

جداسازی، کشت و تعیین هویت سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از بافت سینوویوم زانوی انسان

مهدی کدیور^{۱*}، مریم درویش^۲، M.Sc.^۱، مسعود صالحی مقدم^۳ Ph.D.

۱. انستیتو پاستور ایران، گروه بیوشیمی، تهران، ایران
۲. دانشگاه پیام نور، واحد مشهد، مشهد، ایران

* آدرس نویسنده مسئول: ایران، تهران، صندوق پستی: ۱۳۱۶۴، انستیتو پاستور ایران، گروه بیوشیمی
پست الکترونیک: Email: kadivar@pasteur.ac.ir

دریافت مقاله: ۸۷/۶/۹، پذیرش مقاله: ۸۷/۹/۵

چکیده

*** هدف:** بررسی امکان جداسازی، کشت و تعیین هویت سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از بافت سینوویوم زانوی انسان
*** مواد و روش‌ها:** در این پژوهش ابتدا نمونه‌هایی در حدود ۲۰۰ تا ۳۰۰ میلی‌گرم از بافت سینوویوم بیمارانی گرفته شد که به هر دلیلی تحت عمل جراحی زانو قرار گرفته بودند. پس از طی مراحل هموژنیزه کردن، هضم آنزیمی با کلاژناز D و عبور از فیلتر نایلونی ۷۰ میکرومتری، سلول‌های حاصل کشت داده شد. سلول‌های چسبیده به انتهای فلاسک جهت جداسازی سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از بافت سینوویوم زانو نگه داشته و پاساژ داده شد. هویت سلول‌های جدا شده به کمک مشاهدات مورفولوژیک، تست‌های تمایزی، فلوسایتومتری، بررسی‌های ایمونوسیتوشیمی و RT-PCR مورد تایید قرار گرفت.

*** یافته‌ها:** سلول‌های جدا شده در این تحقیق، از نظر مورفولوژی شبیه به فیروبلاست بوده و از قابلیت تکثیر بالایی برخوردارند. در بررسی‌های فلوسایتومتری و ایمونوسیتوشیمی، وجود آنتی‌ژن‌های اختصاصی CD73 و CD105 مورد تایید گردید. آنالیز ژن توسط RT-PCR و همچنین رنگ آمیزی‌های اختصاصی سلول‌های القا شده به سمت استئوسیت و آدیپوسیت حاکی از توانایی سلول‌های جدا شده در تمایز به سمت رده‌های یاد شده بود.

*** نتیجه‌گیری:** در مجموع به نظر می‌رسد بافت سینوویوم که در بیشتر عمل جراحی زانو، قسمتی از آن کنده و دور ریخته می‌شود، می‌تواند به عنوان منبعی غنی از سلول‌های بنیادی مزانشیمی جهت استفاده در پروتکل‌های سلول درمانی و نیز مهندسی بافت مورد نظر قرار گیرد.

*** کلیدواژگان:** بنیادی مزانشیمی، بافت، سینوویوم، زانو

فصلنامه پزشکی یاخته، سال یازدهم، شماره ۲، تابستان ۸۸، صفحات: ۱۶۷-۱۶۰

مقدمه

حد اقل ذکر شده در بالا هستند اما نکته قابل تامل این است که MSCهای جدا شده از بافت‌های مختلف در قدرت تکثیر و تمایز یا حتی پروفایل ژنی با هم متفاوتند که این تفاوت می‌تواند ناشی از اثرات ریز محیط اطراف این سلول‌ها بر آن باشد (۱۳). با توجه به این واقعیات، استفاده از MSCهای جدا شده از بافت‌های مختلف به منظور کاربردهای کلینیکی و غیرکلینیکی متنوع می‌باشد. علاوه بر موارد بیان شده، امری که جذابیت مطالعه و لزوم جداسازی و کار بر روی این سلول‌ها را دو چندان می‌کند، مطالعه‌ای است که اخیراً توسط عده‌ایی از محققین بر روی سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از چندین بافت مختلف در رت انجام شده است (۱۴). نتیجه این مطالعه مشخص می‌کند که قدرت تکثیر سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از بافت سینوویوم، نسبت به سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از مغز استخوان، پریوستوم، بافت چربی و عضله صد برابر بیشتر است. ضمن اینکه در این مطالعه ثابت شده است که از نظر قدرت تمایز به غضروف و بافت چربی، این رده از سلول‌ها از همه انواع مشابه خود قوی‌تر هستند (۱۴). با این اوصاف به نظر می‌رسد به زودی این سلول‌ها (سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از بافت سینوویوم) در میان انواع دیگر سلول‌های بنیادی مزانشیمی از جایگاه ویژه‌ای برخوردار خواهند شد. با توجه به مطالب فوق در مطالعه حاضر، سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از بافت سینوویوم زانوی انسان را در راستای استفاده‌های احتمال

سلول‌های بنیادی مزانشیمی (Mesenchymal Stem Cells; MSCs) از قدرت تکثیر بالا برخوردار بوده که واجد توانایی تمایز به رده‌های مشتق از نسوج مزانشیمی حتی غیرمزانشیمی می‌باشد. نام سلول‌های بنیادی از آنجا نام گرفت که ابتدا آنها را از نسوج منتسب به بافت‌های مزانشیمی جدا کردند. MSCها از نظر شکل، شبیه به فیروبلاست‌هاست، که از قبل به آنها Fibroblast Colony Forming Unit (CFU-F) گفته می‌شد (۳-۱). کلونی‌های MSC را می‌توان در محیط کشت تا ۳۵ بار پاساژ داد. MSCها به صورت *in vitro* و *in vivo* به انواع سلول‌های بافت همبند و غیرهمبند همچون سلول‌های استئوسیت، کندروسیت، آدیپوسیت، کاردیومیوسیت، نورون و ... تبدیل می‌شوند (۴). در کشت‌های غیر القا شده، MSCها به صورت فیروبلاست‌های دوکی شکل دیده می‌شوند و برخی از آنتی‌ژن‌های اختصاصی CD73 و CD105 را در سطح خود بیان می‌کنند که گاهی به عنوان مارکرهای اختصاصی این سلول‌ها در نظر گرفته می‌شود (۵). گزارش‌های فزاینده‌ای مبنی بر جداسازی این سلول‌ها از بافت‌های گوناگون بزرگسالان مانند مغز استخوان (۶)، بافت چربی (۷)، عضله اسکلتی (۸)، پریوستوم (۹)، لایه اندوتلیال سیاهرگ بند ناف (۱۰-۱۲) و غیره وجود دارد. هر چند تمامی MSCهای جدا شده از بافت‌های مختلف، واجد خصوصیات

نیز به عنوان یکی دیگر از تست‌های تعیین هویت این سلول‌ها استفاده گردید. سلول‌های القا شده به سمت رده‌های مذکور، توسط RT-PCR ژن‌های اختصاصی و نیز رنگ‌آمیزی‌های اختصاصی هر رده مورد آنالیز قرار گرفت.

فلوسایتومتری

جهت انجام فلوسایتومتری، آنتی‌بادی‌های کانژوگه Anti-Human-CD73-FITC در رقت (۱ : ۶۰۰)، Anti-Human-CD105-FITC در رقت (۱ : ۴۰۰)، Anti-Human CD45-FITC در رقت (۱ : ۸۰۰) و آنتی‌بادی Anti-Human CD34-FITC در رقت (۱ : ۲۰۰) که همگی از شرکت Dako تهیه شده بودند، مورد استفاده قرار گرفت. در ضمن به عنوان کنترل منفی ایزوتایپ، از یک آنتی‌بادی غیرمربوط (Anti-Aspergillus Niger Glucose Oxidase) استفاده شد. بدین منظور از سلول‌های جدا شده در پاساژ چهارم استفاده شد. مراحل انجام فلوسایتومتری بدین صورت است که ابتدا سلول‌ها ترپسینه شده با PBS شسته می‌شود آن گاه سلول‌ها در غلظت 5×10^6 cells / 50 μ l در تاریکی به مدت ۴۵ دقیقه و در دمای یخچال با آنتی‌بادی‌های گفته شده در قسمت ۱-۲ انکوبه می‌شوند. پس از اتمام زمان انکوباسیون، سلول‌ها با PBS حاوی BSA ۲ درصد شسته و در محلول پارافمالدئید ۱ درصد در PBS فیکس می‌شوند؛ سپس آنالیز فلوسایتومتری با استفاده از دستگاه (FACSsort, BD) انجام می‌شود. تعداد 10^4 سلول برای Gating و در هر تست مورد شمارش قرار گرفت. لازم به ذکر است که قبل از فلوسایتومتری درصد Viability سلول‌ها به کمک رنگ‌آمیزی با تریپان بلو و شمارش سلول‌ها با لام نئوبار مشخص شد که میزان آن بالای ۹۵ درصد بود. در این رنگ‌آمیزی سلول‌های رنگ گرفته مرده محسوب می‌شوند و درصد سلول‌های زنده از تقسیم تعداد سلول‌های رنگ نگرفته به تعداد کل سلول‌ها ضرب در ۱۰۰ به دست می‌آید (رنگ‌آمیزی نشان داده نشده است).

تست‌های ایمونوسیتوشیمی

ابتدا سلول‌های احاصل از پاساژ چهارم با PBS شست‌وشو داده، سپس به مدت ۱۵ دقیقه در دمای اتاق با محلول پارافمالدئید ۱ درصد در PBS، تثبیت شدند. پس از این مرحله جهت Blocking فضاهای خالی از سلول، فلاسک کشت سلول‌ها چندین بار با PBS و PBS-BSA ۱ درصد شست‌وشو داده شد. سپس سلول‌ها به مدت یک ساعت با آنتی‌بادی‌های اولیه Mouse Anti-Human CD105 و Mouse Anti-Human CD73 در دمای ۴ درجه انکوبه شدند. پس از شست‌وشو با PBS، سلول‌ها با آنتی‌بادی ثانویه Goat Anti-Mouse IgG کونژوگه با HRP انکوبه شدند و در نهایت سوبسترای DAB به سلول‌ها افزوده شد. سلول‌ها به مدت ۵/۰ ساعت در تاریکی با این محلول مجاور گشتند و تغییرات رنگ سلول‌ها در زیر میکروسکوپ مشاهده گردید (همه آنتی‌بادی‌ها از شرکت DAKO تهیه شدند).

تمایز به سمت آدیپوسیت‌ها و رنگ‌آمیزی اختصاصی آنها

محیط تمایز به سمت آدیپوسیت‌ها، شامل DMEM حاوی ۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر آسکوربیک اسید، ۱۰ نانومولار دکزامتازون و ۶۰ میکرومولار ایندومتاسین بود که سلول‌ها به مدت ۲۱ روز تحت القای این محیط قرار گرفتند. جهت ارزیابی تمایز، رنگ‌آمیزی Oil Red O به منظور تشخیص واکوئل‌های چربی انجام شد. برای این رنگ‌آمیزی نیز پس از فیکس کردن سلول‌ها

بعدی در کلینیک و مهندسی، مورد بافت، جداسازی، کشت و تعیین هویت قرار دادیم.

مواد و روش‌ها

تهیه نمونه بافت سینوویوم از بیمار

مطالعه حاضر یک مطالعه تجربی است که مصوب کمیته اخلاق انستیتو پاستور ایران می‌باشد. نمونه‌های گرفته شده در این طرح (n=۵) همگی از بیماران مرد بین سن ۲۰ تا ۴۰ سال تهیه شد که هیچ گونه بیماری سیستمیک و یا متابولیکی نداشتند. قبل از تهیه نمونه‌ها، پرسشنامه و نیز رضایت‌نامه‌ای از بیمارانی که به هر دلیلی قرار بود تحت عمل جراحی زانو به ویژه جراحی لیگامان یا بازسازی ACL (Anterior Cruciate Ligament) قرار گیرند، اخذ می‌شد. سپس در اتاق عمل نمونه‌ای در حدود ۲۰۰ تا ۳۰۰ میلی‌گرم از بافت سینوویوم توسط جراح جدا می‌شد. لازم به ذکر است که در اکثر این جراحی‌ها به طور روتین قسمتی از بافت سینوویوم این بیماران جدا و دور ریخته می‌شود و نمونه‌های مورد استفاده در این مطالعه از نمونه‌هایی که دور ریخته می‌شوند، تامین شد. سپس این نمونه‌ها تحت شرایط استریل و در داخل محیط کشت به آزمایشگاه منتقل شدند.

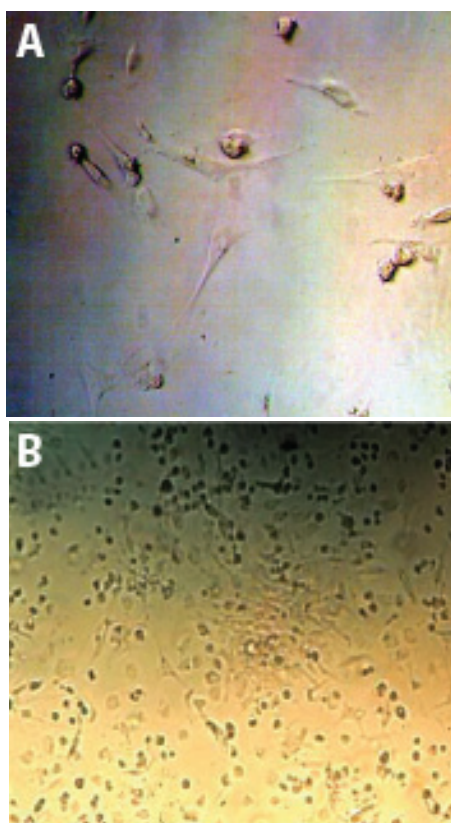
جداسازی و کشت سلولی

نمونه‌های منتقل شده به آزمایشگاه ریز، خرد و هموژن شد و با ۳ میلی‌گرم در میلی‌لیتر کلاژناز D محلول در محیط α -MEM و در دمای ۳۷ درجه به مدت ۳ ساعت جهت هضم، مورد تیمار قرار گرفت. سپس بافت هضم شده از فیلتر نایلونی ۷۰ میکرومتری فیلتر شده و باقی‌مانده‌های بافت دور ریخته شدند. پس از این مرحله، سلول‌های حاصل با PBS شسته شده و سوسپانسیون حاصل سانتریفیوژ شده (به مدت ۴ دقیقه در دور ۱۳۰۰) و سلول‌های رسوب کرده با PBS دوباره شست‌وشو داده شد. در این مرحله سلول‌های هسته‌دار حاصل شمرده و به تعداد 1×10^6 سلول به درون فلاسک‌های کشت سلولی ۲۵ سانتی‌متر مربع ریخته و در محیط DMEM حاوی ۱۰ درصد FBS و ۱۰۰ واحد در میلی‌لیتر پنی‌سیلین (Sigma, USA) و ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر استرپتومایسین (Sigma, USA) در شرایط عادی کشت سلولی (دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و فشار CO_2 ۵ درصد) کشت داده شد. ۲۴ ساعت بعد، سلول‌های چسبیده به ته فلاسک، جهت جداسازی سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از بافت سینوویوم زانو نگه داشته شد و سلول‌های معلق و شناور دور ریخته شدند. به طور مرتب هر سه روز محیط سلول‌ها تعویض شد. پس از هفت روز کلونی‌های سلولی در فلاسک کشت سلولی دیده شده که پس از ترپسینه کردن، جدا و پاساژ داده شدند. پس از این مرحله سلول‌های جدا شده رامی‌توان به کمک روش‌های روتین، فریز و جهت تست یا تحقیقات آینده نگهداری کرد. لازم به ذکر است در کلیه تست‌هایی که از این به بعد بر روی این سلول‌ها صورت گرفت، از پاساژ چهارم آنها استفاده شد.

تعیین هویت سلول‌های خالص شده

پس از کشت و پاساژ سلول‌های جدا شده، جهت تعیین هویت از فلوسایتومتری و رنگ‌آمیزی‌های ایمونوهیستوشیمی توسط آنتی‌بادی‌های اختصاصی CD73 و CD105 استفاده شد و وجود آنتی‌ژن‌های اختصاصی سلول‌های بنیادی مزانشیمی در آنها تایید گردید. در ضمن از قابلیت تمایز سلول‌های جدا شده به سمت آدیپوسیت‌ها و استئوسیت‌ها

جداگانه سلول‌هایی با خصوصیات سلول‌های مزانشیمی بنیادی جدا کنیم. بر اساس مشاهدات روزانه کشت سلولی، ۳ روز پس از کشت اولیه تعداد محدود سلول‌های کشیده با مورفولوژی فیبروبلاست مانند، در میان انواع دیگر سلول‌های جدا شده مشاهده شد (شکل A ۱). در روز هفتم کشت اولیه تعداد سلول‌های دو کی فیبروبلاستی شکل، بیشتر شده و تشکیل کلونی‌هایی منفرد دادند (شکل B ۱).



شکل ۱: مشاهدات مورفولوژیکی سلول‌های جدا شده از بافت سینوویوم زانوی انسان. A. تصویر سلول‌های جدا شده از بافت سینوویوم زانوی انسان در سه روز پس از کشت اولیه (Primary Culture). چنانچه مشاهده می‌شود تعداد کمی سلول‌های فیبروبلاستی شکل قابل مشاهده است (بزرگ‌نمایی $\times 250$). B. تصویر سلول‌های جدا شده فوق در هفتمین روز پس از کشت اولیه. چنانچه مشاهده می‌شود تعداد سلول‌های فیبروبلاستی شکل قابل مشاهده بیشتر شده و بعضی از آنها تشکیل کلونی داده‌اند (بزرگ‌نمایی $\times 100$).

مطابق مورد قبل، سلول‌ها به مدت ۵۰ دقیقه در مجاورت رنگ ۰/۳۶ گرم پودر رنگ Oil-Red-O در ۱۰۰ میلی‌لیتر ایزوپروپانول ۶۰ درصد حل شده و فیلتر می‌گردد) قرار گرفته و آن گاه پس از شست‌وشو، در زیر میکروسکوپ مشاهده شدند.

تمایز به سمت استئوسیت‌ها و رنگ‌آمیزی اختصاصی آنها

محیط تمایز به سمت استئوسیت‌ها شامل DMEM حاوی ۵۰ میکرومولار آسکوربیک اسید، ۱۰۰ نانومولار دگزامتازون و ۱۰ میلی‌مولار بتاگلیسرول فسفات بود که سلول‌ها به مدت ۲۱ روز تحت تاثیر این محیط قرار گرفتند. سپس برای ارزیابی تمایز، رنگ‌آمیزی با آلزارین رد به منظور تشخیص ذخایر کلیمی صورت گرفت. به طور خلاصه برای رنگ‌آمیزی، ابتدا پس از تخلیه محیط رویی، سلول‌ها با PBS شسته و با پارافرمالدئید ۴ درصد به مدت یک ساعت فیکس شدند. سپس رنگ آلزارین رد (۲ گرم پودر آلزارین رد (Sigma, USA) در ۱۰۰ میلی‌لیتر آب حل و فیلتر گردید و pH آن در محدوده ۴/۳-۴/۱ تنظیم شد) به مدت ۳۰ دقیقه بر روی سلول‌ها قرار گرفت و پس از این مدت سلول‌ها با PBS شسته و در زیر میکروسکوپ مشاهده شدند. کلیه مواد مورد استفاده در تمایز و ارزیابی آنها از شرکت (Sigma, USA) تهیه شد.

ارزیابی تمایز سلول‌ها به کمک RT-PCR

جهت بررسی بیان ژن‌های مختص رده‌ای که سلول‌ها به سمت آنها متمایز شدند از RT-PCR استفاده شد. بدین منظور برای ژن‌های ویژه سلول‌های آدیپوسیتی Adipsin و LPL و برای ژن‌های استئوسیتی ALP (آلکالین فسفاتاز) و Osteoprotegerin انتخاب شد. در ضمن از بیان ژن β -actin به عنوان کنترل داخلی استفاده شد. پرایمرهای مربوط به هر کدام از این ژن‌ها مطابق جدول ۱ به کمک برنامه Gene Runner طراحی شد. پس از طراحی پرایمرها، RT-PCR مطابق مراحل زیر انجام شد. استخراج RNA با استفاده از کیت سیناژن صورت گرفت. پس از تعیین میزان RNA مقدار ۲ میکروگرم RNA برای سنتز cDNA با استفاده از کیت مذکور صورت گرفت. در نهایت واکنش PCR با استفاده از پرایمرهای ذکر شده در جدول ۱، به کمک آنزیم Smar Tag سیناژن انجام شد.

یافته‌ها

نتایج جداسازی و مشاهدات مورفولوژی

در این تحقیق توانستیم از کلیه نمونه‌های گرفته شده به طور

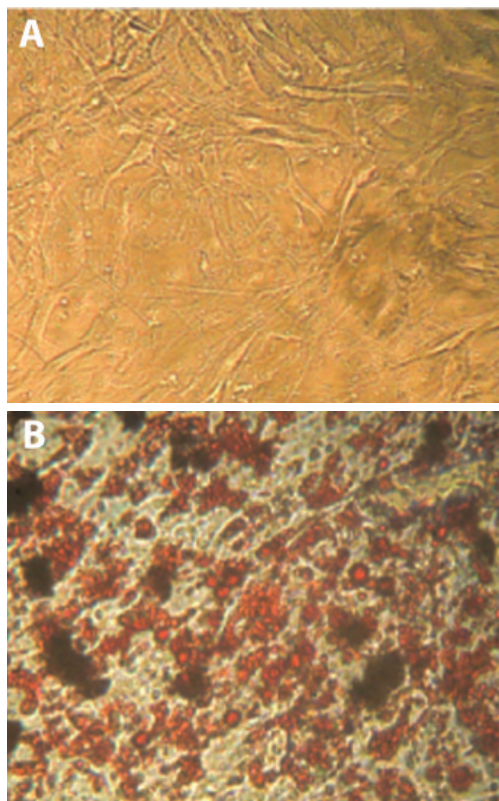
جدول ۱: لیست پرایمرهای مورد استفاده و طول محصول PCR حاصل

Gene	Primer	length
β -Actin	Sense: 5'-TCA TGT TTG AGA CCT TCA A-3' Antisense: 5'-GTC TTT GCG GAT GTC CAC G-3'	512 bp
Adipsin	Sense: 5'-GGT CAC CCA AGC AAC AAA GT-3' Antisense: 5'-CCT CCT GCG TTC AAG TCA TC-3'	271bp
LPL	Sense: 5'-GTC CGT GGC TAC CTG TCA TT-3' Antisense: 5'-AGC CCT TTC TCA AAG GCT TC-3'	717 bp
ALP	Sense: 5'-CTC CTC AGC CTC TGC AAC TG-3' Antisense: 5'-AGG GTC AGG AGA TGA GAC TGG-3'	300 bp
Osteoprotegerin	Sense: 5'-TGC TGT TCC TAC AAA GTT TAC G-3' Antisense: 5'-CTT TGA GTG CTT TAG TGC GTG-3'	435 bp

نتایج تست های تمایزی

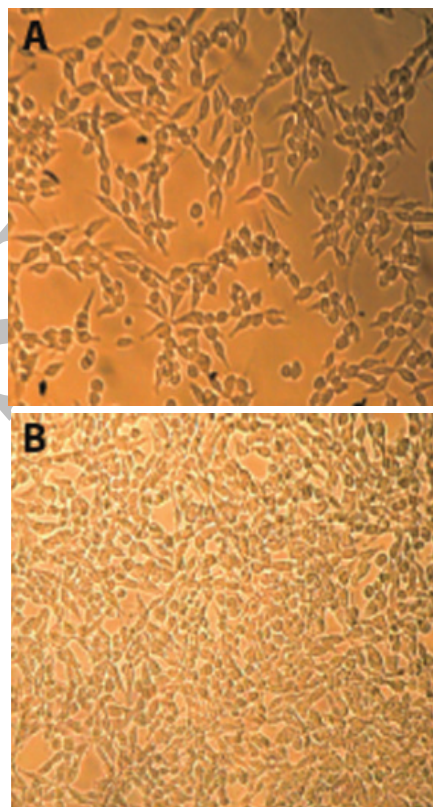
تمایز به آدیپوسیت

سلول های کنترل منفی که به مدت ۲۱ روز در محیط فاقد القا قرار داشتند با این رنگ آمیزی، رنگ نگرفتند (شکل ۳A) و در طی ۲۱ روز کشت سلول ها در محیط القا به سمت آدیپوسیت ها، واکوئل های چربی در سلول ها ظاهر شد که به وسیله رنگ آمیزی Oil-Red-O، رنگ شدند (شکل ۳B).

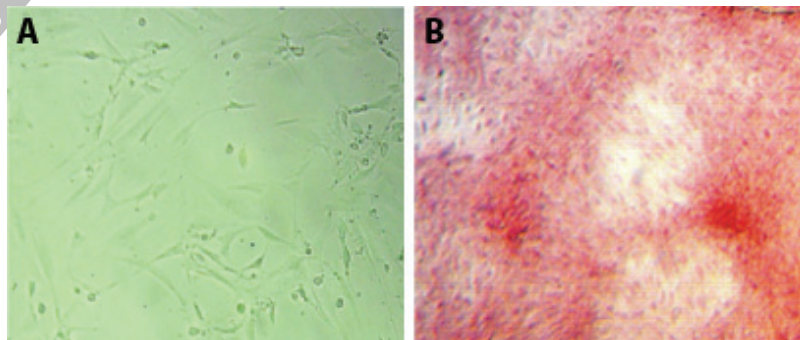


شکل ۳: تمایز سلول های MSC به رده آدیپوسیتی. A. سلول های کنترل منفی که به مدت ۲۱ روز در محیط فاقد القا قرار داشتند. B. سلول های MSC که به مدت ۲۱ روز در معرض محیط تمایز به رده آدیپوسیتی قرار گرفته اند و با اویل رد رنگ آمیزی شده اند (بزرگنمایی ۱۰۰×)

دو روز پس از پاساژ اول ضمن افزایش خلوص، تعداد سلول های دوکی شکل قابل مشاهده، به شدت افزایش داشته و با سرعت به رشد مطلوبی رسیدند (شکل ۲A). پس از گذشت چهار تا پنج روز پس از پاساژ اول، تک لایه ای از سلول های دوکی شکل چسبنده در کف پلیت قابل مشاهده بود (شکل ۲B). پاساژ این سلول ها به منظور ارزیابی پایداری در محیط کشت تا ۱۳ بار انجام شد. این سلول ها، ریخت شناسی فیبروبلاستی خود را در طول کلیه پاساژها حفظ کردند.



شکل ۲: نمایی از سلول های جدا شده و کشت داده شده در پاساژ اول. A. تصویر سلول های جدا شده در روز دوم پس از پاساژ اول. همان طور که پیداست این سلول ها شکل تیپیک و فیبروبلاستی با پاهای کاذب و دوکی شکل خود را به دست آورده اند (بزرگنمایی ۱۰۰×). B. تک لایه سلولی حاصل از به هم پیوستن کلون هادر چهارمین روز بعد از پاساژ اول (بزرگنمایی ۱۰۰×).



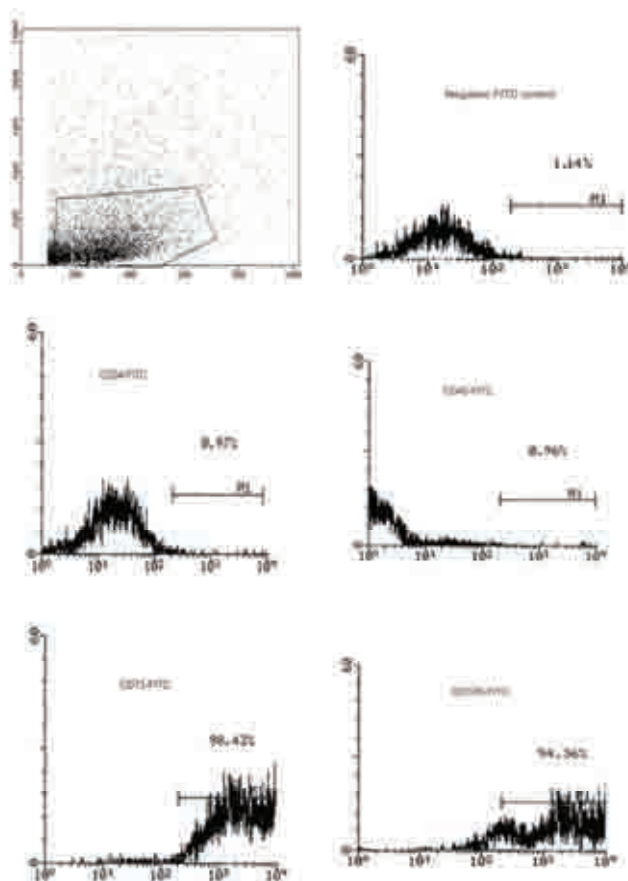
شکل ۴: تمایز سلول های MSC جدا شده از بافت سینه ویوم زانوی انسان به رده استئوسیتی. A. سلول های کنترل منفی که به مدت ۲۱ روز در محیط معمولی فاقد القا قرار داشتند. B. سلول های MSC که به مدت ۲۱ روز در معرض محیط تمایز به رده استئوسیتی قرار گرفته اند و با آلیزارین رد رنگ آمیزی شده اند (بزرگنمایی ۱۰۰×).

نتایج تست‌های فلوسایتومتری

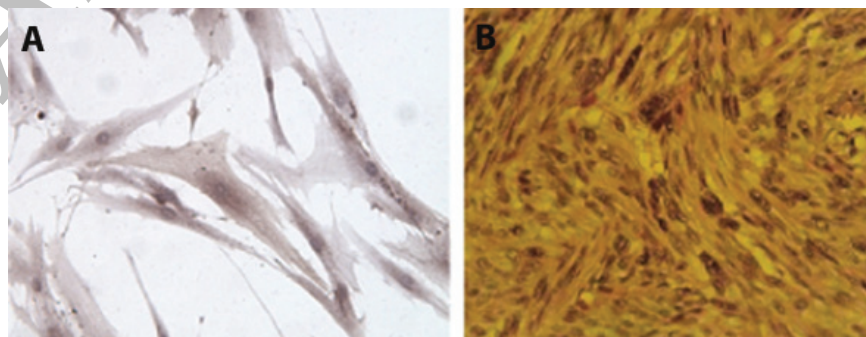
شکل ۵، نمودار فلوسایتومتری هر آنتی‌بادی را به طور جداگانه نشان می‌دهد. بر این اساس میزان بیان مارکرهای هماتوپوئیتیک CD34 و CD45 به ترتیب برابر ۰/۳ و ۰/۴ درصد و میزان بیان مارکرهای CD73 و CD105 به ترتیب برابر ۹۸/۳۶ درصد و ۹۴/۹۸ درصد است.

تمایز به استئوسیت

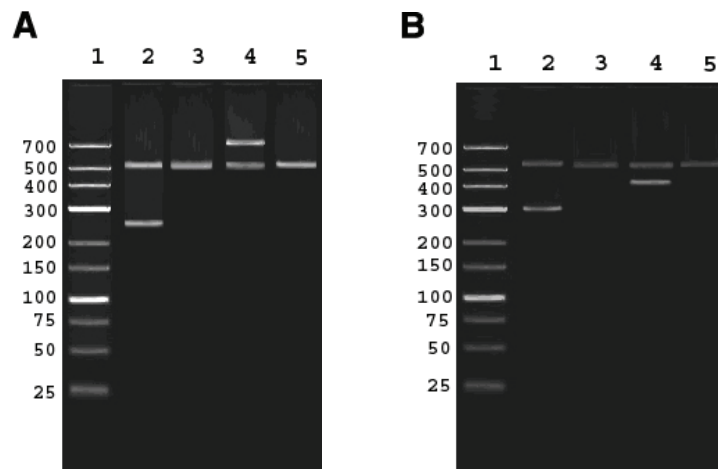
شکل ۴A، کشت کنترل منفی‌ای را - که سلول‌ها در معرض محیط معمولی فاقد مواد القاکننده تمایز به استخوان قرار داشتند - پس از رنگ‌آمیزی با آلزارین رد نشان می‌دهد. شکل ۴B، نیز ۲۱ روز پس از القای استئوسیتی، سلول‌ها را از نظر ترشح ماتریکس معدنی با رنگ‌آمیزی آلزارین رد نشان می‌دهد.



شکل ۵: هیستوگرام‌های فلوسایتومتری نشان دهنده ایمونوفنوتایپ سلول‌های بنیادی مزانشیمی جدا شده از بافت سینوویوم انسان. چنانچه مشخص است این سلول‌ها، آنتی‌ژن‌های CD73 و CD105 را بیان کرده درحالی‌که CD34 و CD45 را بیان نمی‌کنند.



شکل ۶: رنگ‌آمیزی ایمونوسیتوشیمیایی سلول‌های MSC سینوویوم
 A. رنگ‌آمیزی سلول‌های MSC جدا شده از بافت سینوویوم زانوی انسان بر ضد آنتی‌ژن CD73. چنانچه قابل مشاهده است رنگ شدن سلول‌ها نشان دهنده وجود سیگنال مثبت DAB و در نتیجه بیان این مارکر در این سلول‌ها است (بزرگ‌نمایی $\times 400$).
 B. رنگ‌آمیزی سلول‌های جدا شده بر ضد آنتی‌ژن CD105. چنانچه قابل مشاهده است رنگ شدن سلول‌ها در این مورد نیز حاکی از بیان مثبت این مارکر می‌باشد (بزرگ‌نمایی $\times 100$).



شکل ۷: نتایج RT-PCR ژن‌های مختص سلول‌های آدیپوسیتی (A) و استئوسیتی (B). در همه ستون‌ها از بیان ژن β -actin (۵۱۲ جفت باز) به عنوان کنترل داخلی استفاده شده است.
 A. نتایج RT-PCR ژن‌های مختص سلول‌های آدیپوسیتی در سلول‌ها پس از ۲۱ روز القا به این سمت.
 ستون ۱: مارکروزن مولکولی.
 ستون ۲: بیان ژن (۲۱۷ جفت باز) adipin در سلول‌های القا شده به سمت آدیپوسیت.
 ستون ۳: عدم بیان ژن adipin در سلول‌های کنترل القا نشده.
 ستون ۴: بیان ژن (۷۱۷ جفت باز) LPL در سلول‌های القا شده به سمت آدیپوسیت.
 ستون ۵: عدم بیان ژن LPL در سلول‌های کنترل القا نشده.
 B. نتایج RT-PCR ژن‌های مختص سلول‌های استئوسیتی در سلول‌های القا شده به این سمت پس از ۲۱ روز.
 ستون ۱: مارکروزن مولکولی.
 ستون ۲: بیان ژن (۳۰۰ جفت باز) ALP در سلول‌های القا شده به سمت استئوسیت.
 ستون ۳: عدم بیان ژن ALP در سلول‌های کنترل القا نشده.
 ستون ۴: بیان ژن (۴۳۵ جفت باز) Osteoprotegerin در سلول‌های القا شده به سمت استئوسیت.
 ستون ۵: عدم بیان ژن Osteoprotegerin در سلول‌های کنترل القا نشده.

بنیادی مزانشیمی از بافت سینه‌ویوم زانو موفق گشته‌اند (۱۹). وجود چنین سلول‌هایی در بافت سینه‌ویوم باعث شده که در مورد نقش بیولوژیکی آنها در حالت نرمال و در حالت پاتولوژیک مفصل‌ها حدس و گمان‌های مختلفی برانگیخته شود. در این میان عده‌ای اعتقاد دارند به جهت پتانسیل بالای MSCها در ترمیم بافت‌های آسیب دیده، این سلول‌ها در بازسازی مفصل در بیماری آرتروز نقش دارند. به ویژه اینکه در بیماران آرتروزی تعداد این سلول‌ها در مایع سینه‌ویال افزایش قابل توجهی می‌یابد که این پدیده می‌تواند حاکی از نقش ترمیمی آنها در بازسازی غضروف مفصل باشد (۲۰). بر همین اساس توجه محققین به پتانسیل غضروف‌سازی این سلول‌ها معطوف گشته و در همین راستا گروهی از محققین ثابت کرده‌اند که در میان طیفی از سلول‌های بنیادی مزانشیمی، سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از بافت سینه‌ویوم زانو بیشترین پتانسیل غضروف‌سازی را دارا می‌باشند (۲۱).

در این مطالعه با استفاده از روش ذکر شده، سلول‌هایی با خصوصیات شبیه به MSCهای تیپیک همانند سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان، از بافت سینه‌ویوم زانوی انسان جداسازی و کشت داده شد. سلول‌های جدا شده از نظر خصوصیات مورفولوژیکی و مراحل ابتدایی کشت و پاساژ، رفتاری کاملاً شبیه به سلول‌های بنیادی مزانشیمی تیپیک داشتند.

در بررسی ویژگی‌های تمایزی، این سلول‌ها به رده‌های آدیپوسیتی و استئوسیتی سوق داده شدند. بیشتر سلول‌های جدا شده وقتی در معرض القای به سمت آدیپوسیت قرار گرفتند، پس از ۲۱ روز واجد واکنش‌های چربی در سیتوپلاسم خود شدند. این قطرات چربی توسط رنگ آمیزی Oil Red-O مشخص شد. سلول‌های القا نشده چنین

نتایج تست‌های ایمنوسیتوشیمی

شکل ۶: نتایج مربوط به رنگ آمیزی ایمنوسیتوشیمی با CD73 یا SH3 (۶A) و CD105 یا SH2 (۶B) را نشان می‌دهد. چنانچه مشخص است بر اساس این نتایج وجود آنتی‌ژن‌های اختصاصی سلول‌های بنیادی مزانشیمی در این سلول‌ها تایید می‌شود که حاکی از بیان این مارکرها در این دسته از سلول‌ها می‌باشد.

نتایج ارزیابی‌های RT-PCR

همان‌گونه که نتایج RT-PCR نشان می‌دهد (شکل ۷)، بیان ژن‌های مختص آدیپوسیتی (۷A) و استئوسیتی (۷B) در سلول‌های متمایز شده به رده‌های مذکور، حاکی از توانایی سلول‌های جدا شده در تمایز به این رده‌ها می‌باشد.

بحث

ارزش سلول‌های بنیادی مزانشیمی با توجه به خصوصیات منحصر به فرد همچون قدرت تکثیر و تمایز بالای این سلول‌ها، بی‌خطر بودن پیوند آنها و نیز با توجه به سهل‌الوصول بودن و امکان جداساز MSCها از بافت‌های مختلف می‌باشد که اهمیت آن امروزه به دلیل قابلیت بالای تمایز و سازگاری بافتی آنها و امکان استفاده از MSCهای خود بیمار جهت پیوند به خودش به صورت اتوگرافت، بر هیچ کس پوشیده نیست. این سلول‌ها منبعی بی‌بدیل در مطالعه مدل‌های تمایز (۱۵، ۱۶)، سلول درمانی (۱۷)، و مهندسی بافت (۱۸) هستند. به تازگی گروهی از محققین به جداسازی سلول‌هایی با خصوصیات شبیه به سلول‌های

انجام گرفته است، نشان داده شده است که سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از بافت سینوویوم رت از نظر پتانسیل تکثیری ۱۰۰ برابر قوی‌تر از سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از دیگر بافت‌های این حیوان است. ضمن اینکه بیان شده است از نظر قدرت تمایز به سمت آدیپوسیت و کندروسیت، این سلول‌ها از دیگر انواع مشابه، مستعدتر هستند.

نتیجه گیری

هر چند در این تحقیق به مقایسه قدرت تکثیری و تمایزی این سلول‌ها نپرداخته‌ایم اما با توجه به نتایج مورفولوژیکی، تست‌های تمایزی، مطالعات فلوسایتومتری، نتایج ایمونوسیتوشیمی و ارزیابی‌های RT-PCR می‌توان چنین نتیجه‌گیری کرد که به راحتی می‌توان سلول‌های بنیادی مزانشیمی را از بافت سینوویوم انسان جدا کرد تا از آنها به عنوان منبعی مناسب در پروتکل‌های سلول درمانی (Cell Therapy) و مهندسی بافت استفاده کرد.

تقدیر و تشکر

به موجب طرح تحقیقاتی شماره ۳۷۷، این تحقیق در انستیتو پاستور ایران و با تایید کمیته اخلاق آن انجام شد. مولفان این تحقیق از همکاری‌های همه جانبه پرسنل محترم بخش بیوشیمی انستیتو پاستور و نیز بیمارستان سینا به جهت تهیه نمونه‌ها نهایت تشکر را دارند.

References

1. Sukhikh GT, Spivak Nla, Malaitsev VV, Bogdanova IM, Shevchuk VA. Mesenchymal progenitor cell. Biological characteristic and prospects for their use. *Fiziol Zh.* 2007; 53(1): 62-76.
2. Delome B, Chateauvieux S, Charbord P. The concept of mesenchymal stem cells. *Regen Med.* 2006; 1(4): 497-509.
3. Bobis S, Jarocha D, Majka M. Mesenchymal stem cells: characteristics and clinical applications. *Folia Histochem Cytobiol.* 2006; 44(4): 215-230.
4. Benayahu D, Akavia UD, Shur I. Differentiation of bone marrow stroma-derived mesenchymal cells. *Curr Med Chem.* 2007; 14(2): 173-179.
5. Cetrulo CL Jr. Cord-blood mesenchymal stem cells and tissue engineering. *Stem Cell Rev.* 2006; 2(2): 163-168.
6. Prockop DJ. Marrow stromal cells as stem cells for non-hematopoietic tissues. *Science.* 1997; 276(5309): 71-74.
7. Zuk PA, Zhu M, Ashjian P. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Mol Biol Cell.* 2002; 13: 4279-4295.
8. Cao B, Zheng B, Jankowski RJ. Muscle stem cells differentiate into haematopoietic lineage but retain myogenic potential. *Nat Cell Biol.* 2003; 5: 640-646.
9. Fukumoto T, Sperling JW, Sanyal A. Combined effects of insulin like growth factor 1 and transforming factor β 1 on periosteal mesenchymal cells during chondrogenesis in vitro. *Osteoarthritis Cartilage.* 2003; 11: 55-64.
10. Kadivar M, Khatami S, Mortazavi Y, Shokrgozar MA. Multilineage differentiation activity by the human umbilical vein-derived mesenchymal stem cells. *Iranian Biomed J.* 2006; 10(4): 175-184.
11. Kadivar M, Khatami S, Mortazavi Y, Soleimani M, Taghikhani M, Shokrgozar MA. Isolation, culture and characterization of postnatal human umbilical vein-derived mesenchymal stem cells. *DARU.* 2005; 13: 170-176.
12. Kadivar M, Khatami S, Mortazavi Y, Shokrgozar MA, Taghikhani M, Soleimani M. In vitro cardiomyogenic potential of human umbilical vein-derived mesenchymal stem

قطراتی را در سیتوپلاسم خود نداشتند و به طور خود به خودی واجد آنها نیز نگشتند. تحت شرایط استوژنیک پس از ۳ هفته سلول‌های جدا شده به سلول‌هایی متمایز شدند که نتیجه رنگ‌آمیزی آلزارین رد در آنها مثبت بود در حالی که سلول‌های کنترل کشت داده شده در محیط بدون القا کننده، واجد چنین خصوصیتی نشدند.

اگرچه سلول‌های بنیادی مزانشیمی دارای یک مارکر ویژه و اختصاصی نیستند، اما دو نوع آنتی‌بادی که با آنها واکنش می‌دهند و وجود آنها به صورت هم‌زمان برای شناسایی MSCها به کار می‌رود عبارتند از SH2 (یا endoglin) و یا CD105 که یک رسپتور برای TGF-b می‌باشد و به نظر می‌رسد در تمایز این سلول‌ها به سمت سلول‌های غضروفی نقش داشته باشد) و SH3 (و یا 5-terminal nucleotidase و یا CD73). مثبت بودن نتایج فلوسایتومتری و ایمونوسیتوشیمی در هر دو نوع این آنتی‌ژن‌ها حاکی از هویتی شبیه به سلول‌های بنیادی مزانشیمی برای سلول‌های جدا شده بود. ضمن اینکه عدم بیان مارکرهای CD34 و CD45 در این سلول‌ها حاکی از ماهیت هماتوپویتیکی در این سلول‌هاست. ارزیابی بیان ژن‌های مختص رده آدیپوسیتی Adipsin و LPL و نیز ژن‌های مختص رده استوسیتی ALP و Osteoprotegerin در ارزیابی‌های RT-PCR مشخص کرد که سلول‌های جدا شده در این مطالعه توانایی تمایز به رده‌های مذکور را دارا می‌باشند. در مطالعه‌ای که اخیراً توسط یوشیمورا و همکارانش

- cells. *Biochem Biophys Res Comm.* 2006; 340: 639-647.
13. Docheva D, Popov C, Mutschler W, Schieker M. Human mesenchymal stem cells in contact with their environment: surface characteristics and the integrin system. *J Cell Mol Med.* 2007; 11(1): 21-38.
14. Yushimura H, Muneta T, Nimura A, Yokoyama A, Koga H, Sekia I. Comparison of rat mesenchymal stem cells derived from bone marrow, synovium, periosteum, adipose tissue and muscle. *Cell Tissue Res.* 2007; 327: 449-462.
15. Sekia I, Vuoristo JT, Larson BL, Prockop DJ. In vitro cartilage formation by human adult stem cells from bone marrow stroma defines the sequence of cellular and molecular events during chondrogenesis. *Proc Natl Acad Sci.* 2002; 99: 4397-4402.
16. Sekia I, Larson BL, Vuoristo JT, Cui JG, Prockop DJ. Adipogenic differentiation of human adult stem cells from bone marrow stroma (MSCs). *J Bone Miner Res.* 2004; 19: 256-264.
17. Horwitz EM, Prockop DJ, Fitzpatrick LA, Koo WW, Gordon PL, Neel M. Transplantability and therapeutic effects of bone marrow-derived mesenchymal cells in children with osteogenesis imperfecta. *Nat Med.* 1999; 5: 309-313.
18. Wakitani S, Imoto K, Yamamoto T, Saito M. Human autologous culture expanded bone marrow mesenchymal cell transplantation for repair of cartilage defects in osteoarthritic knees. *Osteoarthritis Cartilage.* 2002; 10: 199-206.
19. De Bari C, Dell'Accio F, Tylzanowski P, Luyten FP. Multipotent mesenchymal stem cells from adult human synovial membrane. *Arthritis Rheum.* 2001; 44: 1928-1942.
20. Djouad F, Bony C, Haupl T, Uze J. Transcriptional profiles discriminate bone marrow-derived and synovium-derived mesenchymal stem cells. *Arthritis Res therapy.* 2005; 7(6): R1304-R1315.
21. Sakaguchi Y, Sekiya I, Yagishita K, Muneta T. Comparison of human stem cells derived from various mesenchymal tissues: Superiority of synovium as a cell source. *Arthritis Rheum.* 2005; 52: 2521-2529.

Isolation, Culture and Characterization of Human Synovium-Derived Mesenchymal Stem Cells

Mehdi Kadivar, Ph.D.^{1*}, Maryam Darvish, M.Sc.^{1,2}, Masood Salehi Moghadam, Ph.D.²

1. Biochemistry Department, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran
2. Payam Noor University of Mashhad, Mashhad, Iran

* Corresponding Address: P.O.Box: 13164, Biochemistry Department, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran
Email: Kadivar@pasteur.ac.ir

Received: 30/Aug/2008, Accepted: 25/Nov/2008

Abstract

Objective: It has been demonstrated that mesenchymal stem cells (MSCs), which are isolated from various tissues, have different potential in differentiation and proliferation. For this reason it is necessary to isolate these cells from various sources in order to use them in clinical settings. The present study has been done to investigate the possibility of isolation, culture and characterization of human synovium-derived mesenchymal stem cells.

Materials and Methods: Samples (200-300 mg) were provided from synovium tissue of patients who had knee surgery. Obtained samples were homogenized, enzymatically minced with collagenase D and passed through 70 μ m nylon filters; separated cells were then cultured. Isolated cells were identified by morphological observations, differentiation tests, flow cytometry, immunocytochemistry studies and RT-PCR.

Results: The isolated cells in this study showed fibroblast-like morphology and have a high proliferation capacity. In flow cytometry and immunocytochemical studies, they were positive for CD73 and CD105 antigens. RT-PCR analysis and specific staining for differentiated cells towards osteogenic and adipogenic lineages, showed that isolated cells were potent in differentiation into the mentioned lineages.

Conclusion: These results suggest that synovium tissue, which is discarded in most knee operations, can be used for cell therapy and tissue engineering protocols as an enrichment source of potent mesenchymal stem cells.

Keywords: Mesenchymal Stem Cells, Knee, Synovium, Tissue

Yakhteh Medical Journal, Vol 11, No 2, Summer 2009, Pages: 160-167