

## روند تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی انسانی به سلول‌های استئوبلاست و بررسی میزان بیان ژن‌های استئوپونتین و استئوکلکسین

مه‌ری اشکی<sup>۱</sup>، ناصر امیری‌زاده<sup>۲</sup>، محمد علی جلیلی<sup>۳</sup>، نسیم حیاتی رودباری<sup>۴</sup>، محمد حسین محمدی<sup>۵</sup>، مریم امانی<sup>۵</sup>

### چکیده

#### سابقه و هدف

بیان ژن‌های استئوپونتین و استئوکلکسین در طی تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی به سلول‌های استئوبلاست، دچار تغییراتی می‌شوند. هدف از این مطالعه، دست یافتن به راه‌کاری بهتر در جهت تمایز سریع‌تر این سلول‌ها به استئوبلاست بود.

#### مواد و روش‌ها

در یک مطالعه تجربی، سلول‌های تک هسته‌ای مغز استخون جدا شده و در محیط کشت DMEM-LG و ۱۰٪ FBS کشت داده شدند. در طی روزهای معین، RNA سلول‌های در حال تمایز استخراج شد. در مرحله بعد، ساخت cDNA ژن‌های استئوپونتین و استئوکلکسین توسط آغازگرهای اختصاصی انجام شد. سلول‌های مزانشیمی بر روی داربست سه بعدی تری کلسیم فسفات کشت داده شدند و میزان تمایز به سلول‌های استئوبلاستی با بررسی فعالیت آلکالین فسفاتاز مورد مطالعه قرار گرفت.

#### یافته‌ها

در طی روند این تمایز، بیان دو ژن استئوپونتین و استئوکلکسین طی نظمی تغییر نمود و حداکثر بیان استئوپونتین در روز ششم و استئوکلکسین در روز هفتم و هشتم تمایز بود. تمایز استئوژنیک سلول‌های مزانشیمی با رنگ آمیزی رسوبات معدنی با آلیزارین رد و افزایش بیان آلکالین فسفاتاز تایید شد.

#### نتیجه‌گیری

بررسی نتایج فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز، بیانگر تمایز بهتر سلول‌های بنیادی مزانشیمی در داربست سه بعدی تری کلسیم فسفات نسبت به محیط دو بعدی است. بیان ژن‌های استئوپونتین و استئوکلکسین در روند این تمایز نقش داشته و افزایش بیان آن‌ها می‌تواند راه‌کاری جهت القای تمایز استئوبلاستی در این سلول‌ها باشد.

**کلمات کلیدی:** سلول‌های بنیادی مزانشیمی، استئوپونتین، استئوکلکسین، استئوبلاست

تاریخ دریافت: ۱۹/۱۱/۱۲

تاریخ پذیرش: ۹۰/۶/۱۲

- ۱- کارشناس ارشد زیست‌شناسی سلولی و مولکولی - دانشکده علوم پایه دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران - ایران
- ۲- مؤلف مسؤول: PhD هماتولوژی و بانک خون - استادیار مرکز تحقیقات انتقال خون - مؤسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون - تهران - ایران - صندوق پستی: ۱۱۵۷-۱۴۶۶۵
- ۳- PhD شیمی دارویی - استادیار مرکز تحقیقات انتقال خون - مؤسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون - تهران - ایران
- ۴- PhD زیست‌شناسی سلولی تکوینی جانوری - استادیار دانشکده علوم پایه دانشگاه آزاد اسلامی - واحد علوم و تحقیقات تهران - ایران
- ۵- کارشناسی ارشد خون‌شناسی و بانک خون - مرکز تحقیقات انتقال خون - مؤسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون - تهران - ایران

**مقدمه**

در طی دو دهه گذشته، مطالعه‌های مختلفی در مورد نقش سلول‌های بنیادی مزانشیمی در خون‌سازی، تنظیم پاسخ ایمنی، تجدید و ترمیم بافت انجام شده است (۱، ۲). سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان انسان دارای استعداد زیادی جهت کاربرد در مهندسی بافت از جمله مهندسی بافت استخوان می‌باشند.

این سلول‌ها دارای پتانسیل بالایی برای تمایز به سلول‌های مختلف بافت‌های مزانشیمی هستند و به راحتی قابل جداسازی از مغز استخوان بیمار بوده، به میزان وسیعی در خارج از بدن تکثیر می‌شوند و بعد از تمایز به بافت‌های مختلف از جمله استخوان، قابل پیوند به همان بیمار هستند (۳-۵).

برای ترمیم ضایعات و نقایص استخوانی می‌توان از امکانات مهندسی بافت بهره برد. در این ارتباط، می‌توان از پیوند بافت استخوانی اتولوگ استفاده کرد یا با طراحی داربست مناسب و گذاشتن سلول‌های دارای پتانسیل تولید استخوان بر روی آن‌ها و پیوند در محل ضایعه، آن را ترمیم نمود. با توجه به محدودیت بافت استخوانی اتولوگ و لزوم عمل جراحی و ایجاد ضایعه در ناحیه دیگری برای تهیه این بافت، استفاده از داربست‌های سلولی برای ترمیم ضایعات استخوانی مورد توجه ویژه‌ای قرار گرفته است. در مطالعه‌های اخیر در زمینه مهندسی بافت نشان داده‌اند که استئوبلاست‌ها عملکرد خود را در محیط کشت سه بعدی بهتر از محیط کشت دو بعدی حفظ می‌کنند. هم چنین داربست‌های سه بعدی، سطوح بزرگ‌تر و بهتری را برای اتصال سلولی نسبت به محیط کشت دو بعدی فراهم می‌کنند. از این رو، رشد و تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی در داربست پلیمری سازگار با بدن (biocompatible) می‌تواند جهت ایجاد یک بافت در حد نیاز بالینی مؤثر باشد (۴).

در مطالعه‌های مختلف نیز نشان داده شده است که این داربست‌ها، توانایی تحریک استخوان‌سازی را دارا بوده و با بافت‌های بدن سازگار هستند (۴). به همین دلیل در این مطالعه علاوه بر بررسی رشد و تمایز سلول‌های مزانشیمی در محیط کشت دو بعدی، به بررسی رشد و تمایز آن‌ها در

محیط سه بعدی نیز پرداخته شده است. سرامیک‌های فسفات کلسیم به علت این که ساختاری مشابه با بخش غیر آلی ترکیب استخوان دارند، به عنوان داربست سلولی مورد استفاده قرار گرفته‌اند. عوامل مختلفی بر تمایز هرچه بهتر سلول‌های مزانشیمی مؤثرند. از جمله این عوامل، میزان بیان ژن‌های دخیل در طی این روند است. در طی تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی به سلول‌های استئوبلاست، بیان یک‌سری از ژن‌ها دچار تغییراتی می‌شود. فریدمن و همکاران و لین و همکاران در سال ۲۰۰۶ با توجه به مطلب فوق، نشان دادند که به منظور ارزیابی سلول‌های تمایز یافته، می‌توان بیان ژن‌هایی نظیر بن سیالوپروتئین (Bonesialoprotein)، استئوکلسین (Osteocalcin)، استریکس (Osterix) و استئوپونین (Osteopontin) را در سطح RNA و پروتئین بررسی نمود (۶، ۷). استئوپونین (OPN) در سال ۱۹۸۹ توسط هاین گارد و همکارانش به عنوان عامل مؤثر در معدنی شدن سلول‌های اجدادی استخوان معرفی شد (۸). استئوکلسین نیز یک نشانه شکل‌گیری استخوان است که توسط استئوبلاست‌ها تولید می‌شود و فراوان‌ترین و گسترده‌ترین پروتئین غیر کلاژنی مطالعه شده در استخوان می‌باشد (۱۱-۹).

استئوبلاست‌ها سلول‌های شکل‌دهنده استخوان بالغ هستند و بیان دو ژن استئوپونین و استئوکلسین در طی روند تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی به سلول‌های استئوبلاست، نقش مهمی را ایفا می‌کنند، لذا با توجه به توانایی این سلول‌ها در ترمیم بافت، بر آن شدیم تا این سلول‌ها را از مغز استخوان جدا کرده، در محیط کشت تکثیر داده و به سلول‌های استخوانی تمایز دهیم و میزان بیان ژن‌های استئوپونین و استئوکلسین را در طی این روند بررسی کنیم تا از این طریق، راه‌کاری در جهت تمایز بهتر و سریع‌تر این سلول‌ها به سلول‌های استئوبلاست بیابیم.

**مواد و روش‌ها**

نوع مطالعه در این تحقیق به صورت تجربی و روش انتخاب نمونه تصادفی بود. سلول‌های مزانشیمی از اهداکنندگان سالم پس از کسب رضایت تهیه شدند.

پوشاندند، محیط کشت با محیط تمایزی جایگزین شد. محیط تمایز به استخوان شامل: DMEM-LG، ۱۰٪ FBS، ۱ mM دگزامتازون، ۱ M اسید اسکوربیک دو فسفات و ۱ M گلیسرول دو فسفات (کمیکون-آمریکا) بود. هر ۳ روز یک بار، محیط تمایزی تعویض شد. بعد از ۱۵ روز، تمایز سلول‌ها با استفاده از رنگ‌آمیزی آلیزارین رد و آلکالین فسفاتاز مورد ارزیابی قرار گرفت. در ضمن بیان ژن‌های استئوکلسین و استئوپونین در روزهای معینی طی دوره تمایز با روش RT-PCR بررسی شد (۱۴، ۱۲).

به منظور تثبیت سلول‌های تمایز یافته، اتانول (مرک-آلمان) سرد ۷۰٪ به سلول‌ها افزوده گردید و سلول‌ها در دمای اتاق انکوبه شدند. سپس سلول‌ها با محلول آلیزارین (سیگما-آمریکا) رنگ‌آمیزی و در نهایت سلول‌های رنگ‌آمیزی شده با میکروسکوپ نوری ارزیابی شدند (۱۵). به منظور تثبیت سلول‌ها، محلول تثبیت‌کننده (سیگما-آمریکا) به سلول‌ها افزوده شد، سپس در دمای اتاق انکوبه شدند. بعد از آن محلول رنگ‌آمیزی (سیگما-آمریکا) به سلول‌ها افزوده شد و در دمای ۲۶-۱۸ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. سپس سلول‌ها با همتوکسیلین (سیگما-آمریکا) رنگ‌آمیزی و در نهایت با میکروسکوپ نوری ارزیابی شدند (۱۶).

سلول‌ها از نظر بیان ژن‌های استئوکلسین و استئوپونین در محیط دو بعدی مورد بررسی قرار گرفتند. بدین منظور، کل RNA سلول‌های تمایز نیافته و سلول‌های تمایز یافته (در طی تمایز در روزهای مشخص در محیط دو بعدی) با استفاده از دستورالعمل کیت RNX-Plus (سیناژن-ایران) جداسازی شد. به منظور مساوی بودن میزان RNA کل مورد استفاده در طی این بررسی، اولاً در هنگام تمایز، تعداد مساوی از سلول‌های مزانشیمی ( $10^4 \times 5$  سلول) در چاهک‌های پلیت ۲۴ خانه‌ای کاشته شد. در ثانی تعداد تکرار برای هر روز ۳ چاهک در نظر گرفته شد تا تعداد کافی سلول در دسترس باشد و نهایتاً با استفاده از دستگاه اسپکتروفوتومتر (نانودراپ)، کمیت RNA استخراج شده اندازه‌گیری گردید و سعی شد میزان یکسانی از RNA در تمام روزها مورد بررسی قرار گیرد. سپس از روی RNA استخراج شده، cDNA در واکنش رونویسی معکوس

در مطالعه حاضر ۱۰ میلی لیتر نمونه مغز استخوان از اهداکنندگان سالم تهیه گردید. به طور خلاصه، سلول‌های تک هسته‌ای با استفاده از گرایان شیب غلظت روی فایکول جدا شدند و در فلاسک کشت ۲۵ سانتی‌متر مربع حاوی ۶ میلی‌لیتر محیط کشت DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium، سیگما-آمریکا)، ۱۰٪ FBS (اینویتروژن-آمریکا) و آنتی بیوتیک‌های استرپتومایسین و پنی‌سیلین (سیناژن-ایران) کشت داده شدند. ۴۸ ساعت بعد، سلول‌های غیر چسبنده با تعویض محیط حذف شدند و تنها مزانشیما استم سل‌های انسانی (hMSCs) باقی ماندند. به مدت ۱۴ روز، هر ۳ روز یک بار محیط کشت تعویض شد. پس از این مدت، سلول‌های مزانشیمی تکثیر یافته و ۸۰٪ کف فلاسک را پوشاندند. در این زمان، سلول‌ها پاساژ داده شدند و به فلاسک‌های جدید منتقل گردیدند و ادامه مطالعه روی این سلول‌ها انجام شد (۱۳، ۱۲).

سلول‌های تریپسینه شده توسط تریپسین (اینویتروژن-آمریکا) در ۱ میلی‌لیتر محلول PBS (Phosphate buffer saline) (بیومدیکال-آمریکا)، سوسپانسیون شدند. ۱۰۰ میکرولیتر از سلول‌ها با ۱۰ میکرولیتر از آنتی‌بادی‌های CD105، CD166 (داکو-دانمارک) کتزوگه با فیکواریترین (PE) و آنتی‌بادی‌های CD90، CD34، CD45، CD44 (داکو-دانمارک) کتزوگه با فلورسینس ایزوتیوسیانان (FITC) و برای کنترل منفی با آنتی‌بادی‌های PE-IgG1 و FITC-IgG1 (داکو-دانمارک) مخلوط شدند و به مدت ۳۰ دقیقه در ۴ درجه سانتی‌گراد و تاریکی انکوبه شدند. در مرحله بعد، سلول‌ها با ۲٪ PBS BSA (سیگما-آمریکا) شستشو داده شدند و در ۵۰۰ میکرولیتر PBS سوسپانسیون و با دستگاه فلوسایتومتری تجزیه و تحلیل شدند (۱۲).

به منظور تمایز سلول‌های مزانشیمی به سلول‌های استئوبلاست،  $10^4 \times 5$  سلول در محیط DMEM حاوی ۱۰٪ سرم حیوانی در چاهک‌های پلیت ۲۴ خانه‌ای که با کلاژن و ویتروکتین (کمیکون-آمریکا) پوشیده شده بودند، کشت داده شد و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و ۵٪  $CO_2$  نگهداری شد. بعد از این که سلول‌ها کف پلیت را ۱۰۰٪

**یافته‌ها**

۴۸ ساعت بعد از کشت سلول‌های تک هسته‌ای، سلول‌های غیر چسبان حذف شدند. سلول‌های دوکی شکل مزانشیمی پس از گذشت سه روز در محیط کشت به صورت سلول‌های چسبنده ظاهر شدند. تعدادی سلول هماتوپوئیتیک به طور آزاد یا چسبنده به سلول‌های مزانشیمی، هنوز در محیط دیده شد که در روزهای بعدی با تعویض محیط، این سلول‌ها حذف شدند و تنها سلول‌های مزانشیمی در محیط باقی ماندند. کشت اولیه در حدود ۱۰ تا ۱۴ روز طول کشید که در نهایت در روز چهاردهم، سلول‌ها بیش از ۸۰٪ کف فلاسک را پوشاندند (شکل ۱).

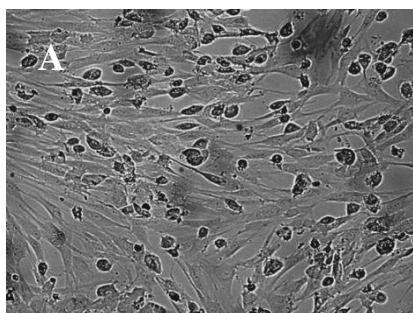
درصد بیان مارکرهای اختصاصی سلول‌های بنیادی مزانشیمی شامل CD90، CD166، CD105، CD44 و CD45 در سلول‌های جدا شده از مغز استخوان به ترتیب ۹۶/۸٪، ۹۸/۸٪، ۹۳٪ و ۹۹/۵٪ بود. در حالی که مارکرهای ویژه سلول‌های هماتوپوئیتیک از جمله CD34 و CD45 در این سلول‌ها بیان قابل توجهی (۳/۸٪ و ۲/۸٪) را نشان ندادند (شکل ۲).

سلول‌های مزانشیمی که به مدت ۱۵ روز در محیط تمایز به استخوان قرار گرفته بودند، با رنگ‌آمیزی اختصاصی آلزارین رد به رنگ قرمز در آمدند که حاکی از تجمع عناصر معدنی بر روی ماتریکس بود. به علاوه رنگ‌آمیزی آلكالین فسفاتاز نشان‌دهنده افزایش میزان

با استفاده از آغازگرهای هگزامر رندم و آنزیم ترانس کریپتاز معکوس مطابق با دستورالعمل کیت ساخت cDNA (اینویترورژن-آمریکا) تهیه گردید. در ادامه، واکنش PCR با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ژن استئوپونتین (F: 5'- TGA GAC CAA TGA GCA TTC CGA TG-3' و R: 5'- CAG GGA GTT TCC ATG AAG CCA C -3' و ژن استئوکلسین (F: 5'- AGC GAG GTA GTG AAG AGA-3' و R: 5'- AGG GGA AGA GGA AAG AAG-3') در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه، در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه، دمای آنیلینگ ۵۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۵ ثانیه، دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۵ ثانیه و دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه برای تکثیر نهایی در ۳۴ سیکل انجام شد.

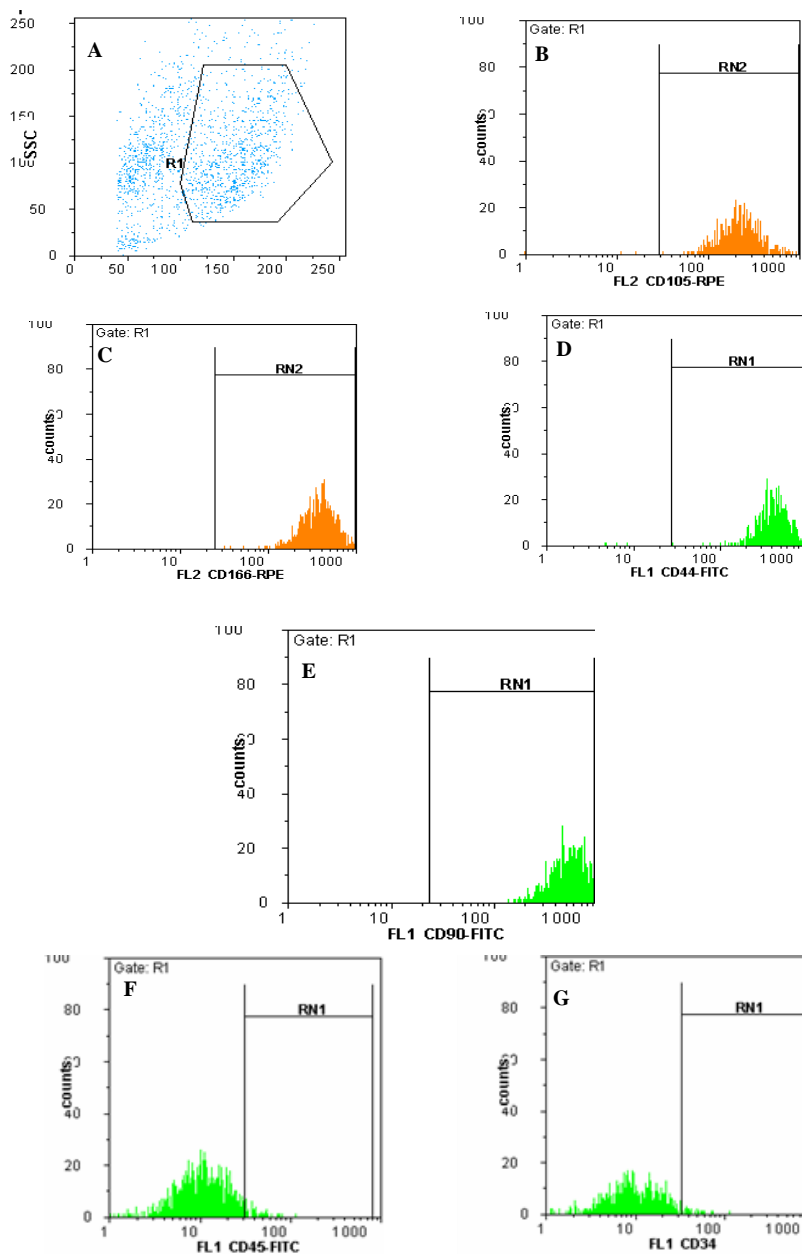
در پایان محصول PCR بر روی ژل آگاروز ۲٪ (سیگما-آمریکا) الکتروفورز گردید و با رنگ اتیدیوم بروماید (بهرینگ-آلمان) رنگ آمیزی و ارزیابی شد (۱۷، ۱۸).

داربست‌های سلولی سه بعدی کلسیم فسفات (بیوساینس-آمریکا) در چاهک‌های پلیت ۹۶ خانه‌ای قرار داده شدند.  $1 \times 10^4$  سلول به هر خانه افزوده و بعد از یک ساعت محیط تمایز به آن‌ها اضافه شد. به مدت ۱۴ تا ۱۷ روز، هر ۳ روز یک بار محیط تمایزی تعویض گردید. بعد از طی این مدت، نمونه‌ها توسط میکروسکوپ الکترونی و بررسی فعالیت آلكالین فسفاتاز مورد ارزیابی قرار گرفتند.



شکل ۱: نمایی از سلول‌های مزانشیمی در روزهای مختلف کشت

(A) سلول‌های شبیه فیروبلات (سلول‌های دوکی شکل) و سلول‌های هماتوپوئیتیک (سلول‌های کروی شکل) در محیط کشت دیده می‌شوند. (B) در روز چهاردهم، سلول‌های مزانشیمی رشد کرده و بیش از ۸۰٪ کف فلاسک را پوشاندند. سلول‌های هماتوپوئیتیک به طور کامل از محیط حذف شده‌اند (بزرگنمایی ۴۰x).

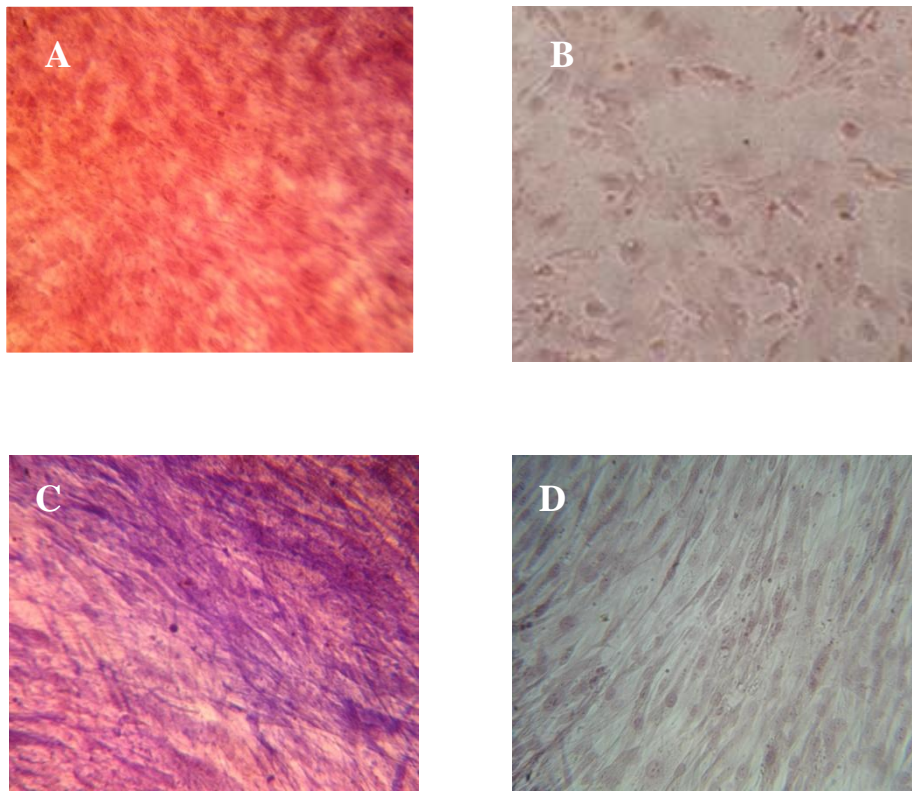


شکل ۲: ایمونوفلوروسانس سلول‌های مزانشیمی مغز استخوان با استفاده از روش فلوسایتومتری

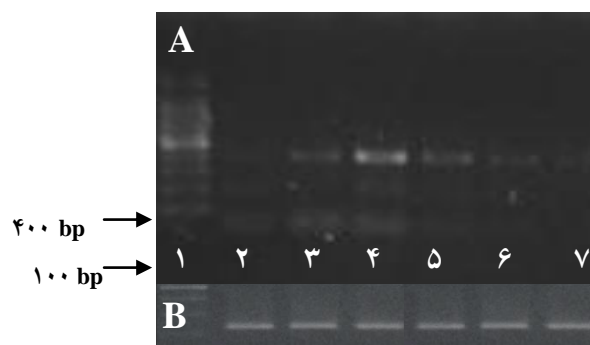
نمودار (A) گیت سلول‌های بزرگ تک‌هسته‌ای را نشان می‌دهد. (B) نمودار بیان آنتی‌ژن CD105، (C) نمودار میزان بیان آنتی‌ژن CD166، (D) نمودار بیان آنتی‌ژن CD44، (E) نمودار بیان آنتی‌ژن CD90، (F) نمودار بیان آنتی‌ژن CD45، (G) نمودار بیان آنتی‌ژن CD34، خطوط RN2 و RN1 بیانگر سلول‌های واجد مارکر ارزیابی هستند که توسط آنتی‌بادی‌های نشاندار شده با مواد فلورسنت مختلف شناسایی شده‌اند.

تمایز مشاهده شد و سپس یک سیر نزولی در بیان ژن OPN تا روز ۱۵ مشاهده گردید (شکل ۴). در مورد ژن استوکلسین نیز در سلول‌های مزانشیمی تمایز نیافته، بیانی دیده نشد اما با شروع تمایز، بیان ژن قابل مشاهده بود که بیشترین میزان بیان آن در روزهای

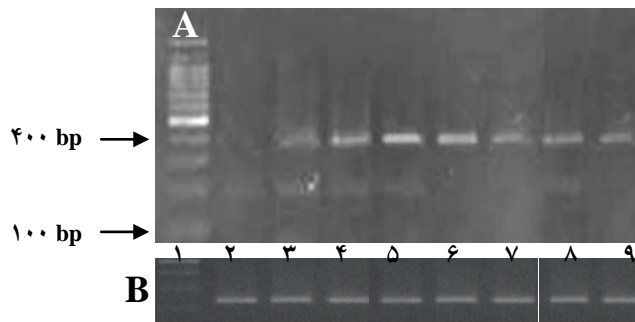
فعالیت این آنزیم در سلول‌های تمایز یافته بود (شکل ۳). بررسی‌های RT-PCR بر روی cDNA ساخته شده نشان داد که ژن استئوپونین در سلول‌های مزانشیمی تمایز نیافته، بیان نشده است، اما در طی روند تمایز، بیان این ژن در سلول‌ها صورت می‌گیرد. حداکثر بیان ژن در روز ششم



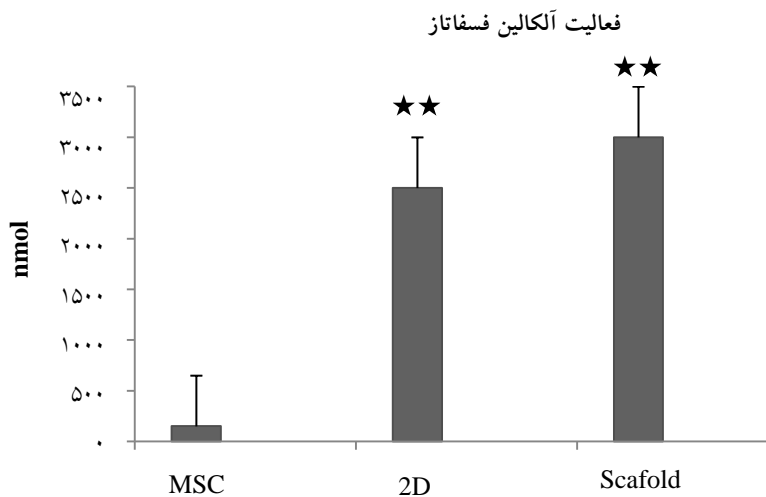
شکل ۳: تمایز سلول‌های مزانشیمی به رده سلول‌های استخوانی  
 سلول‌های مزانشیمی تمایز داده شده به سمت استئوبلاست با رنگ‌آمیزی آلیزارین رد (A) و آلکالین فسفاتاز (C) مثبت بودند. سلول‌های تمایز داده نشده که نسبت به هر دو رنگ‌آمیزی منفی بودند (B,D) (بزرگنمایی  $\times 40$ ).



شکل ۴: بیان ژن استئوپونین (OPN) و بتا اکتین در سلول‌های بنیادی مزانشیمی در طی تمایز به استئوبلاست.  
 A: (۱) مارکر ۱۰۰ bp، (۲) بیان ژن استئوپونین در سلول‌های MSC تمایز نیافته، (۳) بیان ژن استئوپونین در سلول‌ها در روز سوم تمایز، (۴) روز ششم تمایز، (۵) روز نهم تمایز، (۶) روز دوازدهم تمایز و (۷) روز پانزدهم تمایز.  
 B: بیان ژن بتا اکتین در نمونه‌های مربوطه



شکل ۵: بیان ژن استئوکلسین (OCN) و بتا اکتین در سلول‌های بنیادی مزانشیمی در طی تمایز به استئوبلاست.  
 A: (۱) مارکر ۵۰ bp، (۲) بیان ژن استئوکلسین در سلول‌های MSC تمایز نیافته، (۳) بیان ژن استئوکلسین در سلول‌ها در روز سوم تمایز، (۴) روز ششم تمایز، (۵) روز هفتم تمایز، (۶) روز هشتم تمایز، (۷) روز نهم تمایز، (۸) روز دوازدهم تمایز، (۹) روز پانزدهم تمایز.  
 B: بیان ژن بتا اکتین در نمونه‌های مربوطه.



نمودار ۱: میزان فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز در سلول‌های بنیادی مزانشیمی تمایز نیافته، سلول‌های تمایز یافته در محیط ۲ بعدی و سلول‌های تمایز یافته در داربست سه بعدی کلسیم فسفات بعد از ۱۵ روز.  $p < 0.01$

۱۵ روز تمایز در محیط دو بعدی، سطح فعالیت این آنزیم در سلول‌های تمایز یافته در حدود ۲۵۰۰ nmol و در داربست سه بعدی کلسیم فسفات، میزان فعالیت این آنزیم در حدود ۳۰۰۰ nmol بود (نمودار ۱) ( $p < 0.01$ ). این اختلاف معنادار اولاً بیانگر تمایز سلول‌های مزانشیمی به سمت استئوبلاست است در ثانی اثر مثبت داربست‌های سه بعدی کلسیم فسفات را در تمایز استخوان‌زایی سلول‌های مزانشیمی مشخص می‌کند. در این جا میزان فعالیت آنزیم برحسب هیدرولیز سوبسترای پارانیتروفیل فسفات در

هفتم و هشتم تمایز بود. سپس با افزایش تمایز در بیان این ژن، کاهش رخ داد (شکل ۵).  
 فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز با روش اسپکتروفتومتری با استفاده از سوبسترای پارانیتروفیل فسفات در ۳ حالت سلول‌های بنیادی مزانشیمی تمایز نیافته، سلول‌های تمایز یافته در محیط دو بعدی و سلول‌های تمایز یافته در داربست سه بعدی کلسیم فسفات بعد از ۱۵ روز سنجیده شد. میزان فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز در سلول‌های مزانشیمی تمایز نیافته بسیار پایین است در حالی که بعد از

دقیقه، در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد تحت شرایط سنجش مشخص شد.

## بحث

به دلیل توانایی سلول‌های بنیادی مزانشیمی در ترمیم بافت و خصوصیات ذکر شده این سلول‌ها، بر آن شدیم تا این سلول‌ها را از مغز استخوان جدا کرده، در محیط کشت تکثیر داده و به سلول‌های استخوانی تمایز دهیم. بر این اساس مطالعه حاضر روی تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی به سلول‌های استئوبلاست در محیط دو بعدی و داربست‌های سه بعدی کلسیم فسفات شکل گرفت. سلول‌های بنیادی مزانشیمی (MSCs)، از سلول‌های استرومایی مغز استخوان بوده که سهولت جداسازی و تکثیر آن‌ها سبب کاربرد وسیع بالینی این سلول‌ها شده است. تعداد این سلول‌ها در مغز استخوان محدود است به همین دلیل در موارد درمانی باید ابتدا این سلول‌ها را در محیط *In vitro* کشت داد و بعد از تکثیر، از آن‌ها در *vivo* استفاده کرد.

دیجیرولامو و همکاران و پیتنجر و همکاران در ۱۹۹۹، کادیالا و همکاران در ۱۹۹۷ و اسلامی‌نژاد و همکاران نیز در سال ۲۰۰۶ به همین روش سلول‌های مزانشیمی را جدا کرده و با تراکم  $1 \times 10^4$  یا  $0.4 \times 10^6$  در محیط کشت پایه نظیر DMEM حاوی ۱۰٪ سرم جنین گاوی کشت دادند (۲۲-۱۹). در این تحقیق نیز به همین روش سلول‌های مزانشیمی را با موفقیت از نمونه مغز استخوان جدا کرده و در محیط کشت مذکور کشت دادیم. مطالعه‌های زیادی در ارتباط با شناسایی مارکرهای سطحی سلول‌های بنیادی مزانشیمی انسان انجام گرفته است. در این ارتباط سیمونز و همکارانش، مارکر سطحی Stro-1 را به عنوان یک شناسه سطح سلولی ویژه برای سلول‌های غیر خونساز مزانشیمی انسانی شناسایی کردند (۲۳). هم چنین برودر و همکاران مشخص کردند که آنتی‌ژن SB-10 که در سطح سلول‌های بنیادی مزانشیمی وجود دارد، با تمایز سلول به استخوان، ناپدید می‌شود (۲۴). در سال ۱۹۹۹، باری و همکارانش در مطالعه‌ای از آنتی‌بادی SH-2 بر علیه سلول‌های بنیادی مزانشیمی استفاده کردند و مشاهده شد این آنتی‌بادی با

اپی‌توپ رسپتور TGF- $\beta$  که CD105 نامیده می‌شود، واکنش نشان می‌دهد (۲۵). از این آنتی‌بادی در انتخاب ایمنی-مغناطیسی سلول‌های بنیادی مزانشیمی انسانی استفاده می‌شود. البته باید توجه کرد که CD105 در سلول‌های اندوتلیال نیز وجود دارد (۲۶). هم چنین هاینس ورث و همکاران در ۱۹۹۲ نشان دادند دو آنتی‌بادی SH-2 و SH-3 نیز با اپی‌توپ CD73 واکنش نشان می‌دهند و با سلول‌های خونساز واکنش نمی‌دهند (۲۷).

از آن جایی که همه آنتی‌ژن‌های شناسایی شده برای سلول‌های بنیادی مزانشیمی، در انواع سلول‌های دیگر نیز بیان می‌شوند، در نتیجه هنوز آنتی‌ژن ویژه‌ای که خاص این سلول‌ها باشد و از طریق آن با دستگاه فلوسایتومتری به طور اختصاصی شناسایی شود، یافت نشده است. روی هم رفته می‌توان گفت که مطالعه‌های انجام شده نشان‌دهنده این است که فنوتیپ آنتی‌ژنی سلول‌های بنیادی مزانشیمی، منحصر به فرد نبوده و این سلول‌ها مخلوطی از ویژگی‌های سلول‌های مزانشیمی، اندوتلیالی، اپیتلیالی و عضلانی را دارا هستند (۲۲). مینگوئل و همکاران در ۲۰۰۱ نشان دادند که سلول‌های مزانشیمی معمولاً آنتی‌ژن‌های تیپیکال سلول‌های خونساز یعنی CD45، CD34 و CD14 را بیان نمی‌کنند (۲۸). در این مطالعه به منظور تایید سلول‌های مزانشیمی، بررسی ایمونوفنوتیپی سلول‌ها پس از پاساژ اول با استفاده از روش فلوسایتومتری انجام گرفت. نتایج نشان دادند که این سلول‌ها دارای مارکرهای CD44، CD166، CD90 و CD105 و فاقد مارکرهای CD34 و CD35 هستند. این نتایج با نتایج سایر محققین از جمله مطالعه جکسو و همکاران در سال ۲۰۰۷، وکسلر و همکاران در سال ۲۰۰۳ و مؤلمن و همکاران در سال ۲۰۰۶ که مارکرهای CD44، CD166 و CD105 را از مارکرهای تایید شده سلول‌های بنیادی مزانشیمی در نظر گرفته‌اند، مطابقت داشت (۱۲). عوامل مختلفی از جمله جنس ماتریکس خارجی، هم کشتی این سلول‌ها با یک جمعیت متفاوت سلولی دیگر و محرک‌های شیمیایی، بر تمایز سلول‌های مزانشیمی مؤثرند (۲۹-۳۱). برودر و همکاران در سال ۱۹۹۷ نشان دادند که در درجه نخست، تمایز سلول‌های مزانشیمی به دودمان‌های استخوان، غضروف و چربی تحت تاثیر

بررسی شده است (۳۶-۴۱).

سودک و همکاران در سال ۱۹۹۵ و کوبوتا و همکاران در سال ۱۹۸۹ گزارش کردند که OPN در استئوبلاست‌های تمایز یافته موش صحرایی بیان بالایی دارد (۴۳، ۴۲). در مطالعه‌های متعدد از جمله ناگاتا و همکاران در سال ۱۹۸۹، اولدبرگ و همکاران در سال ۱۹۸۶ نشان دادند که دگزامتازون بیان OPN را در کشت‌های سلول‌های مزانشیمی موش صحرایی افزایش می‌دهد (۴۴، ۳۶). نودا و همکاران در سال ۱۹۹۰ نشان دادند که ویتامین D3 یک محرک نیرومند ویژه برای تولید OPN محسوب می‌شود (۴۵). در مطالعه حاضر نیز مشاهده شد که وجود دگزامتازون سبب بیان ژن OPN در سلول‌های مزانشیمی می‌گردد در حالی که کشت‌های فاقد محیط تمایزی، این بیان را نشان ندادند. کاسوگامی و همکاران در سال ۱۹۹۱ بیان کردند که رتینوئیک اسید بیان OPN را افزایش می‌دهد (۴۶).

ستیانا و همکاران در سال ۲۰۰۷ مشخص کردند که OPN در تنظیم اندازه و رشد بلورهای آپاتیت نقش ایفا می‌کند (۴۷). به علاوه در این مطالعه مشاهده شد که بیان ژن OPN در سلول‌های مزانشیمی رخ نمی‌دهد اما با شروع تمایز، بیان این ژن آغاز شده در روز ششم تمایز به حداکثر میزان خود رسید سپس یک سیر نزولی در بیان تا روز ۱۵ تمایز دیده شد. هم چنین با به کار بردن siRNA مربوطه و سرکوب این ژن، تمایز استئوبلاستی سلول‌ها کاهش یافت که این خود می‌تواند دلیلی بر نقش این ژن در استخوان‌زایی باشد.

لی در سال ۲۰۰۰ گزارش‌هایی از بیان mRNA و پروتئین استئوکلسین در دودمان سلولی نامیرای مگا کاریوسیت و آدیپوسیت در محیط آزمایشگاه ارائه کرده است (۴۸). دوکی و همکاران در سال ۱۹۹۶ نشان دادند که موشی که ژن استئوکلسین (OCN) آن خارج شده، از ۶ ماهگی به بعد ناهنجاری استخوانی نشان می‌دهد (۴۹). دلماس و همکارانش در سال ۱۹۹۰ گزارش کردند که OCN، یک علامت حساس‌تر از فعالیت آلکالین فسفاتاز در شناسایی شکل‌گیری استخوان است (۵۰). در این مطالعه نیز بیان این ژن بررسی شد و مشخص گردید که ژن

محرک‌های شیمیایی است. آن‌ها گزارش کردند وقتی سلول‌های بنیادی مزانشیمی در حضور اسکوربیک اسید-۲ فسفات، بتاگلیکسروفسفات و دگزامتازون کشت می‌شوند، سلول‌ها فنوتیپ استخوانی به خود گرفته و ماتریکس خارج سلولی از خود ترشح می‌کنند (۳۲). در این مطالعه نیز از محرک‌های شیمیایی جهت القای تمایز استئوبلاستی استفاده شد که این مشاهده‌ها با نتایج چا و همکارانش در سال ۲۰۰۸ مطابق بود (۳۳). در مطالعه حاضر نتایج رنگ‌آمیزی‌ها تاییدی بر تمایز این سلول‌ها بود. ریخت‌شناسی سلول‌ها پس از رنگ‌آمیزی مشابه با سلول‌های تمایز یافته توسط مئولمن و همکارانش در سال ۲۰۰۶ بود (۳۴).

در این مطالعه، سرامیک‌های فسفات کلسیم به علت این که ساختاری مشابه با بخش غیر آلی ترکیب استخوان دارند، به عنوان داربست سلولی مورد استفاده قرار گرفته‌اند و در مطالعه‌های مختلف نیز نشان داده شده است که این داربست‌ها، توانایی تحریک استخوان‌سازی را دارا بوده و با بافت‌های بدن سازگار هستند (۴). در مطالعه حاضر مشاهده شد که سلول‌های بنیادی مزانشیمی به خوبی در داربست‌های سه بعدی کلسیم فسفات مستقر شده و تکثیر یافتند. مقایسه میزان فعالیت آلکالین فسفاتاز در سلول‌های مزانشیمی تمایز یافته در محیط دو بعدی و داربست‌های فسفات کلسیم مشخص کرد که این داربست‌ها اثر مثبتی روی تمایز استئوبلاستی سلول‌های مزانشیمی دارند.

در طی تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی به سلول‌های استئوبلاست، بیان یک سری از ژن‌ها دچار تغییراتی می‌شود. فریدمن و همکاران و لین و همکاران در سال ۲۰۰۶ نشان دادند که به منظور ارزیابی سلول‌های تمایز یافته، می‌توان بیان ژن‌هایی نظیر استریکس، بن سیالوپروتئین، استئوکلسین و استئوپونتین را در سطح RNA و پروتئین بررسی نمود (۱۸، ۶). در این مطالعه دو ژن استئوپونتین و استئوکلسین را در محیط دو بعدی مورد بررسی قرار دادیم. OPN در سال ۱۹۸۹ توسط هاین‌گارد و همکارانش به عنوان عامل مؤثر در معدنی‌شدن سلول‌های اجدادی استخوان معرفی شد (۳۵). این ژن در موش صحرایی، موش خانگی، خوک، انسان، گاو و جوجه

سازه‌هایی برای مهندسی بافت استخوان به کار رفته است و انواع مختلف و متعددی از آن‌ها در راستای دستیابی به یک داربست مطلوب برای مهندسی بافت استخوان ایجاد شده‌اند (۵۹-۵۷). لی و همکاران در سال ۲۰۰۱ و دانگ و همکاران در سال ۲۰۰۲ سلول‌های مزانشیمی را در داربست‌های سرامیکی کشت داده و از آن‌ها، سلول‌های استخوانی به دست آوردند (۶۰). جونز و همکاران در سال ۲۰۰۹ و کاراگورجیو و همکاران در سال ۲۰۰۵ مشاهده کردند که کاشت و تمایز سلول‌های مزانشیمی در داربست‌های سرامیکی و عبور سیال محیط کشت از آن‌ها، سبب تکثیر سلولی همگن‌تر، افزایش فعالیت آلكالین فسفاتاز و ترشح استئوپونتین توسط سلول‌ها می‌شود (۶۲، ۶۱).

در این مطالعه سرامیک‌های فسفات کلسیم به علت این که ساختاری مشابه با بخش غیر آلی ترکیب استخوان دارند، به عنوان داربست سلولی مورد استفاده قرار گرفته‌اند و در مطالعه‌های مختلف نیز نشان داده شده است که این داربست‌ها، توانایی تحریک استخوان‌سازی را دارا بوده و با بافت‌های بدن سازگار هستند (۴). در مطالعه حاضر مشاهده کردیم که سلول‌های بنیادی مزانشیمی به خوبی در داربست‌های سه بعدی کلسیم فسفات مستقر شده و تکثیر یافتند. مقایسه میزان فعالیت آلكالین فسفاتاز در سلول‌های مزانشیمی تمایز یافته در محیط دو بعدی و داربست‌های فسفات کلسیم مشخص کرد که این داربست‌ها اثر مثبتی روی تمایز استئوبلاستی سلول‌های مزانشیمی دارند.

### نتیجه‌گیری

در مجموع این یافته‌ها تاییدی بر این نکات است که سلول‌های بنیادی مزانشیمی جدا شده از مغز استخوان، توانایی تمایز به سلول‌های استئوبلاستیک را دارند و فاکتورهای تمایز دهنده‌ای هم چون دگزامتازون، بتا-گلیسروفسفات و اسید اسکوربیک، قادر هستند این سلول‌ها را به سمت سلول‌های استئوبلاستی تمایز دهند. بررسی نتایج فعالیت آنزیم آلكالین فسفاتاز، بیانگر تمایز بهتر سلول‌های MSC در داربست سه بعدی تری کلسیم فسفات نسبت به محیط دو بعدی بود.

استئوکلسین نیز در سلول‌های بنیادی مزانشیمی تمایز نیافته، بیان نمی‌شود. اما با شروع تمایز، بیان ژن قابل مشاهده بود که بیشترین میزان بیان آن در روزهای هفتم و هشتم تمایز بود. سپس با افزایش تمایز سلولی، در بیان این ژن کاهش رخ داد. هم چنین پس از سرکوب ژن استئوپونتین و کاهش تمایز، سیر بیان ژن OCN نیز دچار تغییر شد.

جهت کشت و تمایز بهتر سلول‌های مزانشیمی و بهره‌گیری از آن‌ها در مهندسی بافت، از داربست‌های سه بعدی مختلفی بهره گرفته‌اند. از آن جمله استفاده از داربست‌های پلیمری PLA، PGA و PLGA بود. ایشاگ و همکاران در سال ۱۹۹۷ نشان دادند که داربست‌های PLGA، تکثیر و تمایز سلول‌های مزانشیمی موش صحرایی را پشتیبانی می‌کنند و فعالیت آلكالین فسفاتاز را افزایش می‌دهند (۵۱). یو و همکاران در سال ۲۰۰۴ نشان دادند که جریان سیال محیط کشت از میان داربست PLGA، ساخت ماتریکس معدنی شده را در سلول‌های کاشته شده افزایش می‌دهد (۵۲).

نوع دیگری از داربست‌ها، داربست‌های کلاژنی هستند. کیس و همکاران در سال ۱۹۹۰ گزارش کردند که کشت دودمان سلولی استئوژنیک کلونال MC3T3-E1 در داربست‌های کلاژنی، سبب بیان OCN در این سلول‌ها می‌شود (۵۳). مولر و همکاران در ۱۹۹۹ نشان دادند که این نوع داربست، سبب افزایش آلكالین فسفاتاز و معدنی شدن در سلول‌های استئوژنیک می‌شود (۵۴). جرج و همکاران در سال ۲۰۰۶ نشان دادند که کشت سلول‌های بنیادی مزانشیمی در داربست‌های شش خانه‌ای کلاژنی، سبب افزایش میزان فعالیت آلكالین فسفاتاز در مقایسه با کشت در محیط دو بعدی می‌شود (۵۵).

داربست‌های تیتانیومی نوع دیگری از داربست‌ها هستند. دولدر و همکارانش در سال ۲۰۰۳ نشان دادند؛ سلول‌های بنیادی مزانشیمی موش صحرایی که روی شبکه‌های منفذی با رشته‌های تیتانیومی تحت شرایط متحرک کشت داده شدند، افزایش در تکثیر، تمایز و تولید ماتریکس معدنی شده را داشتند (۵۶). اگر چه ارزیابی این سازه از لحاظ بافت‌شناسی کار دشواری است.

سرامیک‌های زیستی در بسیاری موارد به عنوان

باشد.

### تشکر و قدردانی

از کلیه همکاران مرکز تحقیقات سازمان انتقال خون ایران که در انجام این پایان‌نامه، ما را یاری نمودند، تشکر و قدردانی می‌نمایم.

بیان ژن‌های استئوپونتین و استئوکلسین در روند این تمایز نقش داشتند. دو ژن مذکور در سلول‌های مزانشیمی بیان نشده بودند اما با شروع تمایز، بیان آن‌ها آغاز شد. OPN در روز ششم و OCN در روزهای هفتم و هشتم تمایز، حداکثر بیان را داشتند و افزایش بیان آن‌ها می‌تواند راه‌کاری جهت القای تمایز استئوبلاستی در این سلول‌ها

### References :

- Baksh D, Song L, Tuan RS. Adult mesenchymal stem cells: characterization, differentiation, and application in cell and gene therapy. *J Cell Mol Med* 2004; 8(3):301-16.
- Horwitz EM, Gordon PL, Koo WK, Marx JC, Neel MD, McNall RY, et al. Isolated allogenic bone marrow-derived mesenchymal cells engraft and stimulate growth in children with osteogenesis imperfecta: implications for cell therapy of bone. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; 99(13): 8932-7.
- Bobis S, Jarocha D, Majka M. Mesenchymal stem cells: characteristics and clinical application. *Folia Histochem Cytobiol* 2006; 44(4): 215-30.
- Amani M, Amirzadeh N, Soleimani M, Malekan H, Habibi M, Bashtar M. Effect of platelet growth factors gel on proliferation and differentiation of mesenchymal stem cells. *Sci J Iran Blood Transfus Organ* 2009; 6(2): 71-83.[Article in Farsi]
- Gerson SL. Mesenchymal stem cells: no longer second class marrow citizens. *Nat Med* 1999; 5(3): 262-4.
- Friedman MS, Long MW, Hankenson KD. Osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells is regulated by bone morphogenetic protein-6. *J Cell Biochem* 2006; 98(3): 538-54.
- Lin Y, Liu L, Li Z, Qiao J, Wu L, Tang W, et al. Pluripotency potential of human adipose-derived stem cells marked with exogenous green fluorescent protein. *Mol Cell Biochem* 2006; 291(1-2): 1-10.
- Heinegard D, Hultenby K, Oldberg A, Reinholt F, Wendel M. Macromolecules in bone matrix. *Connect Tissue Res* 1989; 21(1-4): 3-11.
- Price PA, Nishimoto SK. Radioimmunoassay for the vitamin K-dependent proteion of bone and its discovery in plasma. *Proc Natl Acad Sci USA* 1980; 77(4): 2234 -8.
- Price PA, Parthemore JG, Deftos LJ. New biochemical marker for bone metabolism. Measurement by radioimmunoassay of bone GLA protein in the plasma of normal subjects and patients with bone disease. *J clin Invest* 1980; 66(5): 878-83.
- Price PA, Baukol SA, Baukol SA. 1,25-Dihydroxyvitamin D3 increases synthesis of the vitamin K-dependent bone protein by osteosarcoma cells. *J biol chem* 1980; 255(24): 11660-3.
- Wexler SA, Donaldson C, Denning-Kendall P, Rice C, Brandley B, Hows JM. Adult bone marrow is a rich source of human mesenchymal stem cells but umbilical cord and mobilized adult blood are not. *Br J Haematol* 2003; 121(2): 368-74.
- Kraus KH, Kirker-Head C. Mesenchymal stem cells and bone regeneration. *Vet Surg* 2006; 35(3): 232-42.
- Tsai MS, Lee JL, Chang YJ, Hwang SM. Isolation of human multipotent mesenchymal stem cells from second-trimester amniotic fluid using a novel two-stage culture protocol. *Hum Reprod* 2004; 19(6): 1450-6.
- Sottile V, Halleux C, Bassilana F, Keller H, Seuwen K. Stem cell characteristics of human trabecular bone-derived cells. *Bone* 2002; 30(5): 699-704.
- Bonab MM, Alimoghaddam K, Talebian F, Ghaffari SH, Ghavamzadeh A, Nikbin B. Aging of mesenchymal stem cell *in vitro*. *BMC Cell Biol* 2006; 7: 14.
- Friedman MS, Long MW, Hankenson KD. Osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells is regulated by bone morphogenetic protein-6. *J Cell Biochem* 2006; 98(3): 538-54.
- Lin Y, Liu L, Li Z, Qiao J, Wu L, Tang W, et al. Pluripotency potential of human adipose-derived stem cells marked with exogenous green fluorescent protein. *Mol Cell Biochem* 2006; 291(1-2): 1-10.
- Digirolamo CM, Stokes D, Colter D, Phinney DG, Class R, Prockop DJ. Propagation and senescence of human marrow stromal cells in culture: a simple colony-forming assay identifies samples with the greatest potential to propagate and differentiate. *Br J Haematol* 1999; 107(2): 275-81.
- Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 1999; 284(5411): 143-7.
- Kadiyala S, Young RG, Thiede MA, Bruder SP. Culture expanded canine mesenchymal stem cells possess osteochondrogenic potential *in vivo* and *in vitro*. *Cell transplant* 1997; 6(2): 125-34.
- Eslaminejad MB, Nikmahzar A, Piriea A. The structure of human mesenchymal stem cells differentiated into cartilage in micro mass culture system. *Yakhteh* 2006; 8: 162-71.[Article in Farsi]
- Simmons PJ, Torok-Storb B. Identification of stromal cell precursors in human bone marrow by a novel monoclonal antibody, STRO-1. *Blood* 1991; 78(1): 55-62.
- Bruder SP, Horowitz MC, Mosca JD, Haynesworth SE. Monoclonal antibodies reactive with human osteogenic cell surface antigens. *Bone* 1997; 21(3): 225-35.
- Barry FP, Boynton RE, Haynesworth S, Murphy JM,

- Zaia J. The monoclonal antibody SH-2, raised against human mesenchymal stem cells, recognizes an epitope on endoglin (CD 105). *Biochem Biophys Res Commun* 1999; 265(1): 134-9.
- 26- Cheifetz S, Bellon T, Cales C, Vera S, Bernabeu C, Massague J, *et al.* Endoglin is a component of the transforming growth factor-beta receptor system in human epithelial cells. *J Biol Chem* 1992; 267(27): 19027-30.
- 27- Haynesworth SE, Baber MA, Caplan AI. Cell surface antigens on human marrow-derived mesenchymal cells are detected by monoclonal antibodies. *Bone* 1992; 13(1): 69-80.
- 28- Minguell JJ, Erices A, Conget P. Mesenchymal stem cells. *Exp Biol Med* 2001; 226(6): 507-20.
- 29- Hellmich C, Ulm FJ. Average hydroxyapatite concentration is uniform in the extracellular ultrastructure of mineralized tissues: evidence at the 1-10 microm scale. *Biomech Model Mechanobiol* 2003; 2(1): 21-36.
- 30- Xiao G, Wang D, Benson MD, Karsenty G, Franceschi RT. Role of the alpha2-integrin in osteoblast-specific gene expression and activation of the *Osf2* transcription factor. *J Biol Chem* 1998; 273(49): 32988-94.
- 31- Gerstenfeld LC, Barnes GL, Shea CM, Einhorn TA. Osteogenic differentiation is selectively promoted by morphogenic signals from chondrocytes and synergized by a nutrient rich growth environment. *Connect Tissue Res* 2003; 44 Suppl 1: 85-91.
- 32- Buder SP, Jaiswal N, Haynesworth SE. Growth kinetics, self-renewal, and the osteogenic potential of purified human mesenchymal stem cells during extensive subcultivation and following cryopreservation. *J Cell Biochem* 1997; 64(2): 278-94.
- 33- Chae sw, Jee BK, Lee JY, Han CW, Jeon YW, Lim Y, *et al.* HOX gene analysis in the osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. *Genet Mol Biol* 2008; 31(4): 815-23.
- 34- Meuleman N, Tondreau T, Delforge A, Dejeneffe M, Massy M, Libertalis M, *et al.* Human marrow mesenchymal stem cell culture: serum free medium allows better expansion than classical MEM medium. *Eur J Haematol* 2006; 76(4): 309-16.
- 35- Heinegard D, Hulthenby K, Oldberg A, Reinholt F, Wendel M. Macromolecules in bone matrix. *Connect Tissue Res* 1989 21:3-11.
- 36- Oldberg A, Franzen A, Heinegard D. Cloning and sequence analysis of rat bone sialoprotein (osteopontin) cDNA reveals an Arg-Gly-Asp cell-binding sequence. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1986; 83(23): 8819-23.
- 37- Craig AM, Smith JH, Denhardt DT. Osteopontin, a transformation-associated cell adhesion phosphoprotein, is induced by 12-O-tetradecanoylphorbol 13-acetate in mouse epidermis. *J Biol Chem* 1989; 264(16): 9682-9.
- 38- Wrana JL, Zhang Q, Sodek L. Full length cDNA sequence of porcine Secreted phosphoprotein-1 (SPP-1, osteopontin). *Nucleic Acids Res* 1989; 17(23): 101-19.
- 39- Kiefer MC, Bauer DM, Barr PJ. The cDNA and derived amino acid sequence for human osteopontin. *Nucleic Acids Res* 1989; 17(8): 3306.
- 40- Kerr JM, Fisher LW, Termine JD, Young MF. The cDNA cloning and RNA distribution of bovine osteopontin. *Gene* 1991; 108(2): 237-43.
- 41- Moore MA, Gotoh Y, Rafidi K, Gerstenfeld LC. Characterization of a cDNA for chicken osteopontin: expression during bone development, osteoblast differentiation, and tissue distribution. *Biochemistry* 1991; 30(9): 2501-8.
- 42- Sodek J, Chen J, Nagata T, Kasugai S, Todescan R Jr Li IW, *et al.* Regulation of osteopontin expression in osteoblasts. *Ann N Y Acad Sci* 1995; 760: 223-41.
- 43- Kubota T, Zhang Q, Wrana JL, Ber R, Aubin JE, Butler WT, *et al.* Multiple forms of Spp1 (secreted phosphoprotein, osteopontin) synthesized by normal and transformed rat bone cell populations: regulation by TGF-beta. *Biochem Biophys Res Commun* 1989; 162(3): 1453-9.
- 44- Nagata T, Todescan R, Goldberg HA, Zhang Q, Sodek J. Sulphation of secreted phosphoprotein 1 (SPP1, osteopontin) is associated with mineralized tissue formation. *Biochem Biophys Res Commun* 1989; 165(1): 234-40.
- 45- Noda M, Vogel RL, Craig AM, Prah J, DeLuca HF, Denhardt DT. Identification of a DNA sequence responsible for binding of the 1,25-dihydroxyvitamin D3 receptor and 1,25-dihydroxyvitamin D3 enhancement of mouse secreted phosphoprotein 1 (SPP-1 or osteopontin) gene expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1990; 87(24): 9995-9.
- 46- Kasugai S, Zhang A, Overall CM, Wrana JL, Butler WT, Sodek J. Different regulation of the 55 and 44 kDa forms of secreted phosphoprotein1 (SPP-1, osteopontin) in normal and transformed rat bone cells by osteotropic hormones, growth factors and a tumor promoter. *Bone Miner* 1991; 13(3): 235-50.
- 47- Scatena M, Liaw L, Giachelli CM. Osteopontin: a multifunctional molecule regulating chronic inflammation and vascular disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2007; 27(11): 2302-9.
- 48- Lee AJ, Hodges S, Eastell R. Measurement of osteocalcin. *Ann Clin Biochem* 2000; 37(pt 4): 432-46.
- 49- Ducy P, Desbois C, Boyce B, Pinero G, Story B, Dunstan C, *et al.* Increased bone formation in osteocalcin-deficient mice. *Nature* 1996; 382(6590): 448-52.
- 50- Delmas PD, Christiansen C, Mann KG, Price PA. Bone Gla protein (osteocalcin) assay standardization report. *J Bone Miner Res* 1990; 5(1): 5-11.
- 51- Ishaug SL, Crane GM, Miller MJ, Yasko AW, Yaszemski MJ, Mikos AG. Bone formation by three-dimensional stromal osteoblast culture in biodegradable polymer scaffolds. *J Biomed Mater Res* 1997; 36(1): 17-28.
- 52- Yu X, Botchwey EA, Levine EM, Pollack SR, Laurencin CT. Bioreactor-based bone tissue engineering: the influence of dynamic flow on osteoblast phenotypic expression and matrix mineralization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004; 101(31): 11203-8.
- 53- Casser-Bette M, Murray AB, Closs EI, Erfle V, Schmidt J. Bone formation by osteoblast-like cells in a three-dimensional cell culture. *Calcif Tissue Int* 1990; 46(1): 46-56.
- 54- Mueller SM, Mizuno S, Gerstenfeld LC, Glowacki J.

- Medium perfusion enhances osteogenesis by murine osteosarcoma cells in three-dimensional collagen sponges. *J Bone Miner Res* 1999; 14(12): 2118-26.
- 55- George J, Kuboki Y, Miyata T. Differentiation of mesenchymal stem cells into osteoblasts on honeycomb collagen scaffolds. *Biotechnol Bioeng* 2006; 95(3): 404-11.
- 56- van den Dolder J, Bancroft GN, Sikavitsas VI, Spauwen PH, Jansen JA, Mikos AG. Flow perfusion culture of marrow stromal osteoblasts in titanium fiber mesh. *J Biomed Mater Res A* 2003; 64(2): 235-41.
- 57- Epinette JA, Manley MT. Hydroxyapatite-coated total knee replacement: clinical experience at 10 to 15 years. *J Bone Joint Surg Br* 2007; 89(1): 34-8.
- 58- Mastrogiacomo M, Papadimitropoulos A, Cedola A, Peyrin F, Giannoni P, Pearce SG, *et al*. Engineering of bone using bone marrow stromal cells and a silicon-stabilized tricalcium phosphate bioceramic: evidence for a coupling between bone formation and scaffold resorption. *Biomaterials* 2007; 28(7): 1376-84.
- 59- Uemura T, Dong J, Wang Y, Kojima H, Saito T, Iejima D, *et al*. Transplantation of cultured bone cells using combinations of scaffolds and culture techniques. *Biomaterials* 2003; 24(13): 2277-86.
- 60- Dong J, Uemura T, Shirasaki Y, Tateishi T. Promotion of bone formation using highly pure porous beta-TCP combined with bone marrow-derived osteoprogenitor cells. *Biomaterials* 2002; 23(23): 4493-502.
- 61- Jones AC, Arns CH, Hutmacher DW, Milthorpe BK, Sheppard AP, Knackstedt MA. The correlation of pore morphology, interconnectivity and physical properties of 3D ceramic scaffolds with bone ingrowth. *Biomaterials* 2009; 30(7): 1440-51.
- 62- Karageorgiou V, Kaplan D. Porosity of 3D biomaterial scaffolds and osteogenesis. *Biomaterials* 2005; 26(27): 5474-91.

*Original Article*

## Osteogenic gene expression in osteoblastic differentiation of human mesenchymal stem cells

Ashki M.<sup>1</sup>, Amirizadeh N.<sup>2</sup>, Jalili MA.<sup>2</sup>, Hayati Roudbari N.<sup>1</sup>, Mohammadi MH.<sup>2</sup>, Amani M.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

<sup>2</sup>Blood Transfusion Research Center, High Institute for Research and Education in Transfusion Medicine, Tehran, Iran

### Abstract

#### *Background and Objectives*

During differentiation of mesenchymal stem cells (MSCs) into various cells, the expression of a variety of genes undergoes some changes; in this study we decided to investigate the expression rate of some genes like osteopontin (OPN) and osteocalcin (OCN) during this process in order to find a better and faster way for these cells to be differentiated into osteoblasts.

#### *Material and Methods*

In this experimental study, the mononuclear cells of bone marrow were separated and then cultured in DMEM-LG culture media with 10% FBS. During some definite days, the RNA of differentiating cells was extracted. Then, the effective genes in osteogenesis like OPN and OCN were amplified by specific primers. The mesenchymal cells were cultured on 3D calcium phosphate scaffolds, and finally the activity rate of the alkaline phosphatase was examined.

#### *Results*

This research has demonstrated that in the process of differentiation, the expression of the two genes of OPN and OCN changed orderly with the maximum expression of OPN in the 6th day and the maximum expression of OCN in the 7th and 8th days of differentiation. The osteogenic differentiation of MSCs was not confirmed by the coloration of mineral sediments. The activity rate of alkaline phosphatase revealed the preference of 3D calcium phosphate scaffold to 2D environment in this differentiation.

#### *Conclusion*

The calcium phosphate scaffold positively affects the differentiation process. The expression of OPN and OCN genes changes during differentiation and can be used as a way to a better and faster differentiation of these cells into osteoblast.

**Key words:** Mesenchymal Stem Cells, Osteopontin, Osteocalcin, Osteoblast  
*Sci J Iran Blood Transfus Organ 2012; 8(4): 251-264*

Received: 1 Feb 2011

Accepted: 3 Sep 2011

*Correspondence:* Amirizadeh N., PhD of Hematology and Blood Bank. Assistant Professor of Blood Transfusion Research Center, High Institute for Research and Education in Transfusion Medicine. P.O.Box: 14665-1157, Tehran, Iran. Tel: (+9821)88601599 ; Fax : (+9821)88601599 E-mail: n.amirizadeh@ibto.ir