مطالعه چند مارکر (آنتي ژن) سطح سلولي در پاساژهاي متوالي سلول‌هاي بنيادي مزانشيمي کشت شده از دو نژاد موشي Balb/c و NMRI

محمدرضا باغبان اسلامي نژاد .Ph.D [1]، صمد ندري .M.Sc [2]، رضا حاجي‌حسيني Ph.D [2]

1. پژوهشکده رويان، گروه سلول‌هاي بنيادي
2. دانشگاه پيام نور، واحد تهران، گروه بيوشيمي
:آدرس مکاتبه: تهران، صندوق‌پستي: 4644-19395، پژوهشکده رويان، گروه سلول‌هاي بنيادي
پست الکترونيک: Email: bagesla@yahoo.com

دريافت مقاله: 85/3/23، پذيرش مقاله: 85/5/15

هدف: کشت سلول‌هاي مزانشيمي از دو نژاد موشي NMRI و Balb/c و بررسي بيان ده مارکر (آنتي ژن) سطح سلولي در آنها طي کشت اوليه تا پاساژ سوم

مواد و روش‌ها: 10 سر موش NMRI و BALB/c با سن تقريبي 6-8 هفته قرباني شد. مغز استخوان از استخوان‌هاي فمور و تيبيا خارج، و در فلاسک‌هاي 75 سانتي‌متري کشت داده شد. دو هفته پس از آغاز کشت, اولين پاساژ صورت گرفت. نيمي از سلول‌ها به فلاسک جديد منتقل و نيمي ديگر به منظور بررسي ده مارکر سطح سلولي، براي فلوسايتومتري آماده شدند. براي اين منظور از آنتي‌بادي‌هاي شاخص سلول‌هاي رده خون‌ساز و اندوتليال شامل CD44، c-Kit CD135، Sca-1، Vcam1، CD34، CD45، CD11b، Rthy1.2، CD31 استفاده شد.کشت سلول تا پاساژ سوم ادامه يافت و در هر پاساژ، سلول‌ها با استفاده از فلوسايتومتري بررسي شدند. سلول‌هاي پاساژ سوم از لحاظ تمايز به استخوان و چربي نيز ارزيابي شدند. در اين مطالعه هر آزمايش سه بار تکرار شد.

يافته‌ها: در کشت اوليه، جمعيت سلولي هتروژن بود و سلول‌ها پهن، دوکي و چند وجهي بودند. در پاساژهاي بالاتر تعداد سلول‌هاي دوکي شکل افزايش يافت، به طوري که در پاساژ سوم بيشتر سلول‌ها دوکي شکل بود. سلول‌هاي پاساژ سوم از نژاد Balb/c اندکي کشيده‌تر از سلول‌هاي مشابه موش NMRI بود. نتايج فلوسايتومتري نشان داد مارکر CD44 در تمام پاساژها در حد بسيار بالايي (90درصد سلول‌ها) بيان مي‌شود اما Thy 1/2 در کشت اوليه بياني نداشت و به تدريج بيان آن افزايش يافت و در پاساژ سوم در حدود نيم تا يک پنجم سلول‌ها اين مارکر را بيان کردند.CD31 اصلا بيان نشد و بيان مارکرهاي CD135 و CD45 و CD11b در طي پاساژها به تدريج کاهش و بيان CD34، Sca-1 و c-Kit اندکي افزايش يافت. دو نژاد موش از لحاظ بيان برخي از مارکرها اختلاف داشتند. به طوري که VCAM در موش Balb/c بيان نشد و از نظر الگوي بيان برخي مارکرها از جمله Sca1 و Thy1 در پاساژهاي مختلف نيز تفاوت‌هايي بين آنها بر قرار بود. سلول‌هاي پاساژ سوم از هر دو نژاد موشي به راحتي به استخوان و چربي تمايز يافتند که نشان‌گر ماهيت مزانشيمي آنها بود.

نتيجه‌گيري: در مجموع، اين مطالعه نشان داد علي‌رغم اينکه کشت سلول‌هاي مزانشيمي به تدريج از کشت اوليه تا پاساژ سوم، از لحاظ مورفولوژي، به سمت هموژن شدن پيش مي‌رود، اما از لحاظ بيان مارکرهاي سطحي سلول، اين اتفاق نمي‌افتد و دو نژاد موشي تا حدودي از لحاظ مورفولوژي و برخي مارکرهاي سطحي تفاوت دارند.

کليدواژگان: سلول بنيادي مزانشيمي، موش NMRI و Balb/c، فلوسايتومتري، مارکرهاي سطحي

مقدمه

تحقيقات نشان داده است که استروماي مغز استخوان نه تنها نقش يک داربست را براي سلول‌هاي بنيادي خون‌ساز ايفا مي‌کند، بلکه بر تکثير و تمايز سلول‌هاي خوني نيز تاثير دارد. همچنين بر اساس مطالعات انجام گرفته، استروما حاوي سلول‌هاي غيرخون‌ساز با خاصيت خود تجديدي (Self Renewal) است و توان تمايز به استخوان، غضروف، ماهيچه، تاندون و چربي را نيز داراست (1، 2).

اولين جداسازي موفقيت‌آميز اين سلول‌ها از مغز استخوان در حدود 40 سال پيش توسط فريدنستن و همکاران (3) صورت گرفت. آنها مشاهده کردند که سلول‌هاي چسبنده موجود در مغز استخوان که مورفولوژي شبيه فيبروبلاست دارند به صورت کلوني رشد کرده و توانايي تمايز به استخوان دارند (4) و به همين دليل، نام واحد تشکيل دهنده کلوني فيبروبلاست (colony Forming Fibroblast-unit) براي اين سلول‌ها

برگزيده شد.

سلول‌هاي فيبروبلاستي مغز استخوان طي سال‌ها به تدريج با اسامي ديگري از قبيل سلول‌هاي داربستي مغز استخوان (Marrow stromal cell)، سلول‌هاي مزانشيمي (Marrow progenitor cell) و سلول‌هاي فيبروبلاستي مغز استخوان (Marrow stromal fibroblast) نيز خوانده شده‌اند (5).

توانايي سلول‌هاي بنيادي مزانشيمي در تمايز به انواع مختلف سلول‌هاي بافت پيوندي، آنها را به يک منبع مناسب در استراتژي‌هاي ترميم بافتي از قبيل ترميم موضعي بافت استخوان (6، 7)، غضروف (8) و تاندون (9) تبديل كرده است. همچنين تحقيقات پيشين، انعطاف و شكل‌پذيري (plasticity) اين سلول‌ها را در تمايز به سلول‌هاي عصبي، پوششي پوست، ريه، كبد، روده، كليه و طحال به اثبات رسانده است (10، 11).

جداسازي سلول‌هاي بنيادي مزانشيمي از مغزاستخوان انسان و برخي گونه‌هاي جانوري با موفقيت انجام گرفته است (20-12). ولي در مورد موش، به عنوان مدل ارزشمند فيزيولوژيک و پاتولوژيک پستانداران، مطالعه سلول‌هاي مزانشيمي با مشكلاتي از قبيل آلودگي به سلول‌هاي غيرمزانشيمي (خون‌ساز، اندوتليال) و توقف تكثير سلولي همراه بوده است (21، 22).

يكي از جنبه‌هايي كه در ارتباط با سلول مزانشيمي موش تا حد زيادي ناشناخته باقي مانده، شناسايي ماركر (آنتي‌ژن)هاي سطح سلولي است. در مطالعات پيشين، محققان سلول‌هاي مزانشيمي را از مغز استخوان موش جدا و پس ازخالص‌سازي آنها با روش‌هاي مختلف، بيان برخي ماركرهاي سطحي را بررسي كرده‌اند (5، 21-24). اطلاعات موجود حاكي از نبود اتفاق نظر مبني برمعرفي ماركرهاي سطح سلولي است. اين در حالي است كه ماركرهاي سطح سلولي از لحاظ شناسايي و جدا سازي سلول‌ها اهميت فراواني دارند.

در تحقيق حاضر، به منظور مطالعه بيشتر ماركرهاي سطحي، سلول‌هاي مغز استخوان از دو نژاد موشي كشت داده شده است و در زمان‌هاي مختلف، از كشت اوليه تا زمان تخليص آنها در پاساژ سوم، بيان برخي ماركرهاي سطح سلولي با روش فلوسايتومتري مورد مطالعه قرار گرفته است. براي اين منظور از يک موش Outbred (NMRI) و يک موش Inbred (Balb/c) استفاده شده است.

مواد و روش‌ها

كشت سلول

موش‌هاي نژاد NMRI و Balb/c با سن تقريبي 8-6 هفته (هر كدام 10 سر) با روش جابه‌جايي مهره‌هاي گردني (طبق مصوب كميتة اخلاق پزشكي پژوهشكده رويان) كشته شدند. استخوان‌هاي فمور و تيبيا جدا و بافت نرم اطراف آنها پاك شد و داخل محيط DMEM (Dolbeco's modified eagles medium, Gibco; Germany) محتوي 15درصد (Fetal bovine serum; Gibco; Germany), FBS و 100 واحد بين‌المللي پني‌سيلين (Gibco, Germany) و 100 واحد بين‌المللي استرپتومايسين (Gibco, Germany) قرار داده شد.

لوله محتوي استخوان‌هاي فمور و تيبيا داخل هود استريل و بر روي يخ قرار گرفت. سپس دو انتهاي استخوان‌ها قطع و با استفاده از سرنگ و سر سوزن شماره22 مغز استخوان از كانال استخواني خارج شد و پس از يک بار سانتريفيوژ (240 گرم به مدت 5 دقيقه)، سلول‌هاي حاصل از هر استخوان دراز در داخل يک فلاسك 75 سانتي‌متري كشت داده شد. اين سلول‌ها، سلول‌هاي كشت اوليه ناميده شدند.

محيط مورد استفاده DMEM حاوي 15درصد FCS و آنتي‌بيوتيك‌هاي پني‌سيلين و استرپتومايسين (,Gibco Germany) بود. 72 ساعت پس از آغاز كشت، محيط سلول‌ها تعويض شد و دو هفته پس از آغاز كشت، پاساژ اول انجام گرفت. بدين‌ترتيب كه با استفاده از Trypsin- (Gibco, Germany) EDTA و scraper سلول‌ها از كف ظرف كنده شده و پس از سانتريفيوژ با لام نئوبار شمارش شد. درصد سلول‌هاي كنده شده از كف ظرف به وسيله رنگ‌آميزي تريپان بلو تعيين شد. سلول‌ها به دو بخش تقسيم شدند. يک بخش براي آناليز (Fluorescence activated cell sorting: FACS) و بخش ديگر به منظور كشت به ظرف كشت جديد منتقل شدند. سلول‌هاي هر رده موشي (NMRI و Balb/c) تا پاساژ سه كشت شدند و در هر پاساژ و در مرحله confluency از لحاظ بيان بر خي ماركر سطحي مورد بررسي قرار گرفتند. همچنين سلول‌هاي پاساژ سوم از لحاظ پتانسيل تمايز به استخوان و چربي به عنوان شاخص سلول مزانشيمي بررسي شدند.

آماده‌سازي سلول‌ها براي فلوسايتومتري

براي انجام آناليز FACS، تعداد 200000 سلول در لوله‌هاي فالكون ريخته و به هر كدام 100ميكرون سرم رت 3 درصد اضافه و به مدت 30 دقيقه روي يخ در يخچال نگهداري شد. سلول‌ها با 500 ميكرون بافر شستشو با تركيب يک ميلي‌ليتر (Fetal Bovine Serum: FBS) درصد ميلي‌ليتر (Phosphate Buffer Solution: PBS) شسته شدند و پس از سانتريفيوژ (400 دور به مدت 10 دقيقه) به مدت 30 دقيقه روي يخ و در يخچال با آنتي‌بادي‌هاي اوليه, CD44، CD135 كونژوگه و مجددا با PE فيكو اريترين (eBioscience) وآنتي‌بادي‌هاي اوليه, c-Kit، Sca-1، Vcam1، CD34، CD45، CD11b، Thy 1.2، CD31 كونژوگه و با FITC (فلورسنس ايزوتيوسيانات

(eBioscience) انكوبه شدند و براي كنترل منفي سلول‌ها با آنتي‌بادي‌هاي IgG2b، PE-IgG2a، FITC-IgG2a، FITC-IgG2b انكوبه شدند.

در مرحله بعد سلول‌ها پس از شستشو به مدت 10 دقيقه با 400دور سانتريفيوژ شدند. سپس به سلول‌ها بافر فيكس كننده (پارافرم آلدهيد 1درصد و FBS 1درصد در PBS) اضافه شد و با دستگاه FACS (calibur cytometer Becton (Dickenson و نرم‌افزار WinMDi آناليز شدند. در اين مطالعه هر آزمايش سه بار تكرار و ميانه سلولي بيان كننده هر آنتي‌ژن تعيين كه به صورت نمودار براي هر نژاد موشي نشان داده شده است (شكل‌هاي 2 و 3).

تمايز به استخوان و چربي

براي اطمينان از ماهيت مزانشيمي سلول‌هاي مورد بررسي در اين مطالعه از تست تمايز به استخوان و چربي استفاده شد. براي اين منظور حدود 100000 سلول پاساژ 3، در ظروف 6 خانه‌اي و فلاسک 25 سانتي‌متر مربع حاوي در محيط DMEM حاوي 15درصد سرم گاوي و آنتي‌بيوتيك كشت داده شد. پس از مرحله Confluency محيط سلول‌ها با محيط تمايز به استخوان و چربي جايگزين شد. محيط تمايز به استخوان شامل DMEM محتوي 50 ميكروگرم در ميلي‌ليتر اسكوربيک اسيد 3-فسفات, 10 نانومولار دگزامتازون و 10 ميلي‌مولار بتا-گليسرول فسفات (Sigma, USA) و محيط تمايز به چربي شامل DMEM حاوي 50 ميكروگرم در ميلي‌ليتر اسكوربيک 3-فسفات، 100 نانومولار دگزامتازون و 50 ميكروگرم در ميلي‌ليتر ايندوميتاسين (Sigma, USA) بود.

ارزيابي تمايز

در پايان هفته سوم كشت، تمايز سلول‌ها مورد ارزيابي قرار گرفت. براي استخوان از رنگ‌آميزي آليزارين رد و براي چربي از اويل رد استفاده شد. همچنين توليد mRNA برخي ماركرهاي استخواني و چربي با روش RT-PCR مورد بررسي قرار گرفت.

رنگ‌آميزي آليزارين رد

تک لايه سلولي با PBS شسته و به مدت 10 دقيقه با متانول (Merck; Germany) فيكس شد و سپس رنگ‌آميزي با محلول رنگي (1درصد آليزارين رد در آب آمونياكي25درصد) (Sigma, USA) به مدت 2 دقيقه انجام شد. در ادامه سلول‌ها با آب مقطر شسته و پس از خشک شدن با ميكروسكوپ مشاهده شد.

رنگ‌آميزي اويل رد

سلول‌ها به مدت يک ساعت در دماي اتاق با فرمالين 4درصد فيكس شدند و سپس با الكل 70درصد شسته و به مدت 15-10 دقيقه با محلول 0/5 درصد Oil red در 99درصد الكل ايزوپروپانل (Sigma, USA)، رنگ‌آميزي شد و در انتها محلول رنگي خارج و سه بار با الكل 70درصد شستشو داده و با ميكروسكوپ مشاهده شد.

آناليز RT-PCR

سلول‌ها در روز صفر و 21 تمايز از لحاظ بيان ژن‌هاي استخواني نظير استئوكالسين (OC)، استئوپونتين (OP) و رسپتور هورمون پاراتيروئيد (PTH) و ژن‌هاي چربي از قبيل آديپسين و ليپوپروتيين ليپاز (LP) مورد ارزيابي قرار گرفتند (جدول 1).

براي اين منظور، RNA سلول‌هاي مورد نظر با استفاده از RNX-Plus solution (Cinagen,Tehran) و مطابق با پروتكل اين شركت جدا سازي شد. در ادامه با استفاده از محلول DNase I (EN0521; Fermentas) به همراه DNA 10x DNA, Reaction buffer, $MgCl_2$ احتمالي همراه با RNA استخراج شده حذف گرديد و سپس فعاليت DNase I با افزودن 25ميلي‌متر EDTA متوقف شد. ساخت cDNA در واكنش رونويسي معكوس (RT) با استفاده از كيت Revert Aid H minus first strand cDNA syntesis kit (Fermentas) 2mg RNA استخراج شده در مرحله پيشين و پرايمر 0/05ميكرو گرم oligo(dt)18 انجام شد. در ادامه واكنش PCR با 2.5ul cDNA $dNTP_s$ ،1x PCR buffer (AMS™, cinagen) 200ميكرومتر، 1u Tag DNA ؛Polymerase (EP0403; (fermentas، MgCl2 1ميكرون 0/75 و 0/5 ميكرومتر از پرايمرهاي ژن‌هاي اختصاصي بافت استخوان, چربي و بتا-توبولين (در جدول يک نشان داده شده است) در دماي 93درجه سانتي‌گراد به مدت 5 دقيقه, دماي 93درجه سانتي‌گراد به مدت 45 ثانيه, دماي Annealing به مدت 45 ثانيه, دماي 72درجه سانتي‌گراد به مدت45 ثانيه و در 30 سيكل انجام شد. در پايان محصول PCR درون چاهک‌هاي ژل 1/5درصد آگارز ريخته شد و پس از الكتروفورز با رنگ اتيديوم بروماید رنگ‌آميزي و سپس ارزيابي شد.

يافته‌ها

مورفولوژي سلول‌هاي چسبنده

در كشت اوليه سلول‌هاي چسبنده مغزاستخوان از موش‌هاي NMRI و BALB/c، جمعيت سلولي هتروژن بود. در اين زمان، سلول‌هايي با مورفولوژي متفاوت از قبيل پهن، دوكي و چندوجهي مشاهده شد. در پاساژ‌هاي بالاتر تعداد سلول‌هاي دوكي

شکل بیشتر شد. به طوري که در پاساژ سوم اکثریت سلول‌ها دوکي شکل بود. سلول‌هاي پاساژ سوم تهیه شده از موش Balb/c اندکي کشیده‌تر از سلول‌هاي مشابه از موش NMRI بود (شکل 1).

بیان مارکر در پاساژهاي مختلف سلول‌هاي چسبنده

نتایج مربوط به بیان ده آنتي‌ژن سطحي در سلول‌هاي چسبنده از موش‌هاي NMRI و BALB/c به صورت تفکیکي در نمودارهاي شکل‌هاي 2 و 3 نشان داده شده است.

Balb/c

در موش Balb/c مارکر CD44 در تمام پاساژها در حد بسیار بالایي (90درصد سلول‌ها) بیان شد. Thy 1/2 در کشت اولیه بیاني نشد و به تدریج بیان آن افزایش یافت و در پاساژ سوم حدود نیمي از سلول‌ها این مارکر را بیان کردند. مارکر CD45 در تمام مراحل کشت سلول بیان شد. به طوري که در کشت اولیه نیمي از سلول‌ها CD45 مثبت بودند و در مراحل بعدي بیان آن به صورت زیگزاگي اندکي کاهش یافت (در پاساژ سوم حدود یک سوم سلول‌ها آن را بیان کردند). مارکر CD11b در تمام مراحل کشت سلولي در حدود یک سوم سلول‌ها بیان شد. به طوري که در کشت اولیه بیان بالا و در مراحل بعد کشت، روند کاهشي در بیان این مارکر مشاهده شد. مارکر Sca-1 در تمام مراحل کشت بیان کمي داشت (حدود 10درصد سلول‌ها). مارکرهاي Vcam-1، CD31 در هیچ یک از مراحل کشت بیان نشد. بیان مارکر CD135 در تعداد کمي سلول و فقط در کشت اولیه مشاهده شد. مارکرهاي c-Kit، CD34 در کشت اولیه بیان نشدند اما در مراحل بعد در تعداد کمي از سلول‌ها بیان شدند.

نداشت و به تدريج بيان آن افزايش يافت و در پاساژ سوم حدود يک پنجم سلول‌ها اين مارکر را بيان کردند. مارکر CD45 در کشت اوليه در بيش از نيمي از سلول‌ها بيان شد و در طي پاساژها بيان آن به صورت زيگزاگي کاهش يافت. به طوري که در پاساژ سوم کمتر از نيمي از سلول‌ها CD45 مثبت بودند. CD11b نيز در تمام مراحل کشت در کمتر از نيمي از سلول‌ها بيان شد و در پاساژ سوم در مقايسه با کشت اوليه به ميزان کمي از بيان آن کاسته شد. مارکر Sca-1 در کشت اوليه در حدود 15درصد سلول‌ها بيان شد و در پاساژ دوم حدود 50 درصد سلول‌ها Sca1 مثبت بودند ود ر پاساژ سوم در حدود 20درصد سلول‌ها بيان شد. مارکر CD31 در هيچ يک از مراحل کشت سلول بيان نشد. مارکر Vcam-1 از پاساژ دوم در تعداد کمي سلول شروع به بيان شدن کرد و ميزان بيان آن به ميزان کمي سير صعودي داشت. مارکر CD135 فقط در کشت اوليه در

، CD34 در

کمتر از 5

درصد سلول‌ها بيان شدند.

شکل 1: مورفولوژي سلول‌هاي چسبنده مغز استخوان از موش‌هاي Balb/c و NMRI: از کشت اوليه تا پاساژ سوم جمعيت سلول‌هاي دوکي شکل بر کشت غالب مي‌شود (ميکروسکوپ فاز کنتراست معکوس، بزرگنمايي100).

شکل 2: منحني تغييرات در بيان برخي مارکرهاي سطحي در کشت سلولهاي چسبنده مغز استخوان موش Balb/c در طي کشت اوليه تا پاساژسوم.

شکل 3: منحني تغييرات در بيان برخي مارکرهاي سطحي در کشت سلولهاي چسبنده مغز استخوان موش NMRI در طي کشت اوليه پاساژ صفر تا پاساژسوم.

NMRI

مارکرCD44 در موشNMRI در تمام پاساژها در بيش از 90درصد سلول‌ها بيان شد. Thy 1/2 در کشت اوليه بياني

تمايز به استخوان و چربي

سلول‌هاي پاساژ سوم از هر دو نژاد موشي كه به مدت 3 هفته در محيط استخوان‌ساز قرار گرفته بودند با رنگ‌آميزي اختصاصي آليزارين‌رد به رنگ قرمز در آمدند كه حاكي از معدني شدن ماتريكس بود. همچنين بررسي‌هاي RT-PCR نشان داد كه ژن‌هاي ماركر استخوان (استئوكالسين، استئوپونتين و رسپتور هورمون پاراتيرويد) در سلول‌هاي تمايز يافته هر دو نژاد موشي به خوبي بيان شده است. سلول‌هاي تمايز نيافته دو نژاد موشي از اين نظر تفاوت داشتند. به طوري كه در سلول‌هاي تمايز نيافته (روز صفر تمايز) موش NMRI بر خلاف Balb/c ژن‌هاي استيوپونتين و استيوكلسين تا حدي بيان داشتند (شكل‌هاي 4 و 5).

پس از سه هفته تمايز در محيط آديپوژنيک، رنگ‌آميزي اويل رد نشان داد، قطرات چربي در سيتوپلاسم سلول‌ها تجمع يافته و آناليز RT-PCR حاكي از بيان ژن‌هاي شاخص چربي (ژن‌هاي آديپسين و ليپو پروتئين ليپاز) بود. سلول‌هاي روز صفر تمايز در نژاد NMRI بر خلاف سلول‌هاي موش Balb/c به مقدار خيلي كمي ژن ليپوپروتيين ليپاز را بيان كردند (شكل‌هاي 4 و 5).

شكل 4: تمايز سلول هاي پاساژ سوم از موش Balb/c . رديف بالا تمايز به استخوان. سلول ها با رنگ آميزي آليزارين رد قرمز شده اند. آناليز RT-PCR نشان دهنده بيان ماركر هاي استخوان در اين سلول هاست. رديف پايين. در نتيجه رنگ آميزي اويل رد ، قطرات چربي در سيتو پلاسم سلول ها قرمز شده و آناليز RT-PCR حاكي از بيان ژن هاي سلول هاي چربي است.

بحث

در مطالعه حاضر ده ماركر سطح سلولي در كشت سلول‌هاي مغز استخوان دو نژاد موشي، ازآغاز تا زمان ظهور سلول‌هاي تقريبا يک دست فيبروبلاستي در پاساژ سوم، مورد بررسي قرار گرفت و تغييرات در بيان آنها در پاساژهاي مختلف ثبت شد. با توجه به اينكه كشت سلول‌هاي مورد بررسي در پا ساژ سوم تقريبا به طور كامل مورفولوژي فيبروبلاستي داشت و به راحتي به استخوان و چربي تمايز يافت (اين قضيه با رنگ‌آميزي اختصاصي و بررسي RT-PCR به اثبات رسيد)، مي‌توان نتيجه گرفت سلول‌هاي مورد مطالعه مزانشيمي هستند.

جداسازي و تخليص سلول‌هاي مزانشيمي موش اهميت فراواني دارد. زيرا موش همواره مدل ارزشمند فيزيولوژيک و پاتولوژيک براي بيماري‌هاي انسان بوده ولي متاسفانه جداسازي سلول‌هاي مزانشيم آن با مشكلاتي از قبيل آلوده شدن به سلول‌هاي خوني, اندوتليال و ماكروفاژ همراه است. يكي از راه‌هاي جداسازي سلولي استفاده از ماركرهاي سطحي آن است. اين موضوع در موش به طور دقيق شناسايي نشده است. مطالعه حاضر مي‌تواند به شناسايي ماركرهاي سطحي موش كمک كند.

ماركرهاي مورد مطالعه در تحقيق حاضر c-Kit، VCAM-1، Sca-1 ، CD34، CD44، CD11b، CD45، CD31، CD135 و Thy1.2 بود. به طور كلي اين ماركرها، شاخص سلول‌هاي رده خون‌ساز و اندوتليال محسوب مي‌شوند و به دو دليل در تحقيق حاضر انتخاب شدند: اولا، اعتقاد بر اين است كه سلول پيش‌ساز مزانشيمي، اندوتليال و خون‌ساز يكي است (25، 26). ثانيا، مطالعات پيشين نشان داده است در كشت سلول‌هاي مزانشيمي موش سلول‌هاي غيرمزانشيمي ظاهر و بر كشت غالب مي‌شود (21، 222، 27-5). با انجام اين مطالعه، بيان ماركرهاي فوق در كشت اوليه، پاساژ اول، پاساژ دوم و پاساژ سوم بررسي شد.

در تحقيقات پيشين، سلول‌هاي مزانشيمي از موش‌هاي Inbred تا حدودي مورد توجه بوده است (22، 23، 24). اما در مورد موش Outbred گزارشي وجود ندارد. اين در حالي است كه موش‌هاي outbred ارزان‌تر بوده و طول عمر زيادي دارند. همچنين، اين موش‌ها نسبت به بيماري‌ها مقاوم‌اند و سرعت رشد بالايي دارند و مهمتر اينكه موش‌هاي outbred از لحاظ اندازه، بزرگتر از inbred هستند. اين ويژگي‌ها سبب مي‌شود كه آنها براي تحقيقات مربوط به stem cell therapy مناسب‌تر از موش‌هاي inbred باشند. مطالعه حاضر به سلول مزانشيمي موش NMRI كه نوعي موش outbred محسوب مي‌شود نيز پرداخته است.

يافته‌هاي ما حاكي از وجود برخي تفاوت‌ها ميان سلول‌هاي مزانشيمي دو نژاد موشي مورد مطالعه بود. از لحاظ مورفولوژي، سلول‌هاي مزانشيمي موش Balb/c اندكي كشيده‌تر از سلول‌هاي موش NMRI بودند. سلول‌هاي تمايز نيافته (روز صفر تمايز) موش NMRI بر خلاف موش Balb/c برخي ژن‌هاي شاخص استخوان (استئوكالسين، استئوپونتين) و چربي (ليپو پروتيين ليپاز) را بيان كردند. از لحاظ بيان برخي ماركرها نيز بين دو نژاد موشي اختلاف وجود داشت. به طوري كه VCAM در موش Balb/c بيان نشد. الگوي بيان ماركرهاي sca-1 و Thy1 در پاساژهاي مختلف دو نژاد موشي نيز تا حدي متفاوت بود. اين تفاوت‌ها را مي‌توان انعكاسي از تفاوت‌هاي ژنتيكي دو نژاد موشي فرض كرد.

تحقيقات پيشين نشان داده است كه آنتي‌ژن CD11b در مونوسيت‌ها , گرانولوسيت‌ها, ماكروفاژها و سلول‌هاي كشنده طبيعي و ماركر CD45 در همه دودمان‌هاي سلول‌هاي خوني بيان مي‌شود (28، 29). در مطالعه حاضر، در كشت اوليه بيان ماركرهاي فوق بالابود و در پاساژهاي بعدي به ميزان كمي بيان آنها كاهش يافت ولي به صفر نرسيد. وجود زياد سلول‌هاي خوني, ماكروفاژ, مونوسيت در كشت اوليه سلول‌هاي مغز استخوان موش گزارش شده است (21، 22، 27-5). نكته جالب توجه اين بود كه حتي در پاساژ سوم كه سلول‌ها مورفولوژي فيبروبلاستي داشتند نيز ماركرهاي فوق تا حدودي بيان شدند.

آنتي‌ژن CD31 به عنوان ماركر اختصاصي سلول‌هاي اندوتليال مطرح است (30). در اين تحقيق اين ماركر در هيچ يک از پاساژها بيان نشد كه اين يافته بر خلاف يافته‌هاي محققان پيشين است كه حضور سلول‌هاي اندوتليال را در كشت سلول‌هاي مزانشيمي نشان داده‌اند (22، 31، 32).

ماركر Thy1.2 در سلول‌هاي لنفوسيت T بالغ بيان مي‌شود (30). در مطالعه ما اين ماركر از پاساژ اول بيان شد و ميزان بيان آن در پاساژهاي بعدي افزايش يافت و در زمان خلوص سلول‌هاي مزانشيمي در پاساژ سوم در حدود نيمي از سلول‌هاي Balb/c و يک پنجم سلول‌هاي NMRI داراي اين ماركر بودند. چون افزايش تعداد سلول‌هاي Thy1.2 مثبت به موازات افزايش مورفولوژي فيبروبلاستي بوده است ماركر فوق به عنوان يک ماركر مزانشيمي مطرح مي‌شود كه البته اثبات اين فرضيه نياز به مطالعه بيشتر دارد.

ماركر CD44 در سلول‌هاي لوكوسيت, اريتروسيت و غيرخون‌ساز بيان مي‌شود و گليكوپروتييني براي اتصال سلول به اجزاي ماتريكس خارج سلولي است (33). اين ماركر در تمام پاساژها در حد بسيار بالايي بيان شد كه اين يافته با توجه به اينكه مطالعه ما روي سلول‌هاي چسبنده به كف ظرف كشت انجام شده است، دور از تصور نبود.

ماركرهاي CD34، Sca1 و c-Kit به عنوان ماركر سلول‌هاي پروژنيتور خون‌ساز، اندوتليال و مزانشيمي مطرح

هستند (5، 24، 34، 35، 36). در مطالعه حاضر، در کشت اوليه، تعداد کمي از سلول‌ها اين سه مارکر را بيان کردند و با انجام پاساژ تعداد اين سلول‌ها به مقدار اندکي افزايش يافت. حضور نسبتا ثابت اين سلول‌ها در تمام پاساژهاي مورد مطالعه اين فرض را در ذهن تقويت مي‌کند که کشت سلول مزانشيمي همواره حاوي يک ذخيره کوچک از سلول نابالغ با توان تمايز به سه رده مزانشيمي، اندوتليال و خون‌ساز است.

مارکر Vcam-1 در دودمان‌هاي ميلوييدي و سلول‌هاي استروماي مغز استخوان و به مقدار کمي در اندوتليال نيز بيان شده است (36). اين مارکر فقط در پاساژهاي بالاي موش NMRI بيان شد. بيان نشدن اين مارکر در سلول‌هاي موش Balb/c مي‌تواند به دليل تفاوت ژنتيکي دو موش باشد. البته ما توضيحي براي اين پديده نداريم. شايد اين مارکر در سلول‌هاي چسبنده يک نژاد خاص موش و تحت تاثير عوامل القاکننده ناشناخته در کشت که با گذشت زمان اثر خود را اعمال مي‌کند بيان مي‌شود.

مارکر CD135 در سلول‌هاي پروژنيتور لنفوسيت B مغز استخوان بزرگسالان و در زير مجموعه‌اي از سلول‌هاي ميلوييد بيان مي‌شود (37). در اين مطالعه اين مارکر فقط در کشت اوليه مغز استخوان بيان شد. عدم بيان اين مارکر در پاساژهاي بعدي بيان‌گر تمايز سلول‌هاي پروژنيتور B و تبديل آنها به سلول‌هاي B بالغ است. اين فرض با مشاهده سلول‌هاي شناور در پاساژهاي انجام شده تقويت شد. البته دکستر و همکاران نيز به اين مورد اشاره داشت که نياهاي لنفوييدي و ميلوييدي تا 20 روز در کشت باقي مي‌مانند (38). در واقع يافته‌هاي ما موید آن است که با وجود اينکه کشت سلول‌هاي مزانشيمي از کشت اوليه تا پاساژ سوم، از لحاظ مورفولوژي به سمت هموژن شدن پيش مي‌رود، از لحاظ مارکرهاي سطح سلولي اتفاق نمي‌افتد و کشت سلول‌هاي مزانشيمي همواره حاوي سلول‌هايي با مارکرهاي مختلف است. به طوري که در کشت اوليه سلول‌هاي مزانشيمي سلول‌هايي با مارکر خون‌ساز و اندوتليال به مقدار کمي حضور دارند. تعداد برخي از اين سلول‌ها با بالا رفتن پاساژ سلولي اندکي افزايش مي‌يابد و برخي ديگر به صورت زيگزاگي اندکي کاهش مي‌يابد ولي تعداد آنها با وجود اينکه در پاساژ سوم مورفولوژي فيبروبلاستي بر جمعيت سلولي حاکم شده است هيچ گاه به صفر نمي‌رسد. در اين ميان افزايش تدريجي تعداد سلول‌هاي Thy 1.2 مثبت در طول پاساژها و حضور نسبتا بالاي سلول‌هايي با مارکر CD44 در تمامي مراحل کشت جالب توجه است.

تقدير و تشکر

مطالعه حاضر با حمايت‌هاي مالي سازمان گسترش و نوسازي صنايع انجام گرفته است که بدين وسيله از مساعدت‌هاي ايشان تشکر مي‌شود.

References

1. Ostendorp RA, Dormer P: VLA-4-mediated interactions between normal human hematopoietic progenitors and stromal cells.Leuk Lymphoma, 1997; 24:423-435

2. Janowska-Wieczorek A, Majka M, Ratajczak J, Ratajczak MZ: Autocrine/paracrine mechanisms in human hematopoiesis. Stem Cells, 2001; 19:99-107

3. Friedenstein AJ, Deriglasora UF, Kulagina NN, et al: Precursors for fibroblasts in different populations of hematopoietic cells as detected by the in vitro colony assay methods. Exp Hematol, 1974; 2: 83-92

4. Friedenstein AJ, Chailakhyan RK, Latsinik NV. Panansyuk AF, Keiliss - Borok IV: Stromal cells responsible for transferring the microenvironment of the hematopoietic tissues. Cloning in vitro and retransplantation in vivo. Transplantation, 1974; 17: 331-340

5. Sun S, Guo Z, Xiao X, Liu B, Liu X, Tang P-H, MAO N: Isolation of mouse marrow mesenchymal progenitors by a novel and reliable methods. Stem cells, 2003; 21: 527-535

6. Bianco P, Riminucci M, Gronthos S, and Robey PG: Bone marrow stromal stem cells: nature, biology, and potential applications. Stem cells, 2001; 19:180-192

7. Richards M, Huibregtse BA, Caplan AI, Goulet JA, Goldstein SA: Marrow-derived progenitors cell injections enhance new bone formation during distraction. J Orthop.Res, 1999; 17:900-908

8. Rohnstone B, Yoo JU: Autologous mesenchymal progenitor cells in articular cartilage repair. Clin Orthop, 1999; 367: 156-162

9. young RG, Butler DL, Weber W, Caplan AI, Gordon SL, Fink DJ: Use of mesenchymal stem cells in a collagen matrix for Achilles tendon repair.J Orthop Res,1998;16:406-413

10. Sugaya K:Potential use of stem cells in neuroreplacement therapies for neurodegenerative diseases. Int Rev Cytol, 2003; 228: 1-30

11. Chapet A, Bertho JM. Bensidhoum A, et al: Mesenchymal stem cells home to injuredtissues when co-infused with hematopoietics cells to treat a radiation- induced multi- organfailure syndrome. J Gene Med, 2003; 5: 1028-1038

12. Schwarz EJ, Alexander GM, Prockop DJ, Azizi SA: Multipotential marrow stromal cells transduced to produced L-DOPA: engrafment in a rat model of parkinson disease. Hum Gene Ther, 1999; 10: 2539-2549

13. Martin DR, Cox NR, Hathcock TL, et al: Isolation and characterization of multipotential mesenchymal stem cells from feline bone marrow. Exp Hematol, 2002; 3: 879-886

14. Kadiyala S, Young RG, Thiede MA, Bruder SP: Culture expanded canine mesenchymal stem cells possess osteochondrogenic potential in vivo and in vitro. Cell Transplant, 1997;6:125-134

15. Devine SM, Bartholomew AM, Mahmud N, et al: Mesenchymal stem cells are capable ofhoming to the bone marrow of non-human primates following systemic infusion Exp Hematol, 2001; 29: 244-255

16. Wakitani S, Goto T, Pineda SJ, et al: Mesenchymal cell-based repair of large full thicknessdefects of articular cartilage. J Bone Joing Surg, 1994;76: 579-592

17. Ringe J, Kaps C, Schmitt B, Buscher K, et al: Porcine mesenchymal stem cells. Inductionof distinct mesenchymal cell lineages. Cell Tissue Res, 2002; 307: 321-327

18. Mosca JD, Hendricks JK, Buyaner D, et al: Mesenchymal stem cells as vehickes for genedelivery. Clin Orthop, 2000; 379: 71-90.

19. Jessop HL, Noble BS, Cryer A: The differentiation of a potential mesenchymal stem cells population within ovine bone marrow. Biochem Soc Trans, 1994; 22: 248

20. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglase R, Mosca JD, Mosca MA, Moorman DW, Simonetti S, et al: Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. Science ,1999; 284:143-147

21. Meirelles LDS, Nardi NB: Murine marrow derived mesenchymal stem cell: Isolation, invitro expansion, and characterization. Brit J Hemat, 2003; 123: 702-711

22. Phinney DG, Kopen G, Isaacson RL, et al: Plastic adherent stromal cells from the bonemarrow of commonly used strains of inbred mice: variabtions in yield, growth, anddiffentiation. J Cell Biochem, 1999; 72: 570-585

23. 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 Cellul Biochem, 2003; 89: 1235-1249

24. Peister A, Mellad JA, Larsen LL, 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: 1662-1668

25. Seshi B , Kumar S, Sellers D:Human bone marrow stromal cell: coexpression of markers specific for multiple mesenchymal cell lineages. Blood Cells Mol Dis,2000; 26:234-246

26. Kinnaird T, Stabile E, Burnett MS, Lee CW , Barr S, Fuchs S, Epstein SE: Marrow-derived stromal cells express genes encoding a broad spectrum of arteriogenic cytokines and promote in vitro and in vivo arterogenesis through paracrine mechanisms. Circ Res, 2004; 94: 678-685

27. Trople P, Noel D, Platet N, Legrand P, et al: Isolation and characterization of mesenchymal stem cells from adult mouse bone marrow. Exp Cell Res, 2004; 295:395-406

28. Springer T, Galfre G, Secher DS, Milstein C: Monoclonal xenogeneic antibodies to murine cell surface antigens: Identification of novel leukocyte differentiation antigens.
Eur J Immunol, 1978; 8:539-51

29. Ledbetter JA, Herzenberg LA:Xenogeneic monoclonal antibodies to mouse lymphoid differentiation antigens.Immunol Rev, 1979;47:63-90

30. Baldwin HS, Shen HM, Yan HC, DeLisser HM, Chung A, Mickanin C, Trask T, Kirschbaum NE, Newman PJ, Albelda SM, et al: Platelet endothelial cell adhesion molecule-1 (PECAM-1/CD31): alternatively spliced, functionally distinct isoforms expressed during mammalian cardiovascular development. Development, 1994; 120: 2539-53

31. 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 radiosesitivity .J Cell Sci , 1993;61:453-466

32. Wang Q-R, Wolf NS: Dissecting the hematopoietic microenvironment: Clonalisolation and identification of cell types in murine CFU-F colonies by limiting dilution Expt. Hematol, 1990; 18: 355-359

33. Trowbridge IS, Lesley J, Schulte R, Hyman R, Trotter J: Biochemical characterization and cellular distribution of a polymorphic, murine cell-surface glycoprotein expressed on lymphoid tissues. Immunogenetics, 1982 ;15:299-312

34. Ikuta K, Weissman IL: Evidence that hematopoietic stem cells express mouse c-kit but do not depend on steel factor for their generation.Proc Natl Acad Sci, 1992; 89: 1502-6

35. Osawa M, Hanada K, Hamada H, Nakauchi H: Long-term lymphohematopoietic reconstitution by a single CD34-low/negative hematopoietic stem cell.Science, 1996 ; 273:242-5

36. Kinashi T, St Pierre Y, Springer TA: Expression of glycophosphatidylinositol-anchored and -non-anchored isoforms of vascular cell adhesion molecule 1 in murine stromal and endothelial cells.J Leukoc Biol, 1995 ; 57:168-173

37. Ogawa M, Sugawara S, Kunisada T, Sudo T, Hayashi S, Nishikawa S, Kodama H, Nishikawa S: Flt3/Flk-2 and c-Kit are not essential for the proliferation of B lymphoid progenitor cells in the bone marrow of the adult mouse. Exp Hematol, 1998; 26:478-88

38. Dexter TM, Spooncer E, Simmons P, Allen TD:Long-term marrow culture: An overview of techniques and experience. Kroc Found Ser,1984; 18:57-96