مطالعه اثر سلول‌های بنیادی مزانشیمی رت به عنوان لایه تغذیه‌کننده در جداسازی و کشت سلول‌های بنیادی جنینی موش

نسیم فرقانی[1*](M.Sc)، مهدی کدیور [2](Ph.D)، پریچهر یغمایی [1](Ph.D)، سعیده کارگر [2](M.Sc)، لیلی قاضی‌زاده [1](M.Sc)

۱- *دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات تهران*

۲- *انستیتوپاستور ایران، بخش بیوشیمی*

چکیده

سابقه و هدف: سلول‌های بنیادی جنینی سلول‌های پرتوانی هستند که از توده سلولی داخلی بلاستوسیست مشتق می‌شوند. برای سلول‌های بنیادی جنینی اکثر گونه‌ها، لایه تغذیه‌کننده و سیتوکاین‌ها جزء الزامات کشت است. هدف اصلی از این مطالعه، استفاده از سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان رت به عنوان لایه تغذیه‌کننده در جداسازی و کشت سلو ل‌های بنیادی جنینی موش بود.

مواد و روش‌ها: ابتدا سلول‌های بنیادی مزانشیمی از مغز استخوان رت استخراج شده و در محیط DMEM و ۱۰٪ سرم جنین گاوی کشت داده شدند. برای اطمینان از ماهیت مزانشیمی آن‌ها، سلول‌های کشت داده شده به مدت ۲۱ روز در حضور مواد القاکننده تمایز به استخوان کشت شدند و در پایان این مدت تمایز سلولی با رنگ‌آمیزی اختصاصی بررسی شد. بلاستوسیست‌ها از موش‌های حامله نژاد Balb/c به دست آمدند و بر روی لایه تغذیه‌کننده MSC و محیط DMEM و ۱۰٪ FBS کشت داده شدند. ۲ روز بعد از کشت، زونا پلوسیدا خارج شد، سلول‌های چسبیده به لایه تغذیه‌کننده تریپسینه شده و توده سلولی داخلی به خوشه‌های کوچک چند سلولی تبدیل شد. سپس توده‌های حاصل بر روی پلیت‌های ۱۲ خانه‌ای پوشیده شده با MSC ها قرار گرفت. هیچ‌گونه ماده رشد یا سایتوکاین به محیط اضافه نشد. ۲-۳ روز پس از پاساژ، کلونی‌هایی تشکیل شد که بر اساس مورفولوژی به کلونی‌های ESCs شباهت داشتند. مطابق روش فوق، کلونی‌های حاصل تا دو بار دیگر بر روی MSC ها پاساژ داده شدند و نهایتاً ماهیت کلونی‌های رشد کرده حاصل از طریق بررسی‌های مورفولوژیک و نیز رنگ‌آمیزی با آلکالین فسفاتاز مورد بررسی قرار گرفت.

یافته‌ها: در این مطالعه سلول‌های بنیادی مزانشیمی به راحتی با استفاده از محیط DMEM کشت داده شدند. ماهیت مزانشیمی سلول‌های حاصل که از لحاظ مورفولوژی، فیبروبلاستی بودند با تمایز به توده‌های استخوانی و رنگ‌پذیری با آلیزلرین رد تایید شد. با استفاده از محیط DMEM و به‌کارگیری سلول‌های مزانشیمی کشت شده به عنوان لایه تغذیه‌کننده سلول‌های بنیادی جنینی موش بدون استفاده از هرگونه سایتوکاین و محرک رشد کشت شدند. پس از انجام پاساژ سلولی، کلونی‌هایی تشکیل شد، که این کلونی‌ها تا دو پاساژ دیگر هم کشت شدند که هر بار بر میزان تشکیل آن‌ها افزوده می‌شد و در نهایت ماهیت بنیادی این کلونی‌ها با رنگ‌آمیزی آلکالین فسفاتاز اثبات شد.

نتیجه‌گیری: نتایج حاصل از تحقیق نشان داد سلول‌های بنیادی مزانشیمی جدا شده از مغز استخوان رت توان تمایزی به رده‌های استخوانی را دارند و می‌توان از آن‌ها به عنوان لایه تغذیه‌کننده برای جداسازی و کشت و تشکیل کلونی‌های سلول‌های بنیادی جنینی استفاده کرد. این روش با حذف نیاز سایتوکاین‌ها و محرک‌های رشد، روشی ساده و کارا برای جداسازی و کشت کلونی‌های سلول‌های بنیادی جنینی می‌تواند باشد.

واژه‌های کلیدی: سلول‌های بنیادی مزانشیمی، سلول‌های بنیادی جنینی، لایه تغذیه‌کننده

مقدمه

سلول‌های بنیادی جنینی از توده سلولی داخلی بلاستوسیست‌ها مشتق می‌شوند. این سلول‌ها هیچ محدودیتی برای خود تکثیری و تمایز به رده‌های گوناگون ندارند [۱]. هنگامی‌که سلول‌های بنیادی جنینیEmberyonic stem cells (ESC) برروی فیدرلایرها یا در حضور فاکتور بازدارنده لوسمی (LIF) کشت می‌شوند، آن‌ها در حالت عدم تمایز باقی می‌مانند [۲] و هنگامی‌که به سوسپانسیون کشت فاقد LIF

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۹۱۴۴۳۱۵۲۱۵ نمابر: ۲۲۳۳۳۷۶ - ۰۴۳۱

Email: nasim_forgani@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۱۳۸۷/۱۰/۳۰ تاریخ پذیرش: ۱۳۸۸/۲/۹

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-07-31]

منتقل می‌شوند، سلول‌های بنیادی شروع به تمایز می‌کنند و توده چند سلولی سه بعدی را تشکیل می‌دهند که اجسام جنینی (EB) نامیده می‌شوند که سه لایه اصلی جنینی را تشکیل می‌دهد. سلول‌های بنیادی جنینی می‌توانند به انواع مختلف سلول‌ها مانند سلول‌های خون‌ساز، سلول‌های عصبی، قلبی، اندوتلیال، استخوان و... تمایز یابند [۳]. سلول‌های بنیادی جنینی و اجسام جنینی به عنوان مدل‌های تحقیقاتی مفیدی در جنین‌شناسی و مهندسی بافت می‌باشند و یک منبع بالقوه‌ای از سلول‌ها برای پیوند هستند [۱].

نخستین بار در سال ۱۹۸۱، سلول‌های بنیادی جنینی از توده سلولی داخلی بلاستوسیست موشی توسط اوانس و کافمن تولید شدند [۴]. هم‌چنین تامسون و همکارانش هم در سال ۱۹۹۸ تولید سلول‌های بنیادی جنینی انسان را گزارش کردند [۵]. تا کنون سلول‌های بنیادی جنینی از گونه‌های مختلف جانوری مثل انسان، موش، میمون، نخستین‌ها و غیره بیش‌تر در مرحله بلاستوسیست تهیه شده [۷،۶] و استفاده‌های وسیعی از آن‌ها در تحقیقات جدید بیوتکنولوژی حاصل شده است [۹،۸]. سلول‌های جدا شده از توده سلولی داخلی یا تمایز می‌یابند و یا سلول‌هایی با مورفولوژی سلول‌های بنیادی جنینی تولید می‌کنند، که آلکالین فسفاتاز را بیان نموده و قادرند کاریوتیپ طبیعی خود را حفظ نمایند [۵].

سلول‌های بنیادی مزانشیمی که نوعی سلول بنیادی بزرگسال به شمار می‌روند، برای اولین بار توسط فریدنشتاین شناسایی و معرفی شدند. در آن زمان، مهم‌ترین ویژگی این سلول‌ها، توان تمایز آن‌ها به کلون‌هایی مشابه با استخوان و غضروف توصیف شد [۱۰]. از طرفی با توجه به این‌که سلول‌های بنیادی مزانشیمی به راحتی از نمونه‌های مغز استخوان قابل استخراج بوده و در شرایط کشت به راحتی تکثیر می‌یابند و سلول مناسبی برای استفاده در مطالعات مرتبط با ژن درمانی، سلول درمانی و مهندسی بافت به ویژه استخوان در نظر گرفته می‌شوند [۱۲،۱۱]. به‌طوری‌که امروزه از سلول‌های بنیادی مزانشیمی به عنوان سلول‌های تغذیه‌کننده مخصوصاً در کشت سلول‌های بنیادی خون‌ساز استفاده می‌کنند.

برای کشت سلول‌های بنیادی جنینی در اکثر گونه‌ها لایه تغذیه‌کننده لازم و ضروری است. از طرفی احتمالاً لایه‌های تغذیه‌کننده، سایتوکاین‌ها یا فاکتورهای رشدی ترشح می‌کنند، یا این‌که سوبسترای مناسب برای اتصال را فراهم می‌نمایند. هم‌چنین با تکثیر ICM بر سلول‌های تغذیه‌کننده و پاساژ آن‌ها بر روی سلول‌های مذکور کلونی‌هایی تشکیل می‌شود که می‌توان آن‌ها را برای مدت طولانی کشت داد و یا منجمد کرد. لذا بر این اساس سلول‌های بنیادی جنینی در شرایط مطلوب حالت غیرتمایزی و کاریوتیپ خود را برای سال‌ها حفظ می‌کنند [۱۴،۱۳]

با توجه به این‌که مکانیسم‌های نگهدارنده خود تجدیدی در سلول‌های بنیادی هنوز نامعلوم می‌باشد، لذا بهینه‌سازی یک سیستم کشت مناسب که بتواند به‌طور مؤثری جداسازی سلول‌های بنیادی را حمایت کند، آسان نیست [۱۵].

بنابراین در مطالعات پیشین برای بهبود وضعیت جداسازی و کشت سلول‌های بنیادی جنینی موشی از انواع لایه‌های تغذیه‌کننده استفاده شده است. به طوری که مارتین از سلول‌های بنیادی تراتوکارسینوما به عنوان لایه تغذیه‌کننده برای کشت سلول‌های بنیادی جنینی موشی استفاده کرد [۱۶]. بعد از این STO (MEF های نامیرا)، سلول‌های Buffallo rat liver ، سلول‌های rat myocardial به عنوان لایه تغذیه‌کننده مورد استفاده قرار گرفتند [۱۸،۱۷].

اخیراً بعضی از محققین تمایز سلول‌های بنیادی جنینی به همه دودمان‌های خونی مانند اریتروئیدها، میلوئیدها، لنفوسیت‌ها و مگاکاریوسیت‌ها را در درون شیشه نشان داده‌اند [۱۹–۲۵]. برای مثال، ناکانو و همکارانش گزارش کردند که با رشد و هم کشتی سلول‌های بنیادی جنینی بر روی لایه تغذیه‌کننده‌ای که از مغز استخوان استرومایی مشتق شده، سلول‌های خونی به‌دست آمده است [۱۹].

در این تحقیق سعی بر آن شد تا پس از جداسازی سلول‌های بنیادی مزانشیمی (MSC)، از مغز استخوان ران رت

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-07-31]

و تمایز آن‌ها به سمت استئوسیتی- برای اطمینان از ماهیت مزانشیمی سلول‌های جدا شده و کشت یافته- بلاستوسیست‌ها را بر روی لایه تغذیه‌کننده MSC و بدون افزودن سایتوکاینی قرار دادیم، تا مراحل مختلف بیرون‌زدگی و رشد و گسترش سلولی و تشکیل کلونی‌های سلولی تمایز نیافته را بر روی لایه تغذیه‌کننده و بدون اثر کمکی مواد دیگر مورد مطالعه قرار دهیم.

مواد و روش‌ها

جداسازی و کشت سلول های بنیادی مزانشیمی. ابتدا ۴ سر رت نر، به وزن تقریبی ۱۵۰ تا ۲۰۰ گرم، که از انستیتوپاستور تهیه شدند، به روش بی‌هوش کردن توسط کلروفرم کشته و در شرایط کاملاً استریل استخوان ران آن‌ها جدا شده و محتویات مغز استخوان آن‌ها با استفاده از فلاشینگ محیط (DMEM) به درون لوله‌های فالکون تخلیه شد. سپس آسپیره حاصل به مدت ۴ دقیقه در دور rpm ۱۴۰۰ سانتریفوژ شد و رسوب سلولی حاصل درون فلاسک‌های کشت سلولی حاوی محیط DMEM به همراه ۱۰٪ سرم جنین گاوی (FBS) کشت داده شد. پس از ۲۴ ساعت محیط رویی خارج شده و سلول‌های چسبیده به کف فلاسک نگه داشته شدند. محیط کشت سلول‌ها هر ۳-۴ روز تعویض شد و پس از این‌که سلول‌ها تمام سطح ظرف را پر کردند پاساژ سلولی با استفاده از تریپسین ۰/۰۵ ٪ و EDTA ۰/۰۲٪ صورت گرفت. از پاساژ ۴ به بعد از سلولهای بنیادی مزانشیمی به عنوان لایه تغذیه کننده استفاده شد. و فعالیت میتوزی آن‌ها با میتومایسین C غیرفعال گردید.

تمایز به سمت استئوسیت‌ها. به منظور تعیین هویت سلول‌های جدا شده از مغز استخوان، در این مطالعه از آزمایش تمایز به سمت رده‌های استئوسیتی استفاده شد. محیط تمایز به استئوسیت شامل DMEM حاوی ۵۰Mμ آسکوربیک اسید، ۱۰۰nM دگزامتازون و ۱۰ mM بتاگلیسرول فسفات است که سلول‌ها به مدت ۲۱ روز تحت تاثیر این محیط قرار گرفتند. سپس برای ارزیابی تمایز، رنگ‌آمیزی با آلیزارین‌رد به منظور تشخیص ذخایر کلسیمی صورت گرفت. برای این رنگ‌آمیزی، ابتدا پس از تخلیه محیط رویی، سلول‌ها با PBS شسته شده و با پارافرمالدئید ۴٪ به مدت یک ساعت فیکس شدند. سپس رنگ آلیزارین‌رد (۲گرم پودر آلیزارین‌رد در ml ۱۰۰ آب حل شد و فیلتر گردید و PH آن در محدوده ۴/۱ -۴/۳ تنظیم شد) (Sigma, USA) به مدت ۳۰ دقیقه بر روی سلول‌ها قرار گرفت و پس از این مدت سلول‌ها شسته شده و در زیر میکروسکوپ مشاهده شدند.

تهیه جنین. برای این منظور از موش‌های (Balb/c ۱۰-۸ هفته‌ای) استفاده شد. (موش‌ها از انستیتوپاستور تهیه شدند). به منظور تحریک تخمک‌گذاری موش‌های ماده، مقدار IU ۱۰هورمون گنادوتروپین سرم مادیان آبستن (PMSG)، هم‌چنین پس از ۴۸ ساعت IU ۱۰هورمون (HCG) از طریق داخل صفاقی تزریق شد و پس از جفت‌گیری و بررسی پلاک واژنی، ۴ روز بعد موش‌ها با جابه‌جایی مهره‌های گردنی کشته شدند و لوله‌های رحمی آن‌ها خارج شد و جنین‌ها با عمل فلاشینگ در محیط کشت DMEM که با روغن معدنی پوشیده شده بود قرار گرفتند و در زیر میکروسکوپ، بلاستوسیست‌ها شناسایی و با پیپت دهانی برداشته شدند و به داخل پلیت‌های ۱۲ خانه‌ای که قبلاً با سلول‌های تغذیه‌کننده MSC پوشیده شده بود، انتقال یافتند. البته باید ذکر شود که روش نمونه‌گیری تصادفی بود و ۱۵۰ جنینی را که در مرحله بلاستوسیست بودند بر روی لایه تغذیه‌کننده قرار دادیم و خروج زوناپلوسیدا، رشد، پاساژ و تشکیل کلونی سلول‌های بنیادی را با دقت بررسی کردیم.

کشت بلاستوسیست‌ها و جدا کردن توده سلولی داخلی. بلاستوسیست‌ها بعد از این‌که بر روی لایه تغذیه‌کننده مذکور قرار گرفتند، ۲ روز بعد زونا پلوسیدا خارج شده و توسط سلول‌های تروفو اکتودرمی به کف پلیت چسبیده و شروع به رشد می‌نمایند. به این صورت که سلول‌های تروفو اکتودرمی در سطح و توده سلولی داخلی (ICM) به صورت سه بعدی و گنبدی شکل رشد می‌کند، سپس توسط روش مکانیکی و به

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-07-31]

کمک پیپت دهانی ICM ها را از سلول‌های تروفواکتودرمی جدا کرده و بر روی قطرات ۲,۵٪ Trypsin/EDTA گذاشته و چندین بار پی‌پتاژ می‌کنیم تا توده سلولی به سلول‌های منفرد تبدیل شوند، مقداری FBS به سلول‌های منفرد شده اضافه می‌کنیم تا تریپسین خنثی شود، سپس به منظور بررسی رشد و تکثیر توده سلولی و تشکیل کلونی، سلول‌های منفرد شده یا خوشه‌های کوچک سلولی بر روی سلول‌های تغذیه کننده قرار داده شد، که این اولین پاساژ محسوب گردید. پاساژ کلونی‌ها تا دو بار دیگر هم طبق روش گفته شده انجام گردید.

بیان فعالیت آلکالین فسفاتاز (AP). بیان فعالیت AP در کلونی‌های سلول‌های بنیادی (ES) با رنگ‌آمیزی آلکالین فسفاتاز تعیین شد به‌همین خاطر محیط کشت از کشت‌ها خارج شده و سلول‌ها با 1% (W/V) paraformaldehyde - 7.5% (w/v) sucrose فیکس شدند. سپس سلول‌ها سه بار در بافر Tris-Hcl با PH=۹/۵ (۱۰۰mM Tris-Hcl و ۵۰mM NaCl و ۵۰mM $MgCL_2$ و ۱٪ Tween-20) هر ۱۰ دقیقه شستشو داده شدند. محلول رنگ‌آمیزی پس از آخرین شستشو اضافه شد. محلول A شامل ۷۵ mg nitroblue tetrazolium salt در ۷۰٪ دی متیل فرمالدئید و محلول B شامل: ۵۰ mg/ml 5-bromo-4-chloro-3-indoly phatetoluicinium Salt (BCIP) در DMF ۱۰۰٪ . فقط قبل از رنگ‌آمیزی، ۴۵ µl از محلول A و ۳۵ µl از محلول B به ۱۰ ml بافر Tris – Hcl اضافه شد. سلول‌های ES ارغوانی – آبی شدند.

بررسی‌های آماری. در تجزیه و تحلیل داده‌ها از روش غیر پارامتریک و از spss-14 استفاده شد که در سطوح خروج زونا پلوسیدا و زمان بیرون‌زدگی و تعداد بلاستوسیست‌های چسبیده به لایه تغذیه‌کننده و میزان زنده ماندنشان و تعداد بلاستوسیست‌هایی که به مرحله پاساژ و تشکیل کلونی رسیده‌اند اختلاف معنی‌داری ($p< ۰/۰۵$) وجود دارد.

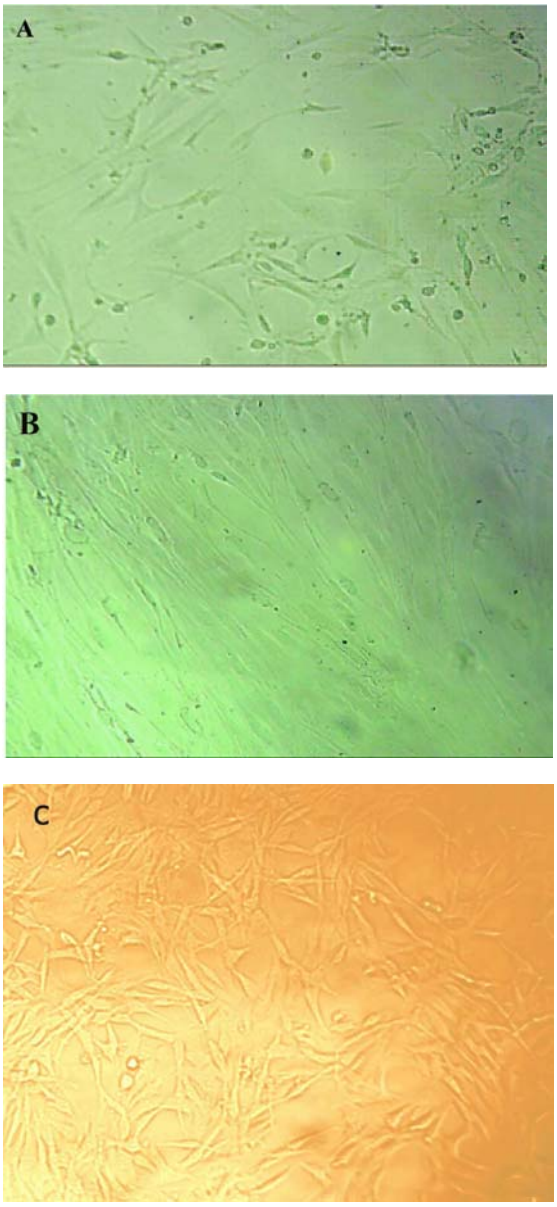
نتایج

مشاهدات مورفولوژی سلول‌های بنیادی مزانشیمی کشت یافته. بر اساس مشاهدات روزانه کشت سلولی، نخست در کشت اولیه کلون‌هایی از سلول‌های فیبروبلاستی چسبیده به کف ظرف ظاهر شد که این کلون‌ها با گذشت زمان گسترش می‌یافتند (شکل۱A). دومین تغییر مرفولوژی مشاهده شده این بود که ده روز پس از آغاز کشت، تک لایه‌ای از سلول‌های دوکی شکل چسبنده تشکیل شد (شکل۱B). و در نهایت سلول‌های فیبروبلاستی مغز استخوان طی پاساژهای متوالی تکثیر شدند. به طوری که این سلول‌ها، ریخت‌شناسی فیبروبلاستی خود را در طی دوره کشت حفظ نمودند (شکل ۱C). **تمایز به استخوان:** سلول‌های کشت داده شده هر روز با میکروسکوپ معکوس بررسی شدند و پس از یک هفته نشانه‌هایی از تغییرات مورفولوژی سلول‌ها مشاهده گردید و پس از ۲۱ روز از القای استئوسیتی، سلول‌ها از نظر ترشح ماتریکس معدنی با رنگ‌آمیزی آلیزارین رد ارزیابی شدند (شکل۲A). و کشت کنترل که در محیط معمولی قرار داشت با آلیزارین رد قرمز رنگ نشد (شکل ۲B).

کشت بلاستوسیست‌ها: سلول‌های بنیادی مزانشیمی وقتی به حدی از رشد رسیدند که کاملاً سطح فلاسک را پر کردند به عنوان لایه تغذیه‌کننده مورد استفاده قرار گرفتند و بلاستوسیست‌هایی که از موش‌های نژاد Balb/c به‌دست آمده بودند بر روی لایه مذکور قرار گرفتند. پس از گذشت ۲ روز جنین‌ها ناحیه زونا را پاره کرده و خارج شدند (شکل ۳) که البته میزان خروج جنین‌ها از زونا پلوسیدا با توجه به این که جنین‌ها در چه مرحله‌ای از بلاستوسیست باشند متفاوت بود.

پس از این‌که جنین‌ها ناحیه زونا را پاره کرده و خارج شدند، به کف پلیت چسبیدند و شروع به رشد کردند به این صورت که توده سلولی داخلی به سمت بالا و سلول‌های تروفواکتودرمی به اطراف رشد کردند. به مدت ۵ روز کشت جنین‌هایی که از ناحیه زونا پلوسیدا خارج شده بودند، بر روی لایه تغذیه‌کننده مانیتور شدند. نمایی از رشد بلاستوسیست‌ها، ۲ و ۵ روز پس از خروج زونا پلوسیدا بر روی لایه‌های تغذیه‌کننده در شکل ۴A و ۴B نشان داده شده است.

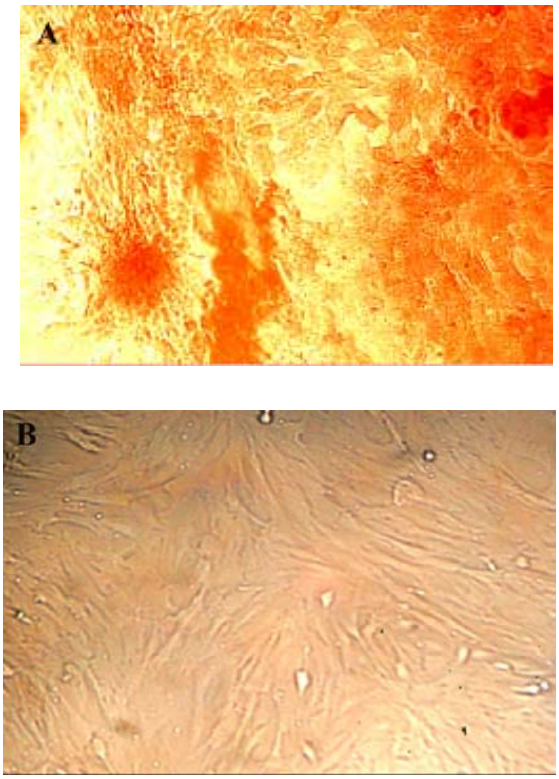
[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-07-31]



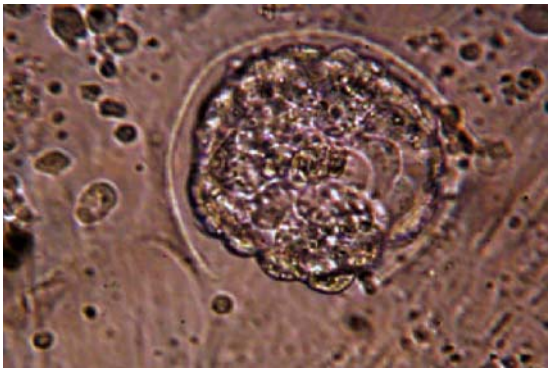
شکل ۱. کشت سلول‌های مغز استخوان رت. A- کلونهایی از سلول‌های فیبروبلاستی چسبیده به کف ظرف را در چند روز اول پس از کشت (درشت نمایی X۱۰). B- تک لایه سلولی حاصل از بهم پیوستن کلونها را در کشت (درشت نمایی X۱۰). C- تکثیر سلولی در طی دو پاساژ، از لحاظ مورفولوژی سلول‌ها فیبروبلاستی هستند (درشت نمایی X۱۰).

کشت توده سلولی داخلی بر روی لایه‌های تغذیه‌کننده:

پس از رشد بلاستوسیست‌ها بر روی لایه‌های تغذیه‌کننده مذکور به روش مکانیکی توده سلولی داخلی را برداشته و آن‌ها را به کمک تریپسین ۲,۵٪ به سلول‌های منفرد و یا خوشه‌های کوچک چند سلولی تبدیل کردیم و بر روی لایه‌های تغذیه‌کننده قرار دادیم و یک‌بار هم توده سلولی



شکل ۲. تمایز سلول‌های MSC به استخوان. A- سلول‌های MSC که به مدت ۲۱ روز در معرض محیط تمایز به استخوان قرار گرفته‌اند و با آلیزارین‌رد رنگ آمیزی شده‌اند (درشت نمایی X۱۰). B- سلول‌های کنترل منفی که به مدت ۲۱ روز در محیط فاقد القاء قرار داشتند و با آلیزارین رنگ قرمز نگرفتند (درشت نمایی X۱۰).



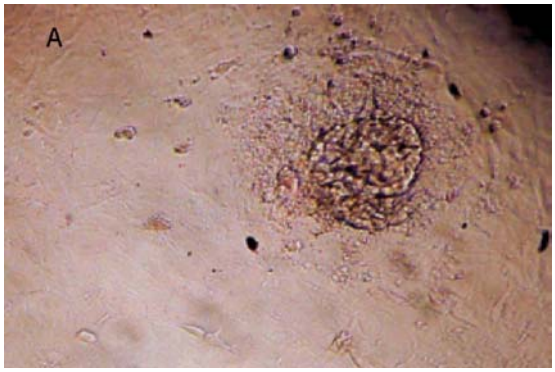
شکل ۳. خروج زوناپلوسیدا، بلاستوسیست قرار گرفته شده بر روی لایه تغذیه کننده مزانشیمی دو روز شروع به خروج زوناپلوسیدا می‌کند و به سلول تغذیه کننده می‌چسبد (درشت نمایی X۲۵).

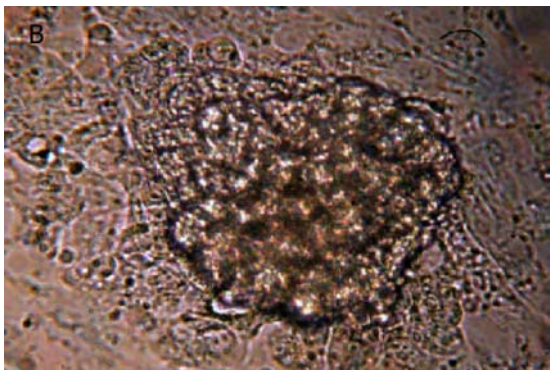
داخلی را به‌صورت کامل کشت دادیم و بعد از ۲-۳ روز نتایج زیر حاصل شد:

در توده سلولی داخلی که به خوشه‌های کوچک چند سلولی تبدیل شده بود شاهد تشکیل کلونی‌هایی بودیم که از طریق مورفولوژی و هم‌چنین با رنگ‌آمیزی آلکالین فسفاتاز

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-07-31]

شناسایی شدند، دو بار دیگر نیز این کلونی‌ها پاساژ داده شدند که هر بار بر میزان تشکیل کلونی‌ها افزوده می‌شد هنگـامی‌کـه کلونی‌ها برای بررسی فعالیت آلکـالین فـسفاتاز رنـگ‌آمیـزی شدند، کلونی‌های تشکیل شده در طی ۳ پاسـاژ، فعالیـت AP مثبت را نشان دادند (شکل ۵ نمایی از تشکیل کلونی و شکل۶ بیان آلکالین فسفاتاز را نشان می‌دهد)

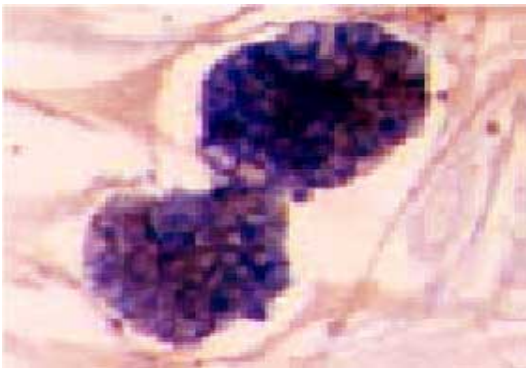




شکل ۴. رشد بلاستوسیست. A- رشـد بلاستوسیـست را دو روز پـس از خروج زونا پلوسیدا، سلول‌های تروفواکتودرمی در سـطح و تـوده سـلولی داخلی به سمت بالا وگنبدی شکل رشد می‌کند (درشت نمایی X۲۵). B- رشد بلاستوسیست را پنج روز پس از خـروج زوناپلوسـیدا، سـلول‌هـای تروفواکتودرمی و توده داخل سلولی تا حد زیادی رشد کـرده‌انـد (درشـت نمایی X۱۰).

اما وقتی توده سلولی داخلی را به صورت کامل بر روی لایـه تغذیه‌کننده قرار دادیم به لایه تغذیه‌کننده نچسبید و کلونی هـم تشکیل نداد و هم‌چنین وقتی توده سلولی داخلی به سلول‌های کاملاً منفرد تبدیل شد، شاهد تشکیل هیچ‌گونه کلونی نبـودیم. ما بهترین نتایج را در توده سلولی تبدیل شده به خوشـه‌هـای کوچک چند سلولی به‌دست آوردیم.

شکل ۵. کلونی‌های سلول‌های بنیادی تشکیل شده در پاساژ سوم (درشـت نمایی X۲۵)



شکل ۶. کلونی‌های رنگ آمیزی شده با آلکالین فسفاتاز، کلونی‌ها به رنگ آبی – ارغوانی مشاهده می‌شوند و نشان دهنده عدم تمایز ایـن کلـونی‌هـا می‌باشد.(درشت نمایی X۴۰)

بحث و نتیجه‌گیری

هدف اصلی در این تحقیق اهمیت فاکتورهای مترشـحه از سلول‌های بنیادی مزانشیمی مـشتق از مغـز اسـتخوان رت در کشت بلاستوسیست‌ها و تشکیل کلونی‌های سلول‌های بنیـادی بود. همان‌طور که اشاره شده برای اطمینان از این‌که سلول‌های کشت یافته مزاشیمی هستند، سلول‌هـای چـسبنده حاصـل از پاساژ سوم، از لحاظ تمایز به استخوان بـا رنـگ آلیـزارین رد مورد بررسی قرار گرفتند. از طرفی با توجه به این‌که موضـوع تمایز به استخوان از لحاظ سـلول درمـانی و پیونـد آن‌هـا در ضایعات استخوانی اهمیت فراوان دارد این سلول‌ها بر خـلاف سایر سلول‌ها مارکر ویژه‌ای را بیان نمی‌کنند، بنابراین شناسایی این سلول‌ها با بهره‌گیـری از یـک شـاخص منحـصر بـه فـرد امکان‌پذیر نیست [۲۶]، اعتقاد بر این است که تنها راه اطمینان از ماهیت مزانشیمی جدا شده، بررسی پتانسیل تمایز به دو یـا

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-07-31]

چند رده سلولی است [۲۷]. در مطالعه حاضر تمایز به استخوان و مثبت بودن رنگ‌آمیزی آلیزارین رد، ما را به این‌که سلول‌های کشت داده شده، مزانشیمی است متقاعد کرد. لایه تغذیه‌کننده یکی از مهم‌ترین فاکتورهای تأثیرگذار در کشت سلول‌های بنیادی جنینی است. گزارش شده که لایه تغذیه‌کننده می‌تواند بعضی از انواع سایتوکاین‌ها مانند LIF را ترشح نماید که ممکن است رشد سلول‌های بنیادی جنینی را تحریک نماید و از تمایزشان جلوگیری کند [۲۸].

به طور کلی در مطالعات پیشین برای تمایز سلول‌های بنیادی جنینی به سلول‌های خون‌ساز از سلول‌های استرومایی به عنوان لایه تغذیه‌کننده استفاده شده است .اما در مطالعه‌ای که توسط هیانگ انجام شده، او با جداسازی سلول‌های بنیادی مزانشیمی و تمایز آن‌ها به سمت سلول‌های استخوان‌ساز و استفاده از این سلول‌های استخوان‌ساز به عنوان لایه تغذیه‌کننده، شاهد نقش حمایتی بسیار خوبی از این لایه تغذیه‌کننده در کشت سلول‌های بنیادی خون‌ساز خون بند ناف بود [۲۹]. هم‌چنین پژوهش دیگری که توسط جانگ انجام شده، از سلول‌های بنیادی مزانشیمی، بدون افزودن هیچ‌گونه سایتوکینی برای کشت سلول‌های $CD34^+$ خون بند ناف استفاده گردید که او معتقد است با این بررسی‌ها کاربردهای کلینکی و بیولوژیکی سلول‌های بنیادی مزانشیمی افزایش خواهد یافت [۳۰].

ما هم در صدد برآمدیم تا از سلول‌های بنیادی مزانشیمی و بدون افزودن هیچ‌گونه سایتوکینی برای کشت سلول‌های بنیادی جنینی استفاده کنیم تا با مشاهده نتایج مطلوب به‌عنوان از آن‌ها در مطالعات وسیع‌تر استفاده نمود. هیرواکی و همکارانش، در پژوهشی سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از بافت‌های چربی را به عنوان لایه تغذیه‌کننده به‌کار برده‌اند و بررسی‌های آن‌ها نشان داده است که سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از چربی‌ها فاکتورهای مختلفی ترشح می‌کنند که بقا و رشد سلول را حمایت می‌کنند تا حدی که می‌توان آن‌ها را به عنوان لایه تغذیه‌کننده برای سلول‌های اپی تلیال نیز به‌کار برد [۳۱].

با توجه به مطالعات انجام گرفته بر آن شدیم تا نقش حمایتی این لایه تغذیه‌کننده را از مرحله کشت بلاستوسیست تا تشکیل کلونی از توده سلولی داخلی مورد بررسی قرار دهیم و به این برسیم که آیا لایه تغذیه‌کننده مذکور می‌تواند تنها با حضور محیط کشت و بدون افزودن هیچ‌گونه فاکتور رشد و سایتو کینی، سلول‌های بنیادی جنینی را که به عنوان یک منبع نامحدود برای تولید انواع رده‌های سلولی حمایت نماید. از تعداد بلاستوسیست‌هایی که ما بر روی لایه تغذیه‌کننده مزانشیمی قرار دادیم، ۹۶/۸ ٪ جنین‌ها پس از ۲ روز قرار گرفتن بر روی سلول تغذیه‌کننده، از زونا پلوسیدا خارج شدند و سپس ۶۴/۵٪ به سلول تغذیه‌کننده چسبیدند و امکان رشد یافتند و به مرحله جداسازی توده سلولی داخلی و تشکیل کلونی رسیدند. هم‌چنین بررسی‌های ما نشان داد که میزان تشکیل کلونی به نوع توده سلولی داخلی بستگی دارد به عبارتی دیگر توده داخل سلولی تبدیل شده به خوشه‌های کوچک چند سلولی قادر به تشکیل کلونی بود، اما توده سلولی که به‌طور کامل بر روی لایه تغذیه‌کننده قرار گرفت اصلاً به لایه تغذیه‌کننده نچسبید در نتیجه کلونی هم تشکیل نشد و در مورد توده سلولی تبدیل شده به سلول‌های منفرد به این صورت کلونی تشکیل نشد. که البته این شرایط ممکن است ناشی از شرایط کشت آزمایشگاهی و گونه موشی باشد [۳۲،۷].

میزان تشکیل کلونی در طی دو پاساژ بعدی افزایش یافت که این کلونی‌ها با رنگ‌آمیزی آلکالین فسفاتاز شناسایی شدند و مشخص شد که تمایز نیافته‌اند و کلونی‌های سلول‌های بنیادی هستند. ما هیچ نوع تمایزی را در طی سه پاساژ در کلونی‌ها مشاهده نکردیم. از طرفی با توجه به این‌که در برخی پژوهش‌ها اشاره شده بود که سلول‌های بنیادی جنینی موشی بر خلاف سلول‌های بنیادی جنینی انسانی فقط نیازمند LIF هستند و مستقل از فیدر لایر می‌باشند [۱۹]. با بررسی‌های بیش‌تر این موضوع لی و همکارانش نشان دادند که به‌دست آوردن سلول‌های بنیادی جنینی وابسته به نوع و منبع و کیفیت لایه تغذیه‌کننده است [۳۳]. هم‌چنین در این راستا ما در این

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-07-31]

تحقیق بدون استفاده از LIF و تنها با حضور لایه تغذیه‌کننده، البته با لایه تغذیه‌کننده‌ای که به حد رشد نهایی رسیده باشد، توانستیم سلول‌های بنیادی را تا حد ۳ پاساژ و بدون هیچ‌گونه تمایزی پیش ببریم و بتوانیم در تحقیقات وسیع‌تر از آن استفاده نماییم.

نتایج حاصل از تحقیق نشان داد که می‌توان سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان را به سمت رده‌های استخوانی تمایز دهیم و به بدون افزودن هیچ‌گونه سایتوکینی به عنوان لایه تغذیه‌کننده در جداسازی و کشت سلول‌های بنیادی جنینی استفاده نماییم. به‌طوری‌که این روش با حذف نیاز سایتوکاین‌ها و محرک‌های رشد، روشی ساده و کارا برای جداسازی و کشت کلونی‌های سلول‌های بنیادی جنینی می‌تواند باشد.

هم‌چنین در این تحقیق کلونی‌های توده سلولی داخلی با روش خرد کردن به شیوه مکانیکی تهیه شد و مورفولوژی آن‌ها به صورت توده پهن یک لایه سلولی با محدوده مشخص و جداره سیتوپلاسمی نامشخص و چند هسته واضح به عنوان اولین علامت موفق کشت سلول‌های توده داخلی بر روی لایه تغذیه‌کننده MSC تعیین شد وعدم تمایز آن‌ها هم‌چنین با رنگ‌آمیزی آلکالین فسفاتاز تعیین گردید.

تشکر و قدردانی

این تحقیق با حمایت‌های مالی انستیتوپاستور تهران و در بخش بیوشیمی پاستور انجام شده است. با تشکر از زحمات تمام کارکنان بخش بیوشیمی.

منابع

[1] Odorico JS, Kaufman DS. and Thomson JA. Multilineage differentiation from human embryonic stem cell lines. Stem Cells 2001; 19: 193-204.

[2] Shamblott MJ, Axelman J, Sterneckert J, Christoforou N, Patterson ES, Siddiqi MA, Kahler H, Ifeanyi LA, Gearhart LD (2002) Stem cell culture: Pluripotent stem cells. In: Atala A, Lanza RP (ed) Methods of Tissue Engineering. Academic Press, San Diego, pp 411-428.

[3] Itskovitz-Eldor J, Schuldiner M, Karsenti D, Eden A, Yanuka O, Amit M. and et al. Differentiation of human embryonic stem cells into embryoid bodies compromising the three embryonic germ layers. Mol Med 2000; 6: 88-95.

[4] Evans MJ. and Kaufman MH. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. Nature 1981; 292: 154-156.

[5] Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Wakintz MA, Swiergel JJ, Marshall VS. and Jones JM. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. Science 1998; 282:1154-1147.

[6] Pera MF, Reubinoff B, and Trounson A. Human embryonic stem cell. J Cell Sci. 2000; 113: 5-10.

[7] Bongso A, Fong CY, Ng SC. and Ratnam S. Isolation and culture of inner cell mass cells from human blastocysts. Human Reprod 1994; 9: 2110-2117.

[8] Gardner RL. Stem cells: Potency, Plasticity and Public perception. J Anat 2002; 200: 277-282.

[9] Sato M. and Nakano T. Embryonic stem cell. Intern Med 2001; 40: 195-200.

[10] Friedenstein AJ. Chailakhjan RK. and 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.

[11] Prochop DJ. Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues. Science 1997; 276: 71-74.

[12] Horwitz EM. Prockop DJ, Gordon PL, Koo WW, Fitzpatrick LA, Neel MD and et al. Clinical responses to bone marrow transplantation in children with severe osteogenesis imperfecta. Blood 2001; 97: 1227-1231.

[13] Baharvand H. and Matthaei KI. Culture Condition Difference for estabilishment of new embryonic stem cell lines from the C57BL/6 and Balb/c mouse steains. In Vitro Cell Dev Biol Anim 2004; 40: 76-81.

[14] Baharvand H, Ashtiani SK, Valojerdi MR, Shahverdi A, Taee A. and Sabour D. Establishment and in vitro differentiation of a new embryonic stem cell line from human blastocysts. Differentiation 2004; 72: 224-229.

[15] Niwa H. Molecular mechanism to maintain stem cell renewal of ES cells. Cell Struct Funct 2001; 26: 137-48.

[16] Martin GR. Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. Proc Natl Acad Sci U S A 1981; 78: 7634-7638

[17] Smit TA. and Hooper ML, Medium conditioned by feeder cells inhibits the deferentiation of embryonal carcinoma cultures. Exp Cell Res 1983; 145: 458-462.

[18] Tong Y, Zou JH, Shang KG. Establishment of a C57BL/6J ES cell line by conditioned media of rat myocardial cells. Acta Sci Nat Univ Pekin 2000; 36: 472-476

[19] Nakano T, Kodama H. and Honjo T. Generation of lympohematopoietic cells from embryonic cells in culture. Science 1994; 265: 1098-1101.

[20] Li F, Lu S, Vida L, Thomson JA. and Honig GR. Bone morphogenetic protein 4 induces efficient hematopoietic differentiation of rhuesus monkey embryonic stem cells in vitro. Blood 2001; 98: 335-342.

[21] Palacios R, Golunski E. and Samarids J. In vitro generation of hematopoietic stem cells from an embryonic stem cell line. Proc Natl Acad Sci U S A 1995; 92: 7530-7534.

[22] Bigas A, Martin DI. and Bernstein ID. Generation of hematopoietic colony-forming cells from embryonic stem cells: Synergy between a soluble factor from NIH-3T3 cells and hematopoietic growth factors. Blood 1995; 85: 3127-3133.

[23] Nakayama N, Fang I. and Elliott G. Natural killer and B-lymphoid potential in CD34+ cells derived from embryonic stem cells differentiated in the presences of vascular endothelial growth factor. Blood 1998; 91: 2283-2295.

[24] Hole N, Graham GJ, Menzel U. and Ansell JD. A limited temporal window for the derivation of multilineage repopulating hematopoietic progenitors during embryonal stem cell differentiation in vitro. Blood 1996; 88: 1266-1276.

[25] Sainteny F. Production of hematopoietic cells from ES cells. J Soc Biol 2001; 195: 13-18.

[26] Seshi B, Kumar S. and Sellers D. Human bone marrow stromal cell, coexpression of markers specific for multiple mesenchymal cell lineages. Blood Cells Moll Dis 2000; 26: 234-246.

[27] Alhadlaq A. and Mao JJ. Tissue-engineered neogenesis of human-shaped mandibular condyle from rat mesenchymal stem cells. J Dent Res 2003; 82: 951-956.

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-07-31]

[28] Smit AG, Health JK, Donaldson DD, Wong GG, Moureau J, Stahl M. and Rogers D. Inhibition of pluripotential embryonic stem cell differentiation purified polypeptides. Nature 1998; 336: 688-690.

[29] Huang XB, Liu T, Meng WT. and Zhi W. Osteoblasts differentiated from human marrow bone mesenchymal stem cells support hematopoietic stem/progenitor cells from umbilical cord blood. Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi 2006; 14: 552-556.

[30] Jang YK, Jung DH, Jung MH, Kim DH, Yoo KH, Sung KW. and et al. Mesenchymal stem cells feeder layer from human umbilical cord blood for ex vivo expanded growth and proliferation of hematopoietic progenitor cells. Ann Hematol 2006; 85: 212-225.

[31] Sugiyama H, Maeda K, Yamato M, Hayashi R, Soma T, Hayashida Y. and et al. Human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells as a novel feeder layer for epithelial cells. J Tissue Eng Regen Med 2008; 2: 445-449.

[32] Kawase E, Suemori H, Takahashi N, Okazaki K, Kashimoto K. and Nakatsuji N. Strain difference in establishment of mouse embryonic stem (ES) cell lines. Int J Dev Biol 1994; 38: 385-390.

[33] Li M, Ma W, Hou Y, Sun XF, Sun QY. and Wang WH. Improved isolation and culture of embryonic stem cells from Chinese miniature pig. J Reprod Dev 2004; 50: 237-244.

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-07-31]

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-07-31]

Effects of rat mesenchymal stem cells as a feeder layer in isolation and culture of mouse embryonic stem cells

Nasim Forghani (M.Sc.)[*1], Mehdi Kadivar (Ph.D)[2], Parechehr Yagmaei (Ph.D)[1], Saeedeh Kargar (M.Sc)[2], Leili Ghazizadeh (M.Sc)[1]

1 - Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

2- Dept. of Biochemistry, Pasteur Institute of Tehran Tehran, Iran

(Received: 19 Jan 2009 Accepted: 26 Apr 2009)

Introduction: Embryonic stem cells (ESCs) are pluripotent cells derived from the inner cell mass (ICM) of blastocysts. A feeder layer and cytokines are necessary for culture of these embryonic cells in most species. The aim of this study was application of rat mesenchymal stem cells (MSCs) as a feeder layer for the isolation and culture of mouse embryonic stem cells.

Materials and Methods: Mesenchymal stem cells were isolated from rat bone marrow and cultured in DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) medium supplemented with 10% FBS (fetal bovine serum). To verify the isolated cells, they were affected by osteocyte differentiation inducer to become bone mass. After twenty-one days, the differentiation was evaluated by Alizarin red staining. Blastocysts were obtained from Balb/c pregnant mice and cultured on this MSCs feeder layer. Two days later; after hatching of blastocysts, the cells were trypsinized and the inner cell mass dissociated to the small cell clumps. These clumps were cultured on 12-well plates covered by the same MSCs without applying any cytokines or growth inducer. Two to three days after the passage, colonies appeared which were similar to embryonic stem cell colonies in morphology. These colonies were passaged two more times using the mentioned procedure and their identities were examined by morphological observation and alkalin phosphatase staining.

Results: In this study we could easily cultured MSCs using DMEM media. The mesenchimic origin of cultured cells, which showed fibroblastic morphology, was proved by differentiation to bone masses using osteocyte inducer and detection with Alizarin red. By applying DMEM media and MSCs cells, as feeder layer, we could culture ESC without any need to cytokines or growth factors. After passage to the inner cell mass colonies were formed. These colonies were formed in two more other passages. The colonies were verified with alkalin phosphatase assay.

Conclusion: Results of this study showed mesenchymal stem cells isolated from rat bone marrow can differentiate to osteoblaste line and can be used as feeder layer for isolation, culture and forming embryonic stem cells colonies. This method, by using MSCs as feeder layer and bypassing the need of cytokine and growth factors, seems to be a simple efficient method for culture and isolation of embryonic stem cells.

Key words: Rat Mesenchymal stem cells, Embryonic stem cells, Feeder layer.

* Corresponding author Fax: +98 431 2233376; Tel: +98 914 431 5215
nasim_forgani@yahoo.com

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-07-31]