جداسازی، تکثیر و تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان خرگوش به سلول‌های رده استخوان، غضروف و چربی

محمدرضا باغبان اسلامی‌نژاد [۱*]، حمید نظریان [۲]

خلاصه

سابقه و هدف: تا به حال از سلول‌های بنیادی مزانشیمی خرگوش در چندین مطالعه مرتبط با سلول‌درمانی تجربی به ویژه بازسازی ضایعات استخوان و غضروف استفاده شده، در حالی که توان تمایز این سلول‌ها در محیط کشت کمتر مورد توجه قرار گرفته است. مطالعه‌ی حاضر به این موضوع می‌پردازد.

مواد و روش‌ها: در مطالعه تجربی حاضر، با کشت نیم میلی‌لیتر مغز استخوان آسپیره شده از درشت نی خرگوش، سلول‌های بنیادی مزانشیمی آن استخراج و در طی چندین پاساژ تکثیر گردید. سلول‌های پاساژ ۳، به مدت ۲۱ روز در حضور مواد القاکننده تمایز، به استخوان چربی و غضروف کشت شدند و در پایان این مدت از نظر تمایز با رنگ‌آمیزی اختصاصی و RT-PCR بررسی گردیدند.

نتایج: سلول‌های جدا شده از نظر ریخت‌شناسی، فیبروبلاستی بودند. این سلول‌ها، در کشت تمایز استخوان توده‌های استخوانی تشکیل دادند که با آلیزارین قرمز، قرمزرنگ شد. در کشت تمایز چربی، در سیتوپلاسم سلول‌ها قطرات چربی تجمع یافت. این قطرات با رنگ‌آمیزی Oil red قرمز شدند. برش‌های تهیه شده از کشت تمایز غضروف، در رنگ‌آمیزی تولوئیدن آبی، خاصیت متاکرومازی داشتند. بر اساس نتایج PCR- RT ، ژن‌های استخوانی شامل استئوکلسین، استئوپونتین و کلاژن نوع I، ژن‌های بافت چربی شامل LPL، PPAR alpha، PPAR gamma و ژن‌های سلول‌های غضروفی نظیر آگریکان، کلاژن نوع II و X به ترتیب در کشت تمایز به استخوان، چربی و غضروف بیان شدند.

نتیجه‌گیری: در مجموع می‌توان گفت که سلول‌های بنیادی مزانشیمی جدا شده از مغز استخوان خرگوش از نظر توان تمایزی حداقل سه ظرفیتی بوده، قادرند به رده‌های استخوانی، چربی و غضروفی تمایز یابند.

واژگان کلیدی: سلول‌های بنیادی، مزانشیمی خرگوش، تمایز سلولی، چربی و غضروف

۱- استادیار گروه سلول‌های بنیادی پژوهشکده رویان

۲- مربی گروه سلول‌های بنیادی پژوهشکده رویان

* **نویسنده مسوول:** محمدرضا باغبان اسلامی

آدرس: تهران، بزرگراه رسالت، خیابان بنی‌هاشم، میدان بنی‌هاشم، کوچه حافظ شرقی، پژوهشکده رویان، گروه سلول‌های بنیادی

پست الکترونیک: bagesla@yahoo.com

تلفن: ۶-۲۲۳۰۷۹۶۰ ۰۲۱

دورنویس: ۲۲۳۱۰۴۰۶ ۰۲۱

تاریخ دریافت: ۸۶/۶/۲۹

تاریخ پذیرش نهایی: ۸۶/۱۱/۲۴

مقدمه

سلول‌های بنیادی مزانشیمی که نوعی سلول بنیادی بزرگ‌سال به شمار می‌روند، برای اولین‌بار توسط فریدنشتاین شناسایی و معرفی شدند. مطالعات این محقق نشان داد که مغز استخوان، علاوه بر سلول‌های رده‌ی خون‌ساز، حاوی سلول‌های داربستی با خاصیت کلون‌زایی نیز است. در آن زمان، مهم‌ترین ویژگی این سلول‌ها، توان تمایز آنها به کلون‌هایی مشابه با استخوان و غضروف توصیف شد [۱]. پس از آن، با انجام مطالعات وسیع مشخص شد که سلول‌های بنیادی مزانشیمی توان تمایزی سه ظرفیتی دارند. به عبارت دیگر، این سلول‌ها، علاوه بر استخوان و غضروف قادرند به سلول‌های رده‌ی چربی نیز تمایز یابند. امروزه، توان تمایز سه ظرفیتی به عنوان استاندارد طلایی جهت شناسایی و اثبات ماهیت بنیادی مزانشیمی سلول‌های بنیادی مزانشیمی به کار می‌رود [۲-۴]. گزارشات نشان داده است که سلول‌های بنیادی مزانشیمی از انعطاف‌پذیری بالایی برخوردارند به طوری که می‌توانند تحت شرایط مناسب به انواعی از سلول‌های غیرمزانشیمی نیز تمایز یابند [۵-۸]. سلول‌های بنیادی مزانشیمی به دلیل این که به راحتی از نمونه‌های مغز استخوان قابل استخراج بوده و از طرفی

[Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2026-11-22]

در شرایط کشت به راحتی تکثیر می‌یابند، سلول مناسبی برای استفاده در مطالعات مرتبط با ژن‌درمانی، سلول‌درمانی و مهندسی بافت به ویژه استخوان در نظر گرفته می‌شوند [۱۲-۹]. تا به حال این سلول‌ها از انسان و برخی گونه‌های حیوانی با موفقیت جداسازی و مطالعه شده است [۱۳-۲، ١٦]. جداسازی سلول بنیادی مزانشیمی از گونه‌های حیوانی به این دلیل اهمیت دارد که استفاده بالینی از این سلول‌ها مستلزم مطالعات پیش‌بالینی در نمونه‌های حیوانی از جمله خرگوش است. یکی از جنبه‌هایی که در ارتباط با سلول بنیادی مزانشیمی تا حد زیادی ناشناخته باقی‌مانده، شناسه‌های منحصر به فرد در سطح سلول است. مطالعات پیشین نشان داده است که این سلول‌ها ویژگی‌های مشترکی با سلول‌های اندوتلیال، اپی‌تلیالی و عضلانی دارند و در نتیجه آنتی‌ژن‌های سطحی متنوعی را بیان می‌کنند [۱۹-۱۷]. به همین دلیل شناسایی سلول‌های بنیادی مزانشیمی با شناسه‌ی سطحی امکان‌پذیر نبوده و ویژگی که ماهیت مزانشیمی بنیادی سلول‌ها را نشان می‌دهد، توان تمایزی آنها به رده‌های استخوان، غضروف و چربی است [۲۰]. تا به حال خرگوش به عنوان نمونه حیوانی در چندین پژوهش مرتبط با درمان ضایعات بافتی با استفاده از سلول‌های بنیادی مزانشیمی به کار گرفته شده است. در سال ۲۰۰٤، Wang و همکاران با استفاده از خرگوش، نمونه سکته‌ی قلبی ایجاد کردند و با پیوند سلول‌های بنیادی مزانشیمی به صورت آلوگرافت، به مطالعه تاثیر آن پرداختند [۲۱]. در مطالعه‌ی دیگری، با ایجاد تخریب در دیسک بین مهره‌ای خرگوش و پیوند سلول‌های بنیادی مزانشیمی در محل ضایعه، تاثیرات ترمیمی سلول‌ها بررسی شد [۲۲]. همچنین از خرگوش در تحقیقات مربوط به ترمیم ضایعات بافت استخوانی و غضروف مفصلی نیز استفاده شده است [۲۵-۲۳]. نکته‌ی قابل توجه این است که اگرچه از سلول‌های بنیادی مزانشیمی خرگوش مکررا در سلول‌درمانی تجربی استفاده شده، ولی توان تمایز این سلول‌ها در محیط کشت کمتر مورد توجه قرار گرفته است و در مواردی که مطالعه شده، تنها تمایز به یک رده بررسی گردیده، برای مثال Johnstone و همکاران در سال ۱۹۹۸ سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از این نمونه حیوانی را در محیط آزمایشگاه تنها به غضروف تمایز دادند [۲٦]. تا به حال توان تمایز به چربی سلول‌های بنیادی مزانشیمی خرگوش بررسی نشده است، لذا در مطالعه‌ی حاضر، مغز استخوان از استخوان درشت نی خرگوش آسپیره شده و کشت گردید. سلول‌های بنیادی مزانشیمی موجود در مغز استخوان، در طی چندین پاساژ تکثیر شد و از نظر توان تمایز به سه رده استخوانی، غضروفی و چربی بررسی گردید. مطالعات تمایز در محیط کشت از آن جهت اهمیت دارند که در برخی راهبردهای سلول‌درمانی، پیوند سلول‌های تمایز یافته ترجیح داده می‌شود [۲۷].

مواد و روش‌ها

نمونه‌گیری از مغز استخوان و کشت سلول‌ها: در مطالعه حاضر از ۱۰ سر خرگوش نر نژاد New Zealand white استفاده شد. ابتدا خرگوش‌ها با تزریق کتامین و زایلازین بیهوش شدند، با استفاده از سرنگ شماره ۱۹، نیم میلی‌لیتر مغز استخوان از استخوان تیبیای آنها آسپیره شد و با ۵ میلی‌لیتر محیط DMEM (Dulbecco's Modified Eagles Medium, Gibco; German) حاوی ۱۵ درصد سرم (Fetal Bovine Serum; FBS Gibco, Germany) ۱۰۰ واحد بین‌المللی آنتی‌بیوتیک پنی‌سیلین و ۱۰۰ واحد بین‌المللی استرپتومایسین (Gibco; Germany) رقیق شد. محلول حاصل به مدت ۳ دقیقه با دور ۱۲۰۰ RPM سانتریفوژ شد. محیط رویی دور ریخته شد و پلیت سلولی کف لوله با ۱ میلی‌لیتر محیط کشت DMEM معلق و در یک فلاسک ۷۵ سانتی‌متری در ۱۵ میلی‌لیتر محیط کشت DMEM حاوی ۱۵ درصد FBS کشت داده شد. سپس سلول‌ها در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و ۵ درصد CO_2 انکوبه شدند. ۳ روز پس از آغاز کشت، محیط سلول‌ها تعویض شد و پس از آن هر دو روز یک بار تعویض محیط کشت انجام گرفت. زمانی که سلول‌ها تمام سطح کشت را پر کردند به نسبت ۱:۳ پاساژ داده شدند (سلول‌های یک فلاسک ۷۵ بین سه فلاسک ۷۵ تقسیم شد) و این عمل تا پاساژ ۳ ادامه یافت. از سلول‌های پاساژ ۳ برای مرحله بعدی تحقیق یعنی بررسی تمایز استفاده شد.

بررسی توان تمایزی سلول‌ها

تمایز به استخوان: سلول‌های پاساژ ۳ در پلیت شش‌خانه کشت داده شدند و پس از این که تمام سطح کشت پر از سلول شد، محیط آنها با محیط القاکننده تمایز به استخوان جایگزین شد این محیط شامل محیط DMEM حاوی ۱۰ درصد FBS، ۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر Ascorbic2-Phosphate (Sigma; USA)، ۱۰ نانومولار Dexametasone (Sigma; USA) و ۱۰ میلی‌مولار β-Glycerol Phosphate (Sigma;USA) بود. به عنوان گروه کنترل، محیط برخی از خانه‌ها با محیط معمولی یعنی DMEM حاوی ۱۰ درصد سرم گاوی جایگزین شد. کشت سلول به مدت ۲۱ روز در شرایط دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و ۵ درصد CO_2 انکوبه شد. هر دو روز یک بار محیط آنها تعویض گردید و در پایان دوره‌ی تمایز وقوع تمایز سلول با روش رنگ‌آمیزی آلیزارین قرمز و انجام RT-PCR بررسی شد.

[Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2026-11-22]

تمایز به چربی: برای این منظور از سلول‌های پاساژ ۳ استفاده شد. ابتدا سلول‌ها در خانه‌های پلیت شش‌خانه کشت شدند و زمانی که کف ظرف کشت از تک لایه سلولی پوشیده شد، تمایز آغاز گشت، بدین ترتیب که محیط معمولی سلول‌ها با محیط تمایز به چربی تعویض شد. این محیط شامل محیط DMEM حاوی ۱۰ درصد FBS، ۱۰۰ نانومولار Dexametasone (Sigma; USA) و ۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر (Sigma; USA) Indomethacine بود. برخی از خانه‌های پلیت شش‌خانه به عنوان گروه کنترل محیط معمولی DMEM حاوی ۱۰ درصد سرم گاوی دریافت کرد. کشت تمایز و گروه کنترل به مدت ۲۱ روز در شرایط ۳۷ درجه سانتی‌گراد، ۵ درصد CO_2 نگهداری شد و در پایان این مدت با روش رنگ‌آمیزی Oil Red و RT-PCR برای ژن‌های اختصاصی چربی مورد ارزیابی قرار گرفت.

تمایز به غضروف: به منظور تمایز به غضروف از روش Micro mass culture system استفاده شد، بدین ترتیب که ۲×۱۰^{۵} سلول پاساژ ۳ به یک لوله ۱۵ میلی‌لیتری انتقال داده شد و تحت ۱۲۰۰RPM به مدت ۵ دقیقه سانتریفوژ شد. سپس محیط رویی تخلیه شده و محیط غضروف‌ساز شامل محیط DMEM حاوی ۱۰ نانوگرم فاکتور رشد TGF-β3 (Transforming Growth Factor-β3; Sigma, USA)، ۱۰ نانوگرم BMP-6 (Bone Morphogenetic protein-6; Sigma, USA)، ۵۰ میلی‌گرم ITS+premix (Insulin-Transferin-Selenium: Sigma, USA)، ۵/۳۵ و ۱/۲۵ میلی‌گرم Bovine Serum Albomin و ۱ درصد سرم گاوی بر روی پلیت سلولی در ته لوله، اضافه شد. محیط تمایز هر ٤-۳ روز یک‌بار به مدت ۳ هفته تعویض شد. برخی از کشت‌ها به عنوان گروه کنترل، محیط معمولی شامل DMEM حاوی ۱۰ درصد سرم گاوی دریافت کردند. برای ارزیابی تمایز به غضروف از روش رنگ‌آمیزی اختصاصی تولوئیدن آبی استفاده شد. همچنین بیان ژن‌های اختصاصی غضروف با انجام RT-PCR ارزیابی شد.

رنگ‌آمیزی آلیزارین قرمز: تک‌لایه سلولی با PBS شسته شده و به مدت ۱۰ دقیقه با متانول خالص (Merck; Germany) فیکس شد و سپس با محلول رنگی ۱ درصد آلیزارین قرمز S (Sigma, Germany) در آب آمونیاکی ۰/۲۵ درصد به مدت ۲ دقیقه رنگ‌آمیزی شد. در پایان، سلول‌ها با آب مقطر شسته و خشک شدند.

رنگ‌آمیزی Oil Red: سلول‌ها به مدت یک ساعت در دمای اتاق با فرمالین ٤ درصد فیکس شدند و سپس با الکل ۷۰ درصد شسته شده و به مدت ۱۵-۱۰ دقیقه با محلول (Sigma, Oil red Germany) ۰/۵ درصد در ایزوپروپانل ۹۹ درصد، رنگ‌آمیزی شده، در پایان محلول رنگی خارج و سلول‌ها، سه بار با الکل ۷۰ درصد شستشو شدند.

رنگ‌آمیزی اختصاصی تولوئیدن آبی: نمونه‌ها به روش روتین بافتی پردازش، و برش‌های ۵ میکرومتری از آن‌ها تهیه شد. به این ترتیب که پلیت سلولی تمایز یافته در دستگاه کشت Micro Mass، ابتدا به مدت ۲ ساعت در پارافرمالدهید ٤ درصد فیکس شد. سپس با استفاده از الکل و گزیلل به ترتیب، آب‌گیری و شفاف‌سازی شده، در پارافین قالب‌گیری شد و با استفاده از میکروتوم، برش‌های ۵ میکرومتری تهیه گردید. برای رنگ‌آمیزی، رنگ تولوئیدین آبی (Sigma; Germany) به مدت ۳۰ ثانیه در دمای اتاق به مقاطع بافتی اضافه گردید و در انتها رنگ اضافی با آب مقطر شسته شد.

RT-PCR: در روش RT-PCR پس از لیز نمودن سلول‌ها به کمک محلول RNAX (CinaGen Inc., Tehran, Iran) و استخراج RNA سلولی، با استفاده از RevertAid ^{TM} H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas) از روی RNA حاصل cDNA در حجم بالا ساخته شده و سپس PCR در حجم ۲۵ میکرولیتر با dNTPs (Fermentas) به حجم ۱۰ میکرولیتر (۲۰۰ نانومولار)، $MgCl_2$ به حجم ۳ میکرولیتر (۱/۵ میلی‌مولار) و آنزیم DNA Taq polymerase (Fermentas) به حجم ۲/۵ میکرولیتر و ۱۰۰ پیکومول از پرایمرهای ژن‌های اختصاصی بافت استخوان شامل Osteocalcin، Osteopontin و Collagen type Iα2، بافت چربی شامل PPAR-alpha، PPAR- gamma و LPL و بافت غضروف شامل کلاژن نوع II، کلاژن نوع X و اگریکان انجام شد. پرایمرهای مورد استفاده به همراه دمای Annealing هر کدام در جدول یک نشان داده شده است.

نتایج

کشت سلول‌ها: کشت سلولی، روزانه با میکروسکوپ مرحله کنتراست مشاهده شد. بر اساس این مشاهدات، در کشت اولیه کلون‌هایی از سلول‌های فیبروبلاستی ظاهر شد (شکل A ۱) و با گذشت زمان رشد کرد، به طوری که ۸ روز پس از آغاز کشت تک‌لایه‌ای از سلول‌های دوکی‌شکل تشکیل شد (شکل B ۱). سلول‌های فیبروبلاستی مغز استخوان با انجام سه پاساژ متوالی تکثیر شدند. این سلول‌ها، ریخت‌شناسی فیبروبلاستی خود را در طی دوره کشت حفظ کردند (شکل C ۱). سرعت رشد سلول‌ها

[Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2026-11-22]

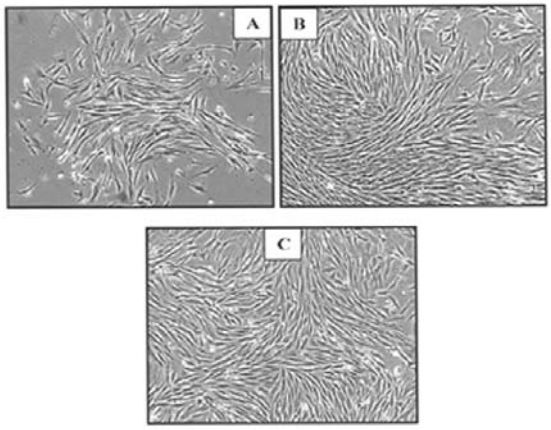
در زمان پاساژ سلولی افزایش یافت، به طوری که هر پاساژ سلولی در طی ٦ روز سطح کشت را پر می کرد.

تمایز

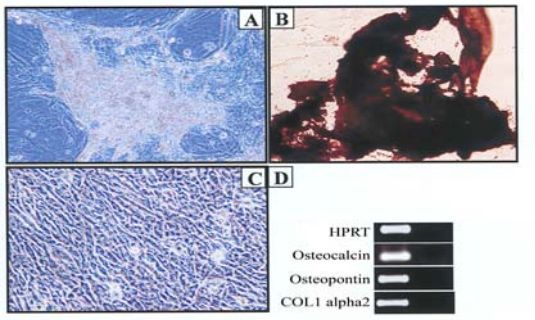
تمایز به استخوان: این کشت هر روز با میکروسکوپ معکوس مشاهده شد. اولین نشانه‌های تغییرات ریخت‌شناسی و تمایز به استخوان یک هفته پس از القای تمایز مشاهده گردید، بدین ترتیب که در مناطقی از تک لایه سلولی، توده‌های سلولی تشکیل شد و به تدریج بزرگ‌تر شد (شکل 2A). در روز ٢١ (پایان دوره کشت تمایز) تعداد فراوانی توده در ظرف کشت قابل مشاهده بود. در این زمان، کشت تمایزی سلول، خاتمه داده شد و سلول‌ها از نظر ترشح ماتریکس معدنی با روش آلیزارین قرمز ارزیابی شدند که حاصل آن قرمز شدن توده‌های مذکور بود (شکل ٢ B). در کشت کنترل که سلول‌ها در معرض محیط معمولی فاقد مواد القاکننده تمایز به استخوان قرار داشتند، توده‌های سلولی تشکیل نشد و این کشت با آلیزارین قرمز رنگ نشد (شکل ٢ C). بر اساس نتایج RT-PCR در کشت تمایز، ژن‌های ویژه رده‌ی استخوانی شامل استئوکلسین، استئوپونتین و کلاژن نوع I بیان شده بود در حالی که در گروه کنترل اثری از بیان این ژن‌ها نبود (شکل ٢ D).

تمایز به چربی: اولین قطرات چربی ٣ روز پس از آغاز کشت در برخی از سلول‌ها مشاهده شد. این قطرات به تدریج در سایر سلول‌ها نیز ظاهر شد، به طوری که در پایان دوره تمایز (روز ٢١)، اغلب سلول‌ها حاوی قطرات چربی بودند (شکل ٣ A). قطرات چربی، به دنبال رنگ‌آمیزی اویل رد، قرمزرنگ شدند (شکل ٣ B)، در مقابل در سلول‌های کنترل که به مدت ٢١ روز در محیط فاقد مواد چربی‌زا قرار داشتند، قطره چربی تشکیل نشد (شکل ٣ C). نتایج RT-PCR حاکی از بیان ژن‌های اختصاصی سلول‌های چربی شامل PPAR alpha، LPL و PPAR بود و در گروه کنترل ژنی بیان نشد (شکل ٣ D).

تمایز به غضروف: در برش‌های تهیه شده از کشت تمایز به غضروف، که با تولوئیدین آبی رنگ‌آمیزی شدند، مناطق بنفش-رنگ متاکروماتیک مشاهده شد (شکل ٤ A) در حالی که در گروه کنترل، برش‌ها آبی‌رنگ شدند (شکل ٤ B). بر اساس RT-PCR انجام شده ژن‌های ویژه غضروف یعنی کلاژن II، X و آگریکان در سلول‌های تمایزیافته بیان شده بود ولی در گروه کنترل ژنی بیان نشد (شکل ٤ C).

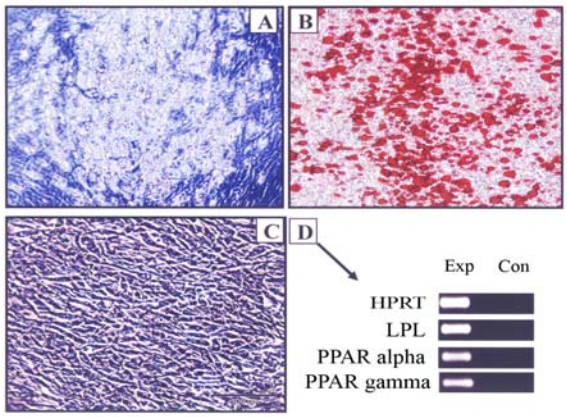


شکل ١- کشت سلول‌های مغز استخوان خرگوش. A) یک کلون سلولی در کشت اولیه. B) تک‌لایه سلولی حاصل از به هم پیوستن کلون‌ها در کشت اولیه. C) با تکثیر سلول‌های از طریق سه پاساژ متوالی، ریخت‌شناسی فیبروبلاستی همچنان حفظ شد (درشت نمایی ٤٠×، میکروسکوپ مرحله کنتراست)

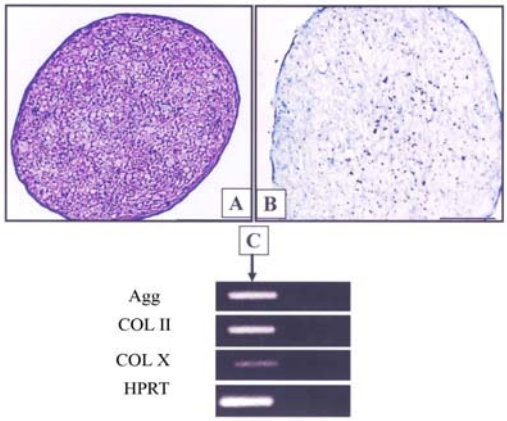


شکل ٢- تمایز به استخوان سلول‌های بنیادی مزانشیمی خرگوش A) یک توده سلولی در کشت استخوان‌ساز. B) رنگ‌آمیزی آلیزارین قرمز توده C) در گروه کنترل، توده سلولی تشکیل نشد D) آنالیز بیان ژن‌های ویژه استخوانی از طریق RT-PCR

[Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2026-11-22]



شکل۳- تمایز به چربی سلول‌های بنیادی مزانشیمی خرگوش. A) ۲۱ روز پس از آغاز تمایز، در سیتوپلاسم اغلب سلول‌ها قطرات چربی جمع شد. این قطرات در رنگ‌آمیزی اویل رد (B) قرمز شد. C) در گروه کنترل سلول چربی مشاهده نشد. D) آنالیز RT-PCR بیان ژن‌های اختصاصی چربی را نشان داد.



شکل ٤- تمایز به غضروف سلول‌های بنیادی مزانشیمی خرگوش. A) رنگ‌آمیزی تولوئیدن آبی برش‌های تهیه شده از کشت غضروف‌ساز خاصیت متاکرومازی را به خوبی نشان داد، در حالی که در گروه کنترل (B) این خاصیت دیده نشد. C) در بررسی RT-PCR بیان ژن‌های ویژه غضروفی در گروه تمایز به خوبی آشکار بود.

جدول ۱- پرایمرهای مورد استفاده در RT-PCR

	Gene name	Direction	Sequence	Annealing Temperature	Product size	PCR Cycle
Primers of osteogenic genes	Osteopontin	Forward	5′-GACCAAGGAACAATCACCAC-3′	56	305	34
		Reverse	5′-TCATCGTCCTCATCCTCATC-3′			
	Osteocalcin	Forward	5′-ACAAGAGATTCAGCGACT-3′	56	254	34
		Reverse	5′-GGTTCTTGGCTTCCTGTTTC-3′			
	Collagen type I2α	Forward	5′-GTCTACCCAAAGCACCAG-3′	56	250	34
		Reverse	5′-GGTGCTGCTGGTAAAGAAGG-3′			
Primers of adipogenic genes	PPAR-alpha	Forward	5′-TGTGTATGGCTGAGACG-3′	58	551	34
		Reverse	5′-CATCTTTTGGAGGAGTTTGG-3′			
	PPAR- gamma	Forward	5′-CAGGAGCAGAGCAAAGAA-3′	58	576	34
		Reverse	5′-GTCCGTCTCCGTCTTCTTTA-3′			
	LPL	Forward	5′-GCCGACCAAGGAAATGAC-3′	57	265	34
		Reverse	5′-GTAACAGCCAGTCCACCAC-3′			
Primers of Chondrogenic genes	Collagen type II	Forward	5′-GTGGAAGAGCGGTGACTAC-3′	56	296	34
		Reverse	5′-TAGGTGATGTTCTGGGAGC-3′			
	Collagen type X	Forward	5′-CTGTTATTCTCTCCAAAGC-3′	56	195	34
		Reverse	5′-GCGTGCCATTCTTATACAGG-3′			
	Aggrecan	Forward	5′-GATACACCCTGGACTTCG-3′	56	191	34
		Reverse	5′-CTCATCCTTGTCTCCGTAGC-3′			
	HPRT	Forward	5′-CCAAGGAAAGCAAGGTCTG-3′	55	230	32
		Reverse	5′-AGTTCTTTGCTGACCTGCTG-3′			

[Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2026-11-22]

بحث

در مطالعه‌ی حاضر با کشت مغز استخوان آسپیره شده از استخوان درشت نی خرگوش، سلول‌های بنیادی مزانشیمی موجود در آن جداسازی و تکثیر شد تا توان آنها در تمایز به سه رده استخوانی، غضروفی و چربی ارزیابی گردد. اگرچه سلول‌های بنیادی مزانشیمی خرگوش مکررا در مطالعات مرتبط با سلول-درمانی تجربی استفاده شده، با این وجود توان تمایزی این سلول‌ها در محیط کشت کمتر بررسی شده است. لذا در تحقیق حاضر این موضوع مورد توجه قرار گرفت و نتایج حاصل نشان داد که سلول‌های بنیادی مزانشیمی این گونه حیوانی از نظر تمایز سه ظرفیتی بوده، قادرند با فراهم شدن شرایط مناسب در محیط آزمایشگاه، به سه رده‌ی استخوانی، غضروفی چربی تمایز یابند. یکی از مشکلاتی که در ارتباط با سلول‌های بنیادی مزانشیمی همچنان حل نشده باقی‌مانده، مساله شناسه‌های سطح سلولی است. اهمیت این شناسه‌ها، در جداسازی سلول‌های بنیادی مزانشیمی از مغز استخوان و بازشناسی آنها پس از تکثیر در محیط کشت است. تا به حال، در مورد سلول‌های بنیادی مزانشیمی انسانی چندین شناسه سطح سلولی نظیر SH-2، SH-3 و SH-4 معرفی شده است (٢٩-٢٨) که مختص سلول‌های انسانی بوده و در سلول‌های گونه‌های حیوانی بیان نمی‌شوند. اخیرا ما در مطالعه‌ای دریافتیم که در کشت سلول‌های بنیادی مزانشیمی موش، بیان شناسه‌ای موسوم به آنتی‌ژن Thy 1.2 به طور معنی‌داری افزایش می‌یابد که پیشنهاد شد این شناسه می‌تواند در غنی‌سازی سلول‌های بنیادی موشی قابل استفاده باشد [١٥]. به هر حال، تا به حال در مورد سلول‌های بنیادی مزانشیمی خرگوش شناسه‌ای معرفی نشده است. به همین دلیل محققین معتقدند که در چنین مواردی بهترین آزمون تشخیصی سلول، بررسی توان تمایزی آن‌هاست [٤] که با توجه به نتایج تحقیق حاضر مبنی بر توان تمایزی سلول‌های جدا شده، ماهیت بنیادی مزانشیمی آنها به خوبی روشن است. یکی از نکات جالب در مطالعه حاضر، بیان ژن کلاژن X در کشت تمایزی غضروف بود. باید خاطرنشان کرد که بیان این ژن معمولا شاخص سلول‌های غضروفی هیپرتروفه در آغاز فرآیند استخوان‌سازی داخل غضروفی است که در دوران تکوین و در بافت‌های اسکلتی جایی که نمونه-ی غضروفی از بین می‌رود و استخوان جایگزین آن می‌شود اتفاق می‌افتد [٣٠]. بیان این ژن که البته متصل کم‌رنگی در RT-PCR تشکیل داد نشان‌دهنده‌ی آغاز پدیده استخوان‌سازی داخل غضروفی در شرایط کشت تمایزی ما بود. به نظر می‌رسد از این تمایز می‌توان به عنوان نمونه استخوان‌سازی داخل غضروفی در شرایط آزمایشگاهی استفاده کرد. این یافته ما موافق نتایج Johnstone و همکاران در سال ١٩٩٨ است که به طور ویژه تمایز به غضروف سلول‌های بنیادی مزانشیمی خرگوش را مورد مطالعه قرار دادند [٢٦]. در کشت تمایز به استخوان تحقیق حاضر، شاید مهم‌ترین نکته قابل توجه، مشاهده تشکیل توده‌های سلولی در کشت و وقوع تمایز به استخوان در این توده‌ها بود. البته وقوع چنین پدیده‌ای در کشت تمایز به استخوان سایر گونه‌ها نیز توصیف شده است. اخیرا ما در مطالعه‌ای، مشاهده کردیم که در کشت تمایز به استخوان سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از مغز استخوان موش نیز توده‌های مشابهی تشکیل می‌شود [١٦]. در تحقیق حاضر، حدود نیم میلی‌لیتر مغز استخوان آسپیره شده از استخوان درشت نی خرگوش، بدون حذف گلبول‌های قرمز آن کشت گردید و با انجام چند پاساژ، جمعیتی از سلول‌های بنیادی مزانشیمی با ریخت‌شناسی فیبروبلاستی ظاهر گردید. در مطالعات پیشین برای جداسازی سلول بنیادی مزانشیمی از مغز استخوان خرگوش، پیش از کشت مغز استخوان، به منظور حذف گلبول‌های قرمز از روش بارگیری مغز استخوان بر روی فایکول و انجام چندین مرحله سانتریفوژ استفاده شده است [٢٦-٢١]. از معایب این روش این است که دو مرحله سانتریفوژ به مدت حدودا ١٥ دقیقه دارد که سبب می‌شود سلول‌ها در خارج از بدن و انکوباتور تحت استرس دمایی محیط و استرس مکانیکی حاصل از سانتریفوژ قرار گیرند. مهم‌تر این که در حین جمع‌آوری لایه سلول‌های هسته‌دار، بخشی از آنها در لوله سانتریفوژ باقی‌مانده و دور ریخته می‌شود. لذا برای انجام کشت با این روش (Gradient Centrifuge)، معمولا مغز استخوان بیشتری (در حدود ٥ میلی-لیتر) لازم است که آسپیره کردن این مقدار مغز استخوان از حیوان، خود استرس‌زا می‌باشد. نتایج مطالعه حاضر نشان داد که از میزان کم مغز استخوان (نیم میلی‌لیتر) و بدون استفاده از سانتریفوژ گرادیان نیز می‌توان سلول بنیادی مزانشیمی استخراج و تکثیر کرد.

نتیجه‌گیری

روی هم رفته می‌توان گفت که سلول‌های بنیادی مزانشیمی جدا شده از مغز استخوان خرگوش همانند سایر رده‌ها Tripotent بوده، قادرند با فراهم شدن شرایط مناسب در محیط آزمایشگاهی به سلول‌های رده‌ی استخوانی، غضروفی و چربی تمایز یابند.

تشکر و قدر دانی

مطالعه‌ی حاضر بخشی از طرح مصوب پژوهشکده رویان بوده و نویسندگان مراتب تقدیر و تشکر خود را از مسوولین پژوهشکده ابراز می دارند.

[Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2026-11-22]

References:

[1] Friedenstein AJ. Chailakhjan RK. Lalykina KS. The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells. ***Cell Tissue Kinet*** 1970; 3: 393-403.
[2] Piersma AH. Brockbank KG. Ploemacher RE. Van Vliet E. Brakel-van Peer KM. Visser PJ. Characterization of fibroblastic stromal cells from murine bone marrow. ***Exp Hematol*** 1985; 13: 237-243.
[3] Owen M. Marrow stromal stem cells. ***J Cell Sci*** 1988; 3: 63-76.
[4] Pittenger MF. Mackay AM. Beck SC. Jaiswal RK. Douglas R. Mosca JD. et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. ***Science*** 1999; 248: 143-147.
[5] Sugaya K. Potential use of stem cells in neuroreplacement therapies for neurodegenerative diseases ***Int Rev Cytol*** 2003; 228: 1-30.
[6] Chapel A. Bertho JM. Bensidhoum M. Fouillard L. Young RG. Frick J. et al. Mesenchymal stem cells home to injured tissues when co-infused with hematopoietic cells to treat a radiation-induced multi-organ failure syndrome. ***J Gene Med*** 2003; 5: 1028-1038.
[7] Grinnemo KH. Mansson A. Dellgren G. Klingberg D. Wardell E. Drvota V. et al. Xenoreactivity and engraftment of human mesenchymal stem cells transplanted into infarcted rat myocardium. ***J Thorac Cardiovasc Surg*** 2004; 127: 1293-1300.
[8] Herrera MB. Bussolati B. Bruno S. Fonsato V. Romanazzi GM. Camussi G. Mesenchymal stem cells contribute to the renal repair of acute tubular epithelial injury. ***Int J Mol Med*** 2004; 14: 1035-1041.
[9] Prochop DJ. Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues. ***Science*** 1997; 276: 71-74.
[10] Horwitz EM. Prockop DJ. Gordon PL. Koo WW. Fitzpatrick LA. Neel MD. et al. Clinical responses to bone marrow transplantation in children with severe osteogenesis imperfecta. ***Blood*** 2001; 97: 1227-1231.
[11] Ishaug SL. Crane GM. Miller MJ. Yasko AW. Yaszemsski MJ. Mikos AG. Bone formation by three-dimensional stromal osteoblast culture in biodegradable polymer scaffolds. ***J Biomed Mater Res*** 1997; 36: 17-28.
[12] Petite H. Viateau V. Bensaid W. Meunier A. Pollak C. Bourguignon M. et al. Tissue-engineered bone regeneration. ***Nat Biotechnol*** 2000; 18: 959-963.
[13] Kadiyala S. Young RG. Thiede MA. Bruder SP. Culture expanded canine mesenchymal stem cells possess osteochondrogenic potential in vivo and in vitro ***Cell Transplant*** 1997; 6: 125-134.
[14] Martin DR. Cox NR. Hathcock TL. Niemeyer GP. Baker HJ. Isolation and characterization of multipotential mesenchymal stem cells from feline bone marrow. ***Exp Hematol*** 2002; 30: 879-886.
[15] 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: 351-364.
[16] 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: 361-370.
[17] Minguell JJ. Erices A. Conget P. Mesenchymal stem cells. ***Exp Biol Med*** 2001; 226: 507-520.
[18] Vogel W. Gruneback F. Messam CA. Kanz L. Brugger W. Buhring HJ. Heterogeneity among human bone marrow-derived mesenchymal stem cells and neural progenitor cells***Haematologica*** 2003; 88: 126-133.
[19] Simmons PJ. Torok-Storb B. CD34 expression by stromal precursors in normal human adult bone marrow.***Blood*** 1991; 78: 2848-2853.
[20] Dominci M. Le Blanc K. Mueller I. Slaper-Cortenbach I. Marini FC. Krause DS. et. al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. ***Cytotherapy*** 2006; 4: 315-317.
[21] Wang JA. Li CL. Fan YQ. He H. Sun Y. Allograftic bone marrow-derived mesenchymal stem cells transplanted into heart infarcted model of rabbit to renovate infarcted heart. ***J Zhejiang Uni Sci*** 2004; 5: 1279-1285.
[22] Sakai D. Mochida MD. Iwashina T. Watanabe T. Nakai T. Ando K. et al. Differentiation of mesenchymal stem cells transplanted to a rabbit degenerative disc model. ***Spine*** 2005; 21: 2379-2387.
[23] Fialkov JA. Holy CE. Shoichet MS. Davies JE. In vivo bone engineering in a rabbit femur. ***J Craniofac Surg*** 2003; 14: 324-332.
[24] Wakitani S. Goto T. Young RG. Mansour JM. Caplan AI. Goldberg VM. Mesenchymal cell-based repair of large, full-thickness defects of articular cartilage. ***J Bone Joint Surg Am*** 1994; 76: 579-592.
[25] Shao X. Goh JC. Hutmacher DW. Lee EH. Zigang G. Repair of large articular osteochondral defects using hybrid scaffolds and bone marrow-derived mesenchymal stem cells in a rabbit model. ***Tissue Eng*** 2006; 12: 1539-1551.
[26] Johnstone B. Hering TM. Caplan AI. Goldberg VM. Yoo JU. In vitro chondrogenesis of bone marrow-derived mesenchymal progenitor cells. ***Exp Cell Res*** 1998; 238: 265-272.
[27] Weissman IL. Translating stem and progenitor cell biology to the clinic: barriers and opportunities. ***Science*** 2000; 287: 1442-1446.
[28] Barry FP. Boynton RE. Haynesworth S. Murphy JM. Zaia J. The monoclonal antibody SH-2, raised against human mesenchymal stem cells, recognizes an epitope on endoglin (CD105). ***Bioch Biophys Res*** 1999; 265: 134-139.
[29] Haynesworth SE. Baber MA. Caplan AI. Cell surface antigens on human marrow-derived mesenchymal cells are detected by monoclonal antibodies. ***Bone*** 1992; 13: 69-80.
[30] Hall BK. Chondrocyte diversity, Bones and cartilage: developmental and evolutionary skeletal biology, first edition. Amsterdam, Elsevier Academic Press, 2005. p. 301-312.

[Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2026-11-22]