Archive of SID

مقاله تحقیقی

تمایز سلولهای بنیادی سوماتیک نا محدود به دست آمده از خون بند ناف به غضروف

فرشته نژاددهباشی .M.Sc*، ✍مسعود سلیمانی .Ph.D، سعید کاویانی .Ph.D**، امیر آتشی .M.Sc**، سعید حیدری.M.Sc*****

*گروه سلولی و مولکولی دانشگاه خاتم

**گروه هماتولوژی دانشگاه تربیت مدرس

***گروه سلولی و مولکولی دانشگاه امام حسین(ع)

تاریخ وصول: اردیبهشت ماه ۸۷؛ تاریخ پذیرش: مردادماه ۸۷

چکیده

هدف: جداسازی و تخلیص سلولهای بنیادی سوماتیک نامحدود (USSC: unrestricted somatic stem cell) به دست آمده ازخون بندناف نوزاد با ترم کامل و بررسی تمایزاین سلولهای به سلولهای غضروفی در محیط آزمایشگاه

مواد و روشها: در این مطالعه سلولها از خون بند ناف جداسازی و در فلاسک کشت داده شدند. یک هفته بعد از کشت، اولین کلونیها ایجاد شد. برای مشخص کردن نوع این سلولها حدود ۱۰۰۰۰۰ تای آنها مورد بررسی فلوسایتومتری قرار گرفت. برای بررسی تمایز این سلولها به غضروف حدود ۲۰۰۰۰۰ تا از این سلولها در پلیتهای ٦ خانه‌ای که کف آنها از قبل با پلی – ال – لیزین۲ پوشانده شده بود، همراه با محیط کندروژنیک در انکوباتور قرار گرفتند. بعد از ٢٤ ساعت اولین توده سلولی تشکیل شد، این وضعیت تا ۲۱ روز ادامه یافت و محیط سلولهای هر دو روز یک بار با محیط کندروژنیک تعویض شد، بعد از اتمام دوره تمایزی و بعد از سه هفته سلولها توسط روشهای رنگ آمیزی آلشیان بلو ، ایمونوسیتوشیمی و RT- PCR بررسی شدند. به علاوه این سلولها برای ۵۰ بار پاساژ یافتند و کاریوتیپ آنها بررسی شد.

یافته‌ها: در روزهای اولیه کشت سلول، جمعیت سلولهایی که دوکی شکل بودند افزایش و گسترش یافتند و تقریباً طی پاساژ دوم تخلیص شدند. نتایج تمایز توسط بررسیهای RT- PCR بیان مقادیر زیادی کلاژن II ، اگریکان ، BMP-6 و کلاژن را که از ژنهای اختصاصی سلولهای غضروفی هستند را نشان داد. بررسیهای هیستوشیمی نشان داد که ماتریکس خارج سلولی در بین سلولها ایجاد شده است و این نتیجه با بررسی ایمونوسیتوشیمی و بیان کلاژن II ،به تایید رسید. کاریوتایپ این سلولها تعداد پاساژهای زیادی را که برای این سلولها امکان پذیر است را نیز مشخص نمود.

نتیجه‌گیری: سلولهای مزانشیمی تمایز یافته به رده غضروف می‌توانند منبعی برای پیون سلولی در آرتریت روماتیسمی باشد و از سوی دیگر خون بندناف نسبت به مغز استخوان می‌تواند منبع مناسبی برای سلول‌های مزانشیمی باشد.

کلیدواژه‌ها: غضروف زایی، سلولهای بنیادی سوماتیک نامحدود ،TGF-β1، مهندسی بافت غضروف

✍ آدرس مکاتبه: تهران، دانشگاه تربیت مدرس، گروه هماتولوژی، صندوق پستی ۱۱۱-۱٤۱۱۵

E-mail: soleim_m@modares.ac.ir

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

سلولهای بنیادی مزانشیمی از مغز استخوان به دست می‌آیند در حالی که سلولهای بنیادی USSC از خون بند ناف، جفت یا خون نوزاد تازه به دنیا آمده جداسازی می‌شوند. این سلولها دارای انعطاف پذیری بالایی بوده و بسیار چسبنده هستند[٤-١]. این سلولها دارای توانایی تمایز به انواع سلولهای مزانشیمی از قبیل استخوان،غضروف ، چربی و میوسیت‌های اسکلتی در محیط آزمایشگاهی هستند.

تلاشهای زیادی در رابطه با جداسازی سلولهای بنیادی مزانشیمی از خون بند ناف و خون محیطی انجام شده و بعضی از محققین بر این عقیده اند که خون بند ناف نوزاد با ترم کامل فاقد سلولهای بنیادی مزانشیمی است [٨-٥] و عده‌ای دیگر بر این عقیده اند که سلولهای بنیادی مزانشیمی در خون محیطی [١١-٩] و در جدار اندوتلیوم رگی در بندناف[١٣-١٢] موجود هستند. اگر چه سلولهایUSSC دارای فرکانس پایینی در نمونه های خون بند ناف هستند اما قادرند تا 10^{15} سلول گسترش یابند و کاریوتایپ طبیعی خود را حفظ نمایند [١٤]. در این مطالعه علی رغم اطلاعات ضد و نقیضی که راجع به امکان جداسازی سلولهای مزانشیمی از خون بند ناف انسان وجود داشت این سلولها جداسازی و کشت داده شدند و قدرت تمایزی آنها به سلولهای غضروفی نیز بررسی شد. بر خلاف دیگر منابع سلولهای بنیادی، خون بند ناف دارای مزایای بیشتری است که می‌توان به محدود نبودن اهدا کننده، بلوغ کمتر سلول نسبت به سلولهای فرد بالغ و کاهش احتمال پس زدگی پیوند پس از پیوند اشاره کرد. از سوی دیگر می‌توان خون بند ناف افراد را ذخیره نموده و در موارد مورد نیاز از آن برای خود شخص یا فرد دیگری استفاده نمود.در مطالعه حاضر سلولهای بنیادی سوماتیک نا محدود از خون بند ناف طبق پروتکل کگلر (Kogler) و همکاران جداسازی شدند و پتانسیل تمایزی آنها به غضروف مورد بررسی قرارگرفت [١٤]. برای ایجاد توده سلولی به جای سانتریفوژ کردن سلولها از پلی- ال- لیزین استفاده شد تا میزان مرگ و میر سلولها کاهش یافته و طبق یافته های پیشین تاثیر این پلیمر در خوشه شدن سلولها مورد بررسی قرار گیرد [١٥] و همچنین میزان پاساژ این سلولها و نرمال بودن آنها به کمک کاریوتایپ بررسی شد.

مواد و روشها

محیطهای کشت والقا کننده

فایکول(١/٠٧٧ gr/ml) ، DMEM high and low glucose(sigma)،bFGF (sigma)، Trypsin(Gibco)، PBS(sigma)، دگزامتازن(سیگما)، آسکوربیک اسید -٢فسفات(سیگما)، لینولئیک اسید (سیگما)،FBS(Gibco) ITS(Gibco)، کلاژناز(سیگما)، TGF-β (peprotech)، آلشیان بلو(سیگما)، آنتی بادی اولیه ضد کلاژن تیپ II (سیگما)، آنتی بادی ثانویه(سیگما)، پنی سیلین(Gibco)، استرپتومایسین(Gibco).

جداسازی سلولهای بنیادی USSC از خون بند ناف

سلولهای بنیادی USSC از خون بند ناف طبق پروتوکلی که کگلر (Kogler) و همکاران منتشر کرده بودند، جداسازی شد. بدین منظور سلولهای تک هسته ای با استفاده از فایکول جداسازی گردید. بعد از سانتریفوژ سلولهای بدست امده در محیط کشت DMEM غنی شده با دگزامتازون ١٠٠ نانومولار، ٣٠ درصد FBS و آنتی بیوتیکهای پنی سیلین و استرپتومایسین قرار گرفت. تعویض محیط اولیه بعد از ٢٤ ساعت انجام گرفت و پس از آن هر ٤ روز یک بار انجام شد. پس از آنکه سلولها ٨٠ درصد سطح فلاسک را پر کردند، با استفاده ازمحلول ٢٥ درصد Trypsin/EDTA، پاساژ انجام گرفت. پس از خالص شدن جمعیت سلولهای بنیادی، تعداد مشخصی از این سلولها برای بررسی فلوسیتومتری و مطالعات تمایزی استفاده شدند.

فلوسایتومتری

برای فلوسایتومتری تعداد یک میلیون سلول در ١٠٠میکرولیتر

www.SID.ir

Archive of SID

از PBS با آنتی بادیهای ،آنتی CD29و ،CD146 و FLK1(kdr) و(CD34) و (CD105) و (CD166). برای ٤٥ دقیقه در ٤ درجه سانتیگراد مجاور شدند پس از شستشو سلولها در ۱۰۰ میکرولیتر محلول ۱درصد پارافرم آلدهید قرار گرفته و آنالیز فلوسایتومتری روی آنها انجام گرفت.

بررسی تعداد پاساژ سلولهای سوماتیک نامحدود وکاریوتایپ آنها

سلولهای ussc جدا شده از خون بند ناف ۵۰ پاساژ داده شدند و کاریوتایپ آنها بررسی شد که پس از ۵۰ پاساژ کاریوتایپ سلولها کاملا طبیعی بوده و به صورت xx که همان سلولهای جدا شده از خون بند ناف نوزادان با ترم کامل دختر بوده است.

برای انجام کاریوتایپ ابتدا سلولها را برای مدت ۳-٤ساعت با ۰/۱µg/ml کلسمید درون انکوباتور قرار داده و سپس سلولها را تریپسینه کرده و ۰/۰۷۵ مولارمحلول KCL را به سلولها اضافه نموده و به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد و $5CO_2$درصد درون انکوباتور قرار داده شد. در مرحله بعد متانول و اسید استیک را به نسبت۳:۱ برای تثبیت نمونه ها اضافه شد. در نهایت سلولها را از ارتفاعی بر سطح لام گسترانیده و کروموزومها مورد آنالیز کروموزومی قرار داده شد.

بررسی تمایز سلولها در محیط دو بعدی به کمک پلی – ال – لیزین

در یک پلیت شش خانه که کف آن با پلی – ال – لیزین پوشیده شده بود تعداد $10^4\times$ ۵ سلولp3 ریخته شدند و به آنها محیط تمایزی غضروفی شامل ۱۰VM دگزامتازون TGF-β ،۱۰ ng/ml ،10ng/ml bFGF ،100x ITS ،500 mg/mllinuleic acid، 50µg/ml ascorbic acid-2-phosphate افزوده شد ومدت ۲۱روز سلولها در این شرایط نگهداری شد.

RT-PCR برای سلولهای تمایزیافته در محیط دوبعدی

کل محتوای RNA از سلولهای سوماتیک نامحدود تمایز نیافته و سلولهای تمایز یافته که به کمک پلی – ال – لیزین تمایز آنها صورت گرفته بود جمع آوری شد و واکنش RT-PCR برای آنها با استفاده از پرایمرهای اختصاصی انجام گرفت (جدول ۱).

جدول ۱. توالیهای پرایمری مورد استفاده برای تمایز غضروفی

	پرایمرها	توالی	TM	اندازه محصول
۱	B2M	F:TCT GGG TTT CAT CCA TCC R:TAC CTG TGG AGC AAC CTG	56.2	432
۲	agrican	F:GAA TCT AGC AGT GAG ACG TC R: CTG CAG CAG TTG ATT CTG AT	58.6	540
۳	Collegen (I)	F: TCC GAC CTC TCT CCT CTG AA R: GAG TGG GGT TAT GGA GGG AT.	62.5	388
٤	Collagen (II)	F: ACC AAA GGG ACA GAA AG R: CAG CTT CAC CAT CAT CAC C	53	470
٥	BMP-6	F: CTC GGG GTT CAT AAG GTG AA R: ACA GCA TAA CAT GGG GCT TC	62.5	412

www.SID.ir

Archive of SID

بررسیهای ایمونوهیستو شیمی

ابتدا توده سلولی حاصل از تشکیل در پلیت به کمک پلی-ال-لیزین را با پارافرم آلدهید ٤درصد تثبیت و سپس با پارافین بلوک گیری شد و از آن برشهای ۵ میکرومتر تهیه شد. مراحل آبدهی را روی برشها انجام داده و سپس با BSA1%+PBS شستشو داده و پس از آن goat serum ۵درصد به مدت ۲۰ دقیقه روی نمونه ها افزوده شد. پس از این زمان آنتی بادی اولیه ضد کلاژن تیپ Π را همراه با ۱درصد BSA به مدت یک شبانه روز در دمای٤ درجه سانتی گراد قرار داده شد. پس از یک شبانه روز با BSA1%+PBS شستشو و آنتی بادی ثانویه FITC افزوده و بعد از یک تا دو ساعت با BSA1%+PBS شستشو شد و با میکروسکوپ فلورسانس بررسی شد.

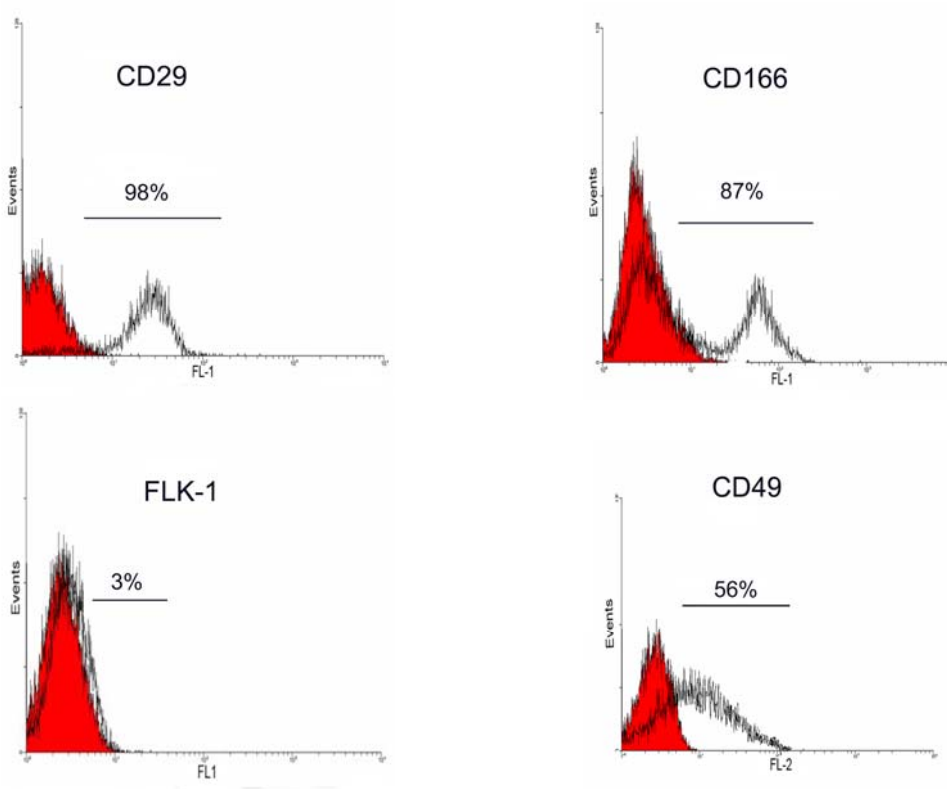
رنگ آمیزی آلشیان بلو

بدین منظور برشهای ۵میکرومتر تهیه شده را آبدهی نموده وسپس درون رنگ آلشیان بلو به مدت ۲۰ دقیقه قرار داده شد. پس از آن مجددا آب گیری نموده و در نهایت نیز هسته ها با هماتوکسیلین وائوزین رنگ آمیزی و زیر میکروسکوپ مشاهده شد.

یافته ها

نتایج حاصل از فلوسایتومتری

نتایج حاصل از فلوسایتومتری نشان‌دهنده بیان نشانگرهای مزانشیمی خون بندناف است (شکل۱).



شکل۱. نتایج حاصل از فلوساتیومتری نشانگرهای سلول بنیادی مزانشیمی خون بندناف.

نتایج نشان داد که مارکرهای CD166، CD49 و CD29 در سلول‌های مورد نظر به میزان بالایی بیان می‌شود.

www.SID.ir

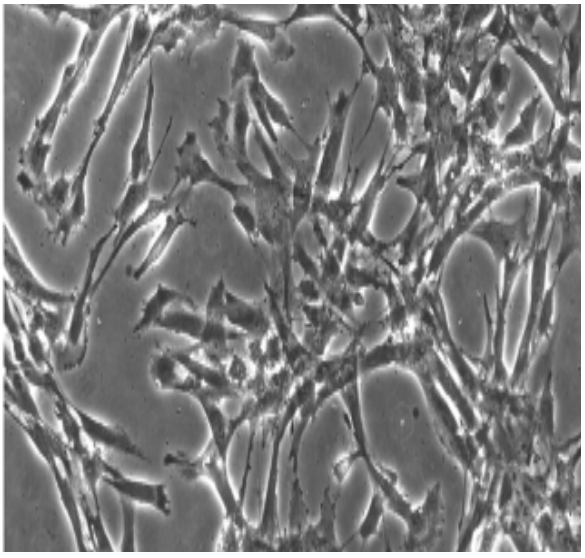
Archive of SID

کاریوتایپ سلول‌های سوماتیک نامحدود خون بندناف

سلول‌های USSC جدا شده از خون بندناف ۵۰ پاساژ داده شدند (شکل۲) و کاریوتایپ آنها بررسی شد که پس از ۵۰ پاساژ کاریوتایپ سلول‌ها کاملاً طبیعی و به‌صورت xx مشاهده شد که همان سلول‌های جدا شده از خون بندناف نوزادان با ترم کامل دختر بود (شکل ۳).

نتایج RT-PCR

نتایج حاصل از RT-PCR نشان داد که ژن‌های Agrican (540)1، Collagen I(388)-2، BMP-6(412)-3، CollagenII (470)-4 و B2M(432)-5 در سلول‌هایی که به مدت ۲۱ روز در محیط تمایز غضروفی قرار گرفته بودند، بیان می‌شوند (شکل ٤).

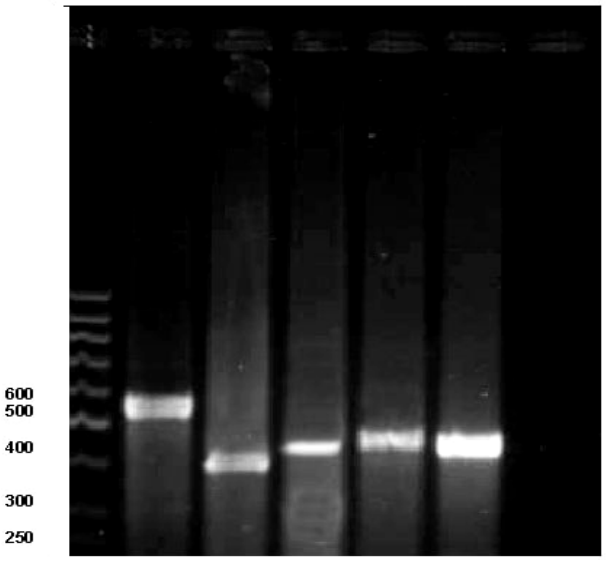


شکل۲. تصویر حاصل از تکثیر سلولهای دوکی شکل USSC در محیط کشت که حدود ۵۰درصد سطح فلاسک را پر کرده‌اند.

شکل ۳. کاریوتایپ کروموزومی سلولهای بنیادی سوماتیک نامحدود بند ناف (USSC) بعد از ۵۰ پاسا ژ که کاملاً طبیعی است و تکثیر نامحدود و بدون خطای این سلولها را نشان می‌دهد.

www.SID.ir

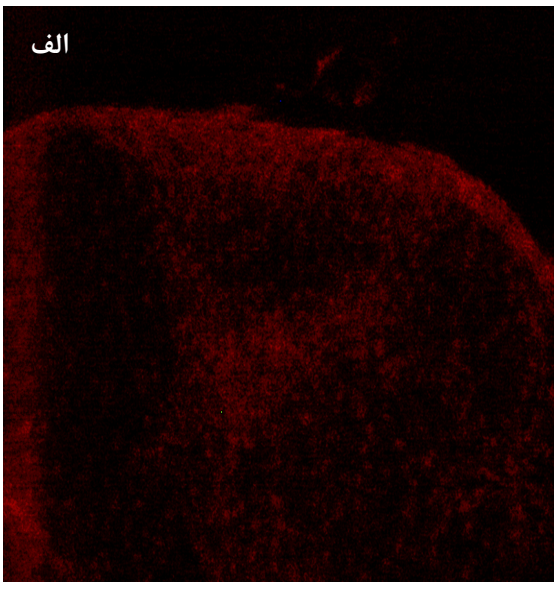
Archive of SID

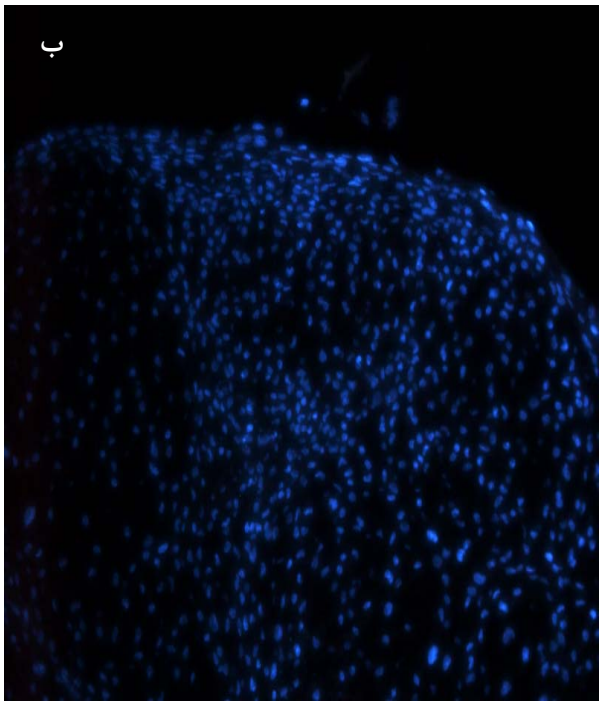


شکل٤. نتیجه حاصل از RT-PCR سلولهای تمایز یافته غضروفی در محیط دو بعدی از سمت چپ به سمت راست. لاینهای موجود به ترتیب مربوط به ژنهای1- Agrican (540)، Collagen I(388)-2، 3- B2M(432)-5 ،CollagenII(470)-4،BMP-6(412) به عنوان کنترل داخلی است

نتایج حاصل از رنگ‌آمیزی آلشیان بلو

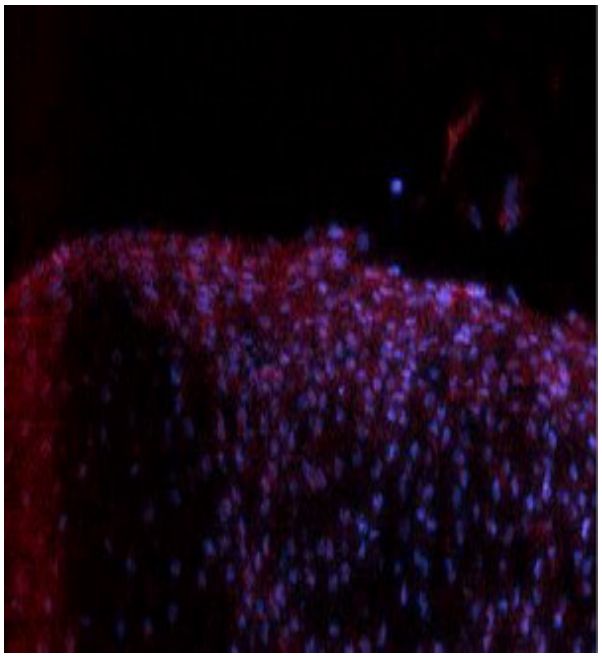
بررسی مقاطع بافتی سلولهای تمایز یافته به غضروف رنگ‌آمیزی اختصاصی، آلشیان بلو و ایمونوستیوشیمی برای کلاژن تیپ دو نشان داد که سلول‌های مورد نظر به راحتی به سلولهای غضروفی تبدیل می‌شوند (شکل‌های ۷-۵).





شکل۵. الف: رنگ آمیزی کلاژن تیپ II برشهای تهیه شده حاصل از بلوک گیری پارافین، با FITC

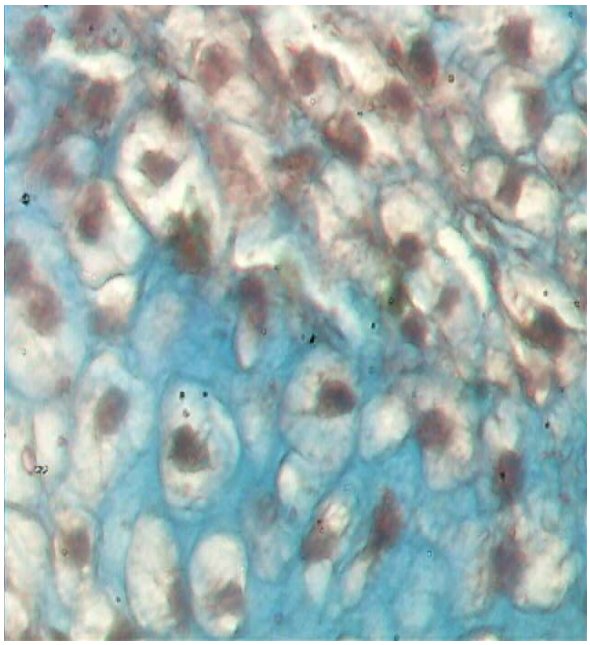
ب: رنگ آمیزی هسته های سلول برشهای تهیه شده حاصل از بلوک گیری پارافین، با رنگ هسته DAPI



شکل٦. رنگ آمیزی همزمان هسته های سلول و کلاژن تیپ II که هسته‌های سلول به رنگ آبی وماده زمینه ای قرمز رنگ حاصل رنگ آمیزی کلاژن II که یک ماده خارج سلولی است.

www.SID.ir

Archive of SID



شکل۷. رنگ آمیزی آلشیان بلو برای برشهای تهیه شده از بلوکهای پارافینی. آلشیان کلاژن II را به عنوان ماده زمینه ای و ماتریکس خارج سلولی آبی نشان می‌دهد و بخشهای قرمز رنگ حاصل از رنگ آمیزی H&E است. تصویر حاصل مانند تصویر شماتیک غضروف است که دارای ماده زمینه‌ای است و حفره های موجود نیز لاکوناها را نشان می‌دهد.

بحث

سلولهای بنیادی USSC دارای قدرت تکثیر فراوان و تمایز به رده های مزانشیمی و غیر مزانشیمی هستند. در این مطالعه سلولهای شبه فیبروبلاستی چسبنده که از خون بند ناف جدا سازی شدند ، از لحاظ مورفولوژیکی و ویژگیهای تکثیری و آنالیز فلوسایتومتری بررسی شدند. همچنین قدرت تمایز این سلولها به سلولهای غضروفی مطالعه شد.

توانایی تبدیل شدن این سلولها به سلولهای غضروفی با بررسیهای RT-PCR ،ایمنوسیتوشیمی و رنگ آمیزی آلشیان بلوتایید شد.

این توانایی تمایز سلولهای جدا شده از خون بند ناف بیانگر آن است که خون بند ناف نوزاد با ترم کامل دارای سلولهای USSC است. جداسازی این سلولها قبلاً توسط کگلر (Kogler) وهمکاران [۱٤] و جاگر (Jager) و همکاران [۱۵] تایید شده است.

در اینجا علی رغم مطالعات قبلی که درون لوله های پلی پروپیلن به روش توده‌ای صورت می‌گرفت، تمایز این سلولها به کمک پلی- ال- لیزین انجام شد. دلیل استفاده از پلی– ال–لیزین با استناد به مطالعه‌ای که وندی(wendy) وهمکاران در سال ۱۹۹۸ [۱٦و۱۷] انجام دادند و نشان دادند که در محیط کشت micromass (توده‌ای) در تراکم بالای سلولهای بنیادی مزانشیمی بال جوجه غضروف زایی توسط پلیمر کاتیونیک پلی – ال – لیزین افزایش می‌یابد. چنانچه این پلیمر خوشه شدن و دسته شدن سلولها را از طریق ارتباطات یونی موجب می‌شود. مواجه شدن با پلی – ال – لیزین منجر به افزایش وابسته به زمان در بیان N–کادهرین هم در سطح RNA وهم در سطح پروتئین می‌شود .نتایج نشان می‌دهد چسبندگی سلولی به واسطه N–کادهرین یک جزء پیش ضروری برای تمایز سلولهای بال جوجه است که منجر به فسفریلاسیون تیروزین catenin به عنوان یک مرحله سیگنالینگ در تمایز غضروفی است.

در مطالعه ای که توسط کگلر (Kogler) و همکارانش صورت گرفت این سلولها بیش از ۲۰ بار پاساژ یافتند و کاریوتایپ آنها در پاساژ ۵ مورد بررسی قرار گرفت ، در صورتی که در این مطالعه سلولها تا حدود ۵۰ بار پاساژ یافتند و کاریوتایپ آنها در پاساژ ۵۰ بررسی شد.

انتخاب یک منبع ایده آل از سلولها برای مهندسی بافت غضروف نیازمند دستیابی به یک سری از اصول دارد که شامل دسترسی آسان و منبع سلولی مناسب، توانایی گسترش یا ترمیم خودبه خودی وسیع منبع سلولی، توانایی تمایز به رده‌های سلولی تحت سیگنالهای ویژه و فقدان توانایی تومورزایی منبع سلولی است. بنابراین کاربرد سلولهای USSC به گونه‌های مختلف تاکنون تومورهای میکروسکوپی یا ماکروسکوپی بعد از ماهها یا حتی سالها بعد از پیوند در

www.SID.ir

Archive of SID

گوسفند ایجاد ننموده است [۱٤]. بـه عـلاوه سـلولهای USSC مولکولهای کواسـتیمیولتری و HLAII را بیـان نمـی کننـد کـه می‌توانند منبع مناسبی برای پیوند باشند.

از این رو روشهای جداسازی سلولها از خون بنـد نـاف بایـد توسعه یابد وممکن است این سلولها به عنوان ابـزار قـوی در درمان بیماریها و آسیب های بافتی استفاده شـوند. نـسبت بـه جداسازی سلول از مغز استخوان که روشی تهاجمی و پرخطر است؛ جداسازی آنها از خون بند ناف راحت تر و با خطـرات کمتری مواجـه اسـت. بنـابراین لازم اسـت در آینـده قـدرت انعطاف پذیری و تمایز این سلولها به رده های دیگر سلولی و قدرت پیوند و بقای آنها در محیط بدن مورد بررسی قرارگیرد.

تقدیر و تشکر

بدینوسـیله از همکـاری مـسولین بخـش زایمـان بیمارسـتان طالقانی هچنین سرکار خانم نیکوگفتار در سازمان انتقال خون ایران قدردانی و تشکر می‌نماییم.

References

1. **Barry FP, Boynton RE, Haynesworth S, Murphy JM, Zaia J.** The monoclonal antibody SH-2 raised against Human Mesenchymal Stem Cells,Recognize an Epitope Endoglin (CD105).Biochem. Biophys. Res Comm 1999; 265: 134-9.
2. **Erices A, Conget P, Minguell JJ.** Mesenchymal progenitor cells in human umbilical cord blood. Br Haematol 2000; 109(1): 235-42.
3. **Mackenzie TC, Flake AW.** Human Mesenchymal Stem Cells.Insight from asurrogate in vivo assay system. Cells Tissue Organ .2002; 171: 90-5.
4. **Rossmanith T, Schroder B, Bug G, Muller P, Klenner R, Knaus D, Hoelzer O, Ottman G.** Interlukine 3 improves the ex vivo expansion of primitive human cord blood progenitor cells an maintains the engraftment potential of scid repopulations cells. Stem Cells 2001; 19(4): 313-20.
5. **Wexler SA, Donaldson C, Denning –Kendal P, Rice C, Bradley B, Hows JM,.**Adult bone marrow is a rich source of human mesenchymal "stem" cells but umbilical cord and mobilized adult blood are not. Br J Haematol 2003; 121: 368-74.
6. **Zvaifler NZ, Marinova L, Marinova L, Mutafchiev A, Adams C, Edward CJ, Moss J, et al.** Mesenchymal precursor cells in the blood of normal individuals. Arthritis Res 2000; 2: 477-88.
7. **Mareshci K, Biasin E, Piacibello W, Aglietta M, Madon E ,Fagioli F.** Isolation of human mesenchymal stem cells: bone marrow versus umbilical cord blood. Haematological 2001; 86: 1099-100.
8. **Yu M, Xiao Z, Shen L, Li L.** Mid –trimester fetal blood – drived adherent cells share characteristics similar to mesenchymal stem cells but full – term umbilical cord blood does not . Br J Haematol 2004 ; 124: 666-75.
9. **Erices A, Conget P, Minguell JJ.** Mesenchymal progenitor cells in human umbilical cord blood. Int J Biochem Cell Biol 2004; 36: 568-84.
10. **Godwin HS, Bicknese AR ,Chien SN, Bogucki BD, Oliver DA, Quinn CO, Wall DA.** Multilineage differentiation activity by cells isolated from umbilical cord blood :expression of bone, fat, and neural markers, Biol Blood Marrow Transplant 2001; 7: 581-8
11. **Lee OK, Kuo TK, WM Lee KD, Hsieh SL, Chen TH.** Isolation of multipotent mesenchymal stem cells from umbilical cord blood. Blood 2004; 103: 1669-765.
12. **RomanowYA, Svintsitskaya VA, Smirnow VN.** Searching for alternative sources of postnatal human mesenchymal stem cells:candidated MSC-like cells from umbilical cord blood. Stem Cells 2003; 105-10.

www.SID.ir

Archive of SID

13. **Covas DT, Siufi JLC, Orellana MD.**Isolation and culture of umbilical vein mesenchymal stem cells , Braz J Med Biol Res 2003; 36: 1179-83.
14. **Kogler G, Sensken S, Muschen M, Feldhahn N, Leidth S, Ficher J.** A new human somatic stem cell from placental cord blood with intrinsic pluripotent differentiation potential. JEM 2004; 200(2): 123-35.
15. **Jager M, Wild A, Lensing-Hohn R, Krauspe R.** Influence of different culthre solutions on osteoblastic differentiation in cord blood and bone marrow derived progenitor cells. Biomed Technik 2003; 48: 241-4.
16. **Delis AM, Tuan RS.** Alterations in the spatiotemporal expression pattern and function of N-cadherin inhibit cellular condensation and chondrogenesis of limb mesenchymal cells in vitro. J Cell Biochem 2002; 87(3): 342-59.
17. **Wendy A. Woodward, Rocky S.** N-Cadherin expression and signaling in limb mesenchymal chondrogenesis: Stimulation by Poly-l-Lysine. Br J Clin 1998; 24: 175-83.

www.SID.ir