

جداسازی سلول‌های بنیادی مزانشیمی از بافت چربی و ریه‌ی موش BALB/c و مقایسه‌ی ایمونوفنوتایپ آن‌ها

زهرا حسین پور^۱، دکتر سید محمود هاشمی^۲، دکتر عیسی صالحی^۳، دکتر طوبی غضنفری^۴

نویسنده‌ی مسول: تهران، دانشگاه شاهد، مرکز تحقیقات تنظیم پاسخ‌های ایمنی tghazanfari@yahoo.com

دریافت: ۹۲/۳/۲۵ پذیرش: ۹۲/۶/۱۸

چکیده

زمینه و هدف: سلول‌های بنیادی مزانشیمی به دلیل توانایی تمایز به سلول‌های مختلف، تکثیر و کشت نسبتاً آسان و داشتن ویژگی‌های تعدیل ایمنی به عنوان منبعی امیدبخش از سلول‌های بنیادی برای ترمیم بافتی هستند. با وجود تحقیقات وسیع بر روی فنوتایپ ایمنی سلول‌های بنیادی مزانشیمی، نبود مارکر اختصاصی چالش‌هایی برای محققان در بر دارد. هدف از این مطالعه جداسازی سلول‌های بنیادی مزانشیمی از بافت چربی و ریه و مقایسه‌ی بیان مارکرهای پروتئینی در سطح این سلول‌ها است.

روش بررسی: سلول‌های بنیادی مزانشیمی از ریه و بافت چربی موش جداسازی و کشت شدند. محیط‌های تمایزی اختصاصی برای بررسی‌های تمایزی به آن‌ها اضافه شد. در نهایت میزان بیان آنتی ژن‌های سطحی با اضافه کردن آنتی‌بادی‌های مونوکلونال در دو جمعیت سلولی با روش فلوسیتومتری مورد مقایسه قرار گرفتند.

یافته‌ها: هر دو سلول بنیادی ساکن بافت به خوبی تکثیر شدند و تمایز به استئوسیت و آدیپوسیت در آن‌ها قابل مشاهده بود. همچنین سلول‌های بنیادی ریوی و بافت چربی دارای مارکرهای CD۹۰، CD۷۳ و CD۱۰۵ بودند و از طرفی دیگر مارکرهای CD۳۴، CD۴۵ و CD۱۱b را بیان نمی‌کردند. در این مطالعه سلول‌های بنیادی مزانشیمی ریوی دارای درصد پایین تری از مارکر CD۱۰۵ را نسبت به سلول‌های بنیادی مزانشیمی بافت چربی بودند.

نتیجه‌گیری: سلول‌های بنیادی مزانشیمی از ریه جداسازی شدند و مشابه سلول‌های بنیادی مزانشیمی بافت چربی مارکرهای شایع مرتبط با سلول‌های بنیادی مزانشیمی را بیان کردند.

واژگان کلیدی: سلول‌های بنیادی مزانشیمی، بافت چربی، ریه، موش BALB/c، ایمونوفنوتایپ

مقدمه

این سلول‌ها از تعداد زیادی از ارگان‌ها (۵) مانند مغز استخوان (۶)، بافت چربی (۷ و ۸)، پوست و طحال (۹)، ریه (۱۰) و کبد (۱۱) جدا شده‌اند. ریه دایما در معرض پاتوژن‌هایی است (۱۲) که منجر به ایجاد انواعی از بیماری‌های التهابی تنفسی

سلول‌های بنیادی مزانشیمی، زیر مجموعه‌ای هتروژن از سلول‌های پروژنیاتور پرتوان و فیروبیلاستی شکل هستند (۱ و ۲) و به دلیل قدرت تکثیر و تمایز بالا (۳) و ویژگی‌های ایمونولوژیک، منبعی امیدبخش برای ترمیم بافتی هستند (۴).

۱- کارشناس ارشد ایمونولوژی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه شاهد، تهران

۲- دکترای تخصصی ایمونولوژی، مرکز تحقیقات مهندسی بافت پویندگان

۳- دکترای تخصصی ایمونولوژی، استادیار دانشگاه علوم پزشکی تهران

۴- دکترای تخصصی ایمونولوژی، استاد مرکز تحقیقات تنظیم پاسخ‌های ایمنی، دانشگاه شاهد

CD۱۹ یا CD۷۹a عنوان کرد (۲۲ و ۲۱). با این وجود تحقیقات بر روی ارایه و بیان مارکرهای پروتئینی سلول‌های بنیادی مزانشیمی همچنان ادامه دارد (۲). با توجه به نقش سلول‌های بنیادی مزانشیمی در ترمیم بافت‌های آسیب دیده و ضرورت شناخت ویژگی‌های فنوتایپی آن‌ها برای جداسازی در مخلوطی از سایر سلول‌ها برای استفاده بهینه این سلول‌ها در مسایل بالینی و جایگزینی آن‌ها از بافت‌های مختلف، بررسی‌های مقایسه‌ای از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. از طرفی دیگر تابه‌حال ویژگی‌های فنوتایپی سلول‌های بنیادی مزانشیمی ریوی و بافت چربی با هم مقایسه نشده‌اند. به این هدف سلول‌های بنیادی مزانشیمی از دو بافت چربی و ریه موش‌های BALB/c جداسازی و کشت شدند. بررسی‌های تمایزی با استفاده از محیط‌های تمایزی مخصوص بر روی آن‌ها انجام شد. سپس با استفاده از روش فلوسایتومتری چندین مارکر سطحی آنالیز شدند و در نهایت بیان این مارکرها در سلول‌های بنیادی حاصل از دو بافت با هم مقایسه شدند.

روش بررسی

برای جداسازی و کشت سلول‌های بنیادی مزانشیمی از بافت‌های ریه و چربی ۵ سر موش استفاده شد. حیوانات مورد بررسی در این مطالعه، موش‌های نر بالغ BALB/c دارای سن ۶ تا ۸ هفته و سالم از مرکز نگهداری حیوانات در دانشکده‌ی پزشکی دانشگاه شاهد تهیه شدند. این کار در شورای پژوهشی دانشگاه شاهد به تصویب رسید.

جداسازی و کشت سلول‌های بنیادی مزانشیمی از بافت چربی: جداسازی و کشت سلول‌های بافت چربی مشابه روش Cho و همکارانش (۲۳) با اندکی تغییرات انجام شد. به‌طور خلاصه، بافت‌های چربی زیر صفاق موش‌ها جدا شدند و در Phosphate Buffer Saline (PBS) نگهداری شدند. بافت‌ها توسط اسکالپل ریز شدند و قطعات حاصل به‌منظور

می‌شوند. سلول‌های پروژنیاتور اندوژن ریه در ترمیم ریوی شرکت می‌کنند (۱۳). لاما همکارانش در سال ۲۰۰۷ سلول‌های بنیادی مزانشیمی را از لاواژ برونکوالوئولار جدا کردند (۱۲). حضور سلول‌های بنیادی مزانشیمی در ریه موش C57BL/6 (۴) و جداسازی آن‌ها از بافت‌های ریوی جنینی انسان (۱۴) گزارش شده است. رویکردهای سلول درمانی در ریه بر روی استفاده از سلول‌های بنیادی ساکن سایر بافت‌ها تمرکز کرده‌اند (۱۵). زاک و همکارانش در سال ۲۰۰۲ جمعیتی از سلول‌های بنیادی مزانشیمی را از بافت چربی جداسازی کردند (۱۶). بافت چربی به دلیل فراوانی و سهولت جداسازی (۱۷)، منبعی جایگزین برای سلول‌های بنیادی مزانشیمی به شمار می‌رود (۱۸). سلول‌های بنیادی مزانشیمی بافت چربی با سرکوب استرس اکسیداتیو و التهاب، آسیب ریوی را کاهش می‌دهند (۱۹). اما با وجود دسترسی دشوار به بافت ریه، به دلیل مقیم بودن سلول‌های بنیادی در موضع، قبل از استفاده از سلول‌های بنیادی سایر بافت‌ها در ترمیم ریه آسیب دیده، تحقیقات پایه‌ی بیشتری ضروری به نظر می‌رسد. علیرغم فراوانی اطلاعات در کاربرد سلول‌های بنیادی فوق در زمینه‌های بالینی متفاوت و مقادیر وسیع آزمایشات متمرکز روی سلول‌های بنیادی مزانشیمی، سوالاتی در مورد زیست‌شناسی آن‌ها از جمله فنوتایپ این سلول‌ها باقی مانده است. در بسیاری از تحقیقات انواعی از مارکرها نظیر ملکول‌های چسبندگی، رسپتورهای فاکتور رشد، رسپتورهای سایتوکاینی و کموکاینی، آنتی‌ژن‌های رده‌ای و پروتئین‌های مرتبط با ایمنی بر روی سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از بافت‌های مختلف بررسی شده‌اند (۲۰). مارکرهای متعددی برای آن‌ها پیشنهاد شده است، اما هیچ یک از آن‌ها به‌عنوان مارکر اختصاصی معرفی نشده‌اند (۱۷). لذا انجمن بین‌المللی سلول درمانی یکی از معیارهای شناسایی سلول‌های بنیادی مزانشیمی را وجود مارکرهای CD۱۰۵، CD۷۳، CD۹۰ و عدم بیان مارکرهای CD۳۴، CD۴۵، HLADR، CD۱۱b و

مطالعه‌ی حاضر بین پاساژهای دوم و سوم انجام گرفتند. تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی به آدیپوسیت: ارزیابی تمایز به آدیپوسیت با حداقل سه تکرار برای سلول‌های مشتق از هر بافت انجام شد. در پاساژ ۲، برای ارزیابی ظرفیت تمایزی به آدیپوسیت‌ها، محیط کشت سلول‌های حاصل از بافت چربی و ریه برداشته شد و به جای آن محیط القاکننده‌ی آدیپوژنز اضافه شد. این محیط دارای ۰/۵ mM ایزوبوتیل متیل گزانتین، ۱۰۰ μM ایندومتاسین و ۰/۱ μM دگزامتازون و ۵ μM انسولین (Sigma) بود. با گذشت سه هفته، محیط‌های کشت تمایزی کاملاً تخلیه شدند و سلول‌ها با محلول پارافرمالدید فیکس شدند. سپس با تخلیه محلول تثبیت کننده، محلول رنگ Oil Red- O به سلول‌ها اضافه شد. در نهایت پس از شستشو با PBS، سلول‌های رنگ‌آمیزی شده با میکروسکوپ ارزیابی شدند و از آن‌ها عکس گرفته شد.

تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی به استئوسیت: بررسی تمایز به استئوسیت با حداقل سه تکرار برای سلول‌های مشتق از هر بافت انجام شد. برای ارزیابی ظرفیت تمایزی به استئوسیت‌ها، محیط کشت استرومال با محیط تمایز به استخوان در پاساژ ۲ تعویض شد. این محیط دارای ۱۰ mM بتا گلیسرول فسفات (Merck)، ۱۰ nM دگزامتازون و ۵۰ μg/ml اسکوریات ۲ فسفات (Sigma) بود. با گذشت سه هفته، محیط‌های کشت تمایزی کاملاً تخلیه شدند و سلول‌ها با محلول پارافرمالدید فیکس شدند. سپس با تخلیه محلول تثبیت کننده، محلول رنگ Alizarin Red به سلول‌ها اضافه شد. در نهایت پس از شستشو با PBS، سلول‌های رنگ‌آمیزی شده با میکروسکوپ ارزیابی شدند و از آن‌ها عکس گرفته شد.

آنالیز فلوسایتومتری: آنالیز فلوسایتومتری با حداقل سه تکرار برای سلول‌های مشتق از هر بافت انجام شد. سلول‌های حاصل از بافت‌های ریه و چربی در پاساژ ۲ تا ۳ مورد ارزیابی فنوتایپی با روش فلوسایتومتری قرار

هضم در کلاژناز ۰/۰۷۵ درصد (GIBCO)، در ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۳۰ دقیقه قرار گرفتند. سپس آنزیم توسط (GIBCO) (DMEM) Dulbecco's Modified Eagle's Medium به همراه ۱۰ درصد (GIBCO) (FBS) Fetal Bovine Serum خنثی شد و مخلوط سلولی در ۳۰۰ rpm به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ شد. در نهایت رسوب سلولی به دست آمده در فلاسک‌های حاوی محیط کشت DMEM، ۱۰ درصد FBS و ۱ درصد پنی‌سیلین / استرپتومایسین کشت داده شد و در انکوباتور ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد، رطوبت ۹۰ درصد و ۵ درصد CO₂ قرار گرفتند.

جداسازی و کشت سلول‌های بنیادی مزانشیمی از ریه: جمع‌آوری و کشت سلول‌های ریوی مشابه روش McQualter و همکارانش (۲۴) با مقداری تغییرات انجام گرفت. به‌طور خلاصه، ریه‌ها از موش‌ها جدا شدند و در PBS قرار گرفتند. ریه‌ها به قطعات کوچک خرد شدند و سپس در ۱۵۰ rpm به مدت ۵ دقیقه سانتریفوژ شدند. قطعات ریز درون لوله حاوی کلاژناز ۰/۰۷۵ درصد برای هضم گذاشته شده و در انکوباتور ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۶۰ دقیقه قرار گرفتند. سپس به منظور خنثی‌سازی آنزیم به مخلوط حاصل DMEM به همراه ۱۰ درصد FBS اضافه شد. این لوله در ۱۵۰ rpm به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ شد و پس از تخلیه سوپ رویی، به رسوب سلولی PBS اضافه شد. سپس سلول‌های بنیادی مزانشیمی با گرادیان فایکول با استفاده از روش‌های استاندارد جدا شدند. در نهایت رسوب سلولی در فلاسک‌های حاوی محیط کشت DMEM، ۱۰ درصد FBS و ۱ درصد پنی‌سیلین / استرپتومایسین کشت شد و در انکوباتور ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد، رطوبت ۹۰ درصد و ۵ درصد CO₂ قرار داده شدند. زمانی که فلاسک‌های کشت حدود ۷۰ تا ۹۰ درصد توسط سلول‌ها پر شدند، با تریپسین مورد هضم قرار گرفتند و سوسپانسیون حاصل کشت مجدد شد. تمامی تست‌ها در

معیار بیان شده است. $P \text{ value} < 0/05$ از لحاظ آماری معنی دار تلقی شده است.

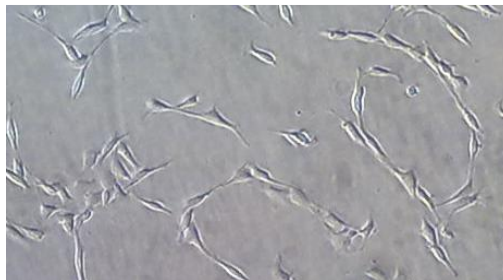
یافته‌ها

مورفولوژی و تکثیر سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از ریه و بافت چربی: سلول‌های بنیادی مزانشیمی از بافت‌های چربی و ریه موش‌های بالغ BALB/c جدا شدند و تکثیر یافتند. این سلول‌ها پس از کشت اولیه به فلاسک‌های پلاستیکی کشت چسبیدند. شکل ۱، اندازه و شکل ظاهری سلول‌های مذکور را در پاساژ سوم به تصویر کشیده است. هر چند سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از بافت چربی کمی کشیده‌تر از سلول‌های مشتق از بافت ریه به نظر می‌رسند، اما سلول‌های حاصل از هر دو نوع بافت اشکال فیبروبلاستوئید را نشان دادند. با بالا رفتن پاساژها خلوص سلول‌ها افزایش یافت، به طوری که بین پاساژ ۲-۳ هر دو جمعیت سلولی مشتق از بافت تقریباً هموزن بودند (شکل ۱)

گرفتند. حدود 1×10^5 سلول با مقادیر مناسبی از آنتی‌بادی مونوکلونال کونژوگه با فلئوئورسین ایزوتیوسیانات (Fluorescein Isothiocyanate) ضد مارکرهای CD۹۰ و CD۳۴ و نیز آنتی‌بادی مونوکلونال کونژوگه با فیکواریترین (Phycoerythrin) ضد مارکرهای CD۱۰۵، CD۷۳، CD۱۱b و CD۴۵ و یا آنتی‌بادی ایزوتایپ کنترل مرتبط در دمای ۴ درجه‌ی سانتی‌گراد در تاریکی به مدت ۳۰ تا ۴۵ دقیقه انکوبه شدند. تمامی آنتی‌بادی‌های مونوکلونال مورد استفاده در این مطالعه از شرکت eBioscience خریداری شدند. سپس سلول‌ها با PBS شستشو شدند و بررسی‌های ایمونوفلورسین با استفاده از یک دستگاه FACSCalibur (Becton Dickinson) انجام شد و یافته‌ها با نرم‌افزار Cyflogic (CyFlo Ltd.) آنالیز شدند. در این تست مقادیر زیر ۵ درصد منفی و بالای ۵ درصد مثبت در نظر گرفته شد.

آنالیز آماری: از آنالیز واریانس چند جانبه برای تجزیه و تحلیل داده‌ها استفاده شد و نتایج به صورت میانگین \pm انحراف

A



سلول‌های بنیادی مزانشیمی بافت چربی

B

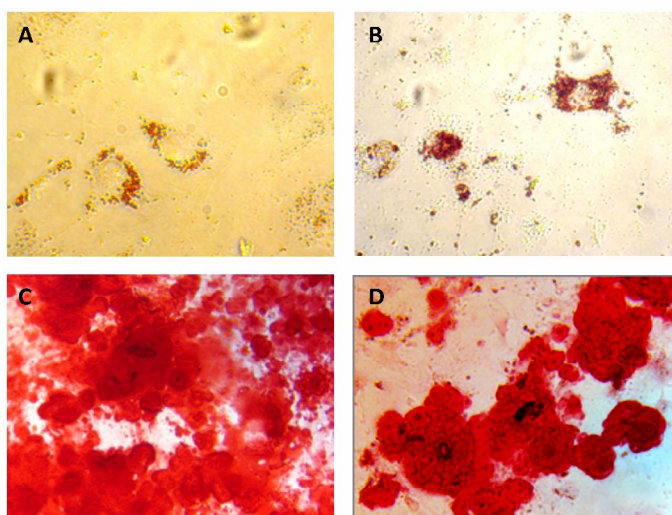


سلول‌های بنیادی مزانشیمی ریوی

شکل ۱: مورفولوژی سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از ریه و بافت چربی موش BALB/c اشکال فیبروبلاستی سلول‌ها در پاساژ سوم در بافت چربی (A) و بافت ریه (B) مشاهده شدند (×۲۰). سلول‌های چسبیده از بافت‌های مذکور جداسازی و سپس کشت شدند. پس از پر شدن فلاسک‌ها تا حدود ۷۰ تا ۹۰ درصد، سلول‌ها تریپسین شدند و سوسپانسیون سلولی حاصل تا رسیدن به پاساژ سوم کشت مجدد شدند.

سلول‌های بنیادی حاصل از هر دو نوع بافت مشابه یکدیگر بودند (شکل ۲ A,B). همچنین با استفاده از محیط استئوژنیک، به مدت ۲۱ روز و رنگ‌آمیزی با Alizarin Red رسوبات کلسیم به صورت نواحی قرمز رنگ به خوبی در سلول‌های مشتق از هر دو نوع بافت مشهود بودند (شکل ۲). تقریباً کلسیفیکاسیون در سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از هر دو بافت یکسان است (شکل ۲ C,D).

پتانسیل تمایزی *in vitro* در سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از ریه و بافت چربی: در پاساژ دوم پتانسیل تمایزی سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از ریه و بافت چربی با استفاده از محیط‌های القاکننده اختصاصی بررسی شد. با گذشت سه هفته، در پلیت‌های حاوی سلول و محیط تمایزی به آدیپوسیت، وزیکول‌های لیپیدی پس از رنگ‌آمیزی با Oil Red-O دیده شدند (شکل ۲). واکویل‌های لیپیدی در



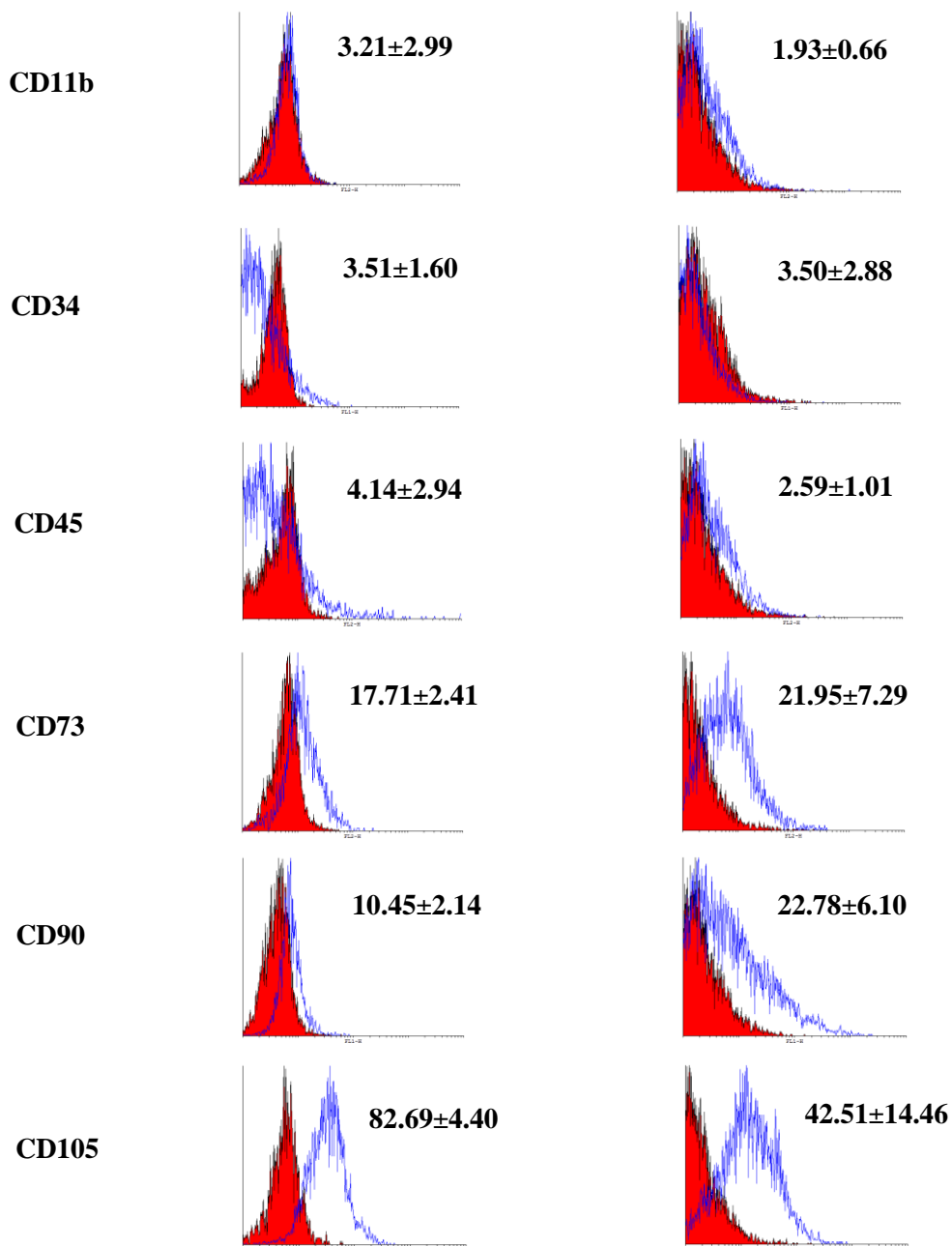
سلول‌های بنیادی مزانشیمی بافت چربی

سلول‌های بنیادی مزانشیمی بافت ریه

شکل ۲: تمایز *In vitro* سلول‌های بنیادی مزانشیمی. در پاساژ دوم سلول‌های بنیادی مزانشیمی بافت چربی (A و C) و سلول‌های بنیادی مزانشیمی ریوی (B و D) در محیط‌های تمایزی خاص انکوبه شدند. پس از ۳ هفته تمایز به آدیپوسیت با رنگ‌آمیزی توسط Oil Red-O (A و B) و تمایز به استئوسیت توسط رنگ‌آمیزی با Alizarin Red (C و D) تشخیص داده شد. یک نمونه از نتایج مربوط به سلول‌های بنیادی جدا شده از بافت چربی و ریه ۵ سر موش BALB/c نشان داده شده است.

مزانشیمی، CD₁₀₅ (SH₂ / Endoglin)، CD₇₃ (SH₃) و CD₉₀ (Thy-1)، را بیان کردند. در مقابل، مارکرهای CD₄₅ (به عنوان مارکر همه لکوسیت‌ها)، CD₃₄ (مارکر سلول‌های بنیادی هماتوپوئیتیک) و CD_{11b} (مارکر ماکروفاژی) در سطح این سلول‌ها بیان بسیار کمی داشتند (نمودار ۱).

ایمونوفنوتایپ سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از بافت چربی و ریه: پس از رشد و تکثیر سلول‌های هر دو بافت، ایمونوفنوتایپینگ برای حضور مارکرهای آنتی‌ژنی در سطح سلول‌های بنیادی مزانشیمی با استفاده از فلوسایتومتری روی سلول‌های چسبنده مشتق از ریه و بافت چربی انجام شد. هر دو سلول مارکرهای گزارش شده برای سلول‌های بنیادی



سلول‌های بنیادی مزانشیمی بافت چربی

سلول‌های بنیادی مزانشیمی ریه

نمودار ۱: نمودار هیستوگرام مارکرهای سطحی سلول‌های بنیادی مزانشیمی. آنتی‌ژن‌های سطحی سلول‌های بنیادی مزانشیمی ریه (راست) و بافت چربی (چپ) با روش فلوسایتومتری سنجیده شدند. رنگ قرمز نشان‌دهنده آنتی‌بادی ایزوتایپ کنترل و رنگ آبی نمایانگر تست‌ها می‌باشد. یک نمونه از نتایج مربوط به سلول‌های بنیادی جدا شده از بافت چربی و ریه ۵ سر موش BALB/c نشان داده شده است.

از ریه نشان داد. به علاوه این مارکر نسبت به CD۹۰ و CD۷۳ در تعداد بیشتری از سلول‌های جدا شده از هر دو بافت بیان شده است (جدول ۱). همان‌طور که در جدول ۱ نشان داده شده است، نتایج آنالیز آماری تفاوت معنی‌داری ($P=۰/۰۰۷$) در مورد میزان بیان مارکر CD۱۰۵ در بین دو جمعیت سلولی دارد.

در بین آنتی‌ژن‌های پروتئینی سطحی تفاوت معنی‌دار و قابل توجهی در مارکرهای منفی CD۴۵، CD۱۱b و CD۳۴ در هر دو جمعیت سلولی دیده نشد. همچنین در بیان مارکرهای CD۹۰ و CD۷۳ در سلول‌های بنیادی مزانشیمی ریوی و بافت چربی نیز اختلاف معنی‌داری دیده نشد. بر عکس دو مارکر قبل، آنتی‌ژن CD۱۰۵ در سطح سلول‌های بنیادی بافت چربی میانگین درصد بالاتری را نسبت به سلول‌های جدا شده

جدول ۱: مقایسه‌ی میزان بیان مارکرهای پروتئینی سطحی سلول‌های بنیادی مزانشیمی ریوی و بافت چربی موش BALB/c

P value	سلول‌های بنیادی مزانشیمی بافت		آنتی‌ژن‌های سطحی سلول
	چربی	سلول‌های بنیادی مزانشیمی ریوی	
۰/۵۸۹	۴/۱۴±۲/۹۴	۲/۵۹±۱/۰۱	CD45
۰/۹۹۵	۳/۵۱±۱/۶۰	۳/۵۰±۲/۸۸	CD34
۰/۶۵۳	۳/۲۱±۲/۹۹	۱/۹۳±۰/۶۶	CD11b
۰/۰۵۸	۱۰/۴۵±۲/۱۴	۲۲/۷۸±۶/۱۰	CD90
۰/۳۴۰	۱۷/۷۱±۲/۴۱	۲۱/۹۵±۷/۲۹	CD73
۰/۰۰۷	۸۲/۶۹±۴/۴۰	۴۲/۲۱±۱۴/۴۶	CD105

بر روی سلول‌های مشتق از مغز استخوان تمرکز یافته‌اند. در سال‌های اخیر مطالعاتی در مورد اثبات وجود این سلول‌ها در بافت‌های مختلف بدن جهت نیل به اهداف کاربردی و سلول درمانی صورت پذیرفته است. بافت چربی به علت فراوانی و سهولت در جداسازی برای سلول‌های بنیادی مزانشیمی یک منبع کاربردی محسوب می‌شود (۱۷). از طرفی ذخیره مشابهی از این سلول‌ها در ریه جدا شده است (۴). تاکنون تحقیقات وسیعی در مورد فنوتایپ ایمنی سلول‌های بنیادی مزانشیمی انجام شده است، اما فقدان مارکر اختصاصی منحصر به فرد هنوز چالش‌هایی را برای محققان به همراه دارد (۲۵). به‌رحال شناسایی و درک بهتر آنتی‌ژن‌های سطحی موجود در روی سلول‌های بنیادی مزانشیمی ساکن بافت‌های بالغین برای جداسازی موثرتر این سلول‌ها از بافت‌ها برای کاربردهای

جدول ۱ سلول‌های بنیادی مزانشیمی با استفاده از آنتی‌بادی مونوکلونال و یا آنتی‌بادی ایزوتایپ کنترل رنگ‌آمیزی شدند و مارکرهای سطحی توسط فلوسایتومتر بررسی شدند. بیان مارکرهای CD۱۱b، CD۳۴ و CD۴۵ در سطح سلول‌های بنیادی ساکن هر دو بافت کم بودند. همچنین آنتی‌ژن‌های CD۹۰، CD۷۳، CD۱۰۵ در سطح هر دو جمعیت سلولی مشاهده شدند. اختلاف معنی‌داری نیز در مارکر CD۱۰۵ بین دو سلول بنیادی ساکن بافت دیده شد. میانگین \pm انحراف معیار حاصل از سلول‌های بنیادی جدا شده از سر موش در جدول آمده است.

بحث

اکثر مطالعات در زمینه‌ی سلول‌های بنیادی مزانشیمی

سوی دیگر کرن و همکارانش در مطالعه‌ی خود بر روی سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از بافت چربی، مغز استخوان و خون بندناف انسانی به توان تکثیر پایین این سلول‌های مشتق از چربی و مغز استخوان در مقابل سلول‌های حاصل از خون بندناف اشاره کردند (۲۶). بنابراین گزارش‌های قبلی با نتایج این مطالعه در زمینه‌ی تکثیر بالای سلول‌های بنیادی مزانشیمی ریوی مطابقت دارد. همچنین تمایز به آدیپوسیت‌ها و استئوسیت‌ها در سلول‌های بنیادی بافت چربی و ریه در این مطالعه، نتایج سایر محققان را در این زمینه تایید می‌کند (۲۹-۲۷ و ۱۵). کروی و همکارانش نشان دادند که سلول‌های استرومایی مزانشیمی جدا شده از پارانشیم ریه انسان فاقد آنتی‌ژن‌های CD۳۴ و CD۴۵ هستند (۱۵). گزارش چو و همکارانش بر روی سلول‌های بنیادی حاصل از بافت چربی در موش‌های BALB/c عدم بیان مارکرهای CD۱۱b و CD۴۵ را نشان داد (۲۳). در مطالعه‌ی دیگری طاه‌ها و همکارانش مارکرهای CD۱۱b، CD۴۵ و CD۳۱ را در سلول‌های بنیادی جدا شده از بافت چربی منفی گزارش کردند (۲۷). همچنین در مطالعه‌ی هاشمی و همکارانش سلول‌های بنیادی مزانشیمی جدا شده از بافت چربی سه گونه‌ی موش BALB/c، C۵۷BL/۶ و DBA از نظر مارکرهای CD۴۵، CD۱۱b، CD۳۱ و CD۳۴ منفی گزارش شدند (۳۰). به این ترتیب، نتایج حاصل از این مطالعه در مورد عدم بیان مارکرهای CD۳۴، CD۱۱b و CD۴۵ در سطح سلول‌های بنیادی مشتق از دو بافت چربی و ریه تمامی گزارشات فوق را مورد تأیید قرار می‌دهند. آنتی‌ژن سطحی CD۷۳ در سطح سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از ریه (۲۱/۹۵ درصد) و بافت چربی (۱۷/۷۱ درصد) بیان شد. CD۹۰ در سلول‌های بنیادی مزانشیمی ریوی (۲۲/۷۸ درصد) بیش از سلول‌های بنیادی بافت چربی (۱۰/۴۵ درصد) بود. تفاوت‌ها در میزان بیان CD۷۳ و CD۹۰ می‌تواند به علت منشا سلول‌ها از بافت‌های مختلف باشد. به‌رحال تفاوت

درمانی ضروری خواهد بود. بنابراین در این مطالعه به مقایسه‌ی سه مارکر مثبت و سه مارکر منفی گزارش شده در سلول‌های بنیادی مزانشیمی حاصل از بافت چربی و ریه پرداخته شده است. بدین منظور پس از جداسازی این سلول‌ها از بافت‌های مذکور و کشت آنها، با اضافه کردن محیط تمایز به سلول استخوان یا سلول چربی، تمایز در سلول‌های بنیادی ریوی و بافت چربی بررسی شد و با انجام فلوسایتومتری میزان بیان مارکرهای فوق در سلول‌های بنیادی دو بافت چربی و ریه با هم مقایسه شدند. در این مطالعه سلول‌های بنیادی جدا شده از بافت چربی و ریه دارای مورفولوژی مشابه بودند، اما میزان تکثیر در سلول‌های حاصل از بافت ریه اندکی بیشتر از بافت چربی قابل مشاهده بود. بررسی‌های تمایزی *In vitro* بر روی سلول‌های بنیادی ریوی و بافت چربی، توانایی تمایز آنها را به استئوسیت‌ها و آدیپوسیت‌ها نشان داد و تفاوتی در ویژگی‌های تمایزی هر دو سلول دیده نشد. دو جمعیت سلولی، از لحاظ ایمونوفنوتایپی، مارکرهای CD۳۴، CD۱۱b و CD۴۵ را بیان نکردند. به علاوه، بیان CD۷۳، CD۱۰۵ و CD۹۰ توسط سلول‌های بنیادی مشتق از ریه و بافت چربی قابل مشاهده بودند. به‌جز مارکر CD۱۰۵، در سایر آنتی‌ژن‌های سطحی تفاوت معنی‌داری بین هر دو جمعیت سلولی دیده نشد. آنالیز فلوسایتومتری پایین بودن میزان بیان مارکر CD۱۰۵ ($P=۰/۰۰۷$) را در سلول‌های بنیادی مزانشیمی ریوی نسبت به همین سلول‌ها در بافت چربی نشان داد. درصد سلول‌های بنیادی مزانشیمی $CD105^+$ در ریه و بافت چربی به ترتیب ۴۲/۵۱ و ۸۲/۶۹ درصد بودند. اگرچه در مطالعاتی بررسی ویژگی‌های سلول‌های بنیادی مزانشیمی در بافت چربی یا ریه به‌طور جداگانه صورت پذیرفته ولی تاکنون در هیچ مطالعه‌ای شاخص‌های این سلول‌ها در دو بافت ریه و چربی با هم مقایسه نشده‌اند. هوا و همکارانش توان تکثیر بالایی را در سلول‌های بنیادی مزانشیمی ریه جنینی گزارش کردند (۱۴). از

روی سلول‌های بنیادی مزانشیمی ریه و استخوان، در مجموع درصد بسیار کمی برای سلول‌های $CD105^+$ (به‌طور میانگین حدود ۳/۸ درصد) در بافت ریه نسبت به سلول‌های مشتق از مغز استخوان (حدود ۷ درصد) نشان داد که نسبت به مطالعه‌ی حاضر (۴۲/۵۱ درصد) بسیار کمتر بوده است. این در حالی است که در گزارش قبلی سلول‌های بیان‌کننده‌ی $CD73$ در ریه (۵۵ درصد) نشان‌دهنده‌ی جمعیت بیشتری نسبت به سلول‌های $CD105^+$ در همین بافت بودند (۳۴). همچنین برنال و همکارانش نیز سلول‌های بنیادی مزانشیمی را از پوست و ریه جداسازی کردند که حدود ۲۹/۷ درصد از سلول‌های جداسازی شده از ریه دارای مارکر $CD105$ بودند و سلول‌های بنیادی ساکن پوست از لحاظ این آنتی‌ژن درصد بیشتری (۳۳/۲ درصد) را به‌خود اختصاص دادند (۴). به‌نظر می‌رسد نتایج این مطالعه تا حدودی پایین بودن میزان بیان $CD105$ بر روی سلول‌های بنیادی مزانشیمی ریوی را در بررسی قبل تایید می‌کند. به‌رحال با توجه به تحقیقات ذکر شده و مقایسه‌ی آن‌ها با نتایج حاصل از بررسی‌های ایمونوفنوتایپی مطالعه‌ی حاضر، یکی از دلایل احتمالی برای درصد پایین سلول‌های بنیادی بالغین دارای $CD105$ در ریه نسبت به بافت چربی می‌تواند به‌دلیل اثر کنام (Niche) موضعی و نیز نوع بافتی باشد که سلول‌های بنیادی مزانشیمی از آن سرچشمه گرفته‌اند. به‌علاوه در مطالعات محققان قبلی سنجش $CD105$ در سلول‌های بنیادی مزانشیمی در گونه‌های مختلف (موش و انسان) درصدهای متفاوتی را در بیان این مارکر نشان می‌دهد. از سوی دیگر تفاوت‌هایی که در نحوه‌ی جداسازی و یا شرایط کشت سلول‌های بنیادی مزانشیمی از بافت چربی و ریه وجود دارد، ممکن است باعث بیان مقادیر متفاوت $CD105$ در دو جمعیت سلولی شود. با توجه به اهمیت سلول‌های بنیادی مزانشیمی در پزشکی ترمیمی و اینکه شاید استفاده از منابع در دسترس این سلول‌ها برای ترمیم بافت‌های مختلف مناسب‌تر باشد، به‌نظر می‌رسد انجام

معنی‌داری در میزان بیان این دو مارکر در هر دو سلول بنیادی مشاهده نشد. از سویی بیان $CD90$ و $CD73$ در مطالعه‌ی حاضر مشابه سایر مطالعات انجام شده بر روی سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از ریه (۴) و بافت چربی (۱۷) موش است. اندوگلین ($CD105$) به عنوان یک $TGF-\beta$ رسپتور تایپ III (۳۱) در سطح سلول‌های اندوتلیال، ماکروفاژ و سلول‌های استرومایی بافت همبند عمل می‌کند (۳۲). درصد سلول‌های بنیادی مزانشیمی بیان‌کننده‌ی $CD105$ در بررسی‌های مختلف به صورت متفاوت بیان شده است. در یک بررسی بر روی سلول‌های بنیادی بافت چربی، درصد سلول‌های $CD105^+$ (۲۰/۱ درصد) نسبت به سلول‌های $CD90^+$ (۵۴ درصد) پایین گزارش شد (۲۳). همچنین جانگ گزارش کرد که ۲۱/۶ درصد از سلول‌های بنیادی بافت چربی دارای آنتی‌ژن $CD105$ بودند (۳۳). این گزارشات در بیان $CD105$ متفاوت با درصد سلول‌های بنیادی $CD105^+$ جداسازی شده از بافت چربی در این مطالعه می‌باشد. از سوی دیگر کرن و همکارانش در بررسی‌های خود مشاهده کردند که سلول‌های بنیادی مزانشیمی دارای $CD105$ در بافت چربی به‌طور میانگین ۹۰ درصد از جمعیت سلولی را تشکیل می‌دهند. به‌علاوه مادوکس و همکارانش ۸۶ درصد از سلول‌های بنیادی بافت چربی را در پاساژ سوم $CD105^+$ گزارش کردند (۱۷). به‌رحال مشاهدات مطالعه‌ی حاضر که تاییدی بر این بررسی‌ها هستند، نشان می‌دهند که $CD105$ مارکری در سطح سلول‌های بنیادی ساکن بافت چربی بوده، در سلول‌های مذکور به مقدار زیادی بیان می‌شود. بیش از ۷۴ درصد از سلول‌های بنیادی انسانی که توسط لاما و همکارانش از لاواژ برونکوآلوئولار جدا شدند، مارکر $CD105$ را داشتند (۱۲). متفاوت بودن میزان بیان $CD105$ در سطح سلول‌های بنیادی در مشاهدات این مطالعه با بررسی قبلی ممکن است به دلیل تفاوت در منبع بافت و گونه مورد بررسی باشد. از طرف دیگر، بررسی‌های ریکاردی و همکارانش بر

بافت چربی از نظر مورفولوژی، پتانسیل تمایزی و ایمونوفنوتایپ تقریباً مشابه هستند. بنابراین به نظر می‌رسد در سلول درمانی برای بافت ریه می‌توان از سلول‌های بنیادی مزانشیمی بافت چربی به عنوان جایگزین استفاده نمود.

تقدیر و تشکر

این مقاله مستخرج از پایان نامه‌ی دانشجویی دوره‌ی کارشناسی ارشد است که با حمایت مرکز تحقیقات تنظیم پاسخ‌های ایمنی دانشگاه شاهد انجام شده است. همچنین از همکاری کارشناسان آزمایشگاه آقای داوود جمالی و خانم زهرا غفلتی تشکر به عمل می‌آید.

References

- 1- Krampera M, Pasini A, Pizzolo G, Cosmi L, Romagnani S, Annunziato F. Regenerative and immunomodulatory potential of mesenchymal stem cells. *Curr Opin Pharmacol*. 2006; 6: 435-41.
- 2- Ye Z, Wang Y, Xie HY, Zheng SS. Immunosuppressive effects of rat mesenchymal stem cells: involvement of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int*. 2008; 7: 608-14.
- 3- Ahmadbeigi N, Soleimani M, Mortazavi Y. The efficiency of density gradient for separation of mesenchymal stem cells from bone marrow sample. *J Zanjan Univ Med Sci*. 2011; 19.
- 4- Bernal A, Fernández M, Pérez LM, San Martín N, Gálvez BG. Method for obtaining committed

بررسی‌های بیشتر بخصوص در زمینه ایمونوفنوتایپ برای جداسازی و شناسایی آن‌ها ضروری باشد. بنابراین پیشنهاد می‌شود که در مطالعات بعدی مارکرهای سطحی بیشتری بررسی شود. همچنین می‌توان برای نزدیک کردن این سلول‌ها برای کاربردهای بالینی این مطالعه را بر روی مارکرهای موجود در نمونه‌های انسانی و یا گونه‌های دیگر موش، به عنوان مدل، انجام داد.

نتیجه‌گیری

در مطالعه‌ی حاضر برای اولین بار سلول‌های بنیادی مزانشیمی ریه از موش BALB/c جداسازی و کشت داده شدند. همچنین این مطالعه نشان داد که سلول‌های بنیادی مزانشیمی ریوی مانند سلول‌های بنیادی مزانشیمی

adult mesenchymal precursors from skin and lung tissue. *PLoS one*. 2012; 7.

- 5- Chen PM, Yen ML, Liu KJ, Sytwu HK, Yen BL. Immunomodulatory properties of human adult and fetal multipotent mesenchymal stem cells. *J Biomed Sci*. 2011; 18.

6- Kode JA, Mukherjee S, Joglekar MV, Hardikar AA. Mesenchymal stem cells: immunobiology and role in immunomodulation and tissue regeneration. *Cytotherapy*. 2009; 11: 377-91.

7- Hematti P. Role of mesenchymal stromal cells in solid organ transplantation. *Transplan Rev (Orlando)*. 2008; 22: 262-73.

8- Shin S, Kim Y, Jeong S, et al. The therapeutic effect of human adult stem cells derived from adipose tissue in endotoxemic rat model. *Int J Med Sci*. 2013; 10: 8-18.

- 9- Bunnell BA, Betancourt AM, Sullivan DE. New concepts on the immune modulation mediated by mesenchymal stem cells. *Stem Cell Res Ther.* 2010; 1.
- 10- Pournasr Khakbaz B, Baharvand H. Human mesenchymal stem cells and their, clinical application. *Iranian J Anatomy Sci.* 2007; 5: 167-215.
- 11- Bernardo ME, Cometa AM, Pagliara D, et al. Ex vivo expansion of mesenchymal stromal cells. *Best Pract Res Clin Haematol.* 2011; 24: 73-81.
- 12- Lama VN, Smith L, Badri L, et al. Evidence for tissue-resident mesenchymal stem cells in human adult lung from studies of transplanted allografts. *J Clin Invest.* 2007; 117: 989-96.
- 13- Chistiakov DA. Endogenous and exogenous stem cells: a role in lung repair and use in airway tissue engineering and transplantation. *J Biomed Sci.* 2010; 17.
- 14- Hua J, Yu H, Dong W, et al. Characterization of mesenchymal stem cells (MSCs) from human fetal lung: Potential differentiation of germ cells. *Tissue Cell.* 2009; 41: 448-55.
- 15- Karoubi G, Cortes-Dericks L, Breyer I, Schmid RA, Dutly AE. Identification of mesenchymal stromal cells in human lung parenchyma capable of differentiating into aquaporin 5-expressing cells. *Lab Invest.* 2009; 89: 1100-14.
- 16- Zuk PA, Zhu M, Ashjian P, et al. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Mol Biol Cell.* 2002; 13: 4279-95.
- 17- Maddox JR, Liao X, Li F, Niyibizi C. Effects of Culturing on the stability of the putative murine adipose derived stem cells markers. *Open Stem Cell J.* 2009; 1: 54-61.
- 18- Mitchell JB, McIntosh K, Zvonic S, et al. Immunophenotype of human adipose-derived cells: temporal changes in stromal-associated and stem cell-associated markers. *Stem Cells.* 2006; 24: 376-85.
- 19- Cheuk-Kwan S, Chia-Hung Y, Yu-Chun L, et al. Autologous transplantation of adipose-derived mesenchymal stem cells markedly reduced acute ischemia-reperfusion lung injury in a rodent model. *J Transl Med.* 2011; 9.
- 20- Alipour R, Sadeghi F, Hashemi-Beni B, et al. Phenotypic characterizations and comparison of adult dental stem cells with adipose-derived stem cells. *Int J Prev Med.* 2010; 1: 164-71.
- 21- da Silva Meirelles L, Caplan AI, Nardi NB. In search of the in vivo identity of mesenchymal stem cells. *Stem Cells.* 2008; 26: 2287-99.
- 22- Ankrum J, Karp JM. Mesenchymal stem cell therapy: Two steps forward, one step back. *Trends Mol Med.* 2010; 16: 203-9.
- 23- Cho KS, Park HK, Park HY, et al. IFATS collection: Immunomodulatory effects of adipose tissue-derived stem cells in an allergic rhinitis mouse model. *Stem Cells.* 2009; 27: 259-65.
- 24- McQualter JL, Brouard N, Williams B, et al. Endogenous fibroblastic progenitor cells in the adult mouse lung are highly enriched in the sca-1 positive cell fraction. *Stem Cells.* 2009; 27: 623-33.
- 25- Si Y-L, Zhao Y-L, Hao H-J, Fu X-B, Han W-

D. MSCs: Biological characteristics, clinical applications and their outstanding concerns. *Ageing Res Rev.* 2011; 10: 93-103.

26- Kern S, Eichler H, Stoeve J, Klüter H, Bieback K. Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, or adipose tissue. *Stem Cells.* 2006; 24: 1294-301.

27- Taha MF, Hedayati V. Isolation, identification and multipotential differentiation of mouse adipose tissue-derived stem cells. *Tissue Cell.* 2010; 42: 211-6.

28- Puissant B, Barreau C, Bourin P, et al. Research Paper: Immunomodulatory effect of human adipose tissue-derived adult stem cells: comparison with bone marrow mesenchymal stem cells. *Br J Haematol.* 2005; 129: 118-29.

29- Hennrick KT, Keeton AG, Nanua S, et al. Lung cells from neonates show a mesenchymal stem cell phenotype. *Am J Respir Crit Care Med.* 2007; 175: 1158-64.

30- Hashemi SM, Hassan ZM, Pourfathollah AA, Soudi S, Shafiee A, Soleimani M. Comparative

immunomodulatory properties of adipose-derived mesenchymal stem cells conditioned media from BALB/c, C57BL/6, and DBA mouse strains. *J Cell Biochem.* 2013; 114: 955-65.

31- Conley BA, Koleva R, Smith JD, et al. Endoglin controls cell migration and composition of focal adhesions: function of the cytosolic domain. *J Biol Chem.* 2004; 279: 27440-9.

32- Barry FP, Boynton RE, Haynesworth S, Murphy JM, Zaia J. The monoclonal antibody SH-2, raised against human mesenchymal stem cells, recognizes an epitope on endoglin (CD105). *Biochem Biophys Res Commun.* 1999; 265: 134-9.

33- Jang HJ, Cho KS, Park HY, Roh HJ. Adipose tissue-derived stem cells for cell therapy of airway allergic diseases in mouse. *Acta Histochem.* 2011; 113: 501-7.

34- Ricciardi M, Malpeli G, Bifari F, et al. Comparison of epithelial differentiation and immune regulatory properties of mesenchymal stromal cells derived from human lung and bone marrow. *PloS One.* 2012; 7.

Mesenchymal Stem Cell Isolation from Adipose and Lung Tissues of BALB/c Murine and Comparison of Their Immunophenotype

Hosseinpur Z¹, Hashemi SM², Salehi E³, Ghazanfari T⁴

¹Dept. of Immunology, Faculty of Medical Sciences, Shahed University, Tehran, Iran

²Dept. of Stem Cell Biology Pouyandegan Tissue Engineering Research Center, Tehran, Iran

³Dept. of Immunology, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

⁴Immunoregulation Research Center, Shahed University, Tehran, Iran

Corresponding Author: Ghazanfari T, Immunoregulation Research Center, Shahed University, Tehran, Iran.

E-mail: tghazanfari@yahoo.com

Received: 15 Jun 2013 **Accepted:** 9 Sep 2013

Background and Objective: Mesenchymal stem cells are promising sources of stem cells for tissue repair because of their ability to differentiate into different cells, easy proliferation and culture, and immunomodulatory properties. Despite extensive research on the immunophenotype of mesenchymal stem cells, a lack of specific markers comprises challenges for researchers. The aim of this research was to isolate and expand murine lung and adipose derived mesenchymal stem cells and to compare their expression of surface protein markers.

Materials and Methods: Mesenchymal stem cells were isolated from murine lung and adipose tissues. Specific differentiation media were added for differential investigations. Finally, the expression of surface antigens were measured by flow cytometry and compared in both cell populations.

Results: Mesenchymal stem cells from both tissues were proliferated well and adipocyte and osteocyte differentiations were observed. Moreover, they showed CD73, CD105 and CD90 expression, but no expression of CD34, CD45 and CD11b was observed. In this study, lung CD105⁺ mesenchymal stem cells possessed lower percentage than those in adipose tissue.

Conclusion: Mesenchymal stem cells were isolated from lung similar to adipose derived mesenchymal stem cells and expressed common markers associated with adipose tissue mesenchymal stem cells.

Keywords: Mesenchymal stem cells, Adipose, Lung, BALB/c, Immunophenotype