دانشور
پزشکی

دوماهنامه علمی – پژوهشی
دانشگاه شاهد
سال پانزدهم – شماره ۷۵
تیر ۱۳۸۷

وصول: ۸۵/۱۲/۲۳
پذیرش: ۸۶/۳/۲۲

مقایسه اثر فورسکولین با تأثیر بتامرکاپتو اتانول و رتینوئیک اسید در تمایز سلول شوان از سلول‌های استرومایی مغز استخوان

نویسندگان: بهار موقر[*1]، دکتر تقی طریحی[*2] و دکتر علیرضا مصباح‌نمین[3]

۱. دانشجوی دکتری علوم تشریح دانشگاه تربیت مدرس
۲. استاد گروه علوم تشریح دانشگاه تربیت مدرس
۳. استادیار گروه بیوشیمی دانشگاه تربیت مدرس

* نویسنده مسئول: Email: bhrmovaghar@yahoo.com

چکیده

مقدمه و هدف: سلول‌های استرومایی مغز استخوان، سلول‌هایی با منشأ مزودرمال هستند که قابلیت تمایز یافتن به سلول‌های سه‌لایه جنینی از جمله سلول‌های شوان را دارند. بتامرکاپتو اتانول و رتینوئیک اسید که هر دو القاکننده‌های عصبی هستند در روش تمایزی تثبیت‌شده توسط Dezawa در مراحل اولیه القا مورد استفاده قرار می‌گیرند. در این مطالعه، نقش فورسکولین به عنوان یک افزاینده cAMP داخل سلولی که می‌تواند در القای عصبی نقش داشته باشد در فرایند تمایز سلول شوان، مورد بررسی قرار گرفته است.

مواد و روش‌ها: سلول‌های استرومایی در دو گروه و طی دو مرحله پیش القا و القا تحت تأثیر القاکننده‌ها قرار گرفتند. پس از طی مراحل القا، سلول‌ها با آنتی‌بادی ضد S100 رنگ‌آمیزی‌شده، سلول‌های S100 مثبت شمارش و نسبت آن‌ها به کل سلول‌ها محاسبه شد. داده‌ها با استفاده از آزمون آماری آنوا (ANOVA)، مورد بررسی قرار گرفتند. جهت بررسی بیان ژن‌های پروتئین میلین صفر (myelin protein zero(P0))، فاکتور رشد عصبی (nerve growth factor(NGF))، اکتامر ۴ (octamer-4 (OCT-4)) و نورو D (NeuroD) در سلول‌های القاشده تکنیک RT-PCR به کار رفت.

نتایج: دو گروه آزمایشی از نظر آماری، تفاوت معناداری را در تعداد سلول‌های S100 مثبت، نشان دادند. گروهی که در آن از بتامرکاپتو اتانول و رتینوئیک اسید استفاده‌شده بود از لحاظ میزان بیان پروتئین S100 از گروهی که در آن از فورسکولین استفاده‌شده بود بالاتر بود. در گروه اول پس از طی مرحله پیش القا NGF به صورتی قوی و در هر دو گروه OCT-4 ضعیف بیان شد. پس از مرحله القا، هیچ یک از ژن‌های P0, NGF و NeuroD در گروه‌ها بیان نشد.

نتیجه‌گیری: فورسکولین، آثار القایی بتامرکاپتو اتانول و رتینوئیک اسید را در تمایز سلول‌های شوان از سلول‌های استرومایی مغز استخوان تقلید می‌کند. میزان کم‌تر بیان پروتئینS100 را در سلول‌های گروه دوم می‌توان به مدت زمان کوتاه‌تر القا با فورسکولین، ونه به عدم کفایت آن نسبت داد.سلول‌های القاشده، خاصیت نورونی نداشتند؛ زیرا هیچ‌یک از ژن‌های NeuroDو NGF در سلول‌های به دست آمده بیان نشد.

واژه‌های کلیدی: سلول استرومایی مغز استخوان، سلول شوان، فورسکولین

Archive of SID
www.SID.ir

مقدمه

مغز استخوان، ارگانی است که دو نوع سلول بنیادی بالغ دارد. سلول‌های بنیادی خون‌ساز (HSCs) که قادر به تمایز به استخوان، غضروف، چربی، بافت همبند فیبروز و خون هستند و سلول‌های استرومایی مغز استخوان (BMSCs) که کمی پس از کشف HSC شناخته شدند و قادرند همان جمعیت‌های سلولی را که HSC تولید می‌کنند به‌وجود آورند[۱]. این سلول‌ها در سال ۱۹۶۸ شناخته و به‌عنوان سلول‌هایی با منشأ مزودرمی، چسبنده، کلون‌ساز، غیرفاگوسیتوزکننده و از نظر رفتاری، شبیه فیبروبلاست معرفی شدند[۲]. این سلول‌ها، قادر به تمایز به سلول‌های استخوانی، غضروفی و چربی نیز هستند. تحقیقات اخیر نشان می‌دهند که آن‌ها علاوه بر تبدیل به سلول‌هایی با منشأ مزودرمی به سلول‌هایی با منشأ غیرمزودرمی، از جمله نورون‌ها، سلول‌های گلیال و سلول‌های کبدی نیز قابل تبدیل هستند[۳و۴].

برخلاف HSCها که در شرایط آزمایشگاهی(in vitro) تقسیم نمی‌شوند یا تقسیم محدودی دارند، سلول‌های استرومایی می‌توانند تا بیش از ۳۵ بار پاساژ تقسیم شوند. یکی از اهداف تحقیق بر روی سلول‌های استرومایی، استفاده از آن‌ها در کلینیک و برای درمان بیماری‌ها و ضایعات وارد بر ارگان‌های مختلف بدن است. همان‌گونه که پیش‌تر اشاره شد برخی محققان تمایز این سلول‌ها را به سلول‌های گلیال، از جمله سلول شوان گزارش کرده‌اند[۵]. سلول‌های شوان طی فرایند تکوین خود پروتئین سیتواسکلتی S-100 را بیان می‌کنند که می‌توان آن را به‌عنوان نشانگری برای تشخیص تمایز آن‌ها در محیط کشت آزمایشگاهی به کار برد[۶]. از جمله پروتئین‌هایی که پس از تمایز و ایجاد سلول‌های شوان میلین‌ساز در این سلول‌ها تولید می‌شوند P_0 است. این پروتئین سبب متراکم شدن میلین می‌گردد و خاص میلین اعصاب محیطی است[۷]. بیان ژن این پروتئین در برخی مراحل دیگر تکوینی این سلول نیز اتفاق می‌افتد، از آن جمله می‌توان mRNA مربوط به P_0 را از جمعیت‌های سلولی در حال مهاجرت سلول‌های ستیغ عصبی که قرار است سرنوشت گلیال پیدا کنند جدا کرد [۷]. برخی دانشمندان با استفاده از اطلاعات راجع به فرایند تکامل سلول‌های شوان در شرایط طبیعی (in vivo) و به کاربردن القاکننده‌های مربوط به تمایز این سلول‌ها توانسته‌اند تا حدودی فرایند تکوینی آن‌ها را در محیط کشت آزمایشگاهی تقلید کنند. از جمله Dezawa و همکارانش در تحقیق خود، سلول‌های استرومایی مغز استخوان را طی مرحله پیش القا با استفاده از بتامرکاپتو اتانول و رتینوئیک اسید و در مرحله القا با استفاده از فاکتورهای رشد پلاکتی، فیبروبلاستی و گلیالی و نیز فورسکولین به سلول‌های شوان متمایز سازند[۵]. القاکننده‌های مرحله پیش القا در واقع همان القاکننده‌های عصبی هستند که برای تمایز ابتدایی این سلول‌ها به سوی رده عصبی به کار می‌روند [۸و۹]. فورسکولین که یک افزاینده سطح cAMP داخل سلولی است می‌تواند سلول‌های استرومایی مغز استخوان را به سوی رده عصبی القا کند[۱۰]. همچنین آثار مضر احتمالی ناشی از بتا مرکاپتو اتانول در محیط کشت را نیز ندارد[۱۱]. از سوی دیگر از آن‌جا که فورسکولین با مکانیسم احتمالی افزایش بیان گیرنده‌های فاکتورهای رشد، قادر به افزایش پاسخ تقسیم سلولی در سلول‌ها است امکان دارد بتواند در مرحله پیش القا جانشین مناسبی برای بتامرکاپتو اتانول و رتینوئیک اسید باشد تا در مرحله القا به تأثیر بهتر القاکننده‌ها کمک کند[۱۲]. هدف از انجام این تحقیق، بررسی اثر فورسکولین به عنوان یک القاکننده در مرحله پیش القا بر تمایز سلول شوان است.

مواد و روش‌ها

کشت سلول‌های استرومایی مغز استخوان

موش های صحرایی ۸-۶ هفته‌ای با کلروفرم کشته شدند. سپس استخوان‌های تیبیا و فمور آن‌ها جداشده

Archive of SID

www.SID.ir

دو سر استخوان‌ها قطع شد. مغز استخوان با تزریق محیط کشت MEMα، به یک سر استخوان، خارج شد و سلول‌های به دست آمده، در محیط کشت MEMα حاوی ۱۰٪FCS، پنی‌سیلین و استرپتومایسین در دمای ۳۷° و رطوبت ۹۵ درصد و CO_2 ۵ درصد کشت داده شدند. پس از ۴۸ ساعت، سلول‌هایی که به کف ظرف پلاستیکی نچسبیده بودند با تعویض محیط، خارج شدند. سلول‌های استرومایی، ۴ بار با کنده‌شدن از کف ظرف توسط محلول تریپسین ۰/۰۴ درصد و ۰/۲۵EDTA درصد پاساژ داده شدند و پس از آن برای انجام آزمایش مورد استفاده قرار گرفتند.

تست فیبرونکتین

برای اطمینان از خالص بودن سلول‌های استرومایی مغز استخوان، سلول‌ها پس از ۴ بار پاساژ، با آنتی‌بادی نشانگر اختصاصی‌شان (آنتی‌بادی فیبرونکتین) رنگ‌آمیزی شدند.

آماده‌سازی سلول‌ها برای القا و شمارش سلولی

پس از چهارمین پاساژ سلولی، سوسپانسیون سلولی جداشده از کف ظرف، در ظرف کشت ۲۴ خانه‌ای که قبلاً در کف خانه‌های آن لامل‌های استریل قرار داده‌شده و روی لامل‌ها با ژلاتین ۰/۱ درصد استریل پوشانده شده بود ریخته شد. پس از آن‌که سلول‌ها تقریباً ۷۰ درصد از کف هر یک از چاهک‌ها را پر کردند چاهک‌ها به دو گروه به شرح زیر تقسیم و مواد القاکننده به آن‌ها اضافه شد.

مرحله القا مرحله پیش القا

1) BME+ RA PDGF + bFGF + FSK + HRG
2) FSK PDGF + bFGF + FSK + HRG

در گروه اول (به عنوان گروه کنترل مثبت) از پروتکل تثبیت‌شده Dezawa و همکارانش استفاده شد و محیط کشت سلول‌هایی که هنوز کاملاً کف ظرف را پر نکرده بودند، با محیط کشت MEMα حاوی یک میلی‌مول، بتا مرکاپتو اتانول (βME) در هر لیتر محیط کشت بدون سرم، تعویض‌شده، به مدت ۲۴ ساعت انکوبه گردید. پس از آن، محیط کشت بار دیگر تعویض، سلول‌ها با PBS شستشو، با محیط کشت MEMα حاوی ۱۰٪ FCS و ۳۵ng/ml ترانس رتینوئیک اسید (RA) جایگزین، و به مدت ۳ روز انکوبه شدند. پس از آن سلول‌ها مجدد با PBS شستشو گردیدند و به محیط کشت جدید، یعنی MEMα حاوی ۱۰٪ FCS، ۵ µm/ml فورسکولین(FSK)، ۱۰ng/ml bFGF، ۵ ng/ml PDGF و ۲۰۰ ng/ml هرگولین (HGR) منتقل و به مدت ۷ روز انکوبه شدند. در گروهی که در مرحله پیش القا از فورسکولین استفاده می‌شد، فورسکولین به میزان ۵µm/ml و به مدت ۲۴ ساعت به محیط کشت اضافه گردید.

برای ارزیابی میزان سلول‌های متمایزشده به سلول‌های شبه‌شوان، سلول‌ها پس از پشت سر گذاشتن مراحل القا، توسط تکنیک ایمونوسیتوشیمی با به‌کارگیری آنتی‌بادی اولیه S100 به عنوان نشانگر سلول‌های شوان[۱۳] رنگ‌آمیزی شدند. پس از آن، سلول‌هایی که به آنتی‌بادی S100 پاسخ مثبت داده بودند شمارش شدند و درصد آن‌ها نسبت به کل سلول‌ها محاسبه گردید. تعداد تکرار در هر گروه آزمایشی، پنج بار بود و در هر تکرار، پنج محدوده به طور تصادفی شمارش گردید و در پایان، نتایج به دست آمده با آزمون آماری واریانس (ANOVA) مورد بررسی آماری قرار گرفت.

تکنیک ایمونوسیتوشیمی

لامل‌های پوشیده از سلول‌های متمایزشده از کف چاهک‌ها، خارج و با PBS شستشو داده شدند. پس از آن، ثبوت سلول‌ها به مدت ۱۵ دقیقه با پارافرمالدئید ۴

Archive of SID

www.SID.ir

درصد انجام شد. سپس ترکیبی از تریتون X-100 ۰/۳ درصد با ۱۰ درصد سرم بز به مدت نیم ساعت بر روی سلول‌ها قرار گرفت. آنگاه آنتی‌بادی اولیه مونوکلونال خرگوشی S100 با رقت ۱ به ۱۵۰ بر روی نمونه‌ها ریخته شد و لامل‌ها به مدت یک شب در دمای ۴°c نگهداری شدند. پس از شستشو با PBS، آنتی‌بادی ضد خرگوشی کونژوگه‌شده با پراکسیداز با رقت ۱ به ۳۰۰ بر روی نمونه‌ها افزوده‌شد و به مدت دو ساعت در دمای اتاق انکوبه گردیدند و پس از شستشو با PBS محلول DAB ۰/۱ درصد به مدت ۱۵ دقیقه به آن اضافه شد. پس از شستشوی مجدد با PBS سلول‌ها آبگیری و در گزیلول قرار گرفته، چسبانده شدند.

در بررسی بیان پروتئین فیبرونکتین در سلول‌های استرومایی مغز استخوان، مراحل انجام تکنیک ایمونوسیتو شیمی به همین ترتیب بود. تنها از آنتی‌بادی گوسفندی علیه فیبرونکتین با رقت ۱ به ۱۰۰ و پس از آن آنتی‌بادی ثانویه فلورسانس‌دار ضد گوسفندی با رقت ۱ به ۵۰ به مدت دو ساعت استفاده شد. پس از شستشو با PBS اتیدیوم بروماید برای رنگ‌آمیزی هسته سلول‌ها به مدت ۲ تا ۳ ثانیه به نمونه‌ها اضافه‌شد و آنگاه با PBS شسته و در نهایت، نمونه با بافر گلیسرول چسبانده شد.

تکنیک RT-PCR

برای انجام تکنیک RT-PCR سلول‌های متمایزشده هر دو گروه و نیز سلول‌های مغز استخوان تمایز نیافته، از ظرف‌های کشت جدا شدند و RNA کل، توسط محلول RNX (سیناژن) از پلاک سلولی حاصل استخراج شد. پس از آن، واکنش رونویسی معکوس توسط آنزیم Reverse transcriptase(Fermentase) انجام شد و cDNA حاصل برای انجام مرحله PCR آماده گردید. پرایمرهای مورد استفاده در واکنش:PCR

پروتئین NGF:

Forward:
5'GCCCACTGGACTAAACTTCAGC3'
Reverse:
5'CCGTGGCTGTGGTCTTATCTC3'

پروتئین OCT-4:

Forward:
5'AAGCTGCTGAAAC AGAAGAGG3'
Reverse:
5'ACACGGTTCTCAATGCTAGTC3'

پروتئین P0:

Forward:
5'CTTCCAAAGGCTCTCAGGTG3'
Reverse:
5'ACGGTCACTTGTTCGAGTCC3'

پروتئین NeuroD:

Forward:
5'AAGCACCAGATGGCACTGTC3'
Reverse:
5'CAGGACTTGGATTCGATACAC3'

ژن β-2M به عنوان کنترل داخلی:

Forward:
5'CCGTGATCTTTCTGGTGCTT3'
Reverse:
5'TTTTGGGCTCCTTCAGAGTG3'

نتایج

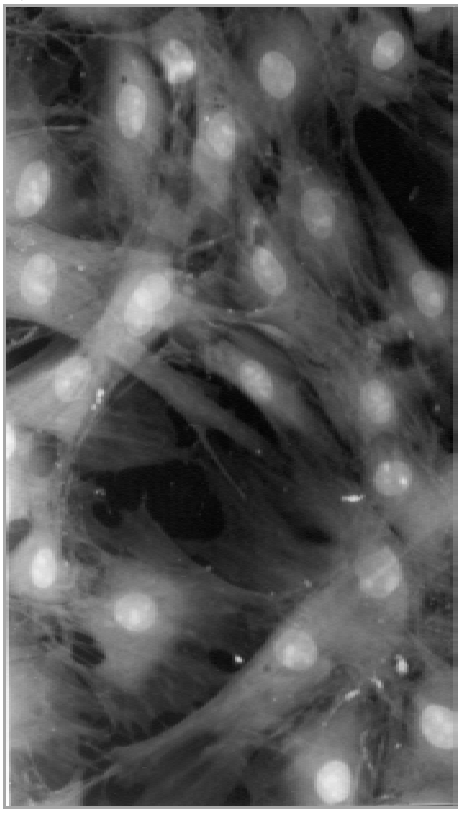
همان‌طور که پیش‌تر شرح داده شد سلول‌های استرومایی مغز استخوان، پس از چهار پاساژ برای سنجش درصد خلوص با آنتی‌بادی ضد فیبرونکتین مورد بررسی قرار گرفتند. در مشاهده با میکروسکوپ فلورسانس، سیتوپلاسم سلول‌های استرومایی مغز استخوان به رنگ سبز و هسته تمام سلول‌های موجود بر روی لامل به رنگ قرمز درمی‌آید (شکل۱). با شمارش این دو دسته سلول و محاسبه درصد سلول‌های فیبرونکتین مثبت به تعداد کل سلول‌ها معلوم شد که حدود ۹۵ درصد آن‌ها سلول‌های استرومایی مغز استخوان بودند که درصد خلوص مناسبی برای مراحل بعدی آزمایش بود.

در مرحله دوم و پس از کشت دادن سلول‌ها و القای آن‌ها در دو گروه آزمایشی، در پایان دوره القا، سلول‌ها توسط آنتی‌بادی S100 رنگ‌آمیزی شده، سلول‌های مثبت در هر محدوده، شمارش و نسبت درصد آن‌ها به کل سلول‌های آن محدوده محاسبه

Archive of SID
www.SID.ir

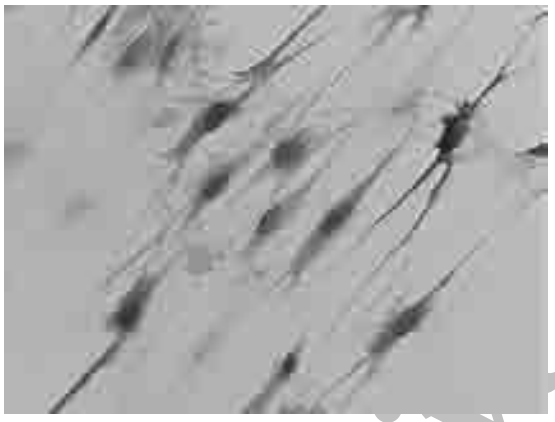
گردید. اگرچه سلول‌ها از نظر شدت بیان پروتئین S100 با یکدیگر تا حدودی متفاوت بودند، ولی تمام این سلول‌ها در دسته سلول‌های مثبت قرار گرفتند. از لحاظ مورفولوژی، سلول‌هایی که به آنتی‌بادی S100 پاسخ مثبت داده بودند دارای مورفولوژی ستاره‌ای و دوکی (مشابه مورفولوژی سلول‌های شوان جداشده از عصب در محیط کشت) بودند که در هر دو گروه آزمایشی ۱۰- ۱۵ درصد کل سلول‌های مثبت را سلول‌های دوکی شکل و بقیه را سلول‌های ستاره‌ای تشکیل می دادند (شکل‌های۲و۳).

نتایج آزمون آماری نشان داد که میزان بیان پروتئین S100 در گروه آزمایشی که در مرحله پیش القا از بتامرکاپتو اتانول و رتینوئیک اسید استفاده شده بود به میزان معناداری از گروه فورسکولین‌دار بالاتر بود.

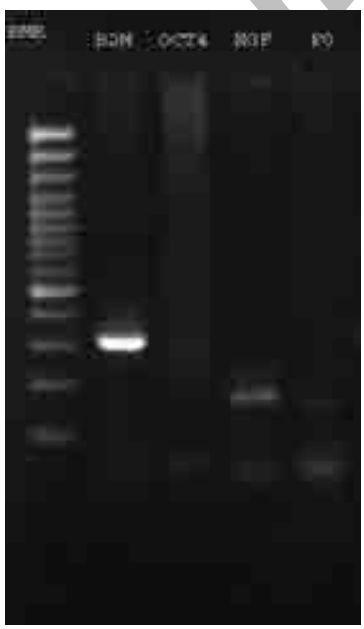


شکل ۱: سلول‌های استرومایی مغز استخوان تمایز نیافته، رنگ‌آمیزی با آنتی‌بادی علیه فیبرونکتین و اتیدیوم بروماید (بزرگنمایی ۴۰۰X).

شکل۲: سلول‌های تمایز یافته با مورفولوژی دوکی. رنگ‌آمیزی با آنتی‌بادی علیه.S100 (بزرگنمایی X ۴۰۰).

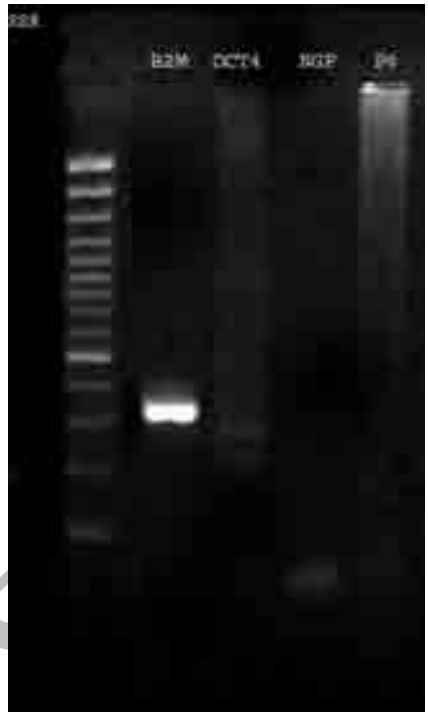


شکل۳: سلول‌های تمایز یافته با مورفولوژی فیبروبلاستی. رنگ‌آمیزی با آنتی‌بادی علیه.S100 (بزرگنمایی X ۴۰۰).



شکل ٤: بیان ژن‌های NGF،OCT-4، P0پس از مرحله پیش القا در گروه BME+ RA.

www.SID.ir



شکل ۵: بیان ژن‌های OCT-4،NGF، P0 پس از مرحله پیش القا در گروه FSK

نتایج مطالعات RT-PCR نشان داد که در سلول‌های استرومایی مغز استخوان، RNA مربوط به تمام ژن‌های مورد بررسی بیان می‌شوند و این در حالی است که پس از مرحله پیش القا در گروهی که تحت تأثیر بتامرکاپتو اتانول و رتینوئیک اسید قرار گرفته بود تنها NGF دارای باندی مشخص و قوی و OCT-4 و P0 دارای باندهای نامشخص و ضعیف بودند (شکل ۴).

در گروهی که تحت القای فورسکولین قرار گرفته بود باندهای مربوط به NGF وP0 دیده نشد و OCT-4 بیان بسیار ضعیفی داشت (شکل ۵)؛ اما پس از پایان مرحله القا، هیچ یک از ژن‌های NGF, P0 وNeuroD در سلول‌های تمایز یافته بیان نشد.

بحث و نتیجه‌گیری

در گروهی که در مرحله پیش القا از بتا مرکاپتو اتانول و رتینوییک اسید استفاده شده بود میزان بیان پروتئین S100 نسبت به گروه فورسکولین به صورت معنادار ($p<۰/۰۱$) بالاتر بود. بتا مرکاپتو اتانول و رتینوییک اسید به هنگام اضافه‌شدن به محیط کشت، سبب القای سلول‌های استرومایی مغز استخوان به سمت سلول‌های پیش ساز عصب‌شده، زمینه تمایز این سلول‌ها را به رده گلیالی فراهم می‌کند. از آن‌جا که افزایش cAMP در محیط کشت سلول‌های استرومایی مغز استخوان، منجر به تمایز این سلول‌ها به سمت پیش‌سازهای رده عصبی می‌شود[۱۰].

چنین عملکردی را از فورسکولین که یک افزاینده سطح cAMP داخل سلولی است می‌توان انتظار داشت [۱۴]. درصد کم‌تر سلول‌های مثبت در گروه فورسکولین را می‌توان به دوره کوتاه‌تر مرحله پیش القا در این گروه، یعنی یک روز در برابر چهار روز در گروه اول نسبت داد، نه عدم کارایی فورسکولین. احتمالاً به‌کارگیری متوالی بتا مرکاپتو اتانول و رتینوییک اسید به علت زمان طولانی‌تر مرحله پیش القا، سبب تمایز مطلوب‌تر سلول‌ها به سوی پیش‌سازهای عصبی نسبت به فورسکولین می‌شود. همان‌گونه که اشاره شد سلول‌های استرومایی مغز استخوان، پیش از تمایز، mRNA مربوط به هر چهار ژن NGF, NeuroD, OCT-4 و P0 را بیان می‌کنند.

از آن‌جا که سلول‌های استرومایی مغز استخوان در بلوغ و تمایز سلول‌های بنیادی خون‌ساز از طریق تماس سلولی نقشی اساسی دارند تعجب‌آور نیست که بتوانند انواع گوناگونی از فاکتورهای رشد و سایتوکاین‌ها را بیان و ترشح کنند[۱۵]. بیان پروتئین‌های NeuroD و NGF در سلول‌های استرومایی مغز استخوان در تحقیقات پیشین گزارش شده بود[۱۷و۱۶].

بیان OCT-4 نیز به دلیل بنیادی‌بودن این سلول‌ها دور از ذهن نیست، ولی تاکنون گزارشی مبنی‌بر بیان P0 در این سلول‌ها ارائه نشده است. از آن‌جا که پروتئین S100 علاوه بر سلول‌های شوان در برخی سلول‌ها با منشأ نورواکتودرمی نیز بیان می‌شود[۱۸] به منظور اطمینان از عدم وجود سلول‌هایی با ماهیت

Archive of SID
www.SID.ir

عصبی در میان سلول‌های تمایز یافته، این سلول‌ها از لحاظ بیان نشانگرهای عصبی، شامل NeuroD و NGF مورد ارزیابی قرار گرفتند. NeuroD، علامت مشخصه‌ای برای مراحل اولیه تمایز نورونی[۸] و NGF نوروتروفینی است که در مراحل اولیه تمایز نورونی بیان می‌شود [۱۹].

در پایان دوره القای سلولی، هیچ‌یک از این دو ژن در گروه‌های آزمایشی بیان نشد. این یافته نشان‌دهنده عدم وجود سلول‌های تمایزیافته به نورون در میان سلول‌های القا شده است. نتایج آزمایش RT-PCR در پایان مرحله پیش القا در گروه دوم آزمایش در مورد کاهش بیان پروتئین OCT-4 و P0 با نتایج به دست آمده از گروه اول مطابقت دارد. تنها تفاوت قابل‌مشاهده در مورد بیان قوی NGF در گروه اول پس از مرحله پیش القا و عدم بیان آن در گروه دوم است. این یافته احتمالاً به علت تمایز بهتر سلول‌ها در مرحله پیش القا در گروه اول به سلول‌های پیش‌ساز نورون است.

نتایج به دست آمده از RT-PCR در پایان مرحله القا در هر دو گروه مشابه است. نتایج به دست آمده می‌تواند شاهدی بر این مدعا باشد که فورسکولین قادر است آثار بتا مرکاپتو اتانول و رتینوییک اسید را در تمایز سلول‌های استرومایی مغز استخوان به سلول‌های شوان تا حدود زیادی تقلید کند.

منابع

1. Freidenstein AJ, Gorskaja JF and Kulagina NN. Fibroblast Precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs. Exp Hematol. 1976: 4: 267-274.

2. Bianco P and Robey PG. Marrow stromal stem cells. J Clin Investigation. 2000: 105: 1663-1667.

3. Sanchez RJ, Song S, Cardozo PF, Hazzi C, Stedeford T, Willing A, et al. Adult bone marrow stromal cells differentiate into neural cells in vitro. Exp Neurol. 2000: 164: 247-256.

4. Azizi SA, Stokes D, Augelli BJ, Digirolamo C and Prockop DJ. Engraftment and migration of human bone marrow stromal cells implanted in the brains of albino rats-similarities to astrocyte grafts. Proc Natl Acad Sci USA. 1998: 95: 3908-3913.

5. Dezawa M, Takahashi I, Esaki M, Takano M and Sawada H. Sciatic nerve regeneration in rats induced by transplantation of in vitro differentiated bone marrow stromal cells. Eur J Neurosci. 2001: 14: 1771-1776.

6. Jessen KR and Mirsky R. Signals that determine schwann cell identity. J Anat. 2000: 200: 367- 379.

7. Barkovich AJ. Concepts of myelin and myelination in neuroradiology. Am J Neuroradiol. 2000: 21: 1099-1109

8. Bossolasco P, CovaL, Calzarossa C, Rimoldi SG, Borsotti C, Deliliers GL, etal. Neuro-glial differentiation of human bone marrow stem cells in vitro. Exp Neurol. 2005: 193: 312-325.

9. Woodbury D, Schwarz EJ, Prockop DJ And Black IB. Adult rat and human bone marrow stromal cells differentiate into neurons. J Neurosci Res. 2000: 61: 364-370.

10. Deng W, Obroka M, Fischer I and Prockop DJ. In vitro differentiation of human marrow stromal cells into early progenitors of neural cells by conditions that increase intracellular cyclic AMP. Biochem Biophys Res Commun. 2001: 282: 148-152.

11. Lu P, Blesch A and Tuszynski MH. Induction of bone marrow stromal cells to neurons: differentiation, transdifferentiation or artifact? J Neurosci Res. 2004: 77: 174-191.

12. Kim HA, Ratner N, Roberts TM and Stiles CD. Schwann cell proliferative responses to cAMP and Nf1 are mediated by cyclin D1. J Neurosci. 2002: 21: 1110-1116.

13. Jessen KR and Mirsky R. Developmental regulation in the Shwann cell lineae. Adv Exp Med Biol. 1999: 468: 3-12.

14. Rahmatullah M, Schroering A, Ruthblum K, Stahl R, Urban B, Carey D, etal. Synergistic regulation of Schwann cell proliferation by heregulin and forskolin. Mol Cell Biol. 1998: 18: 6245-6252.

15. Deans RJ and Moseley AB. Mesenchymal stem cells: biology and potential clinical uses. Exp Hematol. 2000: 28: 875-884.

16. Woodbury D, Reynolds K and Black IB. Adult bone marrow stromal stem cells express germline, ectodermal, endodermal and mesodermal genes prior to neurogenesis. J Neurosci Res. 2002: 69: 908-917

17. Garcia R, Aguiar J, Alberti E, de la Cuetara K And Pavon N. Bone marrow stromal cells produce nerve growth factor and glial cell line-derived

Archive of SID

www.SID.ir

19. Yamaguchi S, Kurda S, Kobayashi H, Shichinohe H, Yano S, Hida K, etal. The effect of neuronal induction on gene expression profile in bone marrow stromal cells (BMSC) – a preliminary study using micro array analysis. Brain Res. In press 2006.

neurotrophic factors. Biochem Biophys Res Commun. 2004: 316: 753-754.

18. Krylyshkina O, Chen J, Mebis L, Denef C and Vankelecom H. Nestin- Immunoreactive cells in rat pituitary are neither hormonal nor typical Folliculo-Stellate cells. Endocrinology 2005: 146: 2376-2387.

Archive of SID

www.SID.ir