Original Article

Culture and Expansion of Rat Mesenchymal Stem Cells Using the Serum Prepared from Rat's Peripheral Blood

Eslaminejad M.B., Ph.D.*, Rouhi L., M.Sc., Arabnajafi M., PhD., Baharvand H., Ph.D.
** P.O.Box: 19395-4644, Stem Cell Department, Royan Institute, Tehran, Iran*

Abstract

Purpose: The aim of this study is to evaluate the effects of prepared serum from rat peripheral blood on growth and viability of rat bone marrow-derived mesenchymal stem cells (MSCs) in vitro.

Materials and Methods: Bone marrow cells prepared from rat's tibia and femur central canal were cultured either in medium containing fetal bovin serum (FBS) or rat peripheral blood-derived serum (PBDS) for three successive passages during which viability, growth and proliferation of the cells were evaluated by MTT [3- (4, 5- dimethylthiazol-2-yl)-2, 5- diphernyltetrazolium bromide], colony forming assay, calculation of population doubling number and daily examination of the cell growth for drawing growth curve. Each experiment was performed ten times and the mean values were statistically compared. In this study, third passaged cells were evaluated in terms of their bone and adipocyte differentiation potentials.

Results: Morphologically, the cells cultured with PBDS appeared to be somewhat more spindle than of FBS cells. Comparatively, these cells seemed to have clear cut border than of FBS-cultured cells. According to MTT assay, the cells from PBDS group significantly showed more absorption value than of FBS group indicating that they would be more viable than FBS cells. Furthermore, in this group, more colon were formed and more population doubling number (about twice of FBS cells) occurred ($p<0.004$). Growth curve of two cells revealed further differences; in contrast to FBS, the cell from PBDS group showed no lag phase and their log phase was much more longer than of FBS cells (2 versus 6 days). Third Passaged cells were readily differentiated to bone and adipocyte lineages confirming their mesenchymal stem cell nature.

Conclusion: Taken together, the serum prepared from rat peripheral blood could significantly improve the viability and proliferation potential of the rat MSCs and in this term they could be considered as appropriate substitute for FBS.

Key words: Mesenchymal stem cells, Bone and cartilage differentiation, Peripheral blood-derived serum, FBS, Cell expansion

مقاله تحقیقی

کشت و تکثیر سلولهای بنیادی مزانشیمی موش صحرایی با استفاده از سرم تهیه شده از خون محیطی

محمدرضا باغبان اسلامی نژاد .Ph.D*، لیلا روحی .M.Sc، سید محمود عرب نجفی .Ph.D**، حسین بهاروند .Ph.D***

* گروه سلولهای بنیادی پژوهشکده رویان

** بخش زیست‌شناسی دانشگاه تهران

تاریخ وصول: آبان ماه ۸۵، تاریخ پذیرش: دی ماه ۸۵

چکیده

هدف: بررسی توان سرم تهیه شده از خون محیطی موش صحرایی در پیشبرد رشد و تکثیر سلولهای بنیادی مزانشیمی همان‌گونه در مقایسه با سرم گاوی

مواد و روشها: مغز استخوان از کانال مرکزی استخوانهای درشت نی و ران موش صحرایی خارج شد و در محیط کشت حاوی سرم جنین گاوی (FBS: fetal bovin serum) و سرم تهیه شده از خون محیطی موش صحرایی (PBDS: peripheral blood-derived serum) برای سه پاساژ متوالی کشت شد و در طول این مدت توان زیستی، رشد و تکثیر سلولها، با روش MTT [3- (4, 5- dimethylthiazol-2-yl)-2, 5- diphernyltetrazolium bromide] ، شمارش کلون، محاسبه تعداد دوبله شدن جمعیت سلولی و بررسی رشد روزانه سلول (به منظور ترسیم منحنی رشد) مطالعه شد. هر مطالعه۱۰ بار تکرار شد و میانگین نتایج، مقایسه آماری شد. در مطالعه حاضر برای اطمینان از ماهیت بنیادی- مزانشیمی سلول، از روش تمایز به استخوان و چربی استفاده شد.

یافته‌ها: از لحاظ مورفولوژی سلولهای گروه PBDS در مقایسه با FBS اندکی دوکی تر و با حد و مرز مشخص‌تری ظاهر شدند. بر اساس آزمون MTT، سلولهای گروه PBDS از لحاظ آماری میزان جذب بالایی داشتند. این شاخص نشان می‌دهد که سلولهای این گروه از توان زیستی بالایی برخوردار بودند. به علاوه در این گروه، تعداد کلون بیشتری تشکیل شد و تعداد دوبله شدن جمعیت سلولی در حدود دو برابر ($p<0.004$) بیشتر از گروه FBS بود (۱۷/۱۸ در مقابل ۱۰/٥٤). منحنی رشد ترسیم شده برای دو گروه نیز تفاوتهایی داشت. در گروه PBDS برخلاف FBS فاز lag مشاهده نشد و مرحله رشد لگاریتمی آن شیب بیشتری داشت. براساس منحنی رشد، زمان دوبله شدن جمعیت سلولی در گروه PBDS، ٤٨ ساعت و برای گروه FBS ٦ روز بود. سلولهای پاساژ سوم دو گروه مورد مطالعه به‌راحتی به استخوان و چربی تمایز یافتند که نمایانگر ماهیت بنیادی- مزانشیمی آنها بود.

نتیجه‌گیری: روی‌هم‌رفته می‌توان گفت که استفاده از سرم تهیه شده از خون محیطی موش صحرایی می‌تواند به‌طور مشخص قابلیت حیات و تکثیر سلولهای بنیادی مزانشیمی همان‌گونه را افزایش دهد و از این نظر جایگزین مناسبی برای سرم گاوی است.

کلید واژه‌ها: سلول بنیادی مزانشیمی، تمایز به استخوان و چربی، سرم تهیه شده از خون محیطی، سرم گاوی، تکثیر سلولی

آدرس مکاتبه: تهران، میدان بنی‌هاشم، کوچه حافظ، پژوهشکده رویان،

صندوق پستی: ٤٦٤٤-١٩٣٩٥

Email: bagesla@yahoo.com

مقدمه

سلولهای بنیادی مزانشیمی، سلولهای چند توانی هستند که توانایی تمایز به انواع دودمانهای بافت همبند را دارا می‌باشد [۱]. وجود سلولهای بنیادی مزانشیمی برای اولین بار توسط فرداستاین (Friedenstein) در سال ۱۹٦۵ مطرح شد. این محققین نشان دادند اگر چه اکثریت سلولهای مغز استخوان متعلق به دودمانهای مختلف خون ساز است، با این حال تعداد کمی از سلولهای شبه فیبروبلاستی نیز وجود دارند که با کشت مغز استخوان، به ظرف کشت چسبیده، تشکیل کلونی می‌دهند. این کلونی‌ها، واحد تشکیل‌دهنده کلونی فیبروبلاستی (CFU-f: Colony Forming Unit-Fibroblast) نامیده شدند [۵-۲]. سلولها در CFU-f توانایی تمایز به انواع سلولهای مزانشیمی از قبیل استئوبلاست، کندروسیت، میوبلاست و آدیپوسیت را دارند [۷-٦].

سلولهای فیبروبلاستی مغز استخوان طی سال‌ها به تدریج با اسامی دیگری از قبیل سلولهای داربستی مغز استخوان (MSC: Marrow Stromal Cell)، سلولهای پروژنیتور مغز استخوان (MPC: Marrow progenitor cell)، سلولهای فیبروبلاستی مغز استخوان (MSF: Marrow Stromal Fibroblast) و سلولهای بنیادی مزانشیمی (MSC: Mesenchymal Stem cell) نیز خوانده شده‌اند [۹-۷].

پتانسیل تمایز و نیز توان تکثیر برای مدت طولانی سبب شده است که سلول بنیادی مزانشیمی به یک منبع مناسب در استراتژی‌های ترمیم بافتی، سلول درمانی و مهندسی بافت تبدیل شود [۱۷-۱۰]. تعداد بسیار اندک این سلولها در بدن، تکثیر آنها را پیش از مطالعات بالینی اجتناب‌ناپذیر کرده است. تا سالهای اخیرهمه پروتکل‌های رایج برای کشت آزمایشگاهی MSCs از سرم جنین گاوی (FBS) به عنوان مکمل تغذیه‌ای استفاده می‌کرد. مانع اصلی استفاده بالینی از MSCs به حضور FBS در محیط کشت مربوط می‌شود زیرا این مکمل محیط کشت ممکن است حامل بیماری‌های ویروسی و پریونی باشد [۱۹-۱۸].

سرم محتوی پروتئینها، پلی‌پپتیدها، هورمون‌ها، متابولیت‌ها، مواد غذایی و معدنی است. نگرانی عمده دیگری که در استفاده از FBS وجود دارد این است که پروتئین آن که منشاء گاوی دارد به عنوان یک عامل خارجی بوده و سلولی که در محیط حاوی سرم کشت شده می‌تواند برخی از این پروتئین‌ها را به بدن پیوند شونده منتقل نموده در نتیجه باعث بروز پاسخ‌های ایمنی شود. اخیراً نشان داده شده که $۱۰^۸$ سلول MSCs رشد یافته تحت شرایط استاندارد در محیط حاوی FBS حدود ۳۰-۷ میلی‌گرم پروتئین FBS را حمل می‌کنند [۱۹-۱۸].

به هر حال برای استفاده بالینی از MSCs باید تماس آنها با FBS کاهش یابد. برای حل این مشکلات در سالهای اخیر استفاده از سرم خودی تهیه شده از خون محیطی به عنوان جانشین FBS توصیه شده است، ولی واقع امر این است که در ارتباط با تأثیرات این نوع سرم بر رشد و تکثیر سلول بنیادی مزانشیمی مطالعات اندک بوده و مهمتر اینکه اطلاعات و نتایج به‌دست آمده متناقض است. برخی از محققین گزارش کرده‌اند که سرم اتولوگ در مقایسه با FBS از لحاظ رشد MSCs بهترعمل می‌کند [۲۱-۲۰] درحالی‌که دسته دیگر نشان داده‌اند که سرم اتولوگ از این نظر شبیه FBS است [۱٦، ۱۸ و ۲۲]. بالاخره دسته سوم از دانشمندان مطرح کرده‌اند که از لحاظ رشد و تکثیر سلولی، FBS بهتر از سرم اتولوگ عمل می‌کند [۲۵-۲۳]. در یک مطالعه شهدادفر (Shahdadfar) و همکاران عنوان کردند که از نظر تکثیر سرم اتولوگ بهتر از FBS عمل می‌کند و از لحاظ تمایز FBS بهتر عمل می‌کند [۱۹].

نکته‌ای که وجود دارد این است که در مطالعات فوق بررسی تکثیر و رشد سلولهای مزانشیمی در مدت کوتاهی از دوره کشت و اغلب در کشت اولیه انجام شده است. از طرفی ابزار و روش ارزیابی رشد سلولی در این مطالعات اغلب محدود بوده است برخی از روش سنجش کلون‌زایی و روش

شمارش سلولی استفاده کرده‌اند و برخی دیگر از روش MTT سود برده‌اند. در مطالعه حاضر سلولهای بنیادی مزانشیمی موش صحرایی در سرم تهیه شده از خون محیطی و سرم جنین گاوی برای یک دوره نسبتاً طولانی شامل کشت اولیه و سه پاساژ متوالی کشت شده‌اند و رشد، تکثیر و توان زیستی آنها با روش‌های متعددی نظیر روش MTT، سنجش توان کلون‌زایی، محاسبه تعداد دوبله شدن جمعیت سلولی در طول دوره کشت و رسم منحنی رشد ارزیابی شده است.

مواد و روشها

جداسازی سلولهای مغز استخوان و آماده‌سازی سرم از خون محیطی موش صحرایی

تعداد ۱۰ سر رت، نژاد Wistar، با سن تقریبی ۱۰-۸ هفته به‌وسیله کلروفرم بیهوش شد، استخوانهای فمور و تیبیا جدا شد، بافت نرم اطراف آنها پاک شد و داخل محیط DMEM[1] محتوی ۱۵ درصد FBS، ۱۰۰ واحد بین‌المللی پنی‌سیلین (Gibco, Germany) و ۱۰۰ واحد بین‌المللی استرپتومایسین (Gibco, Germany) قرار گرفت. مغز استخوان از چهار استخوان دراز تیبیا و فمور به روش Flushing جدا شد و در داخل یک لوله ۱۳ میلی لیتری حاوی محیط DMEM، FBS و آنتی بیوتیک قرار گرفت. سلولهای فوق پس از یک بار سانتریفوژ با دور ۱۲۰۰ به مدت ۵ دقیقه، شمارش شد و به شش قسمت مساوی تقسیم شد و در ظروف ٦چاهکی کشت شد بدین صورت که ۳ چاهک محیط حاوی سرم جنین گاوی (FBS) و ۳ چاهک دیگر محیط محتوی سرم تهیه شده از خون محیطی(PBDS) دریافت کرد. برای هر موش کشت جداگانه ای با تکرار مراحل فوق ترتیب داده شد.

٤۸ ساعت پس از آغاز کشت، سلولهای غیرچسبیده با انجام تعویض محیط و شستشو با PBS^{+} دور ریخته شد و پس از آن، محیط سلولها، ٤ روز یک بار تعویض شد. ۱۰ روز پس از آغاز کشت، ۹۰-۸۰ درصد کف ظرف کشت پر از سلول شد که در این زمان، اولین پاساژ سلولی انجام گرفت. بدین ترتیب که سلولها تریپسینه شدند و مورد شمارش قرار گرفتند. از ٤×10^{٦} سلول در حدود ٢×10^{٦} سلول بین دو ظرف ۲۵ سانتیمتر مربع تقسیم گردید (پاساژ اول) و باقیمانده سلولهای کشت اولیه ، به منظور بررسی برخی شاخص‌های رشد از قبیل توان کلونزایی، محاسبه تعداد دو برابر شدگی جمعیت سلولی، بررسی توان زیستی با روش MTT و ترسیم منحنی رشد استفاده شد. کشت سلولی تا پاساژ سوم ادامه یافت و حاصل هر مرحله از کشت از لحاظ برخی شاخص‌های رشد و تکثیر سلول بررسی شدند.

به منظور تهیه سرم، پس از اینکه رتها بیهوش شدند قفسه سینه آنها باز شده و کل خون توسط سرنگ ۲۰ میلی‌لیتر که از طریق دیواره قلبی وارد آن شده بود، آسپیره شد و دو ساعت در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد تا خون لخته شود. خون لخته شده با دورrpm ۲۵۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ شد که نتیجه آن جدا شدن سرم از لخته بود. سرم حاصل به مدت ۳۰ دقیقه در ٥٦ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد و سپس در ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد تا در کشت سلول به محیط کشت اضافه شود.

تست کلون زایی

برای بررسی توان کلون زایی، سلولهای کشت اولیه تریپسینه شد و با تراکم $1\ cell/cm^2$ در دیش ۱۰۰ mm^2 ، به مدت ١٤ روز کشت شد. در پایان این مدت، کشت سلول دو بار با محلول PBS شسته شد و با رنگ کریستال ویولت به مدت ۵ دقیقه رنگ‌آمیزی گردید. کلون‌های تشکیل شده در دو گروه FBS و PBDS در زیر میکروسکوپ نوری مشاهده و شمارش شد. این کار برای ده موش بطور جداگانه انجام شد و میانگین تعداد کلون برای سلولهای دو گروه PBDS و FBS محاسبه و با آزمون آماری T-test مقایسه شد.

1. Dulbecco Modified Eagles Medium

محاسبه تعداد دو برابر شدگی جمعیت سلول

[PDN: Population Doubling Number]

برای این منظور، تعداد سلولها در آغاز و پایان دوره هر مرحله از کشت (کشت اولیه، پاساژ اول، دوم، و سوم) محاسبه شد و از فرمول: *۳/۳۱ (تعداد سلول در آغاز کشت / تعداد سلول در پایان کشت) log*، تعداد دوبرابر شدگی جمعیت سلولی (PDN) محاسبه شد. PDN کل به صورت مجموع PDN های کشت اولیه، پاساژ اول، دوم و سوم در نظر گرفته شد. این بررسی در ۱۰ موش به‌طور جداگانه انجام گرفت و میانگین PDN کل دو گروه PBDS و FBS با آزمون T-test مقایسه شد.

روش MTT (Methyl Tetrazolium)

این روش به منظور ارزیابی توان زیستی سلولهای دو گروه استفاده شد. اساس این روش بر تشکیل کریستال‌های بنفش رنگ فورامازون دراثر عملکرد سیستم سوکسینات- تترازولیوم ردوکتاز متعلق به زنجیره تنفسی میتوکندریایی، بر روی نمکهای تترازولیوم MTT استوار است. در این روش ابتدا یک منحنی استاندارد رسم شد تا رابطه بین سیگنال بهینه (OD در طول موج ۶۳۰-۵۴۰ نانومتر) و تعداد سلولها یافت شد (R^2= 0.9466) که در یک محدوده $10^4 \times 8$-10^4 سلول / چاهک قرار داشت.

برای انجام روش MTT، 10^4 سلول، به ظروف ۹۶ چاهکی محتوی ۱۰۰ µl محیط حاوی ۱۰ درصد FBS یا ۱۰ درصد PBDS اضافه شد و به مدت ۶ روز در شرایط ۳۷ درجه سانتی‌گراد و CO_2 ۵ درصد انکوبه شد و در تمام این مدت به‌طور روزانه (روز صفر، اول، دوم، سوم، چهارم، پنجم و ششم) در هفت نوبت، از لحاظ روش MTT ارزیابی شد، بدین ترتیب که در هر مرحله ذکر شده به هر چاهک ۲۰µl محلول زرد رنگ MTT (۰/۵ میلی‌گرم در لیتر) (Sigma. Germany) اضافه شد و کشت به مدت ۲-۱ ساعت در ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. سپس محیط رویی سلولها تخلیه شد و ۲۰۰µl دی متیل سولفوکساید (Merk, Germany) اضافه شد تا کریستالهای تشکیل شده حل شوند (دور از نور مستقیم). سپس جذب چاهک به‌وسیله دستگاه ELISA Reader خوانده شد. این روش برای هر مرحله از کشت (کشت اولیه، پاساژ اول، دوم و سوم) بطور جداگانه انجام شد و برای ۱۰ موش مورد استفاده تکرار شد. برای مقایسه بهتر سلولهای دو گروه PBDS و FBS، میانگین جذب در روز ۶ هر مرحله کشت برای ۱۰ بار تکرار هر گروه محاسبه شد و با میانگین مشابه از گروه دیگر با آزمون T-test مقایسه شد.

منحنی رشد

برای رسم منحنی رشد، ۵۰۰۰۰ سلول حاصل از کشت اولیه و پاساژ ۱-۳ در پلیت ۶ چاهکی کشت شد و به‌طور روزانه تا ۷ روز (زمان confluence) تعداد آنها شمارش شده، منحنی رشد ترسیم شد.

تمایز به استخوان و چربی

برای اطمینان از ماهیت مزانشیمی سلولهای مورد بررسی در این مطالعه از روش تمایز به استخوان و چربی استفاده شد. برای این منظور 10^5 سلول از پاساژ ۳ در ظروف شش چاهکی در محیط حاوی FBS و PBDS ۱۵ درصد کشت شد و پس از اینکه کف ظرف پر شد، محیط سلولها با محیط تمایز به استخوان محتوی ۵۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر اسکوربیک اسید

۳- فسفات، ۱۰ نانومولار دگزامتازون و ۱۰ میلی مولار بتا- گلیسرول فسفات (Sigma, USA) یا چربی محتوی ۵ میکروگرم در میلی‌لیتر اسکوربیک ۳- فسفات، ۱۰۰ نانومولار دگزامتازون و ۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر ایندومتاسین (Sigma, USA) جایگزین شد. کشت تمایز به مدت سه هفته نگهداری و در پایان این مدت، وقوع تمایز با روش‌های هیستوشیمی و RT-PCR ارزیابی شد.

رنگ‌آمیزی آلیزارین رد

ابتدا لایه سلولی به‌وسیله PBS شسته شده و با متانول (Merk, Germany) به مدت ۱۰ دقیقه تثبیت شد سپس با آلیزارین رد (۱ درصد در آب آمونیاکی ۲۵ درصد) (Sigma, USA) به مدت ۲ دقیقه رنگ شد در ادامه سلولها با آب مقطر شسته شد.

رنگ‌آمیزی اویل رد

سلولها به مدت ۱ ساعت با فورمالین ٤ درصد فیکس شدند و سپس با الکل ۷۰ درصد شسته و به مدت ۱۵-۱۰ دقیقه با رنگ اویل رد (۰/۵ درصد در ۹۹ درصد ایزوپروپانول)، (Sigma, USA) رنگ‌آمیزی شد و در انتها محلول رنگی خارج شد و سلولها، سه بار با الکل ۷۰ درصد شسته شدند.

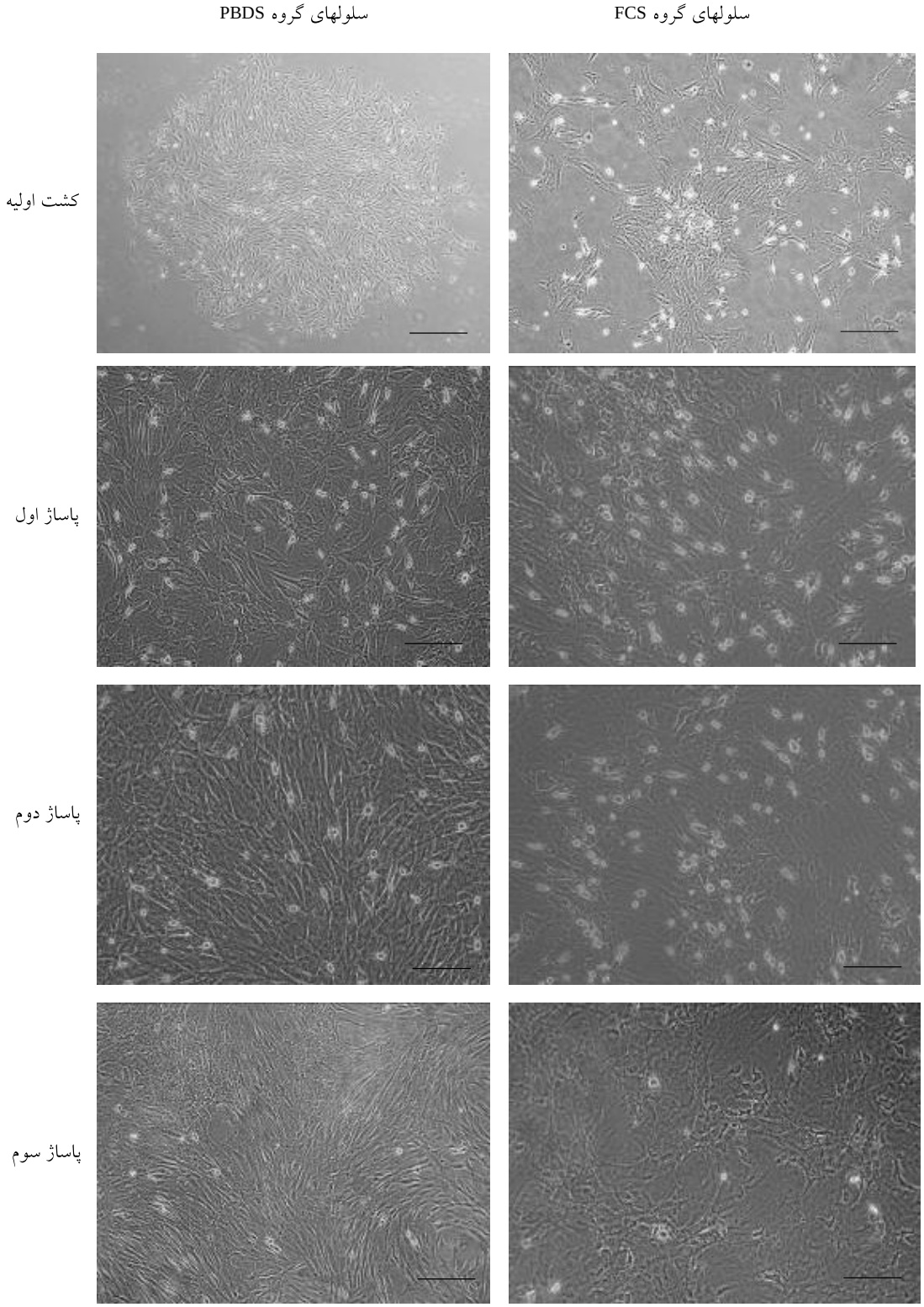
آنالیز RT-PCR

سلولها در روز ۲۱ از لحاظ بیان ژنهای استخوانی نظیر استئوکلسین، استئوپونتین و آلکالین فسفاتاز (ALP) و ژنهای چربی از قبیل C/EBP-alpha, PPAR-alpha, PPAR-gama بررسی شدند (جدول ۱). برای این منظور RNA کل سلولهای مورد نظربا استفاده از RNX- Plus (Cinagen, Tehran) و مطابق با پروتکل این شرکت جداسازی شد. سپس cDNA تک زنجیره‌ای برای RT-PCR با استفاده از پرایمر oligo(dt) و آنزیم ترانسکریپتاز معکوس [Revert Aid First Strand cDNA synthesis Kit(K1622 , Fermentas , EU)] تهیه شد. در ادامه واکنش PCR در دمای ۹٤ درجه سانتیگراد به مدت ۵ دقیقه، در دمای ۹٤ درجه سانتیگراد به مدت ٤۵ ثانیه، دمای Annealing به مدت ٤۵ ثانیه، دمای ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ٤۵ ثانیه و دمای ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ۱۰ دقیقه برای تکثیر نهایی و در ۳۵ سیکل انجام شد. در پایان محصول PCR درون چاهکهای ژل ۱/۷ درصد آگارز ریخته شده و پس از الکتروفورز با رنگ اتیدیوم بروماید رنگ‌آمیزی و سپس ارزیابی شد.

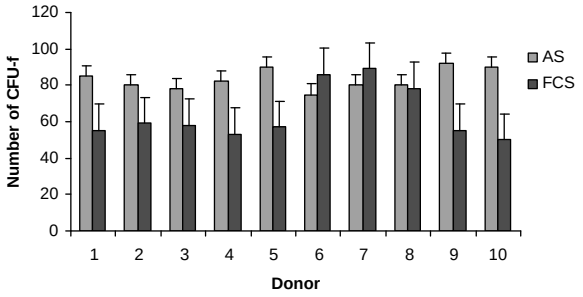
یافته‌ها

کشت سلول

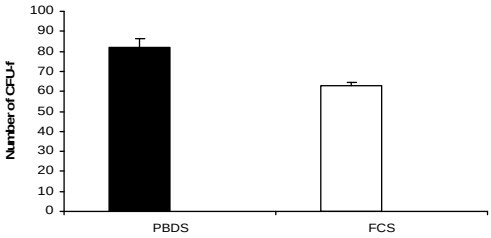
در کشت اولیه گروه PBDS، کلون‌ها که متشکل از سلولهای کشیده و دوکی بودند، درشت‌تر بود درحالی‌که در گروه FBS کلون‌ها کوچک و متعدد بودند و با هم ارتباط داشتند. در گروه PBDS، تعداد سلولهای ریز سوار بر کلون‌ها (احتمالاً سلولهای خونی) که در نمای میکروسکوپی روشن‌تر ظاهر شدند، اندک بود. در پاساژ اول، دوم و سوم، سلولهای کشت شده در محیط محتوی FBS در مقایسه با سلولهای کشت شده در سرم رت، اندکی پهن‌تر به نظر رسیدند درحالی‌که سلولهای گروه PBDS دوکی‌تر و با مرز مشخص‌تری بودند (شکل ۱). نکته جالب دیگر این بود که پاسخ سلولهای دو گروهFBS و PBDS نسبت به تریپسین (در زمان انجام پاساژ سلولی) متفاوت بود. به‌طوری‌که سلولهای گروه PBDS در حضور تریپسین خیلی سریعتر و در طی متوسط ۹۰ ثانیه از سطح ظرف کشت جدا شدند، درحالی‌که این میانگین زمانی برای سلولهای گروه FBS حدود ۱۸۰ ثانیه بود.

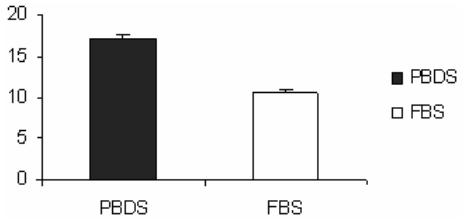


شکل ۱. کشت اولیه و سه پاساژ متوالی سلولهای کشت شده در PBDS و FBS . در کشت اولیه سلولهای PBDS ، بر خلاف FBS ، کلون بزرگی تشکیل داده است. سلولهای گروه PBDS از لحاظ مورفولوژی دوکی‌تر بوده و در مقایسه با گروه FBS حد و مرز بین سلولی مشخص‌تر است (بار: ۱۰۰۰ میکرومتر).



مقایسه کلون زایی در ۱۰ موش مختلف





مقایسه میانگین دوبله شدگی جمعیت سلولی در دو گروه

شکل ۲. نمودار مربوط به توان کلون‌زایی و تعداد دو برابر شدگی جمعیتی در سلولهای دو گروه PBDS و FBS A) از ده موش مورد مطالعه در دو تا، تعداد کلون‌ها در گروه FBS بیش از گروه PBDS بود درحالی‌که در ۸ نمونه باقیمانده تعداد کلون‌ها در گروه PBDS بیش از گروه FBS بود.B) در مجموع توان کلون‌زایی در گروه PBDS به‌طور معنی دار بیش از FBS بود.C) در سلولهای گروه PBDS ، تعداد دو برابر شدن جمعیت سلولی در حدود دو برابر ($p<0.004$) بیشتر از گروه FBS بود.

کلون‌زایی

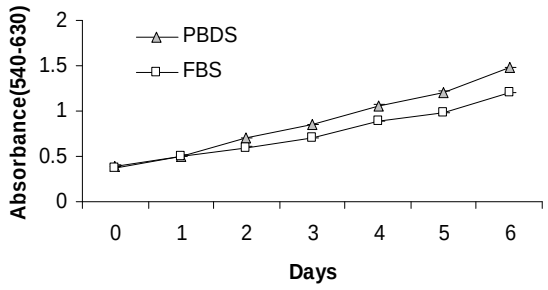
تعداد کلون‌ها در نمونه‌های مختلف متفاوت بود بطوریکه در دو تا از نمونه‌ها، تعداد کلون‌ها در گروه FBS بیش از گروه PBDS بود در حالیکه در ۸ نمونه باقیمانده تعداد کلون‌ها در گروه PBDS بیش از گروه FBS بود (شکل ۲). در مجموع میانگین کلون‌ها درگروه PBDS (۸۲/۲ کلون) بطورمعنی‌داری بیش از گروه FBS (٦٣/١ کلون) بود ($p< 0.005$).

دو برابر شدگی جمعیت

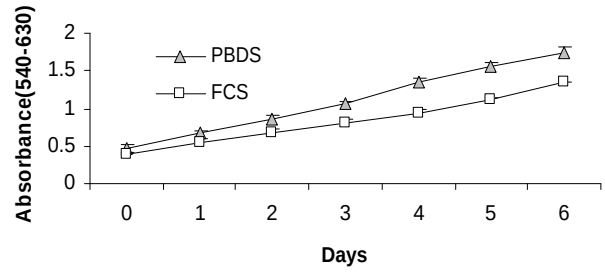
براساس نتایج بدست آمده جمعیت سلولهای کشت شده در PBDS درطول دوره کشت (کشت اولیه، پاساژ اول، دوم و سوم) بطور متوسط ۱۷/۱۸۸ بار دوبله شد درحالی‌که در گروه FBS، سلولها ۱۰/٥٤٩ بار دوبله شدند و دو گروه از این نظر تفاوت آماری ($p<0.004$) داشتند (شکل۲).

روش MTT

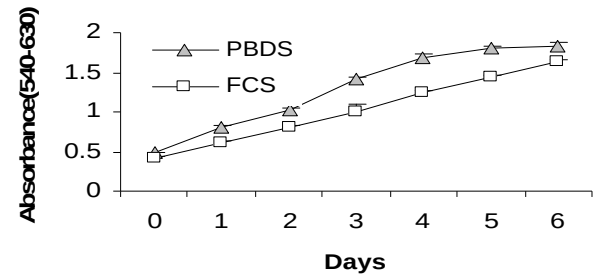
سلولهای رشد یافته در گروه PBDS در تمام مراحل کشت و در تمام روزهای مورد بررسی، میزان جذب بالاتری در مقایسه با سلولهای گروه FBS داشتند. این قضیه در کشت اولیه و سه پاساژ مورد مطالعه کاملاً مشهود بود (شکل ۳)، به‌طوری‌که میانگین جذب در روز ٦ کشت اولیه برای گروه PBDS ١/٤٧ در برابر ١/٢٠ برای FBS بود و این تفاوت از لحاظ آماری معنی دار بود ($p< 0.004$). برای پاساژ اول میزان جذب گروه PBDS ١/٧٣ در مقابل ١/٣٤ و پاساژ دوم ١/٨٢ در مقابل ١/٦٤ و بالاخره پاساژ سوم ١/٨٩ در مقابل ١/٧٧ بود. تمام این تفاوتها با $p< 0.004$ معنی‌دار بود.



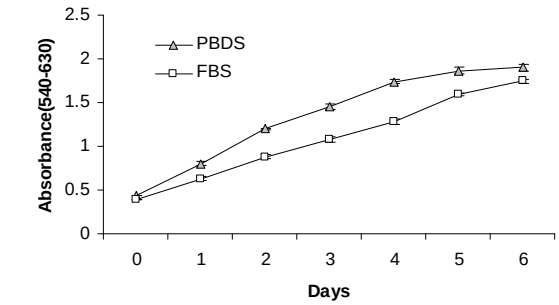
کشت اولیه



پاساژ اول

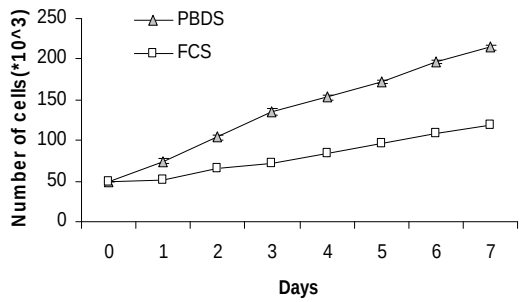


پاساژ دوم

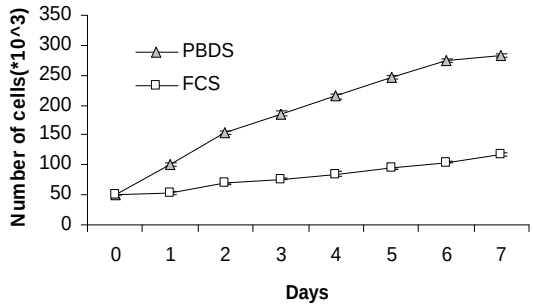


پاساژ سوم

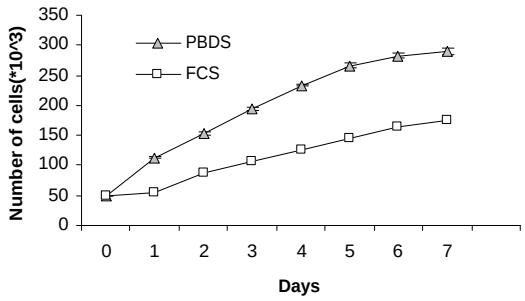
شکل ۳. نمودار روش MTT: در مجموع، سلولهای گروه PBDS در تمام مراحل کشت از لحاظ آماری میزان جذب بالایی داشتند. این شاخص نشان می‌دهد که سلولهای این گروه از توان زیستی بالایی برخوردار بودند.



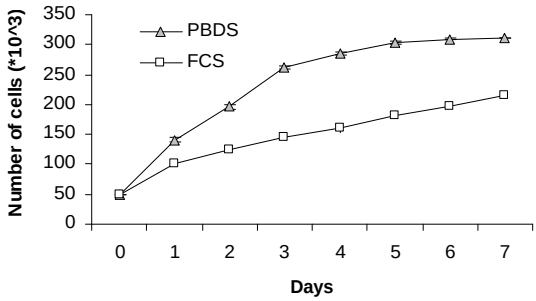
کشت اولیه



پاساژ اول



پاساژ دوم



شکل۴. منحنی رشد. در گروه PBDS برخلاف FBS فاز lag مشاهده نشد و مرحله رشد لگاریتمی آن طولانی‌تر از FBS بود که نشان‌دهنده توان تکثیری بالای سلولهای PBDS است.

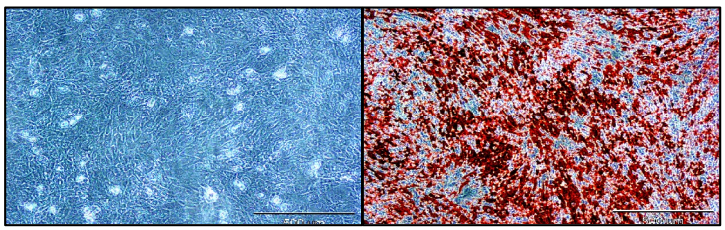
منحنی رشد

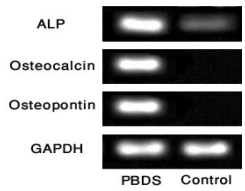
بررسی رشد روزانه سلولها طی هفت روز در ۱۰ نمونه در کشت اولیه، پاساژ اول، دوم و سوم نشان داد که میزان رشد سلولها در گروه PBDS نسبت به گروه FBS در تمام طول دوره کشت بیشتر است. براساس منحنی رشد (شکل ٤) فاز lag در گروه PBDS وجود نداشت درحالی‌که در گروه FBSتا پاساژ سوم فاز lag یک روزه مشاهده شد. فاز log در همه نمونه‌ها در گروه PBDS نسبت به گروه FBS طولانی‌تر بوده و شیب بیشتری داشت.

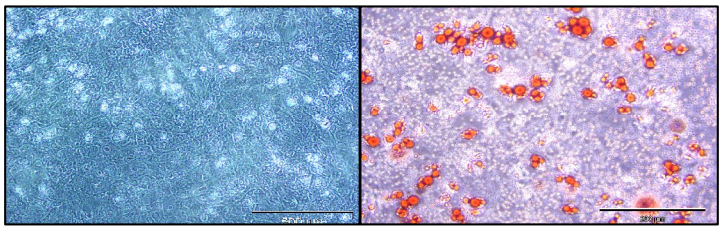
براساس منحنی رشد، Doubling Time (DT) سلولها در گروه PBDS در کشت اولیه ٤۸ ساعت و در FBS شش روز طول کشید DT در پاساژ یک و دو درگروه PBDS ۲٤ ساعت و در گروه FBS در پاساژ یک نیز ٦ روز ولی در پاساژ دو ۷۲ ساعت طول کشید و در پاساژ سه DT گروه PBDS کمتر از ۲٤ ساعت و در گروه FBS ۲٤ ساعت طول کشید.

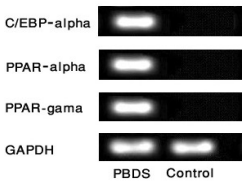
تمایز به استخوان و چربی

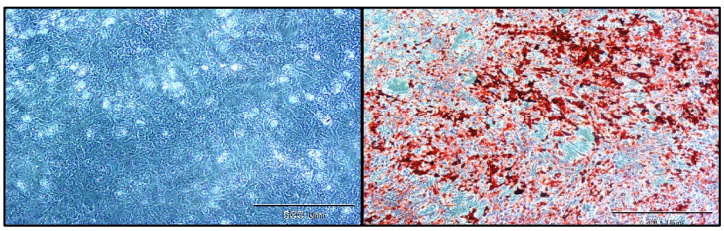
سلولهای پاساژ سوم از هر دو گروه که به مدت سه هفته در محیط استخوان ساز قرار گرفته بودند با رنگ‌آمیزی اختصاصی آلیزارین رد به رنگ قرمز درآمدند که ناشی از معدنی شدن ماتریکس ترشح شده از سلولها بود همچنین بررسی‌های RT-PCR نشان داد که ژن‌های مارکر استخوان در سلولهای تمایز یافته هر دو گروه به خوبی بیان شده که البته ژن ALP در گروه کنترل نیز مقداری بیان داشته است (شکل ۵)، همچنین پس ازسه هفته تمایز درمحیط آدیپوژنیک، رنگ‌آمیزی اویل رد نشان داد که قطرات چربی در سیتوپلاسم سلولها تجمع یافته و آنالیز RT-PCR حاکی از بیان ژنهای شاخص چربی بود (شکل ۵).

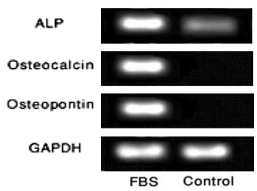

Bone Differentiation-PBDS cells

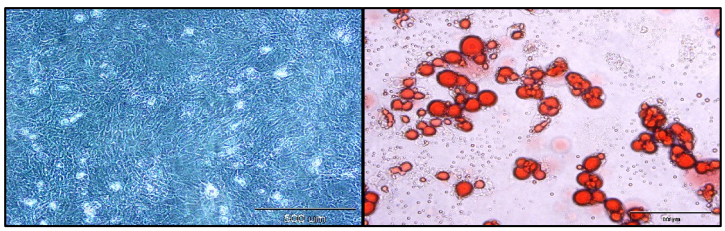


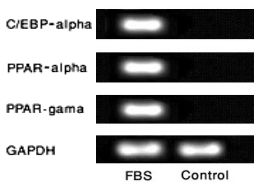

Adipocyte Differentiation-PBDS cells




Bone Differentiation-FBS cells




Adipocyte Differentiation-FBS cells



شکل ۵: تمایز سلولهای کشت شده در PBDS و FBS . سلولهای هر دو گروه توانستند به استخون و چربی تمایز یابند (ستون راست) که نمایانگر ماهیت مزانشیمی ـ بنیادی آنها بود (ستون چپ: گروه کنترل). بار برابر ۵۰۰ میکرومتر است

بحث

در مطالعه حاضر سلولهای مزانشیمی مغز استخوان موش صحرایی در محیط‌های حاوی سرم تهیه شده از خون محیطی موش صحرایی (PBDS) و سرم جنینی گاو (FBS) کشت شد و شاخص‌های تکثیر سلولی در کشت اولیه و سه پاساژ متوالی بررسی شد. نتایج ما بیانگر برتری PBDS در تمام طول دوره کشت بود. این نتایج تائیدی بر این نکته است که کشت سلولهای مزانشیمی بدون استفاده از سرم گاوی امکان‌پذیر بوده و از این روش می‌توان سلولهای لازم برای پیوند درمانی را تکثیر نمود.

یکی از محدودیت‌های طرح حاضر، تهیه سرم اتولوگ به میزان کافی برای انجام کشت تا پاساژ سوم بود. با توجه به میزان کم خون محیطی موش صحرایی، میزان سرم تهیه شده کافی برای انجام کشت سلول تا سه پاساژ متوالی نبود. بنابراین برای عملی کردن مطالعه حاضر، سرم‌های تهیه شده از خون محیطی چندین موش صحرایی با هم مخلوط شد (سرم آلولوگ) و به عنوان افزودنی محیط کشت استفاده شد. استفاده از این سرم به‌طور قابل ملاحظه‌ای شاخص‌های رشد و تکثیر سلول بنیادی مزانشیمی را بهبود بخشید. با توجه به این نتایج می‌توان انتظار داشت که سرم اتولوگ نیز بتواند شاخص‌های تکثیر سلول بنیادی مزانشیمی را بهبود بخشد؛ اگرچه خواص سرم بسته به محتویات فاکتورهای رشد آن از موردی به مورد دیگر متفاوت است. دلیل این تفاوت این است که محتویات پروتئینی ازجمله فاکتورهای رشد سرم بستگی به وضعیت خون‌دهنده (donor) دارد که از زمانی به زمان دیگر متفاوت است، به‌طوری‌که حتی دو Batch متفاوت از FBS که از خون گاوهای متفاوت تهیه شده یکسان عمل نمی کنند.

با توجه به اینکه، برای سلول بنیادی مزانشیمی شاخص منحصر به فرد معرفی نشده، استاندارد طلایی برای اثبات آنها، بررسی و نشان دادن پتانسیل تمایزی آنها به رده‌های اسکلتی است.از این روش محققین پیشین نیز استفاده کرده‌اند [۳۳-۲٦]. در تحقیق حاضر نیز از این روش برای ارزیابی ماهیت بنیادی – مزانشیمی سلولهای مورد مطالعه استفاده شد، بدین ترتیب که سلولهای پاساژ سوم سه هفته در معرض محیط‌های القاءکننده استخوان و چربی قرار گرفتند و ارزیابی‌های انجام شده (رنگ‌آمیزی اختصاصی و آنالیز RT-PCR) تمایز آنها را تائید کرد. بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که سلولهای مورد مطالعه ماهیت بنیادی مزانشیمی داشتند.

یافته‌های تحقیق حاضر بیانگر مورفولوژی بهتر سلولهای گروه PBDS بود. درکشت سلولهای‌گروه FBS، علاوه بر سلولهای دوکی، تعدادی سلول با مورفولوژی پهن و چند ضلعی نیز مشاهده شد، درحالی‌که کشت سلول در گروه PBDS، از این نظر هوموژن تر بوده و اغلب سلولها دوکی بودند. به علاوه، بین سلولهای گروه FBS، مرزمشخصی وجود نداشت درحالی‌که سلولهای‌گروه PBDS حدود مشخص‌تری داشتند. این یافته، با مشاهدات نوربرت (Norbert) و همکاران و شهدادفر (Shahdadfar) و همکاران منافات دارد. آنها در مطالعه‌ای، سلولهای مزانشیمی انسانی کشت یافته در حضور سرم گاوی و سرم اتولوگ انسانی را از نظر مورفولوژی مشابه گزارش کردند [۱۹ و۲۰]. باید توجه کرد که یکی از مشخصه‌های سلولهای بنیادی مزانشیمی، مورفولوژی دوکی شکل آنهاست و تفاوت مورفولوژیکی بین دو گروه مورد مطالعه ما چنین القا می‌کند که کشت سلولی در گروه PBDS از لحاظ حضور سلولهای بنیادی مزانشیمی خالص‌تر از گروه FBS بود که این خود گواهی بر برتری PBDS است.

از یافته‌های جالب تحقیق حاضر، پاسخ متفاوت دو گروه سلول به تریپسین بود درحالی‌که سلولهای گروه PBDS در هنگام پاساژ سلولی به سرعت در پاسخ به تریپسین از سطح ظرف کشت کنده می‌شدند، سلولهای گروه FBS به‌راحتی در اثر تریپسین از سطح ظرف کشت جدا نمی‌شدند. البته این رفتار متفاوت در قبال تریپسنیه شدن باید توجیه منطقی داشته باشد. شاید مورفولوژی متفاوت دو گروه سلول دلیل این این امر باشد باتوجه به شکل فیبروبلاستی سلولهای گروه PBDS

که سطح مقطع کوچکتری در مقایسه با سلولهای نسبتاً پهن گروه FBS دارند و درنتیجه، در مقایسه، اتصال سست‌تری با سطح ظرف کشت ایجاد می‌کنند دلیل این رفتار متفاوت باشد.

با توجه به اینکه یکی از ویژگی‌های سلول بنیادی مزانشیمی، توان کلونی زایی آنهاست، محققین اغلب از این خاصیت سلول استفاده کرده و قدرت تکثیری سلول را مورد ارزیابی قرار می‌دهند؛ ولی واقعیت امر این است که روش کلونی زایی، سنجش قابل اعتماد و دقیقی برای بررسی رشد سلول مزانشیمی نیست زیرا اولا فرآیند تهیه مغز استخوان و جمعیت سلولی آن در هر فرد ممکن است در تعداد کلونی‌ها مؤثر باشد و ثانیاً از طرفی، در این روش تعداد کلونی‌ها ملاک ارزیابی بوده و سایز آنها (به عبارتی تعداد سلول هر کلون) که مستقیما با تکثیر سلول در ارتباط است، مد نظر قرار نمی‌گیرد. به همین دلیل، در مطالعه حاضر، علاوه بر این روش، تکثیر سلولی را با روش‌های دیگری نیز ازقبیل روش MTT، محاسبه PDN و ترسیم منحنی رشد بیشتر ارزیابی شد

نتایج سنجش کلونی‌زایی نشان داد که در دو تا از نمونه‌ها، تعداد کلون‌ها در گروه FBS بیش از گروه PBDS است درحالی‌که در ۸ نمونه باقیمانده تعداد کلون‌ها در گروه PBDS بیش ازگروه FBS است که از این نظر یافته‌های ما با یافته‌های محققین پیشین همخوان دارد. یاماموتو (Yamamoto) و همکارانش نشان داد که تعداد کلون‌ها در سرم FBS در چهار نمونه انسانی نسبت به سرم اتولوگ بیشتر است و در چهار نمونه دیگر تعداد کلون‌ها در سرم اتولوگ بیشتر است و در دو نمونه باقیمانده این تعداد در دو گروه یکسان است [۱٦]. شاید وجود این تفاوت‌ها تاییدی بر این مدعا باشد که این روش، سنجش قابل اعتماد و دقیقی برای بررسی رشد سلول بنیادی مزانشیمی نیست.

روش MTT که به‌عنوان شاخص توان زیستی (Viability) سلول انتخاب شده بود، نشان داد که در همه نمونه‌ها ودر همه پاساژها، سلولهای گروه PBDS افزایش جذب بیشتری در مقایسه با سلولهای گروه FBS دارند. افزایش جذب می‌تواند به دلیل زیاد بودن تعداد سلول زنده و یا به علت افزایش عملکرد آنزیم‌های دخیل در این واکنش اتفاق افتد که دلیلی بر تکثیر بالا و یا قدرت حیات بالای سلولهای مورد مطالعه است که از این نظر، درمطالعه ما، گروه سرم رتی بهتر از گروه FBS ظاهر شد و این یافته ما با نتایج کوبایاشی (Kobayashi) و همکاران که نشان دادند محیط محتوی سرم اتولوگ از لحاظ روشMTT ضعیف‌تر از محیط حاویFBS عمل می‌کنند، متفاوت است [۲۱].

از شاخص‌های دیگری که نشان‌دهنده رشد بهتر سلولهای گروه PBDS در مقایسه با سلولهای FBS بود، میزان دو برابر شدگی جمعیت سلولی (PDN) در طول کشت بود بر اساس نتایج تحقیق حاضر جمعیت سلولهای گروه PBDS به تعداد تقریباً دو برابر سلولهای گروه FBS در طول مدت کشت (کشت اولیه تا پاساژ سوم) دوبله شد. زمان دو برابر شدن برای سلول PBDS دو روز و برای گروه PBS ٦ روز بود که نشان‌دهنده سرعت بالای تکثیر سلولی در گروه PBDS است. بعلاوه در گروه PBDS فاز Lag وجود نداشت و فاز Log طولانی‌تر از سلولهای گروه PCS بود. این داده ها همه حکایت از این دارد که سرم رتی از لحاظ حمایت از رشد و تکثیر سلول بنیادی مزانشیمی نسبت به سرم گاوی برتر است. با توجه به این مطلب به نظر می‌رسد که استفاده از PBDS می‌تواند جایگزین مناسبی برای FBS باشد. این افزودنی محیط کشت ضمن اینکه رشد و تکثیر سلولها را بهتر حمایت می‌کند، با توجه به منبع تهیه آن مشکلاتی از قبیل انتقال پاتوژن و تحریک سیستم ایمنی را نخواهد داشت.

روی هم رفته می‌توان نتیجه گرفت که سرم تهیه شده از خون محیطی موش صحرایی (PBDS)، در زمان کشت سلولهای مزانشیمی مغز استخوان همان‌گونه، ازلحاظ حمایت از رشد و تکثیر سلولی بهتر عمل می‌کند به‌طوری‌که برخی شاخص‌های رشد و تکثیر از قبیل میزان کلون‌زایی، توان زیستی، تعداد دوبله شدن جمعیتی و طولانی شدن مرحله لگاریتمی تکثیر در منحنی رشد بهبود می‌یابد. به نظر می‌رسد استفاده از این افزودنی محیط کشت می‌تواند جایگزین مناسبی برای سرم گاوی محسوب شود.

References

1. **Sekiya I, Larson BL, Smith JR, Pochampally R, Cui JG, Prockop DJ.** Expansion of human adult stem cells from bone marrow stroma: condition that maximizes the yields of early progenitors and evaluate their quality. Stem Cells 2002; 20: 530-41.
2. **Friedenstein AJ** Piatetzky-Shapiro II, Petrakova KV. Osteogenesis in transplant of bone marrow cells. J Emberyol Exp Morphol 1966; 16: 381-90.
3. **Friedenstein, AJ, Chailakhjan, RK, Lalykina, K.S.** The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells. Cell Tissue Kinet 1970; 3: 393-403.
4. **Friedenstein, AJ, Chailakhyan, RK, Latsinik, NV, Panansyuk, AF, Keiliss–Borok, I.V**. Stromal cells responsible for transferring the microenvironment of the hematopoietic tissues. Cloning in vitro and retransplantation in vivo. Transplantation 1974a; 17: 331-40.
5. **Friedenstein AJ, Deriglasora UF, Kulagina NN.** Precursors for fibroblasts in different populations of hematopoietic cells as detected by the in vitro colony assay methods. Exp Hematol 1974b; 2: 83-92.
6. **Bruder SP, Jaiswal N, Haynesworth SE.** Growth kinetics, self renewal and the osteogenicpotential of purified human mesenchymal stem cells during extensive subcultiration and following cryopreservation, J. Cell. Biochem. 1997; 64: 278-94.
7. **Prochop DJ.** Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissue, Science, 1997,276: 71-4.
8. **Conget PA, Minguell JJ.** Phenotypical and functional properties of human bone marrowmesenchymal progenitor cells. J Cell physiol. 1999, 181: 67-73.
9. **Piersma AH, Brockbank KG, Ploemacher AE, Van Vliet E.** Characterization offibroblastic stromal cells from murine bone marrow. Exp Hematol 1985; 13: 237-43.
10. **Friedenstein AJ, Chailakhyan RK, Gerasimov UV.** Bone marrow osteogenic stem cells: in vitro cultivation and transplantation in difusion chamber. Cell Tissue Kinet 1987; 20: 263-72.
11. **Maniatopoulos C, Sodek J, Melcher AH.** Bone formation in vitro by stromal cells obtained from bone marrow of young adult rats. Cell Tissue Res 1988; 254: 317-30.
12. **Owen M.** Lineage of osteogenic cells and their relationshipe to the stromal system. In : Peck W A,eds .Bone and Mineral Research/3. Amesterdam: Elsevier, 1985; 1-25
13. **Owen M E, Cave J, Joyner CJ.** Clonal analysis in vitro of osteogenic differntiation of marrow CFU-F. J cell Sci 1987; 87:731-8.
14. **Haynesworth SE, Goshima J, Goldberg VM.** Characterization of cells with osteogenic potential from human marrow.Bone 1992; 13:81-8.
15. **Ferrari G, Cusella-De Angelis G, Coletta M.** Muscle regenaration by bone marrow-derived myogenic progenitors. Science 1998; 279:1528-30.
16. **Yamamoto N, Isobe M, Negishi A.** Effect of autologouse serume on osteoblastic differentiation in human bone marrow cells .J Med Dent Sci 2003; 50: 63-9.
17. **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: 361-70.
18. **Spess JL, Gregory CA, Singh H.** Internalized antigens must be removed to prepare hypoim-munogenic mesenchymal stem cells for cell and gene therapy. Mol Ther

2004; 95: 747-56.

19. **Shahdadfar A, Fronsdal K, Haug T,**. In vitro Expansion of human mesenchymal stem cells: Chioce of serum is a Determinant of cell proliferation, gene experssion, and transcriptome stability. Stem Cells 2005; 23; 1357-66.
20. **Stute N, Hltz K, Bubenheim M .** Autologous serum for isolation and expanssion of human mesenchymal stem cells for clinical use. Exprimental Hematology 2004; 32; 1212-25.
21. 21- **Kobayashi T, Watanabe H, Yanaqawa T, et al.** Motility and growth of human bone-marrow mesenchymal stem cells during ex vivo expansion in autologous serum. J Bone Joint Surgery 2005; 87: 1426-8.
22. **Anselme K, Broux O, Noel B. et al.** In vitro control of human bone marrow stromal cells for bone tissue engineering. Tissue Eng 2002; 8: 941-53.
23. **Koller MR, Maher RJ, Manchel I.** Alternatives to animal sera for human bone marrow cell expanssion: human serum and serum-free media. J Hematother 1998; 7 413-23.
24. **Kusnetsov SA, Mankani MH, Robey PG.** Effect of serum on human marrow stromal cells: Ex vivo expanssion and in vivo bone formation. Transplantation 2000; 70:1780-7.
25. **Yamaguchi M, Hirayama F, Wakamato S, et al.** Bone marrow stromal cells prepared using AB serum and bFGF for hematopietic stem cells expanssion. Transplantation 2002; 42:921-7.
26. **Meirelles LDS, Nardi NB**. Murine marrow drived mesenchymal stem cell: Isolation, invitro expansion, and characterization. Brit J Hemat 2003;123: 702-11.
27. **Phinney DG, Kopen G, Isaacson RL.** Plastic adherent stromal cells from the bone marrow of commonly used strains of inbred mice: variations in yield, growth, and differentiation. J Cell Biochem 1999; 72: 570-85.
28. **Trople P, Noel D, Platet N, Legrand P.** Isolation and characterization of mesenchymal stem cells from adult mouse bone marrow. Exp Cell Res 2004; 295:395-406.
29. **Modderman WE, Vrigheid-Lamers T, Lowik CWGM.** Removal of hematopoietic cells and marcophage from mouse bone marrow culture: isolation of fibrobalstic stromal cells. Exp Hemat 1994, 22: 194-201.
30. **Peister A, Mellad JA, Larsen LL, Hall BM, Gibson LF, Prockop DJ.** Adult stem cellsfrom bone marrow (MSCs) isolated from different strains of inbred mice vary in surface epitopes, rates of proliferation, and differentiation potential. Blood 2004; 103: 1662-8.
31. **Van Vlasselaer P, Falla N, Snoeck H, Mathieu E.** Characterization and purification of osteogenic cells from murine bone marrow by two-color cell sorting using anti sca-1monocolonal antibody and wheat germ agglutinin. Blood 1994; 84: 753-63.
32. **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 negativeselection. J Cellul Biochem 2003; 89: 1235-49.
33. **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: 351-64.

This document was created with Win2PDF available at http://www.daneprairie.com.
The unregistered version of Win2PDF is for evaluation or non-commercial use only.