خون
فصلنامه پژوهشی
دوره ۴ شماره ۲ تابستان ۸۶ (۱۵۱-۱۴۳)

جداسازی سلول‌های بنیادی مزانشیمی $CD34^+$ از مغز استخوان موش

صمد ندری[۱]، دکتر مسعود سلیمانی[۲]

چکیده

سابقه و هدف

جداسازی و تخلیص سلول‌های بنیادی مزانشیمی(MSCs) موش از طریق روش چسبیدن به ظرف کشت پلاستیک، به علت رشد ناخواسته سلول‌های خونی و غیر مزانشیمی بسیار مشکل است. در این مطالعه، جمعیت هموژن از سلول‌های بنیادی مزانشیمی $CD34^+$ با روش انتخاب ایمنی مثبت(Positive immunoselection) از مغز استخوان موش جداسازی شده است.

مواد وروش‌ها

مطالعه انجام شده از نوع تجربی بود. پس از نخاعی کردن موش‌های نژاد C57B1/6، سلول‌های مغز استخوان آن‌ها آسپیره و با دانه‌های آهن‌ربایی متصل به آنتی‌بادی ضد CD34 انکوبه گردید. بعد از انتخاب ایمنی مثبت، بخشی از سلول‌ها برای بررسی درصد بیان مارکر CD34 با دستگاه فلوسایتومتری مورد بررسی قرار گرفتند و مابقی کشت گردیدند. ۲۴ ساعت پس از کشت، سلول‌های غیر چسبان که عمدتاً سلول‌های بنیادی خون‌ساز بودند، از طریق شستشو حذف شدند و سلول‌های چسبیده به ظرف کشت پلاستیک از نظر وجود مارکرهای سطحی(CD11b and CD45، CD34، Vcam-1، Sca-1، CD44) مورد بررسی قرار گرفتند. به منظور اثبات ماهیت مزانشیمی، از آزمایش تمایز به استخوان و چربی استفاده شد.

یافته‌ها

یک هفته پس از کشت اولیه، جمعیت خالصی از سلول‌های $CD34^+$ شبه فیبروبلاست به دست آمد. در این سلول‌ها مارکرهای CD34 ، Sca-1 ، CD44 و Vcam-1 بیان شد اما CD11b و CD45 بیان نشد. در این سلول‌ها ژن‌های تمایز به استخوان(استئوکالسین، استئوپنتین و گیرنده هورمون پاراتیروئید) و چربی(لیپوپروتئین لیپاز و آدیپسین) بیان شدند.

نتیجه گیری

از این مطالعه می‌توان نتیجه گرفت که با استفاده از این روش امکان تخلیص سلول‌های بنیادی مزانشیمی با کارایی بالا از مغز استخوان موش نژاد C57B1/6 وجود دارد. سلول‌های $CD34^+$ مغز استخوان موش C57/B16 با توانایی چسبیدن به ظرف کشت پلاستیک و تمایز به دودمان‌های اسکلتی، سلول‌های بنیادی مزانشیمی می‌باشند.

کلمات کلیدی: سلول‌های بنیادی مزانشیمی، مغز استخوان، آنتی‌ژن CD34

تاریخ دریافت : ۸۵/۱۰/۱۶
تاریخ پذیرش : ۳ /۶/ ۸۶

۱ – کارشناس ارشد بیوشیمی ـ گروه سلول‌های بنیادی شرکت فن‌آوری بن‌یاخته ـ دانشگاه پیام نور واحد تهران
۲- مؤلف مسؤول: PhD هماتولوژی ـ استادیار دانشکده پزشکی دانشگاه تربیت مدرس ـ صندوق پستی: ۱۱۱-۱۴۱۱۵

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

مقدمه

سلول‌های بنیادی، سلول‌هایی ویژه با دو خصوصیت خود تجدیدی(self renewal) و توان تمایز به رده‌های سلولی مختلف هستند(۱). در درون حفره داخلی مغز استخوان علاوه بر سلول‌های بنیادی خون‌ساز(HSCs)، سلول‌های دیگری از قبیل سلول‌های بنیادی مزانشیمی(MSCs) نیز وجود دارد(۲). در سال‌های اخیر، سلول‌های بنیادی مزانشیمی با اسامی دیگر از قبیل سلول‌های فیبروبلاستی تشکیل دهنده کلونی، سلول‌های بنیادی استرومای مغز استخوان، سلول‌های نیایی مزانشیمی و سلول‌های استرومای مغز استخوان خوانده شده‌اند(۶-۳).

سلول‌های بنیادی مزانشیمی به دلیل دارا بودن خاصیت خود تجدیدی و توان تمایز به بافت‌های اسکلتی به عنوان یک منبع مناسب برای استراتژی‌های سلول و ژن درمانی محسوب می‌شوند(۷). کارآیی این سلول‌ها در درمان بیماری ژنتیکی استئوژنز ایمپرفکتا، بهبود خون‌سازی، بازسازی استخوان، ترمیم محل نکروز در بیماران انفارکتوس و درمان بیماری‌های مفصلی به خوبی نشان داده شده است(۱۳-۷). با وجود اهمیت سلول‌های مزانشیمی در سلول درمانی، هنوز بعضی از جنبه‌های بیولوژیکی آن از قبیل ماهیت سلولی، منشا تکاملی و عملکرد در *in vivo* ناشناخته باقی مانده است(۴).

پاسخ به این گونه مسایل و کاربردی کردن سلول‌های بنیادی مزانشیمی در درمان بیماری‌های انسان مستلزم مطالعات پیش کلینیکی و جداسازی این سلول‌ها از گونه‌های دیگر است. استفاده از روش مرسوم چسبیدن به پلاستیک در جداسازی سلول‌های بنیادی مزانشیمی گونه‌های مختلف جانوری با موفقیت انجام گرفته ولی در مورد موش، که به عنوان مدل فیزیولوژیک و پاتوفیزیولوژیک پستانداران مطرح است، به راحتی امکان‌پذیر نبوده و با مشکلاتی نظیر آلودگی به سلول‌های خون‌ساز و ماکروفاژ همراه است(۱۵، ۱۴).

در مطالعه حاضر، روش جدید و سریعی برای جداسازی سلول‌های مزانشیمی از مغز استخوان موش نژاد C57B1/6 ارایه شده است. در این روش، که بر اساس انتخاب ایمنی مثبت(Positive Immunoselection) سلول‌های $CD34^+$ آسپیره شده از مغز استخوان موش بود، سلول‌های بنیادی مزانشیمی از مغز استخوان موش نژاد C57B1/6 تخلیص شد. محققین پیشین گزارش کرده‌اند که سلول‌های بنیادی مزانشیمی موش نژاد C57B1/6، درصد بالایی از مارکر CD34 را بیان می‌کنند. مارکر CD34 به عنوان مارکر سلول‌های پیش‌ساز خون‌ساز مطرح است(۱۵، ۵) در ادامه سلول‌ها از نظر بعضی مارکرهای سطح سلولی که محققین پیشین در مطالعه روی سلول‌های بنیادی مزانشیمی موشی گزارش کرده‌اند، مورد بررسی قرار گرفته و به منظور اثبات ماهیت مزانشیمی، سلول‌های مورد نظر به سمت سلول‌های استخوانی و چربی تمایز داده شدند(۱۸-۱۵، ۵).

مواد و روش ها

جداسازی سلول‌های $CD34^+$ مغز استخوان:

مطالعه انجام شده از نوع تجربی بود. موش‌های نژاد C57B1/6 با سن تقریبی ۶ تا ۸ هفته(۱۰ سر موش) با روش نخاعی کردن(cervical dislocation) کشته شدند. استخوان‌های ران و درشت نی جدا گردید، عضلات و بافت نرم اطراف پاک شد و داخل محیط DMEM (Duldecco's Modified Eagle's Medium) (جیبکو- آلمان) قرار داده شد. لوله محتوی استخوان‌های ران و درشت نی بر روی یخ قرار داده شده و به زیر هود استریل منتقل گردید. دو انتهای استخوان‌ها قطع گردیده و با استفاده از سرنگ و سر سوزن شماره ۲۲، مغز استخوان خارج و با ۲ میلی‌لیتر HBSS(Hanks Balanced Salt Solution) حل گردید. سلول‌های مغز استخوان استخراج شده از ۱۰ موش با هم مخلوط شد. سلول‌ها به مدت ۳۰ دقیقه(در تاریکی و دمای ۴°C) با دانه‌های آهن‌ربایی متصل به آنتی‌بادی CD34(بیوتک ـ آلمان) انکوبه شده و از ستون عبور داده شدند. سلول‌های عبور یافته از ستون دور ریخته شدند و سلول‌های به دام افتاده در ستون جمع‌آوری شده و پس از سانتریفوژ با لام نئوبار شمارش شدند. درصد بقای سلول‌ها با رنگ‌آمیزی تریپان بلو تعیین شد. بخشی از سلول‌ها برای بررسی وجود آنتی‌ژن CD34 با فلوسایتومتری تجزیه و تحلیل شدند و بقیه در یک فلاسک

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

۲۵ سانتی‌متر مربعی کشت گردیدند. محیط مورد استفاده DMEM حاوی ۱۵٪ سرم جنین گاوی(FBS) و آنتی‌بیوتیک‌های پنی‌سیلین و استرپتومایسین بود. ۲۴ ساعت پس از کشت اولیه، سلول‌های غیر چسبان با شستشو حذف شدند و کشت سلول‌های چسبان به منظور مطالعات بعدی ادامه یافت.

بررسی سلول‌ها از نظر حفظ توان تکثیر:

سلول‌های $CD34^+$ پس از رسیدن به مرحله پوشاندن سطح(Confluency)، پاساژ داده شد و به دو فلاسک جدید منتقل گردید. کشت سلول‌های مورد نظر تا رسیدن به ۸۰ تا ۹۰ درصد پوشیدگی سطح ادامه داده شد. در ادامه سلول‌ها پاساژ داده شد و به دو فلاسک جدید منتقل گردید. مراحل فوق تا پاساژ چهارم انجام گرفت.

آماده‌سازی سلول‌ها برای فلوسایتومتری:

تعداد ۲۰۰۰۰۰ سلول در لوله‌های فالکون ریخته، به هر کدام ۱۰۰ میکرولیتر سرم رت ۳٪ اضافه و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۴°C نگهداری شد. سلول‌ها با ۵۰۰ میکرولیتر بافر شستشو(PBS حاوی ۱٪ سرم جنین گاوی) شسته شدند و پس از سانتریفوژ(g ۴۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه) به مدت ۳۰ دقیقه روی یخ و در یخچال با آنتی‌بادی‌های اولیه CD34، CD45،CD11b، Vcam-1، Scal-1 کونژوگه با FITC(فلورسنس ایزوتیوسیانات)(آمریکا، ابیوساینس) و با CD44 کونژوگه با PE(فیکواریترین) انکوبه شدند و برای کنترل منفی سلول‌ها با آنتی‌بادی‌های IgG2b ، PE-IgG2a و IgG2b ،FITC-IgG2a انکوبه شدند. در مرحله بعد سلول‌ها پس از شستشو به مدت ۱۰ دقیقه با دور g ۴۰۰ سانتریفوژ شدند. سپس به سلول‌ها بافر فیکس کننده(PBS حاوی ۱٪ پارافرم آلدئید و ۱٪ سرم جنین گاوی) اضافه شد و با دستگاه فلوسایتومتری(بکتون دیکنسون ـ آمریکا) و نرم‌افزار WinMDI تجزیه و تحلیل شدند. در این مطالعه هر آزمایش سه بار تکرار شد.

تمایز به استخوان و چربی:

به منظور اثبات ماهیت مزانشیمی سلول‌های مورد بررسی، در این مطالعه از آزمایش تمایز به استخوان و چربی استفاده شد. برای این منظور حدود ۱۰۰۰۰۰ سلول در ظروف ۶ خانه‌ای و در فلاسک ۲۵ سانتی‌متر مربع در محیط DMEM ، حاوی ۱۵ درصد سرم جنین گاوی و آنتی‌بیوتیک کشت داده شد. پس از مرحله پوشاندن سطح، محیط سلول‌ها با محیط تمایز به استخوان و چربی جایگزین شد. محیط تمایز به استخوان شامل DMEM محتوی ۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر اسکوربیک اسید ۳ فسفات، ۱۰ نانومولار دگزامتازون و ۱۰ میلی مولار بتا ـ گلیسرول فسفات(سیگما، آمریکا) و محیط تمایز به چربی شامل DMEM حاوی ۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر اسکوربیک۳ ـ فسفات، ۱۰۰ نانو مولار دگزامتازون و ۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر ایندومتاسین(آمریکا، سیگما) بود(۱۵).

ارزیابی تمایز:

در پایان هفته سوم، تمایز سلول‌ها مورد ارزیابی قرار گفت. برای استخوان از رنگ‌آمیزی آلیزارین رد و برای چربی از رنگ‌آمیزی اویل رد استفاده شد. در ضمن بیان mRNA ، برخی مارکرهای استخوانی و چربی با روش RT-PCR مورد بررسی قرار گرفت.

آنالیز RT-PCR :

سلول‌ها در روز صفر و ۲۱ تمایز، از لحاظ بیان ژن‌های استخوانی نظیر استئوکلسین(OC)، استئوپونتین(OP) و گیرنده هورمون پاراتیروئید(PTHR) و ژن‌های چربی از قبیل آدیپسین(AD) و لیپوپروتئین لیپاز(LPL) مورد ارزیابی قرار گرفتند. برای این منظور، RNA سلول‌های مورد نظر با استفاده از دستورالعمل شرکت فرمنتاز جداسازی شد. در ادامه ساخت cDNA در واکنش رونویسی معکوس(RT) با استفاده از کیت Revert Aid H cDNA synthesis kit minus first strand (فرمنتاز) و ۰/۰۵ میکرو مول آغازگر ۱۸ اولیگو(dt) انجام شد. در ادامه واکنش PCR با ۲۰۰dNTPs میکرو مول، c DNA ۲/۵ میکرو مول، (سیناژن، AMS^{TM}) PCR buffer × ۱، $MgCl_2$ ۰/۷۵ میکرو مول، Tag DNA polymerase ۲۵ میکرولیتر/ unit ۱ فرمنتاز و ۰/۵ میکرو مول از

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

جدول ۱: توالی آغازگر ژن‌های تمایز به چربی و استخوان

ژن‌ها	توالی آغازگرها	اندازه (bp)	دمای آنیلینگ (°C)
لیپوپروتئین لیپاز (LPL)	F 5' GAG GAC ACT TGT CAT CTV ATT C 3' R 5' CT TCT TAT TGGTCA GAC TTC C 3'	۳۷۶	۶۲
آدیپسین (AD)	F 5' ATG GTA TGA TGT GCA TGT AG 3' 5' CAC ACA TCA TGT TAA TGG TGA C 3'	۳۰۹	۵۷
استئوکلسین (OC)	F 5' GAC CAT CTT TCT GCT CAC TCT G 3' R 5' GTG ATA CCA TAG ATG CGT TTG TAG 3'	۲۷۶	۶۰
استئوپونتین (OP)	F 5' CAG TGA TTT GCT TTT GCC TGT TTG 3' R 5' GGT CTC ATC AGA CTC ATC CGA ATG 3'	۳۷۷	۶۷
گیرنده PTH (PTHR)	F 5' GAC AAG CTG CTC AAG GAA GTT CTG 3' R 5' GGA ATA TCC CAC GGT GTA GAT CAT G 3'	۴۴۸	۶۷
β – توبولین	F 5' GGAACATAGCCG TAAACTGC 3' R 5' TCACTGTGCCTGAACTTACC 3'	۳۱۷	۶۳

آغازگرهای ژن‌های اختصاصی بافت استخوان، چربی و بتاـتوبولین(در جدول یک نشان داده شده است) در دمای ۹۳ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه، دمای ۹۳ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۵ ثانیه، دمای آنیلینگ به مدت ۴۵ ثانیه، دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۵ ثانیه و در ۳۰ سیکل انجام شد. در پایان محصول PCR درون چاهک‌های ژل ۱/۵٪ آگاروز ریخته شد و پس از الکتروفورز با رنگ اتیدیوم بروماید رنگ‌آمیزی و سپس ارزیابی شد.

یافته ها

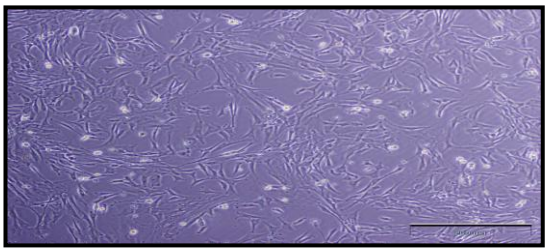
کشت سلول:

۲۴ ساعت بعد از کشت سلول‌های $CD34^+$ و حذف سلول‌های غیر چسبان، سلول‌های دوکی شکل به کف ظرف کشت پلاستیک چسبیدند. یک هفته پس از کشت اولیه، سلول‌های پاساژ اول به مرحله پوشیدگی سطح رسیدند و در این زمان سلول‌های یک دست دوکی شکل مشاهده گردید(شکل ۱ الف). در پاساژهای بالاتر، مدت زمان لازم برای رسیدن به مرحله پوشیدگی سطح افزایش یافت و مورفولوژی آن‌ها دچار تغییرات جزیی شد به طوری که در پاساژ چهارم بعضی سلول‌های پهن هم در بین سلول‌های دوکی مشاهده می‌شد(شکل ۱ ب).

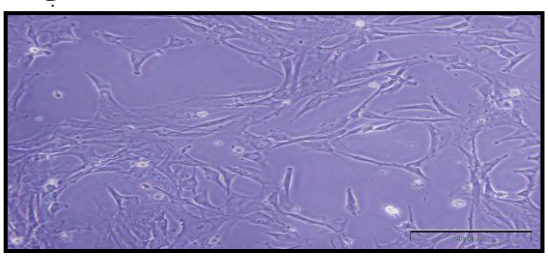
بررسی مارکرهای سطح سلولی:

نتایج مربوط به مارکرهای سطحی سلول‌های $CD34^+$ تخلیص شده از سلول‌های مغز استخوان چسبیده به ظرف کشت پلاستیک حاصل از کشت سلول‌های مورد نظر، در شکل‌های ۲ و ۳ نشان داده شده است.

الف

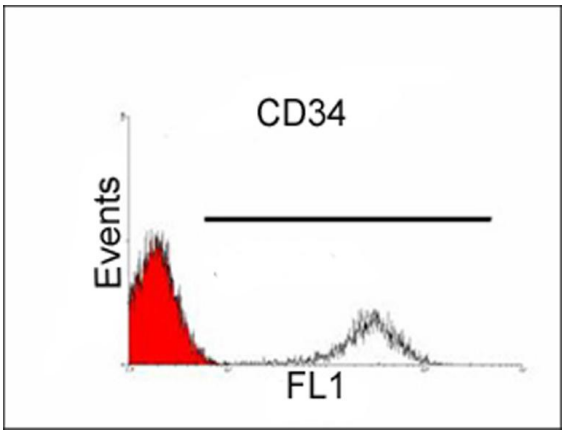


ب



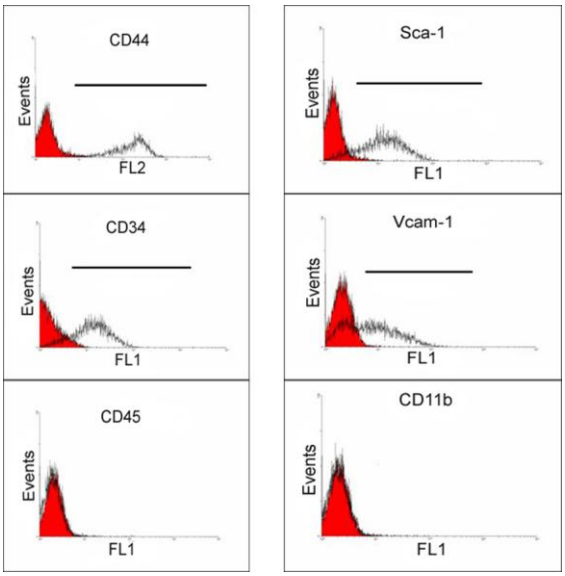
شکل ۱: الف ـ کشت اولیه سلول‌های $CD34^+$ مغز استخوان موش: جمعیت سلولی از لحاظ مورفولوژی همگون بوده و دوکی شکل هستند(روز هفتم کشت، میکروسکوپ فاز کنتراست، بزرگ‌نمایی ×۱۰۰). ب ـ سلول‌های پاساژ چهارم. سلول‌های دوکی کمی بزرگ‌تر شده و در بین آن‌ها سلول‌های پهن مشاهده می‌شود(روز سی‌ام کشت، میکروسکوپ فاز کنتراست، بزرگ‌نمایی ×۱۰۰).

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



***Events: تعداد سلول‌های فلوسیتومتری**

شکل ۲: بیان مارکر CD34 در سلول‌های تخلیص شده به روش انتخاب ایمنی مثبت. در این سلول‌ها مارکر CD34 نزدیک به ۱۰۰ درصد بیان داشت.



***Events: تعداد سلول‌های فلوسیتومتری**

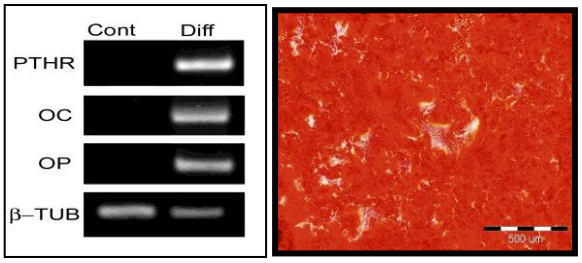
شکل ۳: بیان برخی مارکرهای سطحی در سلول‌های $CD34^+$ چسبیده به ظرف کشت. در این سلول‌ها مارکرهای CD44 ، Sca-1 و Vcam-1 بیان شدند اما مارکرهای CD11b و CD45 بیانی نداشتند.

به منظور بررسی جداسازی سلول‌های CD34 از مغز استخوان موش، بیان این مارکر با دستگاه فلوسایتومتری بررسی شد. نتایج نشان داد که مارکر CD34 در ۹۹٪ سلول‌ها بیان می‌شود. بررسی مارکر سطح سلول‌های $CD34^+$ پس از کشت سلولی(پاساژ اول) نشان داد که بیان مارکر CD34 تا ۷۵٪ کاهش می‌یابد. در این سلول‌ها مارکر CD44 در حد بسیار بالایی(۹۵ درصد سلول‌ها) بیان شد. مارکر Sca-1 در حد ۷۰٪ و مارکر Vcam-1 در حد ۱۰ درصد بیان شد. مارکرهای سطحی CD45 و CD11b در سلول‌های مورد نظر بیان نشدند.

بررسی ویژگی‌های تمایزی:

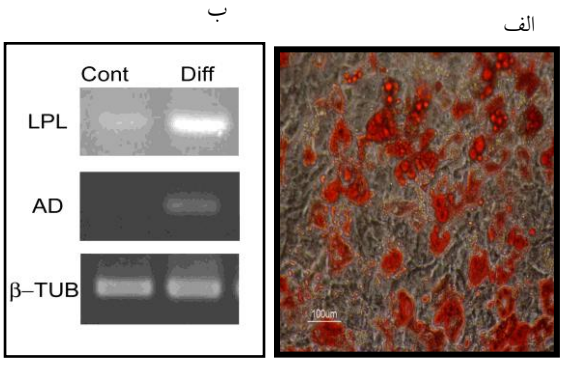
سلول‌های $CD34^+$ چسبیده به ظرف کشت پلاستیک که به مدت ۳ هفته در محیط تمایز به استخوان قرار گرفته بودند، با رنگ‌آمیزی اختصاصی آلیزارین رد به رنگ قرمز درآمدند که حاکی از معدنی شدن ماتریکس بود(شکل ۴ الف). هم چنین بررسی‌های RT-PCR نشان داد که

ب الف



شکل ۴ : تمایز سلول‌های $CD34^+$ کشت اولیه به استخوان. سلول‌های $CD34^+$ که به مدت ۳ هفته در معرض محیط تمایز به استخوان قرار گرفته‌اند و با آلیزارین رد رنگ‌آمیزی شده‌اند(الف). آنالیز RT-PCR نشان دهنده بیان مارکرهای استخوان در این سلول‌هاست(ب).

ب الف



شکل ۵: تمایز سلول‌های $CD34^+$ کشت اولیه به چربی. الف ـ سلول‌های $CD34^+$ که به مدت ۳ هفته در معرض محیط تمایز به چربی قرار گرفته‌اند و با اویل رد رنگ‌آمیزی شده‌اند. ب ـ آنالیز RT-PCR نشان‌دهنده بیان مارکرهای چربی در این سلول‌هاست.

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

ژن‌های مارکر استخوان(استئوکلسین، استئوپونتین و گیرنده هورمون پاراتیروئید) در سلول‌های تمایز یافته به خوبی بیان شده است(شکل ۴ ب).

پس از ۳ هفته در محیط تمایز آدیپوژنیک، رنگ‌آمیزی اویل رد نشان داد، قطرات چربی در سیتوپلاسم سلول‌ها تجمع یافته و آنالیز RT-PCR حاکی از بیان ژن‌های شاخص چربی(آدیپسین و لیپو پروتئین لیپاز) بود(شکل ۵). این سلول‌ها توانایی تمایز خود را تا پاساژ چهارم حفظ کردند.

بحث

هدف تحقیق حاضر، جداسازی سریع و مستقیم سلول‌های بنیادی مزانشیمی با توانایی تمایز چند دودمانی از سلول‌های مغز استخوان موش نژاد C57B1/6 با استفاده از روش انتخاب مثبت سلول‌های $CD34^+$ بود.

جداسازی سلول‌های بنیادی مزانشیمی موش با استفاده از روش مرسوم چسبیدن به پلاستیک به علت رشد ناخواسته سلول‌های خونی و غیر مزانشیمی در جریان کشت سلولی، کارایی بالایی ندارد. در مطالعه حاضر، سلول‌های $CD34^+$ با روش انتخاب مثبت از سلول‌های مغز استخوان موش C57BL/6 جداسازی شدند.

انتخاب این روش به این دلیل بود که در سال ۲۰۰۴ پیستر و همکارانش گزارش کردند که مارکر CD34 در سلول‌های بنیادی مزانشیمی نژادهای موش Balb/c، FVB/N و BL/6 بیان می‌شود. این محققین به تفاوت بیان این مارکر در نژادهای مختلف موش اشاره داشتند. در مطالعه این محققین، مارکر CD34 در موش BL/6 بیش از ۷۵٪ ولی در موش Balb/c کمتر از ۲۰٪ بیان داشت(۱۵).

در این مطالعه، ۲۴ ساعت پس از تخلیص و کشت سلول‌های $CD34^+$، محیط رویی دور ریخته شد و سلول‌های چسبیده به ظرف کشت پلاستیک از نظر خصوصیات تمایزی و مارکر سطحی مورد بررسی قرار گرفت. این سلول‌ها مورفولوژی فیبروبلاستی دوکی شکل داشتند.

بررسی ویژگی‌های خاص سلول‌های شبه فیبروبلاستی که با این روش جدا شدند نشان داد که آن‌ها سلول‌های بنیادی مزانشیمی هستند. این سلول‌ها به راحتی در محیط‌های ویژه به دودمان‌های مزانشیمی تمایز یافتند. در این مطالعه تمایز سلولی با روش‌هایی از قبیل RT-PCR و رنگ‌آمیزی سلول و ماتریکس سلولی مشخص شد. توانایی تمایز سلول‌ها به استخوان از روی بیان ژن‌های رسپتورهورمون پاراتیروئید(PTHR)، استئوکلسین(OC) و استئوپونتین (OP) و قرمز شدن ماتریکس معدنی شده(رنگ‌آمیزی الیزارین رد) مشخص گردید. تمایز به چربی از روی بیان آدیپسین(AD) و لیپوپروتئین لیپاز(LPL) و قرمز شدن قطرات چربی موجود در سیتوپلاسم سلول‌ها(رنگ‌آمیزی اویل رد) ارزیابی شد. هر چند هنوز مارکر اختصاصی برای سلول‌های بنیادی مزانشیمی موش گزارش نشده و بین محققین اختلاف نظراتی وجود دارد اما محققین پیشین به منظور اثبات مزانشیمی بودن سلول‌های بنیادی مغز استخوان موش BL/6 ، از بیان مارکرهای CD44، Sca-1 و عدم بیان مارکرهای CD45 و CD11b استفاده کرده‌اند(۱۵، ۵). در این مطالعه بیان بالای مارکرهای CD44 و Sca-1 و عدم بیان مارکرهای CD11b و CD45 مشاهده شد. خاصیت چسبندگی به ظرف کشت پلاستیک، توان تمایز به دو دودمان اسکلتی، مورفولوژی فیبروبلاستی سلول‌ها و نوع مارکرهای سطح سلول ما را متقاعد ساخت که سلول‌های چسبیده شبه فیبروبلاستی $CD34^+$، سلول‌های بنیادی مزانشیمی هستند. محققین پیشین از این خصوصیات (چسبندگی به پلاستیک، تمایز و مورفولوژی دوکی فیبروبلاستی) به دفعات برای ارزیابی مزانشیمی بودن سلول‌های جدا شده از مغز استخوان استفاده کرده‌اند(۱۶، ۱۵، ۸، ۵). کاهش بیان مارکر CD34 از ۹۹٪ (قبل از انتخاب ایمنی مثبت) به ۷۵٪(پس از کشت اولیه) می‌تواند به دلیل حذف سلول‌های بنیادی خون‌ساز در اثر شستشو و تعویض محیط کشت و از طرف دیگر تغییر مارکرهای سطح سلول‌های مزانشیمی در جریان کشت سلولی باشد(۱۹، ۱۸).

تا به حال چندین روش مختلف برای جداسازی سلول‌های بنیادی مزانشیمی موش بر اساس انتخاب ایمنی ارایه شده است. در این زمینه، بادو و همکاران وی از

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

روش انتخاب منفی(Negative Immunoselection) استفاده کردند(۱۷). این محققین پس از کشت سلول‌های آسپیره شده مغز استخوان، با پاساژ دادن و انکوبه کردن سلول‌های مغز استخوان موش‌های نژاد FVB/N با دانه‌های آهن‌ربایی متصل به آنتی‌بادی‌های CD34 ، CD11b و CD45 اقدام به حذف سلول‌های خونی و جداسازی سلول‌های بنیادی مزانشیمی نمودند. این محققین دریافتند که در این روش، پس از انتخاب ایمنی، بیان ژن‌هایی که در تکثیر سلولی و پیشرفت چرخه سلولی دخالت دارند، کاهش می‌یابد که این امر رشد کم سلول‌های بنیادی مزانشیمی را در پی دارد. در ضمن تراپل و همکارانش مشاهده کردند که یک هفته بعد از حذف دودمان گرانولوسیت ـ مونوسیت، با استفاده از دانه‌های آهن‌ربایی متصل به آنتی‌بادی CD11b بعضی از این سلول‌ها در محیط کشت پدیدار می‌شوند(۱۶). در این مطالعه، با روش انتخاب ایمنی مثبت اقدام به جداسازی سلول‌های $CD34^+$ از مغز استخوان موش نژاد C57BL/6 گردید. در مطالعه حاضر، ۲۴ ساعت پس از کشت، محیط رویی که اکثر آن را سلول‌های بنیادی خون‌ساز CD34 تشکیل می‌دادند دور ریخته شد و کشت سلول‌های چسبنده بنیادی مزانشیمی تا پاساژ چهارم ادامه داده شد. سلول‌های مورد نظر در این مطالعه توانایی تکثیر بالاتری نسبت به مطالعات پیشین داشتند و این توانایی را حداقل تا پاساژ چهارم حفظ نمودند و از طرفی هیچ آلودگی به سلول‌های غیر مزانشیمی CD11b و CD45 مشاهده نشد(۱۷، ۱۶).

این که چرا سلول‌های مزانشیمی مورد نظر نسبت به سلول‌های تخلیص شده به روش انتخاب ایمنی منفی توانایی تکثیر خود را در دوره زمانی طولانی‌تری حفظ می‌کنند بر ما معلوم نیست اما این طور به نظر می‌رسد که سلول‌های بنیادی مزانشیمی $CD34^+$ از نظر مرحله تکاملی پروژنیتورتر باشند که البته اثبات این موضوع به تحقیقات بیشتر محتاج است. در مطالعه حاضر، سلول‌های $CD34^+$ پس از قرار گرفتن در محیط‌های تمایزی مربوطه به آسانی به استخوان و چربی تمایز یافته و این خاصیت را تا پاساژ چهارم حفظ کردند. تلاش ما در استفاده از این روش در جداسازی نژادهای موشی دیگر با موفقیت همراه نبود که می‌تواند تایید کننده این موضوع باشد که بعضی خصوصیات سلول‌های بنیادی مزانشیمی منحصر به نژادهای موشی خاص است.

نتیجه‌گیری

به نظر می‌رسد که استفاده از روش انتخاب ایمنی مثبت، روشی مناسب برای جداسازی سلول‌های مزانشیمی از نژاد C57 BL/6 باشد. سلول‌های $CD34^+$ مغز استخوان موش C57/B16 با توانایی چسبیدن به سطوح پلاستیک و تمایز به دودمان‌های اسکلتی، سلول‌های بنیادی مزانشیمی می‌باشند.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله نویسندگان مقاله از حمایت‌های مالی شرکت فن‌آوری بن‌یاخته تشکر و قدردانی می‌نمایند.

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

References :

1- Fuchs E, Segre JA. Stem cells: a new lease on life. Cell 2000;100: 143-15
2- Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglase R, Mosca JD, *et al*. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. Science 1999; 284:143-7.
3- Friedenstein AJ, Gorskaja UF, Kulagina NN. Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs. Exp Hematol 1976; 4:267-74.
4- Bianco P, Riminucci M, Gronthos S, Robey PG. Bone marrow stromal stem cells: nature, biology, and potential applications. Stem Cells 2001; 19: 180-92.
5- Sun S, Guo Z, Xiao X, Liu B, Liu X, Tang P-H, *et al.* Isolation of mouse marrow mesenchymal progenitors by a novel and reliable methods. Stem cells 2003; 21: 527-35.
6- Prockop DJ. Marrow stromal cells as stem cells for non-hematopoietic tissues. Science 1997; 276:71-4.
7- Baksh D, Song L, Tuan RS. Adult mesenchymal stem cells: characterization, differentiation, and application in cell and gene therapy. Cell Mol Med 2004; 8:301-16.
8- Horwitz EM, Gordon PL, Koo WK, Marx JC, Neel MD, McNall RY, *et al*. Isolated allogeneic bone marrow-derived mesenchymal cells engraft and stimulate growth in children with osteogenesis imperfecta: implications for cell therapy of bone. Proc Natl Acad Sci USA 2002 ; 99:8932-7.
9- Koc ON, Gerson SL, Cooper BW, Dyhouse SM, Haynesworth SE, Caplan AI, et al. Hematopoietic recovery after confusion of autologous-blood stem cells and culture-expanded marrow mesenchymal stem cells in advanced breast cancer patients receiving high-dose chemotherapy. J clin Oncol 2000; 18(2): 307.
10- Petite H, Viateau V, Bensaid W, Meunier A, De Pollak C, Bourguignon M, *et al*. Tissue-engineered bone regeneration. Nat Biotechnol 2000; 18:959-63.
11- Quarto R, Mastrogiacomo M, Cancedda R, Kutepov SM, Mukhachev V, Lavroukov A, *et al*. Repair of large bone defects with the use of autologous bone marrow stromal cells. N Engl J Med 2001 ;344: 385-6.
12- Grinnemo KH, Mansson A, Dellgren G, Klingberg D,Wardell E, Drvota V, *et al*. Xenoreactivity and engraftment of human mesenchymal stem cells transplantation into infracted rat myocardium. Thorac Cardiovasc Surg 2004;127:1293-300
13- Barry FP. Mesenchymal stem cell therapy in joint disease. Novartis Found Symp 2003; 249:86-96
14- Eslami nejad MB, Nikmahzar A, Taghiyar L, Nadri S, Massumi M. Murine mesenchymal stem cells isolated by low density primary culture system. Dev Growth Differ 2006; 48:361-70.
15- Peister A, Mellad JA, Larson BL, Hall BM, Gibson LF, Prockop DJ. Adult stem cells from bore marrow (MSCs) isolated from different strains of inbredmice vary in surface epitopes, rates of proliferation, and differentiation potential. Blood 2004; 103: 1662- 8.
16- Phinney DG, Kopen G, Isaacson RL, Prockop DJ. Plastic adherent stromal cells from the bone marrow of commonly used strains of inbred mice: variations in yield, growth, and differentiation. Cell Biochem 1999; 72:570-85.
17- Tropel P, Noel D, Platet N, Legrand P, Benabid AL, Berger F. Isolation and characterization of mesenchymal stem cells from adult mouse bone marrow. Exp Cell Res 2004; 295:395-406.
18- Baddoo M, Hill K, Wilkinson R, Gaupp D, Hughes C, Kopen GC. Characterization of Mesenchymal stem cells isolated from murine bone marrow by negative selection. J cell Bioche 2003; 89: 1235-49.
19- Eslami Nejad MB, Nadri S, Hosseini RH. Expression of Thy 1.2 surface antigen increases significantly during the murine mesenchymal stem cells cultivation period. Dev Growth Differ 2007; 49: 351-64.

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

فصلنامه پژوهشی خون

Isolation of CD34$^+$ mesenchymal stem cells from mouse bone marrow

Nadri S.[1,2](MS), Soleimani M.[3](PhD)

[1]*Stem cell department, Stem cell technology*
[2]*Payam-e-Noor University*
[3]*Tarbiat Modarres University*

Abstract

Background and Objectives

The isolation and purification of mesenchymal stem cells (MSCs) from mouse via plastic adherent cultures are arduous due to the unwanted growth of hematopoietic cells and non-MSCs. In this study, homogenous populations of CD34$^+$ MSCs from mouse bone marrow were purified through positive immunoselection.

Materials and Methods

In this experimental study, C57BL/6 mice were sacrificed. Their bone marrow cells were aspirated and incubated with anti-CD34 conjugated magnetic beads. After immunoselection, a sample of the cells was prepared for flow cytometry in order to examine the expression of CD34 antigen and the remains were cultivated. 24 hours later, non-adherent cells, mostly consisting of CD34$^+$ hematopoietic stem cells were removed and the plastic adherent cultivated cells were investigated for surface markers (CD44, Sca-1, Vcam-1, CD34, CD11b and CD45). The plastic adherent cultivated cells were differentiated into the osteoblastic and adipogenic lineages to investigate the mesenchymal nature. Furthermore, the expression of some surface markers were investigated through flow cytometry.

Results

Purified populations of fibroblast-like CD34$^+$ cells were achieved in the first passage (one week after initiative cultivation). The CD34, CD44, Sca-1 and Vcam-1 markers were expressed but CD11b and CD45 were absent. Osteocyte (osteocalsin, osteopontin, parathyroid hormone receptor) and adipocyte (lipo protein lipase and adipsin) differentiating genes were expressed in these cells.

Conclusions

This study indicates that this protocol can result in efficient isolation of homogenous populations of MSCs from C57BL/6 mouse bone marrow. We showed that plastic adherent murine bone marrow derived CD34$^+$ cells with capability of differentiating into skeletal lineages *in vitro* are MSCs.

Key words: Mesenchymal stem cells, Bone marrow, CD34 antigen
SJIBTO 2007; 4(2): 143-151

Received: 6 Jan 2007
Accepted: 25 Aug 2007

Correspondence: Soleimani M., PhD of Hematology. Tarbiat Modarres University.
P.O.Box:14115-111, Tehran, Iran. Tel: (+9821)88011001; Fax : (+9821)88013030
E-mail: *soleimani.masoud@gmail.com*

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