

مطالعه مقایسه ای مورفولوژی و بیوشیمی سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان رت قبل و بعد از تمایز استئوزئیک

محمد حسین آبنوسی^{۱*} Ph.D.، لیلا دهدهی^۲ M.Sc.

۱- دانشگاه اراک، دانشکده علوم، گروه زیست شناسی، کدپستی: ۳۸۱۵۶-۸-۸۳۴۹
 ۲- دانش آموخته کارشناسی ارشد، دانشگاه اراک، دانشکده علوم، گروه زیست شناسی
 * پست الکترونیک نویسنده مسئول: abnosi2002@yahoo.com

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۱/۳/۱۶

تاریخ دریافت: ۱۳۹۰/۱۲/۶

چکیده

هدف: هدف این مطالعه مقایسه خصوصیات مورفولوژیک و بیوشیمیایی سلول‌های مزانشیم و استئوبلاست در محیط آزمایشگاهی می‌باشد.

مواد و روش‌ها: بعد از استخراج سلول‌های مزانشیم مغز استخوان رت و کشت آنها تا پاساژ سوم، این سلول‌ها در محیط کشت حاوی ترکیبات تمایزی شامل بتا گلیسرول فسفات، دگزامتازون و آسکوربیک اسید به مدت ۲۱ روز کشت شد. سپس مورفولوژی سلول‌های مزانشیم و تمایز یافته توسط هوخست و آکریدین اورنژ بررسی گردید. همچنین میزان رسوب ماتریکس، میزان کلسیم، فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز در سلول‌های تمایزی و مزانشیم و فعالیت متابولیک سلول‌های تمایز یافته توسط روش MTT بررسی شد.

نتایج: بررسی‌های مورفولوژیک تغییراتی از قبیل تغییر موقعیت هسته و گرد شدن سیتوپلاسم در سلول‌های تمایز یافته را در مقایسه با سلول‌های مزانشیم نشان داد. همچنین معدنی شدن ماتریکس از روز دهم شروع و در روز ۲۱ به بیشترین میزان خود رسید. در سلول‌های تمایز یافته از روز دهم میزان کلسیم داخل سلولی به صورت معنی داری ($P < 0/05$) افزایش یافت ولی فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز کاهش معنی‌دار ($P < 0/05$) نشان داد. افزایش معنی‌دار ($P < 0/05$) فعالیت متابولیک سلول‌های تمایز یافته نیز در طی مراحل تمایز مشاهده شد.

نتیجه گیری: علاوه بر تفاوت‌های مورفولوژیک، میزان کلسیم، فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز و فعالیت متابولیک سلول‌های مزانشیم و استئوبلاست، با یکدیگر متفاوت هستند. لذا می‌توان برای تشخیص تمایز آزمایشگاهی سلول‌های بنیادی مزانشیم مغز استخوان به استئوبلاست، علاوه بر رنگ آمیزی آلیزارین از فاکتورهای ذکر شده در این پژوهش نیز استفاده کرد.

کلمات کلیدی: تمایز، سلول‌های بنیادی مزانشیم، آلکالین فسفاتاز، کلسیم

مقدمه

پیش از این بسیاری از اطلاعات و یافته‌ها از انجام آزمون‌ها بر جانوران یا مطالعات در شرایط آزمایشگاهی با استفاده از سلول‌های بسیار تمایز یافته، نامیرا و سلول‌های سرطانی حاصل می‌شد. اما امروزه سلول‌های بنیادی با توان خودنوزایی و تمایز مدل آزمایشگاهی مناسبی را در اختیار محققان قرار داده است (۱ و ۲). یکی از هدف‌های تحقیق بر سلول‌های بنیادی، تمایز آنها به سلول‌های تخصص یافته نظیر نورون‌ها، سلول‌های عضله قلبی، سلول‌های استخوانی، سلول‌های مولد انسولین و غیره می‌باشد. تمایز جهت دار سلول‌های بنیادی برای استفاده از آنها در توسعه درمان‌های جدید بسیار حیاتی است (۳ و ۴). استخوان فراهم آورنده حمایت مکانیکی برای موجود، محلی برای خون سازی، ذخیره‌ای برای کلسیم و هومئوستازی یون‌ها است، بنابراین حفظ سلامت آن برای بقا لازم و ضروری می‌باشد (۵). سلول‌های استئوبلاست نقش مهمی را در دوباره سازی استخوان (bone remodeling) ایفا کرده و امکان بررسی تمایز سلول‌های مزانشیمی به پیش سازهای استئوبلاستی، بلوغ استئوبلاست‌ها و تشکیل و معدنی شدن ماتریکس در شرایط *in vitro* (آزمایشگاهی) وجود دارد (۶). سلول‌های بنیادی مزانشیمی از دسته سلول‌هایی هستند که در بازسازی بافت استخوان صدمه دیده نقش مهمی را بازی می‌کنند. از آن جایی که در استراتژی‌های سلول درمانی از سلول‌های کاملاً تمایز یافته استفاده می‌شود اولین قدم در استفاده از سلول‌های مزانشیمی به منظور بازسازی ضایعات استخوانی، تمایز آنها به استئوبلاست‌ها در شرایط آزمایشگاهی می‌باشد (۳). علاوه بر آن در اغلب تحقیقات، تمایز به استخوان به عنوان بخشی از پتانسیل سلول مزانشیمی مورد توجه قرار گرفته است. ارزیابی تمایز سلول‌های مزانشیمی به استئوبلاست با استفاده از روش رنگ آمیزی اختصاصی برای معدنی شدن و بررسی بیان ژن‌ها انجام می‌گیرد (۷ و ۸). اما تا به حال هیچ گزارشی از ویژگی‌های مورفولوژیکی، متابولیک و بیوشیمیایی این سلول‌ها قبل و بعد از تمایز استئوژنیک در محیط آزمایشگاه وجود ندارد. لذا مطالعه حاضر به بررسی ویژگی‌های سلول‌های مزانشیمی مغز استخوان رت در شرایط آزمایشگاهی و پس از تمایز آنها به استئوبلاست می‌پردازد. این مطالعه مقایسه‌ای می‌تواند اطلاعات قابل ملاحظه‌ای برای محققین و دانشجویانی که برای اولین بار درصدد انجام

مطالعات تمایزی بر روی سلول‌های مزانشیمی مغز استخوان هستند را فراهم نماید.

مواد و روش‌ها

کشت سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان رت: پس از کسب مجوز از کمیته اخلاق دانشگاه اراک و رعایت اصول اخلاقی، در این مطالعه تجربی موش‌های صحرانی نژاد ویستار به کمک دی‌اتیلن اتر بیهوش شد و استخوان‌های ران و ساق پای آن‌ها جدا و سپس بافت‌های پیوندی اطراف استخوان‌ها به طور کامل پاک گردید. استخوان‌ها در محیط کشت حاوی ۱۵ درصد سرم جنین گاو (FBS) و پنی سیلین-استرپتومایسین به زیر هود لامینار منتقل شد (کلید مواد شیمیایی مورد استفاده در این پژوهش از شرکت سیگما، کشور آلمان خریداری شد مگر در مواردی که ذکر خواهد شد). دو سر استخوان‌های ران و ساق پا با قیچی استریل قطع و سپس مغز استخوان با تزریق محیط کشت بوسیله یک سرنگ توسط تکنیک فلاشینگ خارج و به داخل لوله فالکون هدایت شد. لوله فالکن به مدت ۵ دقیقه در ۱۲۰۰ rpm سانتریفوژ و محیط رویی خارج و رسوب سلولی در یک میلی لیتر محیط تازه معلق گردید. محیط کشت حاوی سلول‌های استخراج شده به یک فلاسک کشت منتقل و در انکوباتور در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد و غلظت ۵ درصد CO₂ نگهداری گردید. بعد از ۲۴ ساعت، محیط رویی که حاوی سلول‌های مرده یا گویچه‌های قرمز بود خارج و سلول‌های چسبیده به کف ظرف کشت توسط PBS⁺ (بافر فسفات نمکی حاوی کلرید کلسیم و کلرید منیزیم) شستشو داده شد و محیط کشت تازه و کامل به آن اضافه گردید. سپس به مدت ۱۴ روز هر سه روز یک بار محیط کشت سلول‌ها به ترتیب فوق تعویض گردید. زمانی که کف فلاسک از سلول پر شد با کمک Trypsin/EDTA سلول‌ها از کف فلاسک جدا و به فلاسک‌های جدید منتقل شدند (اصطلاحاً به آن پاساژ سلولی گفته می‌شود). سلول‌ها بعد از سه مرحله پاساژ برای انجام آزمون‌های بعدی در این تحقیق مورد استفاده قرار گرفتند.

تمایز به استخوان و اندازه گیری میزان معدنی شدن: به منظور تمایز به استخوان، سلول‌ها در مرحله پاساژ سوم با تعداد ۷۰ هزار در چاهک‌های پلیت ۶ خانه در حضور محیط کشت DMEM حاوی ۱۵ درصد FBS و پنی سیلین استرپتومایسین کشت شدند. سپس به سلول‌ها اجازه داده شد تا کف ظرف را پر

سریالی با استفاده از محلول اسید استیک و هیدروکسی آمونیم تهیه و جذب آنها در ۴۰۵ نانومتر توسط اسپکتروفتومتر قرائت گردید. پس از رسم منحنی با استفاده از فرمول $Y=0.179X+0.094$ با $R^2=0.997$ مقادیر نمونه های مجهول محاسبه گردید. در این فرمول Y بیانگر میزان جذب و X بیانگر غلظت بر حسب میکرو مولار می باشد.

سنجش فعالیت متابولیکی: در سنجش متیل تیزول تترازولیوم (MTT) فعالیت متابولیکی سلول ها مورد سنجش قرار می گیرد (۱۰). MTT از نمک های تترازولیوم به رنگ زرد و محلول در آب است که توسط آنزیم های دهیدروناز موجود در میتوکندری احیا شده و به فرم کریستال های فورمازان غیر محلول در سلول های زنده رسوب می نماید. این کریستال ها به رنگ بنفش بوده و میزان تولید کریستال غیر محلول متناسب با فعالیت سلول می باشد، از طرفی سلول هایی که از نظر متابولیکی فعال هستند روند احیای MTT را انجام داده که به عنوان سلول زنده در نظر گرفته می شوند (۱۱). برای انجام این تست سلول ها پس از ۲۱ روز کشت در حضور محیط استئوژنیک دوبار با PBS شستشو داده و به آنها محیط کشت فاقد FBS اضافه شد. سپس به ازای هر ۱۰۰ میکرولیتر محیط کشت ۱۰ میکرو لیتر محلول MTT (۵ میلی گرم بر میلی لیتر) به هر چاهک از پلیت ۶ خانه اضافه و پلیت ها به مدت ۴ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی گراد نگهداری شد. پس از این مدت محیط رویی به آرامی تخلیه و به کریستال های فورمازان حاصل، محلول دی متیل سولفوکسید (DMSO) اضافه و جذب نوری محلول حاصله با دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۵۰۵ نانومتر قرائت شد. لازم به ذکر است که هر آزمایش سه بار تکرار گردید.

بررسی مورفولوژی: پس از ۲۱ روز کشت، مورفولوژی هسته در سلول های استئوژنیک و غیر استئوژنیک با استفاده از رنگ فلورسنت هوخست (۱ میکروگرم بر میلی لیتر) و مورفولوژی سیتوپلاسم با استفاده از رنگ فلورسنت آکریدین اورانژ (۰/۰۱ گرم بر میلی لیتر) بررسی گردید. مطالعه مورفولوژی یک سلول ها با استفاده از میکروسکوپ فلورسنت (Olympus IX70-Japan) انجام و پس از عکسبرداری توسط دوربین دیجیتال، قطر هسته ها به کمک نرم افزار موتیک (MotiC) در هر دو گروه استئوژنیک و غیر استئوژنیک اندازه گیری و مقایسه گردید.

نماینده پس از اطمینان از پر شدن کف ظرف توسط سلول ها، محیط کشت تمایزی حاوی ۵۰ میکروگرم در میلی لیتر آسکوربیک اسید-۲-فسفات، ۱۰ نانومولار دگزامتازون و ۱۰ میلی مولار بتا-گلیسرول فسفات جایگزین شد. کشت تمایزی به مدت ۲۱ روز انجام و هر سه روز یک بار محیط کشت تعویض گردید و در پایان این مدت وقوع تمایز با رنگ آمیزی آلیزارین رد ارزیابی شد. آلیزارین رد یک ترکیب آلی است که به طور اختصاصی ماتریکس معدنی شده را در سلول ها به رنگ قرمز رنگ آمیزی می کند، به طوری که شدت رنگ پذیری بافت با میزان مواد معدنی موجود در ماتریکس آن ارتباط مستقیم دارد. به طور خلاصه و بر اساس روش ارائه شده (۹)، سلول های استئوژنیک ۲ بار با PBS شسته و به مدت ۱۵ دقیقه با فرمالدئید ۱۰ درصد در دمای اتاق فیکس شدند. سپس سلول ها با یک میلی لیتر محلول ۴۰ میلی مولار آلیزارین رد (pH=۴/۱) به مدت ۲۰ دقیقه رنگ آمیزی شدند. بعد از خارج کردن اضافه رنگ از پلیت ۶ خانه و شستشوی آن ها با آب مقطر نمونه ها توسط میکروسکوپ معکوس بررسی و مورد عکسبرداری قرار گرفتند. برای اندازه گیری کمی میزان معدنی شدن بر اساس رنگ آلیزارین، ابتدا چاهک های پلیت ۶ خانه با آب مقطر شسته شدند و سپس ۸۰۰ میکرولیتر اسیداستیک ۱۰ درصد به هر چاهک اضافه و به مدت ۳۰ دقیقه بر روی شیکر قرار گرفت. پس از آن سلول ها از کف پلیت توسط اسکرابر جمع آوری و به همراه اسید استیک به لوله اپندورف منتقل شد. سپس به آرامی ۵۰۰ میکرولیتر روغن معدنی (mineral oil) بر روی سلول های استخراج شده اضافه و به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۸۵ درجه سانتی گراد حرارت داده شد. پس از قرار دادن نمونه به مدت ۵ دقیقه در حمام آب یخ، به مدت ۱۵ دقیقه در ۲۰۰۰۰g سانتریفیوژ گردید. در انتها ۵۰۰ میکرولیتر از مایع رویی اپندورف به لوله دیگری منتقل و به آن ها ۲۰۰ میکرولیتر هیدروکسید آمونیوم ۱۰ درصد اضافه و جذب آن ها به کمک دستگاه اسپکتروفتومتر (PG Instrument Company, England) در طول موج ۴۰۵ نانومتر خوانده شد.

تهیه منحنی استاندارد: محلول ۴۰ میلی مولار الیزارین توسط مخلوطی (به نسبت ۵ به ۲ از اسید استیک ۱۰ درصد و هیدروکسی آمونیوم ۱۰ درصد)، ۲۰ برابر رقیق شد، که بدین ترتیب محلول آلیزارین رد بدست آمده دارای غلظت ۲۰۰۰ میکرو مولار بود. سپس غلظت های ۳۱/۳ تا ۲۰۰۰ میکرو مولار از محلول آلیزارین رد در لوله های جداگانه توسط روش رقیق سازی

سلول استخراج و سپس نمونه‌ها در rpm ۱۲۰۰۰ سانتریفوژ شد. میزان کلسیم در محلول روئی توسط روش ارائه شده توسط کیت شرکت درمان کاو پس از قرائت در طول موج ۵۷۵ نانومتر بصورت میکروگرم در دسی لیتر مشخص گردید.

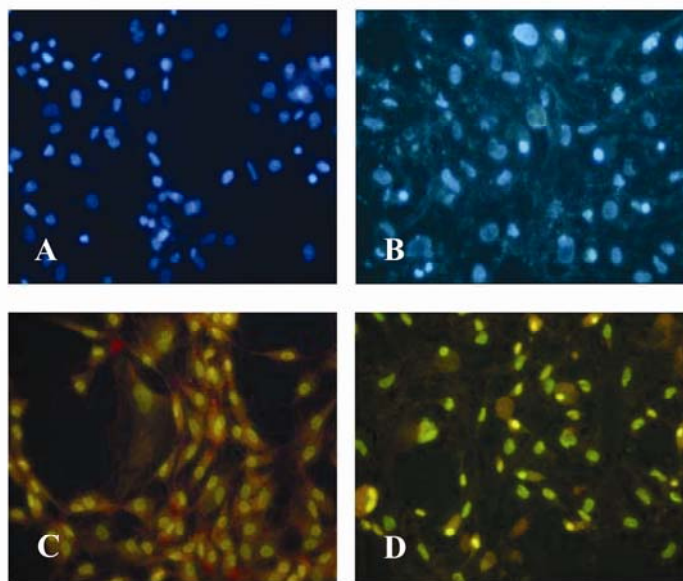
آنالیز آماری: تجزیه و تحلیل آماری با استفاده از نرم افزار SPSS و بر اساس روش آنالیز واریانس یک طرفه و دو طرفه (one and two way ANOVA) با استفاده از تست Tukey انجام و $P < 0.05$ به عنوان سطح معنی داری در نظر گرفته شد.

نتایج

پس از رنگ آمیزی هسته سلول‌ها با رنگ هوخست در پایان کشت ۲۱ روزه، اندازه قطر هسته‌ها در گروه استئوژنیک (سلولهای استئوبلاست) با میانگین 10.05 ± 0.28 میکرومتر و در گروه غیر استئوژنیک (سلولهای مزانشیم) با میانگین 10.01 ± 0.39 میکرومتر تفاوت معنی داری ($P > 0.05$) را نشان نداد (شکل ۱A و ۱B). رنگ آمیزی سیتوپلاسم سلول‌ها با آکریدین اورنژ در پایان دوره کشت نشان داد که سلول‌های غیر استئوژنیک در مقایسه با سلول‌های استئوژنیک دارای زواید قابل تشخیص، سیتوپلاسم چند وجهی و هسته آن‌ها در موقعیت مرکزی بود. در حالی که هسته در سلول‌های استئوژنیک از موقعیت مرکزی خارج و به کناری رانده شده بود و از طرفی سیتوپلاسم نیز از حالت چندوجهی خارج شده و تقریباً گرد به نظر می‌رسید (شکل ۱C و ۱D).

اندازه گیری میزان فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز: فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز با تجزیه پیروفسفات‌ها در محیط *in vitro* قابل اندازه گیری است. سلول‌ها پس از تریپسینه شدن و شستشو، در بافر لیز کننده (0.25 M Tris-HCl, pH: ۷/۵ Triton X-100 قرار داده شد و سپس در rpm ۱۲۰۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ گردید. میزان پروتئین موجود در محلول رویی به کمک روش برادفورد (۱۲) و با استفاده از سرم آلبومین گاوی (BSA) به عنوان استاندارد اندازه گیری شد. فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز در نمونه سلولی لیز شده بر حسب غلظت مساوی از پروتئین در حضور نیتروفیل فسفات به عنوان سوبسترا با استفاده از کیت اندازه گیری آلکالین فسفاتاز ساخت شرکت درمان کاو انجام شد. سپس با افزودن سود ۰/۰۲ نرمال واکنش آنزیم متوقف و میزان جذب در طول موج ۴۱۰ نانومتر اندازه گیری گردید. پس از رسم منحنی استاندارد با استفاده از فرمول $Y=0.004X+0.002$ با $R^2=0.999$ فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز در نمونه‌های مجهول محاسبه گردید. در این فرمول Y بیانگر میزان جذب و X بیانگر فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز بر حسب U/L می باشد.

اندازه گیری میزان کلسیم داخل سلولی: جهت اندازه گیری میزان کلسیم موجود در سلول‌ها پس از شستشوی آنها توسط محلول ایزوتونیک، اوزان مساوی سلولی از نمونه‌های استئوژنیک و غیر استئوژنیک را در یک لوله اپندورف ریخته و سپس یک میلی‌لیتر اسید کلریدریک ۰/۶ نرمال به آن‌ها اضافه شد. پس از ۲۴ ساعت در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد محتوای کلسیم داخل



شکل ۱: بررسی مورفولوژی هسته و سیتوپلاسم توسط رنگ آمیزی فلورسنت- رنگ آمیزی هسته ها در سلول های مزانشیم در محیط غیر استئوژنیک (A) و در محیط استئوژنیک (B) توسط رنگ هوخست. رنگ آمیزی سلول های مزانشیم در محیط غیر استئوژنیک (C) و در محیط استئوژنیک (D) توسط رنگ آکریدین اورنژ (بزرگنمایی $\times 400$).

استئوژنیک قرار داشتند با رنگ آلیزارین رد رنگ نشدند. همچنین نتایج آزمون کمی در جدول ۲ نشان داد که تفاوت آماری معنی داری ($p < 0.05$) در رابطه با میزان جذب رنگ آلیزارین در روزهای ۱۵ و ۲۱ در مقایسه با روزهای ۵ و ۱۰ مشاهده شد. از طرفی با توجه به تغییر ماهیت سلول ها و تمایز آنها، مشاهده شد که محیط کشت در فلاسک های حاوی سلول های تمایز یافته هر روز نیاز به تعویض دارد این در حالی است که تعویض محیط کشت در سلول های مزانشیم (غیر تمایزی) هر ۴ روز یکبار انجام شد.

جدول ۲: مقایسه میانگین میزان جذب نور مرئی در طول موج ۴۰۵ نانومتر بر اساس رنگ آلیزارین (میلی مولار) استخراج شده از نمونه های استئوژنیک در روزهای ۵، ۱۰، ۱۵ و ۲۱.

روز	آلیزارین رد (میلی مولار)
۵	$0.130^a \pm 0.022$
۱۰	$0.404^a \pm 0.025$
۱۵	$16.871^b \pm 0.329$
۲۱	$30.342^c \pm 0.635$

مقادیر به صورت $means \pm sd$ می باشد. میانگین های با کد حرف های متفاوت دارای تفاوت معنی دار می باشد (one way ANOVA, Tukey test, $p < 0.05$).

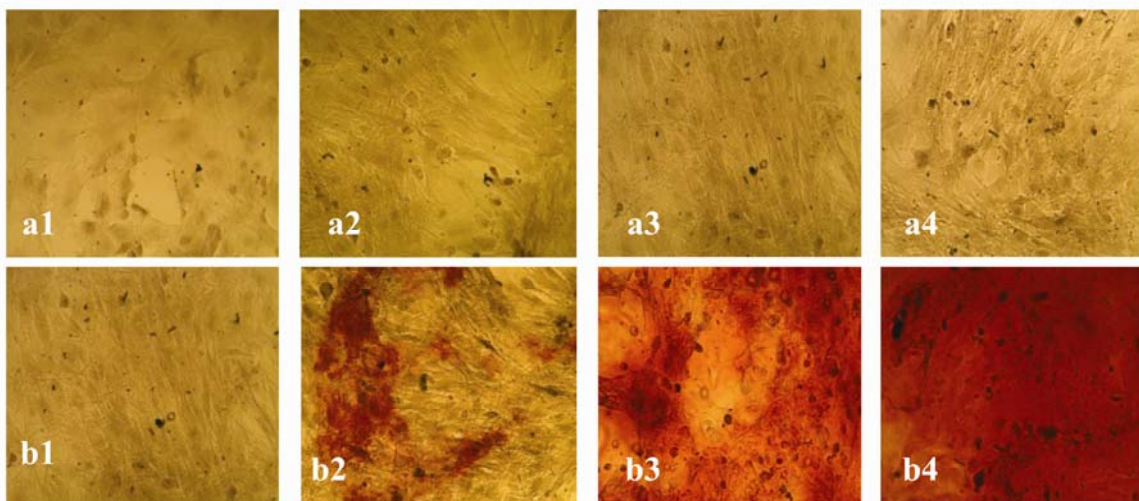
سنجش MTT در روزهای ۵، ۱۰، ۱۵ و ۲۱ از دوره کشت استئوژنیک نشان داد که میانگین میزان جذب در روزهای مختلف تفاوت معنی داری ($p < 0.05$) داشت (جدول ۱). بدین صورت فعالیت متابولیکی سلول ها در طی این دوره رو به رشد بوده و در روز ۲۱ به حداکثر میزان خود رسیده بود.

جدول ۱: مقایسه میانگین میزان جذب MTT (در طول موج ۴۰۵ نانومتر) در نمونه های استئوژنیک در روزهای ۵، ۱۰، ۱۵ و ۲۱.

روز	میزان جذب
۵	$0.352^a \pm 0.020$
۱۰	$0.630^b \pm 0.029$
۱۵	$0.916^c \pm 0.047$
۲۱	$1.635^d \pm 0.078$

مقادیر به صورت $means \pm sd$ می باشد. میانگین های با کد حرف های متفاوت دارای تفاوت معنی دار می باشد (one way ANOVA, Tukey test, $p < 0.05$).

در طی دوره تمایز در روزهای ۵، ۱۰، ۱۵ و ۲۱ وقوع استئوژنز توسط روش رنگ آمیزی آلیزارین رد نشان داد که ترشح ماتریکس معدنی از روز ۱۰ شروع و با افزایش ترشح ماتریکس در روزهای ۱۵ و ۲۱ همراه بود (شکل ۲). در حالی که سلول های گروه کنترل که در معرض محیط DMEM فاقد فاکتورهای



شکل ۲: رنگ آمیزی با آلیزارین رد در نمونه های غیر استئوژنیک و استئوژنیک (رنگ قرمز نشان دهنده رسوب کلسیم در ماتریکس سلول های تمایز یافته می باشد). در نمونه های غیر استئوژنیک (a1 تا a4) هیچگونه معدنی شدن در روزهای ۵، ۱۰، ۱۵ و ۲۰ بر اساس رنگ آمیزی آلیزارین رد مشاهده نشد. در نمونه های استئوژنیک (b1 تا b4) معدنی شدن در روزهای ۱۰، ۱۵ و ۲۰ بر اساس رنگ آمیزی آلیزارین رد مشاهده شد ولی در روز ۵ هیچگونه رنگ قرمزی که نشان دهنده رسوب کلسیم باشد مشاهده نشد (بزرگنمایی $\times 200$).

طرفی آنالیز واریانس یک طرفه نشان دهنده کاهش معنی دار ($p < 0/05$) میزان فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز در سلول های استئوژنیک در روزهای مختلف بود، همچنین این کاهش در سلول های غیر استئوژنیک نیز قابل مشاهده بود (جدول ۳). علاوه بر این آنالیز واریانس دو طرفه نشان دهنده تفاوت آماری معنی داری ($p < 0/001$) در میزان فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز در نمونه های استئوژنیک در مقایسه با نمونه های غیر استئوژنیک بود (جدول ۵).

در نمونه های استئوژنیک میزان کلسیم نیز روند رو به رشدی را داشت به گونه ای که این میزان در روز ۱۰ نسبت به روز ۵ و همچنین روزهای ۱۵ و ۲۱ نسبت به روزهای ۵ و ۱۰ افزایش معنی دار ($p < 0/05$) نشان داد. این در حالی بود که در نمونه های غیر استئوژنیک نیز تفاوت معنی داری بین روزهای ۱۵ و ۲۱ نسبت به روزهای ۵ و ۱۰ مشاهده شد (جدول ۳). آنالیز واریانس دو طرفه نشان داد که میزان افزایش غلظت کلسیم داخل سلولی در سلول های استئوژنیک نسبت به سلول های غیر استئوژنیک در زمان های مشابه بسیار معنی دار ($p < 0/001$) بود (جدول ۴). از

جدول ۳: مقایسه میانگین میزان کلسیم (میکرو گرم بر دسی لیتر) و میزان فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز (U/L) در نمونه های استئوژنیک و غیر استئوژنیک در روزهای ۵، ۱۰، ۱۵ و ۲۱.

روز	میزان کلسیم (میکرو گرم در دسی لیتر) در نمونه های غیر استئوژنیک	میزان کلسیم (میکرو گرم در دسی لیتر) در نمونه های استئوژنیک	میزان فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز (U/L) در نمونه های غیر استئوژنیک	میزان فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز (U/L) در نمونه های استئوژنیک
۵	$0/41 \pm 0/02$	$2/87 \pm 0/01$	$109/9 \pm 2/45$	$153/4 \pm 14/7$
۱۰	$0/47 \pm 0/02$	$23/32 \pm 0/13$	$90/2 \pm 2/8$	$114/9 \pm 3/8$
۱۵	$0/84 \pm 0/03$	$35/52 \pm 0/02$	$52/3 \pm 2/1$	$74/8 \pm 1/9$
۲۱	$0/96 \pm 0/01$	$37/32 \pm 0/01$	$3/4 \pm 0/2$	$63/9 \pm 1/2$

مقادیر به صورت $means \pm sd$ می باشد. میانگین های با کد حرف های متفاوت دارای تفاوت معنی دار می باشد ($p < 0.05$, One way ANOVA, Tukey test).

جدول شماره ۴: مقایسه میانگین فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز (U/L) در نمونه های استئوژنیک و غیر استئوژنیک در روزهای ۵، ۱۰، ۱۵ و ۲۱.

روز	میزان کلسیم (میکرو گرم در دسی لیتر) در نمونه های غیر استئوژنیک	میزان کلسیم (میکرو گرم در دسی لیتر) در نمونه های استئوژنیک	P-Value
۵	$0/41 \pm 0/02$	$2/87 \pm 0/01$	0/001
۱۰	$0/47 \pm 0/02$	$23/32 \pm 0/13$	
۱۵	$0/84 \pm 0/03$	$35/52 \pm 0/02$	
۲۱	$0/96 \pm 0/01$	$37/32 \pm 0/01$	
روز و میزان کلسیم در نمونه ها			0/001

مقادیر به صورت $means \pm sd$ می باشد ($p < 0.05$, Two way ANOVA, Tukey test).

جدول شماره ۵: مقایسه میانگین کلسیم (میکرو گرم بر دسی لیتر) در نمونه های استئوژنیک و غیر استئوژنیک در روزهای ۵، ۱۰، ۱۵ و ۲۱.

روز	میزان فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز (U/L) در نمونه های غیر استئوژنیک	میزان فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز (U/L) در نمونه های استئوژنیک	P-Value
۵	$109/9 \pm 2/45$	$153/4 \pm 14/7$	0/001
۱۰	$90/2 \pm 2/8$	$114/9 \pm 3/8$	
۱۵	$52/3 \pm 2/1$	$74/8 \pm 1/9$	
۲۱	$3/4 \pm 0/2$	$63/9 \pm 1/2$	

بحث

با وجودی که در برخی تحقیقات، پتانسیل تمایز به استخوان سلول‌های بنیادی مزانشیمی به عنوان یک شاخص برای این سلول‌ها مورد مطالعه قرار گرفته است (۱۳)، گزارشی در مورد شکل ظاهری، ویژگی‌های متابولیکی و بیوشیمیایی این سلول‌ها در محیط آزمایشگاه وجود ندارد. اهمیت تمایز به استخوان سلول‌های مزانشیمی از نظر سلول درمانی و پیوند در ضایعات استخوانی بدیهی و مسلم است (۵ و ۱۴). از آن‌جا که روند تمایز سلول‌های مزانشیم مغز استخوان به استئوبلاست در آزمایشگاه‌ها مکرراً انجام می‌شود وجود اطلاعات مورفولوژیک و بیوشیمیایی سلول‌های تمایز یافته امری ضروری است.

در این مطالعه سلول‌های جدا شده از مغز استخوان رت به مدت ۲۱ روز در محیط استئوژنیک قرار گرفت. بررسی ظاهری سلول‌های تمایز یافته با رنگ آمیزی فلورسنت ظهور مورفولوژی متمایز از سلول‌های بنیادی مزانشیمی را از نظر سیتوپلاسم و موقعیت هسته نشان داد که از وقوع تمایز این سلول‌ها حکایت می‌کرد ولی از نظر اندازه هسته تغییر در این سلول‌ها مشاهده نشد. در بسیاری از سلول‌ها و به ویژه سلول‌های جوان، هسته به طور معمول در وسط سلول قرار دارد و وقتی سلول‌ها تمایز می‌یابند، هسته به طرف کناره‌های سلول رانده شده و در محل ویژه‌ای قرار می‌گیرد (۱۵). در این مطالعه در سلول‌های تمایز یافته استئوژنیک، سلول‌ها از حالت چندوجهی به حالت گرد درآمده و موقعیت هسته در سلول‌های بنیادی مزانشیمی از موقعیت مرکزی خارج و به کناری رانده شده بود. تفاوت قابل توجه در وضع ظاهری سلول‌ها در حالت مزانشیمی و تمایز یافته را می‌توان به اختلاف در سازمان اسکلت سلولی در این دو سلول نسبت داد. در سلول‌ها با منشا مزودرمی (میوسیت‌ها، استئوبلاست‌ها، سلول‌های اندوتلیال و ...) تفاوت‌های عملکردی و ساختاری سیتواسکلتون داخلی این سلول‌ها باعث ایجاد تفاوت مورفولوژیک آن‌ها بعد از تمایز سلولی می‌شود (۱۶)، مثلاً وجود دسته‌های ضخیم از رشته‌های اکتین با فیبرهای کششی در سلول‌های بنیادی مزانشیمی که در سرتاسر سیتوپلاسم گسترده شده‌اند از یک طرف و حضور شبکه‌های فشرده و ظریف اکتین‌ها

در استئوبلاست‌ها از طرف دیگر باعث ایجاد تفاوت‌های مورفولوژیک این سلول‌ها از یکدیگر می‌شود (۱۶ و ۱۷).

نتایج این مطالعه نشان داد که طی دوره تیمار استئوژنیک فعالیت متابولیکی سلول‌ها در حال تمایز افزایش یافت که می‌توان این افزایش در فعالیت متابولیکی سلول‌ها را ناشی از سنتز پروتئین دخیل در روند تمایز دانست. در روند تمایز استئوژنیک ۸ گروه پروتئینی شناسایی شده‌اند که بزرگترین دسته پروتئین‌های شناسایی شده در روند تمایز مربوط به متابولیسم سلولی نظیر آنزیم‌های چرخه کربس، متابولیسم آمینو اسیدها، بیوسنتز پروتئین‌ها و گلیکولیز گزارش شده‌اند (۱۸). لذا در این تحقیق افزایش معنی دار متابولیسم بر اساس میزان تولید کریستال بنفش فومازان دور از انتظار نبود.

مثبت شدن رنگ آمیزی آلزارین رد دلیلی بر تشکیل نودول‌های کلسیمی در ماتریکس سلول (۹) و تمایز سلول‌های مزانشیم مغز استخوان به سلول‌های استئوبلاست است (۱۹). نتایج مشاهدات ما نشان داد که تشکیل نودول‌های کلسیمی بعد از روز پنجم شروع می‌شود، بطوری که در روز دهم رنگ قرمز ناشی از رنگ آمیزی نودول‌های تشکیل شده با آلزارین رد مشاهده و از نظر کمی نیز افزایش معنی‌داری را نسبت به روز پنجم نشان داد. همچنین از آنجائی که تشکیل این نودول کلسیم وابسته به حضور کلسیم در داخل سلول است (۲۰) در مطالعه حاضر در روز دهم میزان کلسیم داخل سلولی افزایش قابل ملاحظه‌ای را نسبت به روز پنجم نشان می‌دهد که تایید بر تشکیل نودول‌های کلسیم در روز دهم می‌باشد. از آنجائی که استئوبلاست‌ها نقش عمده‌ای در تشکیل هیدروکسی آپاتیت $[Ca_5(PO_4)_3(OH)]$ دارند (۲۱) لذا حضور فسفات در سلول برای ورود کلسیم به داخل سلول ضروری می‌باشد (۶ و ۲۲). برای حضور کلسیم فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز ضروری است. در مطالعه حاضر فعالیت این آنزیم در سلول روز پنجم در سلول‌های استئوژنیک نسبت به همان روز در سلول‌های غیر استئوژنیک شدیداً افزایش نشان داد. البته عدم تشکیل نودول کلسیم در روز پنجم مغایرتی با فعالیت این آنزیم ندارد بدلیل اینکه فعالیت این آنزیم باعث تجزیه پیروفسفات در سلول شده (۲۳) که متعاقباً ورود کلسیم و تشکیل هیدروکسی آپاتیت را امکان پذیر می‌نماید. در فرایند

3. Baghban Islami Nejad MR, Aghbibi NM, Piriaee A. Study of the bone produced from canine mesenchymal stem cell differentiation Scientific, Journal of Kurdistan University of Medical Sciences. 2007; 12 (3): 8-22. (Abstract in English)
4. Baghban Islami Nejad MR, Jafarian M, Khojasteh A, Mashhadi AF, et al. In vivo Bone Formation by Canine Mesenchymal Stem Cells Loaded onto HA/TCP Scaffolds: Qualitative and Quantitative Analysis, Yakhteh Medical Journal. 2008; 10(3): 205-212.
5. Jabbarpour Bonyadi M, Mahdavi N. Studing the effect of mitogen activated protein kinase inhibitor (MAPKI) on mesenchymal stem cells in vitro, Pharmaceutical Science. 2005; 3: 39-44. (Abstract in English)
6. Hartmann C. A Wnt canon orchestrating osteoblastogenesis, Trends in cell biology. 2006; 16: 151-158.
7. Eslaminejad MB, Nazarian H, Taghiyar L. Mesenchymal stem cell isolation from the removed medium of rat's bone marrow primary culture and their differentiation into skeletal cell lineage, yakhteh medical journal. 2008; 10(1): 65-72.
8. Eslaminejad MB, Talkhabi M, Zeynali B. Effect of Lithium Chloride on Proliferation and Bone Differentiation of Rat Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells in Culture, Iranian Journal of Basic Medical Sciences. 2008; 11(3): 143-151.
9. Gregory CA, Gunn WG, Peister A, Prockop DJ. An Alizarin red-based assay of mineralization by adherent cells in culture: comparison with cetylpyridinium chloride extraction, Analytical Biochemistry. 2004; 329: 77-84.
10. Wyllie, A, Donahue, V, Fischer, B, Hill, D, et al. Apoptosis and Cell Proliferation. 2th Ed. Boehringer Mannheim; 1998.
11. Momeni HR, Soliemani Mehranjani M, Abnosi MH, Nasimi P. Evaluation of viability in adult mouse spinal cord slices by MTT, Iranian Journal of biology. 2010; 23(2): 267-274. (Abstract in English)
12. Bradford MM. Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, Anal. Biochem. 1976; 72: 248-254.
13. Bakhsh D, Song L, Tuan RS. Adult stem cells: characterization, differentiation, and application in cell and gene therapy, Journal of cellular and molecular medicine. 2004; 8: 301-316.
14. Baharvand, H. Differentiation and application of stem cells. 1th Ed. Vol 3. Tehran; khaneh zistshenasi; 2008.

تمایز سلول های مزانشیم به استئوبلاست ژن های مختلفی دخالت دارند که بعضی از آن ها عبارتند از استئوپونین، استئوکلسین، BMP یک و دو، آلكالین فسفاتاز و غیره (۲۲) که البته آلكالین فسفاتاز بعنوان اولین ژنی که در روند تمایز بیان می شود مطرح است (۲۲ و ۲۳). لذا در این تحقیق نیز بیشترین فعالیت این آنزیم در روز پنجم گزارش شده است که به تدریج از فعالیت آن کاسته شده تا به حداقل میزان خود در روز ۲۱ برسد. البته فعالیت این آنزیم در سلول های مزانشیم نیز وابسته به زمان کاهش یافت که با توجه به افزایش میزان کلسیم در روزهای ۱۵ و ۲۱ در سلول های مزانشیم قابل توجیح است. افزایش کلسیم در روزهای ۱۵ و ۲۱ در مقایسه با روزهای ۵ و ۱۰ در سلول های مزانشیم خارج از میزان طبیعی کلسیم (۱۰۰ نانومولار) نیست. ولی در صورتی که میزان فعالیت آنزیم آلكالین فسفاتاز کاهش نیابد (با توجه به نسبت یون های کلسیم به فسفات) میزان کلسیم از غلظت متعارف داخل سلول خارج شده و باعث مرگ سلول می گردد، لذا برای نگهداری غلظت کلسیم داخل سلول کاهش میزان فعالیت آنزیم آلكالین فسفاتاز توجیه پذیر است.

نتیجه گیری

سلول های مزانشیمی مغز استخوان بعد از تمایز به استئوبلاست دچار تغییرات مورفولوژیک از قبیل حذف زائده های سلولی، گرد شدن سلول و تغییر موقعیت هسته در سیتوپلاسم می شوند. علاوه بر آن در این سلول ها تغییرات بیوشیمیایی از قبیل افزایش فعالیت آنزیم آلكالین فسفاتاز، افزایش غلظت کلسیم، رنگ پذیری توسط آلیزارین رد از روز دهم و افزایش متابولیسم سلولی نیز بروز می کند. لذا برای اطمینان از تمایز این سلول ها به استئوبلاست علاوه بر رنگ آمیزی آلیزارین رد می توان از فاکتورها مذکور نیز برای شناسائی استفاده کرد.

منابع

1. Kim SK, Kim BK, Shim JH, Gil JE, et al . Nonylphenol and Octylphenol-induced apoptosis in human embryonic stem cells is related to fas-fas ligand pathway, Toxicological Science. 2006; 94: 310-321.
2. Kermani SH, Karbalaie KH, Madani H, Jahangirnejad AA, et al. Bone marrow-mesenchymal stem cells as a suitable model for assessment of environmental pollution, Journal of Arak University of Medical Sciences. 2008; 11: 117-125.(abstract in English)

17. Melissa L, Knothe T. The Osteocyte, the International Journal of Biochemistry & Cell Biology. 2004; 36(1): 1-8.
18. Zhang AX, Yu WH, Ma BF, Yu XB, et al. Proteomic identification of differently expressed proteins responsible for osteoblast differentiation from human mesenchymal stem cells, Molecular and Cellular Biochemistry. 2007; 304(1-2): 167-179.
19. Zaminy A, Ragerdi Kashani I, Barbarestani M, Hedayatpour A, et al. Melatonin Influences the Proliferative and Differentiative Activity of Rat Adipose-Derived Stem Cells, Yakhteh Medical Journal. 2008; 10(1): 25-32.
20. Dvorak MM, Siddiqua A, Ward DT, Carter DH, et al. Physiological changes in extracellular calcium concentration directly control osteoblast function in the absence of calciotropic hormones. PNAS. 2004; 101(14): 5140-5145.
21. Hesse L, Johnson KA, Anderson HC, Narisawa S, et al. Tissue-nonspecific alkaline phosphatase and plasma cell membrane glycoprotein-1 are central antagonistic regulators of bone mineralization, PNAS. 2002; 99(14): 9445-9449.
22. George R, Beck Jr, Zerler B, Moran E. Phosphate is a specific signal for induction of osteopontin gene expression, PNAS. 2000; 97(15): 8352-8357.
23. Golub Ellis E, Boesze-Battaglia K. The role of alkaline phosphatase in mineralization, Current Opinion in Orthopaedics. 2007; 18(5): 444-448.
15. Majd, A, Shariatzadeh S,M,A. cell and molecular biology. 4th Ed. Tehran; Aeeizh; 2002.
16. Titushkin I, Cho M. Modulation of cellular mechanics during osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells, Biophysical Journal. 2007; 93(10): 3693-3702.

Study of Morphology and Biochemistry of Rat Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells Before and After Osteogenic Differentiation: A Comparative Study

Abnosi MH. Ph.D.^{1*}, Dehdehi L. M.Sc²

1. Department of Biology, Faculty of Sciences, Arak University, Arak 38156-8-8349, Iran

2. M.Sc. Graduated Student, Department of Biology, Arak University

* Email corresponding author: abnosi2002@yahoo.com

Received: 25 Feb. 2012

Accepted: 5 Jun. 2012

Abstract

Aim: The aim of this study was to compare the morphological and biochemical character of mesenchymal stem cells and osteoblasts in vitro.

Material and Methods: After extraction of rat bone marrow mesenchymal stem cells and culturing them till the 3rd passage, these cells were cultured in media containing beta-glycerol phosphate, dexamethasone and ascorbic acid for 21 days. Then morphology of the mesenchymal cells and differentiated one were investigated using Hoechst and acridine orange. In addition the level of matrix deposition, level of calcium, activity of alkaline phosphatase in mesenchymal cells and differentiated on as well as metabolic activity of osteoblasts with the help of MTT was determined.

Results: Morphological study showed delocalization of nuclei and roundness of cytoplasm in differentiated cells as compared to mesenchymal stem cells. In addition mineralization of the matrix started from the 10th day and reached the maximum level at the 21st day. Also from the day 10 the level of calcium increased significantly ($p < 0.05$) but activity of alkaline phosphatase decreased significantly ($p < 0.05$) in differentiated cells. Where as during the differentiation process the metabolic activity of the cells increased significantly ($p < 0.05$).

Conclusion: In addition to morphological differences, calcium content, alkaline phosphatase activity and metabolic activity of the mesenchymal cells and osteoblasts also differs. Therefore in addition to alizarin red staining these factors also can be used to investigate the differentiation processes in vitro.

Key words: Alkaline phosphatase, Calcium, Differentiation, Mesenchymal stem cells