

## ***Therapeutic Potential of Mouse Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells in Carbon Tetrachloride (CCl<sub>4</sub>)-Induced Liver Fibrosis***

***Piryaei A., Ph.D., Rezazadeh Valojerdi M. Ph.D.\*, Baharvand H., Ph.D.\*\****

*\* P.O.Box: 14155-111, Anatomy Department, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran*

*\*\* P.O.Box: 1939-4644, Stem Cells and Developmental Biology Department, Royan Institute for Stem Cell Biology and Technology, ACECR, Tehran, Iran*

### ***Abstract***

**Purpose:** To study the effect of allogenic bone marrow mesenchymal stem cells (BMMSCs) transplantation on carbon tetrachloride-induced liver fibrosis in mice.

**Materials and Methods:** Fifty five female NMRI mice were divided in 5 groups, and to induce liver fibrosis CCL<sub>4</sub> intraperitoneally was injected 1ml/Kg twice a week for 8 weeks 10<sup>6</sup> allogenic BMMSCs were infused in cell therapy group via tail vein at the end of 4<sup>th</sup> weeks. Liver samples were taken and evaluated with histopathologic and immunofluorescence techniques to determine the amount of fibrosis, cell homing and identity of the cells. Mice serum albumin level was measured as well.

**Results:** In the cell therapy group the amount of liver fibrosis and mortality rate decreased significantly (2.24±0.51% vs 3.48±0.6%, P<0.05 and 27.3% vs 45.5%), respectively but there was no significant difference between their serum albumin level. These results were in compliance with low proportion of transplanted cells capable of producing albumin (0.23±0.08% of liver cells). Because most transplanted cells were found in periportal area; they did not produce albumin.

**Conclusion:** It seems that the major role of BMMSCs to reduce CCL<sub>4</sub>-induced liver fibrosis does not occur by their differentiation into hepatocyte but rather through other interaction pathways with injured liver tissue.

**Key words:** Mesenchymal stem cells, Liver fibrosis, Carbon tetrachloride, Cell therapy

# توانایی سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان موش در بهبود فیروز کبدی ناشی از تتراکلرید کربن

عباس پیریایی <sup>M.Sc.\*</sup>، مجتبی رضازاده و لوجردی <sup>Ph.D.\*</sup>، حسین بهاروند <sup>Ph.D.\*\*</sup>

\* گروه علوم تشریح دانشکده علوم پزشکی دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران  
 \*\* گروه سلول‌های بنیادی پژوهشکده رویان جهاد دانشگاهی و گروه زیست‌شناسی تکوینی دانشگاه علم و فرهنگ، تهران، ایران  
 تاریخ وصول: تیرماه ۸۸، تاریخ پذیرش: شهریور ماه ۸۸

## چکیده

**هدف:** بررسی تاثیر پیوند آلورن سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان بر میزان فیروز کبدی ناشی از تتراکلرید کربن در موش  
**مواد و روش‌ها:** تعداد ۵۵ سر موش ماده نژاد NMRI به ۵ گروه ۱۱ تایی تقسیم شدند و برای ایجاد فیروز کبدی به مدت ۸ هفته، هفته‌ای دو بار به میزان ۱ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن تتراکلرید کربن دریافت نمودند. علاوه بر آن، به موش‌های گروه سلول درمانی در پایان هفته ۴، یک میلیون سلول مزانشیمی مغز استخوان آلورن از طریق ورید دم پیوند شد. سپس کبد آن‌ها با روش‌های هیستوپاتولوژیک و ایمنوفلورسنس از نظر میزان فیروز، استقرار سلول‌های پیوندی و ماهیت آن‌ها مورد مطالعه قرار گرفت. همچنین میزان آلبومین خون موش‌ها بررسی شد.  
**یافته‌ها:** در گروه سلول درمانی میزان فیروز و همچنین میزان مرگ و میر موش‌ها به‌طور معنی‌داری کاهش یافته بود (به ترتیب  $0.51 \pm 2.24$  در مقابل  $3.48 \pm 0.76$  درصد،  $P > 0.05$  و  $27/3$  در مقابل  $45/5$  درصد)، از طرفی میزان آلبومین سرم نیز افزایش یافته بود که البته اختلاف آن‌ها معنی‌دار نبود. این یافته با درصد بسیار پایین سلول‌های پیوندی استقرار یافته‌ای که توانایی تولید آلبومین را داشتند ( $0.23 \pm 0.08$  درصد کل سلول‌های بافت کبد) همخوانی داشت. به‌طوری که اکثر سلول‌های پیوندی در نواحی پری پورتال استقرار یافته و توانایی تولید آلبومین را نداشتند.  
**نتیجه‌گیری:** به نظر می‌رسد که نقش اصلی سلول‌های مزانشیمی در بهبود فیروز کبدی ناشی از تتراکلرید کربن نه از طریق تمایز آن‌ها به سلول‌های هپاتوسیتی، بلکه به‌طور عمده از طریق سایر مسیرهای برهم‌کنش متقابل با بافت آسیب دیده اعمال می‌شود.

**کلیدواژه‌ها:** سلول بنیادی مزانشیمی، فیروز کبدی، تتراکلرید کربن، سلول درمانی

## مقدمه

[۲۰۱]. علاوه بر این وظایف متعدد، کبد دارای قدرت بازسازی ذاتی نیز هست. به همین خاطر اغلب بیماری‌های مزمن کبدی (نظیر هپاتیت‌های خود ایمنی، الکلی و ویروسی و همچنین اختلالات متابولیسمی و صفرای) با ایجاد

کبد به‌عنوان بزرگترین غده بدن نقشی حیاتی در متابولیسم، حفظ هموستاز، سنتز و ذخیره‌سازی مواد غذایی، سم‌زدایی و دفاع در مقابل ماکرومولکول‌های مهاجم دارد

✉ آدرس مکاتبه: تهران، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم پزشکی، گروه علوم تشریح، صندوق پستی: ۱۱۱-۱۴۱۱۵  
 E-mail: mr\_valojerdy@modares.ac.ir  
 تهران، پژوهشکده رویان جهاد دانشگاهی، گروه سلول‌های بنیادی، صندوق پستی: ۴۶۴-۱۹۳۹۵  
 E-mail: Baharvand@RoyanInstitute.org

وارد شود، مجموعه این فرایندهای بازسازی نیز قادر به ترمیم آن نخواهند بود [۱۳ و ۱۴].

با شناسایی سلول‌های مشتق از مغز استخوان در کبد ضایعه دیده انسان و جوندگان امیدهایی برای استفاده درمانی از این سلول‌ها در ترمیم کبد ایجاد شد [۸ و ۱۵]. اولین مقاله‌ای که نقش سلول‌های بنیادی خارج کبدی را در ترمیم کبد بیان نمود در سال ۱۹۹۹ توسط پیترسون (Petersen) و همکارانش ارائه شد. آن‌ها برای اولین بار این فرضیه که «آیا سلول‌های بنیادی چند ظرفیتی موجود در مغز استخوان می‌تواند به دنبال ایجاد عوارض شدید کبدی وارد کبد شده و با آن ارتباط برقرار سازند؟» را بررسی کردند. این محققان مغز استخوان موش صحرایی نر را به موش صحرایی ماده‌ای که دچار آسیب کبدی شده بود و مغز استخوانش نیز توسط اشعه تخریب گردیده بود، تزریق نمودند و مشاهده کردند که این سلول‌ها قادرند در کبد جایگزین شده و همچنین شدت بیماری کبدی را کاهش دهند [۱۵]. از طرفی دیگر نمونه‌های بیوپسی و اتوپسی از کبد انسان‌هایی که مغز استخوان یا کبد را از جنس مخالف خود دریافت کرده بودند نیز وجود هپاتوسیت‌های مشتق از سلول‌های مغز استخوان که حدود ۴ تا ۳۴ درصد کل سلول‌های کبدی را تشکیل می‌دادند را نشان داد [۱۶].

شاید بتوان از بین انواع سلول‌های بنیادی، سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان (MSC: Mesenchymal Stem Cells) را بهترین گزینه برای سلول درمانی بیماران مبتلا به آسیب کبدی دانست. زیرا از یک سو، قابلیت تمایز این سلول‌ها به هپاتوسیت در مطالعات متعدد تأیید شده و از سوی دیگر، با توجه به آن‌که می‌توان از پیوندهای اتولوگ این سلول‌ها برای بیماران استفاده نمود، بسیاری از مشکلات مربوط به استفاده از سایر سلول‌های بنیادی (از جمله سرکوب سیستم ایمنی، رد پیوند، مسایل اخلاقی و کمبود منبع سلولی) مرتفع می‌شود [۱۷ و ۲۰-۱۸].

مطالعات مختلفی که تا کنون روی انواع متعددی از حیوانات آزمایشگاهی و با استفاده از روش‌های متفاوت ایجاد

تغییراتی در روند بازسازی طبیعی کبد به جای ترمیم آن سبب بروز عارضه‌ای عمومی به نام فیروز کبدی و در نهایت سیروز کبدی خواهد شد [۳]. براساس آمارهای سازمان بهداشت جهانی بیش از ۴۵۰ میلیون نفر در سراسر دنیا مبتلا به سیروز کبدی هستند [۴] که بیشترین ارتباط را با مرگ و میرهای ناشی از عوارض کبدی دارد و در حال حاضر پیوند کبد اصلی‌ترین راه درمان آن‌ها است. اما متأسفانه تعداد کم اندام‌های اهدایی، نیاز به سرکوب ایمنی شخص گیرنده و پیچیدگی‌های عمل جراحی آن، این گزینه را نیز محدود ساخته است [۵ و ۶]. امروزه روش‌های پیوند سلول‌های کبدی و روش‌های مبتنی بر سلول درمانی (Cell Therapy) در حال توسعه بوده و به عنوان یک جایگزین مناسب برای پیوند اندام کامل مطرح هستند. در این روش‌ها استفاده بهتری از بافت اهدایی شده و همچنین از انجام جراحی‌های مشکل اجتناب می‌شود. ابتدا پیش‌بینی می‌شد که برای پیوند سلول‌های کبدی همولوگ نیازی به سرکوب سیستم ایمنی به شدتی که در پیوند اندام کامل انجام می‌شود، نباشد. زیرا هپاتوسیت‌ها آنتی‌ژن MHC class II را بیان نکرده و فقط به مقدار کمی MHC class I را بیان می‌نمایند [۷]. اما متأسفانه نتایج به دست آمده در مطالعات کلینیکی کاملاً عکس این موضوع را نشان داد و مشخص شد که برای انجام چنین پیوندهایی نیز نیاز به سرکوب شدید سیستم ایمنی شخص گیرنده وجود دارد [۸]. بنابراین به نظر می‌رسد که یافتن منبعی از سلول‌های اتولوگ که بتوانند در درمان چنین عوارضی مؤثر باشند، بسیار با ارزش خواهد بود.

از طرفی دیگر، میدانیم که کبد توانایی بازسازی قابل توجهی دارد (هرچند که این توانایی در انسان نسبت به جوندگان تا حد زیادی محدود شده است). نتایج حاصل از مطالعات متعدد، موجب شد تا محققان به این نتیجه برسند که بازسازی کبد توسط سه منبع سلولی متفاوت (هپاتوسیت‌های بالغ، سلول‌های بنیادی داخل کبدی و سلول‌های بنیادی خارج کبدی) انجام می‌شود [۹-۱۲]. اما متأسفانه با وجود چنین مکانیسم‌های ترمیمی، در صورتی که عارضه‌ای جدی به کبد

تاریکی و دسترسی آزاد به آب و غذای کافی) نگهداری شدند. از حیوانات نر برای تهیه سلول‌های بنیادی مزانشیمی و از حیوانات ماده برای گروه‌های آزمایشی استفاده شد.

### جداسازی و تخلیص سلول‌های بنیادی مزانشیمی

ابتدا با جابه‌جایی مهره‌های گردنی موش‌های نر کشته و بلافاصله استخوان‌های ران و درشت‌نی آن‌ها تحت شرایط استریل جدا شد. پس از جدا نمودن عضلات و بریدن اپیفیزها مغز استخوان‌ها، در محیط کشت DMEM (Dulbecco's modified Eagle medium) بدون سرم تخلیه شد و بعد از یک بار شستشوی سلول‌ها با همان محیط کشت آن‌ها را در محیط کشت DMEM حاوی ۱۰ درصد سرم FBS (Fetal Bovine Serum)، ۱۰۰ واحد در میلی‌لیتر پنی‌سیلین و ۱۰۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر استرپتومایسین (همگی تهیه شده از Gibco, UK)، در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و در غلظت ۵ درصد دی‌اکسیدکربن کشت داده‌شد. پس از یک روز با تعویض محیط کشت سلول‌های غیر چسبیده (سلول‌های خون‌ساز) حذف شد و همچنین با انجام ۴ بار پاساژ سلولی، سلول‌های بنیادی مزانشیمی چسبنده تخلیص و تکثیر شد.

### تمایز به رده‌های مزانشیمی (چربی و استخوان)

برای اثبات مزانشیمی بودن سلول‌های حاصل از مرحله فوق علاوه بر تأیید مورفولوژی، نمونه‌هایی از آن‌ها در معرض محیط‌های تمایزی آدیپوژنیک (شامل DMEM حاوی ۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر آسکوربیک-۲ فسفات، ۱۰۰ نانومولار دگزاتازون و ۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر ایندومتاسین، همگی تهیه شده از Sigma, USA) به مدت دو هفته و استئوژنیک (شامل DMEM حاوی ۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر آسکوربیک-۲ فسفات، ۱۰ نانومولار دگزاتازون و ۱۰ میلی‌مولار بتا-گلیسرول فسفات همگی تهیه شده از Sigma, USA) به مدت ۳ هفته قرار داده شد [۳۲] و پس از ۲۱ روز به ترتیب با

مدل‌های آسیب کبدی و کاربرد سلول‌های مزانشیمی در ترمیم آن انجام شده و همچنین کارآزمایی‌های بالینی متعدد، نتایج کاملاً متفاوت و گاهی متضادی را به‌دنبال داشته‌است [۶ و ۳۱-۲۱]؛ به‌طوری که عبدالعزیز (Abdel-Aziz) و همکاران در سال ۲۰۰۷ نشان دادند که تزریق سلول‌های مزانشیمی به موش‌های صحرایی که دچار فیروز کبدی ناشی از تراکلرید کربن شده بودند موجب کاهش بیان ژن کلژن نوع I و همچنین میزان هیدروکسی پرولین بافت کبدی می‌شود [۶]. هرچند که آن‌ها سرنوشت سلول‌های پیوندی را بررسی نکرده و مشخص نمودند که این سلول‌ها در چه مناطقی از بافت کبدی جایگزین شده‌اند و به هپاتوسیت تمایز یافته‌اند یا خیر. از طرفی دیگر، کاروالهو (Carvalho) و همکارانش در سال ۲۰۰۸ عدم موفقیت سلول‌های مزانشیمی در بهبود پارامترهای کبدی و از جمله فیروز در موش‌های صحرایی تیمار شده با تراکلریدکربن را گزارش نمودند [۲۱].

از آنجا که هنوز به‌طور دقیق مشخص نشده که سلول‌های مزانشیمی پیوند شده به مدل فیروز کبدی به چه میزانی در بافت کبد گیرنده جایگزین می‌شوند و تا چه حدی توانایی تمایز به هپاتوسیت را دارند و همچنین به‌طور دقیق مشخص نشده که نقش این سلول‌ها در روند بهبود احتمالی آسیب کبدی از طریق تمایز آن‌ها به هپاتوسیت یا مسیرهای دیگر است، بنابراین در مطالعه حاضر اثر پیوند سلول‌های بنیادی مزانشیمی آلژن بر فیروز ناشی از تزریق تراکلریدکربن (CCL4) در موش‌های مورد آزمایش بررسی شد.

## مواد و روش‌ها

### حیوانات

تعداد ۱۰ سر موش نر و ۵۵ سر موش ماده نژاد NMRI حدود ۸-۶ هفته‌ای با وزن ۲۵-۲۰ گرم از انستیتو پاستور ایران خریداری شد و در حیوانخانه پژوهشکده رویان تحت شرایط استاندارد (دمای ۲۱ درجه، ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت

رنگ‌آمیزی‌های اوایل رد و آلزارین رد بررسی شد. (Novartis, Switzerland) را به دفعاتی مشابه با گروه فیبروز کبدی (گروه ۴) و از طریق تزریق درون صفاقی دریافت کردند (۱۶ تزریق روغن ذرت و ۳۳ تزریق سیکلوسپورین) و در پایان هفته هشتم نمونه‌برداری شدند. گروه‌های ۳-۵ (مدل فیبروز کبدی و سلول درمانی)، همه این موش‌ها ابتدا به مدت ۴ هفته، هفته‌ای دوبار و هر بار به میزان ۱ میلی‌لیتر بر کیلوگرم وزن بدن تتراکلریدکربن (Merck, Germany) محلول در روغن ذرت را از طریق تزریق درون صفاقی دریافت کردند. گروه ۳ شامل موش‌هایی بود که در پایان هفته چهارم نمونه‌برداری شدند (۸ تزریق تتراکلریدکربن را دریافت کردند). گروه ۴ (فیبروز کبدی) موش‌هایی بودند که به مدت ۴ هفته دیگر تتراکلریدکربن را با همان روش قبلی (مجموعاً ۱۶ تزریق تتراکلرید کربن) دریافت کردند [۳۰، ۲۹، ۳۳]، همچنین همانند گروه ۵ سیکلوسپورین را برای سرکوب سیستم ایمنی دریافت نمودند. گروه ۵ (سلول درمانی) شامل موش‌هایی بود که پس از ۴ هفته تزریق تتراکلریدکربن، تعداد یک میلیون سلول بنیادی مزانشیمی آلوزن (پاساژ ۵-۴) نشان‌دار شده محلول در ۲۰۰ میکرولیتر PBS را از طریق ورید دمی دریافت کردند و سپس به مدت ۴ هفته دیگر با همان روش، تتراکلریدکربن را دریافت نمودند (در مجموع ۱۶ تزریق تتراکلریدکربن را دریافت کردند). همچنین برای سرکوب سیستم ایمنی، این موش‌ها از ۵ روز قبل از پیوند سلول تا پایان زمان مطالعه (پایان هفته هشتم) روزانه میزان ۲۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن سیکلوسپورین و در روز پیوند دو برابر این میزان را دریافت نمودند.

رنگ‌آمیزی‌های اوایل رد و آلزارین رد بررسی شد.

### نشاندن کردن و پیوند سلول‌ها

پس از تأیید مزانشیمی بودن سلول‌ها، به منظور نشاندن کردن آن‌ها برای پیوند به موش‌های مدل فیبروز کبدی از رنگ‌غشایی (Fluorescent Cell Linker Kits, PKH26 (Sigma, USA) استفاده شد. بدین ترتیب که پس از جداسازی سلول‌ها از کف فلاسک توسط تریپسین/EDTA و شستشو با PBS (Phosphat Buffer Salin) (هر دو از Gibco, UK) به مدت ۴ دقیقه در رنگ قرار داده شد و بعد از دوبار شستشو و شمارش سلولی توسط لام نئوبار، با غلظت  $5 \times 10^5$  سلول در ۱۰۰ میکرولیتر PBS آماده شد. سپس به هر موش مدل فیبروز کبدی با وزن حدود ۳۰ گرم، مقدار ۲۰۰ میکرولیتر از این سوسپانسیون سلولی (در مجموع یک میلیون سلول) از طریق ورید دمی تزریق شد.

### گروه‌های حیوانی برای ایجاد مدل فیبروز

#### کبدی و پیوند سلول

۵۵ سر موش ماده نژاد NMRI با سن ۸ هفته و وزن حدود ۳۰ گرم به‌طور تصادفی به ۵ گروه ۱۱ تایی به شرح زیر تقسیم شدند (جدول ۱). گروه ۱ (دست نخورده) که هیچ آزمایشی روی آن‌ها انجام نشد و فقط تا پایان مطالعه (۸ هفته) تحت شرایط حیوانخانه قرار گرفتند و سپس تحت بیهوشی عمیق ناشی از دوز بالای کتامین/زایلازین کشته شده و سرم خون و بافت کبدی آن‌ها نمونه‌برداری شد. گروه ۲ (شم) که حلال تتراکلریدکربن (یعنی روغن ذرت) و همچنین سیکلوسپورین

جدول ۱. گروه‌بندی موش‌های تحت مطالعه، مواد تزریقی، تعداد تزریق‌ها و میزان مرگ و میر در هر گروه

گروه	۱	۲	۳	۴	۵
تعداد اولیه (n)	۱۱	۱۱	۱۱	۱۱	۱۱
نوع و تعداد تزریق	تتراکلریدکربن ۱۶ بار	تتراکلریدکربن ۱۶ بار	تتراکلریدکربن ۸ بار	تتراکلریدکربن ۱۶ بار	تتراکلریدکربن ۱۶ بار
پیوند سلول	سیکلوسپورین ۳۳ بار	سیکلوسپورین ۳۳ بار	سیکلوسپورین ۳۳ بار	سیکلوسپورین ۳۳ بار	یک میلیون سلول بنیادی مزانشیمی
میزان مرگ و میر	۰	۰	۲ (۱۸/۲٪)	۵ (۴۵/۵٪)	۳ (۲۷/۳٪)

## بررسی هیستوپاتولوژیک میزان فیروز بافت کبد

برای این منظور، قطعاتی از بافت کبدی پس از نمونه‌برداری در فرمالین ۱۰ درصد (Merck, Germany) تثبیت شده و پس از انجام پروسس بافتی در پارافین قالب‌گیری شد. سپس برش‌هایی با ضخامت ۵ میکرون تهیه شده و با روش‌های هماتوکسیلین-ئوزین و تریکروم ماسون رنگ‌آمیزی شد. برای به‌دست آوردن درصد فیروز بافت کبد در گروه‌های مختلف و مقایسه آن‌ها با یکدیگر، از هر موش ۵ برش رنگ‌آمیزی شده با روش تریکروم ماسون توسط دوربین DP70 نصب شده روی میکروسکوپ Olympus (BX51, Japan) با بزرگنمایی اولیه ۱۰۰ برابر عکس‌برداری و توسط نرم‌افزار Image J (National Institute of Health) بررسی شد. در این نرم‌افزار ابتدا طیف رنگ سبز-آبی مربوط به نواحی فیروز انتخاب شد، سپس سایر پیکسل‌های تصویر حذف و با شمارش پیکسل‌های طیف فیروز و تقسیم آن به کل پیکسل‌های تصویر، میزان بافت فیروز محاسبه شد، سپس نتایج حاصل توسط آنالیز آماری سنجش شد.

## بررسی میزان استقرار (Homing) سلول‌های

### پیوندی در بافت کبد

برای این منظور قطعاتی از بافت کبدی موش‌های گروه ۵ (سلول درمانی) در فرمالین ۱۰ درصد حاوی ۳۰ درصد سوکروز تثبیت شد؛ سپس توسط میکروتوم یخچال‌دار Leica (CM 1850, Austria) برش‌های انجمادی با ضخامت ۱۰ میکرون تهیه شد. تعداد ۵ برش از هر موش پس از رنگ‌آمیزی هسته‌ها با رنگ Hoechst 33258 (Calbiochem, Germany) توسط میکروسکوپ فلورسنت Olympus (BX51, Japan) و با بزرگنمایی اولیه ۱۰۰ برابر عکس‌برداری شد. سپس با شمارش تعداد هسته‌ها (به‌طور میانگین حدود ۵۰۰۰ هسته) و همچنین تعداد سلول‌های PKH مثبت در هر تصویر و آنالیز آماری آن، نسبت تعداد سلول‌های پیوندی استقرار یافته در کبد به‌دست آمد.

## بررسی ماهیت سلول‌های پیوندی استقرار

### یافته در بافت کبد

برای بررسی تمایز سلول‌های پیوندی استقرار یافته در کبد و توانایی آن‌ها در تولید آلبومین، از هر موش تعداد ۳ برش انجمادی توسط روش ایمونوفلورسنت غیر مستقیم و آنتی‌بادی اولیه Goat Anti Mouse ALB IgG با رقت ۱:۲۰۰ و آنتی‌بادی ثانویه Rabbit Anti Goat IgG FITC (هر دو از Santa Cruz, USA) با رقت ۱:۲۰۰ مطالعه شد و تصاویر مربوط توسط میکروسکوپ فلورسنت Olympus و با بزرگنمایی اولیه ۱۰۰ برابر تهیه شد. سپس نسبت سلول‌های PKH مثبتی که آلبومین مثبت نیز بودند، محاسبه شد.

## بررسی میزان آلبومین سرم

برای این منظور قبل از نمونه‌برداری بافت کبد برای مطالعات بافت‌شناسی، ابتدا حدود ۱ میلی‌لیتر خون از طریق قلب حیوان گرفته و پس از لخته شدن خون سرم آن جدا شد. سپس میزان پروتئین آلبومین آن با روش الایزا و با استفاده از کیت سنجش آلبومین (Bethyl, USA) اندازه‌گیری می‌شد.

## آنالیزهای آماری

داده‌های به‌دست آمده از آزمایش‌های فوق و مقایسه گروه‌های مختلف با یکدیگر توسط آزمون آنالیز واریانس یک‌طرفه و Tukey's Post-test در سطح معنی‌دار  $p < 0/05$  انجام شد.

## یافته‌ها

### خصوصیات عمومی سلول‌های بنیادی مزانشیمی

در کشت اولیه سلول‌های مغز استخوان و پس از چند روز از حذف سلول‌های غیر چسبیده، کلونی‌های سلول‌های مزانشیمی مشاهده شد، اما همچنان ناخالصی‌ها وجود داشت. پس از انجام پاساژهای سلولی، در پاساژ ۴ و ۵ به‌طور عمده اکثر ناخالصی‌ها برطرف شده و سلول‌های دوکی شکل و

گروه ۵ نیز ظریف‌تر از گروه ۴ به نظر می‌رسید. پس از تهیه تصاویر مورد نظر از برش‌های رنگ‌آمیزی شده با روش تری کروم ماسون کبدهای موش‌های گروه‌های مختلف، درصد فیروز هر کدام از برش‌ها به صورت جداگانه محاسبه شد و سپس مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفت. نتایج حاصل نشان داد که میزان فیروز در گروه ۴ (آسیب کبدی) برابر با  $3/48 \pm 0/76$  درصد سطح مقطع است در صورتی‌که این میزان در گروه ۵ (سلول درمانی) به  $2/24 \pm 0/51$  درصد کاهش یافته بود و این اختلاف در سطح  $p < 0/05$  معنی‌دار است (شکل ۲).

### میزان استقرار (Homing) سلول‌های پیوندی در

#### بافت کبد

مشاهده برش‌های انجمادی با میکروسکوپ فلورسنت نشان داد که اکثر سلول‌های PKH مثبت در حاشیه لبول‌ها (نواحی پری پورتال) استقرار یافته‌اند و تنها جمعیت کمی از آن‌ها به درون پارانشیم لبول نفوذ نموده‌اند. شمارش تعداد سلول‌های PKH مثبت موجود در هر تصویر و به دست آوردن درصد آن‌ها نسبت به کل سلول‌های موجود نشان داد که جمعیت سلول‌های پیوندی استقرار یافته در کبد موش‌های گروه ۵ (سلول درمانی)  $3/03 \pm 0/76$  درصد کل سلول‌های کبدی است (شکل ۳ و جدول ۲).

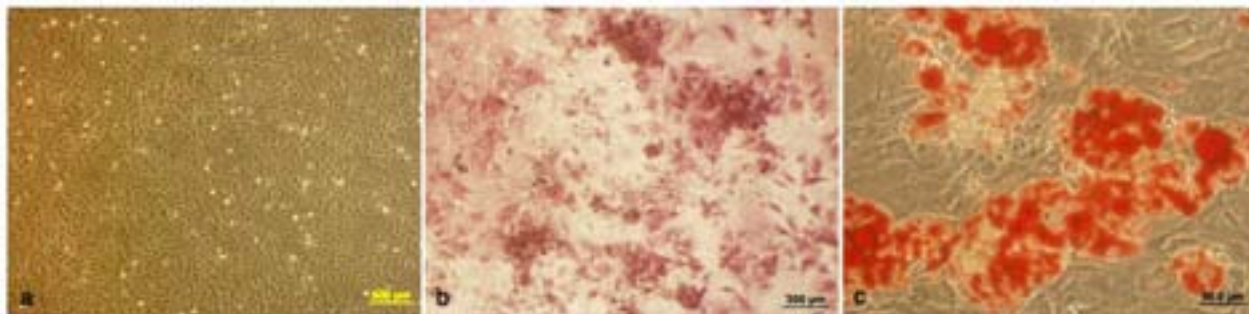
کشیده هنگامی که ۸۰ درصد کف فلاسک را پر می‌کرد، نمایی موج (که ویژگی سلول‌های مزانشیمی است) را نشان می‌داد (شکل ۱a). همچنین سلول‌های پاساژ چهارمی که در محیط‌های آدیپوژنیک و استئوژنیک قرار می‌گرفت، پس از گذشت ۲۱ روز به ترتیب به سلول‌های چربی و استخوانی تمایز می‌یافت و رنگ‌آمیزی‌های اوایل رد و آلزلرین رد تمایز آن‌ها را تأیید می‌نمود (شکل ۱b و c).

### میزان مرگ و میر موش‌ها در گروه‌های مورد بررسی

در گروه‌های ۱ و ۲ هیچ‌گونه مرگ و میری مشاهده نشد، در صورتی‌که در گروه ۳ دو سر (۱۸/۲ درصد)، در گروه ۴ پنج سر (۴۵/۵ درصد) و در گروه ۵ سه سر (۲۷/۳ درصد) مرگ و میر وجود داشت (جدول ۱).

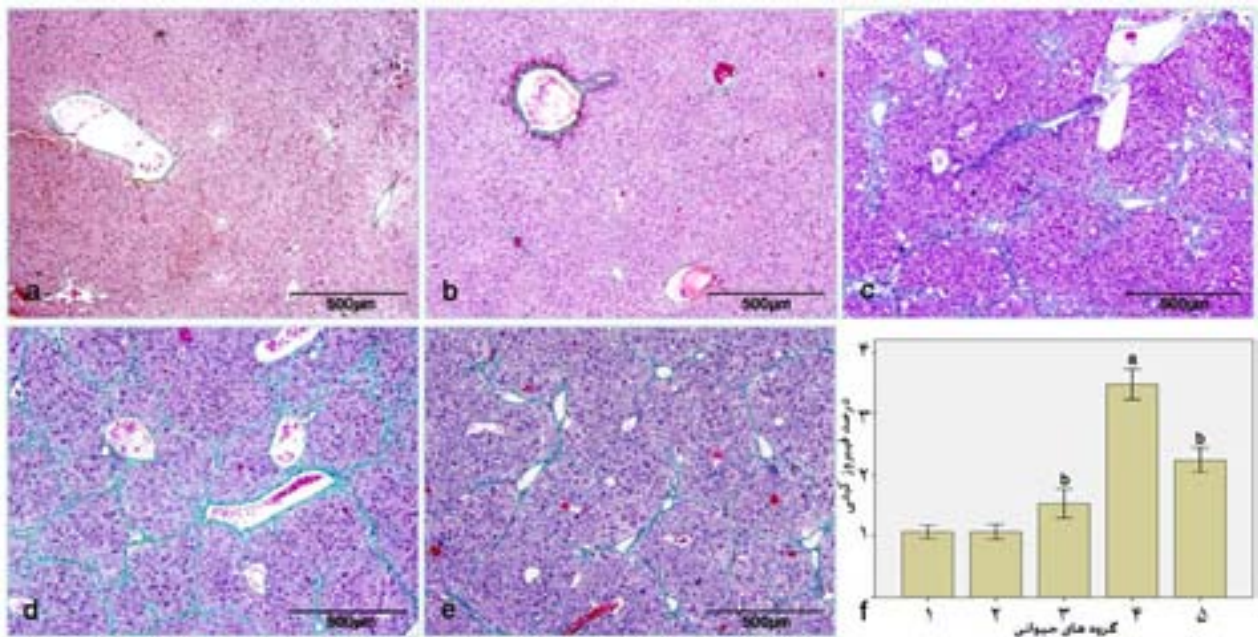
### میزان فیروز بافت کبد

در بافت کبد همه موش‌های گروه‌هایی که تتراکلریدکربن دریافت کرده بودند (گروه‌های ۳، ۴ و ۵)، بافت فیروز مشخصی ایجاد شده بود. این بافت فیروز اغلب در فضاهای پری پورتال و به صورت دسته‌جات کلاژنی که لبول‌های کلاسیک کبدی را احاطه کرده بودند، مشاهده می‌شد. در همان دید اول نیز مشخص بود که میزان بافت کلاژنی ایجاد شده در کبد موش‌های گروه ۳ نسبتاً ظریف‌تر از گروه ۴ است، همچنین این بافت فیروز در

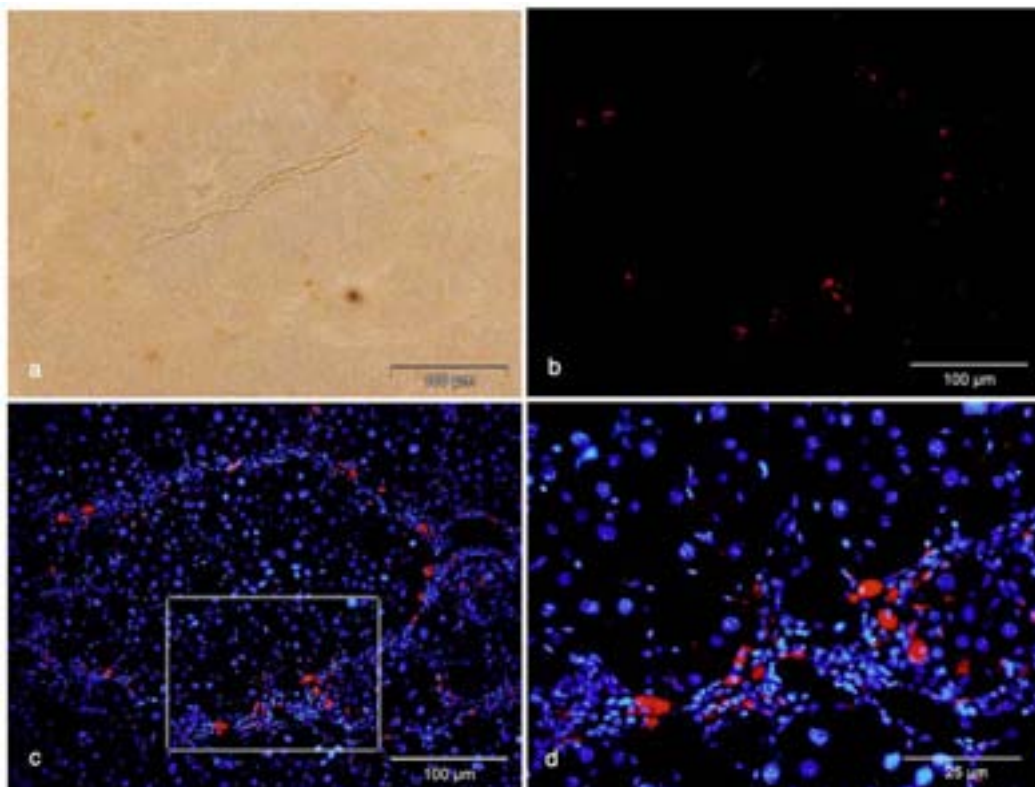


شکل ۱. (a) تصویر فاز کنتراست سلول‌های مزانشیمی موش خالص شده در پاساژ چهارم. (b) تصویر رنگ آمیزی Alizarin red سلول‌های مزانشیمی موشی تمایز یافته به استئوسیت. (c) تصویر رنگ آمیزی Oil red سلول‌های مزانشیمی موشی تمایز یافته به آدیپوسیت



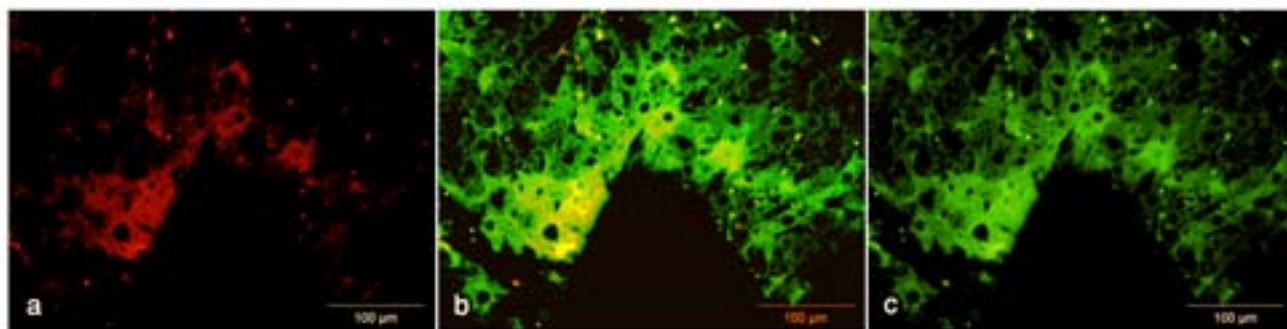


شکل ۲. تصاویر برش‌های بافت کبدی موش‌های گروه‌های ۱ تا ۵ (به ترتیب از a تا e) که برای تشخیص میزان فیبروز توسط روش تری کروم ماسون رنگ‌آمیزی شد. همان‌طور که مشاهده می‌شود در گروه چهار (d) بیشترین میزان بافت فیبروز به صورت رشته‌های قطور ایجاد شده، در حالی که در گروه پنج (e) از قطر بافت فیبروز کاسته شده است. (f) نمودار میانگین درصد فیبروز کبدی گروه‌های مختلف Mean ± SD. گروه چهار در  $p < 0.001$  و گروه‌های سه و پنج در  $p < 0.005$  با سایر گروه‌ها اختلاف معنی‌داری دارند.



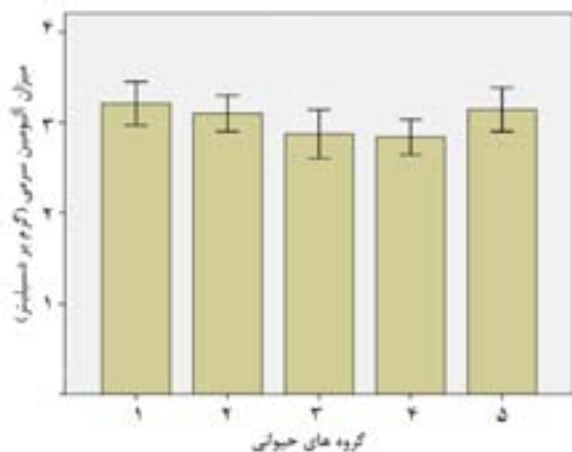
شکل ۳. تصویر برش انجمادی کبد موش پنج گروه (سلول درمانی)، a: بدون رنگ‌آمیزی و با میکروسکوپ نوری، b: با میکروسکوپ فلورسنت و فیلتر تک رنگ قرمز برای تشخیص سلول‌های پیوندی PKH مثبت، c و d با میکروسکوپ فلورسنت و با فیلتر دو رنگ (هسته‌ها با هوکست رنگ‌آمیزی شدند). همان‌طور که مشاهده می‌شود، اکثر سلول‌های پیوندی در حاشیه لیول‌ها (نواحی پورتال) استقرار یافته‌اند. d: بزرگنمایی بالاتر ناحیه داخل کادر شکل c.





شکل ۴. رنگ‌آمیزی ایمنوفلورسنس برای آلبومین (Anti ALB-FITC) و تصاویر میکروسکوپ فلورسنت، (a) با فیلتر تک رنگ قرمز برای تشخیص سلول‌های پیوندی PKH مثبت، (c) با فیلتر تک رنگ سبز برای سلول‌های آلبومین مثبت و (b) ادغام تصاویر a و c که در آن سلول‌های PKH و آلبومین مثبت به رنگ زرد دیده می‌شود.

این اختلاف در سطح  $p < 0.05$  معنی‌دار نبود (شکل ۵).



شکل ۵. نمودار میزان آلبومین سرم موش‌های گروه‌های مختلف  $Mean \pm SD$ . هر چند که در گروه پنج (سلول درمانی) افزایشی در میزان آلبومین نسبت به گروه چهار مشاهده می‌شود اما این اختلاف در سطح  $p < 0.05$  معنی‌دار نیست.

## بحث

فیروز و در نتیجه آن سیروز کبدی که در اثر تجمع بیش از حد ماتریکس برون سلولی و به‌ویژه کلاژن و به دنبال اغلب عوارض مزمن کبدی ایجاد می‌شود؛ منجر به تغییر معماری کبد شده و باعث اختلال در عملکرد هپاتوسیت‌ها و در نتیجه نارسایی‌های کبدی می‌شود. زیرا در این شرایط توانایی تکثیر و بازسازی هپاتوسیت‌های موجود به‌طور چشمگیری کاهش می‌یابد [۲۲-۳۶-۳۴]. بنابراین شناخت راهکارهایی که قادر باشد در چنین شرایطی میزان فیروز را کاهش دهد، می‌تواند در بهبود آسیب کبدی بسیار مؤثر باشد. در مطالعه حاضر با تزریق مزمن

جدول ۲. نتایج شمارش تعداد سلول‌های پیوندی استقرار یافته ( $PKH^+$ ) و سلول‌های استقرار یافته‌ای که آلبومین نیز ترشح می‌نمایند ( $ALB^+$ ,  $PKH^+$ ) در بافت کبدی موش‌های گروه پنج ( $n=8$ ) و درصد آن‌ها نسبت به کل سلول‌های کبد

درصد سلول‌ها	میانگین تعداد سلول‌ها	تعداد سلول‌ها
۱۰۰	$7242/9 \pm 1151/3$	کل سلول‌های شمارش شده در هر تصویر
$3/03 \pm 0/76$	$214/9 \pm 45/96$	سلول‌های $PKH^+$ هر تصویر
$0/23 \pm 0/08$	$16/53 \pm 5/42$	سلول‌های $ALB^+$ و $PKH^+$ هر تصویر

## ماهیت سلول‌های پیوندی استقرار یافته در

### بافت کبد

بررسی ایمنوفلورسنت برش‌های انجمادی کبد موش‌های گروه ۵ (سلول درمانی) توسط آنتی‌بادی علیه آلبومین نشان داد که  $1/79 \pm 7/66$  درصد از سلول‌های مزانشیمی پیوندی استقرار یافته در بافت کبدی توانایی سنتز پروتئین آلبومین را دارد. این جمعیت سلولی که اغلب شامل آن‌هایی می‌شد که به پارانشیم لبول‌ها نفوذ کرده بود،  $0/23 \pm 0/08$  درصد کل سلول‌های بافت کبد را شامل می‌شد (شکل ۴ و جدول ۲).

### میزان آلبومین سرم

اندازه‌گیری پروتئین آلبومین موجود در خون موش‌های گروه‌های مختلف و مقایسه آن‌ها با یکدیگر نیز نشان داد که میزان آلبومین موش‌های گروه ۴ (فیروز کبدی) نسبت به سایر گروه‌ها کاهش می‌یابد، به‌خصوص که میزان آلبومین گروه ۵ (سلول درمانی) افزایشی را نسبت به این گروه نشان می‌داد؛ اما

سلول‌های ستاره‌ای (Stellate Cells) فعال شده کبد با ترشح عوامل پاراکراینی نظیر Hedgehog نه تنها مانع آپوپتوز سلول‌های مزانشیمی، بلکه باعث تکثیر و تمایز آن‌ها به سلول‌های شبه هپاتوسیت می‌شوند (۴۱). اما آیا این درصد کوچک سلول‌های مزانشیمی تمایز یافته به هپاتوسیت می‌تواند دلیل روند بهبودی آسیب کبد باشد؟ مطالعات متعددی نقش آنتی فیبروتیک سلول‌های مزانشیمی را در بافت‌های مختلف نشان داده‌اند. به گونه‌ای که عوامل مترشحه از این سلول‌ها (به‌ویژه عامل رشد هپاتوسیتی، HGF) می‌تواند با اثر منفی بر عملکرد سلول‌های ستاره ای کبد و همچنین القای آپوپتوز در آن‌ها مانع از پیشرفت فیروز شود [۲۴ و ۴۵-۴۲]. همچنین نتایج حاصل از مطالعه آزمایشگاهی نائوکا کامو (Naoko Kamo) و همکارانش در سال ۲۰۰۷ نشان دادند که هم‌کشتی جمعیت ویژه‌ای از سلول‌های مزانشیمی جنینی ( $Thy1^+$ ,  $gp38^+$ ) می‌تواند موجب تسریع تمایز سلول‌های پیش ساز کبدی و بلوغ آن‌ها شود [۴۶].

در مطالعه جالبی توسط بیجو پارکادان (Biju Parekkadan) و همکارانش در سال ۲۰۰۷ روی نارسایی فوق حاد کبدی موش‌های صحرایی، مشخص شد که هرچند تزریق سلول‌های مزانشیمی انسان نمی‌تواند به‌طور معنی‌داری میزان بقای موش‌ها را افزایش دهد، اما تزریق عصاره یا محیط کشت سلول‌های مزانشیمی قادر است میزان مرگ و میر را به‌طور معنی‌داری کاهش دهد. آن‌ها سپس با استفاده از روش پروتئین آری (Protein Array)، نوع و میزان پروتئین‌های مترشحه از سلول‌های مزانشیمی را شناسایی نمودند. مطالعه آن‌ها نشان داد که عمده ترشحات این سلول‌ها شامل طیف وسیعی از عوامل رشد (۳۷ درصد) از جمله HGF، کموکاین‌ها (۳۰ درصد) و سیتوکاین‌ها (۱۹ درصد) است. به نظر می‌رسد که این عناصر تا حدود زیادی توانسته‌اند از نفوذ بیشتر سلول‌های ایمنی و التهابی به بافت کبد جلوگیری نموده و حتی باعث ترک کردن سلول‌هایی شوند که قبلاً نفوذ نموده‌اند. همچنین این عوامل توانسته بودند میزان آپوپتوز هپاتوسیت‌ها را کاهش دهند [۲۴].

تراکلریدکربن، در موش‌ها فیروز کبدی ایجاد شد و سپس نشان داده شد که پیوند سلول‌های مزانشیمی مغز استخوان می‌تواند میزان این فیروز را کاهش دهد. هرچند این پیوند سلولی شاخص دیگر فعالیت کبدی یعنی میزان ترشح آلبومین را به مقدار غیر محسوسی افزایش داد، اما باعث شد میزان زنده ماندن موش‌های تحت بررسی به‌طور چشمگیری افزایش یابد.

امروزه می‌دانیم که سلول‌های مشتق از مغز استخوان به دنبال رها شدن به داخل گردش خون می‌تواند وارد پارانشیم اغلب بافت‌ها (و به‌ویژه در اثر ترشح عوامل شیمیایی جاذبی که از اندام‌های آسیب دیده ترشح می‌شود، به طرف آن‌ها جلب شده) و در تجدید مدل (Remodeling) و بازسازی آن‌ها شرکت نماید [۳۷-۴۰ و ۱۵]. با این وجود مکانیسم این روند تشریح مساعی و بازسازی اندام‌ها هنوز مورد تردید است. آنچه مسلم است، نوع آسیب وارده به بافت، نقش مهمی در تعیین مکانیسم بهبود آن دارد.

در مطالعه‌ای که توسط عبدالعزیز (Abdel-Aziz) و همکارانش در سال ۲۰۰۷ صورت گرفت، مشاهده شد که سلول‌های مزانشیمی مشتق از مغز استخوان وقتی به موش صحرایی مدل آسیب کبدی ناشی از تراکلریدکربن تزریق شوند، قادر اند که وارد پارانشیم کبد شده و ساختار و عملکرد کبد را بهبود بخشند؛ به‌ویژه که میزان بافت فیروز ایجاد شده به مقدار قابل توجهی کاهش می‌یافت [۶]. اما آن‌ها مشخص نکردند که سلول‌های پیوندی به چه میزان توانسته‌اند وارد بافت کبد شده و در آنجا چه ماهیتی را کسب نموده‌اند.

در مطالعه حاضر نشان داده شد که جمعیتی از سلول‌های مزانشیمی پیوندی که در نواحی پری پورتال استقرار یافته‌اند، توانایی تولید آلبومین را ندارند، درحالی که درصد نسبتاً کمی از آن‌ها که به پارانشیم نفوذ کرده‌اند، به سلول‌های هپاتوسیت تولیدکننده آلبومین تبدیل شده‌اند. به نظر می‌رسد که تمایز این سلول‌ها نیز به واسطه عوامل مترشحه در بافت کبد روی می‌دهد. نان‌لین (Nan Lin) و همکارانش در سال ۲۰۰۸ نشان دادند که

کبدی نه به واسطه تمایز آن‌ها به سلول‌های هپاتوسیتی، بلکه از طریق راهکارهای مؤثر دیگری اعمال می‌شود که از آن جمله می‌توان به موارد زیر اشاره نمود. ۱- تولید عوامل رشدی که بقای هپاتوسیت‌های موجود را بهبود بخشیده و از مرگ آن‌ها جلوگیری می‌کند؛ ۲- جلوگیری از پیشرفت فیبروز و در نتیجه مهیا شدن محیطی مناسب برای تکثیر هپاتوسیت‌های موجود و تسریع روند بازسازی طبیعی کبد؛ ۳- ترشح سایتوکاین‌هایی که واکنش‌های ایمنی و التهابی را کاهش می‌دهد [۲۲، ۲۴، ۲۷ و ۴۸]. بدیهی است که درک بهتر هر کدام از این وقایع و تعیین سهم هریک در روند بهبود فیروز کبدی، نیازمند مطالعات تکمیلی در سطح سلولی و مولکولی است.

آنچه مسلم است وجود تفاوت در روش‌های ایجاد مدل‌های مطالعاتی آسیب کبدی، نحوه پیوند سلولی و بسیاری پارامترهای دیگر موجب تنوع مضاعفی در نتایج حاصل از این قبیل مطالعات می‌شود. بنابراین هر چقدر مدل حیوانی مورد استفاده استانداردتر باشد و به‌ویژه آن‌که به خصوصیات پاتولوژیکی بیماری‌های انسانی نزدیکتر باشد، طبیعی است که نتایج به‌دست آمده قابل اعتمادتر بوده و امکان استفاده از آن در درمان بیماری‌های کبدی محتمل‌تر خواهد بود.

نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که در روند سلول درمانی فیروز کبدی با سلول‌های مزانشیمی، تنها درصد کوچکی از سلول‌های پیوندی قادر خواهند بود به هپاتوسیت‌های عملکردی کبد تمایز یافته و از این طریق موجب بهبود شرایط بیماری شوند.

### تقدیر و تشکر

این مطالعه بخشی از طرح تحقیقاتی مصوب پژوهشکده رویان جهاد دانشگاهی است. نویسندگان مراتب تقدیر و تشکر خود را از مساعدت‌های مسئولین محترم این پژوهشکده و همچنین خانم‌ها وحیده ربانی و زهرا اژدری و نیز آقایان بهشاد پورنصر، حمید نظریان و علی رهجویی به‌خاطر کمک‌های تخصصی‌شان ابراز می‌دارند.

لازم به ذکر است که برخی مطالعات نیز وجود دارند که معتقد به عدم توانایی سلول‌های مزانشیمی پیوندی در بهبود فیروز کبدی هستند و شاید یکی از معروف‌ترین آن‌ها مطالعه‌ای است که توسط کاروالهو (Carvalho) و همکارانش در سال ۲۰۰۸ گزارش شد. آن‌ها با ایجاد فیروز کبدی در موش‌های صحرایی توسط تراکلریدکربن به مدت ۱۵ هفته، سپس تزریق سلول‌های مزانشیمی از طریق ورید پورت و قطع تزریق تراکلریدکربن، در فواصل یک و دو ماه پس از تزریق به بررسی پارامترهای کبدی پرداختند. در این مطالعه هیچ سلول پیوندی استقرار یافته‌ای در کبد مشاهده نشد، همچنین تفاوت معنی‌داری در سطح ترشحات کبدی و میزان فیروز بافتی بین گروه سلول درمانی و گروه شم مشاهده نشد. عدم استقرار سلول‌های پیوندی در کبد بزرگترین مشکل آن‌ها بود که خود نویسندگان نیز به آن اعتراف نمودند. به نظر می‌رسد که تزریق سلول‌ها از طریق ورید پورت، به دلیل وجود بافت فیروزه و به دنبال آن افزایش فشار خون پورت منجر به عدم موفقیت سلول‌ها در نفوذ به بافت کبد باشد. همچنین از آنجا که بافت کبد (به ویژه در جوندگان) از قدرت ترمیمی بالایی برخوردار است، در نتیجه قطع تزریق تراکلریدکربن باعث خواهد شد که کبد موش‌های گروه شم نیز با سرعتی تقریباً معادل گروه کنترل ترمیم شود و به نظر می‌رسد که به همین دلیل تفاوت معنی‌داری بین این دو گروه مشاهده نشده است [۲۱]. در واقع به همین دلیل در تحقیق حاضر، تزریق تراکلریدکربن تا انتهای مطالعه ادامه داده شد تا از روند بازسازی طبیعی کبد جلوگیری شود و همان‌طور که مشاهده شد، میزان آسیب و فیروز کبدی در گروه ۴ (که ۱۶ تزریق تراکلریدکربن را دریافت می‌کرد) نسبت به گروه ۳ (که تنها ۸ تزریق تراکلریدکربن را دریافت می‌نمود) پیشرفت کرده بود؛ در حالی که پارامترهای کبدی و به ویژه میزان فیروز در گروه ۵ (سلول درمانی) نسبت به گروه ۴ بهبود یافته بود.

به‌طور کلی با توجه به یافته‌های این تحقیق و همچنین مقایسه آن با سایر مطالعات انجام شده، به نظر می‌رسد که نقش اصلی سلول‌های بنیادی مزانشیمی در روند بهبود آسیب‌های

## References

1. **Xu Y Q, Liu Z C.** Therapeutic potential of adult bone marrow stem cells in liver disease and delivery approaches. *Stem Cell Rev* 2008; 4: 101–12.
2. **Desmet VJ, Organizational principles, In: Arias IM, Boyer JL, Chisari FV et al.** The liver biology and pathobiology, 4th ed. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia 2001, pp 3–15.
3. **Friedman SL, Schiano TD.** Cirrhosis and its sequelae, In: Goldman L, Ausiello D, et al. *Cecil textbook of medicine*. 22th ed. Saunders, Philadelphia 2004, pp 936–44.
4. The World Health Report–Deaths by cause, sex and mortality stratum in World Health Organization regions. Available at <http://www.who.int/en/>. Accessed September 7, 2007.
5. **Masson S, Harrison DJ, Plevris JN, Newsome PN.** Potential of hematopoietic stem cell therapy in hepatology: A critical review. *Stem Cells* 2004; 22: 897-907.
6. **Abdel Aziz MT, Atta HM, Mahfouz S, Fouad HH, Roshdy NK, Ahmed HH, et al.** Therapeutic potential of bone marrow-derived mesenchymal stem cells on experimental liver fibrosis. *Clin Biochem* 2007; 40: 893–9.
7. **Bumgardner GL, Chen S, Hoffman R, Cahill DC, So SK, Platt J.** Afferent and efferent pathways in T cell responses to MHC class I+, II Hepatocytes. *Transplantation* 1989; 47(1):163–70.
8. **Allen KJ, Buck NE, Williamson R.** Stem cells for the treatment of liver disease. *Transpl Immun* 2005; 15: 99–112.
9. **Rabes HM, Wirsching R, Tuzek HV, Iseler G.** Analysis of cell cycle compartments of hepatocyte after partial hepatectomy. *Cell Tissue Kinet* 1976; 9: 517-32.
10. **Yin L, Lynch D, Ilic Z, Sell S.** Proliferation and differentiation of ductular progenitor cells and littoral cells during the regeneration of the rat liver to CCL4/2-AAF injury. *Histol Histopathol*; 2002 17:65-81.
11. **Gordon GJ, Coleman WB, Hixson DC.** Liver regeneration in rats with retrorsin-induced hepatocellular injury proceeds through a novel cellular response. *Am J Pathol* 2000; 156: 607-19.
12. **Sell S.** Heterogeneity and plasticity of hepatocyte lineage cells. *Hepatology* 2001; 33: 738-50.
13. **Lowes KN, Croager EJ, Olynyk JK, Abraham LJ, Yeoh GCT.** Oval cell-mediated liver regeneration: role of cytokines and growth factors. *J Gastroenterol Hepatol* 2003; 18(1): 4–12.
14. **Tian YW, Smith PG, Yeoh GCT.** The oval-shaped cell as a candidate for a liver stem cell in embryonic, neonatal and precancerous liver: identification based on morphology and immunohistochemical staining for albumin and pyruvate kinase isoenzyme expression. *Histochem Cell Biol* 1997; 107(3): 243–50.
15. **Petersen BE, Bowen WC, Patrene KD, Mars WM, Sullivan AK, Murase N, Boggs SS, Greenberger JS, Goff JP.** Bone marrow as a potential source of hepatic oval cells. *Science* 1999; 284 (5417): 1168–70.
16. **Theise ND, Nimmakayalu M, Gardner R, Illei PB, Morgan G, Teperman L, Henegariu O, Krause DS.** Liver from bone marrow in humans. *Hepatology* 2000; 32(1): 11–6.
17. **Schwartz RE, Reyes M, Koodie L, Jiang Y, Blackstad M, Lund T, et al.** Multipotent adult progenitor cells from bone marrow differentiate into functional hepatocyte-like cells. *J Clin Invest* 2002; 109:1291–302.
18. **Lee KD, Kuo TK, Whang-Peng J, Chung YF, Lin CT, Chou SH, et al.** In vitro hepatic differentiation of human mesenchymal stem cells. *Hepatology* 2004; 40 (6):1275–84.
19. **Kang XQ, Zang WJ, Song TS, Xu XL, Yu XJ, Li DL, et al.** Rat bone marrow mesenchymal stem

- cells differentiate into hepatocytes in vitro. *World J Gastroenterol* 2005; 11(22): 3479-84.
20. **Lange C, Bassler P, Lioznov MV, Bruns H, Kluth D, Zander AR, et al.** Hepatocytic gene expression in cultured rat mesenchymal stem cells. *Transplant Proc* 2005; 37: 276-9.
  21. **Carvalho AB, Quintanilha LF, Dias JD.** bone marrow multipotent mesenchymal stromal cells do not reduce fibrosis or improve function in a rat model of severe chronic liver injury. *Stem Cells* 2008; 26:1307-14.
  22. **Cao B Q, Lin j, Zhong Y, Huang S, Lin N, Tang Z, et al.** Contribution of mononuclear bone marrow cells to carbon tetrachloride-induced liver fibrosis in rats. *World J Gastroenterol* 2007; 13(12):1851-1856.
  23. **Sgodda M, Auricha H, Kleista S, Auricha I, Königl S, Dollinger MM, et al.** Hepatocyte differentiation of mesenchymal stem cells from rat peritoneal adipose tissue in vitro and in vivo. *Exp Cell Res* 2007; 313(13):2875-86.
  24. **Parekkadan B, Poll D, Suganuma K, Carter EA, Berthiaume F, Tilles AW, et al.** Mesenchymal stem cell-derived molecules reverse fulminant hepatic failure. *PLoS ONE* 2007; 2(9): 941.
  25. **Jung Y, Ryu K, Cho S J, Woo S, Seoh J, Chung C H, et al.** Syngenic bone marrow cells restore hepatic function in carbon tetrachloride-induced mouse liver injury. *Stem Cells Dev* 2006; 15:687-95.
  26. **Russo FP, Alison MR, Bigger BW, Amofah E, Florou A, Amin F, et al.** The bone marrow functionally contributes to liver fibrosis. *gastroenterology* 2006; 130:1807-21.
  27. **Khan AA, Parveen N, Mahaboob VS, Rajendraprasad A, Ravindrakrishna HR, Venkateswarlu J, et al.** Safety and efficacy of autologous bone marrow stem cell transplantation through hepatic artery for the treatment of chronic liver failure: A preliminary study. *Transpl Proc* 2008; 40:1140-4.
  28. **Terai S, Ishikawa T, Omori K, Aoyama K, Marumoto Y, Urata Y, et al.** Improved liver function in patients with liver cirrhosis after autologous bone marrow cell infusion therapy. *Stem Cells* 2006; 24: 2292-8.
  29. **Sakaida I, Terai S, Yamamoto N, Aoyama K, Ishikawa T, Nishina H, et al.** Transplantation of bone marrow cells reduces ccl4-induced liver fibrosis in mice. *Hepatology* 2004; 40:1304-11.
  30. **Terai S, Sakaida I, Yamamoto N, Omori K, Watanabe T, Ohata S, et al.** An in vivo model for monitoring trans-differentiation of bone marrow cells into functional hepatocytes. *J Biochem* 2003; 134:551-8.
  31. **Mohamadnejad M, Alimoghaddam K, Mohyeddin-Bonab M, Bagheri M, Bashtar M, et al.** Phase I trial of autologous bone marrow mesenchymal stem cell transplantation in patients with decompensated liver cirrhosis. *Arch Iran Med* 2007; 10(4):459-66.
  32. **Baghaban Eslaminejad M, Nikmahzar A, Taghiyar L, Nadri S, Massumi M.** Murine mesenchymal stem cells isolated by low density primary culture system. *Develop Growth Differ* 2006; 48:361-70.
  33. **Marumoto Y, Terai S, Urata Y, Matsumoto T, Mizunaga Y, Yamamoto N, et al.** Continuous high expression of XBP1 and GRP78 is important for the survival of bone marrow cells in CC14-treated cirrhotic liver. *BBRC* 2008; 367:546-52.
  34. **Falkowski O, An HJ, Ianus IA, Chiriboga L, Yee H, West AB, et al.** Regeneration of hepatocyte 'buds' in cirrhosis from intrabiliary stem cells. *J Hepatol* 2003; 39:357-64.
  35. **Rudolph KL, Chang S, Millard M, Schreiber-Agus N, DePinho RA.** Inhibition of experimental liver cirrhosis in mice by telomerase gene delivery. *Science* 2000; 287:1253-8.
  36. **Wiemann SU, Satyanarayana A, Tshuridu M, Tillmann HL, Zender L, Klempnauer J, et al.**

- Hepatocyte telomere shortening and senescence are general markers of human liver cirrhosis. *FASEB* 2002; 16:935-42.
37. **Alison MR, Poulson R, Jeffery R, Dhillon AP, Quaglia A, Jacob J, et al.** Hepatocytes from non-hepatic adult stem cells. *Nature* 2000; 406:257-63.
  38. **Krause DS, Theise ND, Collector MI, Henegariu O, Hwang S, Gardner R, et al.** Multi-organ multi-lineage engraftment by a single bone marrow-derived stem cell. *Cell* 2001; 105:369-77.
  39. **Aurich I, Mueller L P, Aurich H, Luetzkendorf J, Tislar K, Dollinger M M, et al.** Functional integration of hepatocytes derived from human mesenchymal stem cells into mouse livers. *Gut* 2007; 56: 405-15.
  40. **Rabbani V, Gharavi M, Baharvand H.** Transplantation of human mesenchymal stem cells into mouse CCL4-induced cirrhotic liver. *J Farhangestane Oloum Pezeshki* 2008; 1(1): 20-30.
  41. **Lin N, Tang Z, Deng M, Zhong Y, Lin J, Yang X, et al.** Hedgehog-mediated paracrine interaction between hepatic stellate cells and marrow-derived mesenchymal stem cells. *BBRC* 2008; 372: 260-5.
  42. **Ortiz LA, Gambelli F, McBride C, Gaupp D, Baddoo M, Kaminski N, et al.** Mesenchymal stem cell engraftment in lung is enhanced in response to bleomycin exposure and ameliorates its fibrotic effects. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100: 8407-11.
  43. **Kim WK, Matsumoto K, Bessho K.** Growth inhibition and apoptosis in liver myofibroblasts promoted by hepatocyte growth factor leads to resolution from liver cirrhosis. *Am J Pathol* 2005; 166: 1017-28.
  44. **Xia JL, Dai C, Michalopoulos GK.** Hepatocyte growth factor attenuates liver fibrosis induced by bile duct ligation. *Am J Pathol* 2006; 168: 1500-12.
  45. **Neuss S, Becher E, Wöltje M.** Functional expression of HGF and HGF receptor/c-met in adult human mesenchymal stem cells suggests a role in cell mobilization, tissue repair and wound healing. *Stem Cells* 2004; 22: 405-14.
  46. **Kamo N, Yasuchika K, Fujii H, Hoppo T, Machimoto T, Ishii T, et al.** Two populations of Thy1-positive mesenchymal cells regulate in vitro maturation of hepatic progenitor cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2007; 292: 526-34.
  47. **Fang B, Shi M, Liao L, Yang S, Liu Y, Zhao RC.** Systemic infusion of FLK1(+) mesenchymal stem cells ameliorate carbon tetrachloride-induced liver fibrosis in mice. *Transplantation* 2004; 78:83-8.
  48. **Zhao DC, Lei JX, Chen R, Yu WH, Zhang XM, Li SN, et al.** Bone marrow-derived mesenchymal stem cells protect against experimental liver fibrosis in rats. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 3431-40.