خون
فصلنامه پژوهشی
دوره ۱۵ شماره ۳ پاییز ۹۷ (۲۲۵-۲۱۰)

مقاله پژوهشی

تاثیر سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان رت بر میزان آپوپتوز و بیان نشانگرهای سطح سلولی CD33 و CD34 جهت رهیافت درمانی لوسمی میلوئیدی مزمن

داود نجفی[۱]، عزت‌اله فتحی[۲]، راحله فرحزادی[۳]

چکیده

سابقه و هدف

مقاومت دارویی در لوسمی میلوئیدی مزمن، یکی از چالش‌ها در درمان این بیماری می‌باشد. در این مطالعه با هدف القای آپوپتوز در سلول‌های رده سلولی K562 (لوسمی میلوئیدی مزمن) و سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از مغز استخوان رت (rBMSCs) جهت بررسی مارکرهای سطح سلولی CD33 و CD34 و هم چنین درصد آپوپتوز صورت گرفته، هم کشتی این دو رده سلولی انجام شد.

مواد و روش‌ها

در یک مطالعه تجربی، پس از جداسازی rBMSCs ، این سلول‌ها به لحاظ تمایز به استخوان، چربی و غضروف شناسایی و هم چنین از نظر بیان مارکرهای سطحی CD90 ، CD105 ، CD45 و CD56 تعیین ماهیت شدند. سپس سلول‌های K562 جهت بررسی مارکرهای سطح سلولی CD33 و CD34 و آپوپتوز با استفاده از روش فلوسیتومتری جمع‌آوری گردیدند.

یافته‌ها

نتایج حاصل از ایمنوفنوتایپینگ سلول‌ها حاکی از بیان مثبت CD90 و CD105 و بیان منفی CD45 و CD56 بوده و بیان مارکرهای سطح سلولی CD33 و CD34 در رده سلولی K562 در حضور rBMSCs به ترتیب به میزان ۴۵/۲٪ و ۷۶/۵٪ افزایش یافت. القای آپوپتوز در رده سلولی K562 به طور معنادار و به میزان ۵۶/۶٪ در مقایسه با گروه کنترل افزایش نشان داد($p< ۰/۰۵$).

نتیجه گیری

مطالعه حاضر نشان داد، هم‌کشتی رده سلولی K562 با rBMSCs سبب افزایش معنادار در میزان بیان مارکرهای سطح سلولی CD33 و CD34 و القای آپوپتوز در رده سلولی K562 می‌شود. این تاثیر می‌تواند از طریق فاکتورها و سیتوکاین‌های مترشحه از سلول‌های بنیادی مزانشیمی باشد. هر چند که ارزیابی بهتر این سیتوکاین-ها از نظر نوع آن‌ها در مطالعه‌های آینده توصیه می‌شود.

کلمات کلیدی: **لوسمی میلوئیدی مزمن، سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان، آپوپتوز، هم‌کشتی**

تاریخ دریافت: ۹۶/۱۲/۵
تاریخ پذیرش: ۹۷/۲/۱۹

۱- دکترای عمومی دامپزشکی ـ دانشکده دامپزشکی دانشگاه تبریز ـ تبریز ـ ایران
۲- مؤلف مسئول: متخصص کلینیکال پاتولوژی دامپزشکی ـ گروه علوم درمانگاهی ـ دانشیار دانشکده دامپزشکی دانشگاه تبریز ـ تبریز ـ روبروی شهرک خاوران ـ ایران ـ کد پستی: ۵۱۶۶۶۱۶۴۷۱
۳- متخصص بیوشیمی بالینی ـ استادیار مرکز تحقیقات هماتولوژی و انکولوژی دانشگاه علوم پزشکی تبریز ـ تبریز ـ ایران

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-11-01]

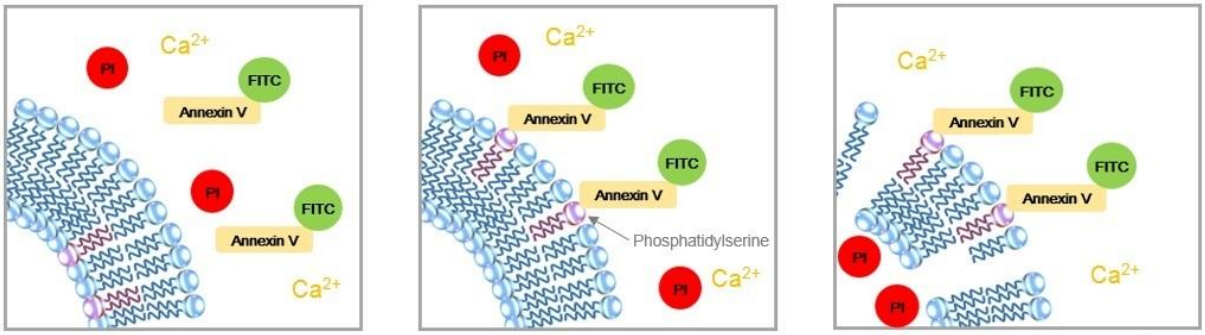
مقدمه

لوسمی میلوئیدی مزمن یا CML (Chronic myeloid leukemia)، یک سرطان میلوپرولیفراتیو است که ۱۵٪ تا ۲۰٪ کل لوسمی‌های افراد بالغ را تشکیل داده و احتمالاً بیشترین مطالعه روی بدخیمی‌های انسان روی این بیماری صورت گرفته است(۱). CML توسط کروموزوم فیلادلفیا شناخته می‌شود که در واقع یک ناهنجاری اکتسابی کلونال بوده و از جابه‌جایی کروموزوم‌های ۹ و ۲۲ و تشکیل انکوژن اتصالی BCR-ABL ایجاد می‌گردد. در دهه‌های اخیر تشخیص CML راحت‌تر شده که علت درک عمیق‌تر پاتوژنز مولکولی و تعیین هدف‌دار داروها به منظور عملکرد مناسب در محل مورد نظر می‌باشد(۲).

در اواسط سال‌های ۱۹۷۰، پیوند سلول‌های بنیادی آلوژنیک موجب از بین رفتن کلون‌های pH مثبت در بیماران CML گردید(۳). سلول‌های بنیادی مزانشیمی، سلول‌های چند توان هستند که توان خودنوزایی و هم‌چنین تمایز به انواع دودمان‌های بافت همبند از جمله آدیپوسیت، کندروسیت و استئوسیت را دارا می‌باشند. در تماس مستقیم سلول با سلول، سلول‌های بنیادی مزانشیمی می‌توانند با ترشح سیتوکاین‌ها در فرآیند خونسازی نقش داشته باشند و بدین ترتیب سرنوشت سلول‌های بنیادی خونساز را تعیین می‌کنند(۴). شواهد آزمایشگاهی نشان داده است که سلول‌های بنیادی مزانشیمی می‌توانند موجب توقف رشد سلول‌های توموری در فاز G1 چرخه سلولی شوند(۵). هم چنین مطالعه‌های گسترده‌ای که در زمینه کنترل سلول‌های توموری توسط سلول‌های بنیادی صورت گرفته، نشان داده که سلول‌های بنیادی مزانشیمی می‌توانند موجب مهار رشد تومور گردند (۸-۶). یکی از شواهدی که به هنگام تغییرات مورفولوژیکی و تشکیل بدخیمی‌ها در سلول‌ها قابل پیگیری است، تغییر در بروز و بیان نشانگرهای اختصاصی سطح سلول می‌باشد(۹). از نشانگرهای سطح سلولی موجود در سلول‌های لوسمی میلوئیدی مزمن می‌توان CD33 و CD34 را نام برد. این دو نشانگر در حالت عادی در سطح سلول‌های لوسمی میلوئیدی مزمن در سطح پایینی بیان می‌شوند (۱۰). در حال حاضر نشانگر CD34 شناخته‌شده‌ترین آنتی‌ژن سطح سلولی است که برای تشخیص و جداسازی سلول‌های پیش‌ساز خونساز در تمام رده‌های سلولی به کار می‌رود(۱۱). نشانگر CD33 در ارتباط بین سلول‌ها و پیام رسانی نقش دارد، روی سلول‌های اجدادی میلوئیدی و منوسیتی وجود دارد و تقریباً در مراحل آخر بلوغ میلوسیتی از سلول حذف می‌گردد. آنتی بادی‌های مونوکلونال(MoAbs = Monoclonal antibodies) مولکول CD33 که برای درمان لوسمی میلوئیدی حاد مورد استفاده قرار گرفته است، حتی قبل از اقدام به روش درمانی جایگزینی مغز استخوان در این بیماران، در تشخیص لوسمی حاد از اهمیت بالایی برخوردار بوده‌اند چرا که امکان تشخیص سلول‌های لوسمی میلوئیدی حاد را از دیگر سلول‌های لنفوئیدی – CD33 (فاقد این نشانگر) می‌دهند(۱۲، ۱۱). آپوپتوز یک رخداد طبیعی بوده نقش کلیدی در سیستم ایمنی، تکامل و زندگی طبیعی موجودات بر عهده دارد(۱۳). روش‌های مختلفی برای بررسی و ارزیابی آپوپتوز وجود دارد. یکی از این روش‌ها ارزیابی تغییرات غشای سیتوپلاسمی مانند بروز فسفاتیدیل سرین است. آمینوفسفولیپیدهایی مثل فسفاتیدیل سرین و فسفاتیدیل اتانول آمین در سمت داخل غشایی قرار گرفته‌اند. با شروع آپوپتوز، فسفاتیدیل سرین به سمت خارج غشایی حرکت کرده و در دسترس قرار می‌گیرد(شکل ۱).

امروزه سعی بر این است تا با به کارگیری روش‌های متفاوت، آپوپتوز را القا نمود تا گامی مهم در درمان سرطان و سایر بیماری‌ها برداشته شود(۱۶-۱۴). در مطالعه حاضر با استفاده از هم‌کشتی سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از مغز استخوان و سلول‌های لوسمی K562 در پلیت‌های مخصوص هم‌کشتی، به بررسی روشن ساختن مکانیسم‌های دخیل در سطح سلولی پرداخته شد تا علاوه بر درمان‌های موجود از قبیل شیمی‌درمانی، دارو درمانی، درمان القایی و ... راه را برای روش‌های درمانی جدیدتر برای این بیماری هموارتر سازد. هدف از این مطالعه، بررسی تاثیر سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان رت بر میزان آپوپتوز و بیان نشانگرهای سطح سلولی CD33 و CD34 در رده سلولی لوسمی میلوئیدی مزمن (K562) بود. بدین منظور ابتدا سلول‌های بنیادی مزانشیمی از

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-11-01]



سلول طبیعی مراحل اولیه آپوپتوز مراحل انتهایی آپوپتوز

شکل ۱: دیاگرام سلول‌های سالم و درگیر آپوپتوز همراه با نشانگرهای تشخیص آپوپتوز. در سلول‌های طبیعی، فسفولیپید فسفاتیدیل سرین که دارای بار منفی است به کمک آنزیم فلیپاز در سمت سیتوزولی غشای سلول قرار دارد. با شروع آپوپتوز این فسفولیپید به سمت خارج غشایی سلول می‌رود. در مراحل ابتدایی آپوپتوز که سلول هنوز تمامیت غشایی خود را حفظ کرده است، آنکسین v در حضور کلسیم به فسفاتیدیل سرین اتصال می‌یابد. در این حالت هنوز رنگ PI نمی‌تواند وارد سلول شود چرا که سلول آن را پس می‌زند. در مراحل انتهایی آپوپتوز، سلول تمامیت غشایی خود را از دست داده و بدین ترتیب رنگ PI وارد سلول می‌گردد(BD Biosciences, August 2011).

مغز استخوان رت جدا شده و پس از پاساژهای متوالی به پلیت‌های مخصوص هم کشتی که حاوی سلول‌های K562 بود انتقال داده شدند. تاثیر سلول‌های بنیادی مزانشیمی بر روی آپوپتوز و بیان نشانگرهای سطح سلولی CD33 و CD34 در سلول‌های K562 به وسیله فلوسیتومتری مورد ارزیابی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

مواد و وسایل مصرفی:

مطالعه انجام شده از نوع تجربی بود. تمام مواد شیمیایی مورد استفاده به غیر از مواردی که در متن مقاله اشاره شده است، از شرکت سیگما ـ آلدریچ(آمریکا) و هم چنین تمام ظروف مخصوص کشت سلولی نیز از شرکت پوچئون(کره) تهیه شد.

استخراج سلول:

پس از اخذ موافقت از کمیته اخلاق، پنج سر رت گونه رتوس نوروژیکوس(Rattis mprvegocis) با سن ۶- ۸ هفتگی از مرکز تحقیقات کاربردی و دارویی دانشگاه علوم پزشکی تبریز خریداری گردید. پس از بیهوشی رت‌ها به وسیله داروهای کتامین – زایلازین(کتامین ۵٪ با دوز ۹۰ mg/kg و زایلازین ۲٪ با دوز ۵ mg/kg) و تزریق دوز بالای داروهای بیهوشی، استخوان فمور آن‌ها جدا شد و با افزودن بافر فسفات سالین(PBS) حاوی آنتی‌بیوتیک داخل ظرف مناسب قرار داده شدند. به منظور جداسازی سلول‌های تک هسته‌ای، ابتدا استخوان‌ها چندین مرتبه با بافر PBS حاوی آنتی‌بیوتیک پنی‌سیلین– استرپتومایسین شستشو داده شدند. پس از شستشوی استخوان در شرایط استریل زیر هود، دو انتهای استخوان‌ها بریده شد و با استفاده از سرنگ حاوی PBS از یک طرف استخوان عمل فلاشینگ انجام شد تا محتویات داخل استخوان به درون پتری دیش‌های استریل ریخته شود. سپس این محتویات به وسیله سمپلر و با استفاده از محلول DMEM (Dulbecco’s Modified Eagles Medium) شستشو داده شد و سلول‌ها جمع‌آوری شدند. نمونه‌ها وارد لوله‌های فالکون ۱۵میلی‌لیتر شده و به مدت ۵ دقیقه با دور g ×۳۶۰ سانتریفیوژ شدند. رسوب سلولی حاصل از سانتریفیوژ در یک حجم از PBS حل شده و به داخل فالکون حاوی فایکول برده شد. پس از سانتریفیوژ محلول حاصله در دور g ×۴۰۰ به مدت ۲۵ دقیقه، سه فاز به دست آمد که سلول‌های فاز میانی برداشته شد. این سلول‌ها چندین مرتبه توسط محلول PBS حاوی ۵٪ FBS (Fetal Bovin Serum) شستشو داده شدند و با دور

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-11-01]

g ×۳۶۰ به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ گردیدند. پس از شمارش سلول‌ها با لام نئوبار، در تراکم $۱/۵ \times ۱۰^{۵}$ سلول در هر سانتی‌متر مربع در پلیت شش خانه کشت داده شدند. یک چهارم فضای پلیت کشت سلول پر شده و با محیط DMEM حاوی ۱۰٪ FBS تغذیه شدند(۱۷).

تعویض محیط، پاساژ سلولی و تعیین زمان دوبرابر شدن سلول‌ها:

تعویض محیط کشت سلولی در پلیت‌های شش خانه‌ای هر دو روز یک بار با محیط تازه انجام گرفت. پس از چسبیدن سلول‌های مزانشیمی دوکی شکل و رسیدن به مقدار رشد ۷۰٪ تا ۸۰٪، سلول‌ها تریپسینه و کشت داده شدند(۱۷). جداسازی سلول‌ها از کف فلاسک توسط ۱ تا ۲ میلی‌لیتر محلول تریپسین ۰/۰۴٪ و EDTA ۰/۲۵٪ در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد برای مدت ۲ تا ۳ دقیقه صورت گرفت. با افزودن محیط کشت DMEM حاوی ۱۰٪ FBS به این مجموعه، اثر تریپسین خنثی گردید. سوسپانسیون حاوی سلول به لوله فالکون ۱۵ میلی‌لیتری منتقل شد و با دور g ×۳۶۰ به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ گردید. محیط کشت حاوی ۱۰٪ FBS به سه چاهک دوازده خانه(نسبت ۱ به ۳) افزوده شده و به منظور ایجاد سوسپانسیون سلولی یکنواخت، پیپتاژ گردید، در سه فلاسک با اندازه T25 تقسیم شد و به انکوباتور منتقل گردید. این سلول‌ها تا پاساژ چهارم کشت داده شدند و در تمامی مراحل این تحقیق از سلول‌های پاساژ چهارم استفاده شد. به منظور تعیین زمان دو برابر شدن سلول‌ها، از نرم‌افزار اینترنتی doubling time calculator به آدرس اینترنتی http:/ www. Doubling-time.com استفاده گردید. شمارش سلولی در ساعات ۲۴، ۴۸ و ۷۲ انجام گرفته و داده‌های به دست آمده در اختیار این نرم‌افزار قرار گرفتند.

تایید سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از مغز استخوان توسط فلوسیتومتری:

در این مطالعه با استفاده از روش فلوسیتومتری بررسی نشانگرهای اختصاصی سطح سلول صورت گرفت (۲۰-۱۸). جهت آماده سازی برای فلوسیتومتری، سلول‌ها به داخل فالکون ۱۵ میلی‌لیتری انتقال داده شده و پس از این مرحله ۲ میلی‌لیتر محیط کشت به آن افزوده گردید. فالکون حاوی سوسپانسیون سلولی با دور g ×۳۶۰ به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ شده و رسوب سلولی دو مرتبه با بافر شستشو (PBS حاوی ۳٪ FBS) شستشو داده شد. رسوب سلولی شستشو داده شده با آنتی بادی‌های کونژوگه با فلورسئین ایزوتیوسیانات(برای CD45 ، CD56) و فیکواریترین(برای CD105 ، CD90) مخلوط گردید. پس از ریختن آنتی‌بادی‌ها، حجم نهایی را به ۱۰۰ میکرولیتر رسانده(توسط بافر شستشو) و به مدت ۲۰ دقیقه محلول در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. پس از این مرحله، با ۱ میلی‌لیتر بافر شستشو، شسته شده و سانتریفیوژ گردید. مایع رویی دور ریخته شده و با افزودن ۵۰۰ میکرولیتر از بافر شستشو به درون تیوب‌های جداگانه انتقال داده شد. نمونه‌های حاصل با استفاده از فلوسیتومتر(BD ، بیوساینس، سان‌دیگو) مورد ارزیابی قرار گرفت.

بررسی توان تمایزی سلول‌های بنیادی مزانشیمی به چربی، استخوان و غضروف:

به منظور اطمینان از مزانشیمی بودن و توان تمایزی این سلول‌ها، از محیط تمایزی استخوان، چربی و غضروف برای سلول‌های پاساژ چهارم استفاده گردید. پس از شمارش با لام نئوبار، تعداد ۸×۱۰^{۴} سلول در پلیت‌های شش خانه کشت داده شد. بعد از این که سلول‌ها ۷۰٪ تا ۸۰٪ سطح پلیت شش خانه را پر کردند از محیط تمایز به چربی(با محیط کشت حاوی: DMEM با گلوکز بالا و ۱۰٪ FBS ، ۰/۰۵ میلی‌مولار اسکوربیک اسید، ۰/۱ میکرومولار دگزامتازون، ۱۰۰ نانومولار ایندومتاسین)، محیط تمایز به استخوان(با محیط کشت شامل: DMEM با گلوکز بالا و ۱۰٪ FBS ، ۱۰ میلی‌مولار بتا-گلیسروفسفات، ۰/۰۵ میلی‌مولار اسکوربیک اسید، ۰/۱ میکرومولار دگزامتازون) و محیط تمایزی سلول‌های غضروف[محیط DMEM حاوی ۱۰ نانوگرم فاکتور رشد TGF-β3 (Transforming Growth Factor-β3)، ۱۰

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-11-01]

نانوگرم BMP-6 (Bone morphogenetic protein-6)، ۵۰ میلی‌گرم ITS (Insulin-Transferin Selenium)، ۵/۳۵ میلی‌گرم لینولئیک اسید، ۱٪ سرم گاوی] به مدت ۲۱ روز استفاده گردید. هر ۳ روز یک بار محیط کشت سلول‌ها تعویض می‌شد(۲۳-۲۱). جهت تایید تمایز چندگانه سلول‌ها، رنگ‌آمیزی‌های اویل رد، آلیزارین رد و تولوئیدن بلو به ترتیب جهت بررسی تمایز به استخوان، چربی و غضروف انجام شد.

رنگ‌آمیزی اویل رد:

سلول‌های تمایز یافته به چربی سه مرتبه با PBS شسته شده و با استفاده از پارافرمالدئید ۴٪ به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق فیکس شدند. پس از فیکس، سلول‌ها با آب مقطر شستشو داده شد و پس از خشک شدن ۲ میلی‌لیتر از محلول رنگ‌آمیزی اویل رد(آمریکا، سیگما) روی سلول‌ها اضافه گردید. پس از آن سلول‌ها در ۱۵ دقیقه در دمای اتاق انکوبه شدند. پس از رنگ‌آمیزی چندین مرتبه با آب مقطر شستشو داده و واکوئل‌های چربی ایجاد شده با میکروسکوپ معکوس بررسی شدند.

رنگ‌آمیزی آلیزارین رد:

سلول‌های تمایز یافته به استخوان سه مرتبه با PBS شستشو داده شدند و با استفاده از پارافرمالدئید ۴٪ به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق فیکس شدند. بعد از انجام مرحله فیکساسیون، سلول‌ها با آب مقطر شستشو داده شده و پس از خشک شدن، سلول‌ها در محلول آلیزارین رد(آمریکا، سیگما) ۲٪ (با PH: ۲/۷) انکوبه شدند. در نهایت بعد از اتمام رنگ‌آمیزی، سلول‌ها را با آب مقطر شستشو داده و رسوبات کلسیمی ایجاد شده با استفاده ازمیکروسکوپ معکوس بررسی گردیدند.

رنگ‌آمیزی تولوئیدن بلو:

سلول‌های تمایز یافته به غضروف سه مرتبه با PBS شسته شده و با استفاده از پارافرمالدئید ۴٪ به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق فیکس شدند. بعد از انجام مرحله فیکساسیون، سلول‌ها با آب مقطر شستشو داده شدند و پس از خشک شدن، ۲ میلی‌لیتر از محلول رنگ‌آمیزی تولوئیدن بلو(آلمان، سیگما) روی سلول‌ها اضافه شد. سلول‌ها برای مدت ۱۵ دقیقه در دمای اتاق با رنگ تولوئیدن بلو انکوبه شدند. چندین مرتبه سلول‌ها توسط آب مقطر شستشو داده شدند و رسوبات اگرکان ایجاد شده با استفاده از میکروسکوپ معکوس بررسی شدند.

انجام آزمایش RT-PCR:

برای انجام آزمایش RT-PCR ، کل محتوای RNA سلولی سلول‌های تمایز یافته به استخوان، چربی و غضروف با کیت شرکت یکتا تجهیز آزما استخراج گردید. RNAهای استخراج شده با DNase I (رُوش) تیمار شدند تا در صورت آلودگی نمونه‌ها با DNA ، پاکسازی و خالص‌سازی صورت گیرد. غلظت و خلوص نمونه‌های RNA با روش اسپکتروفتومتری مورد ارزیابی قرار گرفت. نسخه‌برداری معکوس با استفاده از یک میکروگرم RNA استخراج شده، آغازگر راندوم هگزامر و کیت Revert AldTMH Minus First Strand cDNA Synthesis (فرمنتاز) انجام شد. الگوی مورد استفاده برای PCR در آزمایش، cDNA تولید شده بود. مواد مورد نیاز شامل: ۲ میکرولیتر cDNA (۱۰۰ ng/mL)، ۲/۵ میکرولیتر بافر PCR ، ۰/۷۵ میکرولیتر $MgCl_2$ (۵۰ میلی‌مولار)، ۰/۵ میکرولیتر dNTPmix (۱۰ میلی‌مولار)، ۰/۵ میکرولیتر Smar Taq (سیناژن، TAB ۱۱۰C)(۵ unit/µL) و یک میکرولیتراز هر آغازگر(یک میکرومولار) در یک لوله PCR با هم مخلوط شده و حجم لوله با استفاده از آب دو بار تقطیر به ۲۵ میکرولیتر رسانده شد(جدول ۱). محصولات PCR روی آگارز ۱٪ جدا شده و با استفاده از دستگاه ژل داک مشاهده شدند(۲۳، ۱۷). شرایط PCR بدین صورت انجام گردید: الف- واسرشتگی ابتدایی (۵ دقیقه با دمای ۹۳ درجه سانتی‌گراد)، ب- واسرشتگی هر مرحله(۴۵ ثانیه با دمای ۹۳ درجه سانتی‌گراد)، ج- آنیلینگ(بسته به آغازگرهای هر ژن تفاوت می‌کند)، د- اکستنشن هر چرخه(۴۵ ثانیه)، و- اکستنشن زمانی(۱۰

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-11-01]

دقیقه با دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد).

کشت و نگهداری سلول‌های لوسمی رده K562:

سلول‌های K562 پس از خریداری از مرکز انستیتو پاستور به محیط کشت انتقال داده شدند. در آزمایشگاه با محیط کشت RPMI-۱۶۴۰ در شرایط: دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد؛ انکوباتور حاوی ۵٪ CO_2 و ۹۵٪ رطوبت کشت داده شدند. به منظور تعویض محیط کشت، محلول سوسپانسیون سلولی به داخل لوله فالکون انتقال داده شد و سانتریفیوژ گردید(۳۶۰×g به مدت ۵ دقیقه). پس از دور ریختن محلول رویی، با بافر PBS شستشو داده و محیط کشت جدید در زیر هود به آن اضافه گردید. فلاسک حاوی سلول‌ها در داخل انکوباتور قرار گرفت. در مدت زمان کشت و رشد سلول‌ها، به لحاظ رشد، تقسیم سلولی، مورفولوژی و آلودگی محیطی هر روز با میکروسکوپ اینورت مورد بررسی قرار می‌گرفتند (۲۴، ۲۱).

هم‌کشتی سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از مغز استخوان با سلول‌های رده K562:

در این مرحله، با استفاده از پلیت‌های مخصوص هم‌کشتی با قطر منافذ ۰/۴ میکرومتری، هم‌کشتی دو رده سلولی K562 و سلول‌های بنیادی مزانشیمی انجام گرفت. پس از کاشتن تعداد 10^5 از سلول‌های بنیادی مزانشیمی در هر کدام از چاهک‌های بالایی پلیت و گذشت ۲۴ ساعت(به منظور چسبیدن سلول‌ها به کف پلیت)، تعداد 10^6 عدد از سلول‌های K562 (نسبت ۱ به ۱۰) در هر چاهک از پلیت شش خانه کاشته شد. محیط مورد استفاده در هم‌کشتی RPMI دارای ۱۰٪ FBS بود. به مدت هفت روز و با دو بار تعویض محیط کشت، پلیت در داخل انکوباتور(۵٪ CO_2، دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و ۹۵٪ رطوبت) قرار گرفت(۲۶، ۲۵، ۲۱).

بررسی آپوپتوز توسط روش فلوسیتومتری:

برای بررسی و ارزیابی آپوپتوز در سلول‌های رده K562 پس از هم‌کشتی با سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از مغز استخوان، از فلوسیتومتری استفاده گردید(۲۷، ۲۶). به همین منظور کیت Annexin V FITC Apoptosis خریداری شده و پس از آماده‌سازی بافر اتصال(Binding buffer)، جمع‌آوری نمونه‌ها و شستن آن‌ها توسط PBS با سانتریفیوژ با دور ۳۶۰×g به مدت ۵ دقیقه انجام گردید. پس از آن شستشوی دوباره با بافر اتصال صورت گرفته و پس از دور ریختن مایع رویی، ۱۰۰ میکرولیتر بافر اتصال به همراه ۵ میکرولیتر آنکسین V متصل به رنگ FITC به تعداد 10^5 سلول افزوده شد. محلول حاصله به مدت ۲۰ دقیقه در دمای اتاق و در تاریکی انکوبه گردید. پس از سانتریفیوژ با دور ۳۶۰×g به مدت ۵ دقیقه، ۱۹۰ میکرولیتر بافر اتصال و ۱۰ میکرولیتر پروپیدیوم یدید به منظور رنگ‌آمیزی به نمونه‌ها افزوده شد. ۵ دقیقه بعد از افزودن پروپیدیوم یدید، سنجش نمونه‌ها با دستگاه فلوسیتومتری (FACSCalibursystem BD)(بیوساینس، سان‌دیگو) انجام گردید. نتایج حاصل از فلوسیتومتری در یک جدول چهار خانه گزارش می‌گردد: ۱- ناحیه آنکسین V^-/PI^-: در این ناحیه، سلول‌های زنده قرار می‌گیرند. ۲- ناحیه آنکسین V^+/PI^-: در این ناحیه، سلول‌های آپوپتوتیک اولیه قرار دارند. ۳- ناحیه آنکسین V^+/PI^+: در این ناحیه، سلول‌های مرده توسط نکروز و آپوپتوز ثانویه قرار می‌گیرند. ۴- ناحیه آنکسین V^-/PI^+: در این ناحیه، سلول‌های آسیب دیده در طی مراحل آماده‌سازی قرار دارند(آپوپتوز در آن‌ها رخ نداده است).

بررسی نشانگرهای سطح سلولی CD33 و CD34:

جهت بررسی تاثیر هم‌کشتی سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از مغز استخوان رت بر میزان بیان نشانگرهای سطح سلولی CD33 و CD34 سلول‌های رده K562 از روش فلوسیتومتری استفاده شد. در این مرحله سلول‌ها به داخل فالکون ۱۵ میلی‌لیتری انتقال داده شده و همراه با ۲ میلی‌لیتر بافر شستشو(بافر PBS حاوی ۳٪ FBS) سانتریفیوژ (۳۶۰×g ، ۵ دقیقه) و شستشو داده شدند و رسوب سلولی حاصله با آنتی‌بادی‌های کونژوگه با فلورسئین ایزوتیوسیانات(برای CD34) و فیکواریترین

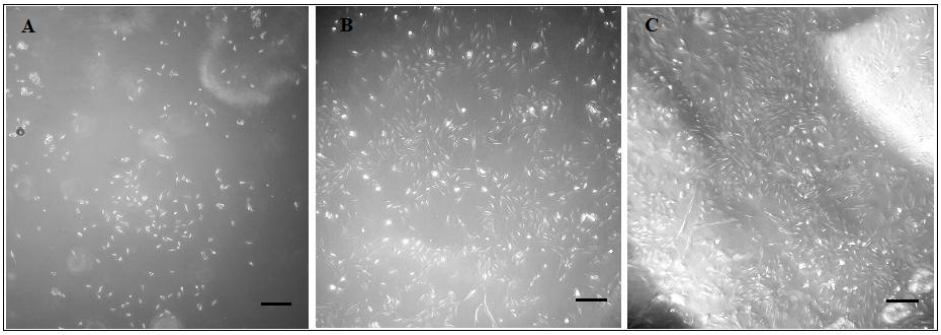
[Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-11-01]

(برای CD33) تیمار شدند. پس از ریختن آنتی‌بادی‌ها، حجم نهایی محلول را با بافر شستشو به ۱۰۰ میکرولیتر رسانده و به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد انکوبه گردید. پس از دو بار سانتریفیوژ کردن به منظور حذف آنتی‌بادی‌های اضافه، ۵۰۰ میکرولیتر بافر شستشو داخل میکروتیوب‌های نمونه ریخته شده و چند بار پیپتاژ گردید. پس از این که سلول‌ها به طور کامل در محلول شناور شدند، داخل لوله آزمایش برده و داخل دستگاه فلوسیتومتر(بیوساینس، سان‌دیگو)(FACSCalibursystem) گذاشته تا عملیات فلوسیتومتری صورت پذیرد(۲۱).

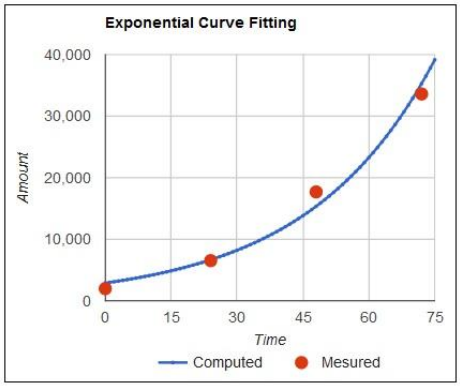
یافته‌ها

کشت، پاساژ و زمان دو برابر شدن سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از مغز استخوان:

طی ساعات اولیه پس از کشت، سلول‌ها هنوز مشخصات سلول‌های فیبروبلاستی را نشان نمی‌دادند به صورتی که این سلول‌ها گرد بوده و دارای هسته‌های نامشخص بودند. سلول‌ها پس از گذشت ۲ روز از کشت، کشیده شده و کمی دوکی شکل شدند و پس از ۷۲ ساعت از نظر مورفولوژی شبیه سلول‌های فیبروبلاست گردیدند.

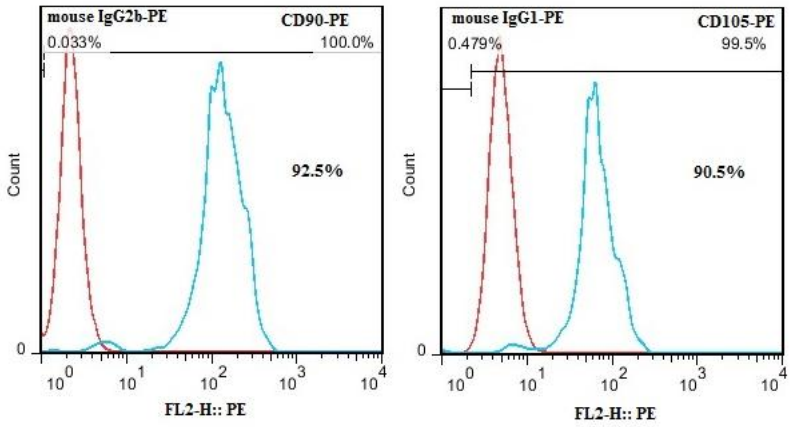


شکل ۲: سلول‌های بنیادی مشتق از مغز استخوان رت. در شکل بالا: (A) سلول‌ها قبل از اتصال حالتی گرد و هسته نامشخص داشتند اما سلول‌های جدا شده از مغز استخوان فمور ۲۴ ساعت بعد کشت اولیه، پس از اتصال به کف ظرف کشت، ظاهری دوکی شکل به خود گرفتند. (B) سلول‌های جدا شده ۵ روز پس از کشت اولیه را نشان می‌دهد که کاملاً کشیده و دوکی شکل شده و ظاهری شبیه به سلول‌های فیبروبلاست پیدا کرده‌اند. (C) سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از مغز استخوان رت در پاساژ ۴. سلول‌ها در این تصویر، کاملاً یک دست بوده و شکل معمول سلول‌های بنیادی مزانشیمی را از خود نشان می‌دهند. در این زمان رشد و تکثیر سلول‌ها بالا رفته است، این سلول‌ها هم‌اکنون مناسب مطالعه هستند(بزرگنمایی ۴۰x).

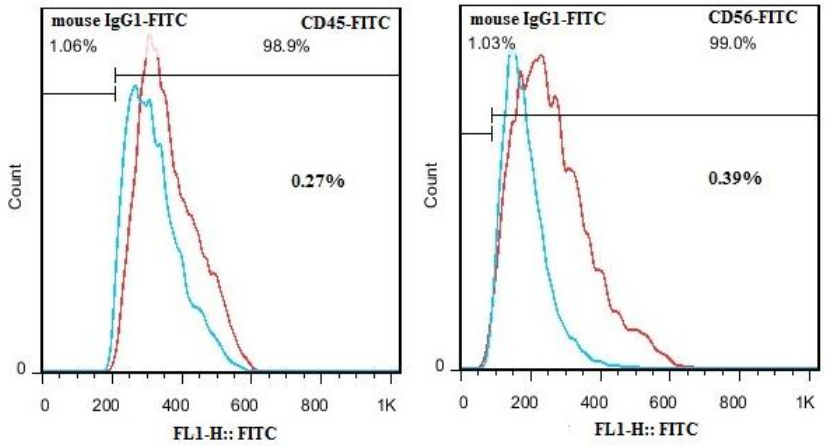


نمودار ۱: زمان دو برابر شدن سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از مغز استخوان رت. در این تصویر، محور عمودی نشان‌دهنده تعداد سلول‌های زنده شمارش شده با استفاده از رنگ‌آمیزی تریپان‌بلو بوده و محور افقی نشان‌دهنده بازه‌های زمانی در ساعات مختلف ۰، ۲۴، ۴۸ و ۷۲ می‌باشد. زمان دو برابر شدن در این سلول‌ها ۱۹/۵ ساعت بود.

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-11-01]



نمودار ۲: آنالیز فلوسیتومتری سلول‌های بنیادی مزانشیمی در مجاورت آنتی‌بادی‌های CD90 و CD105. بیان این نشانگرهای سطح سلولی به ترتیب ۹۲/۵٪ و ۹۰/۵٪ می‌باشد.



نمودار ۳: آنالیز فلوسیتومتری سلول‌های بنیادی مزانشیمی در مجاورت آنتی‌بادی‌های CD45 و CD56. بیان این نشانگرهای سطح سلولی به ترتیب ۰/۲۷٪ و ۰/۳۹٪ می‌باشد.

پس از پاساژ سلولی اول، سرعت دو برابر شدن سلول‌ها تقریباً ۲۰ ساعت بود و سلول‌ها پس از گذشت ۸ و ۱۱ روز به پاساژ ۲ و ۳ رسیدند(شکل۲ و نمودار ۱).

بررسی نشانگرهای سطح سلولی سلول‌های بنیادی مزانشیمی:

با استفاده از نشانگرهای سطح سلولی می‌توان مزانشیمی بودن سلول‌های بنیادی مزانشیمی را اثبات نمود. در این روش بیان نشانگرهای سطح سلولی CD90 ، CD105، CD45 و CD56 مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج آزمون فلوسیتومتری نشان داد که سلول‌های آزمایش شده، نشانگرهای سطح سلولی CD90 و CD105 (مربوط به سلول‌های بنیادی مزانشیمی) را بیان نموده ولی CD56 و CD45 (مربوط به سلول‌های هماتوپوئتیک) را بیان نکردند(نمودارهای ۲ و ۳).

تمایز به چربی:

در این پژوهش قدرت تمایز به سلول‌های چربی نیز مورد بررسی قرار گرفت(شکل ۳A). تمایز BMSCs به سلول‌های چربی با استفاده از رنگ‌آمیزی با اویل رد تایید

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-11-01]

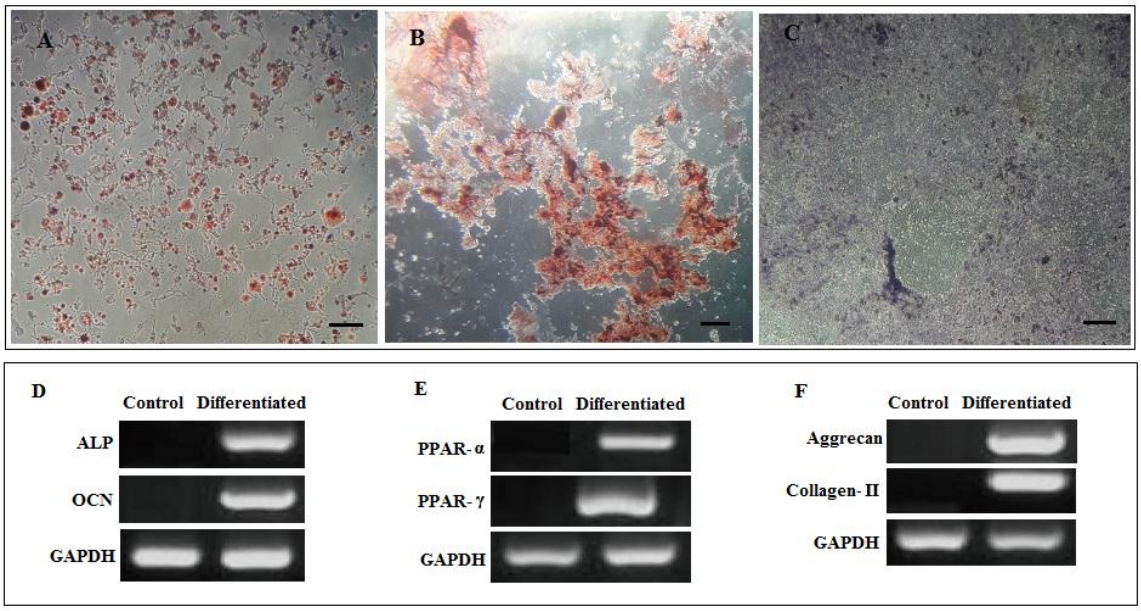
گردید. نوک پیکان‌ها، وزیکول‌های کوچک پراکنده و قطرات چربی در داخل سلول‌ها را نشان می‌دهند. به علاوه نتایج RT-PCR حاکی از تولید ژن‌های ویژه بافت چربی شامل PPAR-α و PPAR-γ بود(شکل ۳D).

تمایز به استخوان:

نتایج حاصل از این پژوهش نشان داد که سلول‌های بنیادی مشتق از مغز استخوان می‌توانند پس از ۲۱ روز قرار گرفتن در محیط کشت تمایزی حاوی عوامل رشد استخوانی، به سلول‌های استخوان‌ساز تبدیل شوند(شکل ۳B). اولین نشانه‌های بارز تغییر مورفولوژی و تمایز به صورت تشکیل شدن توده‌های سلولی و بزرگ‌تر شدن آن‌ها در مناطق لایه‌های تک سلولی در روز ۵ پس از القای تمایز دیده شد. برای تشخیص حضور رسوب املاح معدنی به خصوص کلسیم و تایید تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از مغز استخوان از رنگ‌آمیزی آلیزارین رد استفاده گردید. توده‌های قرمز رنگ نشان‌دهنده رسوبات معدنی بوده و نشان از معدنی شدن ماتریکس داشتند. بررسی بیشتر با روش RT-PCR نشان داد که در توده سلولی تمایز یافته، مارکرهای اختصاصی آلکالین فسفاتاز(ALP) و استئوپونتین(OCN) بیان شده است (شکل ۳E).

تمایز به غضروف:

در این پژوهش قدرت تمایز به سلول‌های غضروف‌ساز نیز مورد بررسی قرار گرفت. در برخی مناطق کشت توده‌های سلولی تشکیل یافت(شکل ۳C). دوره تمایزی این سلول‌ها ۲۱ روز بود و توسط رنگ‌آمیزی تولوئیدن بلو بررسی شدند. رنگ بنفش نشان‌دهنده متاکرومیک بودن و حضور ماتریکس غضروفی در این سلول‌ها بود و آنالیز RT-PCR نشان داد که mRNA مربوط به ژن‌های اگرکان و کلاژن نوع II تولید شده است (شکل ۳F).



شکل ۳: تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از مغز استخوان به سلول‌های چربی‌ساز، استخوان‌ساز و غضروف‌ساز. A: ۲۱ روز پس از تیمار، تمایز BMSCs به سلول‌های چربی با استفاده از رنگ‌آمیزی با اویل رد تایید گردید. وزیکول‌های کوچک پراکنده و قطرات چربی در داخل سلول‌ها قابل مشاهده می‌باشد. B:۲۱ روز پس از تیمار، تمایز BMSCs به سلول‌های استخوانی توسط رنگ‌آمیزی آلیزارین رد مشخص گردید. توده‌های قرمز رنگ نشان‌دهنده رسوبات معدنی هستند. C: ۲۱ روز پس از تیمار، تمایز BMSCs به سلول‌های غضروفی با استفاده از رنگ‌آمیزی تولوئیدن بلو تایید گردید. رنگ بنفش رسوبات سلولی، نشان‌دهنده حضور رسوبات اگرکان در ماتریکس غضروفی است(بزرگنمایی ۴۰x). D-F: مارکرهای اختصاصی سلول‌های چربی، استخوان و غضروف با RT-PCR نشان داده شده است.

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-11-01]

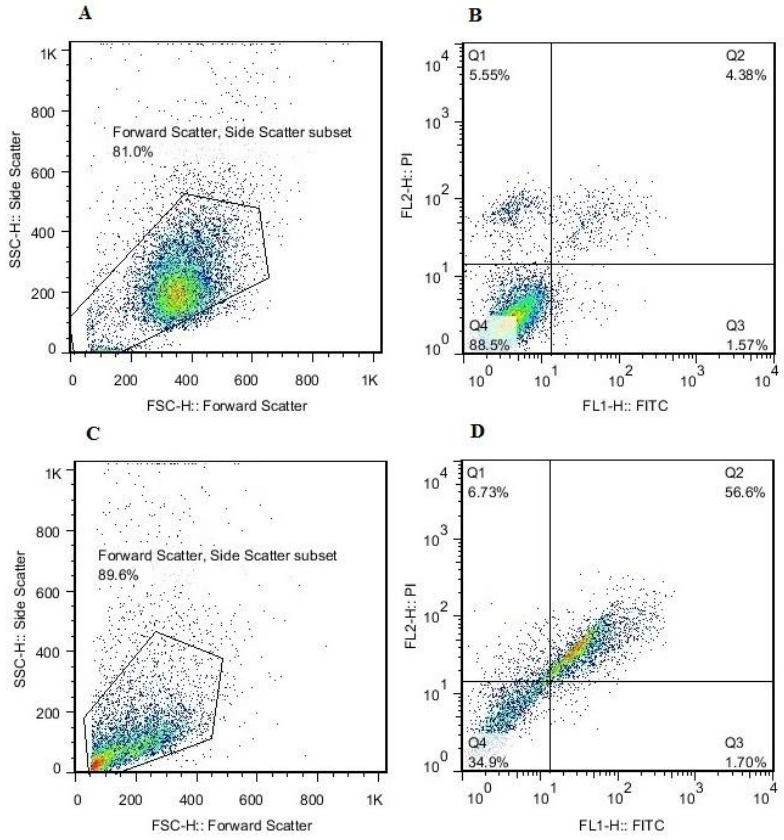
کشت و نگهداری سلول‌های لوسمی رده K562:

این رده سلولی به صورت آماده از انستیتو پاستور خریداری گردید. از مشخصات این سلول‌ها، رشد سریع و مقاومت بالا است که در فاز بلاستیک لوسمی میلوئیدی مزمن قرار داشتند.

از دیگر ویژگی‌های این سلول‌ها خاصیت نیمه شناور بودن آن‌هاست که نیاز به استفاده از آنزیم تریپسین نخواهد داشت. سلول‌های زنده در زیر میکروسکوپ ظاهری کروی داشته و به صورت یک کلنی، کانون‌هایی را در نزدیک یکدیگر به صورت مجموعه تشکیل می‌دهند. در صورتی که سلول‌های مرده به صورت جمع شده بوده و جدا جدا هستند.

نتایج حاصل از آزمایش آنکسین V/PI در سلول‌های K562 پس از هم‌کشتی با سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از مغز استخوان:

یکی از ویژگی‌های آپوپتوز از دست رفتن غشای سلول‌های آپوپتوتیک می‌باشد. فسفاتیدیل سرین در سلول‌های آپوپتوتیک به سطح خارجی غشا منتقل شده و آنکسین V تمایل بالایی را برای باند شدن به آن نشان می‌دهد(نمودار ۴). بررسی نتایج حاصل از ۷ روز هم-کشتی سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از مغز استخوان با سلول‌های K562 نشان داد که این هم‌کشتی می‌تواند موجب القای آپوپتوز به میزان ۵۶/۶٪ در سلول‌های K562 گردد.

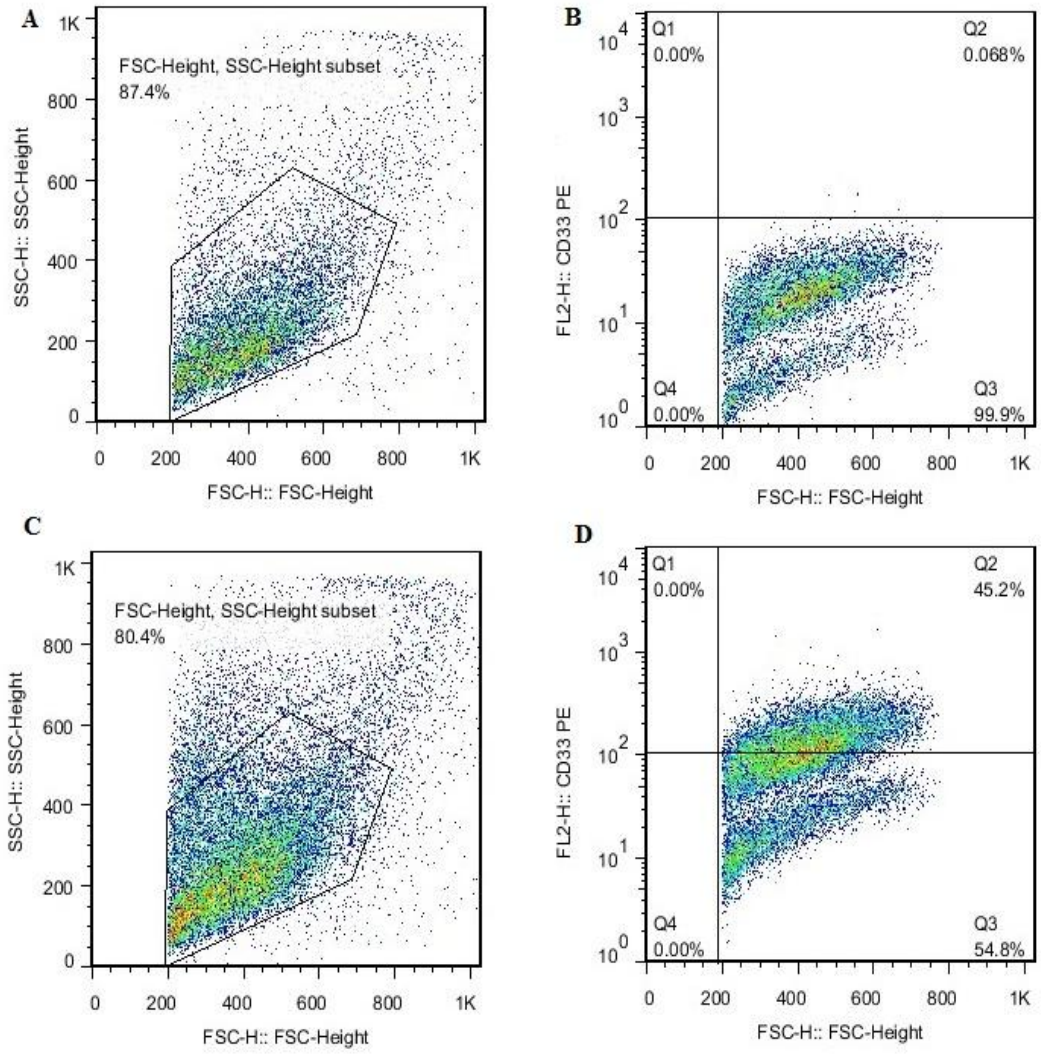


نمودار ۴: نمودار نقطه‌ای حاصل از بررسی میزان آپوپتوز در سلول‌های K562 با استفاده از روش آنکسین V/PI. A و C : توزیع جمعیت سلول‌های K562 بدون هم‌کشتی و همراه با هم‌کشتی سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از مغز استخوان. B و D : میزان و نوع مرگ سلولی سلول‌های K562 بدون هم‌کشتی و همراه با هم‌کشتی سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از مغز استخوان. نواحی Q1، Q2، Q3 و Q4 به ترتیب بیانگر میزان توزیع سلول‌ها در منطقه نکروز، آپوپتوزی ثانویه، آپوپتوزی اولیه و سالم می‌باشند.

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-11-01]

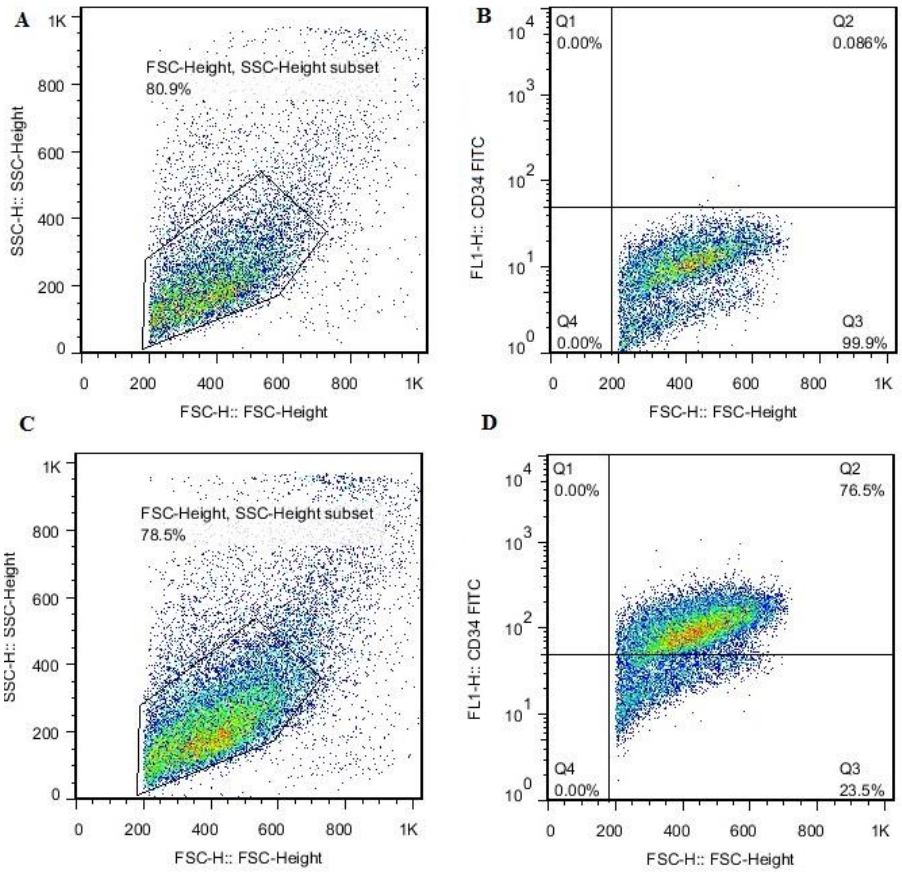
بیـــان نشـــانگرهای ســـطح ســـلولی CD33 و CD34 در سلول‌های K562 پس از هم‌کشتی بـا سـلول‌هـای بنیـادی مزانشیمی مشتق از مغز استخوان:

جهـت بررسـی تـأثیر هـم‌کشـتی سـلول‌هـای بنیـادی مزانشیمی مشتق از مغـز اسـتخوان بـر نشـانگرهای سـطح ســلولی CD33 و CD34 در ســلول‌هــای K562 از روش فلوسیتومتری استفاده گردید. نتایج ایـن بررسـی نشـان داد که میزان بیان نشـانگرهای سـطح سـلولی CD33 و CD34 در سلول‌های K562 که در هم‌کشتی با سلول‌هـای بنیـادی قرار گرفتند به ترتیب ۴۵/۲٪ و ۷۶/۵٪ بـوده و نسـبت بـه گروه کنترل افزایش یافته است(نمودارهای ۵ و ۶).



نمودار ۵: نمودار نقطه‌ای آنالیز فلوسیتومتری سلول‌های K562 ، در مجاورت آنتی‌بادی CD33. A و C : توزیع جمعیت سلول‌هـای K562 بـدون هم‌کشتی و همراه با هم‌کشتی سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از مغز استخوان در حضور آنتی‌بادی CD33 . B و D : میزان بیان نشانگر سـطح سلولی CD33 سلول‌های K562 بدون هم‌کشتی و همراه با هم‌کشتی سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از مغز استخوان. بیان ایـن نشـانگر سـطح سلولی در حضور سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از مغز استخوان ۴۵/۲٪ می‌باشد.

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-11-01]



نمودار ۶: نمودار نقطه‌ای آنالیز فلوسیتومتری سلول‌های K562 ، در مجاورت آنتی‌بادی CD34. A و C : توزیع جمعیت سلول‌های K562 بدون هم‌کشتی و همراه با هم‌کشتی سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از مغز استخوان در حضور آنتی‌بادی CD34 . B و D : میزان بیان نشانگر سطح سلولی CD34 سلول‌های K562 بدون هم‌کشتی و همراه با هم‌کشتی سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از مغز استخوان. بیان این نشانگر سطح سلولی در حضور سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از مغز استخوان ۷۶/۵٪ می‌باشد.

بحث

در مطالعه حاضر سلول‌های بنیادی مزانشیمی از مغز استخوان رت استخراج و پس از کشت و پاساژ سلولی تا چهار مرحله همراه با سلول‌های رده K562 در پلیت هم‌کشتی قرار داده شدند. پس از ۷ روز هم‌کشتی، میزان آپوپتوز و بیان نشانگرهای سطح سلولی CD33 و CD34 در سلول‌های رده K562 بررسی گردید.

امروزه روش‌های درمانی به سمت استفاده از سلول درمانی به وسیله سلول‌های بنیادی مزانشیمی به عنوان روشی مناسب و ایمن در امر درمان سرطان‌های بدخیم سوق پیدا کرده است. سلول‌های بنیادی مزانشیمی یکی از برجسته‌ترین سلول‌های مورد استفاده در امر سلول درمانی می‌باشند. راماسامی و همکاران(۲۰۰۷) تاثیر سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان را روی رده سلولی BV۱۷۳ که از سلول‌های توموری خون‌ساز هستند مورد بررسی قرار دادند که نتایج این تحقیق نشان داد سلول‌های بنیادی مزانشیمی اثر ضد رشد را به صورت وابسته به دوز، بر روی این رده سلولی نشان می‌دهند(۵). نتایج حاصل از تحقیق راماسامی، نتایج مطالعه انجام شده توسط لی و همکاران(۲۰۱۱) را در رابطه با تاثیر سلول‌های بنیادی مزانشیمی انسانی بر روی تومور ریوی رده سلولی A549 و سرطان مری رده سلولی Eca-109 تایید می‌کند و نشانگر توانایی سلول‌های بنیادی مزانشیمی در القای آپوپتوز در سلول‌های توموری است(۲۸). در این مطالعه، میزان و درصد آپوپتوز با روش فلوسیتومتری و با استفاده از آنکسین V مورد ارزیابی و تجزیه و تحلیل قرار گرفت.

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-11-01]

با شروع آپوپتوز، فسفاتیدیل سرین که در حالت عادی در سطح داخلی غشا سلولی است به سمت خارجی غشا منتقل می‌گردد(۲۹). تحقیقات نشان داده است که آنکسین V می‌تواند به صورت اختصاصی و در حضور کلسیم به فسفاتیدیل کولین متصل گردد(۲۷، ۲۶). در مطالعه سچیرو و همکاران که بر روی تأثیر هم‌کشتی سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان انسان با لنفوم غیر هوچکین صورت گرفت، میزان آپوپتوز با استفاده از آنکسین V مورد ارزیابی قرار گرفت(۳۰). نتایج این تحقیق نشان داد که این هم‌کشتی موجب القای آپوپتوز در سلول‌های لنفوم غیر هوچکین می‌گردد و این نتایج همسو با نتایج مطالعه حاضر می‌باشد.

یکی از جالب توجه‌ترین استراتژی‌های درمان سرطان‌های بدخیم استفاده از راه‌کارهایی است که بتواند مرگ آپوپتوتیک را در این سلول‌ها القا نماید چرا که بر خلاف نکروز، آپوپتوز در یک سلول به سلول‌های مجاور آسیبی وارد نمی‌کند و التهاب یا آسیب بافتی ایجاد نمی‌کند(۳۱). دینگ و همکاران(۲۰۰۹) در نتایج مطالعه‌های خود بیان کردند که سلول‌های بنیادی مزانشیمی انسان سلول‌های K562 را در مرحله G0 و G1 سلولی نگه داشته و موجب القای آپوپتوز در این سلول‌ها می‌شوند. این اثر مهاری وابسته به تعداد سلول‌های بنیادی بوده به صورتی که در مقادیر بالا، باعث اثر مهاری بیشتر می‌گردد. بررسی این عملکرد پس از هم‌کشتی سلول‌های لوسمی میلوئیدی مزمن با سلول‌های بنیادی در تعداد برابر و مقادیر متفاوت صورت پذیرفت. پس از بررسی با روش فلوسیتومتری مشخص گردید که در تعداد برابر سلول‌ها در هم‌کشتی، سلول‌های بنیادی می‌توانند موجب مهار رشد سلول‌های K562 شوند که این اثر مهاری در تعداد بالاتر سلول‌های بنیادی بیشتر می‌شود(۳۲). نتایج این محقق همسو با نتایج مطالعه حاضر می‌باشد که در نسبت ۱ به ۱۰، سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از مغز استخوان به سلول‌های K562 هم‌کشتی داده شدند و مشاهده شد میزان آپوپتوز در سلول‌های K562 به میزان ۵۶/۶٪ افزایش یافت. علاوه بر این در مطالعه‌ای دیگر مشاهده شد که هم‌کشتی سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از مغز استخوان افراد مبتلا به لوسمی میلوئیدی مزمن موجب مهار رشد سلول‌های لوسمی گردید که این عملکرد به وسیله ترشح اینترفرون آلفا بود(۳۳).

CD34 ، نشانگر سطح سلولی سلول‌های پیش‌ساز خونساز بوده که توسط بسیاری از سلول‌های طبیعی خونساز اولیه و نیز بسیاری از لوسمی‌های حاد ساخته می‌شود. پس از بررسی بیان c-kit و CD34 در یک مطالعه، مشاهده شد که بیان مولکول CD34 در سلول‌های CML در فاز بلاستیک بسیار بالا می‌رود(۳۴). در مطالعه دیگری نشان داده شد که میزان سلول‌های $CD34^+$ در بیماران مبتلا به CML نسبت به سلول‌های $CD34^+$ در افراد طبیعی به طور معناداری بالاتر بود(۳۵). نشانگر CD33 در ارتباط بین سلول‌ها و علایم‌رسانی نقش دارد و روی سلول‌های اجدادی میلوئیدی و منوسیتی وجود دارد و تقریباً در مراحل آخر بلوغ میلوسیتی از سلول حذف می‌گردد. الگوی بیان CD33 در سلول‌های خونساز نشان‌دهنده یک نقش بالقوه CD33 در تنظیم تمایز سلول‌های میلوئیدی است. در واقع می‌توان گفت که CD33 در سلول‌های میلوئیدی و پیش‌سازهای آن‌ها بیان می‌گردد و یک آنتی‌ژن پان‌میلوئیدی(Pan myeloid antigen) می‌باشد(۱۲). در مطالعه حاضر مشاهده شد که نشانگرهای سطح سلولی CD33 و CD34 در سلول‌های K562 تیمار نشده با سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از مغز استخوان در حد بسیار پایینی بیان شده و یا اصلاً بیان نمی‌گردند. در صورتی که همین سلول‌ها در تیمار با سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از مغز استخوان، نشانگرهای سطح سلولی CD33 و CD34 را در حد بالایی(۴۵/۲٪ و ۷۶/۵٪، به ترتیب) بیان نمودند. در مطالعه اینوئه و همکاران (۲۰۱۴) مشاهده شد که نشانگر CD33 در سلول‌های K562 زمانی که سلول‌ها در حالت نابالغ (state Immature) باشند، در حد بالایی(۶۱/۷٪) بیان می‌گردد که البته این اختلاف ممکن است به دلیل تفاوت در آنتی‌بادی مورد استفاده و فاکتورهای تکنیکی(حساسیت فلوسیتومتری، گیت‌بندی و ...) باشد(۳۶). علاوه بر این ثابت شده است که سلول‌های CML که نشانگر CD34 را در حد بالایی بیان می‌کنند، نسبت به سلول‌های CML که

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-11-01]

این نشانگر را بیان نمی‌کنند، به درمان با داروهای مهارگر تیروزین کیناز از قبیل داساتینیب(Dasatinib) و پوناتینیب(Ponatinib) به طور معناداری حساس‌تر هستند. با این حال سلول‌های پیش‌ساز نابالغ CML که نشانگر CD34 را بیان نمی‌کنند، نسبت به درمان مقاوم‌تر هستند(۳۷). بنابراین با توجه به شواهد به دست آمده از تحقیق حاضر و با توجه به این که سلول‌های CML در حالت بالغ عمر کمتری داشته و حساسیت بالایی را نسبت به دارو درمانی نشان می‌دهند، احتمال می‌رود روش درمانی جدیدی برای بیماری CML داشته باشیم که بتوان با استفاده از سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از مغز استخوان، تمایز سلول‌های نابالغ و پیش‌ساز CML را به سلول‌های بالغ القا نمود.

نتیجه‌گیری

در مجموع نتایج این مطالعه نشان داد که هم‌کشتی سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از مغز استخوان با سلول‌های K562 ، موجب القای آپوپتوز و افزایش بیان نشانگرهای سطح سلولی CD33 و CD34 در سلول‌های K562 می‌گردد. این نتیجه ممکن است تاثیر مناسبی در روند بهبود بیماری CML داشته باشد. به هر حال اقدامات بیشتری باید در این زمینه صورت پذیرد تا تأثیر مثبت سلول‌های بنیادی مزانشیمی را در درمان این بیماری بدخیم تایید کند.

تشکر و قدردانی

این مقاله منتج از پایان‌نامه مقطع دکترای عمومی دامپزشکی دانشگاه تبریز و با کد اخلاق ۱۲۱۸. ۱۳۹۶ می‌باشد. کلیه حقوق مادی و معنوی مربوط به این کار پژوهشی متعلق به دانشگاه تبریز می‌باشد. نویسندگان از مرکز تحقیقات سلول‌های بنیادی دانشگاه علوم پزشکی تبریز به دلیل فراهم آوردن مکان و تجهیزات آزمایشگاهی تشکر و قدردانی می‌نمایند.

References:

1- Hehlmann R, Hochhaus A, Baccarani M. Chronic myeloid leukaemia. Lancet 2007; 370(9584): 342-50.
2- Apperley JF. Chronic myeloid leukaemia. Lancet 2015; 385(9976): 1447-59.
3- Ailawadhi S, Akard LP, Miller CB, Jillella A, DeAngelo DJ, Ericson SG, *et al*. Exploratory study on the impact of switching to nilotinib in 18 patients with chronic myeloid leukemia in chronic phase with suboptimal response to imatinib. Ther Adv Hematol 2017; 8(1): 3-12.
4- Minguell JJ, Erices A, Conget P. Mesenchymal stem cells. Exp Biol Med (Maywood) 2001; 226(6): 507-20.
5- Ramasamy R, Lam EW, Soeiro I, Tisato V, Bonnet D, Dazzi F. Mesenchymal stem cells inhibit proliferation and apoptosis of tumor cells: impact on *in vivo* tumor growth. Leukemia 2007; 21(2): 304-10.
6- Qiao L, Xu Z, Zhao T, Zhao Z, Shi M, Zhao RC, *et al*. Suppression of tumorigenesis by human mesenchymal stem cells in a hepatoma model. Cell Res 2008; 18(4): 500-7.
7- Otsu K, Das S, Houser SD, Quadri SK, Bhattacharya S, Bhattacharya J. Concentration-dependent inhibition of angiogenesis by mesenchymal stem cells. Blood 2009; 113(18): 4197-205.
8- Cousin B, Ravet E, Poglio S, De Toni F, Bertuzzi M, Lulka H, *et al*. Adult stromal cells derived from human adipose tissue provoke pancreatic cancer cell death both *in vitro* and *in vivo*. PLoS One 2009; 4(7): e6278.
9- Noyce RS, Bondre DG, Ha MN, Lin L-T, Sisson G, Tsao MS, *et al*. Tumor cell marker PVRL4 (nectin 4) is an epithelial cell receptor for measles virus. PLoS Pathog 2011; 7(8): e1002240.
10- Inoue T, Swain A, Nakanishi Y, Sugiyama D. Multicolor analysis of cell surface marker of human leukemia cell lines using flow cytometry. Anticancer Res 2014; 34(8): 4539-50.
11- Jin CH, Takada H, Nomura A, Takahata Y, Nakayama H, Kajiwara M, *et al*. Immunophenotypic and functional characterization of CD33+ CD34+ cells in human cord blood of preterm neonates. Exp Hematol 2000; 28(10): 1174-80.
12- Freeman SD, Kelm S, Barber EK, Crocker PR. Characterization of CD33 as a new member of the sialoadhesin family of cellular interaction molecules. Blood 1995; 85(8): 2005-12.
13- Ly JD, Grubb D, Lawen A. The mitochondrial membrane potential (deltapsi(m)) in apoptosis; an update. Apoptosis 2003; 8(2): 115-28.
14- Lebedeva IV, Su ZZ, Sarkar D, Fisher PB. Restoring apoptosis as a strategy for cancer gene therapy: focus on p53 and mda-7. Semin Cancer Biol 2003; 13(2): 169-78.
15- Lin LL, Huang HC, Juan HF. Revealing the molecular mechanism of gastric cancer marker annexin A4 in cancer cell proliferation using exon arrays. PLoS One 2012; 7(9): e44615.

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-11-01]

16- Cartier A, Komai T, Masucci MG. The Us3 protein kinase of herpes simplex virus 1 blocks apoptosis and induces phosporylation of the Bcl-2 family member Bad. Exp Cell Res 2003; 291(1): 242-50.
17- Fathi E, Farahzadi R. Enhancement of osteogenic differentiation of rat adipose tissue-derived mesenchymal stem cells by zinc sulphate under electromagnetic field via the PKA, ERK1/2 and Wnt/beta-catenin signaling pathways. PLoS One 2017; 12(3): e0173877.
18- Farahzadi R, Fathi E, Mesbah-Namin SA, Zarghami N. Zinc sulfate contributes to promote telomere length extension via increasing telomerase gene expression, telomerase activity and change in the TERT gene promoter CpG island methylation status of human adipose-derived mesenchymal stem cells. PLoS One 2017; 12(11): e0188052.
19- Fathi E, Farahzadi R, Charoudeh HN. L-carnitine contributes to enhancement of neurogenesis from mesenchymal stem cells through Wnt/β-catenin and PKA pathway. Exp Biol Med (Maywood) 2017; 242(5): 482-6.
20- Trela E, Glowacki S, Błasiak J. Therapy of chronic myeloid leukemia: twilight of the imatinib era? ISRN Oncol 2014; 2014: 596483.
21- Fathi E, Farahzadi R. Isolation, culturing, characterization and aging of adipose tissue-derived mesenchymal stem cells: a brief overview. Braz Arch Biol Technol 2016; 59: e16150383.
22- Mobarak H, Fathi E, Farahzadi R, Zarghami N, Javanmardi S. L-carnitine significantly decreased aging of rat adipose tissue-derived mesenchymal stem cells. Vet Res Commun 2017; 41(1): 41-7.
23- Farahzadi R, Mesbah-Namin SA, Zarghami N, Fathi E. L-carnitine Effectively Induces hTERT Gene Expression of Human Adipose Tissue-derived Mesenchymal Stem Cells Obtained from the Aged Subjects. Int J Stem Cells 2016; 9(1): 107-14.
24- Subhashini J, Mahipal SV, Reddy MC, Reddy MM, Rachamallu A, Reddanna P. Molecular mechanisms in C-Phycocyanin induced apoptosis in human chronic myeloid leukemia cell line-K562. Biochem Pharmacol 2004; 68(3): 453-62.
25- Xu X, Zeng Z, Yao W, Wang X, Sun D, Ka W, *et al*. Biomechanical alterations of dendritic cells by co-culturing with K562 CML cells and their potential role in immune escape. J Biomech 2010; 43(12): 2339-47.
26- Han Y, Wang Y, Xu Z, Li J, Yang J, Li Y, *et al*. Effect of bone marrow mesenchymal stem cells from blastic phase chronic myelogenous leukemia on the growth and apoptosis of leukemia cells. Oncol Rep 2013; 30(2): 1007-13.
27- Damiano J, Hazlehurst L, Dalton W. Cell adhesion-mediated drug resistance (CAM-DR) protects the K562 chronic myelogenous leukemia cell line from apoptosis induced by BCR/ABL inhibition, cytotoxic drugs, and [gamma]-irradiation. Leukemia 2001; 15(8): 1232-9.
28- Tian LL, Yue W, Zhu F, Li S, Li W. Human mesenchymal stem cells play a dual role on tumor cell growth *in vitro* and *in vivo*. J Cell Physiol 2011; 226(7): 1860-7.
29- Álvarez-Barrientos A, Arroyo J, Cantón R, Nombela C, Sánchez-Pérez M. Applications of flow cytometry to clinical microbiology. Clin Microbiol Rev 2000; 13(2): 167-95.
30- Secchiero P, Zorzet S, Tripodo C, Corallini F, Melloni E, Caruso L, *et al*. Human bone marrow mesenchymal stem cells display anti-cancer activity in SCID mice bearing disseminated non-Hodgkin's lymphoma xenografts. PLoS One 2010; 5(6): e11140.
31- Kamesaki H. Mechanisms involved in chemotherapy-induced apoptosis and their implications in cancer chemotherapy. Int J Hematol 1998; 68(1): 29-43.
32- Ding Y, Lu H, Lu S, Lu R, Liu P, Wu Y, *et al*. Effects of human bone marrow mesenchymal stem cells on proliferation and apoptosis of k562 cells. Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi 2009; 17(1): 137-40. [Article in Chinese]
33- Zhang HM, Zhang LS. Influence of human bone marrow mesenchymal stem cells on proliferation of chronic myeloid leukemia cells. Ai Zheng 2009; 28(1): 29-32.
34- Muroi K, Nakamurat M, Amemiya Y, Suda T, Miura Y. Expression of c-kit receptor (CD 117) and CD34 in leukemic cells. Leuk Lymphoma 1995; 16(3-4): 297-305.
35- De Fabritiis P, Dowding C, Bungey J, Chase A, Angus G, Szydlo R, *et al*. Phenotypic Characterization of Normal and CML CD34-Positive Cells: Only the Most Primitive CML Progenitors Include Ph-neg Cells. Leuk Lymphoma 1999; 11(1-2): 51-61.
36- López-Karpovitch X, Cárdenas R, Piedras J. Immunophenotypic characteristics of the blast crisis in chronic myeloid leukemia. Revista de investigacion clinica; organo del 1997; 49(1): 31-6.
37- Pietarinen PO, Eide CA, Ayuda-Durán P, Potdar S, Kuusanmäki H, Andersson EI, *et al*. Differentiation status of primary chronic myeloid leukemia cells affects sensitivity to BCR-ABL1 inhibitors. Oncotarget 2017; 8(14): 22606-15.
38-

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-11-01]

Sci J Iran Blood Transfus Organ 2018; 15(3): 210-225

Original Article

Investigation of rat bone marrow mesenchymal stem cells effect on apoptosis and cell surface markers expression of CD33 and CD34 as an approach to treatment of chronic myeloid leukemia

Najafi D.[1], Fathi E.[1], Farahzadi R.[2]

[1]Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tabriz, Tabriz, Iran
[2]Hematology and Oncology Research Center, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran

Abstract

Background and Objectives

Drug resistance is one of the main challenges in the treatment of chronic myeloid leukemia (CML). In this study, with the aim of inducing apoptosis in K562 cell line (CML), this cell line was co-cultured with rat bone marrow mesenchymal stem cells (rBMSCs). Then, the rate of apoptosis as well as cell surface markers expression of CD33 and CD34 in the K562 cells line was evaluated.

Materials and Methods

In this experimental study, after isolating rBMSCs, the multilineag differentiation capacity of rBMSCs as well as the mesenchymal stemness of these cells was identified by evaluation of CD90, CD105, CD45, and CD56 cell surface. Then, the K562 cells were subjected for evaluation of CD33 and CD34 cell surface markers and apoptosis using a flow cytometry technique.

Results

Immunophenotyping of the cells indicated positive expression of CD90 and CD105 and negative expression of CD45 and CD56. The expression of CD33 and CD34 cell markers in the K562 cell line was increased 45.2% and 76.5%, respectively. Also, induction of apoptosis in the K562 cell line significantly increased (56.6%) compared to the control ($p < 0.05$).

Conclusions

Briefly, this study showed that the co-culturing of the K562 cells line with rBMSCs causes significant increase in the expression of CD33 and CD34 cell surface markers as well as induction of apoptosis in the K562 cells ($p < 0.05$). This effect can be through the secreted factors and cytokines of rBMSCs; however, better evaluation in terms of type of cytokines is recommended in the future studies.

Key words: Myeloid Leukemia‘Chronic, Bone Marrow Stromal Cells, Apoptosis, Co-culture

Received: 24 Feb 2018
Accepted: 9 May 2018

Correspondence: Fathi E., Specialist in Veterinary Clinical Pathology. Associate Professor of Faculty of Veterinary Medicine, University of Tabriz.
Postal Code: 5166616471, Tabriz, Iran. Tel: (+9841) 13392351; Fax: (+9841) 13357834
E-mail: *ez.fathi@tabrizu.ac.ir*

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-11-01]