● مجلهٔ دانشگاه علوم پزشکی بابل، دوره دهم، شمارهٔ ۲، خرداد – تیر ۱۳۸۷، صفحه ۲۲-۱۲

سلول های بنیادی مزانشیمی با توان تکثیر بالا در محیط رویی کشت اولیه مغز استخوان موش صحرائی

محمدرضا باغبان اسلامی نژاد*[۱]، حمید نظریان[۲]، لیلا تقی یار[۲]

۱- استادیار گروه سلولهای بنیادی مرکز تحقیقات علوم سلولی جهاد دانشگاهی پژوهشکده رویان، تهران ۲- مربی گروه سلولهای بنیادی مرکز تحقیقات علوم سلولی جهاد دانشگاهی پژوهشکده رویان، تهران

سابقه و هدف: در کشت مغز استخوان به منظورجداسازی سلول های بنیادی مزانشیمی، معمولا سلولهای شناور در محیط کشت اولیه با تعویض محیط، دور ریخته می شود. هدف تحقیق حاضر کشت و تکثیراین سلول ها، بررسی ماهیت بنیادی مزانشیمی آنها، مقایسه سرعت رشد آنها با سلول های چسبنده کشت اولیه و بالاخره بهینه سازی شرایط کشت برای رشد بهتر این سلول هاست.

مواد و روشها: در مطالعه تجربی حاضر تعداد ۱۰ سر موش صحرایی نژاد ویستار قربانی شد، مغز استخوان از استخوان درشت نی آنها تهیه و در فلاسک های ۷۵ سانتیمتر مربعی کشت شد. چهار روز پس از آغاز کشت اولیه، محیط رویی جمع آوری و سلول های شناور آن، به موازات سلول های چسبنده تا پاساژ ۳ کشت داده شد. در طول مدت کشت، دو گروه از لحاظ زمان دو برابر شدن جمعیت سلولی مقایسه شدند. در پایان، برای دو گروه، بهترین تراکم سلولی و موثرترین غلظت سرم گاوی که بتواند حداکثر تکثیر را در پی داشته باشد، تعیین شد. سلول های جدا شده از لحاظ پتانسیل تمایز به سه رده استخوان، غضروف و چربی ارزیابی شدند.

یافته ها: بر اساس نتایج حاصل سلول های محیط رویی، بطور متوسط هر ۲±۱۴/۹ ساعت دوبرابر شدند، در حالیکه در کشت سلول های چسبنده، این میزان ۲/۱±۱۹ساعت بود ($p<0/05$). یافته ها نشان داد که شرایط بهینه برای تکثیر سلولهای بنیادی مزانشیمی با محیط کشت حاوی۱۵٪ سرم و تراکم اولیه۱۰۰ سلول در سانتیمتر مربع فراهم می شود. سلولهای جدا شده، براحتی به سه رده اسکلتی متمایز شدند. این قضیه در رنگ آمیزی اختصاصی و RT-PCR برای بیان ژنهای ویژه سه رده کاملا مشهود بود.

نتیجه گیری: محیط رویی کشت اولیه مغز استخوان موش صحرایی حاوی سلول های بنیادی مزانشیمی با توان تکثیر بالاست.

واژه های کلیدی: *سلول بنیادی مزانشیمی، محیط رویی، میزان رشد، تمایز به استخوان، غضروف و چربی.*

دریافت: ۸۶/۱۱/۱، ارسال جهت اصلاح: ۸۷/۲/۱۸، پذیرش: ۸۷/۴/۱۹

مقدمه

سلول بنیادی مزانشیمی، طبق تعریف سلولی است با توانایی تقسیم زیاد که تحت شرایط مناسب قادر است به انواعی از سلول های تخصص عمل یافته نظیر استخوان، غضروف و چربی تمایز یابد (۱). مطالعات اخیر نشان داده است که این سلول ها قادرند انواعی از سلول های غیر مزانشیمی نظیر سلول عصبی، قلبی، کبدی، ریوی، کلیوی و حتی پوستی را نیز بسازند که این پدیده را انعطاف پذیری (Plasticity) سلول های بنیادی مزانشیمی می نامند (۶-۲). وجود سلول‌هایی با توانایی تمایز به استخوان در مغز استخوان، در اواخر قرن نوزدهم توسط Dennis و همکاران گزارش شده بود (۷). این محققین با پیوند زیر پوستی مغز استخوان خرگوش، توانستند آنها را به سلولهای استخوانی تمایز دهند. تحقیق Friedenstein و همکاران شواهد قطعی مبنی بر وجود سلول های بنیادی مزانشیمی در مغز استخوان ارائه داد. این محققین نشان دادند که قابلیت استخوان‌سازی مغز استخوان به‌علت وجود یک زیرگروه

[DOR: 20.1001.1.15614107.1387.10.2.2.2]

خاص از سلول‌های چسبنده آن است که آن را واحد تشکیل دهنده کلونی (CFU-f) نام نهادند (۸). همچنین Friedenstein و همکاران نشان دادند که CFU-f قادر است در محیط کشت، کلونی هایی مشابه با بافت استخوان و غضروف ایجاد نمایند (۹). مشاهدات ابتدایی Friedenstein توسط تحقیقات دانشمندان بعدی توسعه یافت (۱۰و۲). سلولهای بنیادی مزانشیمی به دلیل دارا بودن خاصیت خودتجدیدی و توان تمایز به بافتهای اسکلتی منبع مناسبی برای درمان تعدادی از بیماریها تلقی می شود. کارآیی این سلول ها در درمان بیماری ژنتیکی Osteogenesis Imperfecta، بهبود خونسازی در بیماران سرطانی تحت درمان، بازسازی استخوان، ترمیم بافت نکروز شده در بیماران انفارکتوس قلبی و درمان بیماریهای مفصلی به خوبی نشان داده شده است (۱۷-۱۱).

روشی که Friedenstein در مطالعه سلول های بنیادی مزانشیمی، جهت جداسازی آنها استفاده کرد، بدین صورت بود که نمونه های مغز استخوان در یک ظرف پلاستیکی کشت شد و پس از ۴ ساعت یا بیشتر سلول های غیر چسبنده دور ریخته شد. در اصل این محققین از خاصیت چسبندگی این سلول ها جهت جداسازی آنها استفاده کردند (۹و۸) و این روش تا به امروز به‌عنوان روش رایج برای استخراج سلول‌های بنیادی مزانشیمی به‌کار رفته است. با همین روش سلول‌های بنیادی مزانشیمی از جانوران گوناگونی مانند موش، رت، گربه، سگ، خرگوش، خوک، بابون و انسان استخراج شده اند. هرچند ماکروفاژها، سلول های اندوتلیال، لنفوسیت‌ها و سلول‌های ماهیچه‌ای صاف واقع در مغز استخوان هم توانایی چسبیدن به کف فلاسک و آلوده‌ساختن کشت اولیه سلول های بنیادی مزانشیمی را دارند ولی طی پاساژهای مختلف حذف می‌شوند (۲۴-۱۸). از طرفی نتایج برخی تحقیقات نشان داده است که سلول‌های بنیادی مزانشیمی در مایعات بدن مانند خون محیطی و خون بند ناف نیز حضور دارند (۲۶و۲۵)، بطوریکه برخی محققین با کشت سلولهای این دو منبع توانسته اند سلولهای بنیادی مزانشیمی آن را استخراج نمایند. باتوجه به این مطالعات، بنظر می‌رسد سلولهای بنیادی مزانشیمی برای زنده ماندن کاملا وابسته به تکیه گاه نیستند. بعبارتی برخی جمعیت سلولهای بنیادی مزانشیمی در محیط مایع نیز می توانند زنده بمانند. حال این سوال پیش می آید که سلولهای مغز استخوان که در مطالعه Friedenstein و همکاران، ۴ ساعت پس از آغاز کشت دور ریخته شد و در همه مطالعات بعدی نیز این روش با قدری تغییر روش استاندارد جدا سازی سلول بنیادی مزانشیمی شد، آیا واقعا سلولهای غیر مزانشیمی بودند. به عبارت دیگر، آیا این احتمال وجود ندارد که در بین سلول های شناور محیط رویی برخی سلول بنیادی مزانشیمی وجود داشته باشد. پاسخ این سوالات را Wan و همکاران داده اند براساس تحقیق این دانشمندان، در محیط رویی کشت اولیه سلول های مغز استخوان، سلول هایی با خصوصیات سلول بنیادی مزانشیمی وجود دارد (۲۷). هدف از مطالعه حاضر کشت و جداسازی سلولهای بنیادی مزانشیمی از محیط رویی کشت اولیه و مقایسه آنها با سلول‌های چسبنده از نظر شاخص‌های رشد و تکثیر و نیز قابلیت‌های تمایزی می‌باشد. در این ارتباط Wan و همکاران نشان داده اند که این دو گروه سلول از لحاظ سرعت تکثیر تفاوتی ندارند. در مطالعه حاضراین دو گروه سلول از لحاظ میزان دوبرابر شدن جمعیت سلولی در طی سه پاساژ متوالی با هم مقایسه شدند. نتایج این تحقیق حاکی از سرعت رشد بالای سلول های محیط رویی بود. همچنین برای سلول های جدا شده، شرایط کشت به منظور حصول حداکثر تکثیر سلولی بهینه سازی شده است. مطالعه حاضر از این نظر ضرورت دارد که به سلول های بنیادی مزانشیمی می پردازد که در کشت روتین مغز استخوان با تعویض محیط کشت دور ریخته می شوند. این سلولها می تواند به عنوان منبع مکمل برای سلول های بنیادی مزانشیمی باشند

مواد و روشها

نمونه‌گیری از مغز استخوان و کشت سلول: در مطالعه تجربی حاضر که به صورت Blind انجام شد، ۱۰ سر رت نژاد ویستار با کتامین و زایلازین بیهوش شده با استفاده از سرنگ ۲۲، ۳۰۰-۲۰۰ میکرولیتر مغز استخوان از استخوان درشت نی آن‌ها گرفته شد و به ۵میلی‌لیتر محیط Dubleco's Modified DMEM (Eagles Medium, Gibco; Germany) حاوی ۱۰درصد سرم جنین گاوی (Fetal Bovine Serum, Gibco; Germany)، ۱۰۰ واحد بین‌المللی آنتی‌بیوتیک پنی‌سلین و ۱۰۰واحد بین‌المللی استرپتومایسین (Gibco; Germany) اضافه گردید. محیط حاوی سلول به مدت ۵ دقیقه با دور ۱۲۰۰ در دقیقه سانتریفوژ شد، محیط رویی دور ریخته‌شد و پلت سلولی کف لوله با ۱ میلی‌لیتر محیط کشت DMEM معلق شد و پس از رنگ آمیزی با تریپان بلو، با

[DOR: 20.1001.1.15614107.1387.10.2.2.2]

هموسیتومتر شمارش شد که بیش از ۹۵٪ سلولها زنده بودند. سلولهای مغز استخوان به تعداد 10^5 سلول در سانتیمتر مربع در یک فلاسک ۷۵ سانتی‌متری در ۱۵ میلی‌لیتر محیط کشت DMEM حاوی ۱۰٪ سرم جنین گاوی کشت داده‌شد. سپس سلول‌ها در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد و ۵٪ CO_2 انکوبه شدند. چهار روز پس از آغاز کشت، محیط رویی سلول‌ها جمع آوری شد، به‌مدت ۵ دقیقه با دور ۱۲۰۰ در دقیقه سانتریفیوژ گردید و سلولهای ته نشین شده آن دوباره در یک فلاسک ۷۵ سانتی‌متر مربعی حاوی محیط کشت DMEM با۱۰٪ سرم جنین گاوی کشت داده شد. سلولهای چسبیده کشت اولیه و سلول های جمع آوری شده از محیط رویی کشت اولیه در شرایط ۳۷ درجه سانتیگراد و ۵ درصد CO_2 انکوبه شدند و هر ۴ روز یکبار محیط آنها تعویض شد تا کف فلاسک را پر کردند. در این زمان، سلول ها با استفاده از Trypsin/EDTA ۰/۲٪ (Gibco; Germany) از کف فلاسک کنده و با تراکم 10^4 سلول در سانتیمتر مربع در پلیت های شش خانه ای با انجام سه پاساژ متوالی تکثیر شدند. در طول دوره کشت زمان لازم برای دوبله شدن جمعیت سلولی برای دو نوع سلول محاسبه شد. برای اینکه مقایسه دو گروه سلول در شرایط یکسان انجام گیرد، در هر پاساژ سلولی زمانیکه یکی از کشت ها به مرحله Confluency می رسید (در مطالعه حاضر سلولهای گروه محیط رویی زودتر به این مرحله می رسیدند) به کشت دیگر نیز با انجام پاساژ خاتمه داده می شد. لازم به ذکر است که در محیط کشت سلول های محیط رویی، پس از کشت مجدد، تعدادی سلول شناور حضور داشتند. با کشت مجدد این سلولهای شناور، سلولی به سطح ظرف کشت نچسبید شاید به این دلیل که سلول های فوق غیر مزانشیمی از نوع رده خونساز بودند.

تعیین زمان دو برابر شدن جمعیت سلولی: بمنظور مقایسه سرعت رشد سلول‌های حاصل از دو نوع کشت زمان دو برابر شدن سلول‌ها در طول دوره کشت (پاساژ اول تا سوم) اندازه‌گیری شد. برای این منظور از فرمول زیر استفاده شد. در این رابطه تعداد دو برابرشدن جمعیت سلولی(Population Doubling Time, PDT)، N0 تعداد سلول در شروع کشت، N تعداد سلول در پایان کشت و مدت زمان دوره کشت(Culture Time, CT) است.

$$PDT = \frac{C.T}{Log\frac{N}{N_0}\times 3.31}$$

تعیین Cell Density(تراکم سلولی) بهینه برای آغاز کشت: از آنجایی که تعداد سلول استفاده شده در شروع کشت، بر میزان تکثیر سلول موثر است، سلول های پاساژ سوم با تراکمهای ۱۰۰، ۵۰۰، ۱۰۰۰، ۲۰۰۰ و۵۰۰۰ سلول در سانتی‌متر مربع در خانه های پلیتهای شش خانه کشت شد و به مدت یک هفته در شرایط ۳۷ درجه و ۵٪ CO_2 انکوبه شد در پایان این مدت سلول ها با استفاده از تریپسین جدا گردیده و شمارش شدند. تعداد سلولها بر حسب Fold increase (چند برابر شدگی) محاسبه و دو گروه از این نظر مقایسه شدند.

تعیین غلظت بهینه سرم جنین گاوی در کشت سلولی: رشد و تکثیر سلولهای مزانشیمی موش وابسته به حضور سرم در محیط کشت می‌باشد. برای تعیین بهترین غلظت‌سرم، درصدهای مختلف آن (۵٪، ۱۰٪، ۱۵٪ و ۲۰٪) مورد ارزیابی قرار گرفت. بدین ترتیب که ۱۰۰ سلول در سانتی‌متر مربع در خانه های پلیتهای شش خانه با غلظتهای مختلف سرم کشت گردید و پس از یک هفته، تعداد آنها شمارش گردید و تعداد سلولها برحسبFold increase محاسبه و دو گروه از این نظر مقایسه شدند.

بررسی توان تمایزی سلول‌ها

تمایز به چربی: سلول‌های پاساژ ۳ از دو گروه محیط رویی و چسبنده در پلیت ۶ خانه کشت داده شدند و پس از این‌که کف پلیت پرشد، محیط DMEM سلولها با محیط آدیپوژنیک یعنی DMEM حاوی ۱۰ درصد سرم جنین گاوی، ۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر Ascorbic2-Phosphate (Sigma; USA)، ۱۰۰ نانومولار Dexametasone (Sigma; USA) و ۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر Indomethacine (Sigma; USA) جایگزین شد. سلولهای کشت شده در DMEM به عنوان کنترل در نظر گرفته شد. تمایز سلول ها سه هفته پس از آغاز کشت، با روش رنگ آمیزی اویل رد و آنالیز RT-PCR ارزیابی شد. برای رنگ آمیزی اویل رد به این صورت عمل شد که ابتدا سلولها بمدت یک ساعت در دمای اتاق با فرمالین ۴٪ فیکس شدند و سپس با الکل ۷۰٪ شسته شده و به مدت۱۵–۱۰ دقیقه با محلول Oil red ۰/۵٪ در ایزوپروپانل۹۹٪ رنگ‌آمیزی شده، در پایان محلول رنگی خارج و سه بار با الکل ۷۰٪ شستشو شد.

تمایز به استخوان: برای این منظور سلول های کشت شده در پلیت های شش خانه ای، پس از پر کردن کف پلیت، با محیط استئوژنیک حاوی DMEM، ۱۰٪ سرم جنین گاوی، ۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر Ascorbic2-Phosphate (Sigma; USA)، ۱۰ نانومولار Dexametasone (Sigma; USA) و ۱۰ میلی‌مولار

[DOR: 20.1001.1.15614107.1387.10.2.2.2]

B-Glycerol Phosphate (Sigma; USA) تیمار شدند. در پایان هفته سوم، تمایز سلول‌ها با روش رنگ آمیزی آلیزارین رد و RT-PCR ارزیابی شد. به منظور رنگ آمیزی آلیزارین رد، تک‌لایه سلولی با PBS شسته شده و به مدت ۱۰ دقیقه با متانل (Merck ; Germany) فیکس شد و سپس با محلول رنگی (۱ درصد آلیزارین رد S در آب آمونیاکی ۰/۲۵ درصد) به مدت ۲ دقیقه رنگ‌آمیزی شد. سلول‌ها با آب مقطر شسته و خشک شد.

تمایز به غضروف: به منظور تمایز به غضروف از روش Micromass culture استفاده شد. برای این منظور از سلول های پاساژ ۳ پس از شمارش با لام نئوبار، ۲۰۰/۰۰۰ سلول به یک لوله ۱۵ میلی‌لیتری منتقل شد. سلول ها با ۱۲۰۰ دور در دقیقه به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ شدند. سپس محیط رویی تخلیه شده و محیط کندروژنیک شامل محیط DMEM حاوی ۱۰ نانوگرم فاکتور رشد TGF-B3، ۱۰ نانوگرم BMP-6، ۵۰ میلی‌گرم ITS+premix، ۵/۳۵ linoleic acid و ۱/۲۵ میلی‌گرم Bovine Serum Albomin و ۱ درصد سرم گاوی بر روی پلت سلولی در ته لوله اضافه شد. محیط تمایز هر۴-۳ روز یک‌بار به‌مدت ۳ هفته تعویض شد. برای ارزیابی تمایز به غضروف از روش رنگ‌آمیزی اختصاصی تولوئیدن بلو استفاده شد. برای این منظور، نمونه ها به روش روتین بافتی پردازش و برش‌های ۵ میکرومتری از آن‌ها تهیه شد. به این ترتیب که سلول‌ها ابتدا به‌مدت ۲ ساعت در پارافرمالدئید ۴درصد فیکس شدند. سپس به ترتیب با استفاده از الکل و گزیلل، آب‌گیری و شفاف‌سازی شده و در انتها در پارافین قالب‌گیری شدند و با استفاده از میکروتوم، برش‌های ۵ میکرومتری تهیه شد. به‌منظور رنگ‌آمیزی، رنگ تولوئیدین بلو (Sigma; Germany) به مدت ۳۰ ثانیه در دمای اتاق به مقاطع بافتی اضافه گردید و در انتها رنگ اضافی با آب مقطر شسته شد. برش‌های رنگ شده با استفاده از میکروسکوپ نوری مشاهده شدند.

انجام RT-PCR: در روش RT-PCR پس از لیز نمودن سلول‌ها به‌کمک محلول RNAX (CinaGen Inc., Tehran, Iran) و استخراج RNA سلولی، با استفاده از RevertAid ^{TM} H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas) از روی RNA حاصل cDNA در حجم بالا ساخته شده و سپس PCR در حجم ۲۵ میکرولیتر با dNTPs (Fermentas) به حجم ۱۰ میکرولیتر (۲۰۰ نانومولار)، $MgCl_2$ به حجم ۳ میکرولیتر (۱/۵ میلی مولار) و آنزیم DNA polymerase Taq (Fermentas) به حجم ۲/۵ میکرولیتر و ۱۰۰ پیکومول از پرایمرهای ژن‌های اختصاصی بافت استخوان شامل استئوکلسین، استئوپونتین و آلکالین فسفاتاز، بافت چربی شامل PPAR-α، PPAR-γ و C/EBP-α و بافت غضروف شامل کلاژن تیپ II،کلاژن تیپ X و اگریکان انجام شد. پرایمرهای مورد استفاده به همراه دمای Annealing هرکدام در جدول شماره ۱ یک نشان داده شده است. برای مقایسه نتایج بالا از تست‌های آماری کروسکال- والیس و من- ویتنی استفاده شد. تفاوت های دو گروه با $p<0/05$ معنی دار در نظر گرفته شد.

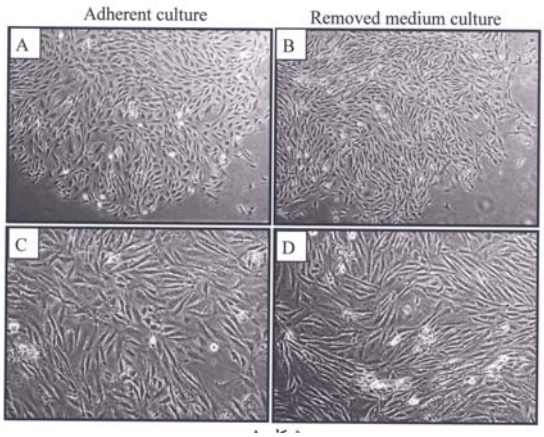
جدول ۱. پرایمر های اختصاصی مورد استفاده در RT-PCR

	نام ژن	جهت	توالی	دمای اتصال	اندازه محصول	تعدادسیکل
استخوان	استئوپونتین	رفت	5′-AGCAGGAATACTAACTGC -3	۴۸	۲۸۷	۳۰
		برگشت	5′-GATTATAGTGACACAGACTATT-3′			
	استئوکلسین	رفت	5′-GTCCCACACAGCAACTCG-3′	۵۸	۳۸۰	۳۰
		برگشت	5′-CCAAAGCTGAAGCTGCCG-3′			
	آلکالین فسفاتاز	رفت	5′-TGCCTTACCAACTCATTTGTG-3′	۶۱	۴۰۱	۳۰
		برگشت	5′-ACGCGATGCAACACCACTC-3′			
چربی	PPAR-alpha	رفت	5′-CCCTGCCTTCCCTGTGAAC-3′	۶۱	۳۶۷	۳۵
		برگشت	5′-GGGACTCATCTGTACTGGTGG-3′			
	PPAR- gamma	رفت	5′-GGTGAAACTCTGGGAGATCCC-3′	۶۴	۳۵۲	۳۵
		برگشت	5′-CCATCTCTGCCACGGGCT-3′			
	C/EBP-alpha	رفت	5′-ACGTGGAGACGCAGCAGAA-3′	۶۳	۲۹۵	۳۵
		برگشت	5′-AGGCGGTCATTGTCACTGG-3′			
غضروف	کلاژن نوع ۲	رفت	5′-GGCTTAGGGCAGAGAGAGAAG-3′	۶۳	۳۱۵	۳۵
		برگشت	5′-TGGACAGTAGACGGAGGA AAGTC-3′			
	کلاژن نوع ۱۰	رفت	5′-CAGCAGCATTACGACCCAAG-3′	۶۱	۳۳۴	۳۰
		برگشت	5′-CCTGAGAAGGACGAGTGGAC-3′			
	اگریکان	رفت	5′-GGCAACCTCCTGGGTGTAAG-3′	۶۳	۴۴۴	۳۰
		برگشت	5′-TCGCACCACCAGGTCCTC-3′			
	GAPDH	رفت	5′-TCGGTGTGAACGGATTTG-3′	۵۸	۲۷۶	۳۰
		برگشت	5′-ACTCCACGACATACTCAGCAC-3′			

[DOR: 20.1001.1.15614107.1387.10.2.2.2]

یافته‌ها

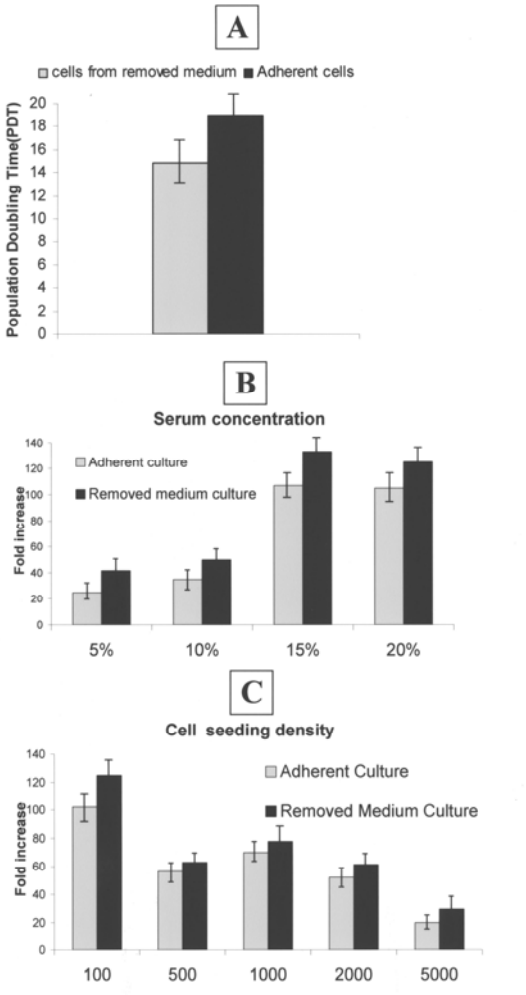
کشت سلول: در کشت اولیه هر دو گروه، کلون های کوچکی از سلول های فیبروبلاستی ظاهر شد (شکل ۱A و۱B) و با گذشت زمان رشد کرد. در کشت اولیه، سلول های محیط رویی در طی ۷ روز کف فلاسک را پر کردند، در حالیکه این زمان برای سلول های چسبنده ۱۰ روز بود. در طی پاساژ ها، سلول های محیط رویی سریعتر ظرف کشت را پر می کردند (شکل ۱C و ۱D).



شکل ۱. کشت سلول. A) کشت اولیه سلول های چسبنده مغز استخوان. B) کشت سلول های شناور محیط رویی کشت اولیه. C) پاساژ سوم سلول های چسبنده کشت اولیه. D) پاساژ سوم سلول های شناور محیط رویی کشت اولیه مغز استخوان. میکروسکوپ فاز کنتراست معکوس، درشتنمایی ۴۰×

زمان دو برابر شدن جمعیت سلولی: بر اساس نتایج حاصل، سلول های محیط رویی، بطور متوسط هر ۲±۱۴/۹ ساعت یکبار دوبله شدند، در حالیکه در کشت سلول های چسبنده، این میزان بطور متوسط ۲/۱±۱۹ بود که این تفاوت از لحاظ آماری معنی دار بود (p<۰/۰۵) (شکل۲A).

تاثیر تراکم سلولی در شروع کشت بر میزان تکثیر: براساس نتایج حاصل، که در نمودار شکل ۲B نشان داده شده است، زمانیکه سلولها، با تراکم ۱۰۰ سلول در سانتی‌متر مربع کشت شدند، بیشترین تکثیر سلولی اتفاق افتاد و از این نظر با گروههای۵۰۰، ۱۰۰۰، ۲۰۰۰ و ۵۰۰۰ سلول در سانتی‌متر مربع تفاوت معنی داری وجود داشت (p<۰/۰۵). در زمان کشت با تراکم های مختلف، اگرچه سلولهای محیط رویی اندکی بیش از گروه سلولهای چسبنده تکثیر شدند ولی تفاوت بین آنها معنی داری نبود.

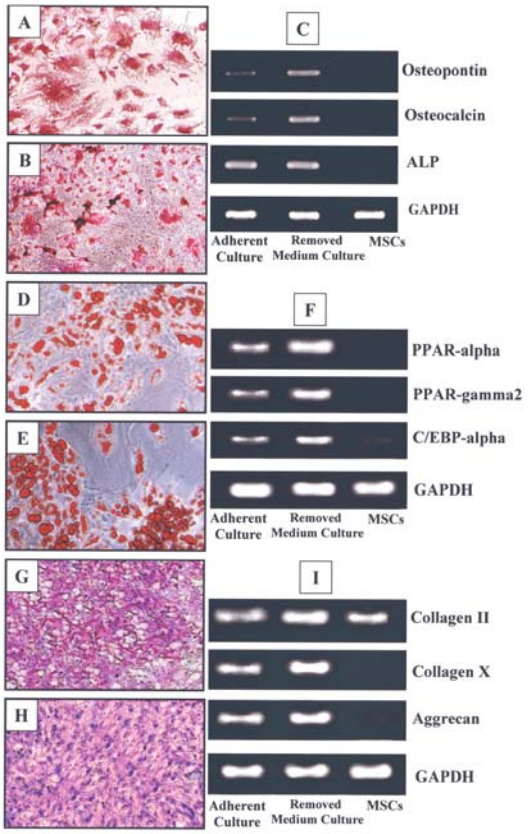


شکل ۲. A) مقایسه PDT (زمان دوبرابرشدن جمعیت سلولی) در دو کشت مورد مطالعه. سلول های محیط رویی بطور معنی داری PDT کوتاه تری دارند (p<۰/۰۵). B) بررسی تاثیر تراکم های مختلف سلولی بر میزان تکثیر سلول های مورد مطالعه. زمانیکه کشت با تراکم ۱۰۰ سلول در سانتیمتر مربع شروع شد بیشترین تکثیر اتفاق افتاد (p<۰/۰۵). C) بررسی غلظت های مختلف سرم گاوی بر میزان تکثیر سلول های جدا شده. در محیط حاوی ۱۵٪ سرم، حداکثر تکثیر حاصل شد (p<۰/۰۵).

پاسخ سلولها به غلظتهای مختلف سرم گاوی: همانطوریکه در نمودار شکل ۲C مشاهده می شود، سلولهای دو گروه در مقایسه در محیط حاوی ۱۵٪ سرم بیشترین تکثیر را داشتند و از این نظر با سرم۵٪ و۱۰٪ تفاوت معنی داری وجود داشت (p<۰/۰۵)، در حالیکه تفاوت آن با سرم۲۰٪ از لحاظ آماری معنی دار نبود. در زمان کشت با سرم ۱۵٪، اگرچه سلول های محیط رویی اندکی بیش از گروه سلولهای چسبنده تکثیر شدند ولی تفاوت بین آنها معنی داری نبود.

[DOR: 20.1001.1.15614107.1387.10.2.2.2]

تمایز استخوان: در کشت تمایز به استخوان هر دو گروه، به تدریج تجمعات سلولی به شکل ندول تشکیل شد و رنگ آمیزی با آلیزارین رد در پایان ۲۱ روز القاء تمایزحاکی از معدنی شدن ندول ها بود (شکل ۳B و ۳A). نتایج RT-PCR نشان داد که سلول های تمایز یافته در گروه محیط رویی مشابه با گروه سلول های چسبنده، ژن های ویژه استخوان شامل استئوکلسین، استئوپونتین و آلکالین فسفاتاز را به مقدار نسبتا زیادی بیان کرده اند (شکل۳C).



شکل ۳. A) تمایز به استخوان سلول های محیط رویی، رنگ آمیزی آلیزارین رد B) تمایز به استخوان سلول های چسبنده کشت اولیه، رنگ آمیزی آلیزارین رد. C) بررسی RT-PCR برای بیان ژن های استخوانی D) تمایز به چربی سلول های محیط رویی، رنگ آمیزی اویل رد E) تمایز به چربی سلول های چسبنده کشت اولیه، رنگ آمیزی اویل رد. F) بررسی RT-PCR برای بیان ژن های چربی G) تمایز به غضروف سلول های محیط رویی، رنگ آمیزی تولوئیدین بلو H) تمایز به غضروف سلول های چسبنده، رنگ آمیزی تولوئیدین بلو. I) بررسی RT-PCR برای بیان ژن های غضروفی.

تمایز چربی: در کشت هر دو گروه، پس از ۳-۲ روز اولین قطرات چربی مشاهده شد و با گذشت زمان تعداد آنها زیاد شد، بطوریکه پس از ۱۰ روز تمام سیتوپلاسم برخی از سلولها از چربی انباشته شده بود. برای تایید ماهیت چربی قطرات مشاهده شده، کشت سلول در روز ۲۱ تمایز با Oil Red رنگ شد و قرمز شدن سیتوپلاسم سلولها، آدیپوسیت بودن آنها را تایید کرد (شکل ۳E و ۳D). نتایج بررسی بیان ژنی نشان داد که در کشت تمایز سلول های محیط رویی همانند سلولهای چسبنده مغزاستخوان پس از تمایز به چربی، ژنهای ویژه چربی شامل PPAR-α، PPAR-γ2 و C/EBP-γ به مقدار زیادی بیان شده است (شکل۳F).

تمایز غضروف: سلول های گروه محیط رویی همانند سلول های چسبنده مغز استخوان با رنگ آمیزی تولوییدن بلوخاصیت متاکرومازی از خود نشان دادند (شکل ۳H و۳G) و نتایج RT-PCR نشان داد که در این گروه همانند گروه سلول های چسبنده ژنهای غضروفی شامل کلاژن II، X و آگریکان بیان شده است (شکل۳I).

بحث و نتیجه گیری

در مطالعه حاضر با کشت مجدد سلول های شناور محیط رویی کشت اولیه سلول های مغز استخوان موش صحرایی، جمعیتی از سلول های بنیادی مزانشیمی ظاهر شد و در طی چندین پاساژ تکثیر داده شد. بررسی های حاضر نشان داد که این جمعیت سلولی بطور معنی داری با سرعت بیشتری نسبت به سلول های چسبنده تکثیر می شود بطوریکه در طی هر ۱۴/۹ ساعت یکبار تعداد این سلول ها دو برابر می شود. این در حالی بود که جمعیت سلول های چسبنده کشت اولیه بطور متوسط در هر ۱۹ ساعت یکبار دو برابر شدند. در واقع این نتایج قویا پیشنهاد می کند که نباید به هنگام تعویض محیط کشت اولیه مغز استخوان، محیط تعویضی دور ریخته شود بلکه می توان پس از جمع آوری محیط رویی اقدام به کشت مجدد آنها نمود. یافته های تحقیق حاضر مبنی بر وجود سلول های بنیادی مزانشیمی با توان تکثیر بالا در محیط رویی کشت اولیه مغز استخوان موش صحرایی، مخالف نتایج Wan و همکاران است که اذعان می کنند سلول های مزانشیمی جدا شده از محیط رویی کشت اولیه مغز استخوان از لحاظ توان رشد تفاوتی با سلول های چسبنده کشت اولیه ندارند (۲۷). با توجه به اینکه در مطالعه حاضر از سلول های موش صحرایی استفاده شد و Wan و همکاران، سلولهای انسانی را بررسی کرده اند، به نظر می رسد که این تفاوت در نتایج به دلیل تفاوت های گونه ای باشد.

[DOR: 20.1001.1.15614107.1387.10.2.2.2]

در مطالعه حاضر PDT (زمان لازم برای دوبرابر شدن جمعیت سلولی) با در نظر گرفتن شمارش سلولی در پاساژ اول تا سوم محاسبه شد و کشت اولیه منظور نگردید، زیرا معمولا، در کشت اولیه به منظور استخراج سلول بنیادی مزانشیمی، سلول های مغز استخوان با تراکم بسیار زیاد کشت می شوند و از این تعداد، سلولهای معدودی منشاء کشت می شوند. به عبارتی، تعداد سلول مغز استخوان برای آغاز کشت همیشه بیش از تعداد آنها در انتهای کشت است. لذا، تحت چنین شرایطی، به ظاهر تکثیر سلولی اتفاق نمی افتد و محاسبه زمان دوبله شدن جمعیت سلولی منطقی نخواهد بود. به همین دلیل در مطالعه حاضر، PDT برای سه پاساژ متوالی محاسبه گردید.

اگرچه تلاش های زیادی در جهت شناسایی مارکرهای سطحی سلول های بنیادی مزانشیمی انجام شده است، با این وجود مارکر ویژه منفردی معرفی نشده است. در این ارتباط چندین مارکر از جمله CD133 ، LNGFR (Low Affinity Nerve Growth Factor Receptor) و STRO-1 برای سلولهای بنیادی مزانشیمی انسانی پیشنهاد شده است ولی برای سلول های بنیادی مزانشیمی حیوانی مارکر اختصاصی ذکر نشده است (۳۰-۲۸). به همین دلیل کمیته سلول های بنیادی مزانشیمی که بخشی از انجمن بین المللی سلول درمانی محسوب می شود، چندین معیار برای شناسایی سلول بنیادی مزانشیمی پیشنهاد کرده است. براین اساس، سلول بنیادی مزانشیمی از مدل حیوانی بایستی در زمان کشت در شرایط استاندارد بتواند به سطح کشت بچسبد و نیز توانایی تمایز به سه رده استخوانی، غضروفی و چربی در شرایط آزمایشگاهی را داشته باشد (۳۱). بر اساس یافته های این تحقیق، سلول های مورد مطالعه منطبق با خصوصیات مذکور بودند.

نکته ای که می بایست توضیح داده شود در ارتباط با ماهیت سلول های بنیادی مزانشیمی محیط رویی است. به نظر می رسد این سلول ها گروه ویژه ای از سلول های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان هستند که ویژگی خاص آنها تاخیر در چسبیدن به سطح کشت است بطوریکه در چند روز اول برخلاف سلول های بنیادی مزانشیمی چسبنده به حالت شناور در محیط کشت باقی می مانند. به عبارتی این سلول ها به زمان بیشتری برای چسبیدن نیاز دارند، ولی به دلیل اجتناب ناپذیر بودن تعویض محیط کشت بدلیل تهی شدن آن از مواد تغذیه ای، این شانس در اختیار سلول ها قرار داده نمی شود و در نتیجه دور ریخته می شوند. نتایج این مطالعه نشان داد که با کشت مجدد سلول های شناور محیط تعویضی کشت اولیه می توان این سلول ها را تکثیر کرد.

به‌طور کلی در کشت سلول به‌ویژه با اهداف درمانی سعی بر این است که تا حد امکان از حداقل سرم در محیط کشت استفاده شود تا احتمال انتقال آلودگی‌های حیوانی کاهش یابد و از سوی دیگر رشد و تکثیر سلول های بنیادی مزانشیمی شدیدا وابسته به سرم گاوی است (۳۲). لذا یکی از آزمایش‌هایی که در این تحقیق انجام شد تعیین غلظتی از سرم گاوی که حداکثر تکثیر سلولی را به دنبال داشته باشد، بود. نتایج این تحقیق نشان داد که در هر دو نوع کشت بطور معنی داری بیشترین تکثیر در حضور ۱۵ درصد سرم اتفاق می افتد. تحت چنین شرایطی، سلول های محیط رویی بیش از سلول های چسبنده کشت اولیه تکثیر شدند. که این خود تاییدی بر رشد سریع آنهاست. یافته های Peister و همکاران بر روی جداسازی سلول های بنیادی مزانشیمی موش سوری نشان داد که از بین سه غلظت ۵٪، ۱۰٪ و ۲۰٪ سرم گاوی ۲۰٪ بیشترین تاثیرات تکثیری را به همراه داشته است (۳۳). بر اساس یافته های تحقیق حاضر نیز اگرچه غلظت ۱۵٪ اندکی بیش از غلظت ۲۰٪ سبب تکثیر سلولی شد ولی تفاوت بین این دو غلظت سرم معنی دار نبود.

آزمایش دیگری که در مطالعه حاضر انجام شد، بررسی تأثیر تعداد اولیه سلول روی سرعت رشد و تکثیر سلول‌های پاساژ ۳ بود. هدف از این کار بهینه سازی شرایط کشت برای سلول های دو گروه بود. از این حیث در هر دو نوع کشت، زمانیکه سلول ها با تراکم ۱۰۰ سلول در سانتیمتر مربع کشت شدند، تکثیر بیشتری حاصل شد. بطوریکه میزان Fold increase در این تراکم بطور معنی داری بیش از تراکم های ۵۰۰، ۱۰۰۰، ۲۰۰۰و ۵۰۰۰ بود. براساس نتایج این مطالعه، سلول های محیط رویی، با تفاوت آماری معنی داری، بیش از سلول های چسبنده کشت اولیه در شرایط ۱۰۰ سلول در سانتیمتر مربع تکثیر شدند که البته این یافته دور از انتظار نبود. زیرا بر اساس محاسبات PDT، این سلول ها زمان دوبرابرشدن کوتاهی داشتند. از این نظر نتایج مطالعه حاضر موافق یافته های محققین پیشین است (۳۳). در مجموع مطالعات مربوط به بهینه سازی شرایط کشت برای حصول حداکثر تکثیر نشان داد که دو نوع سلول مورد مطالعه، از این نظر تفاوتی ندارند، بطوریکه هر دو در حضور ۱۵٪ سرم گاوی و با تراکم ۱۰۰ سلول در سانتیمتر مربع ماکزیمم تکثیر را

[DOR: 20.1001.1.15614107.1387.10.2.2.2]

انجام می دهند. روی هم رفته، این عدم اختلاف بیانگر تشابه بیولوژی این دو نوع سلول است. به عبارتی دیگر دو سلول مورد مطالعه در برابر فاکتورهای محیطی رفتارهای نسبتاً یکسانی داشتند زیرا هر دو سلول بنیادی مزانشیمی بودند. تنها ویژگی که این دو را از هم متمایز می کرد. اختلاف در سرعت رشد در شرایط یکسان بود.

نکته دیگری در مطالعه حاضر حیوان آزمایشگاهی مورد مطالعه بود. نتایج نشان داد که این روش کشت که پیش از این Wan و همکاران برای انسان گزارش کرده اند برای موش صحرایی نیز عملی است. در واقع با این روش، یک منبع مکمل برای سلول های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان تامین می شود و این مسئله برای موش صحرایی بویژه زمانیکه خواسته شود از این مدل برای پیوند درمانی اتولوگ استفاده شود، اهمیت فراوانی دارد. زیرا با انجام بیوپسی از مغز استخوان، با توجه به تجربه مطالعه حاضر، حداکثر ۳۰۰ میکرولیتر از استخوان تیبیا قابل تهیه است و این میزان برای کشت و تکثیر سلول های بنیادی مزانشیمی برای مقاصد پیوند درمانی کافی نیست. بنابراین وجود یک منبع مکمل نظیر سلول های شناور محیط رویی کشت اولیه ضروری می نماید.

در کل با توجه به یافته های تحقیق حاضر چنین به نظر می رسد که در بین سلول های شناور محیط رویی کشت اولیه مغز استخوان، سلول های بنیادی مزانشیمی وجود دارد که با کشت مجدد به سطح کشت چسبیده و در مقایسه با سلول های چسبنده اولیه با سرعت زیادی رشد می کنند. این سلول ها زمانیکه با تراکم ۱۰۰ سلول در سانتیمتر مربع و در حضور ۱۵٪ سرم گاوی کشت شدند، حداکثر تکثیر را به نمایش گذاشتند.

****

References

1. Beresford JN. Osteogenic stem cells and the stromal system of bone and marrow. Clin Orthoped Rel Res 1989; 240: 270-80.

2. Petersen BE, Bowen WC, Patrene KD, et al. Bone marrow as a potential source of hepatic oval cells. Science 1999; 284 (5417): 1168-70.

3. Poulsom R, Alison MR, Cook T, et al. Bone marrow stem cells contribute to healing of the kidney. J Am Soc Nephrol 2003; 14 (Supp 1): S48-54.

4. Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, et al. Bone marrow cells regenerate infracted myocardium. Nature 2001; 410(6829): 701-5.

5. Mezey E, Chandross KJ, Harta G, Maki RA, McKercher SR. Turning blood into brain: cells bearing neuronal antigens generated in vivo from bone marrow. Science 2000; 290(5497): 1770-82.

6. Chapel A, Bertho JM, Bensidhoum A, et al. Mesenchymal stem cells home to injured tissues when co-infused with hematopoietics cells to treat a radiation- induced multi- organ failure syndrome. J Gene Med 2003; 5(12): 1028-38.

7. Dennis JE, Esterly K, Awadallah A, et al. Clinical-scale expansion of a mixed population of bone-marrow-derived stem and progenitor cells for potential use in bone-tissue regeneration. Stem Cells 2007; 25(10): 2575-82.

8. Friedenstein AJ, Piatetzky Shapiro II, Petrakova KV. Osteogenesis in transplants of bone marrow cells. J Embryol Exp Morphol 1966, 16 (3): 381-90.

9. Friedenstein AJ, Chailakhjan RK, Lalykina KS. The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells. Cell Tissue Kinet 1970; 3(4): 393-403.

[DOR: 20.1001.1.15614107.1387.10.2.2.2]

10. Piersma AH, Brockbank KG, Ploemacher RE, Van Vliet E, Brakel Van Peer KM, Visser PJ. Characterization of fibroblastic stromal cells from murine bone marrow. Exp Hematol 1985; 13(4): 237-43.

11. Baksh D, Song L, Tuan RS. Adult mesenchymal stem cells: characterization, differentiation and application in cell therapy. Mol Med 2004; 8(3): 301-16.

12. Horwitz EM, Gordon PL, Koo WK, et al. Isolated allogenic bone marrow-derived mesenchymal cells engraft and stimulate growth in children with osteogenesis imperfecta: Implications for cell therapy of bone. Proc Natl Acad Sci USA 2002; 99(13): 8932-7.

13. Koe ON, Gerson SL, Cooper BW, et al. Rapid hematopoietic recovery after confusion of autologous-blood stem cells in advanced breast cancer patients receiving high dose chemotherapy. J Clin Oncol 2000; 18(2): 307-16.

14. Petite H, Viateau V, Bensaid W, et al. Tissue engineered bone regeneration. Nat Biotechnol 2000; 18(9): 959-63.

15. Quarto R, Mastrogiacomo M, Cancedda R, et al. Repair of large bone defect with the use of autogenic bone marrow stromal cell. N Engl J Med 2001; 344(5): 385-6.

16. Grinnemo KH, Mansson A, Dellgren G, et al. Xenoreactivity and engrafment of human mesenchymal stem cells transplanted into infarcted rat myocardium. J Thorac Cardiovasc Surg 2004; 127(5): 1293-300.

17. Barry FP. Mesenchymal stem cell therapy in joint disease. Novartis Found Symp 2003; 249: 86-96.

18. Arnhold SJ, Goletz I, Klein H, et al. Isolation and characterization of marrow derived equine mesenchymal stem cells. Am J Vet Res 2007; 68(10): 1095-105.

19. Martin DR, Cox NR, Hathcock TL, Niemeyer GP, Baker HJ. Isolation and characterization of multipotential mesenchymal stem cells from feline bone marrow. Exp Hematol 2002; 3(8): 879-86.

20. Gao K, Lu Y, Li S, et al. Isolation, culturing and growth characteristics of mesenchymal stem cells from bone marrow of Rhesus monkey, Macaca mulatta. Sheng Wu Yi Xue Gong Cheng Xue Za Zhi 2007; 24(6): 1343-7.

21. Abdallah BM, Kassem M. Human mesenchymal stem cells: from basic biology to clinical applications. Gene Ther 2008; 15(2): 109-16.

22. Ringe J, Kaps C, Schmitt B, et al. Porcine mesenchymal stem cells. Induction of distinct mesenchymal cell lineages. Cell Tissue Res 2002; 307(3): 321-7.

23. Eslaminejad MB, Nadri S, Hosseini RH. Expression of thy 1.2 surface antigen increases significantly during the murine mesenchymal stem cells cultivation period. Dev Growth Differ 2007; 49(4): 351-64.

24. 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(6): 361-70.

25. Campagnoli C, Roberts IA, Kumar S, Bennett PR, Bellantuono I, Fisk NM. Identification of mesenchymal stem/progenitor cells in human first trimester fetal blood, liver, and bone marrow. Blood 2001; 98(8): 2396-402.

26. Erices A, Conget P, Miguell JJ. Mesenchymal progenitor cells in human umbilical cord blood. Br J Haematol 2000; 109(1): 235-42.

27. Wan C, He Q, McCaigue M, Marsh D, Li G. Nonadherent cell population of human marrow culture is a complementary source of mesenchymal stem cells (MSCs). J Orthopaedic Res 2006; 24(1): 21-8

[DOR: 20.1001.1.15614107.1387.10.2.2.2]

28. Kuci S, Wessels JT, Buhring HJ, et al. Identification of a novel class of human adherent CD 34- stem cells that give rise to SCID-repopulating cells. Blood 2003; 101(3): 869-76.

29. Quirici N, Soligo D, Bossolasco P, Servida F, Lumini C, Deliliers GL. Isolation of bone marrow mesenchymal stem cells by anti-nerve growth factor receptor antibodies. Exp Hematol 2002; 30(7): 783-91.

30. Gronthos S, Simmons PJ. The growth factor requirements of STRO-1-positive human bone marrow stromal precursors under serum-derived conditions in vitro. Blood 1995; 85(4): 929-40.

31. Dominci M, Le Blanc K, Mueller I, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The international society for cellular therapy position statement. Cytotherapy 2006; 8(4): 315-17.

32. Spees JL, Gregory CA, Singh H, et al. Internalized antigens must be removed to prepare hypoimmunogenic mesenchymal stem cells for cell and gene therapy. Mol Ther 2004; 9(5): 747-56.

33. Peister A, Mellad JA, Larsen 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. Gene Therapy 2004; 103(5): 1662-8.

*آدرس نویسنده مسئول: تهران، بزرگراه رسالت، خیابان بنی هاشم، پژوهشکده رویان، تلفن: ۲۶۳۰۰۰۱۶-۰۲۱.

[DOR: 20.1001.1.15614107.1387.10.2.2.2]

MESENCHYMAL STEM CELLS WITH HIGH GROWTH RATE IN THE SUPERNATANT MEDIUM FROM RAT BONE MARROW PRIMARY CULTURE

M.R. Baghaban Eslaminejad (PhD) [1*], H. Nazarian (MSc) [2], L. Taghiyar (MSc)[2]

1. [*]Assistant Professor of Stem Cell Department, Cell Sciences Research Center, Royan Institute, ACECR, Tehran, Iran, bagesla@yahoo.com, 2. Staff of Stem Cell Department, Cell Sciences Research Center, Royan Institute, ACECR, Tehran, Iran.

BACKGROUND AND OBJECTIVE: In marrow primary culture for mesenchymal stem cell isolation, the cells suspended in supernatant are usually discarded at first medium exchange. The objective of this study was to culture and expand these cells, to examine their mesenchymal stem cell nature, to compare their growth rate with that of adherent cells of primary culture and eventually to optimize the culture conditions for the cells maximum proliferation.

METHODS: In this experimental study, 10 Wistar strain rats were sacrificed, their tibial bone marrow were collected and plated in 75cm^2 culture flasks. Four days after culture initiation, the supernatant medium was collected and its floating cells along with those primarily adherent cells were expanded by three successive subcultures, during which population doubling time (PDT) was calculated and statistically compared. Furthermore, culture condition including its fetal bovine serum (FBS) concentration as well as the cell density at culture initiation for maximum proliferation of the cells was optimized. The isolated cells were evaluated with respect to their potential to differentiate into bone, cartilage and adipose cells.

FINDINGS: Based on our results, the population of the cells from removed medium was doubled in number each 14.9±2 hr, while this value was 19±2.1 hr for primarily adherent cell population ($p<0.05$). Data indicated that both cells had a maximum proliferation when cultured in a medium containing 15% FBS at 100 cell/cm^2. The isolated cells were readily differentiated into skeletal cells as were evident in specific staining as well as RT-PCR analysis.

CONCLUSION: Supernatant of rat's marrow primary culture contains mesenchymal stem cells (MSCs) with high growth rate.

KEY WORDS: *Mesenchymal stem cells, Removed medium, Growth rate, Bone, cartilage and adipose differentiation.*

Journal of Babol University of Medical Sciences 2008; 10(2): 12-22

Received: January 20th 2008, Revised: May 7th 2008, Accepted: July 9th 2008

[DOR: 20.1001.1.15614107.1387.10.2.2.2]