Archive of SID

SJRM SAREM JOURNAL OF REPRODUCTIVE MEDICINE

Sarem Journal of Reproductive Medicine. 2017;1(1):9-13

Osteoblastic Differentiation of Amniotic Pluripotent Stem Cell

ARTICLE INFO

Article Type
Original research

Authors
Mahmoodinia Maymand M.[1] *MSc?*, Noruzinia M.* *MD*, *MPH*

How to cite this article
Mahmoodinia Maymand M, Noruzinia M. Osteoblastic Differentiation of Amniotic Pluripotent Stem Cell. Sarem Journal of Reproductive Medicine. 2017;1(1): 9-13.

ABSTRACT

Aims Amniotic fluid stem cells have lower ethical limitations than embryonic stem cells for the use in research and treatment. These cells show great self-renewal potential and can differentiate into the specialized cells of all three germ layers. The amniotic fluid stem cells display minimal risks of teratomas and very low immunogenicity. For these reasons, amniotic fluid appears as a promising alternative source for stem cell therapy. The objective of this study was to isolate the stem cells from amniotic fluid and differentiate them into the osteoblastic cells.

Materials & Methods An amniotic fluid sample (about 10ml) was collected from a healthy donor in Sarem women's hospital (Tehran, Iran). After centrifugation, the cells were cultured in a DMEM medium supplemented with 20% FBS. The cell clones were observed after two weeks and were passaged to an osteoblastic differentiation medium. Alizarin red staining and RT-PCR for alkaline phosphatase and osteocalcin markers were used for confirmation of cellular differentiation.

Findings Stem cells were isolated from amniotic fluid. Phenotypically, these cells showed spindle-shaped morphology with a large nucleus. Following the induction of differentiation, they showed the expression of osteoblastic cells markers indicating their differentiation. The expression of those markers was confirmed by immunocytochemistry and RT-PCR.

Conclusion Amniotic stem cells have the ability to differentiate into the osteoblastic cells using an osteoblastic differentiation medium.

Keywords Fetal Stem Cells; Amniotic Fluid; Osteoblasts; Cell Differentiation

CITATION LINKS

[1] Amniotic fluid cells and human stem cell research: A new connection [2] Isolation of osteogenic progenitors from human amniotic fluid using a single step culture protocol [3] Isolation, differentiation and biochemical aspects of amniotic fluid stem cell [4] In vitro and in vivo study of human amniotic fluid-derived stem cell differentiation into myogenic lineage [5] Development of amniotic fluid-derived stem cell [6] Adult mesenchymal stem cells: Characterization, differentiation, and application in cell and gene therapy [7] Isolation of amniotic stem cell lines with potential for therapy [8] Versatile stem cells without the ethical baggage? [9] The amniotic fluid as a source of cells for fetal tissue engineering [10] Osteocyte-osteoclast morphological relationships and the putative role of osteocytes in bone remodeling [11] Tissue engineering craniofacial defects with adult stem cells? Are we ready yet? [12] Effects of implantation of bone marrow mesenchymal stem cells, disc distraction and combined therapy on reversing degeneration of the intervertebral disc [13] Epigenetic modifications in osteogenic differentiation and transformation [14] Osteoblast differentiation of human bone marrow cells under continuous and discontinuous treatment with dexamethasone [15] Craniofacial tissue engineering by stem cells [16] Mesenchymal stem cells: Cell biology and potential use in therapy [17] Adhesion to vitronectin and collagen I promotes osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells [18] Induced differentiation of adult human bone marrow derived mesenchymal stem cells in vitro toward osteoblasts [19] Modulation of osteogenesis in human mesenchymal stem cells by specific pulsed electromagnetic field stimulation [20] Discovery of osteoblast-associated genes using cDNA microarrays

*Medical Genetics Department, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran
[1]Sarem Cell Research Center (SCRC), Sarem Women's Hospital, Tehran, Iran

Correspondence
Address: -
Phone: -
Fax: -
noruzinia@modares.ac.ir

Article History
Received: September 27, 2015
Accepted: January 12, 2016
ePublished: February 15, 2017

Copyright© 2017, ASP Ins. This open-access article is published under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License which permits Share (copy and redistribute the material in any medium or format) and Adapt (remix, transform, and build upon the material) under the Attribution-NonCommercial terms.

www.SID.ir

Archive of SID

تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی مایع آمنیوتیک به سلول‌های استئوبلاستی

مریم محمودی‌نیا میمند MSc
پژوهشکده سلولی- مولکولی و سلول‌های بنیادی صارم، بیمارستان فوق تخصصی صارم، تهران، ایران
مهرداد نوروزی‌نیا* MD, PhD
گروه ژنتیک پزشکی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

چکیده
اهداف: سلول‌های بنیادی مایع آمنیوتیک در مقایسه با سلول‌های بنیادی جنینی به‌منظور استفاده در تحقیقات و درمان محدودیت اخلاقی کمتری دارند. این سلول‌ها قدرت خودنوسازی زیادی داشته و می‌توانند به سلول‌های تخصصی از هر سه لایه جنینی تمایز یابند و حداقل احتمال خطر برای ایجاد سرطان را داشته و ایمونوژنیستی پایینی دارند. به همین دلایل، این سلول‌ها به‌عنوان منبع سلولی برای کاربرد درمانی در آینده بسیار مورد توجه هستند. هدف از این مطالعه جداسازی سلول‌های بنیادی از مایع آمنیوتیک و تمایز آنها به سلول‌های استئوبلاستی بود.
مواد و روش‌ها: حدود ۱۰میلی‌لیتر مایع آمنیوتیک از اهداکننده سالم در بیمارستان صارم تهیه شد. بعد از انجام سانتریفیوژ، سلول‌ها در محیط DMEM که حاوی FBS ۲۰% بود کشت داده شدند. بعد از دو هفته کلون‌های سلولی تشخیص و پس از پاساژ به سلول‌های استخوانی تمایز داده شدند. از روش‌های رنگ‌آمیزی الیزارین‌رِد و همچنین RT-PCR برای مارکر الکالین‌فسفاتاز و استئوکلسین به‌منظور تایید تمایز سلولی استفاده شد.
یافته‌ها: سلول‌های بنیادی از مایع آمنیوتیک جدا شد که از نظر فنوتیپی این سلول‌ها مورفولوژی دوکی‌شکل با هسته بزرگ را نشان دادند. پس از القای تمایز، بیان مارکر سلول‌های استخوانی را که نشان‌دهنده تمایزپذیری آنها بود، نشان دادند. بیان این مارکرها به وسیله تکنیک ایمونوسیتوشیمی و RT-PCR تایید شد.
نتیجه‌گیری: سلول‌های بنیادی مایع آمنیوتیک با به‌کارگیری محیط تمایزی استئوبلاستی، توانایی تمایز به سلول‌های استئوبلاستی را دارند.
کلیدواژه‌ها: سلول‌های بنیادی مزانشیمی، مایع آمنیوتیک، استئوبلاست، تمایز

تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۰۷/۰۵
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۴/۱۰/۲۲
*نویسنده مسئول: noruzinia@modares.ac.ir

مقدمه

سلول‌های بنیادی مزانشیمال مایع آمنیوتیک (AFSC)، سلول‌های بنیادی چندپتانسیلی هستند که قدرت تکثیر و خودنوسازی بالا دارند[1]. همچنین پتانسیل تمایز به رده‌های مختلف سلولی از جمله سلول‌های استئوبلاست[2]، سلول‌های چربی[3] و سلول‌های میوسیت[4] را دارند. قدرت تمایزی این سلول‌ها در محیط‌های *in vivo* و *in vitro* و همین‌طور در کشت‌های Ex vivo مشاهده شده است[5]. سلول بنیادی خواستگاه و منشا انواع سلول‌ها در بدن بوده و دارای دو ویژگی مهم یعنی پرتوانی (Pluripotency) و خودنوسازی (Self-renewal) است که هم قدرت تبدیل به انواع سلول‌ها را دارد و هم می‌تواند به سلولی تمایزنیافته مشابه خودش تبدیل شود تا منبع اصلی سلولی بنیادی هم باقی بماند. بسته به نوع سلول‌های بنیادی، این سلول‌ها قدرت تبدیل به یک یا چند نوع سلول مختلف را دارند که این نوع سلول‌ها می‌توانند در درمان انواع مختلف بیماری‌ها کمک‌کننده باشند. سلول‌های بنیادی می‌توانند براساس قدرت تمایزی یا منبع تقسیم‌بندی شوند[6]. این قابلیت سبب استفاده از این سلول در درمان بیماری‌هایی که عمدتاً با حذف سلول‌ها همراه هستند (نظیر بیماری‌های دژنراتیو) شده است، به‌طوری که مطالعات وسیعی روی تامین تعداد کافی سلول و تزریق به فرد بیمار در حال انجام است. در این بین سلول‌های بنیادی مشتق از مایع آمنیوتیک جایگاه ویژه‌ای دارند، زیرا نسبت به سلول‌های بنیادی بالغ، خاصیت ایمونوژنیک کمتری دارند و همچنین پس از تزریق به موش مانند سلول‌های بنیادی جنینی، خاصیت تومورزایی از خود نشان ندادند[7]. به همین دلیل مطالعات زیادی مبنی بر تاثیر آنها در سلول‌درمانی تاکید کرده‌اند، زیرا این سلول‌ها برای استفاده مشکلات پزشکی کاربرد ندارند و همچنین معمولاً انجام آمنیوسنتز خطری را متوجه جنین و مادر نمی‌کند [8, 9]. استخوان، یک بافت پیوندی است که به همراه غضروف، اسکلت بدن را تشکیل می‌دهد. این بافت از سلول‌های استئوبلاستی و ماتریکس استخوانی تشکیل شده و برخلاف سایر بافت‌های پیوندی، ماتریکس استخوانی دارای این توانایی منحصر به فرد است که می‌تواند کلسیفه شود. استئوژنز یک پروسه تکاملی است که تعداد زیادی از عوامل بیرونی مثل هورمون‌ها، فاکتورهای رشد، مسیرهای پیام‌رسان و فاکتورهای رونویسی در آن دخالت دارند. دو رده سلولی استخوانی وجود دارد که شامل الف) سلول‌های تشکیل‌دهنده استخوان (استئوبلاست‌ها و استئوسیت‌ها) و ب) سلول‌های بازجذب‌کننده استخوان یا استئوکلاست‌ها است[10]. به‌تازگی سلول‌های استئوبلاستی که از تمایز سلول‌های بنیادی حاصل شده‌اند، به‌عنوان منبع سلولی برای درمان بیماری‌های دژنراتیو استخوانی مطرح شده‌اند[11, 12]. در پروسه تمایز استئوبلاستی، تقسیم اولیه سلول‌های بنیادی مزانشیمی نامتقارن بوده و باعث تولید دو نوع سلول می‌شود که یکی سلول بنیادی است و ذخایر سلول‌های بنیادی را حفظ می‌کند (ویژگی خودنوسازی) و دیگری یک سلول پروژنیتور متعهد که قابلیت تبدیل به رده استئوبلاستی را دارا است (Potency). دو گام مهم در تمایز استئوبلاست‌ها از سلول‌های MSCs وجود دارد، گام اول مرحله گذر از سلول بنیادی مزانشیمی به سلول‌های پروژنیتور متعهد به رده استئوبلاستی یا مرحله Transition و گام دوم تمایز انتهایی و متوقف‌شدن چرخه سلولی است. استئوبلاست‌ها سلول‌های تمایزیافته‌ای هستند که شاخص‌های Osteopontin،Osteocalcin ، ALP و سیالوپروتئین استخوانی را بیان می‌کنند. این سلول‌ها دارای قدرت تکثیری محدودی هستند و بعد از ورود سلول‌های استئوبلاستی به مرحله تمایز انتهایی، چرخه سلولی متوقف شده و استئوسیت‌های بعد میتوزی (Post mitotic) حاصل می‌شود. استئوکلسین، یک مارکر مرحله تمایز انتهایی سلول‌های استئوبلاستی است. نقش فاز Transit amplfing در تشکیل استخوان بسیار مهم است، چرا که افزایش تکثیر در این مرحله منجر به افزایش توده استخوانی می‌شود[13]. 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 *in vitro* نیازمند فاکتورهایی مثل Ascorbic acid، Dexametasone و β-glycerophophate است. یکی از ویژگی‌های تمایز استئوبلاستی، ایجاد کلسیم و همچنین نواحی متخلخل حتی در شرایط *in vitro* است که در برخی مواقع منجر به جداشدن سلول‌ها از کف فلاسک می‌شود. در این مطالعه برای پیشبرد تمایز و همچنین ممانعت از جداشدن سلول‌ها روشی ابداع شد، به‌طوری که نیمی از محیط رویی سلول‌ها در هر تعویض محیط به‌آرامی خارج و از تکان‌های شدید فلاسک جلوگیری می‌شود. به این ترتیب میزان کلسیفه‌شدن سلول‌ها بسیار قابل ملاحظه بود. هدف از این مطالعه جداسازی سلول‌های بنیادی از مایع آمنیوتیک و تمایز آنها به سلول‌های استئوبلاستی بود.

www.SID.ir

Archive of SID

مواد و روش‌ها

حدود ۱۰میلی‌لیتر از مایع آمنیوتیک از اهداکننده سالم که از بیمارستان صارم تهیه شده بود، پس از دریافت رضایت‌نامه از فرد در یک لوله استریل به آزمایشگاه کشت سلولی منتقل شد.

کشت سلولی: بعد از سانتریفیوژ، پلاک سلولی حاصل با محیط کشت DMEM-low glucose (Gibco) که حاوی ۲۰% سرم FBS (Gibco) و پنی‌سیلین- استرپتومایسین (Gibco) بود، به‌حالت سوسپانسیون درآمد. برای شمارش سلولی و تعیین درصد Viability با استفاده از تریپان و با کمک لام نئوبار، شمارش سلولی انجام شد. برای انجام تمایز، سلول‌های بنیادی مزانشیمی به‌مدت ۲۱ روز با محیط تمایز استئوبلاستی شامل محیط DMEM high glucose که با ۱۰% سرم و ۲میلی‌مولار L- glutamine و ۱۰۰واحد پنی‌سلین- استرپتومایسین (Sigma) و ۵۰میکروگرم بر میلی‌لیتر Ascorbate-2-phosphate و ۵میلی‌مولار بتاگلیسرو فسفات و ۱۰نانومولار دگزامتازون غنی شده بود، تیمار شدند. در طول مدت تمایز، تعویض محیط سلول‌ها به‌صورت هفته‌ای دوبار انجام شد.

رنگ‌آمیزی Alizarin Red: پس از ۲۱ روز سلول‌های تمایزیافته و سلول‌های بنیادی مزانشیمی به‌عنوان شاهد تمایز به‌منظور رنگ‌آمیزی الیزارین‌رِد استفاده شدند. لام‌ها دو بار با PBS شست‌وشو داده و سپس با فرمالدهید ۴۰% فیکس شدند. رنگ‌آمیزی با محلول الیزارین‌رِد ۱% به‌مدت ۳۰دقیقه در دمای اتاق انجام شد و بعد از شست‌وشو در زیر میکروسکوپ، رنگ‌آمیزی سلول‌های استئوبلاستی در مقایسه با MSC بررسی شد.

RT-PCR برای مارکر الکالین‌فسفاتاز و استئوکلسین: برای استخراج RNA از کیت Rima Zol (طیف‌آرا فرآیند) استفاده شد. با توجه به پروتکل کیت، لیز سلول‌ها انجام شد. بعد از لیزشدن کامل سلول‌ها، استخراج به کمک کلروفرم و ایزوپروپانل انجام می‌گیرد تا رسوب RNA به دست آید. در نهایت پس از شست‌وشو با اتانول ۷۵%، RNA حاصل در آب حل می‌شود. برای تهیه cDNA براساس پروتکل شرکت سیناژن (تهران، ایران)، ۱۰میکرولیتر محلول RNA را در دمای ۶۵°C به‌مدت ۱۰-۵دقیقه انکوبه کرده و سپس مخلوطی شامل ۳میکرولیتر بافر (10X PCR)، راندوم پرایمر (10mM 0.2)، dNTP ۶میکرولیتر، $MgCl_2$ (25Mm) و ۰/۵میکرولیتر آنزیم Reverse Transcriptase را به آن اضافه کردیم. محلول حاصل را ۱۰دقیقه در ۲۵°C قرار داده و سپس به‌مدت یک ساعت در ۴۲°C انکوبه شد و در ادامه برای توقف واکنش، نمونه در ۷۰°C به‌مدت ۱۰دقیقه قرار داده شد. cDNA حاصل برای PCR استفاده شد. نمونه cDNA را می‌توان در دمای ۷۰°C زیر صفر فریز کرد. الکالین فسفاتاز یک شاخص ابتدایی سلول‌های استئوبلاستی است. در این آزمایش cDNA تهیه‌شده از RNA استخراج‌شده از سلول‌های استئوبلاستی به‌عنوان نمونه تست و cDNA تهیه‌شده از RNA استخراج‌شده از سلول‌های بنیادی مزانشیمی به‌عنوان شاهد آزمایش شدند. آزمایش PCR با استفاده از مخلوطی شامل بافر $MgCl_2$ ،PCR l0X ،dNTP (200µM) و پرایمر (1mm) برای هر پرایمر، Taq (100ng) DNA Polymerase برای هر واکنش با حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر در نظر گرفته شد. بعد از مرحله دناتوراسیون اولیه که به‌مدت ۳دقیقه در دمای ۹۴°C انجام شد، تکثیر قطعات در ۳۵ سیکل با دماهای ۹۴°C به‌مدت ۳۰ثانیه، ۵۸°C به‌مدت ۲۰ثانیه و ۷۲°C به‌مدت ۳۰ثانیه انجام شد. Extension نهایی نیز در دمای ۷۲°C و به‌مدت ۷دقیقه انجام شد. محصول PCR روی ژل اگاروز ۱/۵% الکتروفورز شد و بعد از رنگ‌آمیزی با اتیدیوم بروماید با استفاده از اشعه UV از آن عکس تهیه شد (جدول ۱).

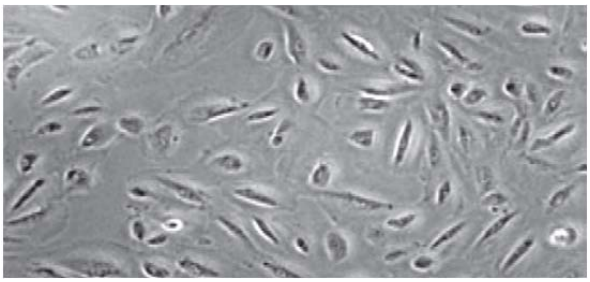
جدول ۱) توالی پرایمرهای استفاده‌شده در این مطالعه

پرایمر	توالی (‘۳-‘۵)	اندازه محصول
ALP F	GCA CCT GCC TTA CTA ACT C	۱۶۱ bp
ALP R	AGA CAC CCA TCC CAT CTC	
Osc F	TCA CAC TCC TCG CCC TAT TGG	۲۵۰ bp
Osc R	GAT GTG GTC AGC CAA CTC GTC A	

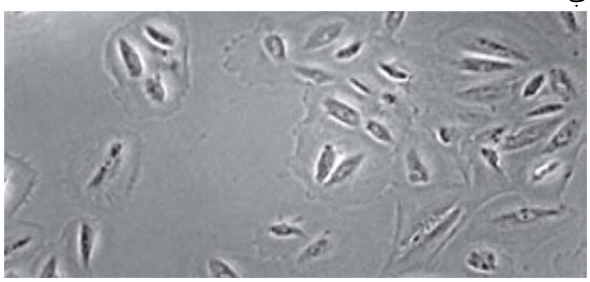
یافته‌ها

درصد Viability سلول‌ها حدود ۸۰% بود. مشاهده سلول‌ها با میکروسکوپ معکوس(Inverted) نشان داد که مورفولوژی این سلول‌ها مشابه سلول‌های فیبروبلاستی بود (شکل ۱).

الف



ب



شکل ۱) مورفولوژی فیبروبلاستی سلول‌های بنیادی مزانشیمی از مایع آمنیوتیک نتیجه رنگ‌آمیزی الیزارین‌رد

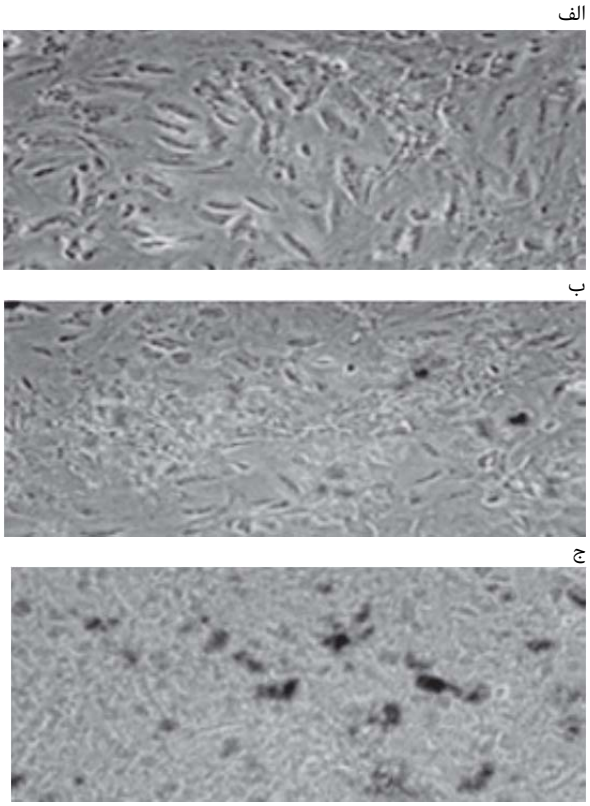
همچنین نتایج حاصل از فلوسایتومتری، نشان‌دهنده بیان مارکرهای اختصاصی سلول‌های بنیادی مزانشیمی در سلول‌های جداشده از مغز استخوان بود که تاییدکننده کیفیت جداسازی سلول‌های MSCs بود. با به‌کارگیری محیط تمایزی استئوبلاستی، سلول‌های بنیادی مزانشیمی به سلول‌های استئوبلاستی تمایز یافتند و تغییرات مورفولوژیک در روزهای مختلف مشاهدات میکروسکوپی قابل ملاحظه بود (شکل ۲).

رنگ‌آمیزی الیزارین‌رِد، نشان‌دهنده رسوب کلسیم در محیط کشت بود که تاییدکننده تمایز استئوبلاستی بود. رنگ الیزارین‌رِد بیانگر رسوب کلسیم و تایید تمایز سلول‌های مزانشیمی به استئوبلاست بود که البته از سلول‌های بنیادی مزانشیمی تمایزنیافته بودند و

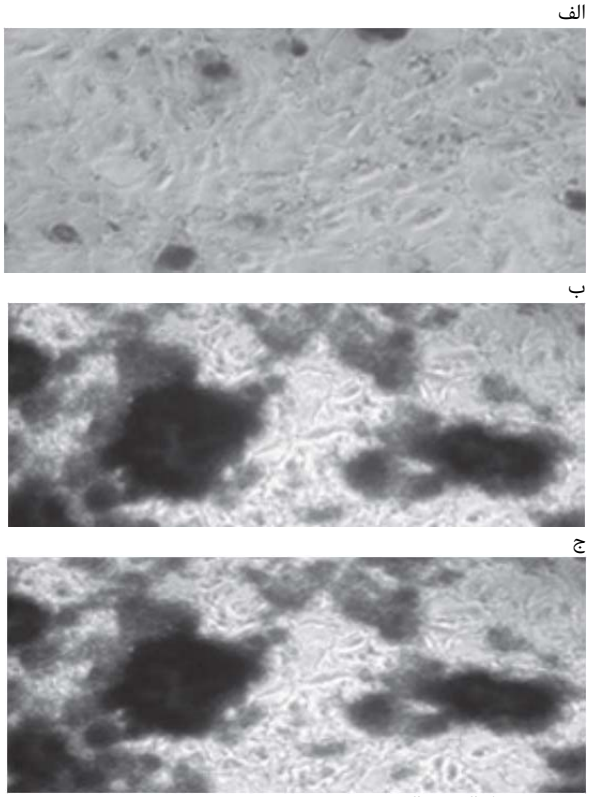
www.SID.ir

Archive of SID

پس از رنگ‌آمیزی با الیزارین‌رِد به‌عنوان کنترل منفی در نظر گرفته شد (شکل ۳).

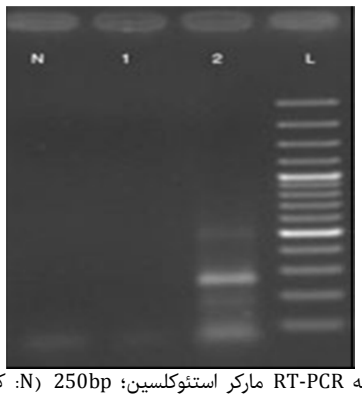


شکل ۲) سلول‌های بنیادی مزانشیمی در روزهای مختلف تمایز (از بالا به پایین به‌ترتیب) هفته اول، دوم و سوم تمایز

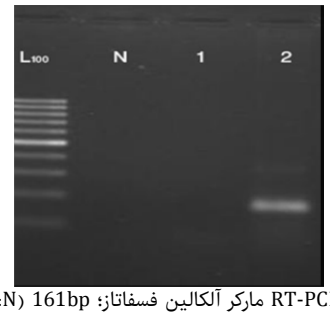


شکل ۳) رنگ‌آمیزی آلیزارین رد برای تایید تمایز استئوبلاستی، بخش الف مربوط به نمونه کنترل است.

برای تایید تمایز سلول‌های استئوبلاستی علاوه بر رنگ‌آمیزی الیزارین‌رِد، از مارکرهای ترانسکریپتوم نیز استفاده شد. بدین منظور بیان شاخص آلکالین فسفاتاز از شاخص‌های اولیه تمایز استئوبلاستی و مارکر استئوکلسین از شاخص‌های انتهایی تمایز استئوبلاستی بررسی شدند. نتایج RT-PCR هر دو مارکر نشان داد که این شاخص‌ها در سلول‌های استئوبلاستی بیان شده است، اما در سلول‌های بنیادی مایع آمنیوتیک بیان نشده‌اند که تاییدکننده تمایز سلول‌های استئوبلاستی بود (شکل‌های ۴ و ۵).



شکل ۴) نتیجه RT-PCR مارکر استئوکلسین؛ 250bp (N: کنترل منفی، ۱: سلول‌های بنیادی مایع آمنیوتیک، ۲: استئوبلاست، L: Ladder100bp)



شکل ۵) نتیجه RT-PCR مارکر آلکالین فسفاتاز؛ 161bp (N: کنترل منفی، ۱: سلول‌های بنیادی مایع آمنیوتیک، ۲: استئوبلاست، L: Ladder100bp)

بحث

در واقع سلول‌های بنیادی مزانشیمی نخستین بار به‌عنوان سلول‌های بنیادی غیرخون‌ساز در مغز استخوان شناسایی شدند. این سلول‌های چندقوه‌ای به راحتی با استفاده از خاصیت چسبندگی خود به سطح فلاسک‌های کشت پلاستیکی در *in vitro* جداسازی، تکثیر و تمایز داده می‌شوند. به علت اینکه سلول‌های بنیادی مزانشیمی قدرت self-renewal و تکثیری بالایی دارند، این سلول‌ها اهداف مناسبی برای ژن‌درمانی با استفاده از وکتورهای رتروویروسی است. سلول‌های استرومایی چسبنده می‌توانند با وکتورها القا شده و به‌مدت طولانی و به‌طور موثر ژن مربوط را بیان کنند. لذا ابزار مناسبی برای سلول‌درمانی و ژن‌درمانی محسوب می‌شوند. این سلول‌ها قادرند به سلول‌های استئوبلاستی، ادیپوسیتی، کندروسیتی، سلول‌های عصبی، سلول‌های عضلانی و استرومای حمایت‌کننده در خون‌سازی تمایز پیدا کنند. منابع دیگری نظیر بافت چربی، خون بند ناف، خون محیطی و مایع آمنیوتیک برای سلول‌های بنیادی مزانشیمی وجود دارد. مایع آمنیوتیک به‌عنوان یک منبع جایگزین مهم برای جداسازی این سلول‌ها یاد شده است. طی مطالعاتی، جداسازی سلول‌های MSC از مایع آمنیوتیک انسانی در سه‌ماهه دوم بارداری[14] و همچنین

www.SID.ir

Archive of SID

از مایع آمنیوتیک موش C57BL/6 صورت گرفته است. تمایز استئوبلاست‌ها استئوژنز یک پروسه تکاملی به‌شدت کنترل‌شده است که تعداد زیادی از عوامل بیرونی مثل هورمون‌ها، فاکتورهای رشد، مسیرهای پیام‌رسان و فاکتورهای رونویسی در آن دخالت دارند. استئوبلاست‌ها سلول‌های تخصص‌یافته‌ای است که ازسلول‌های بنیادی مزانشیمی موجود در استرومای مغز استخوان منشا گرفته و پیش‌ساز استئوسیت‌ها یا سلول‌های سازنده استخوانی هستند. استئوبلاست‌ها سلول‌های تمایزیافته‌ای هستند که دارای قدرت تکثیری محدودی بوده و بعد از ورود این سلول‌ها به مرحله تمایز انتهایی چرخه سلولی متوقف شده و استئوسیت‌های بعد میتوز (Post mitotic) حاصل می‌شود. مطالعات نشان داده است سلول‌های استئوبلاستی که از سلول‌های بنیادی مایع آمنیوتیک مشتق شده‌اند نیز برای بازسازی استخوان یا آسیب‌های تخریب‌کننده موثر هستند[15, 16]. تایید تمایز با استفاده از رنگ‌آمیزی Alizarin red و RT-PCR در این بررسی با استفاده از رنگ‌آمیزی AR مشخص شد که سلول‌های مورد استفاده توانایی تولید کلسیم را دارا هستند. این رنگ‌آمیزی به‌عنوان مارکر استاندارد تایید تمایز در مطالعات گذشته استفاده شده است[17, 18]. البته در بعضی مطالعات مشخص پیشنهاد شده است که به همراه رنگ‌آمیزی AR، استفاده از بیان ژن‌های استئوکلسین و الکالین فسفاتاز می‌تواند بسیار کمک‌کننده باشند[19]. محصول ژن الکالین فسفاتاز از پروتئین‌هایی است که در فاز تمایزی بین روزهای ۲۵-۱۱ اتفاق می‌افتد بیان می‌شود، در حالی که استئوکلسین از ژن‌هایی است که در فاز نهایی تمایز بیان می‌شود و در بین روزهای ۳۵-۲۵ اتفاق می‌افتد؛ البته مارکرهای متعدد دیگری نظیر استئوپونتین و سیالوپروتئین و همچنین فاکتورهای رونویسی مثل Ets1, Runx2/Cbfa1 هم در تایید تمایز سلول‌های استئوبلاستی استفاده شده است[20]. البته مشخص شده است که با استفاده از دو مارکر می‌تواند به اندازه کافی اختصاصی تمایز باشد[20]. در این مطالعه توانستیم با جداسازی سلول‌های بنیادی مزانشیمی از مایع آمنیوتیک و تمایز آنها به سلول‌های استئوبلاست زمینه را برای مطالعات بیشتر در ارتباط با شناسایی عوامل ژنتیک و اپی‌ژنتیک موثر در این تمایز ایجاد کنیم و همچنین روش مقدماتی درمان با سلول‌های بنیادی مزانشیمی اثبات و راه‌اندازی شد.

نتیجه‌گیری

سلول‌های بنیادی مایع آمنیوتیک با به‌کارگیری محیط تمایزی استئوبلاستی، توانایی تمایز به سلول‌های استئوبلاستی را دارند.

تشکر و قدردانی: موردی از سوی نویسندگان ذکر نشده است.
تاییدیه اخلاقی: موردی از سوی نویسندگان ذکر نشده است.
تعارض منافع: موردی وجود نداشته است.
منابع مالی: توسط پژوهشکده سلولی- مولکولی و سلول‌های بنیادی صارم تامین شده است.
سهم نویسندگان: مریم محمودی‌نیا میمند (نویسنده اول)، نگارنده مقدمه/پژوهشگر اصلی (۴۰%)؛ مهرداد نوروزی‌نیا (نویسنده دوم)، نگارنده مقدمه/روش‌شناس/پژوهشگر اصلی/نگارنده بحث (۶۰%)

منابع

1- Prusa, AR, Hengstschlager M. Amniotic fluid cells and human stem cell research: A new connection. Med Sci Monit. 2002;8(11):RA253-7.
2- Antonucci I, Iezzi I, Morizio E, Mastrangelo F, Pantalone A, Mattioli-Belmonte M, et al. Isolation of osteogenic progenitors from human amniotic fluid using a single step culture protocol. BMC Biotechnol, 2009;9:9.
3- Cabral ACV, Ângelo PC, Leite HV, Pereira AK, Lopes APBM, Oliveira MB. Isolation, differentiation and biochemical aspects of amniotic fluid stem cell. Rev Assoc Med Bras. 2008;54(6):489-93.
4- Gekas J, Walther G, Skuk D, Bujold E, Harvey I, Bertrand OF. In vitro and in vivo study of human amniotic fluid-derived stem cell differentiation into myogenic lineage. Clin Exp Med. 10(1):1-6.
5- Zhang X, Chen X, Wang H, Liu S. Development of amniotic fluid-derived stem cell. Zhongguo Xiu Fu Chong Jian Wai Ke Za Zhi. 2008;22(7):864-8.
6- Baksh D, Song L, Tuan RS. Adult mesenchymal stem cells: Characterization, differentiation, and application in cell and gene therapy. J Cell Mol Med. 2004;8(3):301-16.
7-De Coppi P, Bartsch GJR, Siddiqui MM, Xu T, Santos CC, Perin L, et al. Isolation of amniotic stem cell lines with potential for therapy. Nat Biotechnol. 2007;25(1):100-6.
8- Holden C. Versatile stem cells without the ethical baggage?. Science. 2007;315(5809):170.
9- Kaviani A, Perry TE, Dzakovic A, Jennings RW, Ziegler MM, Fauza DO, Et al. The amniotic fluid as a source of cells for fetal tissue engineering. J Pediatr Surg. 2001;36(11):1662-5.
10- Palumbo C, Ferretti M, Ardizzoni A, Zaffe D, Marotti G. Osteocyte-osteoclast morphological relationships and the putative role of osteocytes in bone remodeling. J Musculoskelet Neuronal Interact. 2001;1(4):327-32.
11- Zuk PA. Tissue engineering craniofacial defects with adult stem cells? Are we ready yet?. Pediatr Res. 2008;63(5):478-86.
12- Hee HT, Ismail HD, Lim CT, Goh JC, Wong HK. Effects of implantation of bone marrow mesenchymal stem cells, disc distraction and combined therapy on reversing degeneration of the intervertebral disc. J Bone Joint Surg Br. 2010;92(5):726-36.
13- Thomas D, Kansara M. Epigenetic modifications in osteogenic differentiation and transformation. J Cell Biochem. 2006;98(4):757-69.
14- Beloti, MM. Rosa AL. Osteoblast differentiation of human bone marrow cells under continuous and discontinuous treatment with dexamethasone. Braz Dent J. 2005;16(2):156-61.
15- Mao JJ, Giannobile WV, Helms JA, Hollister SJ, Krebsbach PH, Longaker MT, et al. Craniofacial tissue engineering by stem cells. J Dent Res. 2006;85(11):966-79.
16- Kassem M, Kristiansen M, Abdallah BM. Mesenchymal stem cells: Cell biology and potential use in therapy. Basic Clin Pharmacol Toxicol, 2004;95(5):209-14.
17- Salasznyk RM, Williams WA, Boskey A, Batorsky A, Plopper GE. Adhesion to vitronectin and collagen I promotes osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. J Biomed Biotechnol. 2004;2004(1):24-34.
18- Liu XJ, Ren GH, Liao H, Yu L, Yuan L. Induced differentiation of adult human bone marrow derived mesenchymal stem cells in vitro toward osteoblasts. Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao. 2004;24(4):408-11, 418.
19- Tsai MT, Li WJ, Tuan RS, Chang WH. Modulation of osteogenesis in human mesenchymal stem cells by specific pulsed electromagnetic field stimulation. J Orthop Res. 2009;27(9):1169-74.
20- Raouf A. Seth A. Discovery of osteoblast-associated genes using cDNA microarrays. Bone. 2002;30(3):463-71.

www.SID.ir