

The Role of Ultraweb Nano-Fibrillar Substrates in the Differentiation of *In Vitro* Mouse Bone Marrow Mesenchymal Stem Cell-Derived Hepatocyte-Like Cells

Abbas Piryaei, Ph.D.¹, Mojtaba Rezazadeh Valojerdi, Ph.D.^{1*},
Mansoureh Shahsavani, B.Sc.², Hossein Baharvand, Ph.D.^{2, 3*},

1. Department of Anatomy, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran
2. Department of Stem Cells and Developmental Biology, Royan Institute for Stem Cell Biology and Technology, ACECR, Tehran, Iran
3. Department of Developmental Biology, University of Science and Culture, Tehran, Iran

* Corresponding Addresses: P.O. Box 14115-111, 1. Department of Anatomy, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

P.O. Box: 19395-4644, Department of Stem Cells and Developmental Biology, Royan Institute for Stem Cell Biology and Technology, ACECR, Tehran, Iran
Emails: mr_valojerdi@modares.ac.ir
baharvand@royaninstitute.org

Received: 8/Aug/2009, Accepted: 2/Jan/2010

Abstract

Objective: To study the impact of ultraweb nano-fibrillar substrates on *in vitro* differentiation of mouse bone marrow-derived mesenchymal stem cells into hepatocyte-like cells.

Materials and Methods: For a duration of up to 36 days, mouse bone marrow mesenchymal stem cells (MSCs) were cultured on an artificial basement membrane containing ultraweb nanofiber (nano⁺) and plates (nano⁻) coated with Matrigel and used growth and differentiating factors for hepatogenic differentiation. Then, to study the impact of nanofibers on hepatocyte differentiation, mRNA expressions for liver-specific genes (CK7, AFP, FOXa2, ALB, CYP1a1, HNF4a) were analyzed using real-time PCR, and ultrastructures of differentiated cells were evaluated using scanning and transmission electron microscope.

Results: Both experimental groups expressed mRNA of liver-specific genes in a time dependent manner. However, mRNA expression trends of liver-specific genes, especially those of FOXa2 and HNF4a, were better in the nano⁺ culture as compared to the nano⁻ culture (p<0.05). Furthermore, the ultrastructures of differentiated cells in the 36 day-old nano⁺ culture were more mature as compared to those of the nano⁻ group.

Conclusion: The results suggest that topographical properties of the extracellular matrices produced by ultraweb nanofibers are effective for the *in vitro* reproduction of more differentiated MSC-derived hepatocyte-like cells.

Keywords: Mesenchymal Stem Cells (MSCs), Differentiation, Hepatocyte, Nanofibers

Yakhteh Medical Journal, Vol 12, No 2, Summer 2010, Pages: 275-286

نقش بستر حاوی نانو رشته‌های درهم بافته بر تمایز سلول‌های شبه هپاتوسیتی مشتق از سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان موش در محیط آزمایشگاهی

عباس پیریایی ^۱ Ph.D.، مجتبی رضازاده ولوجردی ^۱ Ph.D.*، منصوره شاهسونی ^۲ B.Sc.، حسین بهاروند ^۳ Ph.D.*

۱. دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم پزشکی، گروه علوم تشریح، تهران، ایران
 ۲. پژوهشکده رویان، مرکز تحقیقات علوم سلولی جهاد دانشگاهی، گروه سلول‌های بنیادی و زیست‌شناسی تکوینی، تهران، ایران
 ۳. دانشگاه علم و فرهنگ، گروه زیست‌شناسی تکوینی، تهران، ایران

* آدرس نویسندگان مسئول:

ایران، تهران، صندوق پستی: ۱۱۱-۱۴۱۱۵، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم پزشکی، گروه علوم تشریحی
 ایران، تهران، صندوق پستی: ۴۶۴۴-۱۹۳۹۵، پژوهشکده رویان، مرکز تحقیقات علوم سلولی جهاد دانشگاهی،
 گروه سلول‌های بنیادی و زیست‌شناسی تکوینی

پست الکترونیک: mr_valojerdi@modares.ac.ir
baharvand@royaninstitute.org

دریافت مقاله: ۸۸/۵/۱۷، پذیرش مقاله: ۸۸/۱۰/۱۳

مکیده

*** هدف:** مطالعه تاثیر بستر حاوی نانو رشته‌های درهم بافته (Ultraweb Nanofibers) بر تمایز سلول‌های شبه هپاتوسیتی مشتق از سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان موش در محیط آزمایشگاهی

*** مواد و روش‌ها:** سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان موش بر روی غشای پایه مصنوعی حاوی بستر نانو رشته‌ای (گروه نانو مثبت) و پلیت‌هایی (گروه نانو منفی) که هر دو توسط ماتریز پویش داده شده بودند، کشت شده و با استفاده از فاکتورهای رشد و تمایزی به مدت ۳۶ روز به سمت تولید سلول‌های شبه هپاتوسیتی القا گردیدند. سپس جهت تعیین نقش نانو، رشته‌ها در روند تمایز هپاتوسیتی، میزان بیان mRNA ژن‌های اختصاصی کبدی (CK 7, AFP, FOXa2, ALB, CYP1a1, HNF4a) توسط روش Real Time-PCR، همچنین فراساختار سلول‌های تمایز یافته توسط میکروسکوپ الکترونی ترانس‌میشن و اسکینینگ مورد بررسی قرار گرفت.

*** یافته‌ها:** در هر دو گروه نانو (مثبت و منفی) ژن‌های اختصاصی کبدی در یک الگوی وابسته به زمان بیان گردیدند. اما روند بیان این ژن‌ها به ویژه FOXa2 و HNF4a در گروه نانو مثبت نسبت به گروه نانو منفی بهتر بود ($P < 0.05$). همچنین فراساختار سلول‌ها در روز ۳۶ تمایز در گروه نانو مثبت بالغ تر از گروه نانو منفی بود.

*** نتیجه‌گیری:** نتایج این تحقیق نشان داد که خصوصیات توپوگرافیک حاصل از نانو رشته‌های درهم بافته موجود در بستر سلولی، در ایجاد سلول‌های شبه هپاتوسیتی مشتق از سلول‌های بنیادی مزانشیمی در محیط آزمایشگاهی نقش موثری دارد.

*** کلیدواژگان:** سلول بنیادی مزانشیمی، تمایز، هپاتوسیت، نانو رشته

فصلنامه پزشکی یاخته، سال دوازدهم، شماره ۲، تابستان ۸۹، صفحات: ۲۸۷-۲۷۵

مقدمه

بر اساس آمارهای سازمان بهداشت جهانی بیش از صدها میلیون نفر در سراسر دنیا مبتلا به بیماری‌های کبدی هستند (۱)، که در حال حاضر در بسیاری موارد پیوند کبد اصلی‌ترین راه درمان آنها است. اما متأسفانه تعداد کم اندام‌های اهدایی، نیاز به سرکوب ایمنی شدید شخص گیرنده و پیچیدگی‌های عمل جراحی آن، این گزینه را نیز محدود ساخته است (۲-۴). امروزه فناوری سلول‌های بنیادی و قابلیت تمایز آنها به انواع سلول‌های بالغ و هم‌چنین استفاده از آنها در درمان بیماری‌ها به طور روز افزونی در حال پیشرفت بوده که امیدواری‌هایی را در جهت ایجاد روش‌های مبتنی بر سلول درمانی (Cell Therapy) به عنوان یک جایگزین مناسب برای پیوند اندام کامل ایجاد نموده است.

علاوه بر کاربرد هپاتوسیت‌های تمایز یافته از سلول‌های بنیادی در درمان بیماری‌های کبدی، استفاده مهم دیگر آنها مطالعه تاثیرات داروهای سنتتیک جدید است (۵). افزایش روزافزون داروهای شیمیایی جدید که برای انواع و اقسام بیماری‌ها تولید می‌شوند و نیاز

به بررسی اثرات آنها به ویژه آثار جانبی مضر احتمالی - که می‌توانند ایجاد نمایند - باعث گردیده تا آزمایشات جدیدی نیز پایه‌ریزی گردد. از آنجا که کبد اندام اصلی برای تغییر شکل مواد شیمیایی و بیولوژیک مختلف است، می‌توان با کشت سلول‌های کبدی در آزمایشگاه و تیمار آنها با این مواد، میزان امنیت داروهای جدید را بررسی نمود. اما همان‌طور که می‌دانیم محدودیت‌هایی برای استفاده از سلول‌های کبدی انسانی سالم وجود دارد (۶، ۷). بنابراین دست‌یابی به یک منبع جایگزین مناسب برای رفع این معضل نیز ضروری است.

در سال‌های اخیر، انواع مختلفی از سلول‌های بنیادی جهت تمایز به سلول‌های کبدی مورد استفاده قرار گرفته است (۸-۱۶). شاید بتوان از بین انواع سلول‌های بنیادی، سلول‌های بنیادی مزانشیمی (Mesenchymal Stem Cells; MSCs) مغز استخوان را بهترین سلول برای تمایز به هپاتوسیت و استفاده از آنها در مطالعات دارویی و همچنین سلول درمانی بیماران مبتلا به آسیب کبدی دانست. زیرا علاوه بر آنکه مطالعات متعددی قابلیت تمایز این سلول‌ها را به هپاتوسیت تایید نموده‌اند، می‌توان از پیوندهای اتولوگ این سلول‌ها برای بیماران

رشد، تکثیر، تمایز، چسبندگی، بنیادینگی (Stemness)، سازماندهی سیتواسکلت، مورفولوژی و برهم کنش‌های سلول به سلول می‌گردند (۲۱، ۲۲). علاوه بر آن استفاده از بسترهای رشته‌ای سه بعدی در کشت اولیه هیپاتوسیت‌ها نشان داده است که چنین بستری موجب می‌شود این سلول‌ها - که در حالت عادی به سرعت خصوصیات تمایزی خود را از دست می‌دهند - به مدت طولانی تری در محیط کشت فعالیت نموده و خصوصیات تمایزی خود را حفظ کنند (۲۳-۲۵). بنابراین در این مطالعه بر آن شدیم تا تاثیر بستر حاوی نانو رشته‌های درهم بافته را بر تمایز سلول‌های شبه هیپاتوسیتی مشتق از سلول‌های بنیادی مزانشیمی مورد مطالعه قرار دهیم.

مواد و روش‌ها

جداسازی و تخلیص سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان موش

سلول‌های بنیادی مزانشیمی مورد استفاده در این مطالعه از ۱۰ سر موش نر نژاد NMRI حدود ۶-۴ هفته‌ای با وزن ۲۵-۲۰ گرم که از انستیتو پاستور ایران خریداری شده و در حیوان‌خانه پژوهشکده رویان تحت شرایط استاندارد (دمای ۲۱ درجه، روشنایی و تاریکی ۱۲ ساعته و دسترسی آزاد به آب و غذای کافی) نگهداری می‌شدند، تهیه گردید. کار بر روی موش‌ها بر اساس مصوبه کمیته اخلاق پژوهشکده رویان انجام می‌شد.

ابتدا موش‌های نر با جابه‌جایی مهره‌های گردنی کشته شده و بلافاصله استخوان‌های ران و درشت نی آنها تحت شرایط استریل جدا شد و پس از جدا نمودن عضلات و بریدن اپیفیزی‌ها مغز استخوان‌ها در محیط کشت Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) بدون سرم تخلیه گردید. برای آنکه همه سلول‌های مورد استفاده در کلیه آزمایشات یکسان باشند، مغز استخوان همه موش‌ها با یکدیگر مخلوط شده و بعد از یک بار شست‌وشو با همان محیط کشت، سلول‌ها در محیط کشت DMEM حاوی ۱۰ درصد سرم (FBS) و ۱۰۰ واحد در میلی‌لیتر پنی‌سیلین / استرپتومایسین (همگی از Gibco)، در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و در غلظت ۵ درصد دی‌اکسید کربن کشت داده شدند. پس از یک روز با شست‌وشوی سلول‌ها توسط Phosphate Buffer Saline (PBS) و تعویض محیط کشت آنها، سلول‌های غیر چسبیده (سلول‌های خون‌ساز) حذف گردیده و با انجام ۴ پاساژ سلولی متوالی، سلول‌های بنیادی مزانشیمی چسبیده تخلیص و تکثیر شدند. سرانجام از این سلول‌های مزانشیمی پاساژ ۴ برای انجام آزمایشات بعدی استفاده گردید.

تمایز به رده‌های مزانشیمی (چربی و استخوان)

برای اثبات مزانشیمی بودن سلول‌های حاصل از مرحله فوق علاوه بر تایید مورفولوژی، نمونه‌هایی از آنها را در معرض محیط‌های تمایزی آدیپوژنیک شامل DMEM حاوی ۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر Ascorbic2-Phosphate، ۱۰۰ نانومول Dexamethasone و ۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر Indomethacin به مدت دو هفته و محیط تمایزی استئوژنیک شامل DMEM حاوی ۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر Ascorbic2-Phosphate، ۱۰ نانومول Dexamethasone و ۱۰ میلی‌مول β -Glycerol Phosphate به مدت ۳ هفته قرار داده (۲۶) و سپس به ترتیب با رنگ‌آمیزی‌های Oil-Red O و Alizarin Red مورد بررسی قرار دادیم.

استفاده نمود که بسیاری از معایب مربوط به سایر سلول‌های بنیادی از جمله مشکلات سرکوب ایمنی و رد پیوند، مسایل اخلاقی و کمبود منبع سلولی نیز مرتفع می‌گردد (۸، ۱۸-۱۶). بنابراین به دست آوردن روشی موثر برای تمایز این سلول‌های بنیادی به هیپاتوسیت می‌تواند بسیاری از مشکلات موجود در این زمینه را حل نماید.

نتایج به دست آمده از مطالعات متعدد - که تمایز سلول‌های مزانشیمی به هیپاتوسیت را انجام داده‌اند - هر چند امیدوار کننده بوده اما نشان داد که همواره میزان تمایز سلول‌ها و همچنین کیفیت عملکردی سلول‌های حاصله و بلوغ آنها ضعیف بوده و باید تدابیری اتخاذ نمود تا بازده تمایزی را افزایش دهد و از سلول‌های حاصله در سطح بالینی بتوان استفاده نمود. در این مقوله نکته بسیار مهمی که در روند تمایز سلول‌های بنیادی وجود دارد، آن است که برای بهبود کیفیت و کمیت سلول‌های تمایز یافته از سلول‌های بنیادی در محیط آزمایشگاه، بایستی از روش‌هایی استفاده شود که تا حد ممکن شبیه به حالت *In vivo* و شرایط تکوین طبیعی سلول‌های مورد نظر باشد (۵، ۱۹، ۲۰). دانسته‌های اخیر نشان می‌دهد که مراحل مختلف رشد و تمایز سلول‌ها به شدت به خصوصیات ذاتی و پیام‌های محیطی (از جمله سایتوکاین‌ها، فاکتورهای رشد و ماتریکس برون سلولی) آنها وابسته است (۱۹).

برای اولین بار شوارتز و همکارانش موفق شدند سلول‌های پیش‌ساز بالغ چند ظرفیتی (Multipotent Adult Progenitor Cells, MAPCs) مغز استخوان انسان، موش صحرایی و موش را در محیط آزمایشگاهی به سلول‌های شبه هیپاتوسیتی تمایز دهند. آنها سلول‌های MAPC را بر روی پلیت، کلاژن، فیبرونکتین و ماتریژل کشت داده و برای تمایز آنها به هیپاتوسیت از فاکتورهای Fibroblast Growth و Hepatocyte Growth Factor (HGF) Factor-4 (FGF-4) استفاده نمودند. آنها دریافتند که بهترین ماتریکس برای تمایز این سلول‌ها ماتریژل است (۸). طی مطالعه جالب توجهی که توسط لی و همکارانش بیان شد، سلول‌های مزانشیمی مغز استخوان و خون بند ناف انسان با روشی دو مرحله‌ای به هیپاتوسیت تمایز داده شد. آنها برای تولید سلول‌های شبه هیپاتوسیتی بالغ و فعال ابتدا از فاکتورهای تمایزی و سپس از فاکتورهای بلوغی (تقریباً نظیر آنچه در روند هپاتوژنز طبیعی در بدن جنین به کار می‌رود) استفاده نمودند (۱۶). آکوموتو و همکارانش نیز با کشت سلول‌های مغز استخوان موش صحرایی بر روی غشای پایه مصنوعی و با القای آنها توسط HGF، Insulin Transferrin و Epidermal Growth Factor (EGF) Selenium (ITS) موفق به ایجاد هیپاتوسیت گردیدند (۱۴). آنها نشان دادند که هر چند تمایز سلول‌های مغز استخوان به هیپاتوسیت در غیاب غشای پایه یا ماتریکس برون سلولی نیز رخ می‌دهد، اما در این شرایط برای دست‌یابی به میزان سلول‌های تمایز یافته یکسان به غلظت بالاتری از فاکتورهای تمایزی نیاز است. بنابراین چنین استنباط می‌گردد که سایتوکاین‌ها در روند تکثیر و تمایز سلول‌های بنیادی به هیپاتوسیت، نقش اصلی را بر عهده دارند و ماتریکس برون سلولی با تنظیم غلظت موضعی این سایتوکاین‌ها نقش خود را ایفا می‌نمایند (۱۷).

امروزه به تاثیر انواع ماتریکس‌های برون سلولی بر تکثیر و تمایز سلول‌های بنیادی توجه خاصی می‌شود، به ویژه که در چند سال اخیر از ترکیبات نانو نیز کمک گرفته شده است. ماتریکس‌های ساخته شده توسط نانو رشته‌ها با توجه به آنکه خصوصیات توپوگرافیکی مشابه ماتریکس برون سلولی (یا غشای پایه) طبیعی دارند باعث بهبود شرایط

Real Time-PCR

برای مقایسه الگو و میزان بیان ژن‌های اختصاصی کبدی سلول‌های شبه هپاتوسیتی مشتق از مزانشیم در گروه‌های نانو مثبت و منفی در سطح mRNA، شاخص‌های ابتدایی تمایز هپاتوسیتی شامل سیتوکراتین ۷ (CK 7)، آلفا فیتوپروتئین (AFP) و FOXa2 در روزهای ۹، ۱۸ و ۳۶، و شاخص‌های نهایی تمایز هپاتوسیتی شامل آلبومین (ALB)، فاکتور هسته‌ای هپاتوسیتی ۴a (HNF4a) و سیتوکروم P450 (CYP7a1) در روزهای ۱۸ و ۳۶ بررسی شدند. برای این منظور حدود ۵۰۰ هزار تا ۱ میلیون سلول‌های مزانشیمی پاساژ ۴، همچنین سلول‌های شبه هپاتوسیتی مشتق از مزانشیم گروه‌های نانو مثبت و منفی در روزهای ۹، ۱۸ و ۳۶ تمایز توسط PBS شسته و توسط TRIZOL لیز گردیدند. کل RNA سلول‌ها با روش TRIZOL استخراج شده و با استفاده از پرایمر Random Hexamer و کیت Revert aid TM H minus First Strand cDNA Synthesis رشته مکمل cDNA ساخته شد. سپس میزان بیان ژن‌های مورد نظر با استفاده از Power SYBR Green و توسط دستگاه ABI 7500 Real-Time PCR و به روش $2^{-\Delta\Delta CT}$ مورد ارزیابی قرار گرفت. همه واکنش‌ها به صورت دوتایی انجام شد، از ژن بتا توبولین (β -Tubulin) برای نرمالایز کردن سطح RNAها استفاده شده و میزان بیان ژن‌های مورد نظر نسبت به مزانشیم پاساژ ۴ محاسبه گردید. در ضمن کلیه مراحل فوق برای هر گروه سه بار تکرار گردید و نتایج حاصله توسط آنالیز واریانس دوطرفه و با استفاده از تست Tukey مورد ارزیابی قرار گرفته و $P < 0.05$ به عنوان سطح معنی‌دار بودن اختلاف‌ها در نظر گرفته شد (مشخصات پرایمرهای مورد استفاده در جدول ۱ نشان داده شده است).

میکروسکوپ الکترونی ترانس‌میشن (TEM)

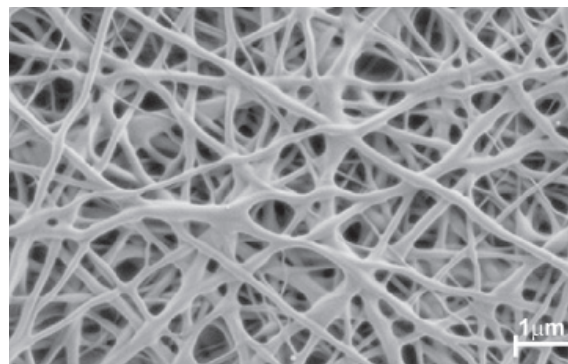
برای بررسی فراساختار سلول‌های شبه هپاتوسیتی مشتق از مزانشیم گروه‌های نانو مثبت و منفی در روز ۳۶ تمایز، پس از شست‌وشوی سلول‌ها با PBS ابتدا به مدت یک شب در محلول گلو تار آلدئید ۲/۵ درصد در PBS و سپس به مدت ۲ ساعت در تتراکسید اسمیوم ۱ درصد فیکس گردیدند. جهت آب‌گیری نمونه‌ها از غلظت‌های رو به افزایش استن و برای نفوذدهی و بلوک‌گیری از رزین اپوکسی آرالدایت CY212 استفاده شد. سپس توسط دستگاه اولترامیکروتوم Leica برش‌های فوق نازکی با ضخامت ۷۰ نانومتر تهیه و بر روی گریدهای ۲۰۰ خانه‌ای قرار داده شد. برش‌های مذکور توسط رنگ‌های یورانیل استات ۵ درصد و لید سترات ۰/۵ درصد رنگ‌آمیزی شده و توسط میکروسکوپ الکترونی ترانس‌میشن Zeiss EM900 و تحت اختلاف پتانسیل ۸۰ کیلوولت بررسی شده و میکروگراف‌های الکترونی مورد نظر تهیه گردید.

میکروسکوپ الکترونی اسکینینگ (SEM)

پس از شست‌وشوی سلول‌های شبه هپاتوسیتی مشتق از مزانشیم گروه‌های نانو مثبت و منفی در روز ۳۶ تمایز، ثبوت اولیه آنها در محلول گلو تار آلدئید ۲/۵ درصد در PBS و ثبوت ثانویه آنها در تتراکسید اسمیوم ۱ درصد هر کدام به مدت ۲ ساعت انجام شد. برای آب‌گیری نمونه‌ها از غلظت‌های رو به افزایش اتانول استفاده شده و سپس نمونه‌ها به مدت ۱ شب در هوای اتاق خشک‌شدند. پس از چسباندن نمونه‌ها روی استاب آلومینیومی، توسط دستگاه Sputter Coater پوشش طلا داده شده و توسط میکروسکوپ الکترونی اسکینینگ Zeiss DSM 960A بررسی و میکروگراف‌های الکترونی مربوطه تهیه شد.

کشت سلول‌های مزانشیمی بر روی بستریهای متفاوت و تمایز آنها به سلول‌های شبه هپاتوسیتی

برای کشت سلول‌ها از پلیت‌های ۶ خانه‌ای استفاده شد. بستریهای حاوی نانورشته‌های پلی‌آمیدی درهم بافته به قطر ۴۰۰-۲۰۰ نانومتر که با روش الکترواسپین و به صورت اتفاقی بر روی Cover Slip پوشش داده شده بودند (Ultraweb Nanofibers, SurModics, USA) (شکل ۱) در کف خانه‌ها قرار داده شد و این خانه‌ها به عنوان گروه نانو مثبت و خانه‌های فاقد بستر نانو رشته‌ای به عنوان گروه نانو منفی در نظر گرفته شد. در ضمن برای هر گروه حداقل ۲۰ خانه اختصاص داده شد؛ بدین صورت که ۶ خانه برای مطالعه سه تکرار Real Time در هر مرحله (هر ۲ خانه در مجموع شامل حدود یک میلیون سلول بود و برای یک تکرار استفاده می‌شد و از آنجا که مطالعه مولکولی در ۳ مرحله مختلف تمایز انجام شد، به ۱۸ خانه نیاز بود)، همچنین یک خانه برای میکروسکوپ الکترونی ترانس‌میشن (TEM) و یک خانه برای میکروسکوپ الکترونی اسکینینگ (SEM) در نظر گرفته شد. خانه‌های مذکور توسط ماتریز یک درصد در محیط DMEM فاقد سرم پوشانده شده و به مدت یک شب در انکوباتور ۳۷ درجه انکوبه گردیدند. سپس با حذف محلول اضافی، در هر خانه سلول‌های مزانشیمی با تراکم ۵۰ هزار سلول در سانتی‌متر مربع، در محیط DMEM حاوی ۱۵ درصد سرم کشت شده و پلیت‌ها در انکوباتور ۳۷ درجه حاوی ۵ درصد دی‌اکسید کربن انکوبه شدند. پس از آنکه سلول‌ها کف خانه‌ها را به طور کامل پر نمودند (حدود ۳ روز)، ابتدا مرحله حذف سرم و سپس روند القای تمایز هپاتوسیتی با روش دوم مرحله‌ای انجام شد. برای حذف سرم سلول‌ها به مدت دو روز در DMEM حاوی ۲۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر EGF و ۱۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر basic Fibroblast Growth Factor (bFGF) در مرحله اول القای تمایز، سلول‌ها به مدت ۶ روز در محیط DMEM حاوی ۲۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر Hepatocyte Growth Factor (HGF)، ۱۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر bFGF و ۶۱ صدم گرم بر لیتر Nicotinamide قرار گرفتند و در مرحله دوم القای بلوغ سلول‌ها در محیط DMEM حاوی ۲۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر Oncostatin M، ۱ میکرومول Dexamethasone و ۵۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر Insulin Transferin Selenium (ITS) قرار گرفتند (۱۶). محیط‌های کشت هر ۳ روز یک بار تعویض شده و روند تمایز سلول‌ها در روزهای ۹، ۱۸ و ۳۶ پس از القای تمایز با روش‌های مختلف مورد بررسی قرار گرفت.



شکل ۱: اسکینینگ الکترون میکروگراف بستر نانورشته‌ای مورد استفاده در تحقیق حاضر (SurModics, Inc).

جدول ۱: پرایمرهای مورد استفاده در real time-PCR

Genes	Primer Sequence (5'»3')	Annealing temperature (°C)	Length (bp)	Gene bank code
Hepatic nuclear factor 4 alpha (HNF4a)	GTCCCAGCAGATCACCTC GGAT-GTACTTGGCCCACT	60	134	NM_008261
Albumin (Alb)	AGACATCCTTATTTCTATGCCG GACCAATGCTTTCTCCTTCAC	60	141	NM_009654
Forkhead box A2 (FOXa2)	GCAGACACTTCCTACTACCAA CTCCTACTCAGCCTCTCATTT	60	124	NM_010446
Cytokeratin 7 (CK7)	TTGCTGAAGAAGGATGTGGA TCTGCTAACTCTGTCTCGTG	60	119	NM_033073.2
Cytochrome P450 (Cyp7a1)	TTTGCTAAGCACAGATTCTCC CCTACTTTCCTTCTCCTTATCCA	60	138	NM_007824
Alpha fetoprotein (AFP)	ACAAGA GCT TCT CAT TAA CCT G CAA CTT TGG ACC CTC TTC TG	60	151	NM_007423.4
Tubulin, beta 5 (b-Tub)	GGAACATAGCCGTAAACTGC TCACTGTGCCTGAACTTACC	60	319	NM 011655

آدیپوژنیک و یا به مدت ۲۱ روز در محیط استئوژنیک قرار گرفته بودند به ترتیب به سلول‌های چربی و استخوانی تمایز یافتند و رنگ‌آمیزی‌های Oil-Red O و Alizarin-Red تمایز آنها را تایید نمود (شکل ۲B, C).

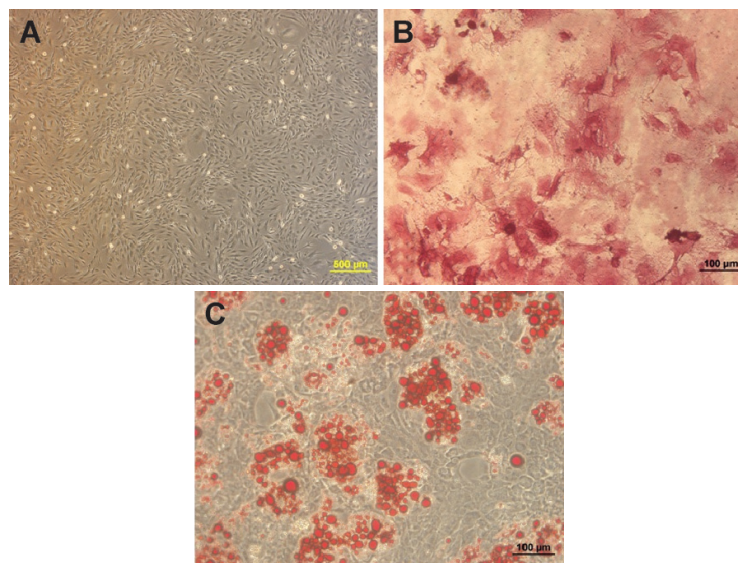
تمایز سلول‌های مزانشیمی به سلول‌های شبه هیپاتوسیت در آزمایشگاه

در هر دو گروه نانو مثبت و منفی سه روز پس از کشت سلول‌های مزانشیمی، این سلول‌ها به طور کامل کف ظرف را پر نموده و ظاهری دوکی شکل و موج داشتند. سلول‌ها همین حالت خود را تا پایان مرحله حذف سرم که به عنوان روز صفر تمایز در نظر گرفته می‌شد نیز حفظ نمودند (شکل ۲A, B).

یافته‌ها

خصوصیات سلول‌های بنیادی مزانشیمی

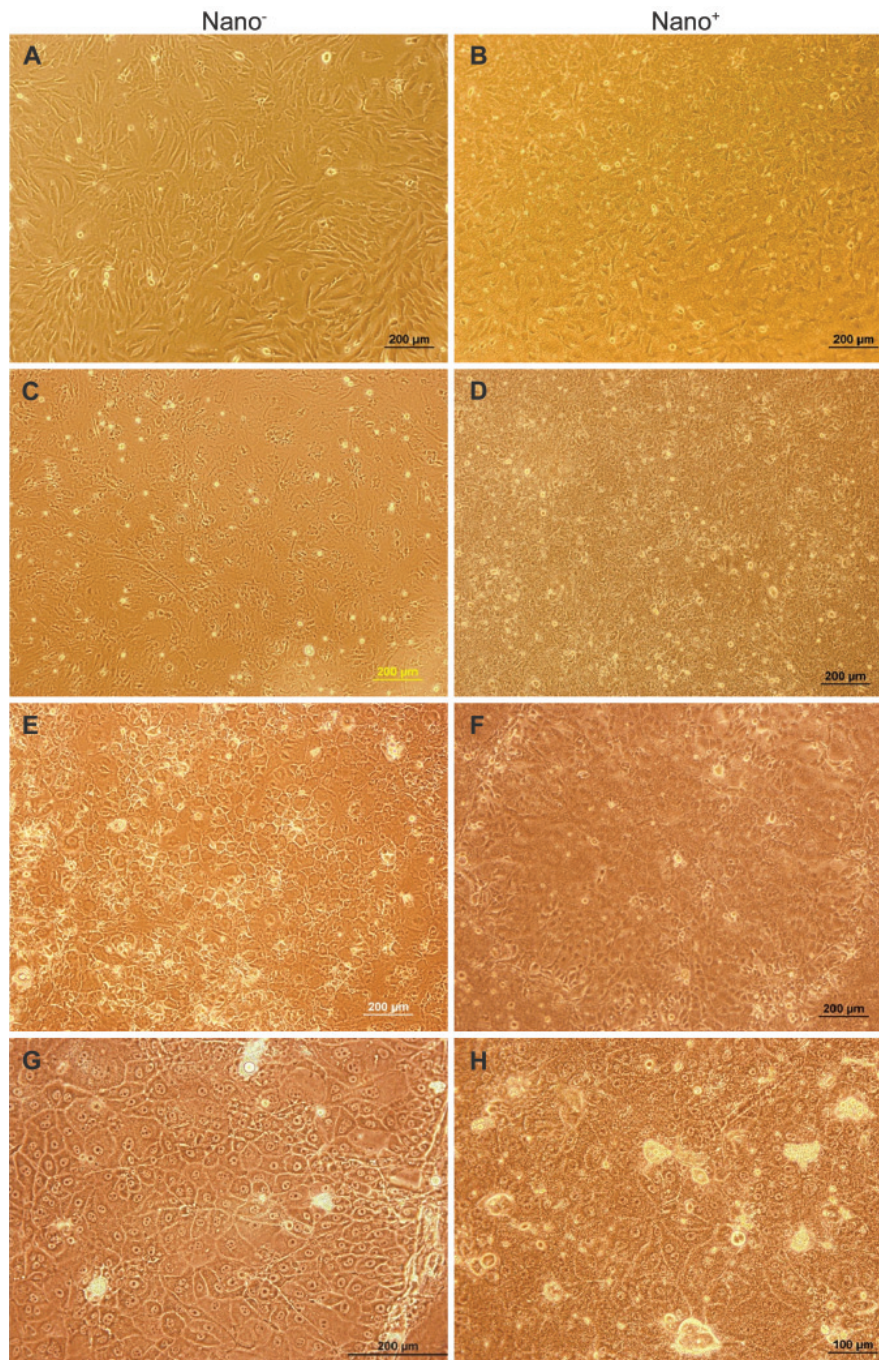
در کشت اولیه سلول‌های مغز استخوان و پس از چند روز از حذف سلول‌های غیرچسبنده، کلنی‌های سلول‌های مزانشیمی مشاهده شد که شامل سلول‌هایی دوکی بودند و به صورت شعاعی از مرکز کلنی به اطراف کشیده می‌شدند، اما همچنان ناخالصی‌های سلولی در بین آنها قابل مشاهده بود. پس از انجام پاساژهای سلولی، در پاساژ ۴ به طور عمده اکثر ناخالصی‌ها برطرف شده و همه سلول‌ها ظاهری دوکی شکل و کشیده داشتند و هنگامی که ۸۰ درصد کف فلاسک را پر می‌کردند، نمایی موج (که مشخصه سلول‌های مزانشیمی است) را نشان می‌دادند (شکل ۲A). همچنین سلول‌های مزانشیمی پاساژ چهارمی که به مدت ۱۴ روز در محیط



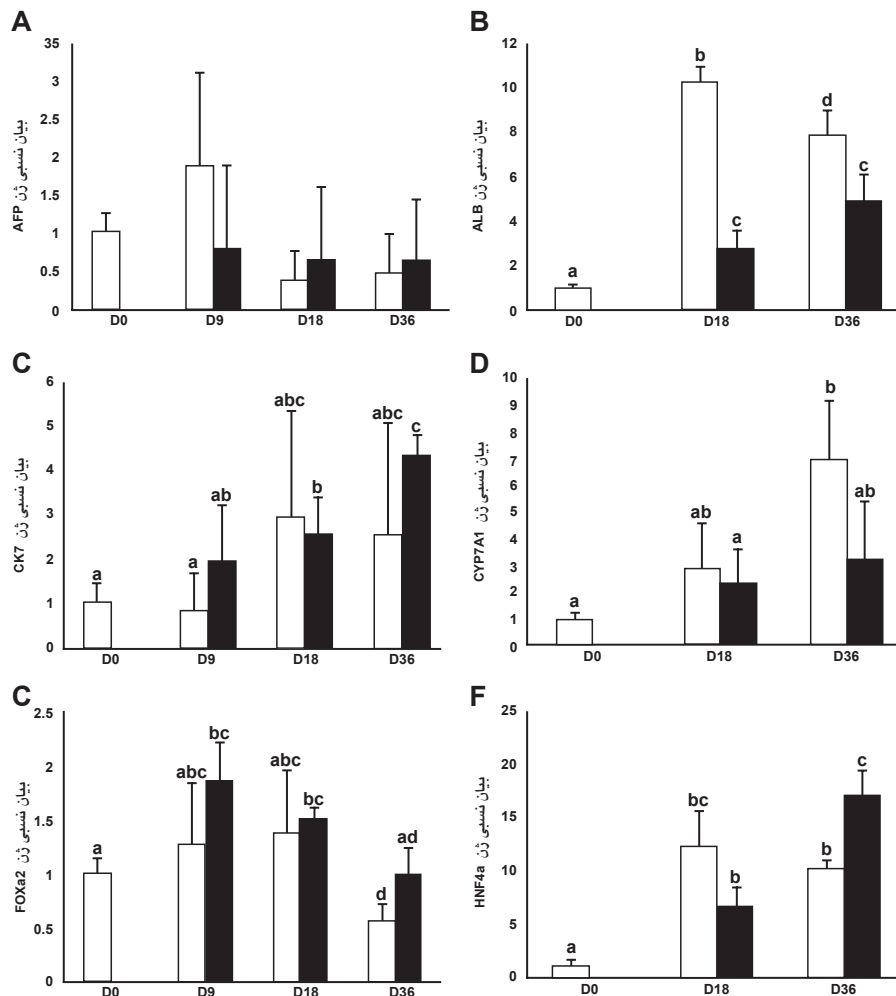
شکل ۲. تصاویر فاز کنتراست (A) سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان موش در پاساژ ۴، (B) سلول‌های استخوانی مشتق از مزانشیم که با Alizarin red رنگ‌آمیزی شده و (C) سلول‌های چربی مشتق از مزانشیم که با Oil red O رنگ‌آمیزی شده‌اند.

کامل با یکدیگر متراکم شده و ظاهری چند وجهی را نشان می‌دادند (شکل ۳E, F)، و در روز ۳۶ تمایز سلول‌ها با اشکالی چند وجهی آرایشی به طور کامل اپیتلیویدی داشتند (شکل ۳G, H). در این روز سلول‌ها نسبت به قبل قدری حجیم‌تر شده، دارای هسته‌های به نسبت درشت روشن با هستک‌های واضح بوده، و حتی برخی از آنها دو هسته داشتند.

به طور تقریب از روز ۶ تمایز به بعد تغییر شکل سلول‌ها از حالت کشیده به حالت گرد شروع می‌شد. به نحوی که در روز ۹ تمایز بسیاری از سلول‌ها زواید کشیده و بلند خود را از دست داده، گرد شده و تقریبی به صورتی متراکم در کنار یکدیگر قرار می‌گرفتند (شکل ۳C, D). تغییرات مذکور با گذشت زمان بیشتر می‌شد، به شکلی که در روز ۱۸ تمایز سلول‌ها به طور



شکل ۳: تصاویر فاز کنتراست (A, B) سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان موش که به طور کامل سطح پلایت و بستر نانو رشته‌ای را پر کرده‌اند، و (C-H) سلول‌های شبه هیپاتوسیستی مشتق از آنها، (C, D) در روز ۹، (E, F) روز ۱۸ و (G, H) روز ۳۶ تمایز.



نمودار ۱: نمودارهای بیان نسبی ژن‌های اختصاصی کبدی در طی تمایز سلول‌های شبه هیپاتوسیتی مشتق از سلول‌های بنیادی مزانشیمی. ستون‌های سفید مربوط به گروه نانو منفی، و ستون‌های سیاه گروه نانو مثبت می‌باشد. حروف یکسان روی نمودارها نشان دهنده عدم تفاوت معنی‌دار است (سطح معنی‌دار بودن اختلاف‌ها $p < 0.05$ در نظر گرفته شده، محور افقی روز تمایز را نشان می‌دهد، نمودارها به صورت $\text{Mean} \pm \text{SD}$ رسم شده‌اند).

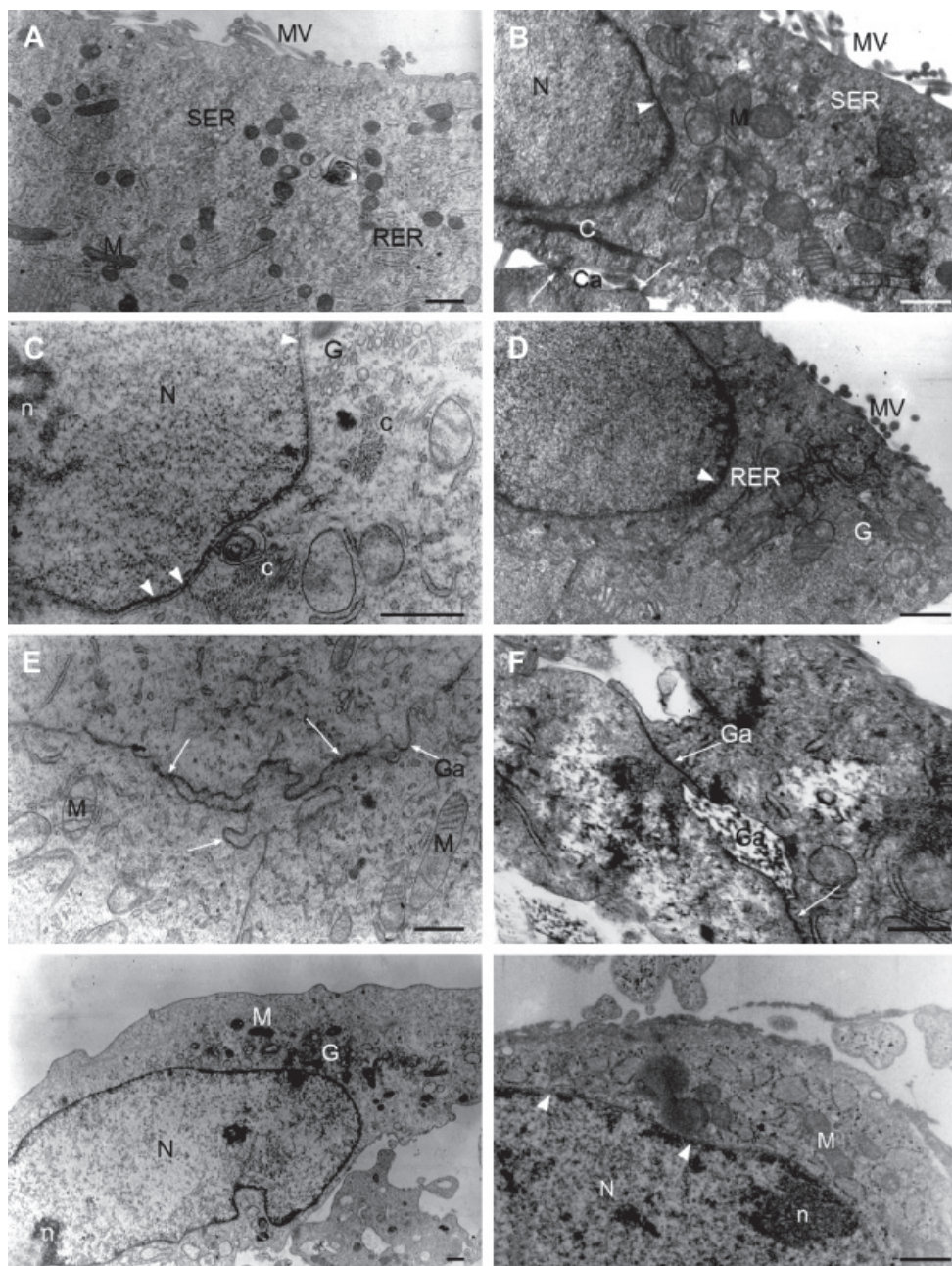
که نسبت به دو ژن قبلی برای سلول‌های کبدی اختصاصی‌تر است، در هر دو گروه نانو منفی و مثبت و از روز ۹ تا ۳۶ روند نزولی را نشان داد؛ به طوری که در هر دو گروه کاهش معنی‌داری در بیان این ژن در روز ۳۶ نسبت به روزهای ۹ و ۱۸ مشاهده گردید. در حالی که تفاوت بین گروه‌ها در مراحل مختلف تمایز معنی‌دار نبوده و تنها در گروه نانو مثبت در روزهای ۹ و ۱۸ تمایز افزایش معنی‌داری نسبت به روز صفر دیده شد (نمودار ۱C). بیشترین میزان بیان ژن ALB در گروه نانو منفی و در روز ۱۸ مشاهده گردید، که به دنبال آن در روز ۳۶ کاهش معنی‌داری را نشان داد. در حالی که در گروه نانو مثبت هرچند اختلاف معنی‌داری بین روزهای ۱۸ و ۳۶ وجود نداشت اما بر خلاف گروه نانو منفی با گذشت زمان تمایز، میزان بیان افزایش نشان دارد. در ضمن در هر مرحله، میزان بیان در گروه نانو منفی به طور معنی‌داری بیشتر از گروه نانو مثبت بود (نمودار ۱D). میزان بیان ژن CYP7a1 هر چند که در هر دو گروه نانو منفی و مثبت در روز ۳۶ نسبت به روز ۱۸ افزایش کوچکی را نشان داد، و البته این افزایش در گروه نانو منفی بیشتر به نظر می‌رسید،

ارزیابی سلول‌های شبه هیپاتوسیتی مشتق از مزانشیم توسط Real time-PCR

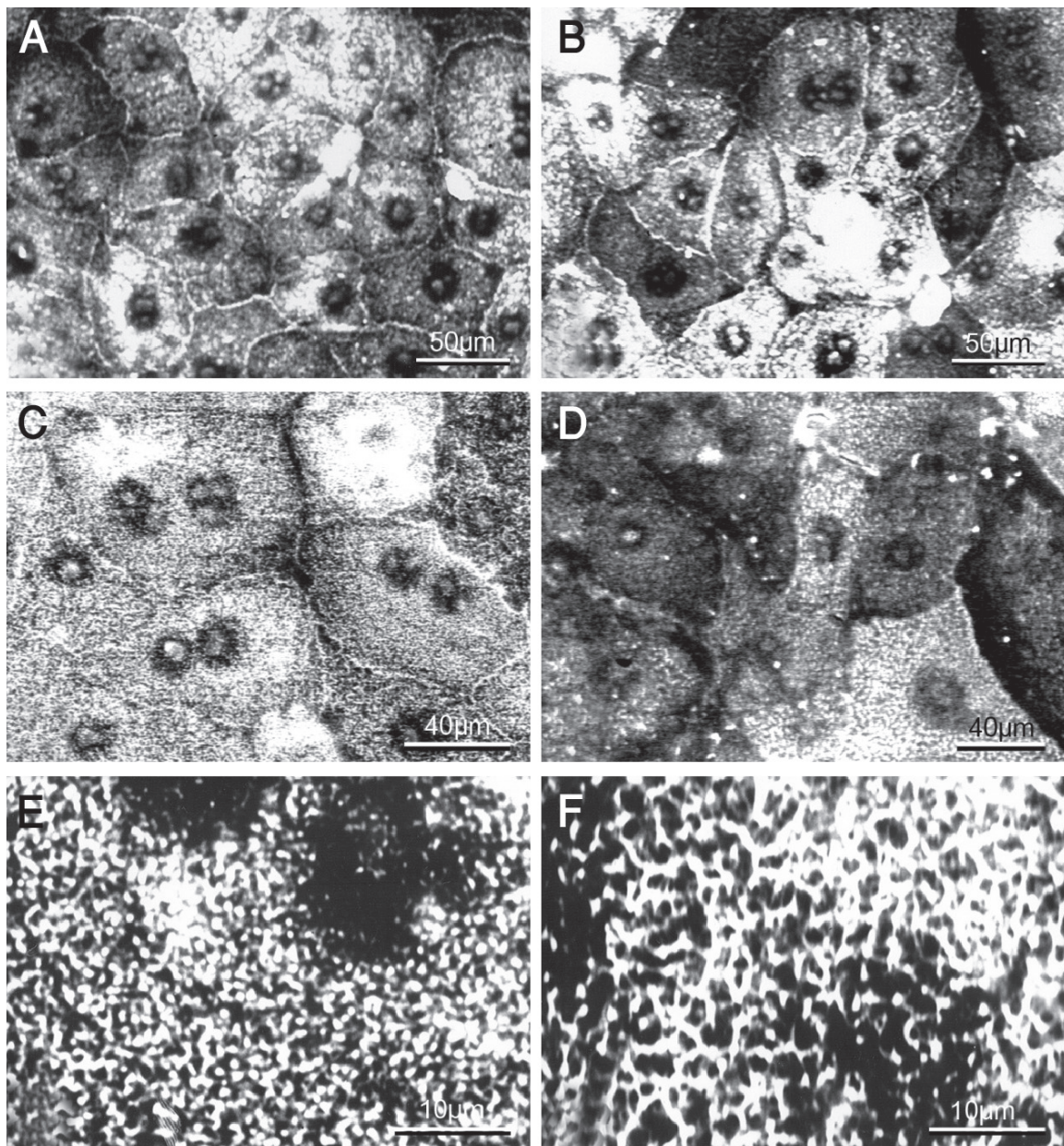
در بررسی AFP، هر چند اختلاف معنی‌داری بین دو گروه در هر یک از روزهای مورد مطالعه و هم‌چنین در هر گروه بین روزهای مختلف تمایز مشاهده نشد، اما بیشترین مقدار بیان mRNA در روز ۹ و در گروه نانو منفی ثبت گردید که به دنبال آن در روزهای ۱۸ و ۳۶ کاهش بیان را نشان می‌داد (در همه موارد سطح معنی‌دار بودن اختلافات $p < 0.05$ در نظر گرفته شده). در حالی که در گروه نانو مثبت، میزان بیان در مراحل مختلف تمایز به طور تقریب یکسان بود (نمودار ۱A). بیان ژن CK 7 در گروه نانو مثبت با گذشت زمان روند افزایشی را نشان می‌داد، به نحوی که میزان بیان این ژن در روز ۳۶ نسبت به روز ۹ و ۱۸ افزایش معنی‌داری را نشان داد. در صورتی که در گروه نانو منفی، بیان آن در روزهای ۱۸ و ۳۶ تقریباً یکسان بوده و افزایش غیرمعنی‌داری را نسبت به روز ۹ نشان می‌داد. لازم به ذکر است که تفاوت بین دو گروه نانو منفی و مثبت در هر مرحله تمایزی با یکدیگر معنی‌دار نبود (نمودار ۱B). ژن FOXa2

کاهش غیر معنی داری نسبت به روز ۱۸ دیده شد، در حالی که در گروه نانو مثبت افزایش معنی داری در بیان این ژن در روز ۳۶ نسبت به روز ۱۸ مشاهده گردید. علاوه بر آن در روز ۳۶ میزان بیان ژن HNF4a در گروه نانو مثبت افزایش معنی داری را نسبت به گروه نانو منفی نشان داد (نمودار ۱F).

اما اختلاف هیچ کدام معنی دار نیست. در واقع تنها در گروه نانو منفی و در روز ۳۶ افزایش معنی دار این ژن نسبت به روز صفر مشاهده شد (نمودار ۱E). HNF4a به عنوان یکی از ژنهای موثر در عملکرد هپاتوسیتها همانند ALB رفتار متفاوتی را در دو گروه نانو منفی و مثبت نشان داد. بدین صورت که در گروه نانو منفی در روز ۳۶



شکل ۴: (A-F) میکروگرافهای الکترونی ترانس‌میشن سلولهای شبه هپاتوسیتی مشتق از سلولهای بنیادی مزانشیمی مغز استخوان موش در روز ۳۶ تمایز (A, C, E) گروه نانومنفی و (B, D, F) گروه نانو مثبت، و (G, H) سلول بنیادی مزانشیمی مغز استخوان موش برای مقایسه. همان‌طور که مشاهده می‌شود سلولهای تمایز یافته دارای هسته‌های (N) درشت یوکروماتین با هستک (n) بزرگ بوده، همچنین در سیتوپلاسم خود دارای تعداد زیادی میتوکندری (M)، شبکه اندوپلاسمیک خشن (RER) و صاف (SER)، دستگاه‌های گلژی (G)، و سیتوکراتین (C) می‌باشند. این سلولها در سطح راسی خود دارای میکروویلی (MV) بوده و با یکدیگر اتصالات سلولی (فلش‌ها) و به ویژه اتصال سوراخ‌دار (Ga) دارند. علاوه بر آن در گروه نانو مثبت کانالیکول‌های صفراوی (Ca) بین سلولی نیز مشاهده می‌گردد. نوک پیکان: منافذ هسته ای (Scale bars= 1um).



شکل ۶: میکروگراف‌های الکترونی اسکینینگ سلول‌های شبه هیپاتوسیتی مشتق از سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان موش در روز ۳۶ تمایز (A, C, E) گروه نانومنفی و (B, D, F) گروه نانو مثبت. همان‌طور که مشاهده می‌شود سلول‌های تمایز یافته کاملاً چند وجهی بوده و به صورت متراکم کنار یکدیگر قرار دارند و برخی از آنها نیز دو هسته‌ای نیز می‌باشند. (E, F) میکروویلی‌های سطح راسی سلول‌ها با بزرگ‌نمایی بالاتر نشان داده شده است.

بین سلول‌ها اتصالات بین سلولی، به ویژه اتصال سوراخ‌دار مشاهده می‌گردید. همچنین در سطح آزاد سلول‌ها میکروویلی‌های فراوانی تشکیل شده و نیز در گروه نانو مثبت کانالیکول‌های صفراوی بین سلولی مشخصی مشاهده گردید (شکل ۴ و ۵).

بحث

امروزه به خوبی می‌دانیم که در تمایز سلول‌های بنیادی در محیط آزمایشگاهی علاوه بر خصوصیات ذاتی سلول، حداقل دو

فراساختار سلول‌های شبه هیپاتوسیتی مشتق از مزانشیم در بررسی فراساختار سلول‌های شبه هیپاتوسیتی، هر دو گروه نانو منفی و مثبت با میکروسکوپ الکترونی ترانس‌میشن و اسکینینگ نکته قابل توجه مشاهده هسته‌های درشت یوکروماتین با هستک‌های بزرگ و افزایش تعداد ارگانل‌های سیتوپلاسمی به ویژه میتوکندری‌ها، ژدستگاه‌های گلژی و شبکه‌های اندوپلاسمیک خشن و صاف بود که نسبت به سلول‌های مزانشیمی به طور کامل چشم‌گیر بودند. در ضمن در سیتوپلاسم سلول‌های تمایز یافته رشته‌های سیتوکراتین و همچنین

داشته باشد (۲۱).

در این مطالعه نیز با به کار بردن بستر حاوی نانورشته‌های درهم بافته جهت ایجاد خصوصیات توپوگرافیکی نظیر حالت *in vivo*، نشان داده شد که وجود چنین بستری می‌تواند در روند تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان به سلول‌های شبه هپاتوسیت موثر باشد. در واقع در سطح مولکولی بیان بالاتر ژن FOXa2 (از شاخص‌های هپاتوسیت‌های اولیه) در همه مراحل تمایزی در گروه نانو مثبت نشان از روند تمایزی بهتر این گروه نسبت به گروه نانو منفی است. همچنین افزایش معنی دار بیان HNF4a (عاملی رونویسی که بسیاری از ژن‌های اختصاصی هپاتوسیتی را فعال می‌کند) در گروه نانو مثبت و در روز ۳۶ نسبت به گروه نانو منفی، و نیز روند رو به افزایش بیان ALB در گروه نانو مثبت نسبت به روند رو به کاهش آن در گروه نانو منفی همگی نشان از تمایز موثرتر و البته شاید با کمی تاخیر سلول‌های این گروه می‌باشد. از طرفی دیگر وجود بیشترین بیان ALB در روز ۱۸ گروه نانو منفی و سپس کاهش آن در روز ۳۶ ممکن است به خاطر بازگشت تمایز این سلول‌ها به خاطر عدم حمایت کافی توسط ماتریکس ساده (فاقد نانو رشته) آنها باشد. در مطالعه دیگری که سلول‌های بنیادی مغز استخوان موش صحرایی را به مدت ۱۸ روز به سلول‌های شبه هپاتوسیتی تمایز داده بودند نیز بیشترین میزان بیان FOXa2 را در روز ۱۰ تمایز و سپس کاهش آن را مشاهده نموده بودند. آنها همچنین گزارش نمودند که بیان ALB از روز ۱۰ شروع شده و در روز ۱۸ به بیشترین میزان خود می‌رسد (۱۹).

مطالعه فراساختاری سلول‌های تمایز یافته نیز به طور چشم‌گیری افزایش ارگانل‌های سیتوپلاسمی، به ویژه دستگاه‌های گلژی و شبکه‌های اندوپلاسمیک صاف و خشن را در هر دو گروه و همچنین وجود کانالیکول‌های صفراوی را تنها در گروه نانو مثبت نشان داد. علاوه بر نتایج مولکولی وجود چنین ارگانل‌هایی که در روند تولید و ترشح پروتئین‌ها و همچنین اعمال اختصاصی سلول‌های کبدی نقش دارند، خود می‌تواند شاهدهی بر فعال بودن سلول‌های حاصله باشد و شاید تشکیل کانالیکول‌های صفراوی در گروه نانو مثبت نشان دهنده فعالیت بیشتر این سلول‌ها باشد. همان‌گونه که در مطالعه دیگر نشان داده شد، تمایز سلول‌های بنیادی جنینی در محیط کشت سه بعدی (با استفاده از داربست سه بعدی کلاژنی) به مدت ۲۸ روز نیز منجر شده بود سلول‌های حاصله فراساختاری شبیه به هپاتوسیت را نشان دهند (۳۱). در آن مطالعه نیز به طور تقریب همه ارگانل‌هایی که ما مشاهده نمودیم گزارش گردید.

نتیجه‌گیری

با توجه به یافته‌های حاصل از این تحقیق و همچنین مقایسه آن با سایر مقالات و بحث‌ارایه شده به نظر می‌رسد که خصوصیات توپوگرافیک حاصل از نانو رشته‌های درهم بافته موجود در بستر سلولی، می‌تواند در بلوغ سلول‌های شبه هپاتوسیتی مشتق از سلول‌های بنیادی مزانشیمی در محیط آزمایشگاهی نقش موثری داشته باشد. در اصل پاسخ قطعی به این ادعا با انجام مطالعات تکمیلی دیگر از جمله بررسی تولید پروتئین‌های اختصاصی و میزان ترشح شاخص‌های اختصاصی کبدی در دو گروه و مقایسه آنها با یکدیگر، امکان‌پذیر خواهد بود.

عامل اصلی دیگر نقشی اساسی دارند که عبارتند از: سیتوکاین‌ها (فاکتورهای رشد و تمایزی) و ماتریکس برون سلولی. در مورد عامل نخست چنین عنوان می‌گردد که، از آنجا که در روند هپاتوژن طبیعی در زمان جنینی فاکتورهای موثر در زمان‌های متفاوتی تاثیر خود را ابتدا بر روی تشکیل اندودرم و سپس تمایز آن به کبد اعمال می‌نمایند، می‌توان چنین نتیجه گرفت که در صورت فراهم شدن چنین شرایطی در آزمایشگاه، روند تمایز سلول‌ها به نحو بهتری رخ دهد (۱۶، ۱۹). به همین دلیل در این مطالعه نیز با بررسی انواع روش‌های تمایزی موجود و نتایج حاصل از آنها، از روش تمایز دو مرحله‌ای استفاده گردید. در واقع در این روند در مرحله اول تمایز HGF و FGF با تاثیر بر سلول‌های مزانشیمی آنها را به سمت تشکیل اندودرم پیش برده و علاوه بر آن HGF، باعث راه‌اندازی مراحل ابتدایی تمایز به سمت هپاتوسیت نیز می‌گردد (۱۶، ۲۷). همچنین در مرحله دوم استفاده از عواملی نظیر ITS، دگزانتازون و به ویژه OSM باعث می‌گردد سلول‌هایی که روند تمایز به هپاتوسیت را آغاز نموده‌اند به سمت بلوغ پیش روند (۲۸، ۲۹).

اما در مورد دومین عامل موثر که همان ماتریکس برون سلولی است، مطالعات متعددی نشان داده است که وجود ماتریکس و همچنین نوع ترکیب آن به طور موثری در تمایز سلول‌های بنیادی به هپاتوسیت نقش دارد (۸، ۱۴). در همین راستا شوارتز و همکارانش با به کار بردن انواعی از ماتریکس‌ها نشان دادند که در روند تمایز سلول‌های پیش‌ساز بالغ چند ظرفیتی (MAPC) مغز استخوان انسان، موش و موش صحرایی، استفاده از ماتریژل بهترین نتیجه را خواهد داشت (۸). در واقع از آنجا که ماتریژل ماتریکسی مرکب بوده و دارای اغلب ترکیبات موجود در ماتریکس طبیعی کبد و به ویژه هپاران سولفات می‌باشد، طبیعی است که نقش بهتری را در روند تمایز سلول‌های بنیادی به هپاتوسیت بازی نماید (۱۴). مطالعه بافت کبدی طبیعی نشان می‌دهد که هپاتوسیت‌های کبدی، آرایشی اپیتلیویدی داشته و با ماتریکس موجود در فضای دیس در ارتباط‌اند و به نظر می‌رسد خصوصیات فیزیکی-شیمیایی این ماتریکس در حفظ ویژگی‌های تمایزی و فعالیت آنها نقش موثری داشته باشد. به ویژه که این ماتریکس (در کبد جنینی و بالغ) حاوی شبکه ظرفیتی از رشته‌های کلاژن نوع III (داربست رتیکولر) بوده که می‌تواند ایجاد بستری توپوگرافیک با پستی بلندی‌هایی در حد نانو نماید که در تماس با سطح قاعده‌ای هپاتوسیت‌ها هستند (۳۰). از طرف دیگر، برخی مطالعات آزمایشگاهی نیز نشان داده است در صورتی که هپاتوسیت‌های بالغ در ظروف ساده کشت شوند به سرعت تمایز خود را از دست داده و فعالیت‌های فیزیولوژیکی‌شان کاهش می‌یابد. اما با کشت آنها بر روی ماتریکس‌های طبیعی، به ویژه داربست‌های سه بعدی می‌توان برای مدت طولانی‌تری تمایز و فعالیتشان را حفظ نمود (۲۵-۲۳). در واقع پیام‌های ناشی از خصوصیات فیزیکی ماتریکس از طریق فعال‌سازی Rho (یک پروتئین GTPase کوچک) و Rho kinase به اسکلت سلولی منتقل شده و آبخاری از واکنش‌ها را در سلول به راه می‌اندازد. بنابراین سرنوشت سلول تنها توسط فاکتورهای محلول تعیین نمی‌شود؛ بلکه با اتصال سلول به ماتریکس سه بعدی، خصوصیات فیزیکی، مکانیکی و شیمیایی این ماتریکس نیز می‌تواند به طور مستقیم یا غیرمستقیم در مسیرهای تعیین سرنوشت سلول نقش

از مساعدت‌های مسئولین محترم این پژوهشگاه و همچنین خانم‌ها وحیده ربانی و زهرا اژدری و نیز آقایان بهشاد پورنصر و حمید نظریان به خاطر کمک‌های تخصصی‌شان ابراز می‌دارند.

تقدیر و تشکر

این مطالعه بخشی از طرح تحقیقاتی مصوب پژوهشگاه رویان جهاد دانشگاهی است. نویسندگان مراتب تقدیر و تشکر خود را

References

1. Roger W. Global challenges in liver disease. *Hepatology*. 2006; 44: 521-526.
2. Masson S, Harrison DJ, Plevris JN, Newsome PN. Potential of hematopoietic stem cell therapy in hepatology: A critical review. *Stem Cells*. 2004; 22(6): 897-907.
3. Abdel Aziz MT, Atta HM, Mahfouz S, Fouad HH, Roshdy NK, Ahmed HH, et al. Therapeutic potential of bone marrow-derived mesenchymal stem cells on experimental liver fibrosis. *Clin Biochem*. 2007; 40(12): 893-899.
4. Rabani V, Baharvand H. Matrix metalloproteinase's role in producing and curing of liver fibrosis. *Yakhteh Med J*. 2009; 11: 106-121.
5. Snykers S, Vanhaecke T, De Becker A, Papeleu P, Vinken M, Van Riet I, et al. Chromatin remodeling agent trichostatin A: a key-factor in the hepatic differentiation of human mesenchymal stem cells derived of adult bone marrow. *BMC Develop Biol*. 2007; 7: 24-39
6. Gomez-Lechon MJ, Donato MT, Castell JV, Jover R. Human hepatocytes as a tool for studying toxicity and drug metabolism. *Curr Drug Metab*. 2003; 4(4): 292-312.
7. Gomez-Lechon MJ, Donato MT, Ponsoda X, Castell JV. Human hepatic cell cultures: in vitro and in vivo drug metabolism. *Altern Lab Anim*. 2003; 31(3): 257-265.
8. Schwartz RE, Reyes M, Koodie L, Jiang Y, Blackstad M, Lund T, et al. Multipotent adult progenitor cells from bone marrow differentiate into functional hepatocyte-like cells. *J Clin Invest*. 2002; 109(10): 1291-1302.
9. Hamazaki T, Itoh Y, Oka M, Papst PJ, Meacham AM, Zon LI, et al. Hepatic maturation in differentiating embryonic stem cells in vitro. *FEBS Lett*. 2001; 497(1): 15-19.
10. Kuai XL, Cong XQ, Li XL, Xiao SD. Generation of hepatocytes from cultured mouse embryonic stem cells. *Liver Transpl*. 2003; 9(10): 1094-1099.
11. Rambhatla L, Chiu CP, Kundu P, Peng Y, Carpenter MK. Generation of hepatocyte-like cells from human embryonic stem cells. *Cell Transplant*. 2003; 12(1): 1-11.
12. Kakinuma S, Tanaka Y, Chinzei R, Watanabe M, Shimizu-Saito K, Hara Y, et al. Human umbilical cord blood as a source of transplantable hepatic progenitor cells. *Stem Cells*. 2003; 21(2): 217-227.
13. Wang X, Ge S, McNamara G, Hao QL, Crooks GM, Nolte JA. Albumin expressing hepatocyte-like cells develop in the livers of immunodeficient mice that received transplants of highly purified human hematopoietic stem cells. *Blood*. 2003; 101(10): 4201-4208.
14. Okumoto K, Saito T, Hattori E, Ito JI, Suzuki A, Misawa K, et al. Differentiation of rat bone marrow cells cultured on artificial basement membrane containing extracellular matrix into a liver cell lineage. *J Hepatol*. 2005; 43(1): 110-116.
15. Lee OK, Kuo TK, Chen WM, Lee KD, Hsieh SL, Chen TH. Isolation of multipotent mesenchymal stem cells from umbilical cord blood. *Blood*. 2004; 103(5): 1669-1675.
16. Lee KD, Kuo TK, Whang-Peng J, Chung YF, Lin CT, Chou SH, et al. In vitro hepatic differentiation of human mesenchymal stem cells. *Hepatology*. 2004; 40(6): 1275-1284.
17. Kang XQ, Zang WJ, Song TS, Xu XL, Yu XJ, Li DL, et al. Rat bone marrow mesenchymal stem cells differentiate into hepatocytes in vitro. *World J Gastroenterol*. 2005; 11(22): 3479-3484.
18. Lange C, Bassler P, Lioznov MV, Bruns H, Kluth D, Zander AR, et al. Hepatocytic gene expression in cultured rat mesenchymal stem cells. *Transplant Proc*. 2005; 37: 276-279.
19. Snykers S, Vanhaecke T, Papeleu P, Luttun A, Jiang Y, Vander Heyden Y, et al. Sequential Exposure to Cytokines Reflecting Embryogenesis: The Key for in vitro Differentiation of Adult Bone Marrow Stem Cells into Functional Hepatocyte-like Cells. *Toxicol Sci*. 2006; 94(2): 330-341.
20. Ogawa S, Tagawa Y, Kamiyoshi A, Suzuki A, Nakayama J, Hashikura Y, et al. Crucial roles of mesodermal stem cell lineages in a murine embryonic stem cell-derived in vitro liver organogenesis system. *Stem cells*. 2005; 23(7): 903-913.
21. Nur-E-Kamal A, Ahmed I, Kamal JM, Schindler M, Meiners S. Three-Dimensional Nanofibrillar Surfaces Promote Self-Renewal in Mouse Embryonic Stem Cells. *Stem Cells*. 2006; 24(2): 426-433.
22. Schindler M, Nur-E-Kamal A, Ahmed I, Kamal J, Liu HY, Amor N, et al. Living in three dimensions: 3D nanostructured environments for cell culture and regenerative medicine. *Cell Biochem Biophys*. 2006; 45(2): 215-227.
23. Ng S, Wua YN, Zhou Y, Tohb YE, Ho ZZ, Chia SM, et al. Optimization of 3-D hepatocyte culture by controlling the physical and chemical properties of the extra-cellular matrices. *Biomaterials*. 2005; 26(16): 3153-3163.
24. Fassett JT, Tobolt D, Nelsen CJ, Albrecht JH, Hansen LK. The role of collagen structure in mitogen stimulation of ERK, cyclin D1 expression, and G1-S progression in rat hepatocytes. *J Biol Chem*. 2003; 278(34): 31691-31700.
25. Hansen LK, Albrecht JH. Regulation of the hepatocyte cell cycle by type I collagen matrix: role of cyclin D1. *J Cell Sci*. 1999; 112(Pt 17): 2971-2981.
26. Baghaban Eslaminejad M, Nikmahzar A, Taghiyar L, Nadri S, Massumi M. Murine mesenchymal stem cells isolated by low density primary culture system. *Dev Growth Differ*. 2006; 48(6): 361-370.
27. Schmidt C, Bladt F, Goedecke S, Brinkmann V, Zschiesche W, Sharpe M, et al. Scatter factor/hepatocyte growth factor is essential for liver development. *Nature*. 1995; 373(6516): 699-702.
28. Kinoshita T, Sekiguchi T, Xu MJ, Ito Y, Kamiya A, Tsuji K, et al. Hepatic differentiation induced by oncos-

tatin M attenuates fetal liver hematopoiesis. Proc Natl Acad Sci USA. 1999; 96(13): 7265-7270.

29. Miyajima A, Kinoshita T, Tanaka M, Kamiya A, Mukoyama Y, Hara T. Role of oncostatin M in hematopoiesis and liver development. Cytokine Growth Factor Rev. 2000; 11(3): 177-183.

30. Arias IM, Boyer J, Chisari F, Fausto N, Schachter D, Shafritz D. The liver biology and pathobiology. Phil-

adelphia: Lippincott Williams and Wilkins, 2001; Online access chapters W27 and W 28. Available from: <http://liver.med.tufts.edu>. (14 sep 2010).

31. Baharvand H, Hashemi SM, Kazemi Ashtiani S, Farrokhi A. Differentiation of human embryonic stem cells into hepatocytes in 2D and 3D culture systems in vitro. Int J Dev Biol. 2006; 50(7): 645-652.
