDTA ۰/۰۲٪ صورت گرفت. از پاساژ ۴ به بعد از سلول‌های بنیادی مزانشیمی به عنوان لایه تغذیه‌کننده استفاده شد. و فعالیت میتوزی آن‌ها با میتوماپسین C غیرفعال گردید.

تمایز به سمت استئوسیت‌ها. به منظور تعیین هویت سلول‌های جدا شده از مغز استخوان، در این مطالعه از آزمایش تمایز به سمت رده‌های استئوسیتی استفاده شد. محیط تمایز به استئوسیت شامل DMEM حاوی $50\text{M}\mu$ آسکوربیک اسید، 100nM دگزامتازون و 10mM بتاگلیسرول فسفات است که سلول‌ها به مدت ۲۱ روز تحت تاثیر این محیط قرار گرفتند. سپس برای ارزیابی تمایز،

کشت اولیه کلون‌هایی از سلول‌های فیروبلاستی چسبیده به کف ظرف ظاهر شد که این کلون‌ها با گذشت زمان گسترش می‌یافتند (شکل ۱A). دومین تغییر مورفولوژی مشاهده شده این بود که ده روز پس از آغاز کشت، تک لایه‌ای از سلول‌های دوکی شکل چسبیده تشکیل شد (شکل ۱B). و در نهایت سلول‌های فیروبلاستی مغز استخوان طی پاساژهای متوالی تکثیر شدند. به طوری که این سلول‌ها، ریخت‌شناسی فیروبلاستی خود را در طی دوره کشت حفظ نمودند (شکل ۱C). تمایز به استخوان: سلول‌های کشت داده شده هر روز با میکروسکوپ معکوس بررسی شدند و پس از یک هفته نشانه‌هایی از تغییرات مورفولوژی سلول‌ها مشاهده گردید و پس از ۲۱ روز از القای استئوسیتی، سلول‌ها از نظر ترشح ماتریکس معدنی با رنگ‌آمیزی آلیزارین رد ارزیابی شدند (شکل ۲A). و کشت کنترل که در محیط معمولی قرار داشت با آلیزارین رد قرمز رنگ نشد (شکل ۲B).

کشت بلاستوسیت‌ها: سلول‌های بنیادی مزانشیمی وقتی به حدی از رشد رسیدند که کاملاً سطح فلاسک را پر کردند به عنوان لایه تغذیه‌کننده مورد استفاده قرار گرفتند و بلاستوسیت‌هایی که از موش‌های نژاد Balb/c به دست آمده بودند بر روی لایه مذکور قرار گرفتند. پس از گذشت ۲ روز جنین‌ها ناحیه زونا را پاره کرده و خارج شدند (شکل ۳) که البته میزان خروج جنین‌ها از زونا پلوسیدا با توجه به این که جنین‌ها در چه مرحله‌ای از بلاستوسیت باشند متفاوت بود.

پس از این که جنین‌ها ناحیه زونا را پاره کرده و خارج شدند، به کف پلیت چسبیدند و شروع به رشد کردند به این صورت که توده سلولی داخلی به سمت بالا و سلول‌های تروفوکتودرمی به اطراف رشد کردند. به مدت ۵ روز کشت جنین‌هایی که از ناحیه زونا پلوسیدا خارج شده بودند، بر روی لایه تغذیه‌کننده مانتیور شدند. نمایی از رشد بلاستوسیت‌ها، ۲ و ۵ روز پس از خروج زونا پلوسیدا بر روی لایه‌های تغذیه‌کننده در شکل ۴A و ۴B نشان داده شده است.

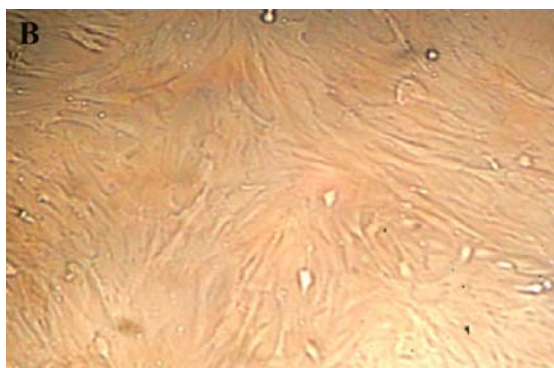
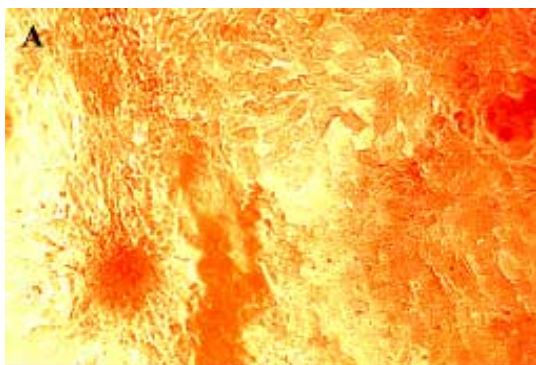
کمک پیبت دهانی ICM ها را از سلول‌های تروفوکتودرمی جدا کرده و بر روی قطرات ۲.۵٪ Trypsin/EDTA گذاشته و چندین بار پی‌پتاژ می‌کنیم تا توده سلولی به سلول‌های منفرد تبدیل شوند، مقداری FBS به سلول‌های منفرد شده اضافه می‌کنیم تا تریپسین خنثی شود، سپس به منظور بررسی رشد و تکثیر توده سلولی و تشکیل کلونی، سلول‌های منفرد شده یا خوشه‌های کوچک سلولی بر روی سلول‌های تغذیه‌کننده قرار داده شد، که این اولین پاساژ محسوب گردید. پاساژ کلونی‌ها تا دو بار دیگر هم طبق روش گفته شده انجام گردید. بیان فعالیت آلکالین فسفاتاز (AP). بیان فعالیت AP در

کلونی‌های سلول‌های بنیادی (ES) با رنگ‌آمیزی آلکالین فسفاتاز تعیین شد به همین خاطر محیط کشت از کشت‌ها خارج شد و سلول‌ها با 1% (W/V) paraformaldehyde - 7.5% (w/v) sucrose فیکس شدند. سپس سلول‌ها سه بار در بافر Tris-Hcl با $\text{pH}=9.5$ و 100 mM Tris-Hcl و 50 mM NaCl و 50 mM MgCl_2 و 1% Tween-20 هر ۱۰ دقیقه شستشو داده شدند. محلول رنگ‌آمیزی پس از آخرین شستشو اضافه شد. محلول A شامل ۷۵ mg nitroblue tetrazolium salt در ۷۰٪ دی متیل فرمالدئید و محلول B شامل ۵۰ mg/ml 5-bromo-4-chloro-3-indoly phatetoluicinium Salt (BCIP) در ۱۰۰٪ DMF. فقط قبل از رنگ‌آمیزی، ۴۵ μl از محلول A و ۳۵ μl از محلول B به ۱۰ ml بافر Tris-Hcl اضافه شد. سلول‌های ES ارغوانی - آبی شدند.

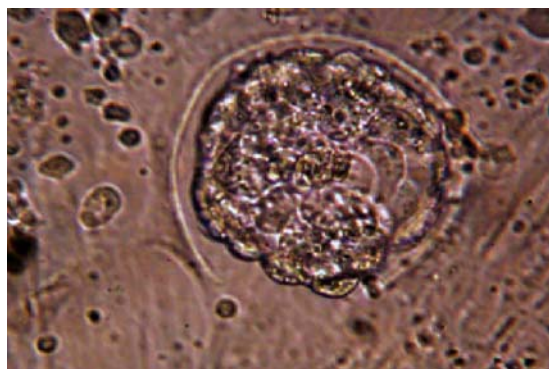
بررسی‌های آماری. در تجزیه و تحلیل داده‌ها از روش غیر پارامتریک و از spss-14 استفاده شد که در سطوح خروج زونا پلوسیدا و زمان بیرون‌زدگی و تعداد بلاستوسیت‌های چسبیده به لایه تغذیه‌کننده و میزان زنده ماندنشان و تعداد بلاستوسیت‌هایی که به مرحله پاساژ و تشکیل کلونی رسیده‌اند اختلاف معنی‌داری ($p < 0.05$) وجود دارد.

نتایج

مشاهدات مورفولوژی سلول‌های بنیادی مزانشیمی کشت یافته. بر اساس مشاهدات روزانه کشت سلولی، نخست در



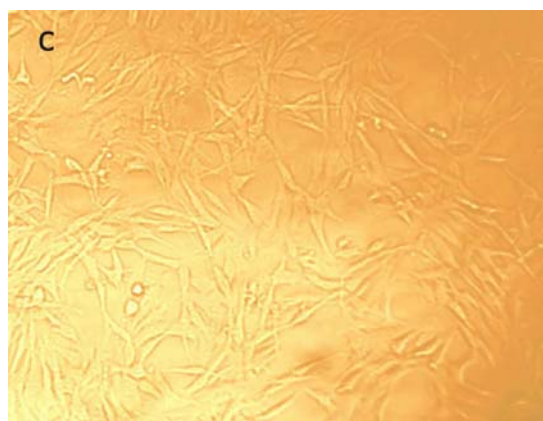
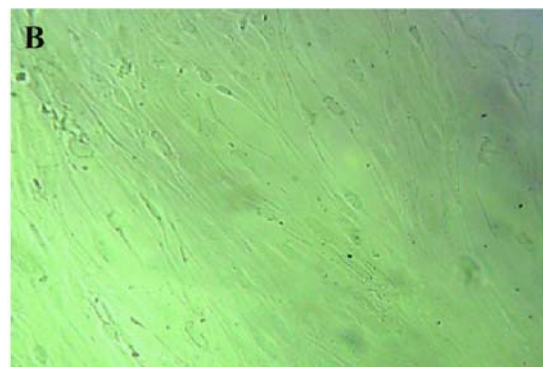
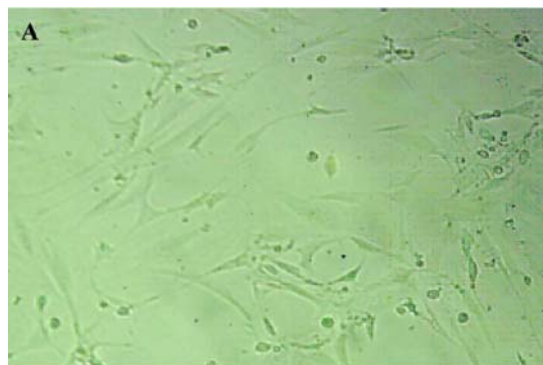
شکل ۲. تمایز سلول های MSC به استخوان. A- سلول های MSC که به مدت ۲۱ روز در معرض محیط تمایز به استخوان قرار گرفته اند و با آلیزارین رد رنگ آمیزی شده اند (درشت نمایی $\times 10$). B- سلول های کنترل منفی که به مدت ۲۱ روز در محیط فاقد القاء قرار داشتند و با آلیزارین رنگ قرمز نگرفتند (درشت نمایی $\times 10$).



شکل ۳. خروج زوناپلوئید، بلاستوسیسست قرار گرفته شده بر روی لایه تغذیه کننده مزانشیمی دو روز شروع به خروج زوناپلوئید می کند و به سلول تغذیه کننده می چسبد (درشت نمایی $\times 25$).

داخلی را به صورت کامل کشت دادیم و بعد از ۲-۳ روز نتایج زیر حاصل شد:

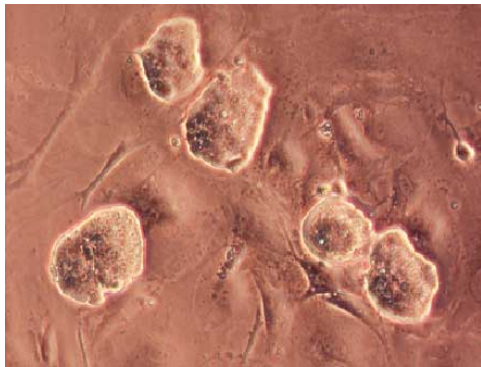
در توده سلولی داخلی که به خوشه های کوچک چند سلولی تبدیل شده بود شاهد تشکیل کلونی هایی بودیم که از طریق مورفولوژی و هم چنین با رنگ آمیزی آلكالین فسفاتاز



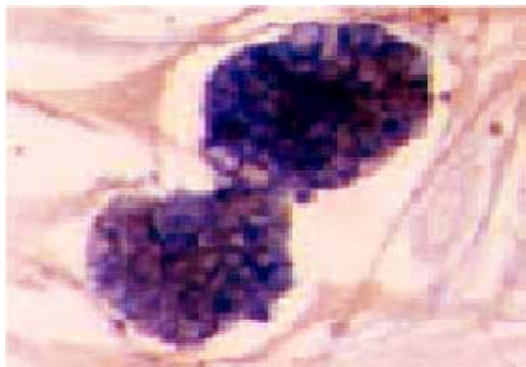
شکل ۱. کشت سلول های مغز استخوان رت. A- کلون هایی از سلول های فیبروبلاستی چسبیده به کف ظرف را در چند روز اول پس از کشت (درشت نمایی $\times 10$). B- تک لایه سلولی حاصل از بهم پیوستن کلون ها را در کشت (درشت نمایی $\times 10$). C- تکثیر سلولی در طی دو پاساژ، از لحاظ مورفولوژی سلول ها فیبروبلاستی هستند (درشت نمایی $\times 10$).

کشت توده سلولی داخلی بر روی لایه های تغذیه کننده:

پس از رشد بلاستوسیسست ها بر روی لایه های تغذیه کننده مذکور به روش مکانیکی توده سلولی داخلی را برداشته و آن ها را به کمک تریپسین ۲.۵٪ به سلول های منفرد و یا خوشه های کوچک چند سلولی تبدیل کردیم و بر روی لایه های تغذیه کننده قرار دادیم و یک بار هم توده سلولی



شکل ۵. کلونی‌های سلول‌های بنیادی تشکیل شده در پاساژ سوم (درشت نمایی X۲۵)

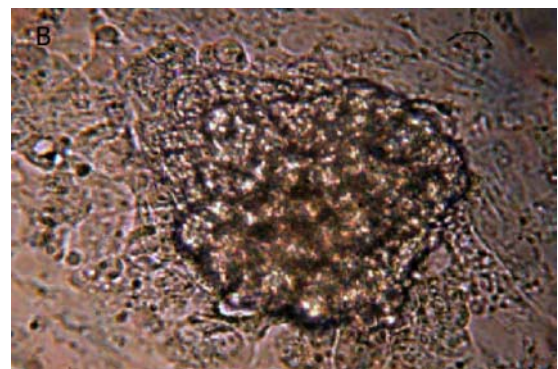
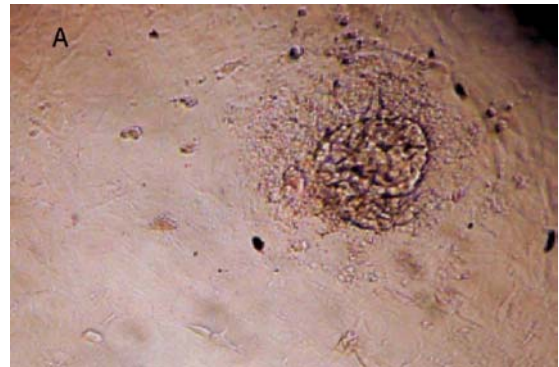


شکل ۶. کلونی‌های رنگ آمیزی شده با آلکالین فسفاتاز، کلونی‌ها به رنگ آبی - ارغوانی مشاهده می‌شوند و نشان دهنده عدم تمایز این کلونی‌ها می‌باشد. (درشت نمایی X۴۰)

بحث و نتیجه‌گیری

هدف اصلی در این تحقیق اهمیت فاکتورهای مترشحه از سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از مغز استخوان رت در کشت بلاستوسیست‌ها و تشکیل کلونی‌های سلول‌های بنیادی بود. همان‌طور که اشاره شده برای اطمینان از این‌که سلول‌های کشت یافته مزانشیمی هستند، سلول‌های چسبنده حاصل از پاساژ سوم، از لحاظ تمایز به استخوان با رنگ آلیزارین رد مورد بررسی قرار گرفتند. از طرفی با توجه به این‌که موضوع تمایز به استخوان از لحاظ سلول درمانی و پیوند آن‌ها در ضایعات استخوانی اهمیت فراوان دارد این سلول‌ها بر خلاف سایر سلول‌ها مارکر ویژه‌ای را بیان نمی‌کنند، بنابراین شناسایی این سلول‌ها با بهره‌گیری از یک شاخص منحصر به فرد امکان‌پذیر نیست [۲۶]، اعتقاد بر این است که تنها راه اطمینان از ماهیت مزانشیمی جدا شده، بررسی پتانسیل تمایز به دو یا

شناسایی شدند، دو بار دیگر نیز این کلونی‌ها پاساژ داده شدند که هر بار بر میزان تشکیل کلونی‌ها افزوده می‌شد هنگامی‌که کلونی‌ها برای بررسی فعالیت آلکالین فسفاتاز رنگ‌آمیزی شدند، کلونی‌های تشکیل شده در طی ۳ پاساژ، فعالیت AP مثبت را نشان دادند (شکل ۵ نمایی از تشکیل کلونی و شکل ۶ بیان آلکالین فسفاتاز را نشان می‌دهد)



شکل ۴. رشد بلاستوسیست. A- رشد بلاستوسیست را دو روز پس از خروج زونا پلوسیدا، سلول‌های تروفوکتودرمی در سطح و توده سلولی داخلی به سمت بالا و گنبدی شکل رشد می‌کند (درشت نمایی X۲۵). B- رشد بلاستوسیست را پنج روز پس از خروج زونا پلوسیدا، سلول‌های تروفوکتودرمی و توده داخل سلولی تا حد زیادی رشد کرده‌اند (درشت نمایی X۱۰).

اما وقتی توده سلولی داخلی را به صورت کامل بر روی لایه تغذیه‌کننده قرار دادیم به لایه تغذیه‌کننده نچسبید و کلونی هم تشکیل نداد و هم‌چنین وقتی توده سلولی داخلی به سلول‌های کاملاً منفرد تبدیل شد، شاهد تشکیل هیچ‌گونه کلونی نبودیم. ما بهترین نتایج را در توده سلولی تبدیل شده به خوشه‌های کوچک چند سلولی به دست آوردیم.

با توجه به مطالعات انجام گرفته بر آن شدیم تا نقش حمایتی این لایه تغذیه کننده را از مرحله کشت بلاستوسیسست تا تشکیل کلونی از توده سلولی داخلی مورد بررسی قرار دهیم و به این برسیم که آیا لایه تغذیه کننده مذکور می تواند تنها با حضور محیط کشت و بدون افزودن هیچ گونه فاکتور رشد و سایتو کینی، سلول های بنیادی جنینی را که به عنوان یک منبع نامحدود برای تولید انواع رده های سلولی حمایت نماید. از تعداد بلاستوسیسست هایی که ما بر روی لایه تغذیه کننده مزانشیمی قرار دادیم، ۹۶/۸٪ جنین ها پس از ۲ روز قرار گرفتن بر روی سلول تغذیه کننده، از زونا پلوسیدا خارج شدند و سپس ۶۴/۵٪ به سلول تغذیه کننده چسبیدند و امکان رشد یافتند و به مرحله جداسازی توده سلولی داخلی و تشکیل کلونی رسیدند. هم چنین بررسی های ما نشان داد که میزان تشکیل کلونی به نوع توده سلولی داخلی بستگی دارد به عبارتی دیگر توده داخل سلولی تبدیل شده به خوشه های کوچک چند سلولی قادر به تشکیل کلونی بود، اما توده سلولی که به طور کامل بر روی لایه تغذیه کننده قرار گرفت اصلاً به لایه تغذیه کننده نچسبید در نتیجه کلونی هم تشکیل نشد و در مورد توده سلولی تبدیل شده به سلول های منفرد به این صورت کلونی تشکیل نشد. که البته این شرایط ممکن است ناشی از شرایط کشت آزمایشگاهی و گونه موشی باشد [۳۲،۷].

میزان تشکیل کلونی در طی دو پاساژ بعدی افزایش یافت که این کلونی ها با رنگ آمیزی آلکالین فسفاتاز شناسایی شدند و مشخص شد که تمایز نیافته اند و کلونی های سلول های بنیادی هستند. ما هیچ نوع تمایزی را در طی سه پاساژ در کلونی ها مشاهده نکردیم. از طرفی با توجه به این که در برخی پژوهش ها اشاره شده بود که سلول های بنیادی جنینی موشی بر خلاف سلول های بنیادی جنینی انسانی فقط نیازمند LIF هستند و مستقل از فیدر لایر می باشند [۱۹]. با بررسی های بیش تر این موضوع لی و همکارانش نشان دادند که به دست آوردن سلول های بنیادی جنینی وابسته به نوع و منبع و کیفیت لایه تغذیه کننده است [۳۳]. هم چنین در این راستا ما در این

چند رده سلولی است [۲۷]. در مطالعه حاضر تمایز به استخوان و مثبت بودن رنگ آمیزی آلیزارین رد، ما را به این که سلول های کشت داده شده، مزانشیمی است متقاعد کرد. لایه تغذیه کننده یکی از مهم ترین فاکتورهای تأثیرگذار در کشت سلول های بنیادی جنینی است. گزارش شده که لایه تغذیه کننده می تواند بعضی از انواع سایتوکاین ها مانند LIF را ترشح نماید که ممکن است رشد سلول های بنیادی جنینی را تحریک نماید و از تمایزشان جلوگیری کند [۲۸].

به طور کلی در مطالعات پیشین برای تمایز سلول های بنیادی جنینی به سلول های خون ساز از سلول های استرومایی به عنوان لایه تغذیه کننده استفاده شده است. اما در مطالعه ای که توسط هیانگ انجام شده، او با جداسازی سلول های بنیادی مزانشیمی و تمایز آن ها به سمت سلول های استخوان ساز و استفاده از این سلول های استخوان ساز به عنوان لایه تغذیه کننده، شاهد نقش حمایتی بسیار خوبی از این لایه تغذیه کننده در کشت سلول های بنیادی خون ساز خون بند ناف بود [۲۹]. هم چنین پژوهش دیگری که توسط جانگ انجام شده، از سلول های بنیادی مزانشیمی، بدون افزودن هیچ گونه سایتوکینی برای کشت سلول های $CD34^+$ خون بند ناف استفاده گردید که او معتقد است با این بررسی ها کاربردهای کلینکی و بیولوژیکی سلول های بنیادی مزانشیمی افزایش خواهد یافت [۳۰].

ما هم در صدد برآمدیم تا از سلول های بنیادی مزانشیمی و بدون افزودن هیچ گونه سایتوکینی برای کشت سلول های بنیادی جنینی استفاده کنیم تا با مشاهده نتایج مطلوب به عنوان از آن ها در مطالعات وسیع تر استفاده نمود. هیرواکی و همکارانش، در پژوهشی سلول های بنیادی مزانشیمی مشتق از بافت های چربی را به عنوان لایه تغذیه کننده به کار برده اند و بررسی های آن ها نشان داده است که سلول های بنیادی مزانشیمی مشتق از چربی ها فاکتورهای مختلفی ترشح می کنند که بقا و رشد سلول را حمایت می کنند تا حدی که می توان آن ها را به عنوان لایه تغذیه کننده برای سلول های اپی تلیال نیز به کار برد [۳۱].

- [4] Evans MJ. and Kaufman MH. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature* 1981; 292: 154-156.
- [5] Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Wakintz MA, Swiergel JJ, Marshall VS. and Jones JM. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* 1998; 282:1154-1147.
- [6] Pera MF, Reubinoff B, and Trounson A. Human embryonic stem cell. *J Cell Sci.* 2000; 113: 5-10.
- [7] Bongso A, Fong CY, Ng SC. and Ratnam S. Isolation and culture of inner cell mass cells from human blastocysts. *Human Reprod* 1994; 9: 2110-2117.
- [8] Gardner RL. Stem cells: Potency, Plasticity and Public perception. *J Anat* 2002; 200: 277-282.
- [9] Sato M. and Nakano T. Embryonic stem cell. *Intern Med* 2001; 40: 195-200.
- [10] Friedenstein AJ. Chailakhjan RK. and Lalykina KS. The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells. *Cell Tissue Kinet* 1970; 3: 393-403.
- [11] Prochop DJ. Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues. *Science* 1997; 276: 71-74.
- [12] Horwitz EM. Prockop DJ, Gordon PL, Koo WW, Fitzpatrick LA, Neel MD and et al. Clinical responses to bone marrow transplantation in children with severe osteogenesis imperfecta. *Blood* 2001; 97: 1227-1231.
- [13] Baharvand H. and Matthaai KI. Culture Condition Difference for establishment of new embryonic stem cell lines from the C57BL/6 and Balb/c mouse steins. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 2004; 40: 76-81.
- [14] Baharvand H, Ashtiani SK, Valojerdi MR, Shahverdi A, Tae A. and Sabour D. Establishment and in vitro differentiation of a new embryonic stem cell line from human blastocysts. *Differentiation* 2004; 72: 224-229.
- [15] Niwa H. Molecular mechanism to maintain stem cell renewal of ES cells. *Cell Struct Funct* 2001; 26: 137-48.
- [16] Martin GR. Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1981; 78: 7634-7638
- [17] Smit TA. and Hooper ML. Medium conditioned by feeder cells inhibits the differentiation of embryonal carcinoma cultures. *Exp Cell Res* 1983; 145: 458-462.
- [18] Tong Y, Zou JH, Shang KG. Establishment of a C57BL/6J ES cell line by conditioned media of rat myocardial cells. *Acta Sci Nat Univ Pekin* 2000; 36: 472-476
- [19] Nakano T, Kodama H. and Honjo T. Generation of lymphohematopoietic cells from embryonic cells in culture. *Science* 1994; 265: 1098-1101.
- [20] Li F, Lu S, Vida L, Thomson JA. and Honig GR. Bone morphogenetic protein 4 induces efficient hematopoietic differentiation of rhesus monkey embryonic stem cells in vitro. *Blood* 2001; 98: 335-342.
- [21] Palacios R, Golunski E. and Samarids J. In vitro generation of hematopoietic stem cells from an embryonic stem cell line. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995; 92: 7530-7534.
- [22] Bigas A, Martin DI. and Bernstein ID. Generation of hematopoietic colony-forming cells from embryonic stem cells: Synergy between a soluble factor from NIH-3T3 cells and hematopoietic growth factors. *Blood* 1995; 85: 3127-3133.
- [23] Nakayama N, Fang I. and Elliott G. Natural killer and B-lymphoid potential in CD34+ cells derived from embryonic stem cells differentiated in the presences of vascular endothelial growth factor. *Blood* 1998; 91: 2283-2295.
- [24] Hole N, Graham GJ, Menzel U. and Ansell JD. A limited temporal window for the derivation of multilineage repopulating hematopoietic progenitors during embryonal stem cell differentiation in vitro. *Blood* 1996; 88: 1266-1276.
- [25] Sainteny F. Production of hematopoietic cells from ES cells. *J Soc Biol* 2001; 195: 13-18.
- [26] Seshi B, Kumar S. and Sellers D. Human bone marrow stromal cell, coexpression of markers specific for multiple mesenchymal cell lineages. *Blood Cells Moll Dis* 2000; 26: 234-246.
- [27] Alhadlaq A. and Mao JJ. Tissue-engineered neogenesis of human-shaped mandibular condyle from rat mesenchymal stem cells. *J Dent Res* 2003; 82: 951-956.

تحقیق بدون استفاده از LIF و تنها با حضور لایه تغذیه‌کننده، البته با لایه تغذیه‌کننده‌ای که به حد رشد نهایی رسیده باشد، توانستیم سلول‌های بنیادی را تا حد ۳ پاساژ و بدون هیچ‌گونه تمایزی پیش ببریم و بتوانیم در تحقیقات وسیع‌تر از آن استفاده نماییم.

نتایج حاصل از تحقیق نشان داد که می‌توان سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان را به سمت رده‌های استخوانی تمایز دهیم و به بدون افزودن هیچ‌گونه سایتوکینی به عنوان لایه تغذیه‌کننده در جداسازی و کشت سلول‌های بنیادی جنینی استفاده نماییم. به‌طوری‌که این روش با حذف نیاز سایتوکاین‌ها و محرک‌های رشد، روشی ساده و کارا برای جداسازی و کشت کلونی‌های سلول‌های بنیادی جنینی می‌تواند باشد.

هم‌چنین در این تحقیق کلونی‌های توده سلولی داخلی با روش خرد کردن به شیوه مکانیکی تهیه شد و مورفولوژی آن‌ها به صورت توده پهن یک لایه سلولی با محدوده مشخص و جداره سیتوپلاسمی نامشخص و چند هسته واضح به عنوان اولین علامت موفق کشت سلول‌های توده داخلی بر روی لایه تغذیه‌کننده MSC تعیین شد و عدم تمایز آن‌ها هم‌چنین با رنگ‌آمیزی آلکالین فسفاتاز تعیین گردید.

تشکر و قدردانی

این تحقیق با حمایت‌های مالی انستیتوی پاستور تهران و در بخش بیوشیمی پاستور انجام شده است. با تشکر از زحمات تمام کارکنان بخش بیوشیمی.

منابع

- [1] Odorico JS, Kaufman DS. and Thomson JA. Multilineage differentiation from human embryonic stem cell lines. *Stem Cells* 2001; 19: 193-204.
- [2] Shamblo MJ, Axelman J, Sterneckert J, Christoforou N, Patterson ES, Siddiqi MA, Kahler H, Ifeanyi LA, Gearhart LD (2002) Stem cell culture: Pluripotent stem cells. In: Atala A, Lanza RP (ed) *Methods of Tissue Engineering*. Academic Press, San Diego, pp 411-428.
- [3] Itskovitz-Eldor J, Schuldiner M, Karsenti D, Eden A, Yanuka O, Amit M. and et al. Differentiation of human embryonic stem cells into embryoid bodies comprising the three embryonic germ layers. *Mol Med* 2000; 6: 88-95.

[31] Sugiyama H, Maeda K, Yamato M, Hayashi R, Soma T, Hayashida Y. and et al. Human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells as a novel feeder layer for epithelial cells. *J Tissue Eng Regen Med* 2008; 2: 445-449.

[32] Kawase E, Suemori H, Takahashi N, Okazaki K, Kashimoto K. and Nakatsuji N. Strain difference in establishment of mouse embryonic stem (ES) cell lines. *Int J Dev Biol* 1994; 38: 385-390.

[33] Li M, Ma W, Hou Y, Sun XF, Sun QY. and Wang WH. Improved isolation and culture of embryonic stem cells from Chinese miniature pig. *J Reprod Dev* 2004; 50: 237-244.

[28] Smit AG, Health JK, Donaldson DD, Wong GG, Moureau J, Stahl M. and Rogers D. Inhibition of pluripotential embryonic stem cell differentiation purified polypeptides. *Nature* 1998; 336: 688-690.

[29] Huang XB, Liu T, Meng WT. and Zhi W. Osteoblasts differentiated from human marrow bone mesenchymal stem cells support hematopoietic stem/progenitor cells from umbilical cord blood. *Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi* 2006; 14: 552-556.

[30] Jang YK, Jung DH, Jung MH, Kim DH, Yoo KH, Sung KW. and et al. Mesenchymal stem cells feeder layer from human umbilical cord blood for ex vivo expanded growth and proliferation of hematopoietic progenitor cells. *Ann Hematol* 2006; 85: 212-225.

Effects of rat mesenchymal stem cells as a feeder layer in isolation and culture of mouse embryonic stem cells

Nasim Forghani (M.Sc.)^{*1}, Mehdi Kadivar (Ph.D)², Parechehr Yagmaei (Ph.D)¹, Saeedeh Kargar (M.Sc)², Leili Ghazizadeh (M.Sc)¹

1 - Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

2- Dept. of Biochemistry, Pasteur Institute of Tehran Tehran, Iran

(Received: 19 Jan 2009 Accepted: 26 Apr 2009)

Introduction: Embryonic stem cells (ESCs) are pluripotent cells derived from the inner cell mass (ICM) of blastocysts. A feeder layer and cytokines are necessary for culture of these embryonic cells in most species. The aim of this study was application of rat mesenchymal stem cells (MSCs) as a feeder layer for the isolation and culture of mouse embryonic stem cells.

Materials and Methods: Mesenchymal stem cells were isolated from rat bone marrow and cultured in DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) medium supplemented with 10% FBS (fetal bovine serum). To verify the isolated cells, they were affected by osteocyte differentiation inducer to become bone mass. After twenty-one days, the differentiation was evaluated by Alizarin red staining. Blastocysts were obtained from Balb/c pregnant mice and cultured on this MSCs feeder layer. Two days later; after hatching of blastocysts, the cells were trypsinized and the inner cell mass dissociated to the small cell clumps. These clumps were cultured on 12-well plates covered by the same MSCs without applying any cytokines or growth inducer. Two to three days after the passage, colonies appeared which were similar to embryonic stem cell colonies in morphology. These colonies were passaged two more times using the mentioned procedure and their identities were examined by morphological observation and alkaline phosphatase staining.

Results: In this study we could easily cultured MSCs using DMEM media. The mesenchymic origin of cultured cells, which showed fibroblastic morphology, was proved by differentiation to bone masses using osteocyte inducer and detection with Alizarin red. By applying DMEM media and MSCs cells, as feeder layer, we could culture ESC without any need to cytokines or growth factors. After passage to the inner cell mass colonies were formed. These colonies were formed in two more other passages. The colonies were verified with alkaline phosphatase assay.

Conclusion: Results of this study showed mesenchymal stem cells isolated from rat bone marrow can differentiate to osteoblast line and can be used as feeder layer for isolation, culture and forming embryonic stem cells colonies. This method, by using MSCs as feeder layer and bypassing the need of cytokine and growth factors, seems to be a simple efficient method for culture and isolation of embryonic stem cells.

Key words: Rat Mesenchymal stem cells, Embryonic stem cells, Feeder layer.

* Corresponding author Fax: +98 431 2233376; Tel: +98 914 431 5215
nasim_forghani@yahoo.com