

اثر سلول‌های بنیادی خونساز انسانی بر تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی به سلول‌های استئوبلاست

راضیه فدائی^۱، ناصر امیری‌زاده^۲، مهین نیکوگفتار ظریف^۳، مهریار حبیبی رودکنار^۴

چکیده

سابقه و هدف

ارتباط سلول‌های بنیادی خونساز (HSCs) با سلول‌های موجود در ریز محیط مغز استخوان (نیچ) به ویژه سلول‌های استئوبلاست، جهت حفظ فعالیت‌های آن‌ها بسیار ضروری می‌باشد. البته مدارکی که به صورت مستقیم HSC ها را در توسعه نیچ دخیل کنند، اندک هستند ولی در صورت اثبات، روشن می‌شود که چرا نقص‌های هماتوپوئیک بسیاری با تغییر در ساختار استخوانی همراه بوده و لذا اهداف درمانی هماتوپوئیک و اهداف درمانی جدیدی را برای تنظیم ساختار و تشکیل استخوان فراهم می‌آورند.

مواد و روش‌ها

در یک مطالعه تجربی، سلول‌های بنیادی مزانشیمال (MSC) مغز استخوان را در محیط Stem Span به مدت ۳ روز تحت همکشتی با HSC های خون بند ناف قرار دادیم. سپس MSC ها با استفاده از کیت استئوژنیزس به استئوبلاست تمایز داده شدند و در روزهای مختلف تمایزی مورد ارزیابی قرار گرفتند که شامل بیان ژن‌های استئوپونین و استئوکلسین در روزهای ۴ و ۶ تمایزی (RT-PCR)، بیان مارکر CD90 (فلوسیتومتری)، بیان آنزیم آلکالین فسفاتاز (رنگ‌آمیزی آلکالین فسفاتاز) و مینرالیزه شدن (رنگ‌آمیزی آلیزارین رد) در روز دهم تمایزی بود.

یافته‌ها

نتایج، بیان زود هنگام ژن‌های استئوپونین و استئوکلسین را در همکشتی MSC با HSC نمایان ساخت. این یافته‌ها از نقش HSC ها در القای تمایز استئوبلاستی MSC ها حمایت می‌نمایند. هم چنین کاهش بیان CD90 و افزایش فعالیت آلکالین فسفاتاز و مینرالیزاسیون سلولی، این نتایج را تایید نمودند.

نتیجه‌گیری

نتایج این تحقیق در ارتباط با سلول‌های بنیادی انسانی در *ex vivo*، اثبات نمود که HSC ها قادرند سبب افزایش تمایز MSC ها به استئوبلاست شده و بدین وسیله در تشکیل نیچ خود سهیم باشند.

کلمات کلیدی: سلول‌های بنیادی خونساز، سلول‌های بنیادی مزانشیمی، همکشتی، استخوان‌سازی، استئوبلاست‌ها

تاریخ دریافت: ۹۰/۵/۱۱

تاریخ پذیرش: ۹۰/۱۰/۱۷

۱- کارشناس ارشد هماتولوژی - مرکز تحقیقات انتقال خون - مؤسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون - تهران - ایران

۲- مؤلف مسؤل: PhD هماتولوژی و بانک خون - استادیار مرکز تحقیقات انتقال خون - مؤسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون - تهران - ایران - صندوق پستی: ۱۴۶۶۵-۱۱۵۷

۳- PhD هماتولوژی و بانک خون - مرکز تحقیقات انتقال خون - مؤسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون - تهران - ایران

۴- PhD بیوتکنولوژی پزشکی - دانشیار مرکز تحقیقات انتقال خون - مؤسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون - تهران - ایران

مقدمه

پروتئین مورفوژنیک استخوانی (BMP) و آنژیوپوئین (قرار می‌گیرند. لازم به ذکر است که مسیرهای سیگنالینگ متعددی از جمله Hedgehog، Notch، BMP، wnt و FEG، در تعدیل فعالیت نیچ سلول‌های بنیادی خونساز دخیل می‌باشند (۱۵).

وجود هماهنگی میان هزاران سیگنال دایمی از جمله سایتوکاین‌ها، فاکتورهای رشد، لیگاندها، مسیرهای مختلف سیگنالینگ و ... که در نیچ موجود می‌باشند، به ایجاد تعادلی ظریف میان خود نوسازی و تمایز در HSC ها منتهی می‌گردد.

با وجود این، مدارکی که به صورت مستقیم HSC ها را در توسعه نیچ دخیل کنند، بسیار اندک می‌باشند ولی در صورت اثبات این امر، روشن می‌شود که چرا نقص‌های هماتوپوئیک بسیاری با تغییرات در ساختار استخوانی همراه هستند و به دنبال آن، اهداف درمانی هماتوپوئیک و نیز اهداف درمانی جدیدی را برای تنظیم ساختار و تشکیل استخوان فراهم می‌آورند. با توجه به قابلیت سلول‌های بنیادی مزانشیمی در تمایز به سلول‌های مختلف از جمله استئوبلاست، به منظور روشن شدن این موضوع که آیا HSC ها قادر به تنظیم تشکیل نیچ خود می‌باشند یا خیر، می‌توان از کشت هم‌زمان HSC ها همراه با پیش‌سازهای مزانشیمی بهره جست.

اطلاعات به دست آمده نشان می‌دهند که HSC ها تحت شرایط پایه، دارای توانایی هدایت تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی به سمت استئوبلاست‌ها می‌باشند که در این مسیر، BMP2 و BMP6 مشتق از HSC ها، نقش بسیار مهمی را بر عهده دارند. مطالعه‌های قبلی انجام شده، همه از یک ارتباط متقابل میان استئوبلاست و HSC حکایت می‌کنند که به موجب آن، HSC ها فعالیت‌های حمایتی خونسازی خود را از طریق استئوبلاست‌ها القا می‌نمایند (۱۶). تا پیش از این ضروری بودن ارتباط متقابل میان HSC ها و استئوبلاست‌ها جهت توسعه هر دو جمعیت سلولی، در حد یک فرضیه بود تا این که یانگ هون جانگ و همکارانش در مطالعه‌های خود نشان دادند که HSC ها می‌توانند به طور مستقیم، تمایز سلول‌های مزانشیمی را به سمت سلول‌های استئوبلاست هدایت نمایند (۱۷).

شناخت هر چه بهتر بیولوژی سلول‌های بنیادی، در استفاده از اثرات درمانی این سلول‌ها برای گستره‌ای از بیماری‌های ارثی و اکتسابی بسیار مؤثر می‌باشد. استفاده بهینه از سلول‌های بنیادی به موارد متعددی از جمله شناسایی منابع غنی از سلول‌های بنیادی، جداسازی و دستیابی به سلول‌های مفیدتر برای پیوند و مطالعه در جهت کاهش معایب و افزایش مزایای این سلول‌ها بستگی دارد. رسیدن به این هدف مستلزم استفاده از کشت، دست‌کاری ژنتیکی و روش‌های مختلف نگهداری در محیط آزمایشگاه، شناسایی مارکرهای سطحی و سیتوپلاسمی، واکنش‌های درون سلولی و مسیرهایی که این فعالیت‌ها را سیگنال‌دهی می‌کنند، می‌باشد.

سلول‌های بنیادی خونساز (HSCs) دارای هر دو قابلیت خود نوسازی و تمایز بوده و این فعالیت‌ها نیز اغلب در نیچ‌های واقع در مغز استخوان صورت می‌گیرند. مطالعه‌های مورفولوژیک و *in vitro* حاکی از آن است که نیچ‌های HSC ها، از مشارکت تعدادی از سلول‌های استرومایی مغز استخوان (BMSCs) با عملکردهای مشابه و محدود، حاصل می‌گردد (۱۱-۱).

پیشرفت‌های قابل ملاحظه‌ای در تعیین نقش مولکول‌های چسبندگی و سایتوکاین‌های مشتق از نیچ در خود نوسازی سلول‌های بنیادی صورت گرفته است (۱۲). این موضوع که آیا HSC ها خود بقاء، حفظ و توسعه نیچ را تنظیم می‌کنند، هنوز به اثبات نرسیده است. در عین حال عقیده بر این است که ارتباط متقابل میان HSC ها و نیچ، هر یک از فعالیت‌هایشان را تنظیم می‌نماید (۱۴، ۱۳).

در حال حاضر نقش کلیدی سلول‌های استئوبلاست در برقراری و تشکیل نیچ سلول‌های بنیادی خونساز، امری ثابت شده است (۱۲، ۵، ۱). استئوبلاست‌ها رسپتورهای سلول - سلول از جمله N-کاده‌رین، Jagged، مولکول‌های چسبندگی سلولی واسکولار نوع ۱ (VCAM-1)، سایتوکاین‌های سلولی و محلول و فاکتورهای رشد تنظیم کننده اعمال مختلف HSC را بیان می‌نمایند که هر یک از این فاکتورها نیز تحت تاثیر سیگنال‌های مکانیکی، هورمونی (مانند هورمون پاراتیروئید) و موضعی (مانند

آنالیز فلوسیتومتری:

سلول‌های تریپسینه شده در ۱ میلی‌لیتر محلول PBS (Phosphate Buffered Saline) سوسپانسیون شدند. ۵۰ میکرولیتر از سلول‌ها با ۵ میکرولیتر از آنتی‌بادی‌های CD166 و CD105 کنژوگه با فیکواریترین (PE) و آنتی‌بادی‌های CD90، CD34، CD45، و CD44 کنژوگه با فلورسئین ایزوتیوسیانات (FITC) و برای کنترل منفی با آنتی‌بادی‌های PE-IgG1 و FITC-IgG1 مخلوط شدند و به مدت ۲۰ تا ۳۰ دقیقه در ۴ درجه سانتی‌گراد و تاریکی انکوبه شدند. در مرحله بعد سلول‌ها با ۲٪ PBS-BSA شستشو داده شدند و در ۵۰۰ میلی‌لیتر PBS سوسپانسیون شدند و در انتها به منظور فیکس شدن سلول‌ها، ۵۰ میکرولیتر پارافرمالدئید ۱٪ به لوله‌ها اضافه و با دستگاه فلوسیتومتری تجزیه و تحلیل شدند.

جداسازی سلول‌های CD34⁺ از خون بند ناف:

در این مطالعه پس از اخذ رضایت‌نامه از والدین، ۳ نمونه خون بند ناف با میانگین حجمی ۸۰ میلی‌لیتر بلافاصله بعد از زایمان، درست قبل از بسته شدن بند ناف و در شرایط کاملاً استریل، در کیسه‌های مخصوص خون بند ناف حاوی ماده ضد انعقاد و نگه‌دارنده CPDA-1 جمع‌آوری شد. برای جداسازی سلول‌های تک هسته‌ای از خون بند ناف، به دلیل وجود مقادیر بالای گلبول قرمز در خون بند ناف با استفاده از روش‌های مناسب (از جمله افزودن هیدروکسی اتیل استارچ) گلبول‌های قرمز را به حداقل رساندیم تا هم حجم نمونه جهت استفاده مناسب شده و هم کیفیت و کمیت سلول‌های بنیادی موجود در نمونه به حد قابل قبولی برسد. سپس سلول‌های تک هسته‌ای با استفاده از فایکول (با چگالی ۱/۰۷۷ g/mL) و روش گرادینت شیب غلظت جداسازی گردیدند. جداسازی سلول‌های CD34⁺ مطابق دستورالعمل MACS (Magnetic Activated Cell Sorting) متعلق به شرکت میلتنی بیوتک صورت گرفت. برای انجام این کار از آنتی‌بادی‌های نشان دار شده با ذرات microbead بر علیه آنتی ژن CD34 استفاده شد و پس از آغشته شدن سلول‌ها با آنتی‌بادی، از ستون مگنتیک MACS (ستون LS: سایز

با توجه به این که مطالعه‌های مذکور فقط بر روی HSC موشی در *in vivo* و *in vitro* صورت پذیرفته است، در این مطالعه بر آن شدیم تا جهت بررسی شکل‌گیری نیچ استئوبلاستی تحت تأثیر فعالیت HSC‌های انسانی، به تحقیق پردازیم و به این منظور از HSC‌های نمونه‌های خون بند ناف (به دلیل مزایای بسیار این منبع نسبت به سایر منابع) استفاده کردیم تا در صورت تایید این تاثیر، به اهداف درمانی جدیدی در این موضوع نایل آییم.

مواد و روش‌ها

مطالعه انجام شده از نوع تجربی بود. محیط DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium)، کیت آلكالین فسفاتاز و کیت آلیزارین رد از شرکت سیگما، کیت ساخت cDNA از شرکت بیونیر، کیت استئوژنیزس از شرکت میکون، کیت PCR از شرکت تاکارا بیوتکنولوژی دالیان و کیت جداسازی سلول‌های CD34⁺ از شرکت بیوتک خریداری شد. تریپسین، سرم حیوانی (FBS) از شرکت اینویترورژن، آنتی‌بادی‌های مورد نیاز برای فلوسیتومتری از شرکت‌های داکو و بیوساینس و آنتی‌بیوتیک‌ها از شرکت سیناژن تهیه گردید.

جداسازی و کشت سلول‌های MSCs مغز استخوان:

در مطالعه حاضر ۳ نمونه مغز استخوان از افراد اهداکننده سالم (با میانگین حجمی ۱۰ میلی‌لیتر و با اخذ رضایت‌نامه از والدین اهداکنندگان مذکور که جهت اهدای مغز استخوان به بیمارستان شریعتی مراجعه کرده بودند) با ضد انعقاد هپارین تهیه گردید.

به طور خلاصه سلول‌های تک هسته‌ای با استفاده از گرادینت غلظت جدا شدند و در فلاسک کشت ۲۵ cm² حاوی ۶ میلی‌لیتر محیط کشت DMEM، FBS ۱۰٪ و آنتی‌بیوتیک‌های استرپتومایسین و پنی‌سیلین کشت داده شدند. ۴۸ ساعت پس از آغاز کشت، سلول‌های غیر چسبیده با تعویض محیط حذف شدند و به مدت ۱۴ روز، هر ۳ روز یک بار محیط کشت عوض شد. بعد از این مدت سلول‌های مزانشیمی تکثیر یافته و ۸۰٪ کف فلاسک را پوشاندند. در این زمان، سلول‌ها پاساژ داده شد و به فلاسک‌های جدید منتقل گردیدند.

۵٪ سرم به هر چاهک افزوده گردید (گروه آزمایش). پس از ۳ روز هم کشتی، سلول‌های CD34⁺ را از چاهک‌ها خارج کرده و جهت تعدیل شرایط MSC‌ها برای ورود به فاز تمایزی، محیط DMEM با غلظت کم گلوکز حاوی ۱۰٪ FBS جایگزین شد. پس از ۲۴ ساعت، محیط‌ها را از تمام چاهک‌ها کاملاً خارج کرده و به همه چاهک‌ها، ۱ میلی‌لیتر محیط تمایزی سلول‌های مزانشیمی شامل DMEM حاوی دگزامتازون ۱ میلی‌مولار، اسید اسکوربیک دو فسفات ۱/۰ مولار، گلیسرول دو فسفات ۱ مولار و ۱۰٪ سرم افزوده گردید. در ادامه هر دو روز یک بار محیط‌های داخل چاهک‌ها با محیط تمایزی تازه (در هر دو گروه) جایگزین شد. در روزهای ۴ و ۶ تمایزی، فرآیند استخراج RNA، ساخت cDNA، و در نهایت PCR و الکتروفورز روی ژل جهت بررسی بیان ژن‌های استئوپوننتین و استئوکلسین انجام شد. استئوپوننتین I (multidomain، acid-rich Phosphorylated glycoprotein) توسط سلول‌های مختلفی در بدن تولید می‌گردد ولی تولید عمده آن در نیچ اندوستیل توسط استئوبلاست می‌باشد. OPN (استئوپوننتین) یک مولکول خارج سلولی و غیر هماتوپوئیتیک است و به صورت یک تنظیم‌کننده منفی بالقوه برای HSC به واسطه کاهش در آپوپتوز این سلول‌ها عمل می‌کند، بدین ترتیب به عنوان یک جزء کلیدی نیچ سلول‌های HSC مطرح است. استئوکلسین که BGLAP (bone gamma-) protein containing carboxyglutamate acid) نیز نامیده می‌شود، پروتئینی غیرکلاژنی بوده، به صورت انحصاری توسط استئوبلاست ترشح می‌شود و در تنظیم متابولیک بدن، مینرالیزاسیون استخوانی و هموستاز یون کلسیم نقش داشته و ذاتاً یک ماهیت پرواستئوبلاستیک یا استخوان‌سازی دارد. مارکر مهم دیگر در بررسی استئونژنیز CD90 می‌باشد، این مارکر به میزان بالایی در سطح MSC‌ها بیان شده و میزان بیان آن در طی تمایز استئوبلاستی و در سلول استئوبلاست کاهش می‌یابد. در روز ۶ تمایز برای بررسی میزان کاهش بیان این مارکر، بر روی سلول‌های هر دو گروه آزمایش و کنترل فلوسیتومتری مارکر CD90 انجام شد. در روز ۱۰ تمایز نیز جهت بررسی بیان آنزیم آلکالین فسفاتاز (بیان این آنزیم غشایی در

بزرگتر ستون متناسب با تعداد سلول) عبور داده شده و به روش Positive selection این سلول‌ها از سایر سلول‌های تک هسته‌ای جدا شدند و مورد شمارش سلولی و آزمایش حیات‌پذیری (Viability) قرار گرفتند.

ارزیابی درجه خلوص سلول‌های CD34⁺:

در این مرحله جهت تعیین خلوص سلول‌های CD34⁺ به روش فلوسیتومتری، ابتدا ۵۰ میکرولیتر از سوسپانسیون سلولی (حاوی ۱۰^۶ سلول در هر میلی‌لیتر) با ۵ میکرولیتر از آنتی‌بادی منوکلونال CD34⁺ کوئزوگه با FITC (فلورسئین ایزوتیوسیانات) و برای کنترل منفی با آنتی‌بادی FITC-IgG1 مخلوط شدند و به مدت ۲۰ تا ۳۰ دقیقه در ۴ درجه سانتی‌گراد و تاریکی انکوبه شدند. در مرحله بعد سلول‌ها با ۲٪ PBS-BSA شستشو داده شدند و در ۵۰۰ میلی‌لیتر PBS سوسپانسیون شدند و در انتها به منظور فیکس شدن سلول‌ها، ۵۰ میکرولیتر پارافرمالدئید ۱٪ به لوله‌ها اضافه و با دستگاه فلوسیتومتری تجزیه و تحلیل شدند.

کشت هم‌زمان سلول‌های بنیادی خونساز و مزانشیمی:

در این آزمایش از دو گروه شامل گروه آزمایش یعنی MSC‌هایی که با HSC هم کشتی داده شده و سپس تحت تمایز استئوبلاستی قرار گرفتند و گروه کنترل یعنی MSC‌هایی که بدون هم کشتی با HSC تحت تمایز استئوبلاستی قرار گرفتند، استفاده شد. قابل ذکر است که سلول‌های MSC در هر ۲ گروه از یک اهداکننده و از یک پاساژ سلولی برداشت شده‌اند و تمام مراحل کار ۳ بار تکرار شده است. این دستورالعمل شامل ۳ بخش هم‌کشتی MSC‌ها با سلول‌های HSC، تمایز سلول‌های MSC و ارزیابی‌های مورد نظر می‌باشد. ابتدا ۱۰^۴ × ۵ سلول MSC در محیط DMEM حاوی ۱۰ درصد سرم حیوانی در چاهک‌های پلیت ۲۴ خانه‌ای که با کلاژن و ویتروکتین پوشیده شده بودند، کشت داده شد. بعد از این که سلول‌ها به هم‌پوشانی ۸۰٪ تا ۹۰٪ رسیدند، محیط DMEM از چاهک‌ها خارج و پس از شستشوی چاهک‌ها با PBS، تعداد ۱۰^۴ × ۵ از سلول‌های CD34⁺ تازه جدا شده به همراه ۱ میلی‌لیتر محیط Stem Span حاوی ۱۰ ng/mL SCF

جدول ۱: آغازگرهای ژن‌های بتا‌اکتین، استئوپوننتین و استئوکلکسین

نام آغازگر	دما (°C)	سکانس
OPNF جلوبرنده	۶۸	5'-TGA GAG CAA TGA GCA TTC CGA TG-3'
OPNF معکوس	۶۸	5'-CAG GGA GTT TCC ATG AAG CCA C-3'
OCNF جلوبرنده	۵۴	5'-AGC GAG GTA GTG AAG AGA-3'
OCNF معکوس	۵۴	5'-AGG GGA AGA GGA AAG AAG-3'
β -actin جلوبرنده	۵۹	5'-TTC TAC AAT GAG CTG CGT GTG G-3'
β -actin معکوس	۵۹	5'-GTG TTG AAG GTC TCA AAC ATG AT-3'

جداسازی و کشت سلول‌های MSC:

۴۸ ساعت بعد از کشت سلول‌های تک هسته‌ای، سلول‌های غیر چسبان حذف شدند. سلول‌های دوکی شکل مزانشیمی پس از گذشت سه روز در محیط کشت به صورت سلول‌های چسبنده ظاهر شدند. تعدادی سلول هماتوپوئیتیک به طور آزاد یا چسبیده به سلول‌های مزانشیمی هنوز در محیط دیده می‌شد که در روزهای بعدی با تعویض محیط این سلول‌ها حذف شدند و تنها سلول‌های مزانشیمی در محیط باقی ماندند. کشت اولیه در حدود ۱۰ تا ۱۴ روز طول کشید که در نهایت در روز چهاردهم، سلول‌ها بیش از ۸۰٪ کف فلاسک را پوشاندند.

بررسی مارکرهای سطح سلولی MSCs:

نتایج مربوط به مارکرهای سطحی سلول‌های مزانشیمی در شکل ۱ نشان داده شده است. میانگین درصد بیان مارکرهای اختصاصی سلول‌های بنیادی مزانشیمی شامل CD90، CD166، CD105 و CD44 در سلول‌های جدا شده از مغز استخوان به ترتیب $8/7 \pm 96/8$ ، $12/1 \pm 98/8$ ، $9/5 \pm 93$ و $10/2 \pm 99/5$ می‌باشد. در حالی که مارکرهای ویژه سلول‌های هماتوپوئیتیک از جمله CD45 و CD34 در این سلول‌ها بیان قابل توجهی ($3/3 \pm 0/3$ ، $2/8 \pm 0/4$) را نشان ندادند (شکل ۱).

جداسازی سلول‌های CD34⁺:

میانگین درصد خلوص سلول‌های CD34⁺ جدا شده با

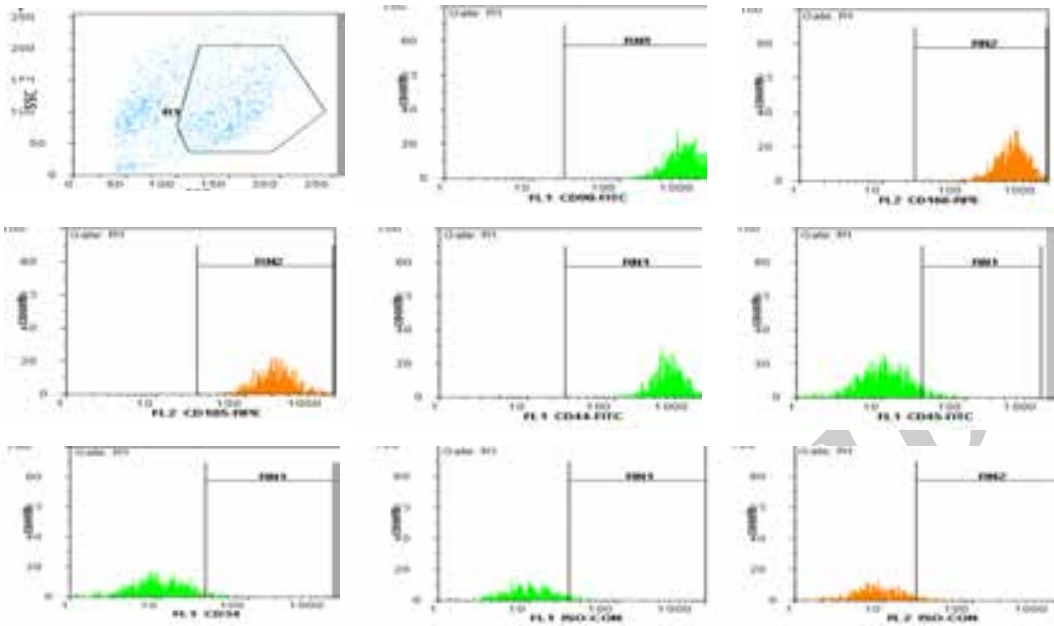
حین تمایز MSC به استئوبلاست، ۴۷ Fold افزایش می‌یابد و به عنوان اولین نشانه این تمایز به روش آنزیماتیک و رنگ‌آمیزی اختصاصی قابل ارزیابی می‌باشد)، رنگ‌آمیزی ALP و جهت بررسی مینرالیزاسیون سلولی و میزان رسوب کلسیم فسفات در MSCها، رنگ‌آمیزی آلیزارین رد بر روی سلول‌های هر دو گروه مذکور صورت گرفت.

جدول ۲: برنامه زمانی و دماهای لازم دستورالعمل کیت Takara جهت انجام PCR

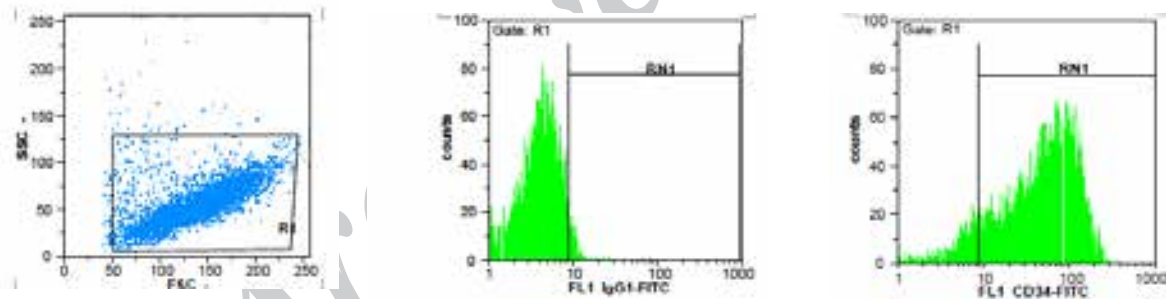
دنا تورا سیون مقدماتی	۹۵ °C	۵ دقیقه
دنا تورا سیون	۹۴ °C	۱ دقیقه
آنیلینگ	۵۸ °C	۴۵ ثانیه
اکستنشن	۷۲ °C	۴۵ ثانیه
اکستنشن نهایی	۷۲ °C	۵ دقیقه

آنالیز RT-PCR:

سلول‌ها از نظر بیان ژن استئوپوننتین و استئوکلکسین مورد بررسی قرار گرفتند. برای این منظور RNA سلول‌های هر دو گروه آزمایش و کنترل جداسازی شد. سپس cDNA در واکنش رونویسی معکوس با استفاده از کیت ساخت cDNA تهیه شد. در ادامه واکنش PCR انجام شد (جداول ۱ و ۲). در پایان محصول PCR درون چاهک‌های ژل ۲ درصد آگاروز ریخته شد و پس از الکتروفورز با رنگ اتیدیوم بروماید رنگ‌آمیزی و سپس ارزیابی شد.



شکل ۱: نتایج فلوسیتومتری سلول‌های مزانشیمی مغز استخوان. ردیف اول از چپ: جمعیت سلول‌های بزرگ تک هسته‌ای، واکنش سلول‌ها با آنتی CD90 و آنتی CD166. ردیف دوم از چپ: واکنش سلول‌ها با آنتی CD105، آنتی CD44 و آنتی CD45. ردیف سوم از چپ واکنش سلول‌ها با آنتی CD34 و ایزوتیپ کنترل.



شکل ۲: خصوصیات ایمونوفنوتیپی سلول‌های CD34⁺ جدا شده با روش MACS. از چپ: شکل اول: جمعیت سلول‌های بزرگ تک هسته‌ای. شکل دوم: واکنش سلول‌ها با آنتی‌بادی ایزوتیپ. شکل سوم: واکنش سلول‌ها با آنتی CD34 (R1=97.9% of total cells, RN1=84.27%).

آزمایش و کنترل، عوامل تمایز دهنده (دگزامتازون، اسید اسکوربیک، گلیسرول فسفات) افزوده شد (شکل‌های ۳ و ۴).

با توجه به این که در طی تمایز محتویات کلسیم در سلول‌ها افزایش می‌یابند، از رنگ‌آمیزی اختصاصی آلزارین رد رسوبات کلسیم (به رنگ قرمز) در سلول‌های تمایز یافته در هر دو گروه آزمایش و کنترل بهره جسته شد. هم چنین در سلول‌های استئوبلاست، فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز افزایش یافته و شاخصی برای تمایز سلول‌ها

استفاده از روش فلوسیتومتری $5/6 \pm 84/27$ درصد و میانگین درصد زنده ماندن سلول‌های جدا شده حدود 2 ± 89 درصد بود (شکل ۲).

یافته‌ها

ارزیابی توانایی تمایز سلول‌های مزانشیمی به استئوبلاست در دو گروه آزمایش و کنترل:

رنگ‌آمیزی آلکالین فسفاتاز و آلزارین رد:

به منظور تمایز سلول‌های مزانشیمی به سلول‌های استئوبلاست، به محیط کشت پایه سلول‌های هر دو گروه



شکل ۳: سلول‌های مزانشیمی تمایز داده شده به سمت استئوبلاست بدون هم کشتی با HSC (گروه کنترل) در (A) روز چهارم تمایزی. (B) روز ششم تمایزی. (C) روز دهم تمایزی (بزرگ نمایی ۴۰x).



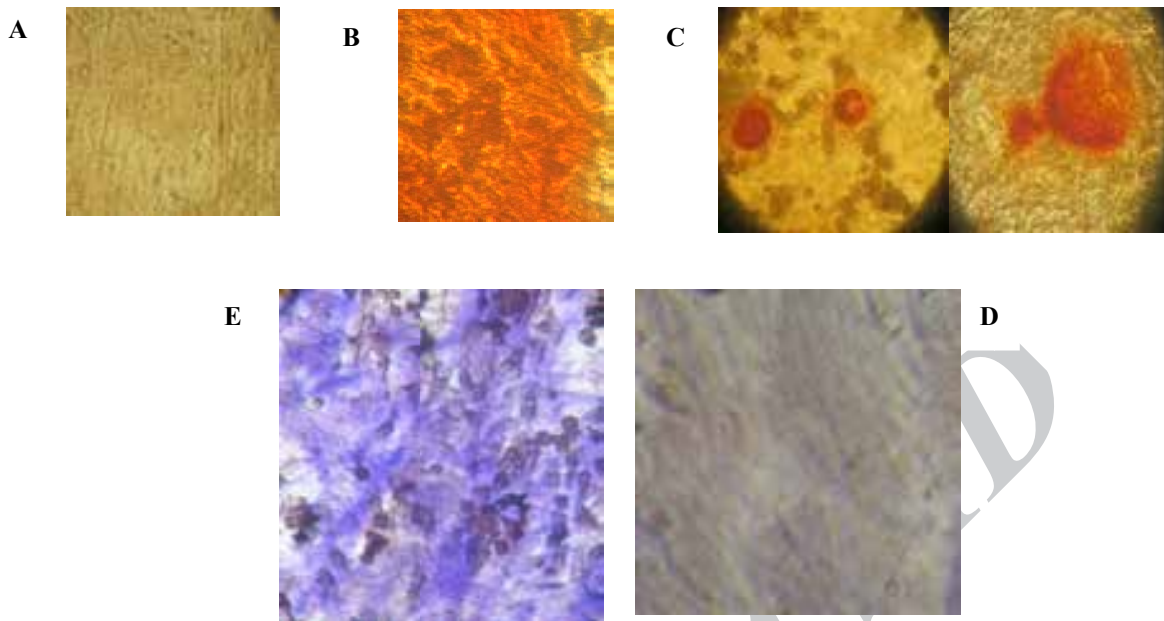
شکل ۴: سلول‌های مزانشیمی تمایز داده شده به سمت استئوبلاست که قبلاً با HSCها هم کشتی داشته‌اند (گروه آزمایش). (A) روز چهارم تمایزی. (B) روز ششم تمایزی. (C) روز دهم تمایزی (بزرگ نمایی ۴۰x).

سلول‌های بنیادی مزانشیمی به استئوبلاست می‌شوند در حالی که در گروه کنترل، زودتر از روز ۱۴ رنگ‌آمیزی مثبتی مشاهده نگردید. هم چنین چند ناحیه در رنگ‌آمیزی سلول‌های گروه آزمایش نمایان شد که به صورت کانونی رنگ گرفته بودند. احتمال می‌رود در این مناطق HSCها در اتصال و تماس مستقیم با MSCها بوده و بر همکنش‌های میان این دو سلول، یکی از عوامل دخیل در اثر مذکور باشند.

در همین رابطه مشخص شد در مناطق فوق، با افزایش روزهای تمایز (تا روز ۱۰)، سلول‌های HSC نه تنها کاهش نیافته بلکه تکثیر پیدا می‌کنند. این امر نیز دلیل دیگری بر تماس مستقیم MSC و HSC می‌باشد که در واقع تا روز دهم سلول‌ها به استئوبلاست تمایز می‌یابند. استئوبلاست‌ها دارای نقش در خود نوسازی HSCها بوده لذا تاثیرات متقابل این دو سلول در نواحی مذکور قابل مشاهده است (شکل ۵).

محسوب می‌گردد، لذا سلول‌های تمایز یافته در هر دو گروه آزمایش و کنترل با انجام این رنگ‌آمیزی، مورد ارزیابی قرار گرفتند. در سلول‌های مزانشیمی تمایز یافته، میزان فعالیت این آنزیم افزایش یافته که بیانگر تمایز این سلول‌ها به سلول‌های رده استئوبلاستیک می‌باشد. در تمایز سلول‌های MSC به استئوبلاست به روش استاندارد (گروه کنترل)، دو رنگ‌آمیزی مذکور از روز ۱۴ تمایز مثبت شدند. در این مطالعه انتظار می‌رفت به دلیل هم کشتی این سلول‌ها با HSCها و تأثیر آن‌ها بر تمایز MSCها به استئوبلاست‌ها، سلول‌های بنیادی مزانشیمی زودتر وارد فاز تمایزی گردند.

در بررسی این امر در گروه آزمایش، به دنبال تکرارهای متوالی و رنگ‌آمیزی‌های فوق در روزهای مختلف بعد از هم کشتی، مشخص شد که از روز ۱۰ تمایز به بعد، رنگ‌آمیزی‌ها مثبت می‌گردند. این مطلب حاکی از آن است که سلول‌های بنیادی خونساز باعث افزایش سرعت تمایز



شکل ۵: رنگ‌آمیزی آلیزارین رد در سلول‌های مزانشیمی تمایز داده شده به سمت استئوبلاست در روز دهم تمایزی در گروه کنترل منفی (A) و در گروه آزمایش مثبت بود (B) و نیز در نواحی از سلول‌های تمایز یافته گروه آزمایش این رنگ‌آمیزی به صورت کانونی مثبت بود (C) (بزرگ‌نمایی ۴۰x)، رنگ‌آمیزی آلکالین فسفاتاز در سلول‌های مزانشیمی تمایز داده شده به سمت استئوبلاست در روز دهم تمایزی در گروه کنترل منفی (D) و در گروه آزمایش مثبت بود (E) (بزرگ‌نمایی ۴۰x).

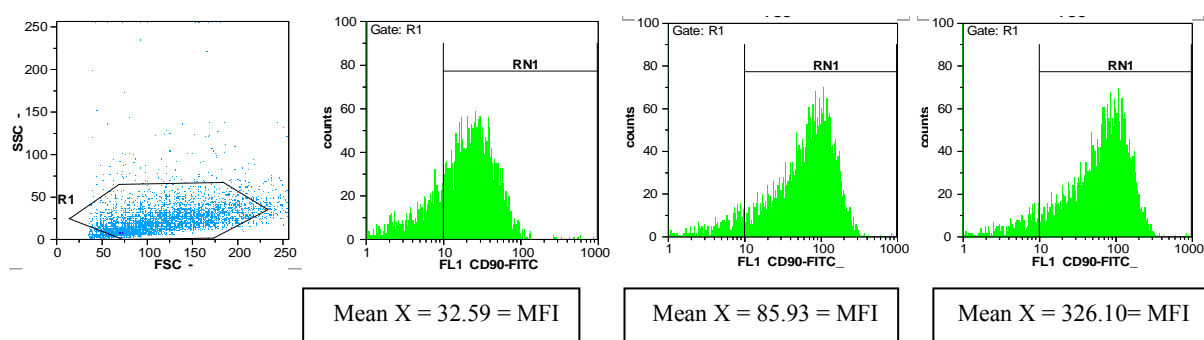
پروتئین را نشان می‌دهند، میانگین شدت رنگ فلورسنت، بیانگر میانگین میزان بیان مارکر CD90 در سلول‌های تحت بررسی می‌باشد.

به همین دلیل میانگین فلورسنت بازتابی سلول‌ها (میزان مارکرهای هدف که به آنتی‌بادی منوکلونال متصل شده‌اند) به عنوان میزان بیان مارکر مورد نظر در سلول‌های دو گروه آزمایش و کنترل بررسی گردید. نتایج نشان دادند که با توجه به میزان بیان مارکر CD90⁺ در سلول‌های مزانشیمی پیش از تمایز، میزان بیان آن در سلول‌های مزانشیمی در روز ششم تمایزی، در سلول‌های گروه آزمایش نسبت به سلول‌های مذکور در گروه کنترل بسیار بیشتر کاهش یافته است (شکل ۶).

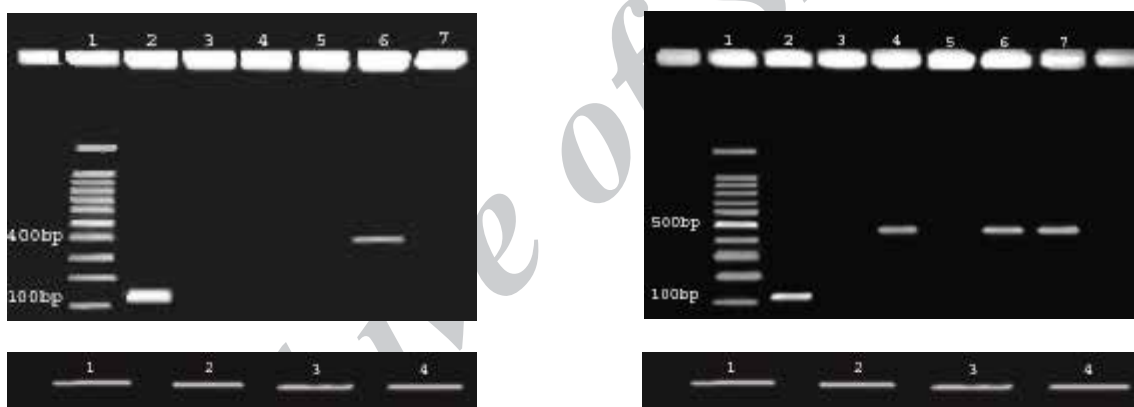
بررسی بیان ژن استئوپونین و استئوکلسین:

تمایز سلولی با استفاده از بیان ژن استئوپونین و استئوکلسین مورد ارزیابی قرار گرفت. طبق آن چه که در مطالعه‌های مختلف گزارش گردیده، بیان ژن استئوپونین از

انجام فلوسیتومتری جهت تایید کاهش بیان مارکر CD90⁺: همان طور که در مطالعه‌های مختلف اشاره شده است، در تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی جدا شده از مغز استخوان، میزان بیان مارکر CD90⁺ کاهش می‌یابد. در این مطالعه از این امر جهت مقایسه سرعت تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی بین دو گروه آزمایش و کنترل استفاده نمودیم. برای انجام این کار جمعیت سلول‌های بنیادی مزانشیمی CD90⁺، مارکری که در سلول‌های MSC به میزان بالایی بیان می‌شود، جهت بررسی فلوسیتومتری جداسازی گردیدند. جهت مقایسه میزان بیان CD90⁺ در سطح سلول‌های دو گروه آزمایش و کنترل در روز ۶ تمایزی، از آن جا که آنتی‌بادی‌های مونوکلونال به مولکول‌های فلورسنت متصل بوده و در واکنش اختصاصی به مولکول‌های CD90⁺ متصل می‌شوند و به همین دلیل شدت رنگ فلورسنت بازتابی نمایانگر مقدار حضور مارکر مذکور در سطح سلول‌ها می‌باشد. لذا در بررسی فلوسیتومتری ضمن تعیین درصد سلول‌هایی که بیان



شکل ۶: نتایج فلوسیتومتری بررسی مقایسه میزان بیان مارکر CD90 که به صورت میانگین فلورسنت بازتابی ارایه شده است. از چپ: پراکندگی سلولی در جمعیت مورد مطالعه و بیان مارکر CD90 سلول‌های گروه آزمایش در روز ۶ تمایز، بیان مارکر CD90 سلول‌های گروه کنترل در روز ۶ تمایز و بیان مارکر CD90 در سلول‌های MSC پیش از تمایز.



شکل ۸: شکل بالا: بیان ژن‌های استنوکلسین (OCN) و بتا اکتین (β -actin) در سلول‌های مزانشیمی تمایز یافته به استئوبلاست. (۱) نشانگر شاخص وزن مولکولی (DNA Size Marker 100bp) است. (۲) بیان ژن بتا اکتین (۳) کنترل منفی (۴) بیان OCN در روز ۴ تمایز سلول‌های مزانشیمی آزمایش (۵) بیان OCN در روز ۴ تمایز سلول‌های مزانشیمی کنترل (۶) بیان OCN در روز ۶ تمایز سلول‌های مزانشیمی آزمایش (۷) بیان OCN در روز ۶ تمایز سلول‌های مزانشیمی کنترل را نشان می‌دهد.

شکل پایین: بیان ژن بتا اکتین به ترتیب در سلول‌های (۱) روز ۴ تمایز گروه آزمایش، (۲) روز ۴ تمایز گروه کنترل، (۳) روز ۶ تمایز گروه آزمایش و (۴) روز ۶ تمایز گروه کنترل.

شکل ۷: شکل بالا: بیان ژن‌های استنوپونتین (OPN) و بتا اکتین (β -actin) در سلول‌های مزانشیمی تمایز یافته به استئوبلاست. (۱) نشانگر شاخص وزن مولکولی (DNA Size Marker 100bp) است. (۲) بیان ژن بتا اکتین (۳) کنترل منفی (۴) بیان OPN در روز ۶ تمایز سلول‌های مزانشیمی کنترل (۵) بیان OPN در روز ۶ تمایز سلول‌های مزانشیمی آزمایش (۶) بیان OPN در روز ۴ تمایز سلول‌های مزانشیمی آزمایش (۷) بیان OPN در روز ۴ تمایز سلول‌های مزانشیمی کنترل را نشان می‌دهد.

شکل پایین: شکل سمت چپ بیان ژن بتا اکتین به ترتیب در سلول‌های (۱) روز ۴ تمایز گروه آزمایش، (۲) روز ۴ تمایز گروه کنترل، (۳) روز ۶ تمایز گروه آزمایش و (۴) روز ۶ تمایز گروه کنترل.

مزانشیمی پیش از تمایز، ژن استنوکلسین بیان نمی‌گردد. در این مطالعه انتظار می‌رفت که هم کشتی سلول‌های HSC با سلول‌های MSC باعث شود این سلول‌ها زودتر از زمان ذکر شده وارد فاز تمایز گردند و به عبارتی بیان این دو

روز سوم شروع و در روز هفتم تمایز به حداکثر می‌رسد و بعد از آن به تدریج کاهش می‌یابد و متعاقب کاهش آن، بیان ژن استنوکلسین از روز هفتم افزایش می‌یابد. این در حالی است که در سلول‌های بنیادی

محیط تمایزی استئوژنیک شامل DMEM-LG، FBS، L-آسکوربات، β -گلیسرول فسفات و دگزامتازون کشت داده شدند. نظر به این که میزان بیان ALP و نیز رسوبات کلسیم در طی فرآیند تمایز استئوبلاستی در این سلول‌ها افزایش می‌یابد، از رنگ‌آمیزی سیتوشیمی ALP و آلیزارین رد به عنوان شاخص تمایز استئوبلاستیک استفاده گردید. نتایج به دست آمده با نتایج مطالعه‌های صورت گرفته توسط محققینی از جمله مولمن و همکاران وی در سال ۲۰۰۶ (مطابقت داشت) (۱۹). بررسی شاخص‌های دیگر تمایز استئوبلاستیک شامل استئوپونتین و استئوکلسین نیز به روش مولکولی (RT-PCR) انجام شد که نتایج حاصله در گروه کنترل مطابق با نتایج هایلاک و همکاران وی در سال ۲۰۰۳ و نیز E پوجاز و همکارانش در سال ۲۰۰۷ می‌باشد (۲۰، ۱۵). مشاهده گردید که بیان ژن OPN در روز ۷ تمایز به حداکثر رسیده و سپس به تدریج کاهش می‌یابد. بیان ژن OCN نیز وابسته به زمان بوده و از روز ۷ تمایز افزایش می‌یابد. در این مطالعه مشاهده شد که در سلول‌های گروه آزمایش، بیان ژن OPN در روز ۴ تمایز بالاتر از بیان ژن OPN در سلول‌های گروه کنترل بوده و بیان آن در روز ۶ تمایزی در گروه آزمایش، با روش RT-PCR قابل ردیابی نمی‌باشد در حالی که در گروه کنترل هم چنان بیان ژن مذکور در روز ۶ تمایز قابل مشاهده می‌باشد. بیان OCN نیز از روز ۶ تمایز قابل ردیابی است. به دلیل این که تاکنون مطالعه مشابهی بر روی HSC و MSC‌های انسانی صورت نگرفته است لذا نتایج فوق قابل مقایسه با نتایج مطالعه‌های دیگر نمی‌باشد. هم چنین در این مطالعه جهت مقایسه روند تمایز بین دو گروه آزمایش و کنترل، بررسی بیان مارکر CD90 به روش فلوسیتومتری قبل و بعد از تمایز در هر دو گروه صورت پذیرفت و نتایج به دست آمده مبنی بر کاهش بیان این مارکر در طی تمایز استئوبلاستی MSC‌ها، با نتایج مطالعه صورت گرفته توسط وایسمن و همکاران وی در سال ۲۰۰۶ مطابقت دارد. البته در مطالعه مذکور از روش ایمونوفلورسانس جهت بررسی بیان CD90 استفاده گردیده است (۲۱). هم چنین مشخص گردید کاهش بیان این مارکر در سلول‌های گروه آزمایش، به میزان قابل توجهی بیشتر از سلول‌های

ژن در سلول‌های تمایز یافته زودتر تحقق یابد. نتایج حاصله این مدعا را اثبات نمودند و در سلول‌های تمایز یافته گروه آزمایش، بیان ژن استئوپونتین در روز چهارم تمایز کاهش و در روز ششم تمایز عدم بیان این ژن مشاهده گردید (شکل ۷). بیان ژن استئوکلسین نیز در این سلول‌ها از روز ششم تمایز شروع شد در حالی که در سلول‌های گروه کنترل، بیان این ژن مشاهده نگردید (شکل ۸). این نتایج همگی تایید می‌نمایند که سلول‌های HSC باعث افزایش سرعت تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی به استئوبلاست می‌شوند.

بحث

در مطالعه‌های انجام شده توسط محققین متعددی از جمله تایچمن و همکاران وی در سال ۱۹۹۷، ارتباط تنگاتنگی میان سلول‌های بنیادی خونساز و سلول‌های استئوبلاست مشاهده گردید که به موجب آن، HSC‌ها بیان فعالیت‌های حمایتی خونسازی را از طریق سلول‌های استئوبلاست القا می‌نمایند، لذا این فرضیه مطرح می‌شود که ارتباط متقابل میان این دو سلول، جهت توسعه و نمو هر دو جمعیت سلولی، امری ضروری می‌باشد (۱۸). در این مطالعه نشان داده شد که در فرآیند تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی، سلول‌هایی که پیش از تمایز تحت هم‌کشتی با سلول‌های بنیادی خونساز $CD34^+$ قرار گرفته‌اند نسبت به آن‌هایی که بدون هم‌کشتی با سلول‌های مذکور تمایز داده شده‌اند، زودتر وارد فاز تمایزی به سمت استئوبلاست می‌گردند و این امر با بررسی بیان دو ژن استئوپونتین و استئوکلسین در روزهای مختلف تمایز، رنگ‌آمیزی سیتوشیمیایی آکالین فسفاتاز و آلیزارین رد و نیز بررسی بیان مارکر CD90 در این سلول‌ها، تحقق پذیرفت. با استناد به نتایج حاصله اثبات گردید که سلول‌های HSC انسانی $CD34^+$ جداشده از خون بند ناف قادرند سبب افزایش تمایز سلول‌های MSC انسانی به دست آمده از مغز استخوان به سلول‌های استئوبلاست شوند و به عبارت دیگر می‌توانند نیچ خود را تنظیم نموده و سبب گسترش نیچ استئوبلاستیک گردند. جهت بررسی توانایی تمایز MSC‌ها به رده استئوبلاستی، این سلول‌ها در

به عبارتی *condition media* وارد محیط تمایزی MSC می‌شود. فاکتورهای مورد نظر در این مطالعه نیز شامل بررسی مقادیر IL6، SCF، OCN، BMP2 و BMP6 در هم‌کشتی مذکور می‌باشد و عنوان گردیده است که احتمالاً افزایش بیان BMP₂ و BMP₆ تولید شده توسط HSCها، مسؤول تمایز MSC به استئوبلاست بوده و نقشی برای اتصال سلول - سلول در این امر مطرح نشده است (۱۷). در حالی که با توجه به نتایجی که در این مطالعه حاصل گشت، تصور می‌شود که بر همکنش‌های سلول - سلول نیز علاوه بر افزایش بیان BMP2 و BMP6، نقش به‌سزایی را در این پدیده ایفا می‌نمایند. در نهایت در این مطالعه اثبات گردید که HSCهای انسانی جدا شده از خون بند ناف، قادرند سبب افزایش سرعت تمایز MSCهای انسانی جدا شده از مغز استخوان به استئوبلاست گردند و به عبارتی گسترش نیچ استئوبلاستیک را صورت دهند. اما جزئیات، برهمکنش‌ها و عوامل دخیل در این امر هنوز مشخص نمی‌باشد و نیاز به بررسی‌های سلولی و مولکولی دقیق در این رابطه است. امید است که با نیل به این هدف، گامی مؤثر در دستیابی به اهداف درمانی جدید در حوزه هماتوپوئیتیک برداشته شود.

نتیجه‌گیری

نتایج ما بیان‌زود هنگام ژن‌های استئوپوئیتین و استئوکلسین را در هم‌کشتی MSC با HSCها نمایان ساخت. این یافته‌ها از نقش HSCها در القای تمایز استئوبلاستی MSCها حمایت می‌نمایند. هم‌چنین کاهش بیان CD90 و افزایش فعالیت آلکالین فسفاتاز و مینرالیزاسیون سلولی این نتایج را تایید نمودند.

تشکر و قدردانی

این مقاله حاصل پایان‌نامه کارشناسی ارشد مصوب مرکز تحقیقات مؤسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون وابسته به سازمان انتقال خون ایران می‌باشد. بدین وسیله از کلیه همکاران مرکز تحقیقات سازمان انتقال خون ایران که در انجام این پایان‌نامه ما را یاری نمودند تشکر و قدردانی می‌نماییم.

گروه کنترل می‌باشد که این امر نیز گواه دیگری بر تاثیر سلول‌های HSC بر افزایش سرعت تمایز MSCها به سلول‌های استئوبلاست می‌باشد.

نتایج به دست آمده از مطالعه دیگری ولامو و همکاران وی در سال ۱۹۹۹ و نیز سکیا و همکارانش در سال ۲۰۰۲ همگی نشان می‌دهند که با افزایش سن اهدا کننده، خاصیت تمایز استئوبلاستی MSCها کاهش می‌یابد. با توجه به این که در مطالعه‌های قبلی صورت گرفته در آزمایشگاه نیز این امر مشاهده گردید لذا در این مطالعه از نمونه‌های مغز استخوان کودکان استفاده شد (۲۳، ۲۲). در این مطالعه، با توجه به این که هدف از هم‌کشتی HSC و MSC، حفظ MSCها در محیط کشت می‌باشد، لذا پس از بررسی‌های متعدد بهترین محیط آزمایش Stem Span + SCF (جهت جلوگیری از تمایز HSCها و خود نوساز ماندن آن‌ها به کار برده شد و نیز بی‌تاثیری آن بر تمایز MSCها بررسی گردید) + ۵٪ FBS می‌باشد. به علاوه نمایان گشت که محیط Stem Span، تاثیر سویی بر رشد و تمایز MSCها ندارد.

نکته دیگر این بود که در گروه آزمایش، پس از اتمام هم‌کشتی سلول‌ها، حتی با وجود شستشوی صورت گرفته، هم‌چنان تعدادی از HSCها به MSCهای در حال تمایز متصل باقی ماندند و نه تنها حذف نشدند بلکه در محیط تمایزی، تکثیر نیز یافتند. مشاهده گردید که این مناطق در رنگ‌آمیزی آلزارین رد، به صورت کانونی رنگ می‌گیرند. با توجه به شواهد موجود احتمال می‌رود در این مناطق، HSCها در اتصال و تماس مستقیم با MSCها بوده و برهمکنش‌های میان این دو سلول، یکی از عوامل دخیل در اثر مذکور باشند. لازم به ذکر است که به دلیل عدم وجود مطالعه مشابه بر روی سلول‌های انسانی مذکور، این نتایج قابل مقایسه با نتایج دیگر نمی‌باشد.

البته در سال ۲۰۰۸، مطالعه نسبتاً مشابهی توسط یانگ هون جانگ و همکاران وی بر روی سلول‌های مذکور موشی در *in vitro* و *in vivo* صورت پذیرفته است ولی در آن مطالعه جهت هم‌کشتی از پلیت‌های Transwell استفاده شده که در آن دو سلول HSC و MSC با هم تماس سلول - سلول نداشته و صرفاً فاکتورهای مترشحه از HSCها یا

References :

- 1- Taichman RS, Emerson SG. Human osteoblasts support hematopoiesis through the production of granulocyte colony-stimulating factor. *J Exp Med* 1994; 179(5): 1677-82.
- 2- Adams GB, Chabner KT, Alley IR, Olson DP, Szczepiorkowski ZM, Poznansky MC, *et al.* Stem cell engraftment at the endosteal niche is specified by the calcium-sensing receptor. *Nature* 2006; 439(7076): 599-603.
- 3- Arai F, Hirao A, Ohmura M, Sato H, Matsuo S, Takubo K, *et al.* Tie2/angiopoietin-1 signaling regulates hematopoietic stem cell quiescence in the bone marrow niche. *Cell* 2004; 118(2): 149-61.
- 4- Calvi LM, Adams GB, Weibrecht KW, Weber JM, Olson DP, Knight MC, *et al.* Osteoblastic cells regulate the hematopoietic stem cell niche. *Nature* 2003; 425(6960): 841-6.
- 5- Nilsson SK, Johnston HM, Whitty GA, Williams B, Webb RJ, Denhardt DT, *et al.* Osteopontin, a key component of the hematopoietic stem cell niche and regulator of primitive hematopoietic progenitor cells. *Blood* 2005; 106(4): 1232-9.
- 6- Beresford JN. Osteogenic stem cells and the stromal system of bone and marrow. *Clin Orthop Relat Res* 1989; 240: 270-80.
- 7- Dorheim MA, Sullivan M, Dandapani V, Wu X, Hudson J, Segarini PR, *et al.* Osteoblastic gene expression during adiposegenesis in hematopoietic supporting murine bone marrow stromal cells. *J Cell Physiol* 1993; 154(2): 317-28.
- 8- Gordon MY, Clarke D, Atkinson J, Greaves MF. Hemopoietic progenitor cell binding to the stromal microenvironment *in vitro*. *Exp Hematol* 1990; 18(7): 837-42.
- 9- Quesenberry PJ. Stromal cells in long-term bone marrow cultures. In: Tavassoli M, editor. *Handbook of the Hematopoietic Microenvironment*. Clifton, NJ: Humana Press; 1989. p. 253-85.
- 10- Kaigler D, Krebsbach PH, West ER, Horger K, Huang YC, Mooney DJ. Endothelial cell modulation of bone marrow stromal cell osteogenic potential. *FASEB J* 2005; 19(6): 665-7.
- 11- Krebsbach PH, Kuznetsov SA, Satourma K, Emmons RV, Rowe DW, Robey PG. Bone formation *in vivo*: comparison of osteogenesis by transplanted mouse and human marrow stromal fibroblasts. *Transplantation* 1997; 63(8): 1059-69.
- 12- Taichman RS. Blood and bone: two tissues whose fates are intertwined to create the hematopoietic stem-cell niche. *Blood* 2005; 105(7): 2631-9.
- 13- Li Z, Li L. Understanding hematopoietic stem-cell microenvironments. *Trends Biochem Sci* 2006; 31(10): 589-95.
- 14- Wilson A, Trumpp A. Bone-marrow haematopoietic-stem-cell niches. *Nat Rev Immunol* 2006; 6(2): 93-106.
- 15- Haylock DN, Nilsson SK. Osteopontin: a bridge between bone and blood. *Br J Haematol* 2006; 134(5): 467-74.
- 16- Murrell W, Féron F, Wetzig A, Cameron N, Splatt K, Bellette B, *et al.* Multipotent stem cells from adult olfactory mucosa. *Dev Dyn* 2005; 223(2): 496-515.
- 17- Jung Y, Song J, Shiozawa Y, Wang J, Wang Z, Williams B, *et al.* Hematopoietic stem cells regulate mesenchymal stromal cell induction into osteoblasts thereby participating in the formation of the stem cell niche. *Stem Cells* 2008; 26(8): 2042-51.
- 18- Taichman RS, Reilly MJ, Emerson SG. Human osteoblasts support human progenitor cells *in vitro* bone marrow cultures. *Blood* 1996; 87(2): 518-24.
- 19- Meuleman N, Tondreau T, Delforge A, Massy M, Libertalis M, Bron D, *et al.* Human marrow mesenchymal stem cell culture: serum-free medium allows better expansion than classical alpha-MEM medium. *Eur J Haematol* 2006; 76(14): 309-16.
- 20- Lee NK, Sowa H, Hinoi E, Ferron M, Ahn JD, Confavreux C, *et al.* Endocrine regulation of energy metabolism by the skeleton. *Cell* 2007; 130(3): 456-69.
- 21- Wiesmann A, Bühring HJ, Mentrup C, Wiesmann HP. Decreased CD90 expression in human mesenchymal stem cells by applying mechanical stimulation. *Head Face Med* 2006; 2: 8.
- 22- Sekiya I, Larson BL, Smith JR, Pochampally R, Cui JG, Prockop DJ. Expansion of human adult stem cells from bone marrow stroma: conditions that maximize the yields of early progenitors and evaluate their quality. *Stem Cells* 2002; 20(6): 530-41.
- 23- Digirolamo CM, Stokes D, Colter D, Phinney DG, Class R, Prockop DJ. Propagation and senescence of human marrow stromal cells in culture: a simple colony-forming assay identifies samples with the greatest potential to propagate and differentiate. *Br J Haematol* 1999; 107(2): 275-81.

Original Article

Effect of human hematopoietic stem cells on differentiation of mesenchymal stem cells to osteoblast cells

Fadaei R.¹, Amirizadeh N.¹, Nikougoftar M.¹, Habibi Roudkenar M.¹

¹*Blood Transfusion Research Center, High Institute for Research and Education in Transfusion Medicine, Tehran, Iran*

Abstract

Background and Objectives

The correlation between hematopoietic stem cells (HSCs) and the cells comprising the niche especially osteoblast cells is critical for maintaining stem cell activities. Yet little evidence supports the concept that HSCs regulate development of the niche. If true, it may explain why many hematopoietic defects are accompanied by changes in the osseous architecture and provide new therapeutic targets for regulating bone formation.

Materials and Methods

In this experimental study, we cocultured bone marrow mesenchymal stem cells (MSCs) with umbilical cord blood HSCs in stem span media for 3 days. Then MSCs were differentiated to osteoblast cells by using osteogenesis kit. Evaluation of osteogenic differentiation of MSCs in different days came out to be: expression of osteopontin and osteocalcin (RT-PCR on days 4 and 6), expression of CD90 (flow cytometry on day 6), expression of alkaline phosphatase enzyme (alkaline phosphatase staining) and mineralization of MSCs (alizarin red staining on day 10).

Results

Our results showed early expression of osteopontin and osteocalcin in HSCs coculture with MSCs. These findings support the role of HSCs in induction of osteoblastic differentiation of MSCs. Decrease in the expression of CD90, higher activation in cell alkaline phosphatase enzyme, and mineralization confirmed the results.

Conclusions

In the field of human stem cells, our *ex vivo* findings demonstrated that HSCs can enhance differentiation of MSCs toward osteoblast cells thereby participating in formation of their niche.

Key words: Hematopoietic Stem Cells, Mesenchymal Stem Cell, Coculture, Osteogenesis, Osteoblasts

Received: 2 Aug 2011

Accepted: 6 Feb 2012

Correspondence: Amirizadeh N., PhD of Hematology and Blood Bank. Assistant Professor of Blood Transfusion Research Center, High Institute for Research and Education in Transfusion Medicine. P.O.Box: 14665-1157, Tehran, Iran. Tel: (+9821)88601599; Fax : (+9821)88601599
E-mail: n.amirizadeh@ibto.ir