

## تمایز سلولهای بنیادی سوماتیک نامحدود به دست آمده از خون بند ناف به غضروف

فرشته نژاددهبازی M.Sc.\*، مسعود سلیمانی Ph.D.\*\*، سعید کاویانی Ph.D.\*\*، امیر آتشی M.Sc.\*\*، سعید حیدری M.Sc.\*\*

\*گروه سلولی و مولکولی دانشگاه خاتم

\*\*گروه هماتولوژی دانشگاه تربیت مدرس

\*\*\*گروه سلولی و مولکولی دانشگاه امام حسین(ع)

تاریخ وصول: اردیبهشت ماه ۸۷؛ تاریخ پذیرش: مردادماه ۸۷

### چکیده

**هدف:** جداسازی و تخلیص سلولهای بنیادی سوماتیک نامحدود (USSC: unrestricted somatic stem cell) به دست آمده ازخون بندناف نوزاد با ترم کامل و بررسی تمایز این سلولهای به سلولهای غضروفی در محیط آزمایشگاه

**مواد و روشها:** در این مطالعه سلولها از خون بند ناف جداسازی و در فلاسک کشت داده شدند. یک هفته بعد از کشت، اولین کلونیه‌ها ایجاد شد. برای مشخص کردن نوع این سلولها حدود ۱۰۰۰۰۰۰ تایی آنها مورد بررسی فلوسایتومتری قرار گرفت. برای بررسی تمایز این سلولها به غضروف حدود ۲۰۰۰۰۰۰ تا از این سلولها در پلیتهای ۶ خانه‌ای که کف آنها از قبل با پلی - ال - لیزین ۲ پوشانده شده بود، همراه با محیط کندروژنیک در انکوباتور قرار گرفتند. بعد از ۲۴ ساعت اولین توده سلولی تشکیل شد، این وضعیت تا ۲۱ روز ادامه یافت و محیط سلولهای هر دو روز یک بار با محیط کندروژنیک تعویض شد، بعد از اتمام دوره تمایزی و بعد از سه هفته سلولها توسط روشهای رنگ آمیزی آلبین بلو، ایمونوسیتوشیمی و RT-PCR بررسی شدند. به علاوه این سلولها برای ۵۰ بار پاساژ یافتند و کاربوتیپ آنها بررسی شد.

**یافته‌ها:** در روزهای اولیه کشت سلول، جمعیت سلولهایی که دوکی شکل بودند افزایش و گسترش یافتند و تقریباً طی پاساژ دوم تخلیص شدند. نتایج تمایز توسط بررسیهای RT-PCR بیان مقادیر زیادی کلاژن II، آگریکان، BMP-6 و کلاژن را که از ژنهای اختصاصی سلولهای غضروفی هستند را نشان داد. بررسیهای هیستوشیمی نشان داد که ماتریکس خارج سلولی در بین سلولها ایجاد شده است و این نتیجه با بررسی ایمونوسیتوشیمی و بیان کلاژن II، به تایید رسید. کاربوتایپ این سلولها تعداد پاساژهای زیادی را که برای این سلولها امکان پذیر است را نیز مشخص نمود.

**نتیجه گیری:** سلولهای مزانشیمی تمایز یافته به رده غضروف می‌توانند منبعی برای پیوند سلولی در آرتريت روماتیسمی باشد و از سوی دیگر خون بندناف نسبت به مغز استخوان می‌تواند منبع مناسبی برای سلولهای مزانشیمی باشد.

**کلیدواژه‌ها:** غضروف زایی، سلولهای بنیادی سوماتیک نامحدود، TGF- $\beta$ 1، مهندسی بافت غضروف

## مقدمه

سلولهای بنیادی مزانشیمی از مغز استخوان به دست می‌آیند در حالی که سلولهای بنیادی USSC از خون بند ناف، جفت یا خون نوزاد تازه به دنیا آمده جداسازی می‌شوند. این سلولها دارای انعطاف پذیری بالایی بوده و بسیار چسبنده هستند [۴-۱]. این سلولها دارای توانایی تمایز به انواع سلولهای مزانشیمی از قبیل استخوان، غضروف، چربی و میوسیت‌های اسکلتی در محیط آزمایشگاهی هستند.

تلاشهای زیادی در رابطه با جداسازی سلولهای بنیادی مزانشیمی از خون بند ناف و خون محیطی انجام شده و بعضی از محققین بر این عقیده اند که خون بند ناف نوزاد با ترم کامل فاقد سلولهای بنیادی مزانشیمی است [۸-۵] و عده‌ای دیگر بر این عقیده اند که سلولهای بنیادی مزانشیمی در خون محیطی [۹-۱۱] و در جدار اندوتلیوم رگی در بندناف [۱۲-۱۳] موجود هستند. اگر چه سلولهای USSC دارای فرکانس پایینی در نمونه های خون بند ناف هستند اما قادرند تا  $10^{10}$  سلول گسترش یابند و کاریوتایپ طبیعی خود را حفظ نمایند [۱۴]. در این مطالعه علی رغم اطلاعات ضد و نقیضی که راجع به امکان جداسازی سلولهای مزانشیمی از خون بند ناف انسان وجود داشت این سلولها جداسازی و کشت داده شدند و قدرت تمایزی آنها به سلولهای غضروفی نیز بررسی شد. بر خلاف دیگر منابع سلولهای بنیادی، خون بند ناف دارای مزایای بیشتری است که می‌توان به محدود نبودن اهدا کننده، بلوغ کمتر سلول نسبت به سلولهای فرد بالغ و کاهش احتمال پس زدگی پیوند پس از پیوند اشاره کرد. از سوی دیگر می‌توان خون بند ناف افراد را ذخیره نموده و در موارد مورد نیاز از آن برای خود شخص یا فرد دیگری استفاده نمود. در مطالعه حاضر سلولهای بنیادی سوماتیک نا محدود از خون بند ناف طبق پروتکل کگلر (Kogler) و همکاران جداسازی شدند و پتانسیل تمایزی آنها به غضروف مورد بررسی قرار گرفت [۱۴]. برای ایجاد توده سلولی به جای سانتریفوژ کردن سلولها از

پلی-ال-لیزین استفاده شد تا میزان مرگ و میر سلولها کاهش یافته و طبق یافته های پیشین تاثیر این پلیمر در خوشه شدن سلولها مورد بررسی قرار گیرد [۱۵] و همچنین میزان پاساژ این سلولها و نرمال بودن آنها به کمک کاریوتایپ بررسی شد.

## مواد و روشها

### محیطهای کشت و القا کننده

فایکول (DMEM high and low,  $1/0.77$  gr/ml)، (sigma) bFGF، (sigma) Trypsin (Gibco)، (sigma) PBS، دگزامتازن (سیگما)، آسکوربیک اسید -۲ فسفات (سیگما)، لینولئیک اسید (سیگما)، (Gibco) FBS، (Gibco) ITS، کلاژناز (سیگما)،  $TGF-\beta$  (peprotech)، آکشیان بلو (سیگما)، آنتی بادی اولیه ضد کلاژن تیپ II (سیگما)، آنتی بادی ثانویه (سیگما)، پنی سیلین (Gibco)، استرپتومایسین (Gibco).

### جداسازی سلولهای بنیادی USSC از خون بند ناف

سلولهای بنیادی USSC از خون بند ناف طبق پروتوکلی که کگلر (Kogler) و همکاران منتشر کرده بودند، جداسازی شد. بدین منظور سلولهای تک هسته ای با استفاده از فایکول جداسازی گردید. بعد از سانتریفوژ سلولهای بدست آمده در محیط کشت DMEM غنی شده با دگزامتازون  $100$  نانومولار،  $30$  درصد FBS و آنتی بیوتیکهای پنی سیلین و استرپتومایسین قرار گرفت. تعویض محیط اولیه بعد از  $24$  ساعت انجام گرفت و پس از آن هر  $4$  روز یک بار انجام شد. پس از آنکه سلولها  $80$  درصد سطح فلاسک را پر کردند، با استفاده از محلول  $25$  درصد Trypsin/EDTA، پاساژ انجام گرفت. پس از خالص شدن جمعیت سلولهای بنیادی، تعداد مشخصی از این سلولها برای بررسی فلوسیتومتری و مطالعات تمایزی استفاده شدند.

### فلوسایتومتری

برای فلوسایتومتری تعداد یک میلیون سلول در  $100$  میکرولیتر

اضافه شد. در نهایت سلولها را از ارتفاعی بر سطح لام گسترانیده و کروموزومها مورد آنالیز کروموزومی قرار داده شد.

### بررسی تمایز سلولها در محیط دو بعدی به کمک

#### پلی - ال - لیزین

در یک پلیت شش خانه که کف آن با پلی - ال - لیزین پوشیده شده بود تعداد  $5 \times 10^4$  سلول p3 ریخته شدند و به آنها محیط تمایزی غضروفی شامل  $10^7$  M دگزامتازون  $TGF-\beta$ ،  $100 \times ITS$ ،  $10 \text{ ng/ml bFGF}$ ،  $500 \text{ mg/ml inulinic acid}$ ،  $50 \mu\text{g/ml ascorbic acid-2-phosphate}$  افزوده شد و مدت ۲۱ روز سلولها در این شرایط نگهداری شد.

#### RT-PCR برای سلولهای تمایز یافته در محیط دوبعدی

کل محتوای RNA از سلولهای سوماتیک نامحدود تمایز نیافته و سلولهای تمایز یافته که به کمک پلی - ال - لیزین تمایز آنها صورت گرفته بود جمع آوری شد و واکنش RT-PCR برای آنها با استفاده از پرایمرهای اختصاصی انجام گرفت (جدول ۱).

از PBS با آنتی بادیهای، آنتی CD29 و CD146، و FLK1(kdr) و (CD34) و (CD105) و (CD166). برای ۴۵ دقیقه در ۴ درجه سانتیگراد مجاور شدند پس از شستشو سلولها در ۱۰۰ میکرولیتر محلول ۱ درصد پارافرم آلدئید قرار گرفته و آنالیز فلوسایتومتری روی آنها انجام گرفت.

### بررسی تعداد پاساژ سلولهای سوماتیک نامحدود

#### و کاریوتایپ آنها

سلولهای ussc جدا شده از خون بند ناف ۵۰ پاساژ داده شدند و کاریوتایپ آنها بررسی شد که پس از ۵۰ پاساژ کاریوتایپ سلولها کاملاً طبیعی بوده و به صورت xx که همان سلولهای جدا شده از خون بند ناف نوزادان با ترم کامل دختر بوده است.

برای انجام کاریوتایپ ابتدا سلولها را برای مدت ۳-۴ ساعت با  $0.1 \mu\text{g/ml}$  کلسمید درون انکوباتور قرار داده و سپس سلولها را تریپسینه کرده و  $0.075$  مولار محلول KCL را به سلولها اضافه نموده و به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد و  $5\text{CO}_2$  درصد درون انکوباتور قرار داده شد. در مرحله بعد متانول و اسید استیک را به نسبت ۱:۳ برای تثبیت نمونه ها

جدول ۱. توالیهای پرایمری مورد استفاده برای تمایز غضروفی

اندازه محصول	TM	توالی	پرایمرها	
432	56.2	F:TCT GGG TTT CAT CCA TCC R:TAC CTG TGG AGC AAC CTG	B2M	۱
540	58.6	F:GAA TCT AGC AGT GAG ACG TC R: CTG CAG CAG TTG ATT CTG AT	agrican	۲
388	62.5	F: TCC GAC CTC TCT CCT CTG AA R: GAG TGG GGT TAT GGA GGG AT.	Collegen (I)	۳
470	53	F: ACC AAA GGG ACA GAA AG R: CAG CTT CAC CAT CAT CAC C	Collagen (II)	۴
412	62.5	F: CTC GGG GTT CAT AAG GTG AA R: ACA GCA TAA CAT GGG GCT TC	BMP-6	۵

### بررسیهای ایمونوهیستوشیمی

ابتدا توده سلولی حاصل از تشکیل در پلیت به کمک پلی-ال-لیزین را با پارافرم آلدئید ۴ درصد تثبیت و سپس با پارافین بلوک گیری شد و از آن برشهای ۵ میکرومتر تهیه شد. مراحل آبدهی را روی برشها انجام داده و سپس با BSA1%+PBS شستشو داده و پس از آن ۵ درصد goat serum به مدت ۲۰ دقیقه روی نمونه ها افزوده شد. پس از این زمان آنتی بادی اولیه ضد کلاژن تیپ II را همراه با ۱ درصد BSA به مدت یک شبانه روز در دمای ۴ درجه سانتی گراد قرار داده شد. پس از یک شبانه روز با BSA1%+PBS شستشو و آنتی بادی ثانویه FITC افزوده و بعد از یک تا دو ساعت با BSA1%+PBS شستشو شد و با میکروسکوپ فلورسانس

بررسی شد.

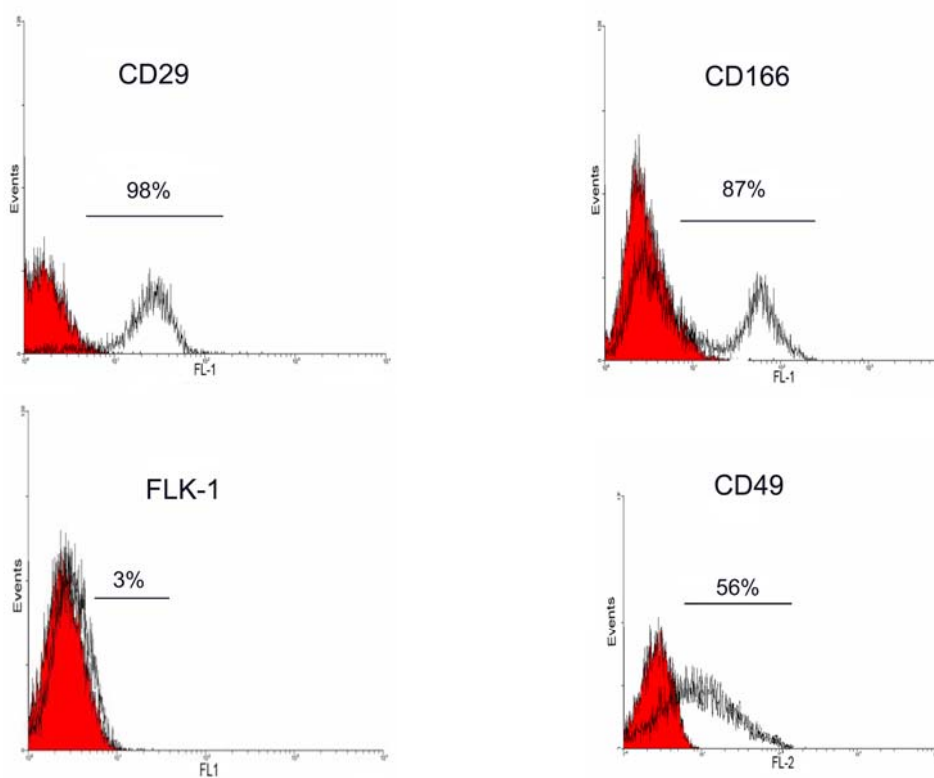
### رنگ آمیزی آلشیان بلو

بدین منظور برشهای ۵ میکرومتر تهیه شده را آبدهی نموده و سپس درون رنگ آلشیان بلو به مدت ۲۰ دقیقه قرار داده شد. پس از آن مجدداً آب گیری نموده و در نهایت نیز هسته ها با هماتوکسیلین وائوزین رنگ آمیزی و زیر میکروسکوپ مشاهده شد.

### یافته ها

#### نتایج حاصل از فلوسایتومتری

نتایج حاصل از فلوسایتومتری نشان دهنده بیان نشانگرهای مزانشیمی خون بندناف است (شکل ۱).



شکل ۱. نتایج حاصل از فلوسایتومتری نشانگرهای سلول بنیادی مزانشیمی خون بندناف.

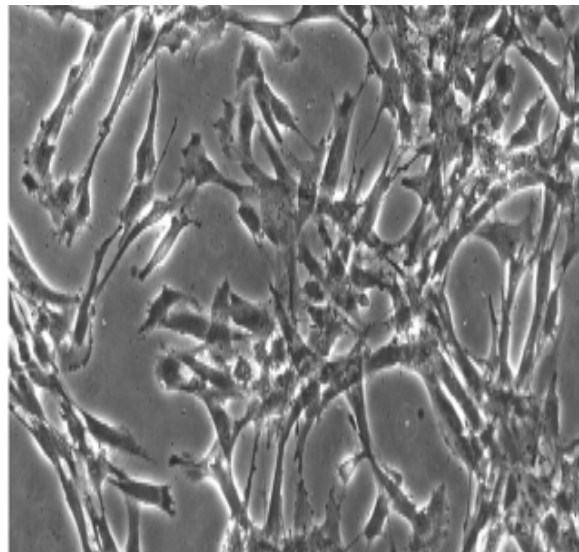
نتایج نشان داد که مارکرها CD29، CD49، CD166 در سلولهای مورد نظر به میزان بالایی بیان می شود.

### کاریوتایپ سلول‌های سوماتیک نامحدود خون بندناف

سلول‌های USSC جدا شده از خون بندناف ۵۰ پاساژ داده شدند (شکل ۲) و کاریوتایپ آنها بررسی شد که پس از ۵۰ پاساژ کاریوتایپ سلول‌ها کاملاً طبیعی و به صورت xx مشاهده شد که همان سلول‌های جدا شده از خون بندناف نوزادان با ترم کامل دختر بود (شکل ۳).

### نتایج RT-PCR

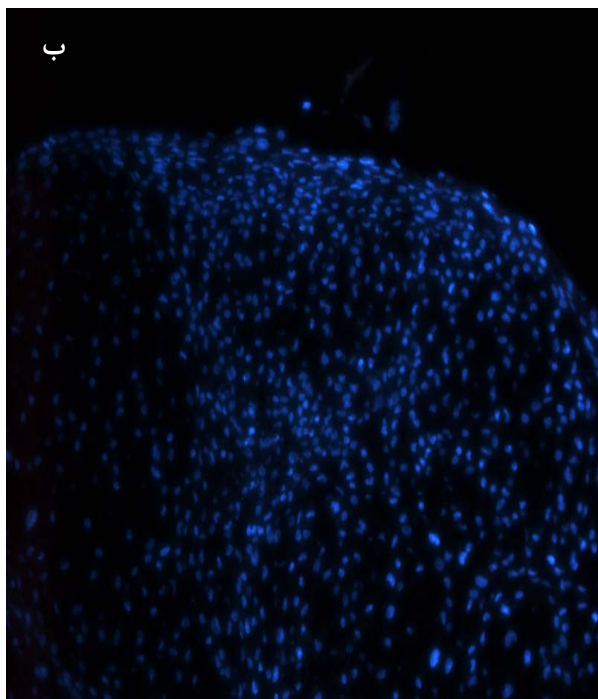
نتایج حاصل از RT-PCR نشان داد که ژن‌های Agrican، Collagen II، BMP-6(412)-3، Collagen I(388)-2، (540)1 (470)-4 و B2M(432)-5 در سلول‌هایی که به مدت ۲۱ روز در محیط تمایز غضروفی قرار گرفته بودند، بیان می‌شوند (شکل ۴).



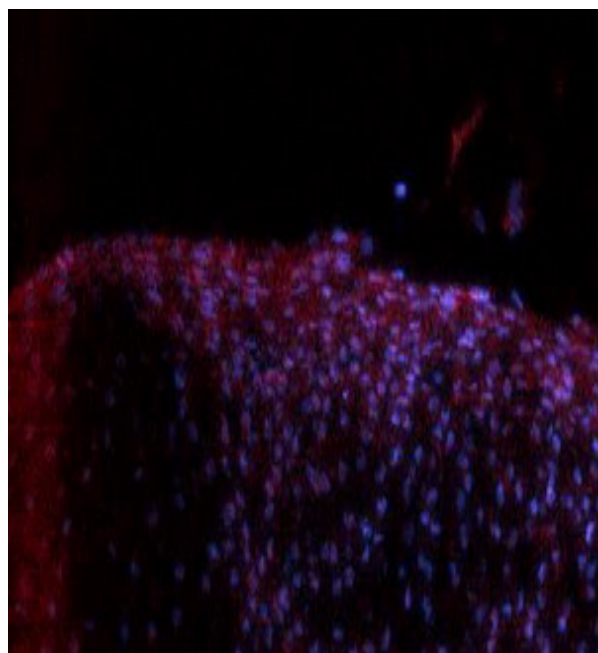
شکل ۲. تصویر حاصل از تکثیر سلول‌های دوکی شکل USSC در محیط کشت که حدود ۵۰ درصد سطح فلاسک را پر کرده‌اند.



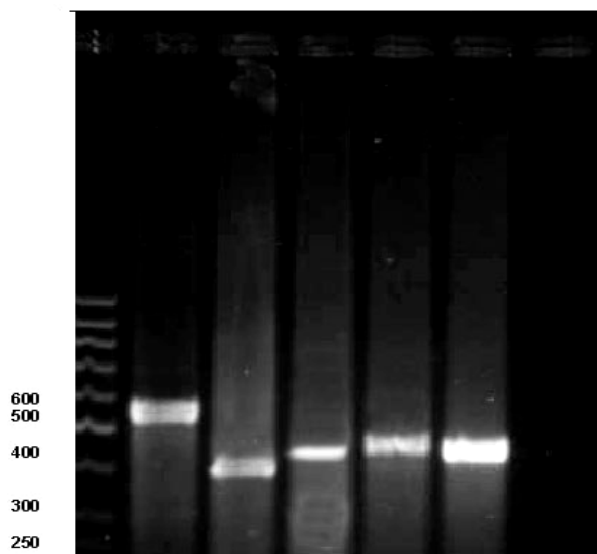
شکل ۳. کاریوتایپ کروموزومی سلول‌های بنیادی سوماتیک نامحدود بند ناف (USSC) بعد از ۵۰ پاساژ که کاملاً طبیعی است و تکثیر نامحدود و بدون خطای این سلول‌ها را نشان می‌دهد.



شکل ۵. الف: رنگ آمیزی کلاژن تیپ II برشهای تهیه شده حاصل از بلوک گیری پارافین، با FITC  
ب: رنگ آمیزی هسته های سلول برشهای تهیه شده حاصل از بلوک گیری پارافین، با رنگ هسته DAPI



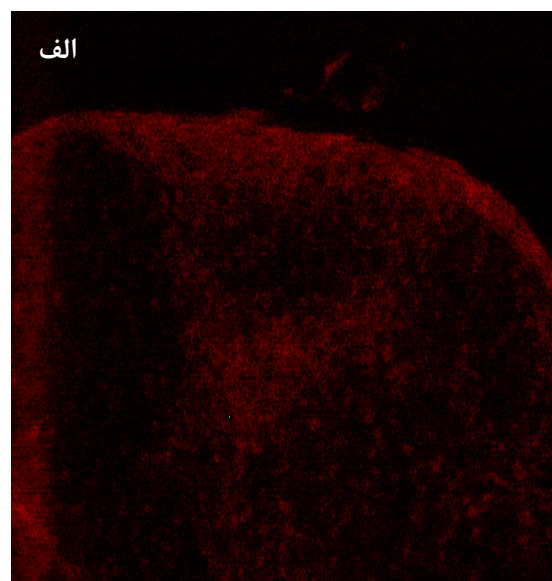
شکل ۶. رنگ آمیزی همزمان هسته های سلول و کلاژن تیپ II که هسته های سلول به رنگ آبی و ماده زمینه ای قرمز رنگ حاصل رنگ آمیزی کلاژن II که یک ماده خارج سلولی است.



شکل ۴. نتیجه حاصل از RT-PCR سلولهای تمایز یافته غضروفی در محیط دو بعدی از سمت چپ به سمت راست. لاینهای موجود به ترتیب مربوط به ژنهای 1-Agrican (540)، 2-Collagen I(388)، 3-BMP-6(412)، 4-BMP-6(412)، 5-B2M(432) به عنوان کنترل داخلی است

### نتایج حاصل از رنگ آمیزی آلیشیان بلو

بررسی مقاطع بافتی سلولهای تمایز یافته به غضروف رنگ آمیزی اختصاصی، آلیشیان بلو و ایمونوستیوشیمی برای کلاژن تیپ دو نشان داد که سلولهای مورد نظر به راحتی به سلولهای غضروفی تبدیل می شوند (شکل های ۵-۷).

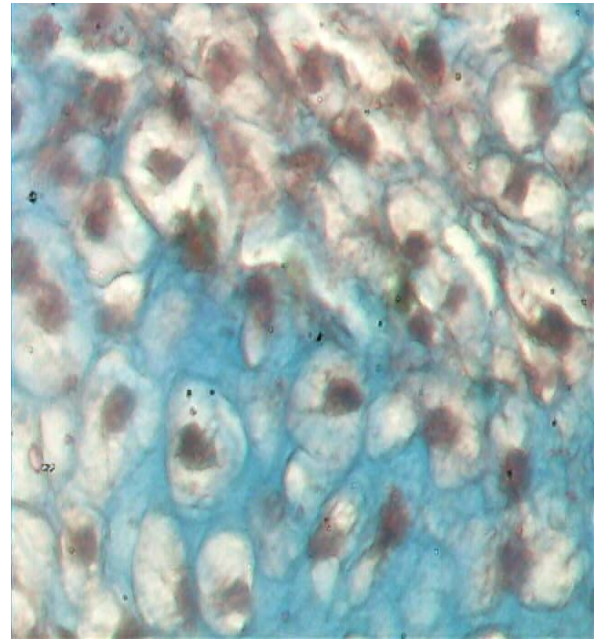


است.

در اینجا علی رغم مطالعات قبلی که درون لوله های پلی پروپیلن به روش توده ای صورت می گرفت، تمایز این سلولها به کمک پلی - ال - لیزین انجام شد. دلیل استفاده از پلی - ال - لیزین با استناد به مطالعه ای که وندی (wendy) و همکاران در سال ۱۹۹۸ [۱۷ و ۱۶] انجام دادند و نشان دادند که در محیط کشت micromass (توده ای) در تراکم بالای سلولهای بنیادی مزانشیمی بال جوجه غضروف زایی توسط پلیمر کاتیونیک پلی - ال - لیزین افزایش می یابد. چنانچه این پلیمر خوشه شدن و دسته شدن سلولها را از طریق ارتباطات یونی موجب می شود. مواجه شدن با پلی - ال - لیزین منجر به افزایش وابسته به زمان در بیان N-کادهرین هم در سطح RNA وهم در سطح پروتئین می شود. نتایج نشان می دهد چسبندگی سلولی به واسطه N-کادهرین یک جزء پیش ضروری برای تمایز سلولهای بال جوجه است که منجر به فسفریلاسیون تیروزین catenin به عنوان یک مرحله سیگنالینگ در تمایز غضروفی است.

در مطالعه ای که توسط کگلر (Kogler) و همکارانش صورت گرفت این سلولها بیش از ۲۰ بار پاساژ یافتند و کاریوتایپ آنها در پاساژ ۵ مورد بررسی قرار گرفت، در صورتی که در این مطالعه سلولها تا حدود ۵۰ بار پاساژ یافتند و کاریوتایپ آنها در پاساژ ۵۰ بررسی شد.

انتخاب یک منبع ایده آل از سلولها برای مهندسی بافت غضروف نیازمند دستیابی به یک سری از اصول دارد که شامل دسترسی آسان و منبع سلولی مناسب، توانایی گسترش یا ترمیم خودبه خودی وسیع منبع سلولی، توانایی تمایز به رده های سلولی تحت سیگنالهای ویژه و فقدان توانایی تومورزایی منبع سلولی است. بنابراین کاربرد سلولهای USSC به گونه های مختلف تاکنون تومورهای میکروسکوپی یا ماکروسکوپی بعد از ماهها یا حتی سالها بعد از پیوند در



شکل ۷. رنگ آمیزی آلبیان بلو برای برشهای تهیه شده از بلوکهای پارافینی. آلبیان کلاژن II را به عنوان ماده زمینه ای و ماتریکس خارج سلولی آبی نشان می دهد و بخشهای قرمز رنگ حاصل از رنگ آمیزی H&E است. تصویر حاصل مانند تصویر شماتیک غضروف است که دارای ماده زمینه ای است و حفره های موجود نیز لاکوناها را نشان می دهد.

## بحث

سلولهای بنیادی USSC دارای قدرت تکثیر فراوان و تمایز به رده های مزانشیمی و غیر مزانشیمی هستند. در این مطالعه سلولهای شبه فیبروبلاستی چسبنده که از خون بند ناف جدا سازی شدند، از لحاظ مورفولوژیکی و ویژگیهای تکثیری و آنالیز فلوسایتومتری بررسی شدند. همچنین قدرت تمایز این سلولها به سلولهای غضروفی مطالعه شد. توانایی تبدیل شدن این سلولها به سلولهای غضروفی با بررسیهای RT-PCR، ایمنوسیتوشیمی و رنگ آمیزی آلبیان بلوتایید شد.

این توانایی تمایز سلولهای جدا شده از خون بند ناف بیانگر آن است که خون بند ناف نوزاد با ترم کامل دارای سلولهای USSC است. جداسازی این سلولها قبلاً توسط کگلر (Kogler) و همکاران [۱۴] و جاگر (Jager) و همکاران [۱۵] تایید شده

کمتری مواجه است. بنابراین لازم است در آینده قدرت انعطاف پذیری و تمایز این سلولها به رده های دیگر سلولی و قدرت پیوند و بقای آنها در محیط بدن مورد بررسی قرارگیرد.

### تقدیر و تشکر

بدینوسیله از همکاری مسولین بخش زایمان بیمارستان طالقانی هچنین سرکار خانم نیکوگفتار در سازمان انتقال خون ایران قدردانی و تشکر می نمایم.

گوسفند ایجاد نموده است [۱۴]. به علاوه سلولهای USSC مولکولهای کوآستیمولتری و HLAI را بیان نمی کنند که می توانند منبع مناسبی برای پیوند باشند.

از این رو روشهای جداسازی سلولها از خون بند ناف باید توسعه یابد و ممکن است این سلولها به عنوان ابزار قوی در درمان بیماریها و آسیب های بافتی استفاده شوند. نسبت به جداسازی سلول از مغز استخوان که روشی تهاجمی و پرخطر است؛ جداسازی آنها از خون بند ناف راحت تر و با خطرات

### References

1. Barry FP, Boynton RE, Haynesworth S, Murphy JM, Zaia J. The monoclonal antibody SH-2 raised against Human Mesenchymal Stem Cells, Recognize an Epitope Endoglin (CD105). *Biochem. Biophys. Res Comm* 1999; 265: 134-9.
2. Erices A, Conget P, Minguell JJ. Mesenchymal progenitor cells in human umbilical cord blood. *Br Haematol* 2000; 109(1): 235-42.
3. Mackenzie TC, Flake AW. Human Mesenchymal Stem Cells. Insight from asurrogate in vivo assay system. *Cells Tissue Organ* .2002; 171: 90-5.
4. Rossmannith T, Schroder B, Bug G, Muller P, Klenner R, Knaus D, Hoelzer O, Ottman G. Interlukine 3 improves the ex vivo expansion of primitive human cord blood progenitor cells an maintains the engraftment potential of scid repopulations cells. *Stem Cells* 2001; 19(4): 313-20.
5. Wexler SA, Donaldson C, Denning -Kendal 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: 368-74.
6. Zvaifler NZ, Marinova L, Marinova L, Mutafchiev A, Adams C, Edward CJ, Moss J, et al. Mesenchymal precursor cells in the blood of normal individuals. *Arthritis Res* 2000; 2: 477-88.
7. Mareshci K, Biasin E, Piacibello W, Aglietta M, Madon E ,Fagioli F. Isolation of human mesenchymal stem cells: bone marrow versus umbilical cord blood. *Haematological* 2001; 86: 1099-100.
8. Yu M, Xiao Z, Shen L, Li L. Mid –trimester fetal blood – drived adherent cells share characteristics similar to mesenchymal stem cells but full – term umbilical cord blood does not . *Br J Haematol* 2004 ; 124: 666-75.
9. Erices A, Conget P, Minguell JJ. Mesenchymal progenitor cells in human umbilical cord blood. *Int J Biochem Cell Biol* 2004; 36: 568-84.
10. Godwin HS, Bicknese AR ,Chien SN, Bogucki BD, Oliver DA, Quinn CO, Wall DA. Multilineage differentiation activity by cells isolated from umbilical cord blood :expression of bone, fat, and neural markers, *Biol Blood Marrow Transplant* 2001; 7: 581-8
11. Lee OK, Kuo TK, WM Lee KD, Hsieh SL, Chen TH. Isolation of multipotent mesenchymal stem cells from umbilical cord blood. *Blood* 2004; 103: 1669-765.
12. RomanowYA, Svintsitskaya VA, Smirnow VN. Searching for alternative sources of postnatal human mesenchymal stem cells:candidated MSC-like cells from umbilical cord blood. *Stem Cells* 2003; 105-10.



13. **Covas DT, Siufi JLC, Orellana MD.** Isolation and culture of umbilical vein mesenchymal stem cells , Braz J Med Biol Res 2003; 36: 1179-83.
14. **Kogler G, Sensken S, Muschen M, Feldhahn N, Leidth S, Ficher J.** A new human somatic stem cell from placental cord blood with intrinsic pluripotent differentiation potential. JEM 2004; 200(2): 123-35.
15. **Jager M, Wild A, Lensing-Hohn R, Krauspe R.** Influence of different culthre solutions on osteoblastic differentiation in cord blood and bone marrow derived progenitor cells. Biomed Technik 2003; 48: 241-4.
16. **Delis AM, Tuan RS.** Alterations in the spatiotemporal expression pattern and function of N-cadherin inhibit cellular condensation and chondrogenesis of limb mesenchymal cells in vitro. J Cell Biochem 2002; 87(3): 342-59.
17. **Wendy A. Woodward, Rocky S.** N-Cadherin expression and signaling in limb mesenchymal chondrogenesis: Stimulation by Poly-l-Lysine. Br J Clin 1998; 24: 175-83.