مقاله تحقیقی

تمایز سلولهای بنیادی مزانشیمی خون بندناف انسان به سلولهای استئوبلاستی

مسعود سلیمانی M.Sc.*،**، سعید کاویانی M.Sc.*، حسین بهاروند Ph.D.**، امیر آتشی B.Sc.**

* گروه هماتولوژی دانشگاه تربیت مدرس

** گروه سلولهای بنیادی پژوهشکده رویان

تاریخ وصول: آذر ماه ۸۳، تاریخ پذیرش: دی ماه ۸۳

چکیده

هدف: جداسازی سلولهای بنیادی مزانشیمی از خون بندناف نوزاد با ترم کامل و تمایز سلولهای به‌دست آمده به سلولهای استخوانساز

مواد و روشها: در این تحقیق اقدام به جداسازی و تکثیر سلولهای بنیادی مزانشیمی با کشتهای متعدد سلولی از کشت خون بندناف شد. ابتدا سلولهای تک هسته‌ای خون بندناف کشت داده شد و پس از یک هفته تعویض محیط انجام گرفت و سلولهای چسبنده انتخاب و تکثیر شدند. سپس با استفاده از القاکننده‌های دگزامتازون،آسکوربیک اسید و بتاگلیسرول فسفات تمایز به سلولهای استئوبلاستی انجام گرفت .

یافته‌ها: سلولهای تکثیر شده شبیه سلولهای فیبروبلاستی بوده (دوکی شکل و کشیده) و فعالیت آلکالین فسفاتاز اندکی داشتند و پس از درمان با القاگرهای فوق به مدت ۱۲ روز به سلولهای پهن با فعالیت آلکالین فسفاتازی بالا متمایز شدند.

نتیجه‌گیری: بر اساس نتایج به‌دست آمده، خون بندناف را می‌توان به عنوان منبعی جایگزین برای سلولهای بنیادی مزانشیمی مغز استخوان در نظر گرفت که دارای کاربردهای آزمایشگاهی و بالینی است.

کلیدواژه‌ها: سلولهای بنیادی مزانشیمی، خون بندناف، استئوبلاست، تمایز

مقدمه

سلولهای بنیادی مزانشیمی (MSC)[1] یک جمعیت نادر سلولی بوده و قادر به حمایت از خونسازی و تمایز به سایر رده‌های سلولی هستند [۳-۱]. با توجه به این توانایی که با آزمایشهای *in-vitro* [۵-۴] و یا مطالعات *in-vivo* [۷-۶] ثابت شده است، سلولهای‌بنیادی مزانشیمی به عنوان یک ابزار در زمینه مهندسی بافت و سلول درمانی درنظر گرفته می‌شوند. به طور رایج سلولهای مغز استخوان به عنوان منبع اصلی سلولهای بنیادی مزانشیمی برای مصارف آزمایشگاهی و بالینی استفاده می‌شوند [۲و۳]. سلولهای MSC مغز استخوان با توجه به افزایش سن کاهش چشمگیری پیدا می‌کنند.

تلاشهای زیاد در رابطه با جداسازی سلولهای بنیادی مزانشیمی از خون محیطی و خون بندناف انجام شده و بعضی از محققین بر این عقیده‌اند که خون بندناف نوزاد با ترم کامل فاقد سلولهای بنیادی مزانشیمی است [۸،۹،۱۰و۱۱] و عده‌ای دیگر بر این عقیده‌اند که سلولهای بنیادی مزانشیمی در خون محیطی [۱۲،۱۳و۱۴] و در جدار آندوتلیوم رگی در بندناف [۱۵و۱۶] موجود هستند.

برخلاف دیگر منابع سلولهای بنیادی خون بندناف دارای مزایای بیشتری است که می‌توان به فراوانی، محدود نبودن اهداء کننده، بلوغ کمتر سلول نسبت به سلولهای فرد بالغ و کاهش احتمال پس‌زدگی پیوند پس از پیوند اشاره کرد. علاوه بر این می‌توان خون بندناف افراد را ذخیره نموده و در موارد موردنیاز از آن برای خود شخص یا فرد دیگری مورد استفاده قرار داد. بنابراین می‌توان سلولهای بنیادی مزانشیمی مشتق از خون بندناف را در محیط کشت مورد تکثیر قرار داد که می‌تواند به

آدرس مکاتبه : تهران، دانشگاه تربیت مدرس، گروه هماتولوژی، صندوق پستی ۴۸۳۸-۱۴۱۵۵ Email: soleim-m@modares.ac.ir

1. Mesenchymal Stem Cell

عنوان یک ابزار عملی برای سلول درمانی، پیوند و ژن درمانی در نظر گرفته شود.

در این مطالعه ضمن جداسازی سلولهای چسبنده با فنوتیپ مزانشیمی از خون بندناف انسانی، ارزیابی پتانسیل تمایزی سلولهای جداشده با استفاده از قدرت تمایز این سلولها به سلولهای استخوانساز بررسی شد.

مواد و روشها

محیط کشت IMDM[1] (Sigma)، FBS[2] (Gibco)، محیط RPMI-1640 (Sigma) پلیتهای کشت سلول (Corning)، اسید آسکوربیک ۲ فسفات (Merck)، بتاگلیسرول فسفات (Merck)، دگزامتازون (Sigma)، تریپسین (Sigma)، کیت آلکالین فسفاتاز (Sigma)، نیترات نقره (Merck) فایکول (سازمان انتقال خون) است.

جداسازی و کشت سلولهای بندناف

ابتدا خون بندناف از بندناف نوزادان متولد شده به روش استریل و دوشیدن جمع‌آوری شد و به آزمایشگاه کشت سلول منتقل شد، سپس خون بندناف با استفاده از PBS[3] استریل به نسبت ۱:۱ رقیق و روی فایکول منتقل گردیده و در دور ۲۲۰۰ و به مدت ۲۵ دقیقه سانتریفوژ شد. لایه سلولهای تک‌هسته‌ای به طور کامل جمع‌آوری شد و ۲ بار مورد شستشو قرار گرفت. در نهایت این سلولها در محیط کشت IMDM حاوی ۲۰ درصد FBS، ۱۰۰IU/ml پنی‌سیلین، استرپتومایسین ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر منتقل و کشت شدند. سپس فلاسکهای کشت سلول در انکوباتور در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و فشار CO_2، ۵ درصد انکوبه شدند. محیط کشت فلاسکهای کشت سلول هر ۳ روز یکبار تعویض شد و سلولهای غیرچسبنده حذف شدند. پس از ۳ هفته سلولهای چسبیده توسط تریپسین با غلظت ۰/۲۵ درصد از کف فلاسکهای کشت جدا شده و به فلاسکهای جدید منتقل شدند. در این فلاسکها ۱۰۰۰ سلول در هر سانتی‌متر مربع انتخاب شد.

مطالعات تمایزی

تمایز روی سلولهای MSC در پاساژهای سوم انجام گرفت. به منظور تمایز سلولهای MSC به ردهٔ استئوبلاستی از دگزامتازون با غلظت 10^{-8} مولار، بتاگلیسرول فسفات با غلظت ۱۰ میکرومول و آسکوربیک اسید ۲- فسفات با غلظت ۵۰ میکرومول استفاده شد. با گذشت چهارده روز از کشت سلولهای MSC در حضور فاکتورهای فوق و شرایط دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و فشار CO_2 پنج‌درصد، سلولهای تمایز یافته ارزیابی شدند.

روش رنگ‌آمیزی آلکالین فسفاتاز و اندازه‌گیری فعالیت آن

دو روز بعد از کشت سلولها در پلیت ۲۴ خانه‌ای (زمانی که confluent به ۷۰ درصد رسید) به چاهکهای کنترل 10^{-7} مول اتانول و به چاهکهای مورد آزمایش ترکیبات دگزامتازون و بتاگلیسرول فسفات و اسیدآسکوربیک اضافه شد. در روزهای ۴، ۶، ۸، ۱۰ و ۱۲ یک چاهک از چاهکهای کنترل و یک چاهک از چاهکهای مورد آزمایش انتخاب و توسط تریس (Tris) ۰/۱ مول با pH=۸ شستشو داده شد. سپس این سلولها در تریس ۰/۱ مول، تریتون X-۱۰۰ ۰/۲ درصد در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. در زمان اندازه‌گیری آلکالین فسفاتاز سلولهای هر چاهک که در تریتون X-۱۰۰ با غلظت ۰/۲ درصد و تریس ۰/۱ مولار در دمای ۸۰- قرار داشت بلافاصله در حمام آب گرم ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شده و سلولها ذوب شدند و مجدداً در ۸۰- درجه سانتی‌گراد فریز و در حمام آب گرم ۳۷ درجه سانتی‌گراد ذوب شدند (۲ مرتبه). این عمل سبب متلاشی شدن سلول و آزاد شدن آنزیمهای درون سلول می‌شود. میزان آلکالین فسفاتاز در محلول لیز شده سلولی با استفاده از P- نیتروفنیل فسفات دی‌سدیم و سوبسترا شده در ۰/۱ مول گلیسین با pH=۱۰/۵ ارزیابی شد. میزان پروتئین نیز با استفاده از آزمون برادفورد با کاربرد محلول کوماسی بلو و استاندارد BSA[4] ارزیابی شد. فعالیت آنزیم به صورت نانومول از P- نیتروفنیل (ml/mg protein) بیان شده است. هر آزمایش در هر چاهک ۳ بار انجام شد (mean±SD).

1. Iscove's Modified Dulbecco Medium
2. Fetal bovin serum
3. Phosphate buffer saline
4. Bovine Serum Albumin

یافته‌ها

نتایج حاصل از کشت سلولهای تک‌هسته‌ای خون بندناف

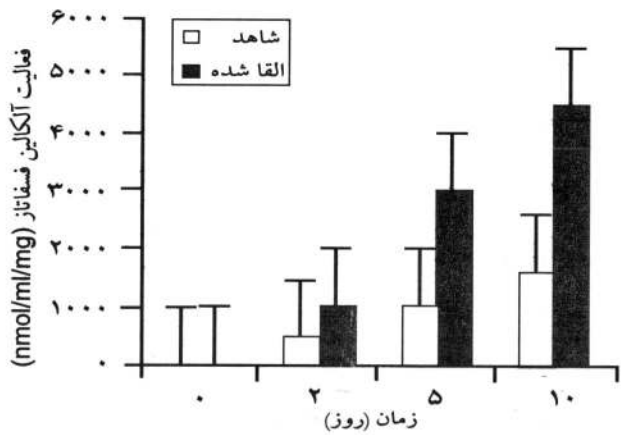
بعد از کشت سلولهای تک‌هسته‌ای خون بندناف با توجه به اینکه هر ۳ روز یکبار تعویض محیط کشت انجام شد و سلولهای غیرچسبنده دور ریخته شدند و با توجه به پاساژهای متعددی که روی سلولهای چسبنده انجام می‌گرفت، تنها سلولهایی که دارای قدرت تکثیر بودند و خاصیت خودتکثیری داشتند باقی مانده و لایه چسبنده را در کف فلاسک کشت سلول ایجاد کردند (شکل ۱). این سلولها کشیده و دوکی شکل بودند و فعالیت آلکالین فسفاتاز آنها منفی بود. همچنین در میزان فعالیت آلکالین فسفاتاز این سلولها در روزهای مختلف کشت سلولی تفاوت زیادی مشاهده نشد.

نتایج حاصل از تمایز سلولهای بنیادی مزانشیمی

سلولهای مزانشیمی بنیادی تهیه شده از کشت سلولهای خون بندناف که در حضور القاء کننده‌های شیمیایی کشت شده بودند، متمایز شده و از حالت دوکی شکل خارج و تبدیل به سلولهای پهن زایده‌دار شدند (شکل ۲). از نظر فعالیت آلکالین فسفاتاز نیز سلولهای متمایز شده دارای فعالیت آلکالین فسفاتاز بوده و در رنگ‌آمیزی آلکالین فسفاتاز به رنگ بنفش کم‌رنگ مشاهده شدند و در رنگ‌آمیزی نیترات نقره نیز ذرات سیاه در سلولهای متمایز شده، مشاهده شد و این نشان دهندهٔ مینرالیزه کلسیم در سلولها و تمایز سلولهای مزانشیمی بنیادی به سلولهای استئوبلاستی است (شکل ۳). در نمودار ۱ افزایش میزان فعالیت آلکالین فسفاتاز در سلولهای متمایز شده در روزهای مختلف حاصل از تأثیر دگزامتازون، بتاگلیسرول فسفات و اسیدآسکوربیک بر سلولهای مزانشیمی بنیادی مشخص شده است.

تأثیر دگزامتازون، بتاگلیسرول فسفات و اسید آسکوربیک بر رشد و تکثیر سلولهای MSC

بعد از ۱۲ روز کشت سلولی و تأثیر مواد فوق بر کشت سلولهای MSC مشاهده شد که سلولهای درمان شده نسبت به سلولهای کنترل دارای قدرت تکثیر کمتری بوده و در این سلولها قدرت تمایز افزایش یافته و سرعت تقسیم و رشد سلولی کاهش یافته است (جدول ۱).



نمودار ۱. مقایسه فعالیت آلکالین فسفاتاز برحسب nmol/ml/mg در روزهای ۱۰، ۵، ۲، ۰ پس از القا در نمونه‌های القا شده و کنترل

جدول ۱: اثر دگزامتازون و بتا گلیسرول فسفات و اسیدآسکوربیک برتعداد سلولهای MSC

کنترل	$۴/۲\pm۰/۲\times۱۰^{5}$
درمان شده	$۱/۹\pm۰/۲۲\times۱۰^{5}$

بحث

سلولهای بنیادی مزانشیمی دارای قدرت تکثیر خودی و قدرت تمایز به رده‌های مزانشیمی هستند. در این مطالعه سلولهای شبه فیبروبلاستی چسبنده که از خون بندناف جدا شد، از لحاظ مورفولوژیکی و ویژگیهای تکثیری و آنالیز ایمونوفنوتیپی بررسی شدند. همچنین قدرت تمایز این سلولها به سلولهای استئوبلاستی مطالعه شد.

توانایی تبدیل شدن این سلولها به سلولهای استخوانساز با تعیین افزایش فعالیت آلکالین فسفاتاز و رسوب کلسیم تأیید شد. این توانایی تمایز سلولهای جداشده از خون بندناف مؤید آنست که خون بندناف نوزاد با ترم کامل دارای سلولهای بنیادی مزانشیمی است.جداسازی این سلولها از خون بندناف نوزاد با ترم کامل قبلا توسط اریکس (Erices) و همکاران [۱۲]، گودوین (Goodwin) و همکاران [۱۳] و لی (Lee) و همکاران [۱۴] تأیید

شـده بـود ولی مـطالعات دیگـری مـانند بـررسیهای وکسـلر (Wexler) و همکاران [۸]، مارشی (Mareschi) و همکاران [۱۰] و یو (Yu) و همکاران [۱۱] بیانگر آن بود که خون بندناف نوزاد فاقد سلولهای بنیادی مزانشیمی است. دلیل ایـن جـواب‌هـای متضاد هنوز مشخص نشده است ولی یک احـتمال آنست کـه چون تعداد این سلولهای بنیادی در خون بندناف انـدک است، شرایط کشت مـختلف و نـحوه کشت سـلول در آزمـایشگاهها می‌تواند سبب از بین رفتن این سلولها شود.

در بین بافتهای مختلف انسانی، مغز استخوان به عنوان منبع اصلی سلولهای بنیادی مزانشیمی در نظر گرفته می‌شود. قدرت و خواص تمایزی سلولهای بنیادی مزانشـیمی مشـتق از مـغز اسـتخوان در حـدود سـه دهـه است کـه مـطالعه شـده است [۱۷،۱۸و۱۹] و همچنین کاربردهای بالینی این سلولها شـروع شده است و برای درمـان نـقصهای اسـتخوانسـازی [۲۰و۲۱]، آسیبهای قلبی [۲۳و۲۲] و سندرم هورلر[۲۴] به‌کارگرفته شـده است. در این مطالعات بالینی بعضی مشکلات نیز وجود دارد که شامل محدودیت در یـافتن HLA یکسـان ،انـتقال بـیماریهای ویروسی و روشهای تهاجمی برای گرفتن سلول از فـرد است. نتایج تحقیق حاضر نشان دادکه سـلولهای بـنیادی مـزانشـیمی جداشده از خون بندناف همانند سلولهای بـنیادی مـزانشـیمی مشتق شده از مغز استخوان دارای قدرت تـمایز بـه سـلولهای استئوبلاست است، بنابراین مـی‌توان پـیشنهاد کـرد کـه خـون بندناف به عنوان منبع جایگزین به جای سلولهای مغز استخوان مورد استفاده قرار گیرد. از این رو روشهای جداسازی سلول از خون بندناف باید توسعه یابد و ممکن است ایـن سـلولها بـه عنوان یک ابزار قوی در درمـان بـیماریها و آسـیبهای بـافتهای پیوندی به‌کار گرفته شود. لازم است قدرت انعطاف پـذیری و تمایز سلولهای بنیادی مزانشیمی خون بندناف و مکانیسمهای مولکولی آن در مطالعات آینده بیشتر مورد توجه قرار گیرد.

تقدیر و تشکر

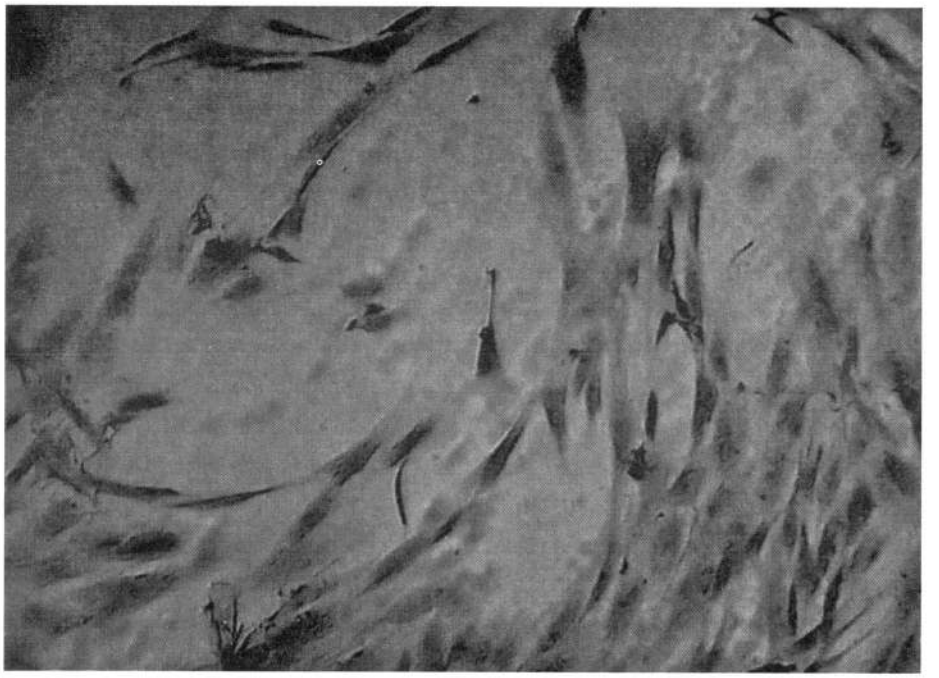
بدینوسیله از همکاری مسئولین بخش زایـمان بـیمارستان مادران، خانم دکتر زنوبی و سرکار خانم ابراهـیمی قـدردانـی و تشکر می‌نماییم.

References

1. **Deans RJ, Moseley AB.** Mesenchymal stem cell: biology and potential use. Exp Hematology 2000; 28: 875-84.
2. **Mingvell JJ, Conget P, Erices A.** Biology and clinical ueilization of mesenchymal progenitor cells. Braz J Med Biol Res 2000; 33: 881-7.
3. **Filvaroff EH, Derynck R.** Induction of myogenesis in mesenchymal cell by myoD depends on their degree of differentiation. Dev Biol 1996; 178: 549.
4. **PIllenger MF, Macka AM, Beck SC, et al.** Multilinineage potential of adult human mesenchymal stem cell. Science 1999; 284: 143-7.
5. **Makino S, Fukuda K, et al.** Cardiomyocytes can be generated from marrow stromal cells, in vitro. J Clin Invest 1999; 103: 697-705.
6. **Toma K, Pittenger MF, Cahill KS.** Human mesenchmal stem cells differentiated to cardiomyocyte phenotype in adult murine heart. Circulaton 2002; 105: 93-8.
7. **Schwartz RE, Reyes M, Koodie L.** Multipotent adult progenetive cell from bone marrow differentiate into Functional hepatocyt like cell. J Clin Inves 2002; 109: 1291-302.
8. **Wexler SA, Donaldson C, Denning-Kendall 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.
9. **Zvaifler NZ, Marinova L, Mutafchieva, Adams C, Edwards CJ, Moss J, et al.** Mesenchymal precursor cells in the blood of normal individuals, Arthritis Res 2000; 2: 477-88.
10. **Mareshci K, Biasin E, Piacibello W, Aglietta M, Madon E, Fagioli F.** Isolation of humanesenchymal stem cells: bone marrow versus umbilical cord blood, Haematological 2001; 86: 1099-100.
11. **Yu M, Xiao Z, Shen L, Li L.** Mid-trimester fetal blood - derived adherent cells share characteristics similar to mesenchymal stem cells but full - term umbilical cord blood does not, Br J Haematol 2004; 124: 666-75.
12. **Erices A, Conget P, Minguell JJ.** Mesenchymal progenitor cells in human umbilical cord blood, Br J

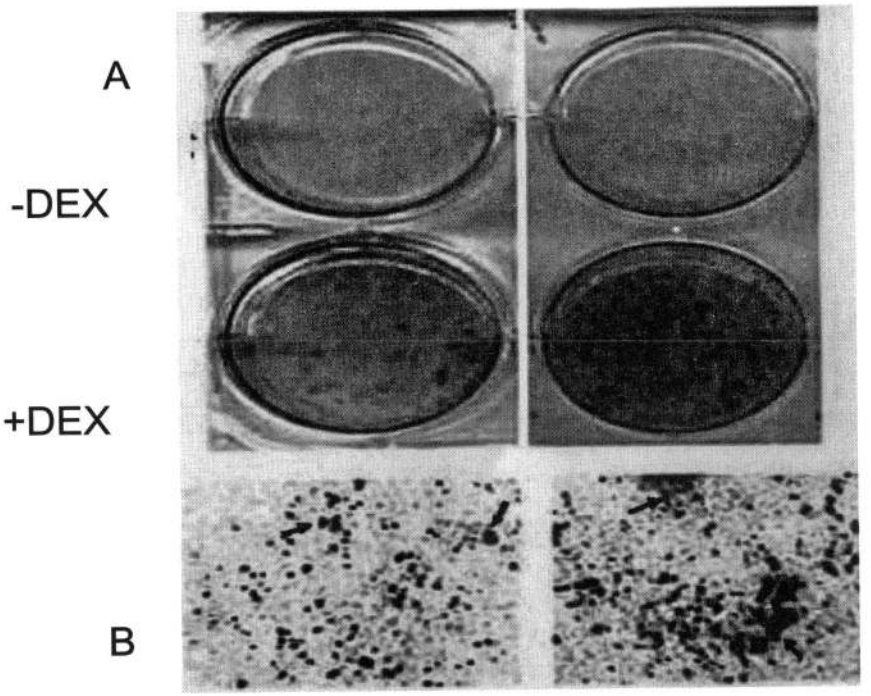
Haematol 2000; 109: 235-42.

13. **Goodwin HS, Bicknese AR, Chien SN, Bogucki BD, Oliver DA, Quinn CO, Wall D.A.** 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.
14. **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.
15. **Romanov YA, Svintsitskaya VA, Smirnov VN.** Searching for alternative sources of postnatal human mesenchymal stem cells: candiated MSC- like cells from umbilical cord blood, Stem Cells 2003; 105-10.
16. **Covas DT, Siufi JLC, Orellana MD.** Isolation and culture of umbilical vein mesenchymal stem cells, Braz J Med Biol Res 2003; 36: 1179-83.
17. **Campagnoli C, Roberts IAG, 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: 2396-402.
18. **Conget PA, Minguell JJ.** Phenotypical and functional properites of human bone marrow mesenchymal progenitor cells, J Cell Physiol 1999; 181: 67-73.
19. **Barry FP, Murphy JM.** Mesenchymal stem cells: clinical applicatons and biological characterization, Int J Biochem cell Biol 2004; 36: 568-84.
20. **Horwitz EM, Gordon PL, Koo WK, Marx JC, Neel MD, McNall RY, Muul L, Hofmann T.** Isolated allogenic bone marrow- derived mesenchymal cells engraft and stimulate grwoth in children with osteogenesis imperfecta: implications for cell therapy of bone, Proc Natl Acad Sci USA 2002; 99: 8932-7.
21. **Chamerlain JR, Schwarze U, Wang PR, Hirata RK, Hankenson KD, et al.** Gene targeting in stem cells from individuals with osteogenesis imperfecta, Science 2003; 303: 1198-201.
22. **Toma C, Pittenger MF, Cahill KS, Byrne BJ, Kessler PD.** Human mesenchymal stem cells differentiate to a cardiomyocte phenotype in the adult murine heart, Circulation 2002; 105: 93-8.
23. **Al-Khaldi A, Al-Sabti H, Galipeau J, Lachapelle K.** Therapeutic angiogenesis using autologous bone marrow stromal cells: improved blood flow in a chronic limb ischemia model. Ann Thorac Surg 2003; 75: 204-9.
24. **Koc ON, Day J, Nieder M, Gerson SL, Lazarus HM, Krivit W.** Allogenic mesenchymal stem cell infusion for treatment of metachromatic leukodystrophy (MLD) and Hurler syndrome (MPS-IH), Bone Marrow Transplant 2002; 20: 215-22.



▲ شکل ۱. سلولهای بنیادی مزانشیمی خون بندناف در سومین پاساژ سلولی. رنگ‌آمیزی: هماتوکسیلین، بزرگنمایی: ۱۰ ×

▼ شکل ۲. سلولهای بنیادی مزانشیمی خون بندناف متمایز شده به سلولهای استوبلاستی. پیکانها نشانگر فعالیت آلکالین فسفاتاز هستند.
رنگ‌آمیزی: الکالین فسفاتاز، بزرگنمایی: ۴۰ ×



شکل ۳. A) کشت سلولهای بنیادی مزانشیمی بندناف در هفته اول و دوم بدون دگزامتازون و در حضور دگزامتازون با رنگ‌آمیزی الکالین فسفاتاز. B) رنگ‌آمیزی نیترات نقره (van kossa) در هفته اول و دوم در حضور دگزامتازون