مقاله پژوهشی

ارمغان دانش، مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی یاسوج
دوره ۱۸، شماره ۷، آبان۱۳۹۲(شماره پی در پی۷۹)

بیان مارکرهای سطحی در سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق شده از مغز استخوان

هما محسنی کوچصفهانی[۱]، حمداله دلاویز[۲]، محمد نبیونی[۱]، خدیجه بهره بر[۱*]، زهرا نظری[۱]، پروانه هواسی [۱]

[۱]گروه زیست شناسی تکوینی، دانشگاه خوارزمی، تهران، ایران[۲]، مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی یاسوج، یاسوج، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۱/۱۰/۲۷ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۲/۲/۱۰

چکیده

زمینه و هدف: سلول‌های بنیادی مزانشیمی برای اولین بار به وسیله فردنستین و همکاران از مغز استخوان جدا شدند. جهت اثبات مزانشیمی بودن سلول‌ها علاوه بر خاصیت چسبندگی‌آنها، از مارکرهای سطحی استفاده می‌شود. هدف این مطالعه کشت و جداسازی سلول‌های بنیادی مزانشیمی از مغز استخوان موش و بیان برخی مارکرهای سطحی در سلول‌های حاصل بود.

روش بررسی: در این مطالعه تجربی سلول‌های مغز استخوان از استخوان‌های ران و درشت نی موش‌های NMRI جدا شدند. سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان بر اساس خاصیت چسبندگی آنها به کف ظرف کشت جداسازی شدند. جهت اثبات مزانشیمی بودن سلول‌ها علاوه بر خاصیت چسبندگی آنها، مارکرهایCD73، CD44، CD90، CD31، CD45 و CD29 بعد از پاساژ چهارم با روش فلوسیتومتری بررسی شدند.

یافته‌ها: در کشت اولیه، جمعیت هتروژنی از سلول‌ها پهن، دوکی و چند وجهی بودند. در پاساژهای بعدی تعداد سلول‌های دوکی شکل افزایش یافت، به طوری که در پاساژ سوم بیشتر سلول‌ها دوکی شکل بودند. آنالیز فلوسایتومتری مارکرهای سطحی نشان داد که سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان حاصل از پاساژ چهارم مارکرهایی CD44 ، CD73 و CD29 را به میزان بالا و مارکرهایی CD45، CD31 و CD90 را به میزان کم بیان می‌کنند.

نتیجه‌گیری: سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق شده از مغز استخوان دارای تعدادی مارکر مثبت هستند که به میزان بالایی بیان می‌شوند و نیز تعدادی مارکر منفی هستند که به میزان کمی بیان می‌شوند. میزان بیان این مارکرها، مزانشیمی بودن این سلول‌ها را اثبات می‌کند.

واژه‌های کلیدی: مغز استخوان، سلول‌های بنیادی مزانشیمی، مارکرهای سطحی

[*]**مؤلف مسئول: خدیجه بهره بر**، تهران، دانشگاه خوارزمی، دانشکده علوم زیستی، گروه زیست شناسی تکوینی
Email: bahrebar6224@yahoo.com

Archive of SID

مقدمه

سلول‌های بنیادی سلول‌های تمایز نیافته‌ای هستند که توانایی تبدیل و تمایز به انواع مختلف سلول‌ها را دارند. سلول‌های بنیادی دارای دو ویژگی مهم هستند که آنها را از سایر سلول‌ها متمایز می‌کنند. این سلول‌ها، توانایی تکثیر نامحدود دارند و در حالت متمایز نشده باقی می‌مانند. علاوه بر این، سلول‌های بنیادی چنانچه در شرایط محیطی مناسب قرار بگیرند، قادرند به سلول‌های مورد نظر تبدیل شوند. آنها می‌توانند تحت تأثیر بعضی شرایط فیزیولوژیک یا آزمایشگاهی به سلول‌هایی با عملکردهای اختصاصی مانند سلول‌های عضلانی قلب یا سلول‌های تولید کننده انسولین در پانکراس تبدیل شوند(۱). سلول‌های بنیادی از لحاظ منشاء به دو دسته عمده، سلول‌های بنیادی جنینی و سلول‌های بنیادی بالغ تقسیم می‌شوند(۲).

سلول‌های بنیادی بالغ در بسیاری از بافت‌ها و اندام‌ها شامل؛ مغز، مغزاستخوان، ماهیچه اسکلتی، شبکیه، قرنیه چشم، پالپ دندان، مغز، طناب عصبی، کبد، بافت چربی، پوست و روده وجود دارند(۳). از مهم‌ترین سلول‌های بنیادی بالغ، سلول‌های بنیادی مزانشیمی می‌باشند، این سلول‌ها برای اولین بار در مغز استخوان و در سال ۱۹۶۶ شناسایی شد(۴). در سال‌های اخیر، مهم‌ترین منبع سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان بوده است، اما سلول‌های بنیادی مزانشیمی را از منابع دیگر مثل بافت چربی، پولپ دندان، بافت سینوویال، بندناف، خون محیطی، بافت پریوست و ماهیچه اسکلتی جدا کرده‌اند(۶ و۵).

مغز استخوان منبع اصلی دو نوع از این سلول‌ها به نام سلول‌های بنیادی خون‌ساز و سلول‌های بنیادی مزانشیمی می‌باشد(۷). جداسازی و خلوص سلول‌های بنیادی مزانشیمی موش به علت تعداد کم سلول‌های مزانشیمی در مغز استخوان و رشد ناخواسته سلول‌های غیر مزانشیمی(خون‌ساز و اندوتلیال) به مراتب مشکل‌تر از دیگر گونه‌های جانوری است(۸). روشی که فریدن استاین در مطالعه سلول‌های بنیادی مزانشیمی، جهت جداسازی آنها استفاده کرد، بدین صورت بود که نمونه‌های مغز استخوان در یک ظرف پلاستیکی کشت شد و پس از چند ساعت سلول‌های غیرچسبنده دور ریخته شدند. در اصل این محقق از خاصیت چسبندگی این سلول‌ها جهت جداسازی آنها استفاده کرد(۴). یکی از جنبه‌هایی که در ارتباط با سلول‌های مزانشیمی موش تا حدی زیادی ناشناخته باقی مانده است، شناسایی مارکرهای سطح سلولی است، این مارکرهای سطحی نقش مهمی در مزانشیمی بودن سلول‌ها را اثبات می‌کنند. در مطالعات پیشین، محققان سلول‌های مزانشیمی را از مغز استخوان موش جدا نموده و پس از خالص سازی آنها با روش‌های مختلف، بیان برخی مارکرهای سطحی را بررسی کرده‌اند. اطلاعات موجود حاکی از نبود اتفاق نظر مبنی بر معرفی مارکرهای سطح سلولی است، بنابراین دراین بررسی مارکرهای سطحی در سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق شده از مغز استخوان که از لحاظ شناسایی و جداسازی سلول‌ها اهمیت فراوانی دارند،

Archive of SID

www.SID.ir

مورد بررسی قرار می‌گیرند(۱۲-۹). برای شناسایی انواع سلول‌های بالغ از مورفولوژی سلول‌ها استفاده می‌شود. ولی در بسیاری از موارد که ساختار سلول‌ها بسیار شبیه همدیگر هستند از مارکرهای سطح سلول استفاده می‌شود. در مورد سلول‌های بنیادی مزانشیمی آنتی‌ژن ویژه‌ای وجود ندارد که بتوان آنها را شناسایی کرد. بنابراین روش معمول برای شناسایی این سلول‌ها در روند کشت سلولی، خاصیت چسبندگی آنها به کف فلاسک است. در محیط کشت جمعیت همگنی از این سلول‌ها، مارکرهای پروتئینی مانند CD105 و CD73 را بیان می‌کنند(۱۳). بیان این مارکرهای سطحی دلالت بر بنیادی بودن این سلول‌ها و توانایی تمایز این سلول‌ها به انواعی دیگر از سلول‌ها است. بنابراین در این بررسی مارکرهای سطحی در سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق شده از مغز استخوان که از لحاظ شناسایی و جداسازی سلول‌ها اهمیت فراوانی دارند مورد بررسی قرار گرفت.

روش‌بررسی

در این مطالعه تجربی موش‌های نژاد NMRI با سن تقریبی ۶-۴ هفته با روش جابه‌جای مهره‌های گردنی کشته شدند، سپس با استفاده از الکل ۷۰ درصد ضدعفونی و در شرایط کاملاً استریل استخوان‌های ران و درشت نی آنها جدا گردید. عضلات و بافت نرم اطراف استخوان‌ها پاک شد و داخل محیط DMEM[1] قرار داده شدند. لوله محتوی استخوان‌های ران و درشت نی بر روی یخ قرار داده شده و به زیر هود منتقل گردید. دو سر استخوان با یک قیچی کاملاً استریل بریده شده و مغز استخوان از داخل کانال استخوان به کمک یک سرنگ و سر سوزن شماره ۲۲ که با محیط DMEM پر شده بود با روش فلاشینگ به داخل پتری دیش تخلیه گردید. مغز استخوان در فالکون ۱۵ میلی‌لیتری ریخته شد و به مدت ۵ دقیقه با دور ۱۵۰۰ سانتریفیوژ شدند تا پلت سلولی تشکیل شود. سپس محیط رویی تخلیه شده و به پلت سلولی ۲ میلی-لیتر محیط تازه DMEM حاوی FBS[2] ۱۵ درصد و ۱۰۰ واحد پنی‌سیلین و ۱۰۰ واحد استرپتومایسین اضافه شد. سلول‌های حاصل در فلاسک ۲۵ سانتی‌مترمکعبی کشت داده شدند. سپس فلاسک به انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و ۵ درصد دی‌اکسیدکربن منتقل گردید. بعد از دو روز محیط رویی خارج گردید و محیط DMEM تازه اضافه گردید. محیط سلول‌ها هر سه روز یکبار به مدت دو هفته تعویض شدند. سلول‌های مزانشیمی بر اساس خاصیت چسبندگی خود به کف فلاسک می‌چسبند، اما سایر سلول‌ها از جمله سلول‌های خون‌ساز چون توانایی چسبیدن ندارند، با تعویض محیط خارج می‌شوند. در ادامه سلول‌های مزانشیمی با استفاده Trypsin-EDTA (شرکت گیبکو-آلمان) از کف فلاسک جدا شده و به فلاسک‌های جدید منتقل شدند.

1-Dy Methyl Sulfoxide (DMEM)
2-Fetal Bovine Serum (FBS)

Archive of SID

www.SID.ir

سلول‌هایی که تریپسینه شدند و مورد شمارش قرار گرفته بودند تا سه پاساژ دیگر تکثیر شدند.

فلوسیتومتری تکنیکی برای شمارش و مطالعه مشخصات سلول‌ها است. در این روش هنگامی که سلول‌ها به صورت معلق در مایع سیال به همراه مایع غلیظ‌تری به نام Sheath قرار می‌گیرند، یکی پس از دیگری از نقطه حساس نوری دستگاه شناسایی الکترونیکی به نام فلوسیتومتر می‌گذرند و شمارش سلولی انجام می‌شود. جهت اثبات مزانشیمی بودن سلول‌های بنیادی جدا شده از مارکرهای سطحی آنها استفاده شد که برخی مارکرهای مثبت بودند و بیان بالایی دارند و برخی دیگر مارکرهای منفی و بیان پایینی دارند. سلول‌های حاصل از پاساژ چهارم را بعد از تریپسینه و سانتریفیوژ کردن در اپندورف ریخته و با PBS[1] شسته شدند، سپس به مدت ۱۰ دقیقه با دور ۲۰۰۰ در دقیقه سانتریفیوژ شدند. آنتی‌بادی‌های اولیه CD90، CD44، CD29 و CD73 کونژوگه با PE (فیکواریترین) و CD45 و CD31 کونژوگه با FITC (فلورسنس ایزوتیوسیانات) اضافه شد و به مدت ۳۰ دقیقه در یخچال قرار گرفت و برای کنترل منفی از آنتی‌بادی‌های PE-IgG2a، FITC- IgG2b و PE-IgG2b استفاده شد. در مرحله بعد سلول‌ها پس از شستشو با PBS به مدت ۱۰ دقیقه با دور ۲۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شدند. سپس به سلول‌ها بافر فیکس کننده فرمالین ۱ درصد اضافه شد و با دستگاه فلوسیتومتری(FACS) آنالیز شدند.

یافته‌ها

در کشت اولیه سلول‌های گرفته شده از مغز استخوان موش‌های NMRI به شکل گروه‌های سلولی ناهمگن و هتروژن دیده شدند. در روز هفتم، سلول‌ها با مورفولوژی متفاوت نظیر پهن، دوکی و چند وجهی مشاهده شدند. در پاساژهای بعدی تعداد سلول‌های دوکی شکل بیشتر شد، به طوری که در پاساژ سوم اکثریت سلول‌ها دوکی شکل بودند. در ادامه پاساژهای بعدی سلول‌های بنیادی مزانشیمی به صورت خالص در آمده بودند و سلول‌های مزانشیمی از لحاظ مورفولوژیکی بیشتر شبیه به سلول‌های فیبروبلاست(دوکی شکل)بودند(تصویر۱).

جهت اثبات ماهیت مزانشیمی بودن این سلول‌ها علاوه بر خاصیت چسبندگی آنها به ظرف کشت، یکی دیگر از راه‌های شناسایی آنها استفاده از مارکر سطحی بوده است، که بعد از پاساژ چهارم و جدا شدن سلول‌های بنیادی مزانشیمی از سایر سلول‌ها به روش فلوسیتومتری بررسی شد. تاکنون برای این سلول‌ها نشانگر خاصی به دست نیامده است، ولی این سلول‌ها نشانگرهای خون‌ساز(هماتوپویتیک) از جمله CD45 و CD31 و مولکول چسبنده CD90 را به میزان کمی بیان

1-Phosphate Buffer Salin (PBS)

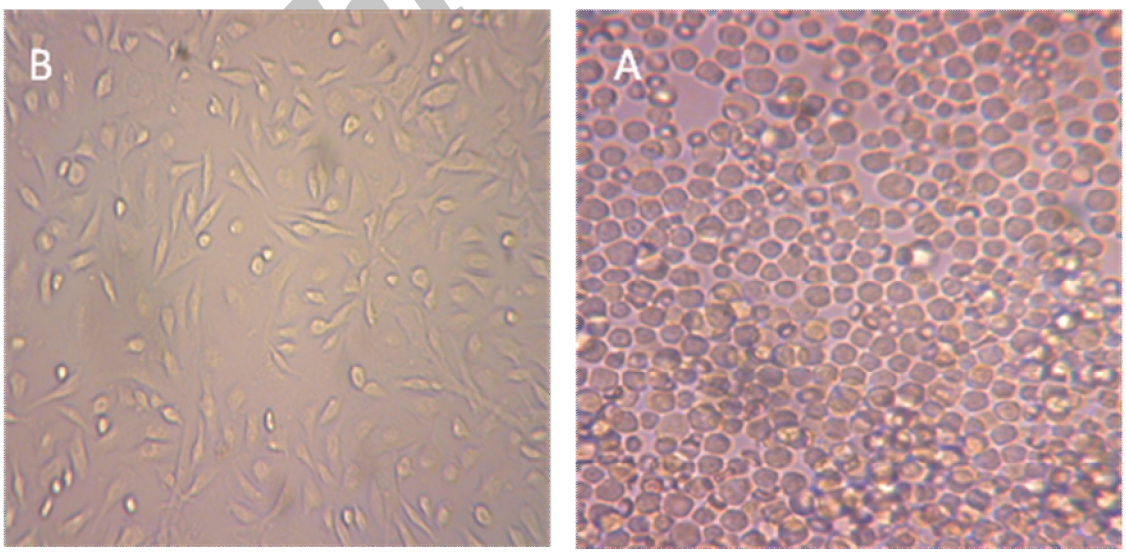
Archive of SID

www.SID.ir

می‌کنند، اما تعدادی از مولکول‌های چسبنده مثل CD44، CD29 و CD73 را به میزان بالایی بیان می‌کنند(تصویر۲).

بحث

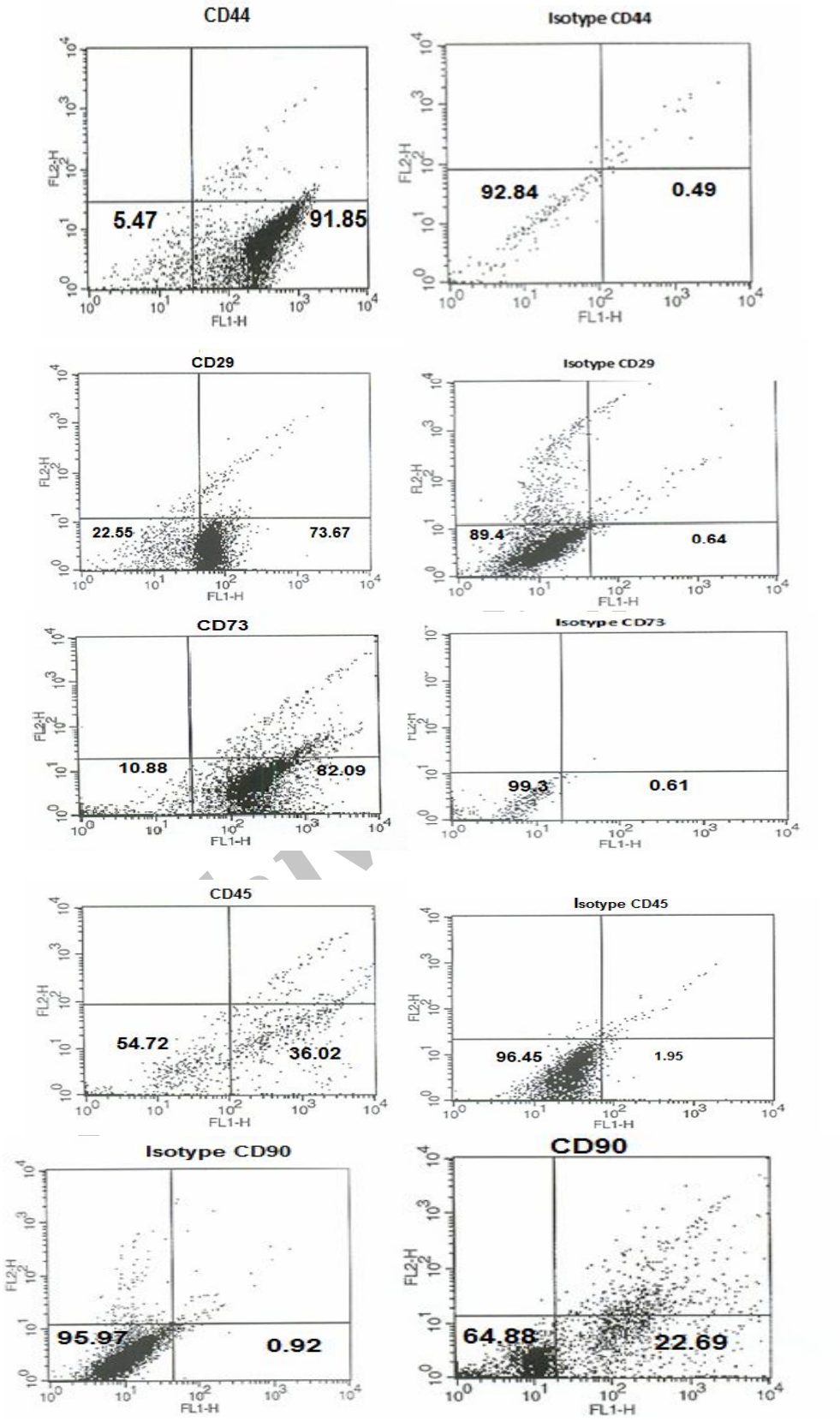
جداسازی و تخلیص سلول‌های بنیادی مزانشیمی موش‌اهمیت فراوانی دارد، زیرا موش همواره مدل ارزشمند فیزیولوژیک و پاتولوژیک برای بیماری انسان بوده ولی متأسفانه جداسازی سلول‌های مزانشیم آن با مشکلاتی از قبیل آلوده‌سازی به سلول‌های خونی، اندوتلیال و ماکروفاژ همراه است. یکی از راه‌های جداسازی سلول‌های مزانشیمی از سایر سلول‌ها، استفاده از مارکرهای سطحی می‌باشد(۱۴). سلول‌های مغز استخوان شامل؛ فیبروبلاست‌ها، سلول‌های اجدادی خونی، ماکروفاژها، سلول‌های اندوتلیالی و چربی می‌باشند(۱۶ و۱۵). مطالعات قبلی نشان دادند، این سلول‌ها در کشت باقی‌مانده و باعث آلوده‌سازی سلول‌های‌فیبروبلاستی‌می‌شوند(۱۸و۱۷)، اما تعویض محیط کشت مانع از چسبیدن سلول‌های غیر مزانشیمی و خونی به پلیت پلاستیکی کشت می‌شود. در این مطالعه بدون کمترین استرس بر سلول‌ها و با بهبود روش چسبیدن به ظرف کشت پلاستیک از طریق تعویض سریع محیط کشت در ساعات اولیه از کشت سلول‌های مغزاستخوان موش، از چسبیدن سلول‌های غیر مزانشیمی به ظرف کشت جلوگیری گردید. یکی دیگر از روش‌های جداسازی این سلول‌ها استفاده از مارکر سطحی است. این موضوع در موش به طور دقیق شناسایی نشده است. نتایج این تحقیق نشان داد که مارکرهای CD44، CD29 و CD73 در سلول‌های بنیادی مزانشیمی بیان بالایی دارند، در حالی‌که مارکرهای CD31،CD45 و CD90 بیان کمی داشتند.



تصویر۱: کشت سلول‌های مغز استخوان گرفته شده از موش. در روز اول کشت، سلول‌های مزانشیمی و غیر مزانشیمی به شکل ناهمگن دیده شدند(A). در روز هفتم ،سلول‌های مزانشیمی بیشتر به صورت دوکی شکل مشاهده شدند(B).(میکروسکوپ فاز کنتراست معکوس با بزرگ نمایی ×۴۰۰).

Archive of SID

www.SID.ir



تصویر۲: مقایسه نتایج فلوسایتومتری سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان با مارکرهای مختلف

www.SID.ir

مطالعات انجام شده نشان می‌دهد که سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق شده از مغز استخوان و ژله وارتون برخی از مارکرهای سطحی مانند؛ CD44 ,CD73(SH3), CD90 و CD105(SH2) را در محیط کشت بیان می‌کنند(۱۹). در حالی‌که فاقد برخی از فاکتورهای خون‌ساز مانند؛CD34 ,CD14 و CD54 می‌باشد. بررسی‌های دیگر نشان می‌دهد که سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق شده از بافت چربی مارکرهای سطحی متفاوتی مانند؛ CD9, CD29, CD44,CD54, CD73 (SH3), CD90, CD105 (SH2), CD106, CD146, CD166 را بیان می‌کنند، ولی فاقد مارکرهای دیگری مانند؛ CD14, CD31, CD34, CD45, CD133, CD144, HLA-DR, STRO-1 می‌باشد(۲۰). آنالیز فلوسایتومتری از مارکرهای سطحی سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق شده از مغز استخوان و بافت چربی نشان داده است که این سلول‌ها مارکرهایی مانند؛ CD13, CD29, CD44 CD90, CD105 (SH2) و CD73 (SH3) را بیان می‌کنند در حالی‌که این سلول‌ها بیان متفاوتی از CD34,CD54 و CD49d دارند(۱۳).

در راستای بررسی فوق، نتایج مطالعه حاضر نشان داد که سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق شده از مغز استخوان بیان مارکرهای CD44 و CD29 را بیشتر و بیان CD31 و CD90 را کمتر بیان کرده‌اند. بنابراین مطالعه حاضر می‌تواند به شناسایی مارکرهای سطحی موش کمک کند. بادو و همکاران(۲۰۰۳) مارکرهای سطحی، CD106، CD81،CD11b، CD34، CD105، CD48 و CD31 را در سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان موش بررسی کردند، که نتایج این بررسی نشان داد که این سلول‌ها مارکرهای CD105، CD106 و CD81 را به میزان بالایی بیان کردند، در حالی‌که مارکرهای CD11b، CD34، CD48 CD45 و CD31 به میران کمی بیان شدند(۲۰). در سال(۲۰۰۷)مارکرهای سطحی CD135، CD44، CD34،C-kit، Vcam-1، CD11b و Thy1.2 در سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان موش بررسی شده است که نتایج این بررسی نشان داد که مارکر CD44 در حد بسیار بالایی(۹۰ درصد) و سایر مارکرها به میزان کم در این سلول‌ها بیان می‌شوند(۲۱). در این مطالعه بیان برخی مارکرهای سطحی نظیر CD44، CD29، CD73، CD31، CD45 و CD90 در سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان به روش فلوسیتومتری مورد بررسی قرار گرفت، که نتایج این تحقیق نشان داد که مارکرهای CD44، CD29 و CD73 در سلول‌های بنیادی مزانشیمی بیان بالایی داشتند، در حالی‌که مارکرهای CD31،CD45 و CD90 بیان کمی داشتند. در این تحقیق بر خلاف تحقیقات گذشته، مارکرهای سطحی بعد از پاساژ چهارم بررسی شدند، در حالی‌که در تحقیقات گذشته در طی پاساژهای اول، دوم و سوم انجام شده بود، چون علاوه بر سلول‌های بنیادی مزانشیمی، سلول‌های پیش‌ساز بالغ چند توان نیز در مغز استخوان وجود دارند، که تا حدودی خاصیت چسبندگی دارند، اما طی مدت زمانی طولانی حدود سه هفته طی پاساژ چهارم با تعویض محیط کشت از کف فلاسک جدا می‌شوند. دلیل انتخاب سلول‌های مزانشیمی در پاساژ چهارم

Archive of SID

www.SID.ir

جهت بررسی مارکرهای سطحی به همین دلیل بود تا طی این مدت سلول‌های بالغ چند توان جدا شده باشند و سلول‌هایی که به کف فلاسک چسبیده‌اند، فقط سلول‌های بنیادی مزانشیمی باشند که آنالیز مارکرهای سطحی با روش فلوسایتومتری مزانشیمی بودن این سلول‌ها را تأیید کرد. بیان مارکرها در این تحقیق تا حدودی مشابه تحقیقات گذشته بوده اما بر خلاف تحقیقات گذشته که مارکر CD90 یک مارکر مثبت بوده و بیان بالایی داشت، در این تحقیق مارکرCD90 بیان کمی داشته و جزء مارکرهای منفی به شمار می‌رود.

نتیجه‌گیری

بر اساس یافته‌های این مطالعه، می‌توان نتیجه گرفت که سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق شده از مغز استخوان دارای تعدادی مارکر مثبت هستند که به میزان بالایی بیان می‌شوند و نیز دارای تعدادی مارکر منفی هستند که میزان بیان کمی دارند. میزان بیان این مارکرها دلیل اثبات مزانشیمی بودن این سلول‌ها است، چون سلول‌های مزانشیمی مارکرهای سطحی ویژه سلول‌های هماتوپوئتیک از جمله CD45، CD34، CD14و CD31 را به میزان کم بیان می‌کنند.

تقدیر و تشکر

این مطالعه حاصل پایان‌نامه مقطع کارشناسی ارشد زیست شناسی تکوینی بود. از همکاری شرکت فن‌آوری بن یاخته و دانشگاه علوم پزشکی تهران تشکر و قدردانی می‌شود.

Archive of SID

www.SID.ir

REFERENCE

1.Baksh D, Davis JE, Zandstra PW. Adult human bone marrow-derived mesenchymal progenitor cells are capable of adhesion-independent and expansion. Exp Hematol 2003; 31: 723-32.
2.Fernando Ulloa-Montoya, Catherine M, Verfaillie …., Wei-shou HU. Culture systems for Pluripotent Stem Cells. Bioscience And Bioengineering 2005; 100: 12-27
3.Musina RA, Eqorov EE, Beliavski AV. Stem cells: properties and perspectives of therapeutic use. Mol Biol(mosk) 2004; 38: 563-77.
4.Friedenstein AJ, Petrakova KV. Osteogenesis in transplants of bone marrow cells. *J Embryol Exp Morph 1966;16*(3): 581 -390.
5.Mohammad R, Baghaban E, LeilaT. Mesenchymal Stem Cell Purification from the Articular Cartilage cell culture. Basic Medical Sciences *2007; 10: 146-53.*
6.Arshak R. Alexanian Neural stem cells induce bone- marrow-derived mesenchymal stem cells to generate neural stem-like cells via juxtacrine and paracrine interactions. *Experimental Cell Research 2005; 310*: 383-91.
7.Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, et a1. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. Science 1999; 284: 143-7.
8.Baksh D, Song L, Tuan RS. Adult mesenchymal stem cells: characterization, differentiation, and application in cell and gene therapy. J Cell Mol Med 2004; 8: 301-16.
9.Sun S, Guo Z, Xiao X, Liu B, Liu X, Tang PH, et al. Isolation of mouse marrow mesenchymal progenitors by a novel and reliable method. Stem Cells 2003; 21: 527-35.
10.Meirelles Lda S, Nardi NB. Murine marrow-derived mesenchymal stem cell: isolation, in vitro expansion, and characterization. Br J Haematol 2003; 123: 702-11.
11.Phinney DG, Kopen G, Isaacson RL, Prockop DJ. Plastic adherent stromal cells from the bone marrow of commonly used strains of inbred mice: variations in yield, growth, and differentiation. J Cell Biochem 1999; 72: 570-85.
12.Peister A, Mellad JA, Larson BL, Hall BM, Gibson LF, Prockop DJ. Adult stem cells from bone marrow (MSCs) isolated from different strains of inbred mice vary in surface epitopes, rates of proliferation, and differentiation potential. Blood 2004; 103: 1662-8.
13.De Ugarte DA, Alfonso Z, Zuk PA, Elbarbary A, Zhu M, Ashjian P, Benhaim P, Hedrick MH, Fraser JK. Differential expression of stem cell mobilizationassociated molecules on multi-lineage cells from adipose tissue and bone marrow. Immunol Lett 2003; 89: 267-70.
14.Eslaminejad MB, Nikmahzar A, Taghiyar L, Nadri S, Massumi M. Murine mesenchymal stem cells isolated by low density primary culture system. Dev Growth Differ 2006; 48: 361-70.
15.Phinney DG, Kopen G, Isaacson RL, Prockop DJ. Plastic adherent stromal cells from the bone marrow of commonly used strains of inbred mice: variations in yield, growth, and differentiation. J Cell Biochem 1999; 72: 570-85.
16.Zuckerman KS, Wicha MS. Extracellular matrix production by the adherent cells of long-term murine bone marrow cultures. Blood 1983; 61: 540-7.
17.Meirelles Lda S, Nardi NBMurine marrow-derived mesenchymal stem cell: isolation, in vitro expansion, and characterization. Br J Haematol 2003; 123: 702-11.
18.Xu CX, Hendry JH, Testa NG, Allen TD. Stromal colonies from mouse marrow: characterization of cell types, optimization of plating efficiency and its effect on radiosensitivity. J Cell Sci 1983; 61: 453-66
19.Ralf H, Cornelia K, Stefanie B, Roland J. Different populations and sources of human mesenchymal stem cells (MSC): A comparison of adult and neonatal tissue-derived MSC. Cell Communication and Signaling 2011; 9:12.
20.Baddoo M, Hill K, Wilkinson R, Gaupp D, Hughes C, Kopen GC,Phinney DG. Characterization of mesenchymal stem cells isolated from murine bone marrow by negative selection. J Cell Biochem 2003; 89: 1235-49.
21.Eslaminejad MB, Nadri S, Hossini RH. Expression of Thy 1.2 surface antigen increases significantly during th 2007; 49: 351- 64.

Archive of SID

www.SID.ir

Armaghane-danesh, Yasuj University of Medical Sciences Journal (YUMSJ)

Original Article

Surface Markers Expression in the Mesenchymal Stem Cells Derived from Bone Marrow

Mohseni KouchesfahaniH [1], Delavize H [2], Nabiuni M[1], Bahrebar Kh[1*], Nazari Z[1] , Havasi P[1]

[1]Department of Biology, kharazmi University, Tehran, Iran, [2]Cellular and Molecular research center, Yasuj University of Medica Sciences, Yasuj, Iran

Received: 17 Jan 2013 Accepted: 30 April 2013

Abstract

Background and aim: Mesenchymal stem cells were separated from bone marrow by Friedenstein et al. for the first time. In addition to their cohesion, mesenchymal properties of the cells were proven by surface markers. The aim of this study was to isolate mesenchymal stem cells from mouse bone marrow cultures and some surface markers in the obtained cells were expressed.

Methods: In this study, bone marrow cells in the femur and tibia bones were isolated from NMRI mice. Bone marrow mesenchymal stem cells were isolated to the bottom of culture dish based on cohesion properties. In addition to their cohesion, mesenchymal properties of the cells were proven by CD73, CD44, CD90, CD31, CD45 and CD29 markers, after the fourth passage using flow cytometry.

Results: In the primary culture, a heterogenous population of flattened, spindle and multi-faceted cells were observed. Spindle-shaped cells increased in later passages, so that almost all of third passage cells were spindle-shaped. Flow cytometry analysis of surface markers revealed high level mesenchymal stem cells from the fourth passage markers CD44, CD73 and CD29, and, low level of CD31, CD45 and CD90 markers.

Conclusion: It can be concluded that MSCs derived from bone marrow mouse have some positive and negative surface markers with high and low expression, respectively. The expression rate of these markers proves the mesenchymal properties of cells.

Keyword: Bone Marrow, Mesenchymal Stem Cells, Surface Markers

***Corresponding Author: Bahrebar Kh,** Department of Biology, kharazmi University, Tehran, Iran
Email: bahrebar6224@yahoo.com

Archive of SID

www.SID.ir