مطالعه چند مارکر (آنتی ژن) سطح سلولی در پاساژهای متوالی سلول‌های بنیادی مزانشیمی کشت شده از دو نژاد موشی Balb/c و NMRI

محمدرضا باغبان اسلامی نژاد Ph.D.[1*]، صمد ندری M.Sc.[2]، رضا حاجی‌حسینی Ph.D[2]

۱. پژوهشکده رویان، گروه سلول‌های بنیادی

۲. دانشگاه پیام نور، واحد تهران، گروه بیوشیمی

* آدرس مکاتبه: تهران، صندوق‌پستی: ۴۶۴۴-۱۹۳۹۵، پژوهشکده رویان، گروه سلول‌های بنیادی

پست الکترونیک: Email: bagesla@yahoo.com

چکیده

دریافت مقاله: ۸۵/۳/۲۳، پذیرش مقاله: ۸۵/۵/۱۵

هدف: کشت سلول‌های مزانشیمی از دو نژاد موشی NMRI و Balb/c و بررسی بیان ده مارکر (آنتی ژن) سطح سلولی در آنها طی کشت اولیه تا پاساژ سوم

مواد و روش‌ها: ۱۰ سر موش NMRI و BALB/c با سن تقریبی ۶-۸ هفته قربانی شد. مغز استخوان از استخوان‌های فمور و تیبیا خارج، و در فلاسک‌های ۷۵ سانتی‌متری کشت داده شد. دو هفته پس از آغاز کشت، اولین پاساژ صورت گرفت. نیمی از سلول‌ها به فلاسک جدید منتقل و نیمی دیگر به منظور بررسی ده مارکر سطح سلولی، برای فلوسایتومتری آماده شدند. برای این منظور از آنتی‌بادی‌های شاخص سلول‌های رده خون‌ساز و اندوتلیال شامل CD44، c-Kit CD135، Sca-1، Vcam1، CD34، CD45، CD11b، Rthy1.2، CD31 استفاده شد. کشت سلول تا پاساژ سوم ادامه یافت و در هر پاساژ، سلول‌ها با استفاده از فلوسایتومتری بررسی شدند. سلول‌های پاساژ سوم از لحاظ تمایز به استخوان و چربی نیز ارزیابی شدند. در این مطالعه هر آزمایش سه بار تکرار شد.

یافته‌ها: در کشت اولیه، جمعیت سلولی هتروژن بود و سلول‌ها پهن، دوکی و چند وجهی بودند. در پاساژهای بالاتر تعداد سلول‌های دوکی شکل افزایش یافت، به طوری که در پاساژ سوم بیشتر سلول‌ها دوکی شکل بود. سلول‌های پاساژ سوم از نژاد Balb/c اندکی کشیده‌تر از سلول‌های مشابه موش NMRI بود. نتایج فلوسایتومتری نشان داد مارکر CD44 در تمام پاساژها در حد بسیار بالایی (۹۰درصد سلول‌ها) بیان می‌شود اما Thy ۱/۲ در کشت اولیه بیانی نداشت و به تدریج بیان آن افزایش یافت و در پاساژ سوم در حدود نیم تا یک پنجم سلول‌ها این مارکر را بیان کردند. CD31 اصلا بیان نشد و بیان مارکرهای CD135 و CD45 و CD11b در طی پاساژها به تدریج کاهش و بیان CD34، Sca-1 و c-Kit اندکی افزایش یافت. دو نژاد موش از لحاظ بیان برخی از مارکرها اختلاف داشتند. به طوری که VCAM در موش Balb/c بیان نشد و از نظر الگوی بیان برخی مارکرها از جمله Sca1 و Thy1 در پاساژهای مختلف نیز تفاوت‌هایی بین آنها بر قرار بود. سلول‌های پاساژ سوم از هر دو نژاد موشی به راحتی به استخوان و چربی تمایز یافتند که نشان‌گر ماهیت مزانشیمی آنها بود.

نتیجه‌گیری: در مجموع، این مطالعه نشان داد علی‌رغم اینکه کشت سلول‌های مزانشیمی به تدریج از کشت اولیه تا پاساژ سوم، از لحاظ مورفولوژی، به سمت هموژن شدن پیش می‌رود، اما از لحاظ بیان مارکرهای سطحی سلول، این اتفاق نمی‌افتد و دو نژاد موشی تا حدودی از لحاظ مورفولوژی و برخی مارکرهای سطحی تفاوت دارند.

کلیدواژگان: سلول بنیادی مزانشیمی، موش NMRI و Balb/c، فلوسایتومتری، مارکرهای سطحی

فصلنامه پزشکی یاخته، سال هشتم، شماره ۲، تابستان ۸۵، صفحات ۱۲۳-۱۱۴

مقدمه

تحقیقات نشان داده است که استرومای مغز استخوان نه تنها نقش یک داربست را برای سلول‌های بنیادی خون‌ساز ایفا می‌کند، بلکه بر تکثیر و تمایز سلول‌های خونی نیز تاثیر دارد. همچنین بر اساس مطالعات انجام گرفته، استروما حاوی سلول‌های غیرخون‌ساز با خاصیت خود تجدیدی (Self Renewal) است و توان تمایز به استخوان، غضروف، ماهیچه، تاندون و چربی را نیز داراست (۱، ۲).

اولین جداسازی موفقیت‌آمیز این سلول‌ها از مغز استخوان در حدود ۴۰ سال پیش توسط فریدنستن و همکاران (۳) صورت گرفت. آنها مشاهده کردند که سلول‌های چسبنده موجود در مغز استخوان که مورفولوژی شبیه فیبروبلاست دارند به صورت

Archive of SID

www.SID.ir

کلونی رشد کرده و توانایی تمایز به استخوان دارند (۴) و به همین دلیل، نام واحد تشکیل دهنده کلونی فیبروبلاست (colony Forming Fibroblast-unit) برای این سلول‌ها برگزیده شد.

سلول‌های فیبروبلاستی مغز استخوان طی سال‌ها به تدریج با اسامی دیگری از قبیل سلول‌های داربستی مغز استخوان (Marrow stromal cell)، سلول‌های مزانشیمی (Marrow progenitor cell) و سلول‌های فیبروبلاستی مغز استخوان (Marrow stromal fibroblast) نیز خوانده شده‌اند (۵).

توانایی سلول‌های بنیادی مزانشیمی در تمایز به انواع مختلف سلول‌های بافت پیوندی، آنها را به یک منبع مناسب در استراتژی‌های ترمیم بافتی از قبیل ترمیم موضعی بافت استخوان (۶، ۷)، غضروف (۸) و تاندون (۹) تبدیل کرده است. همچنین تحقیقات پیشین، انعطاف و شکل‌پذیری (plasticity) این سلول‌ها را در تمایز به سلول‌های عصبی، پوششی پوست، ریه، کبد، روده، کلیه و طحال به اثبات رسانده است (۱۰، ۱۱).

جداسازی سلول‌های بنیادی مزانشیمی از مغزاستخوان انسان و برخی گونه‌های جانوری با موفقیت انجام گرفته است (۲۰-۱۲). ولی در مورد موش، به عنوان مدل ارزشمند فیزیولوژیک و پاتولوژیک پستانداران، مطالعه سلول‌های مزانشیمی با مشکلاتی از قبیل آلودگی به سلول‌های غیرمزانشیمی (خون‌ساز، اندوتلیال) و توقف تکثیر سلولی همراه بوده است (۲۱، ۲۲).

یکی از جنبه‌هایی که در ارتباط با سلول مزانشیمی موش تا حد زیادی ناشناخته باقی مانده، شناسایی مارکر (آنتی‌ژن)های سطح سلولی است. در مطالعات پیشین، محققان سلول‌های مزانشیمی را از مغز استخوان موش جدا و پس ازخالص‌سازی آنها با روش‌های مختلف، بیان برخی مارکرهای سطحی را بررسی کرده‌اند (۵، ۲۴-۲۱). اطلاعات موجود حاکی از نبود اتفاق نظر مبنی برمعرفی مارکرهای سطح سلولی است. این در حالی است که مارکرهای سطح سلولی از لحاظ شناسایی و جدا سازی سلول‌ها اهمیت فراوانی دارند.

در تحقیق حاضر، به منظور مطالعه بیشتر مارکرهای سطحی، سلول‌های مغز استخوان از دو نژاد موشی کشت داده شده است و در زمان‌های مختلف، از کشت اولیه تا زمان تخلیص آنها در پاساژ سوم، بیان برخی مارکرهای سطح سلولی با روش فلوسایتومتری مورد مطالعه قرار گرفته است. برای این منظور از یک موش Outbred (NMRI) و یک موش Inbred (Balb/c) استفاده شده است.

مواد و روش‌ها

کشت سلول

موش‌های نژاد NMRI و Balb/c با سن تقریبی ۸-۶ هفته (هر کدام ۱۰ سر) با روش جابه‌جایی مهره‌های گردنی (طبق مصوب کمیتهٔ اخلاق پزشکی پژوهشکده رویان) کشته شدند. استخوان‌های فمور و تیبیا جدا و بافت نرم اطراف آنها پاک شد و داخل محیط DMEM (Dolbeco's modified eagles medium, Gibco; Germany) محتوی ۱۵درصد (Fetal bovine serum; Gibco; Germany), FBS و ۱۰۰ واحد بین‌المللی پنی‌سیلین (Gibco, Germany) و ۱۰۰ واحد بین‌المللی استرپتومایسین (Gibco, Germany) قرار داده شد.

لوله محتوی استخوان‌های فمور و تیبیا داخل هود استریل و بر روی یخ قرار گرفت. سپس دو انتهای استخوان‌ها قطع و با استفاده از سرنگ و سر سوزن شماره۲۲ مغز استخوان از کانال استخوانی خارج شد و پس از یک بار سانتریفیوژ (۲۴۰ گرم به مدت ۵ دقیقه)، سلول‌های حاصل از هر استخوان دراز در داخل یک فلاسک ۷۵ سانتی‌متری کشت داده شد. این سلول‌ها، سلول‌های کشت اولیه نامیده شدند.

محیط مورد استفاده DMEM حاوی ۱۵درصد FCS و آنتی‌بیوتیک‌های پنی‌سیلین و استرپتومایسین (Gibco, Germany) بود. ۷۲ ساعت پس از آغاز کشت، محیط سلول‌ها تعویض شد و دو هفته پس از آغاز کشت، پاساژ اول انجام گرفت. بدین‌ترتیب که با استفاده از Trypsin-EDTA (Gibco, Germany) و scraper سلول‌ها از کف ظرف کنده شده و پس از سانتریفیوژ با لام نئوبار شمارش شد. درصد سلول‌های کنده شده از کف ظرف به وسیله رنگ‌آمیزی تریپان بلو تعیین شد. سلول‌ها به دو بخش تقسیم شدند. یک بخش برای آنالیز (Fluorescence activated cell sorting: FACS) و بخش دیگر به منظور کشت به ظرف کشت جدید منتقل شدند. سلول‌های هر رده موشی (NMRI و Balb/c) تا پاساژ سه کشت شدند و در هر پاساژ و در مرحله confluency از لحاظ بیان بر خی مارکر سطحی مورد بررسی قرار گرفتند. همچنین سلول‌های پاساژ سوم از لحاظ پتانسیل تمایز به استخوان و چربی به عنوان شاخص سلول مزانشیمی بررسی شدند.

آماده‌سازی سلول‌ها برای فلوسایتومتری

برای انجام آنالیز FACS، تعداد ۲۰۰۰۰۰ سلول در لوله‌های فالکون ریخته و به هر کدام ۱۰۰میکرون سرم رت ۳ درصد اضافه و به مدت ۳۰ دقیقه روی یخ در یخچال نگهداری شد. سلول‌ها با ۵۰۰ میکرون بافر شستشو با ترکیب یک میلی‌لیتر (Fetal Bovine Serum: FBS) درصد میلی‌لیتر (Phosphate Buffer Solution: PBS) شسته شدند و پس از سانتریفیوژ (۴۰۰ دور به مدت ۱۰ دقیقه) به مدت ۳۰ دقیقه روی یخ و در یخچال با آنتی‌بادی‌های اولیه، CD44، CD135 کونژوگه و مجددا با PE فیکو اریترین (eBioscience) وآنتی‌بادی‌های اولیه، c-Kit، Sca-1، Vcam1، CD34، CD45، CD11b، Thy 1.2، CD31 کونژوگه و با FITC (فلورسنس ایزوتیوسیانات (eBioscience) انکوبه شدند و برای کنترل منفی سلول‌ها با آنتی‌بادی‌های IgG2b، PE-IgG2a، FITC-IgG2a، FITC-IgG2b انکوبه شدند.

در مرحله بعد سلول‌ها پس از شستشو به مدت ۱۰ دقیقه با ۴۰۰دور

Archive of SID
www.SID.ir

سانتریفیوژ شدند. سپس به سلول‌ها بافر فیکس کننده (پارافرم آلدهید ۱درصد و FBS ۱درصد در PBS) اضافه شد و با دستگاه FACS (calibur cytometer Becton Dickenson) و نرم‌افزار WinMDi آنالیز شدند. در این مطالعه هر آزمایش سه بار تکرار و میانه سلولی بیان کننده هر آنتی‌ژن تعیین که به صورت نمودار برای هر نژاد موشی نشان داده شده است (شکل‌های ۲ و ۳).

تمایز به استخوان و چربی

برای اطمینان از ماهیت مزانشیمی سلول‌های مورد بررسی در این مطالعه از تست تمایز به استخوان و چربی استفاده شد. برای این منظور حدود ۱۰۰۰۰۰ سلول پاساژ ۳، در ظروف ۶ خانه‌ای و فلاسک ۲۵ سانتی‌متر مربع حاوی در محیط DMEM حاوی ۱۵درصد سرم گاوی و آنتی‌بیوتیک کشت داده شد. پس از مرحله Confluency محیط سلول‌ها با محیط تمایز به استخوان و چربی جایگزین شد. محیط تمایز به استخوان شامل DMEM محتوی ۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر اسکوربیک اسید ۳-فسفات، ۱۰ نانومولار دگزامتازون و ۱۰ میلی‌مولار بتا-گلیسرول فسفات (Sigma, USA) و محیط تمایز به چربی شامل DMEM حاوی ۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر اسکوربیک ۳-فسفات، ۱۰۰ نانومولار دگزامتازون و ۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر ایندومتاسین (Sigma, USA) بود.

ارزیابی تمایز

در پایان هفته سوم کشت، تمایز سلول‌ها مورد ارزیابی قرار گرفت. برای استخوان از رنگ‌آمیزی آلیزارین رد و برای چربی از اویل رد استفاده شد. همچنین تولید mRNA برخی مارکرهای استخوانی و چربی با روش RT-PCR مورد بررسی قرار گرفت.

رنگ‌آمیزی آلیزارین رد

تک لایه سلولی با PBS شسته و به مدت ۱۰ دقیقه با متانول (Merck; Germany) فیکس شد و سپس رنگ‌آمیزی با محلول رنگی (۱درصد آلیزارین رد در آب آمونیاکی۲۵درصد) (Sigma, USA) به مدت ۲ دقیقه انجام شد. در ادامه سلول‌ها با آب مقطر شسته و پس از خشک شدن با میکروسکوپ مشاهده شد.

رنگ‌آمیزی اویل رد

سلول‌ها به مدت یک ساعت در دمای اتاق با فرمالین ۴درصد فیکس شدند و سپس با الکل ۷۰درصد شسته و به مدت ۱۵-۱۰ دقیقه با محلول ۰/۵ درصد Oil red در ۹۹درصد الکل ایزوپروپانل (Sigma, USA)، رنگ‌آمیزی شد و در انتها محلول رنگی خارج و سه بار با الکل ۷۰درصد شستشو داده و با میکروسکوپ مشاهده شد.

آنالیز RT-PCR

سلول‌ها در روز صفر و ۲۱ تمایز از لحاظ بیان ژن‌های استخوانی نظیر استئوکالسین (OC)، استئوپونتین (OP) و رسپتور هورمون پاراتیروئید (PTH) و ژن‌های چربی از قبیل آدیپسین و لیپوپروتیین لیپاز (LP) مورد ارزیابی قرار گرفتند (جدول ۱).

برای این منظور، RNA سلول‌های مورد نظر با استفاده از RNX-Plus solution (Cinagen,Tehran) و مطابق با پروتکل این شرکت جدا سازی شد. در ادامه با استفاده از محلول DNase I (EN0521; Fermentas) به همراه DNA 10x DNA, Reaction buffer, $MgCl_2$ احتمالی همراه با RNA استخراج شده حذف گردید و سپس فعالیت DNase I با افزودن ۲۵میلی‌متر EDTA متوقف شد. ساخت cDNA در واکنش رونویسی معکوس (RT) با استفاده از کیت Revert Aid H minus first strand cDNA syntesis kit (Fermentas) 2mg RNA استخراج شده در مرحله پیشین و پرایمر ۰/۰۵میکرو گرم oligo(dt)18 انجام شد. در ادامه واکنش PCR با 2.5ul cDNA (AMS^{TM}, cinagen) 1x PCR buffer، $dNTP_s$ ۲۰۰میکرومتر، 1u Tag DNA Polymerase (EP0403; fermentas)، MgCl2 ۱میکرون ۰/۷۵ و ۰/۵ میکرومتر از پرایمرهای ژن‌های اختصاصی بافت استخوان، چربی و بتا-توبولین (در جدول یک نشان داده شده است) در دمای ۹۳درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه، دمای ۹۳درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۵ ثانیه، دمای Annealing به مدت ۴۵ ثانیه، دمای ۷۲درجه سانتی‌گراد به مدت۴۵ ثانیه و در ۳۰ سیکل انجام شد. در پایان محصول PCR درون چاهک‌های ژل ۱/۵درصد آگارز ریخته شد و پس از الکتروفورز با رنگ اتیدیوم بروماید رنگ‌آمیزی و سپس ارزیابی شد.

یافته‌ها

مورفولوژی سلول‌های چسبنده

در کشت اولیه سلول‌های چسبنده مغزاستخوان از موش‌های NMRI و BALB/c، جمعیت سلولی هتروژن بود. در این زمان، سلول‌هایی با مورفولوژی متفاوت از قبیل پهن، دوکی و چندوجهی مشاهده شد. در پاساژهای بالاتر تعداد سلول‌های دوکی شکل بیشتر شد. به طوری که در پاساژ سوم اکثریت سلول‌ها دوکی شکل بود. سلول‌های پاساژ سوم تهیه شده از موش Balb/c اندکی کشیده‌تر از سلول‌های مشابه از موش NMRI بود (شکل ۱).

بیان مارکر در پاساژهای مختلف سلول‌های چسبنده

نتایج مربوط به بیان ده آنتی‌ژن سطحی در سلول‌های چسبنده از موش‌های NMRI و BALB/c به صورت تفکیکی در نمودارهای شکل‌های ۲ و ۳ نشان داده شده است.

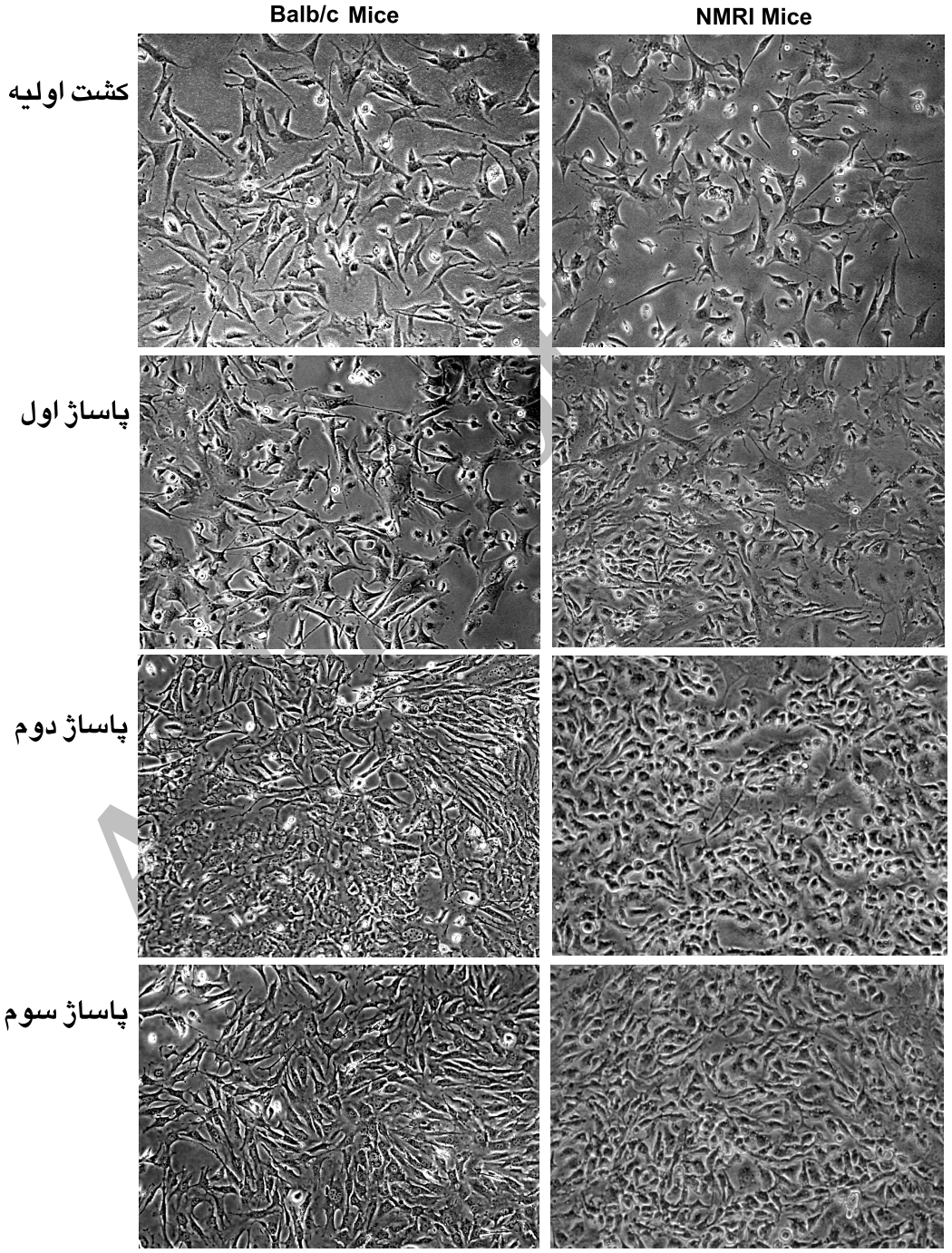
Balb/c

در موش Balb/c مارکر CD44 در تمام پاساژها در حد بسیار بالایی (۹۰درصد سلول‌ها) بیان شد. Thy ۱/۲ در کشت اولیه بیانی نشد و به

Archive of SID

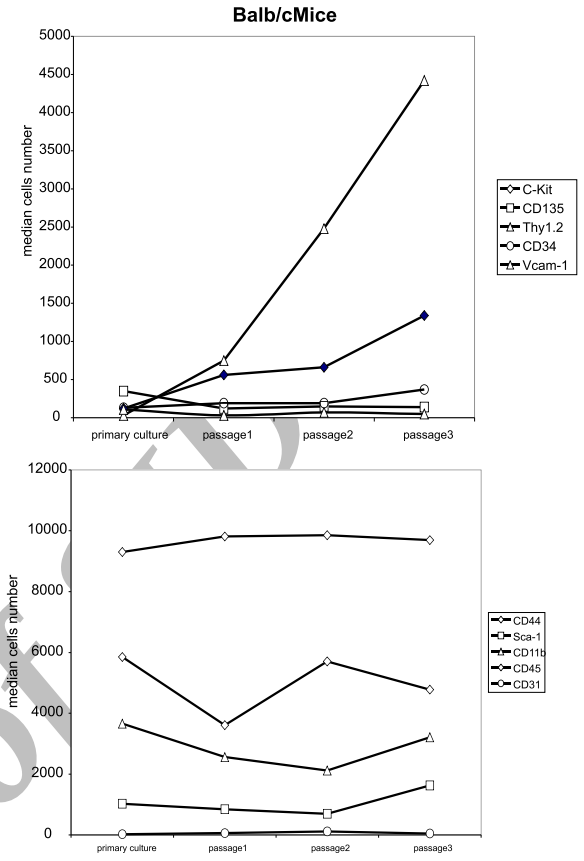
www.SID.ir

تدریج بیان آن افزایش یافت و در پاساژ سوم حدود نیمی از سلول‌ها این مارکر را بیان کردند. مارکر CD45 در تمام مراحل کشت سلول بیان شد. به طوری که در کشت اولیه نیمی از سلول‌ها CD45 مثبت بودند و در مراحل بعدی بیان آن به صورت زیگزاگی اندکی کاهش یافت (در پاساژ سوم حدود یک سوم سلول‌ها آن را بیان کردند). مارکر CD11b در تمام مراحل کشت سلولی در حدود یک سوم سلول‌ها بیان شد. به طوری که در کشت اولیه بیان بالا و در مراحل بعد کشت، روند کاهشی در بیان این مارکر مشاهده شد. مارکر Sca-1 در تمام مراحل کشت بیان کمی داشت (حدود ۱۰درصد سلول‌ها). مارکرهای Vcam-1، CD31 در هیچ یک از مراحل کشت بیان نشد. بیان مارکر CD135 در تعداد کمی سلول و فقط در کشت اولیه مشاهده شد. مارکرهای c-Kit، CD34 در کشت اولیه بیان نشدند اما در مراحل بعد در تعداد کمی از سلول‌ها بیان شدند.

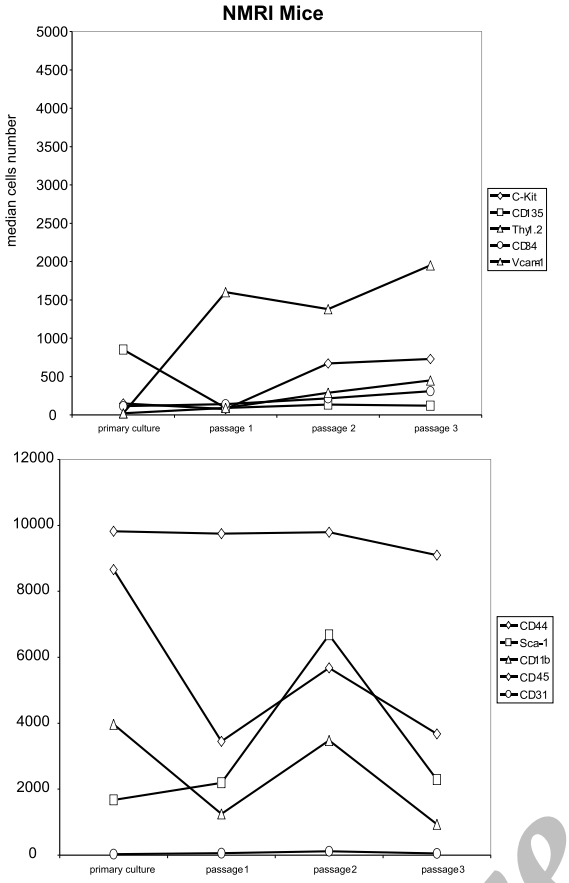


شکل ۱: مورفولوژی سلول‌های چسبنده مغز استخوان از موش‌های Balb/c و NMRI: از کشت اولیه تا پاساژ سوم جمعیت سلول‌های دوکی شکل بر کشت غالب می‌شود (میکروسکوپ فاز کنتراست معکوس، بزرگنمایی ۱۰۰).

www.SID.ir



شکل ۲: منحنی تغییرات در بیان برخی مارکرهای سطحی در کشت سلولهای چسبنده مغز استخوان موش Balb/c در طی کشت اولیه تا پاساژسوم.



شکل ۳: منحنی تغییرات در بیان برخی مارکرهای سطحی در کشت سلولهای چسبنده مغز استخوان موش NMRI در طی کشت اولیه پاساژ صفر تا پاساژسوم.

NMRI

مارکر CD44 در موش NMRI در تمام پاساژها در بیش از ۹۰درصد سلول‌ها بیان شد. Thy ۱/۲ در کشت اولیه بیانی نداشت و به تدریج بیان آن افزایش یافت و در پاساژ سوم حدود یک پنجم سلول‌ها این مارکر را بیان کردند. مارکر CD45 در کشت اولیه در بیش از نیمی از سلول‌ها بیان شد و در طی پاساژها بیان آن به صورت زیگزاگی کاهش یافت. به طوری که در پاساژ سوم کمتر از نیمی از سلول‌ها CD45 مثبت بودند. CD11b نیز در تمام مراحل کشت در کمتر از نیمی از سلول‌ها بیان شد و در پاساژ سوم در مقایسه با کشت اولیه به میزان کمی از بیان آن کاسته شد. مارکر Sca-1 در کشت اولیه در حدود ۱۵درصد سلول‌ها بیان شد و در پاساژ دوم حدود ۵۰ درصد سلول‌ها Sca1 مثبت بودند ود ر پاساژ سوم در حدود ۲۰درصد سلول‌ها بیان شد. مارکر CD31 در هیچ یک از مراحل کشت سلول بیان نشد. مارکر Vcam-1 از پاساژ دوم در تعداد کمی سلول شروع به بیان شدن کرد و میزان بیان آن به میزان کمی سیر صعودی داشت. مارکر CD135 فقط در کشت اولیه در حدود ۱۰درصد سلول‌ها بیان شد. مارکرهای c-Kit، CD34 در کشت اولیه بیانی نداشتند اما در پاساژهای بعدی در کمتر از ۵ درصد سلول‌ها بیان شدند.

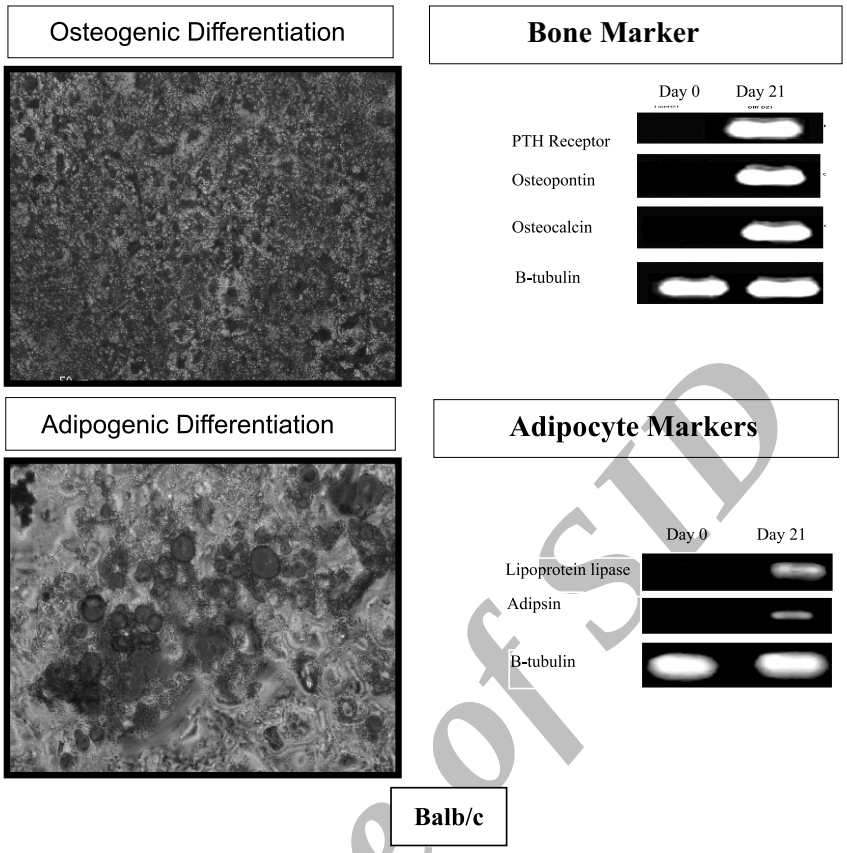
تمایز به استخوان و چربی

سلول‌های پاساژ سوم از هر دو نژاد موشی که به مدت ۳ هفته در محیط استخوان‌ساز قرار گرفته بودند با رنگ‌آمیزی اختصاصی آلیزارین‌رد به رنگ قرمز در آمدند که حاکی از معدنی شدن ماتریکس بود. همچنین بررسی‌های RT-PCR نشان داد که ژن‌های مارکر استخوان (استئوکالسین، استئوپونتین و رسپتور هورمون پاراتیرویید) در سلول‌های تمایز یافته هر دو نژاد موشی به خوبی بیان شده است. سلول‌های تمایز نیافته دو نژاد موشی از این نظر تفاوت داشتند. به طوری که در سلول‌های تمایز نیافته (روز صفر تمایز) موش NMRI بر خلاف Balb/c ژن‌های استیوپونتین و استیوکلسین تا حدی بیان داشتند (شکل‌های ۴ و ۵).

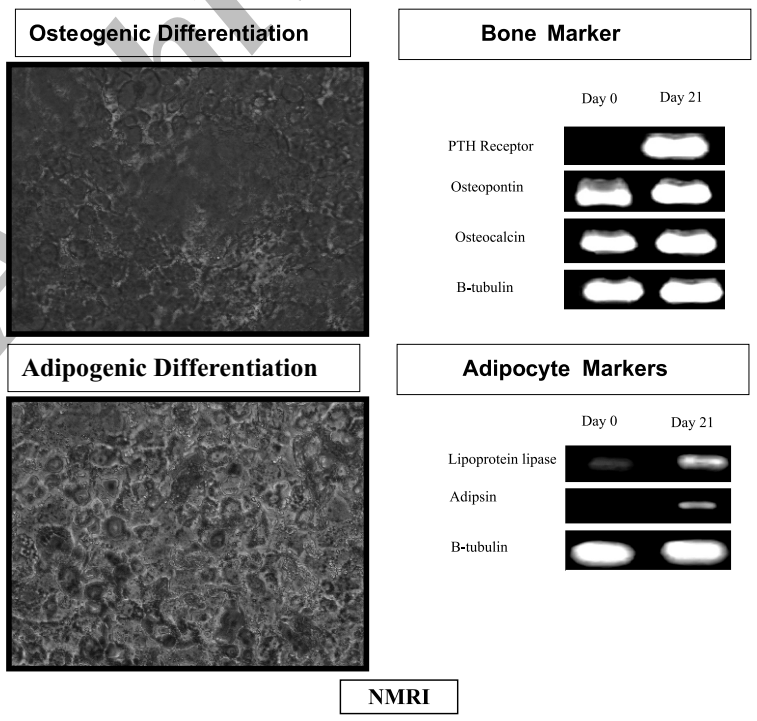
پس از سه هفته تمایز در محیط آدیپوژنیک، رنگ‌آمیزی اویل رد نشان داد، قطرات چربی در سیتوپلاسم سلول‌ها تجمع یافته و آنالیز RT-PCR حاکی از بیان ژن‌های شاخص چربی (ژن‌های آدیپسین و لیپو پروتئین لیپاز) بود. سلول‌های روز صفر تمایز در نژاد NMRI بر خلاف سلول‌های موش Balb/c به مقدار خیلی کمی ژن لیپوپروتیین لیپاز را بیان کردند (شکل‌های ۴ و ۵).

Archive of SID

www.SID.ir



شکل ۴: تمایز سلول های پاساژ سوم از موش Balb/c . ردیف بالا تمایز به استخوان. سلول ها با رنگ آمیزی آلیزارین رد قرمز شده اند. آنالیز RT-PCR نشان دهنده بیان مارکر های استخوان در این سلول هاست. ردیف پایین. در نتیجه رنگ آمیزی اویل رد ، قطرات چربی در سیتو پلاسم سلول ها قرمز شده و آنالیز RT-PCR حاکی از بیان ژن های سلول های چربی است.



شکل۵ : تمایز سلول های پاساژ سوم از موش NMRI به استخوان و چربی با روش رنگ آمیزی اختصاصی و آنالیز RT-PCR نشان داده شده است.

Archive of SID
www.SID.ir

بحث

در مطالعه حاضر ده مارکر سطح سلولی در کشت سلول‌های مغز استخوان دو نژاد موشی، ازآغاز تا زمان ظهور سلول‌های تقریبا یک دست فیبروبلاستی در پاساژ سوم، مورد بررسی قرار گرفت و تغییرات در بیان آنها در پاساژهای مختلف ثبت شد. با توجه به اینکه کشت سلول‌های مورد بررسی در پا ساژ سوم تقریبا به طور کامل مورفولوژی فیبروبلاستی داشت و به راحتی به استخوان و چربی تمایز یافت (این قضیه با رنگ‌آمیزی اختصاصی و بررسی RT-PCR به اثبات رسید)، می‌توان نتیجه گرفت سلول‌های مورد مطالعه مزانشیمی هستند.

جداسازی و تخلیص سلول‌های مزانشیمی موش اهمیت فراوانی دارد. زیرا موش همواره مدل ارزشمند فیزیولوژیک و پاتولوژیک برای بیماری‌های انسان بوده ولی متاسفانه جداسازی سلول‌های مزانشیم آن با مشکلاتی از قبیل آلوده شدن به سلول‌های خونی، اندوتلیال و ماکروفاژ همراه است. یکی از راه‌های جداسازی سلولی استفاده از مارکرهای سطحی آن است. این موضوع در موش به طور دقیق شناسایی نشده است. مطالعه حاضر می‌تواند به شناسایی مارکرهای سطحی موش کمک کند.

مارکرهای مورد مطالعه در تحقیق حاضر c-Kit، VCAM-1، Sca-1، CD34، CD44، CD11b، CD45، CD31، CD135 و Thy1.2 بود. به طور کلی این مارکرها، شاخص سلول‌های رده خون‌ساز و اندوتلیال محسوب می‌شوند و به دو دلیل در تحقیق حاضر انتخاب شدند: اولا، اعتقاد بر این است که سلول پیش‌ساز مزانشیمی، اندوتلیال و خون‌ساز یکی است (۲۵، ۲۶). ثانیا، مطالعات پیشین نشان داده است در کشت سلول‌های مزانشیمی موش سلول‌های غیرمزانشیمی ظاهر و بر کشت غالب می‌شود (۲۱، ۲۲۲، ۲۷-۵). با انجام این مطالعه، بیان مارکرهای فوق در کشت اولیه، پاساژ اول، پاساژ دوم و پاساژ سوم بررسی شد.

در تحقیقات پیشین، سلول‌های مزانشیمی از موش‌های Inbred تا حدودی مورد توجه بوده است (۲۲، ۲۳، ۲۴). اما در مورد موش Outbred گزارشی وجود ندارد. این در حالی است که موش‌های outbred ارزان‌تر بوده و طول عمر زیادی دارند. همچنین، این موش‌ها نسبت به بیماری‌ها مقاوم‌اند و سرعت رشد بالایی دارند و مهم‌تر اینکه موش‌های outbred از لحاظ اندازه، بزرگتر از inbred هستند. این ویژگی‌ها سبب می‌شود که آنها برای تحقیقات مربوط به stem cell therapy مناسب‌تر از موش‌های inbred باشند. مطالعه حاضر به سلول مزانشیمی موش NMRI که نوعی موش outbred محسوب می‌شود نیز پرداخته است.

یافته‌های ما حاکی از وجود برخی تفاوت‌ها میان سلول‌های مزانشیمی دو نژاد موشی مورد مطالعه بود. از لحاظ مورفولوژی، سلول‌های مزانشیمی موش Balb/c اندکی کشیده‌تر از سلول‌های موش NMRI بودند. سلول‌های تمایز نیافته (روز صفر تمایز) موش NMRI بر خلاف موش Balb/c برخی ژن‌های شاخص استخوان (استئوکالسین، استئوپونتین) و چربی (لیپو پروتیین لیپاز) را بیان کردند. از لحاظ بیان برخی مارکرها نیز بین دو نژاد موشی اختلاف وجود داشت. به طوری که VCAM در موش Balb/c بیان نشد. الگوی بیان مارکرهای sca-1 و Thy1 در پاساژهای مختلف دو نژاد موشی نیز تا حدی متفاوت بود. این تفاوت‌ها را می‌توان انعکاسی از تفاوت‌های ژنتیکی دو نژاد موشی فرض کرد.

تحقیقات پیشین نشان داده است که آنتی‌ژن CD11b در مونوسیت‌ها ، گرانولوسیت‌ها، ماکروفاژها و سلول‌های کشنده طبیعی و مارکر CD45 در همه دودمان‌های سلول‌های خونی بیان می‌شود (۲۸، ۲۹). در مطالعه حاضر، در کشت اولیه بیان مارکرهای فوق بالابود و در پاساژهای بعدی به میزان کمی بیان آنها کاهش یافت ولی به صفر نرسید. وجود زیاد سلول‌های خونی، ماکروفاژ، مونوسیت در کشت اولیه سلول‌های مغز استخوان موش گزارش شده است (۲۱، ۲۲، ۲۷-۵). نکته جالب توجه این بود که حتی در پاساژ سوم که سلول‌ها مورفولوژی فیبروبلاستی داشتند نیز مارکرهای فوق تا حدودی بیان شدند.

آنتی‌ژن CD31 به عنوان مارکر اختصاصی سلول‌های اندوتلیال مطرح است (۳۰). در این تحقیق این مارکر در هیچ یک از پاساژها بیان نشد که این یافته بر خلاف یافته‌های محققان پیشین است که حضور سلول‌های اندوتلیال را در کشت سلول‌های مزانشیمی نشان داده‌اند (۲۲، ۳۱، ۳۲).

مارکر Thy1.2 در سلول‌های لنفوسیت T بالغ بیان می‌شود (۳۰). در مطالعه ما این مارکر از پاساژ اول بیان شد و میزان بیان آن در پاساژهای بعدی افزایش یافت و در زمان خلوص سلول‌های مزانشیمی در پاساژ سوم در حدود نیمی از سلول‌های Balb/c و یک پنجم سلول‌های NMRI دارای این مارکر بودند. چون افزایش تعداد سلول‌های Thy1.2 مثبت به موازات افزایش مورفولوژی فیبروبلاستی بوده است مارکر فوق به عنوان یک مارکر مزانشیمی مطرح می‌شود که البته اثبات این فرضیه نیاز به مطالعه بیشتر دارد.

مارکر CD44 در سلول‌های لوکوسیت، اریتروسیت و غیرخون‌ساز بیان می‌شود و گلیکوپروتیینی برای اتصال سلول به اجزای ماتریکس خارج سلولی است (۳۳). این مارکر در تمام پاساژها در حد بسیار بالایی بیان شد که این یافته با توجه به اینکه مطالعه ما روی سلول‌های چسبنده به کف ظرف کشت انجام شده است، دور از تصور نبود.

مارکرهای CD34، Sca1 و c-Kit به عنوان مارکر سلول‌های پروژنیتور خون‌ساز، اندوتلیال و مزانشیمی مطرح هستند (۵، ۲۴، ۳۴، ۳۵، ۳۶). در مطالعه حاضر، در کشت اولیه، تعداد کمی از سلول‌ها این سه مارکر را بیان کردند و با انجام پاساژ تعداد این سلول‌ها به مقدار اندکی افزایش یافت. حضور نسبتا ثابت این سلول‌ها در تمام پاساژهای مورد مطالعه این فرض را در ذهن تقویت می‌کند که کشت سلول مزانشیمی همواره حاوی یک ذخیره کوچک از سلول نابالغ با توان تمایز به سه رده مزانشیمی، اندوتلیال و خون‌ساز است.

مارکر Vcam-1 در دودمان‌های میلوییدی و سلول‌های استرومای مغز استخوان و به مقدار کمی در اندوتلیال نیز بیان شده است (۳۶). این مارکر فقط در پاساژهای بالای موش NMRI بیان شد. بیان نشدن این

Archive of SID

www.SID.ir

مارکر در سلول‌های موش Balb/c می‌تواند به دلیل تفاوت ژنتیکی دو موش باشد. البته ما توضیحی برای این پدیده نداریم. شاید این مارکر در سلول‌های چسبنده یک نژاد خاص موش و تحت تاثیر عوامل القاکننده ناشناخته در کشت که با گذشت زمان اثر خود را اعمال می‌کند بیان می‌شود.

مارکر CD135 در سلول‌های پروژنیتور لنفوسیت B مغز استخوان بزرگ‌سالان و در زیر مجموعه‌ای از سلول‌های میلوییید بیان می‌شود (۳۷). در این مطالعه این مارکر فقط در کشت اولیه مغز استخوان بیان شد. عدم بیان این مارکر در پاساژهای بعدی بیان‌گر تمایز سلول‌های پروژنیتور B و تبدیل آنها به سلول‌های B بالغ است. این فرض با مشاهده سلول‌های شناور در پاساژهای انجام شده تقویت شد. البته دکستر و همکاران نیز به این مورد اشاره داشت که نیاهای لنفوییدی و میلوییدی تا ۲۰ روز در کشت باقی می‌مانند (۳۸). در واقع یافته‌های ما موید آن است که با وجود اینکه کشت سلول‌های مزانشیمی از کشت اولیه تا پاساژ سوم، از لحاظ مورفولوژی به سمت هموژن شدن پیش می‌رود، از لحاظ مارکرهای سطح سلولی اتفاق نمی‌افتد و کشت سلول‌های مزانشیمی همواره حاوی سلول‌هایی با مارکرهای مختلف است. به طوری که در کشت اولیه سلول‌های مزانشیمی سلول‌هایی با مارکر خون‌ساز و اندوتلیال به مقدار کمی حضور دارند. تعداد برخی از این سلول‌ها با بالا رفتن پاساژ سلولی اندکی افزایش می‌یابد و برخی دیگر به صورت زیگزاگی اندکی کاهش می‌یابد ولی تعداد آنها با وجود اینکه در پاساژ سوم مورفولوژی فیبروبلاستی بر جمعیت سلولی حاکم شده است هیچ گاه به صفر نمی‌رسد. در این میان افزایش تدریجی تعداد سلول‌های Thy 1.2 مثبت در طول پاساژها و حضور نسبتا بالای سلول‌هایی با مارکر CD44 در تمامی مراحل کشت جالب توجه است.

تقدیر و تشکر

مطالعه حاضر با حمایت‌های مالی سازمان گسترش و نوسازی صنایع انجام گرفته است که بدین وسیله از مساعدت‌های ایشان تشکر می‌شود.

References

1. Ostendorp RA, Dormer P: VLA-4-mediated interactions between normal human hematopoietic progenitors and stromal cells.Leuk Lymphoma, 1997; 24:423-435

2. Janowska-Wieczorek A, Majka M, Ratajczak J, Ratajczak MZ: Autocrine/paracrine mechanisms in human hematopoiesis. Stem Cells, 2001; 19:99-107

3. Friedenstein AJ, Deriglasora UF, Kulagina NN, et al: Precursors for fibroblasts in different populations of hematopoietic cells as detected by the in vitro colony assay methods. Exp Hematol, 1974; 2: 83-92

4. Friedenstein AJ, Chailakhyan RK, Latsinik NV. Panansyuk AF, Keiliss - Borok IV: Stromal cells responsible for transferring the microenvironment of the hematopoietic tissues. Cloning in vitro and retransplantation in vivo. Transplantation, 1974; 17: 331–340

5. Sun S, Guo Z, Xiao X, Liu B, Liu X, Tang P-H, MAO N: Isolation of mouse marrow mesenchymal progenitors by a novel and reliable methods. Stem cells, 2003; 21: 527-535

6. Bianco P, Riminucci M, Gronthos S, and Robey PG: Bone marrow stromal stem cells: nature, biology, and potential applications. Stem cells, 2001; 19:180-192

7. Richards M, Huibregtse BA, Caplan AI, Goulet JA, Goldstein SA: Marrow-derived progenitors cell injections enhance new bone formation during distraction. J Orthop.Res, 1999; 17:900-908

8. Rohnstone B, Yoo JU: Autologous mesenchymal progenitor cells in articular cartilage repair. Clin Orthop, 1999; 367: 156-162

9. young RG, Butler DL, Weber W, Caplan AI, Gordon SL, Fink DJ: Use of mesenchymal stem cells in a collagen matrix for Achilles tendon repair.J Orthop Res,1998;16:406-413

10. Sugaya K:Potential use of stem cells in neuroreplacement therapies for neurodegenerative diseases. Int Rev Cytol, 2003; 228: 1-30

11. Chapet A, Bertho JM. Bensidhoum A, et al: Mesenchymal stem cells home to injuredtissues when co-infused with hematopoietics cells to treat a radiation- induced multi- organfailure syndrome. J Gene Med, 2003; 5: 1028-1038

12. Schwarz EJ, Alexander GM, Prockop DJ, Azizi SA: Multipotential marrow stromal cells transduced to produced L-DOPA: engrafment in a rat model of parkinson disease. Hum Gene Ther, 1999; 10: 2539-2549

13. Martin DR, Cox NR, Hathcock TL, et al: Isolation and characterization of multipotential mesenchymal stem cells from feline bone marrow. Exp Hematol, 2002; 3: 879-886

14. Kadiyala S, Young RG, Thiede MA, Bruder SP: Culture expanded canine mesenchymal stem cells possess osteochondrogenic potential in vivo and in vitro. Cell Transplant, 1997;6:125-134

15. Devine SM, Bartholomew AM, Mahmud N, et al: Mesenchymal stem cells are capable ofhoming to the

Archive of SID
www.SID.ir

bone marrow of non-human primates following systemic infusion Exp Hematol, 2001; 29: 244-255
16. Wakitani S, Goto T, Pineda SJ, et al: Mesenchymal cell-based repair of large full thicknessdefects of articular cartilage. J Bone Joing Surg, 1994;76: 579-592
17. Ringe J, Kaps C, Schmitt B, Buscher K, et al: Porcine mesenchymal stem cells. Inductionof distinct mesenchymal cell lineages. Cell Tissue Res, 2002; 307: 321-327
18. Mosca JD, Hendricks JK, Buyaner D, et al: Mesenchymal stem cells as vehickes for genedelivery. Clin Orthop, 2000; 379: 71-90.
19. Jessop HL, Noble BS, Cryer A: The differentiation of a potential mesenchymal stem cells population within ovine bone marrow. Biochem Soc Trans, 1994; 22: 248
20. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglase R, Mosca JD, Mosca MA, Moorman DW, Simonetti S, et al: Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. Science ,1999; 284:143-147
21. Meirelles LDS, Nardi NB: Murine marrow derived mesenchymal stem cell: Isolation, invitro expansion, and characterization. Brit J Hemat, 2003; 123: 702-711
22. Phinney DG, Kopen G, Isaacson RL, et al: Plastic adherent stromal cells from the bonemarrow of commonly used strains of inbred mice: variabtions in yield, growth, anddiffentiation. J Cell Biochem, 1999; 72: 570-585
23. Baddoo M, Hill K, Wilkinson R, Gaupp D, Hughes C, Kopen GC, Phinney DG: Characterization of mesenchymal stem cells isolated from murine bone marrow by negative selection. J Cellul Biochem, 2003; 89: 1235-1249
24. Peister A, Mellad JA, Larsen LL, Hall BM, Gibson LF, Prockop DJ: Adult stem cells from bone marrow (MSCs) isolated from different strains of inbred mice vary in surface epitopes, rates of proliferation, and differentiation potential. Blood, 2004; 103: 1662-1668
25. Seshi B , Kumar S, Sellers D:Human bone marrow stromal cell: coexpression of markers specific for multiple mesenchymal cell lineages. Blood Cells Mol Dis,2000; 26:234-246
26. Kinnaird T, Stabile E, Burnett MS, Lee CW , Barr S, Fuchs S, Epstein SE: Marrow-derived stromal cells express genes encoding a broad spectrum of arteriogenic cytokines and promote in vitro and in vivo arterogenesis through paracrine mechanisms. Circ Res, 2004; 94: 678-685
27. Trople P, Noel D, Platet N, Legrand P, et al: Isolation and characterization of mesenchymal stem cells from adult mouse bone marrow. Exp Cell Res, 2004; 295:395-406
28. Springer T, Galfre G, Secher DS, Milstein C: Monoclonal xenogeneic antibodies to murine cell surface antigens: Identification of novel leukocyte differentiation antigens.
Eur J Immunol, 1978; 8:539-51
29. Ledbetter JA, Herzenberg LA:Xenogeneic monoclonal antibodies to mouse lymphoid differentiation antigens.Immunol Rev, 1979;47:63-90
30. Baldwin HS, Shen HM, Yan HC, DeLisser HM, Chung A, Mickanin C, Trask T, Kirschbaum NE, Newman PJ, Albelda SM, et al: Platelet endothelial cell adhesion molecule-1 (PECAM-1/CD31): alternatively spliced, functionally distinct isoforms expressed during mammalian cardiovascular development. Development, 1994; 120: 2539-53
31. Xu CX, Hendry JH,Testa NG,Allen TD: Stromal colonies from mouse marrow: characterization of cell types, optimization of plating efficiency and its effect on radiosesitivity .J Cell Sci , 1993;61:453-466
32. Wang Q-R, Wolf NS: Dissecting the hematopoietic microenvironment: Clonalisolation and identification of cell types in murine CFU-F colonies by limiting dilution Expt. Hematol, 1990; 18: 355-359
33. Trowbridge IS, Lesley J, Schulte R, Hyman R, Trotter J: Biochemical characterization and cellular distribution of a polymorphic, murine cell-surface glycoprotein expressed on lymphoid tissues. Immunogenetics, 1982 ;15:299-312
34. Ikuta K, Weissman IL: Evidence that hematopoietic stem cells express mouse c-kit but do not depend on steel factor for their generation.Proc Natl Acad Sci, 1992; 89: 1502-6
35. Osawa M, Hanada K, Hamada H, Nakauchi H: Long-term lymphohematopoietic reconstitution by a single CD34-low/negative hematopoietic stem cell.Science, 1996 ; 273:242-5
36. Kinashi T, St Pierre Y, Springer TA: Expression of glycophosphatidylinositol-anchored and -non-anchored isoforms of vascular cell adhesion molecule

Archive of SID

www.SID.ir

1 in murine stromal and endothelial cells.J Leukoc Biol, 1995 ; 57:168-173
37. Ogawa M, Sugawara S, Kunisada T, Sudo T, Hayashi S, Nishikawa S, Kodama H, Nishikawa S: Flt3/Flk-2 and c-Kit are not essential for the proliferation of B lymphoid progenitor cells in the bone marrow of the adult mouse. Exp Hematol, 1998;26:478-88
38. Dexter TM, Spooncer E, Simmons P, Allen TD:Long-term marrow culture: An overview of techniques and experience. Kroc Found Ser,1984; 18:57-96

Archive of SID

www.SID.ir