

# خون

فصلنامه پژوهشی

دوره ۹ شماره ۳ مکرر پاییز ۹۱

ویژه‌نامه سلول‌های بنیادی (۲۳۸-۲۲۶)

مقاله پژوهشی

## اثر سلول‌های بنیادی خونساز انسانی بر تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی به سلول‌های استئوبلاست

راضیه فدائی<sup>۱</sup>, ناصر امیری‌زاده<sup>۲</sup>, مهین نیکوگفتار ظریف<sup>۳</sup>, مهریار حبیبی رودکنار<sup>۴</sup>

### چکیده

#### سابقه و هدف

ارتباط سلول‌های بنیادی خونساز (HSCs) با سلول‌های موجود در ریز محیط مغز استخوان (نیچ) به ویژه سلول‌های استئوبلاست، جهت حفظ فعالیت‌های آن‌ها بسیار ضروری می‌باشد. البته مدارکی که به صورت مستقیم HSC‌ها در توسعه نیچ دخیل کنند، اندک هستند ولی در صورت اثبات، روشن می‌شود که چرا نقص‌های هماتوپوئیک بسیاری با تغییر در ساختار استخوانی همراه بوده و لذا اهداف درمانی هماتوپوئیک و اهداف درمانی جدیدی را برای تنظیم ساختار و تشکیل استخوان فراهم می‌آورند.

#### مواد و روش‌ها

در یک مطالعه تجربی، سلول‌های بنیادی مزانشیمال (MSC) مغز استخوان را در محیط Span به مدت ۳ روز تحت همکشتی با HSC‌های خون بند ناف قرار دادیم. سپس MSC‌ها با استفاده از کیت استئوژنریز به استئوبلاست تمایز داده شدند و در روزهای مختلف تمایزی مورد ارزیابی قرار گرفتند که شامل بیان ژن‌های استئوپوتین و استئوکلسین در روزهای ۴ و ۶ تمایزی (RT-PCR)، بیان مارکر CD90 (فلوسيتومتری)، بیان آنزیم آکالین فسفاتاز (رنگ آمیزی آکالین فسفاتاز) و میترالیزه شدن (رنگ آمیزی آلیزارین رد) در روز دهم تمایزی بود.

#### نتایج

نتایج، بیان زود هنگام ژن‌های استئوپوتین و استئوکلسین را در همکشتی MSC با HSC نمایان ساخت. این یافته‌ها از نقش HSC‌ها در القای تمایز استئوبلاستی MSC‌ها حمایت می‌نمایند. هم چنین کاهش بیان CD90 و افزایش فعالیت آکالین فسفاتاز و میترالیزاسیون سلولی، این نتایج را تایید نمودند.

#### نتیجه‌گیری

نتایج این تحقیق در ارتباط با سلول‌های بنیادی انسانی در *ex vivo*، اثبات نمود که HSC‌ها قادرند سبب افزایش تمایز MSC‌ها به استئوبلاست شده و بدین وسیله در تشکیل نیچ خود سهیم باشند.

**کلمات کلیدی:** سلول‌های بنیادی خونساز، سلول‌های بنیادی مزانشیمی، همکشتی، استئوبلاست‌ها

تاریخ دریافت: ۱۱/۵/۹۰

تاریخ پذیرش: ۱۷/۱۰/۹۰

۱- کارشناس ارشد هماتولوژی - مرکز تحقیقات انتقال خون - مؤسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون - 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 هماتولوژی و بانک خون - مرکز تحقیقات انتقال خون - مؤسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون - تهران - ایران  
۴- PhD بیوتکنولوژی پزشکی - دانشیار مرکز تحقیقات انتقال خون - مؤسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون - تهران - ایران

## مقدمه

پروتئین مورفوژنیک استخوانی (BMP) و آنزیوپوئین (Anz) قرار می‌گیرند. لازم به ذکر است که مسیرهای سیگنالینگ متعددی از جمله wnt، BMP، Notch، Hedgehog و FEG، در تعديل فعالیت نیچ سلول‌های بنیادی خونساز دخیل می‌باشند (۱۵).

وجود هماهنگی میان هزاران سیگنال دائمی از جمله سایتوکاین‌ها، فاکتورهای رشد، لیگاندها، مسیرهای مختلف سیگنالینگ و ... که در نیچ موجود می‌باشند، به ایجاد تعادلی ظریف میان خود نوسازی و تمایز در HSC‌ها متناسب می‌گردد.

با وجود این، مدارکی که به صورت مستقیم HSC‌ها را در توسعه نیچ دخیل کنند، بسیار اندک می‌باشند ولی در صورت اثبات این امر، روشن می‌شود که چرا نقص‌های هماتوپوئیک بسیاری با تغییرات در ساختار استخوانی همراه هستند و به دنبال آن، اهداف درمانی هماتوپوئیک و نیز اهداف درمانی جدیدی را برای تنظیم ساختار و تشکیل استخوان فراهم می‌آورند. با توجه به قابلیت سلول‌های بنیادی مزانشیمی در تمایز به سلول‌های مختلف از جمله استئوبلاست، به منظور روشن شدن این موضوع که آیا HSC‌ها قادر به تنظیم تشکیل نیچ خود می‌باشند یا خیر، می‌توان از کشت هم‌زمان HSC‌ها همراه با پیش‌سازهای مزانشیمی بهره جست.

اطلاعات به دست آمده نشان می‌دهند که HSC‌ها تحت شرایط پایه، دارای توانایی هدایت تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی به سمت استئوبلاست‌ها می‌باشند که در این مسیر، BMP2 و BMP6 مشتق از HSC‌ها، نقش بسیار مهمی را بر عهده دارند. مطالعه‌های قبلی انجام شده، همه از یک ارتباط متقابل میان استئوبلاست و HSC حکایت می‌کنند که به موجب آن، HSC‌ها فعالیت‌های حمایتی خونسازی خود را از طریق استئوبلاست‌ها القا می‌نمایند (۱۶). تا پیش از این ضروری بودن ارتباط متقابل میان HSC‌ها و استئوبلاست‌ها جهت توسعه هر دو جمعیت سلولی، در حد یک فرضیه بود تا این که یانگ هون جانگ و همکارانش در مطالعه‌های خود نشان دادند که HSC‌ها می‌توانند به طور مستقیم، تمایز سلول‌های مزانشیمی را به سمت سلول‌های استئوبلاست هدایت نمایند (۱۷).

شناخت هر چه بهتر بیولوژی سلول‌های بنیادی، در استفاده از اثرات درمانی این سلول‌ها برای گسترهای از بیماری‌های ارثی و اکتسابی بسیار مؤثر می‌باشد. استفاده بهینه از سلول‌های بنیادی به موارد متعددی از جمله شناسایی منابع غنی از سلول‌های بنیادی، جداسازی و دستیابی به سلول‌های مفیدتر برای پیوند و مطالعه در جهت کاهش معایب و افزایش مزایای این سلول‌ها بستگی دارد. رسیدن به این هدف مستلزم استفاده از کشت، دست‌کاری ژنتیکی و روش‌های مختلف نگهداری در محیط آزمایشگاه، شناسایی مارکرهای سطحی و سیتوپلاسمی، واکنش‌های درون سلولی و مسیرهایی که این فعالیت‌ها را سیگنال‌دهی می‌کنند، می‌باشد.

سلول‌های بنیادی خونساز (HSCs) دارای هر دو قابلیت خود نوسازی و تمایز بوده و این فعالیت‌ها نیز اغلب در نیچ‌های واقع در مغز استخوان صورت می‌گیرند. مطالعه‌های مورفوژنیک و *in vitro* حاکی از آن است که نیچ‌های HSC‌ها، از مشارکت تعادلی از سلول‌های استرومایی مغز استخوان (BMSCs) با عملکردهای مشابه و محدود، حاصل می‌گردد (۱۱-۱۲).

پیشرفت‌های قابل ملاحظه‌ای در تعیین نقش مولکول‌های چسبندگی و سایتوکاین‌های مشتق از نیچ در خود نوسازی سلول‌های بنیادی صورت گرفته است (۱۲). این موضوع که آیا HSC‌ها خود بقا، حفظ و توسعه نیچ را تنظیم می‌کنند، هنوز به اثبات نرسیده است. در عین حال عقیده بر این است که ارتباط متقابل میان HSC‌ها و نیچ، هر یک از فعالیت‌هایی‌شان را تنظیم می‌نماید (۱۳، ۱۴).

در حال حاضر نقش کلیدی سلول‌های استئوبلاست در برقراری و تشکیل نیچ سلول‌های بنیادی خونساز، امری ثابت شده است (۱۲، ۵، ۱). استئوبلاست‌ها رسپتورهای سلول - سلول از جمله N-کادھرین، Jagged، مولکول‌های چسبندگی سلولی و اسکولار نوع ۱ (VCAM-1)، سایتوکاین‌های سلولی و محلول و فاکتورهای رشد تنظیم کننده اعمال مختلف HSC را بیان می‌نمایند که هر یک از این فاکتورها نیز تحت تاثیر سیگنال‌های مکانیکی، هورمونی (مانند هورمون پاراتیروئید) و موضعی (مانند

### آنالیز فلوسیتومتری:

سلول‌های تریپسینه شده در ۱ میلی‌لیتر محلول PBS (Phosphate Buffered Saline) سوسپانسیون شدند. ۵۰ میکرولیتر از سلول‌ها با ۵ میکرولیتر از آنتی‌بادی‌های CD105 و CD166 کثروگه با فیکوارتیرین (PE) و آنتی‌بادی‌های CD90، CD34، CD45 و CD44 کثروگه با فلورسین ایزوتوپیوسبیانات (FITC) و برای کنترل منفی با آنتی‌بادی‌های PE-IgG1 و FITC-IgG1 محلوت شدند و به مدت ۲۰ تا ۳۰ دقیقه در ۴ درجه سانتی‌گراد و تاریکی انکوبه شدند. در مرحله بعد سلول‌ها با ۲٪ PBS-BSA شستشو داده شدند و در ۵۰۰ میلی‌لیتر PBS سوسپانسیون شدند و در انتهای به منظور فیکس شدن سلول‌ها، ۵۰ میکرولیتر پارافرمالدئید ۱٪ به لوله‌ها اضافه و با دستگاه فلوسیتومتری تجزیه و تحلیل شدند.

### جداسازی سلول‌های CD34<sup>+</sup> از خون بند ناف:

در این مطالعه پس از اخذ رضایت‌نامه از والدین، ۳ نمونه خون بند ناف با میانگین حجمی ۸۰ میلی‌لیتر بلافارسله بعد از زایمان، درست قبل از بسته شدن بند ناف و در شرایط کاملاً استریل، در کیسه‌های مخصوص خون بند ناف حاوی ماده ضد انعقاد و نگهدارنده CPDA-1 جمع‌آوری شد. برای جداسازی سلول‌های تک هسته‌ای از خون بند ناف، به دلیل وجود مقادیر بالای گلbul قرمز در خون بند ناف با استفاده از روش‌های مناسب (از جمله افزودن هیدروکسی اتیل استارچ) گلbul‌های قرمز را به حداقل رساندیم تا هم حجم نمونه جهت استفاده مناسب شده و هم کیفیت و کمیت سلول‌های بنیادی موجود در نمونه به حد قابل قبولی برسد. سپس سلول‌های تک هسته‌ای با استفاده از فایکول (با چگالی ۱/۰۷۷ g/mL) و روش گرادیانت شیب غلاظت جداسازی گردیدند. MACS جداسازی سلول‌های CD34<sup>+</sup> مطابق دستورالعمل (Magnetic Activated Cell Sorting) متعلق به شرکت میلتني بیوتک صورت گرفت. برای انجام این کار از آنتی‌بادی‌های نشان دار شده با ذرات microbead بر علیه آنتی‌ژن CD34 استفاده شد و پس از آگشته شدن سلول‌ها با آنتی‌بادی، از ستون مگنتیک MACS (ستون LS: سایز

با توجه به این که مطالعه‌های مذکور فقط بر روی HSC موشی در *in vitro* و *in vivo* صورت پذیرفته است، در این مطالعه بر آن شدیدم تا جهت بررسی شکل‌گیری نیچ استئوبلاستی تحت تأثیر فعالیت HSC‌های انسانی، به تحقیق پردازیم و به این منظور از HSC‌های نمونه‌های خون بند ناف (به دلیل مزایای بسیار این منع نسبت به سایر منابع) استفاده کردیم تا در صورت تایید این تأثیر، به اهداف درمانی جدیدی در این موضوع نایل آییم.

### مواد و روش‌ها

مطالعه انجام شده از نوع تجربی بود. محیط DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) فسفاتاز و کیت آلیزارین رد از شرکت سیگما، کیت آلکالن cDNA از شرکت بیونیر، کیت استئوژنیزیس از شرکت کمیکون، کیت PCR از شرکت تاکارا بیوتکنولوژی دالیان و کیت جداسازی سلول‌های CD34<sup>+</sup> از شرکت بیوتک خردباری شد. تریپسین، سرم حیوانی (FBS) از شرکت اینویتروژن، آنتی‌بادی‌های مورد نیاز برای فلوسیتومتری از شرکت‌های داکو و بیوساینس و آنتی‌بیوتیک‌ها از شرکت سیناژن تهیه گردید.

### جداسازی و کشت سلول‌های MSCs مغز استخوان:

در مطالعه حاضر ۳ نمونه مغز استخوان از افراد اهداکننده سالم (با میانگین حجمی ۱۰ میلی‌لیتر و با اخذ رضایت‌نامه از والدین اهداکنندگان مذکور که جهت اهدای مغز استخوان به بیمارستان شریعتی مراجعه کرده بودند) با ضد انعقاد هپارین تهیه گردید.

به طور خلاصه سلول‌های تک هسته‌ای با استفاده از گرادیانت غلاظت جدا شدند و در فلاسک کشت  $25\text{ cm}^2$  حاوی ۶ میلی‌لیتر محیط کشت DMEM، ۱۰٪ FBS و آنتی‌بیوتیک‌های استرپتومایسین و پنی‌سیلین کشت داده شدند. ۴۸ ساعت پس از آغاز کشت، سلول‌های غیر چسبیده با تعویض محیط حذف شدند و به مدت ۱۴ روز، هر ۳ روز یک بار محیط کشت عوض شد. بعد از این مدت سلول‌های مزانشیمی تکثیر یافته و به مدت ۸۰٪ کف فلاسک را پوشاندند. در این زمان، سلول‌ها پاساژ داده شد و به فلاسک‌های جدید منتقل گردیدند.

و ۰.۵٪ سرم به هر چاهک افزوده گردید(گروه آزمایش). پس از ۳ روز هم کشتی، سلول‌های CD34<sup>+</sup> را از چاهک‌ها خارج کرده و جهت تعدیل شرایط MSC‌ها برای ورود به فاز تمایزی، محیط DMEM با غلظت کم گلوکز حاوی ۱٪ FBS جایگزین شد. پس از ۲۴ ساعت، محیط‌ها را از تمام چاهک‌ها کاملاً خارج کرده و به همه چاهک‌ها، ۱ میلی لیتر محیط تمایزی سلول‌های مزانشیمی شامل DMEM حاوی دگراماتازون ۱ میلی مولار، اسید اسکوربیک دو فسفات ۰/۱ مولار، گلیسرول دو فسفات ۱ مولار و ۰.۱۰٪ سرم افزوده گردید. در ادامه هر دو روز یک بار محیط‌های داخل چاهک‌ها با محیط تمایزی تازه(در هر دو گروه) جایگزین شد. در روزهای ۴ و ۶ تمایزی، فرآیند استخراج RNA، ساخت cDNA و در نهایت PCR و الکتروفسورز روی ژل جهت بررسی بیان ژن‌های استئوپونتین و استئوکلسین انجام شد. استئوپونتین I (multidomain acid-rich Phosphorylated glycoprotein) توسط سلول‌های مختلفی در بدن تولید می‌گردد ولی تولید عده آن در نیچ اندوستیل توسط استئوبلاست می‌باشد. OPN (استئوپونتین) یک مولکول خارج سلولی و غیر هماتوپونتیک است و به صورت یک تنظیم‌کننده منفی بالقوه برای HSC به واسطه کاهش در آپوپتوز این سلول‌ها عمل می‌کند، بدین ترتیب به عنوان یک جزء کلیدی نیچ سلول‌های HSC مطرح است. استئوکلسین که BGLAP bone gamma- (carboxyglutamate acid containing protein) نیز نامیده می‌شود، پروتئینی غیرکلائزی بوده، به صورت انحصاری توسط استئوبلاست ترشح می‌شود و در تنظیم متابولیک بدن، مینرالیزاسیون استخوانی و هموستاز یون کلسیم نقش داشته و ذاتاً یک ماهیت پرواستئوبلاستیک یا استخوان‌سازی دارد. مارکر مهم دیگر در بررسی استئوژنریس CD90 می‌باشد، این مارکر به میزان بالایی در سطح MSC‌ها بیان شده و میزان بیان آن در طی تمایز استئوبلاستی و در سلول استئوبلاست کاهش می‌یابد. در روز ۶ تمایز برای بررسی میزان کاهش بیان این مارکر، بر روی سلول‌های هر دو گروه آزمایش و کنترل فلورسیوتومتری مارکر CD90 انجام شد. در روز ۱۰ تمایز نیز جهت بررسی بیان آنزیم آلkalین فسفاتاز (بیان این آنزیم غشایی در

بزرگتر ستون متناسب با تعداد سلول) عبور داده شده و به روش Positive selection این سلول‌ها از سایر سلول‌های تک هسته‌ای جدا شدند و مورد شمارش سلولی و آزمایش حیات‌پذیری(Viability) قرار گرفتند.

### ارزیابی درجه خلوص سلول‌های CD34<sup>+</sup>:

در این مرحله جهت تعیین خلوص سلول‌های CD34<sup>+</sup> به روش فلورسیوتومتری، ابتدا ۵۰ میکرولیتر از سوسپانسیون سلولی(حاوی ۱۰<sup>۶</sup> سلول در هر میلی لیتر) با ۵ میکرولیتر از آنتی‌بادی منوکلونال CD34<sup>+</sup> کونژوگه با FITC (فلورسین-ایزوتوپیسانات) و برای کنترل منفی با آنتی‌بادی- FITC IgG1 مخلوط شدند و به مدت ۲۰ تا ۳۰ دقیقه در ۴ درجه سانتی‌گراد و تاریکی انکوبه شدند. در مرحله بعد سلول‌ها با ۰.۲٪ PBS-BSA شستشو داده شدند و در ۵۰۰ میلی لیتر PBS سوسپانسیون شدند و در انتهای به منظور فیکس شدن سلول‌ها، ۵۰ میکرولیتر پارافرمالدئید ۱٪ به لوله‌ها اضافه و با دستگاه فلورسیوتومتری تجزیه و تحلیل شدند.

### کشت همزمان سلول‌های بنیادی خونساز و مزانشیمی:

در این آزمایش از دو گروه شامل گروه آزمایش یعنی MSC‌هایی که با HSC‌ها هم کشتی داده شده و سپس تحت تمایز استئوبلاستی قرار گرفتند و گروه کنترل یعنی MSC‌هایی که بدون هم کشتی با HSC‌ها تحت تمایز استئوبلاستی قرار گرفتند، استفاده شد. قابل ذکر است که سلول‌های MSC در هر ۲ گروه از یک اهداکننده و از یک پاساز سلولی برداشت شده‌اند و تمام مراحل کار ۳ بار تکرار شده است. این دستورالعمل شامل ۳ بخش هم کشتی MSC‌ها با سلول‌های HSC، تمایز سلول‌های MSC و ارزیابی‌های مورد نظر می‌باشد. ابتدا ۱۰<sup>۴</sup> سلول MSC در محیط DMEM حاوی ۱۰ درصد سرم حیوانی در چاهک‌های پلیت ۲۴ خانه‌ای که با کلائز و ویترونکتین پوشیده شده بودند، کشت داده شد. بعد از این که سلول‌ها به هم پوشانی ۸۰٪ تا ۹۰٪ رسیدند، محیط DMEM از چاهک‌ها خارج و پس از شستشوی چاهک‌ها با PBS، تعداد ۱۰<sup>۴</sup> از سلول‌های CD34<sup>+</sup> تازه جدا شده به همراه ۱ میلی لیتر محیط Stem Span حاوی ۱۰ ng/mL SCF در

جدول ۱: آغازگرهای ژن‌های بتاکتین، استئوپونتین و استئوکلسین

نام آغازگر	دما (°C)	سکانس
OPNF جلوبرنده	۶۸	5'-TGA GAG CAA TGA GCA TTC CGA TG-3'
OPNF معکوس	۶۸	5'-CAG GGA GTT TCC ATG AAG CCA C-3'
OCNF جلوبرنده	۵۴	5'-AGC GAG GTA GTG AAG AGA-3'
OCNF معکوس	۵۴	5'-AGG GGA AGA GGA AAG AAG-3'
β-actin جلوبرنده	۵۹	5'-TTC TAC AAT GAG CTG CGT GTG G-3'
β-actin معکوس	۵۹	5'-GTG TTG AAG GTC TCA AAC ATG AT-3'

**یافته‌ها**

جاداسازی و کشت سلول‌های MSC:

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 هماتوپوئیک به طور آزاد یا چسبیده به سلول‌های مزانشیمی هنوز در محیط دیده می‌شد 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.

بررسی مارکرهای سطح سلولی MSCs:

نتایج مربوط به مارکرهای سطحی سلول‌های مزانشیمی در شکل ۱ نشان داده شده است. میانگین درصد بیان مارکرهای اختصاصی سلول‌های بنیادی مزانشیمی شامل CD90، CD166، CD105، CD44 و CD45 در سلول‌های جدا شده از مغز استخوان به ترتیب  $8/7 \pm 8/8\%$ ،  $9/6/8 \pm 12/1\%$ ،  $9/8/8 \pm 9/5\%$ ،  $9/9/5 \pm 10/2\%$  و  $9/93 \pm 9/5\%$  می‌باشد. در حالی که مارکرهای ویژه سلول‌های هماتوپوئیک از جمله CD45 و CD34 در این سلول‌ها بقابل توجهی ( $0/3 \pm 0/38\%$ ) نشان ندادند (شکل ۱).

جاداسازی سلول‌های CD34<sup>+</sup>:میانگین درصد خلوص سلول‌های CD34<sup>+</sup> جدا شده با

حین تمایز MSC به استئوبلاست، Fold ۴۷ افزایش می‌یابد و به عنوان اولین نشانه این تمایز به روش آنزیماتیک و رنگ‌آمیزی اختصاصی قابل ارزیابی می‌باشد)، رنگ‌آمیزی ALP و جهت بررسی میترالیزاسیون سلولی و میزان رسوب کلسیم فسفات در MSC‌ها، رنگ‌آمیزی آلیزارین رد بر روی سلول‌های هر دو گروه مذکور صورت گرفت.

جدول ۲: برنامه زمانی و دمای لازم دستورالعمل کیت Takara

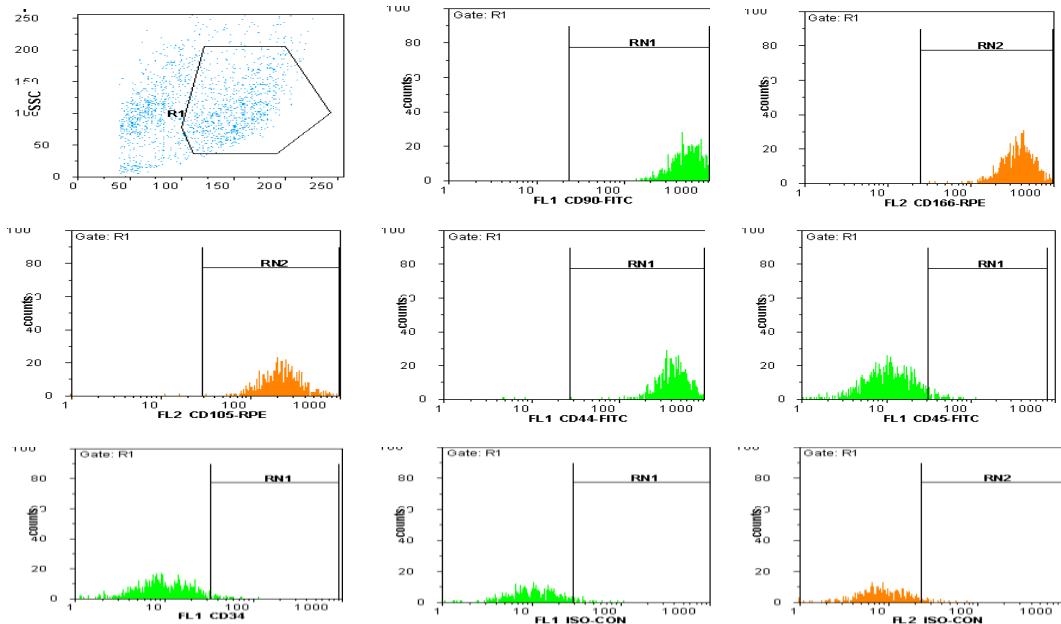
## جهت انجام PCR

دنا توراسیون مقدماتی	۹۵ °C	۵ دقیقه
دنا توراسیون	۹۴ °C	۱ دقیقه
آنلینگ	۵۸ °C	۴۵ ثانیه
اکستنشن	۷۲ °C	۴۵ ثانیه
اکستنشن نهایی	۷۲ °C	۵ دقیقه

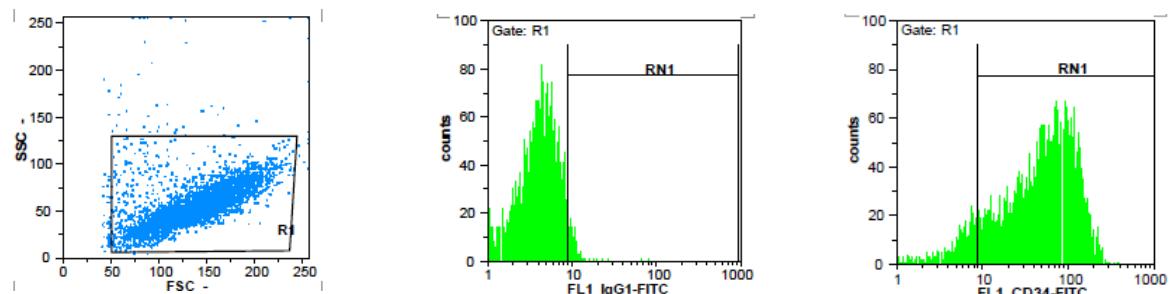
## آنالیز RT-PCR :

سلول‌ها از نظر بیان ژن استئوپونتین و استئوکلسین مورد بررسی قرار گرفتند. برای این منظور RNA سلول‌های هر دو گروه آزمایش و کنترل جadasازی شد.

سپس cDNA در واکنش رونویسی معکوس با استفاده از کیت ساخت cDNA تهیه شد. در ادامه واکنش PCR انجام شد (جداول ۱ و ۲). در پایان محصول PCR درون چاهک‌های ژل ۲ درصد آگاروز ریخته شد و پس از الکتروفورز با رنگ اتیدیوم بروماید رنگ‌آمیزی و سپس ارزیابی شد.



شکل ۱: نتایج فلوسیتومتری سلول‌های مزانشیمی مغز استخوان. ردیف اول از چپ: جمعیت سلول‌های بزرگ تک هسته‌ای، واکنش سلول‌ها با آنتی CD90 و آنتی CD166. ردیف دوم از چپ: واکنش سلول‌ها با آنتی CD105، آنتی CD44 و آنتی CD45. ردیف سوم از چپ واکنش سلول‌ها با آنتی CD34 و ایزوتیپ کنترل.



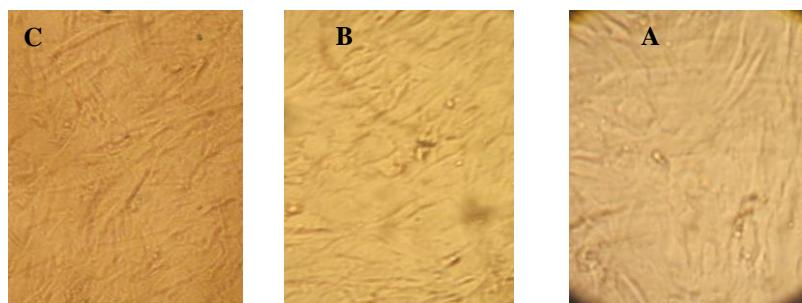
شکل ۲: خصوصیات ایمنوفوتیپی سلول‌های  $CD34^+$  MACS . از چپ: شکل اول: جمعیت سلول‌های بزرگ تک هسته‌ای. شکل دوم: واکنش سلول‌ها با آنتی‌بادی ایزوتیپ. شکل سوم: واکنش سلول‌ها با آنتی CD34 (R1=97.9% of total cells , RN1=84.27% )

آزمایش و کنترل، عوامل تمایز دهنده(دگرامتازون، اسید اسکوربیک، گلیسرول فسفات) افزوده شد(شکل‌های ۳ و ۴).

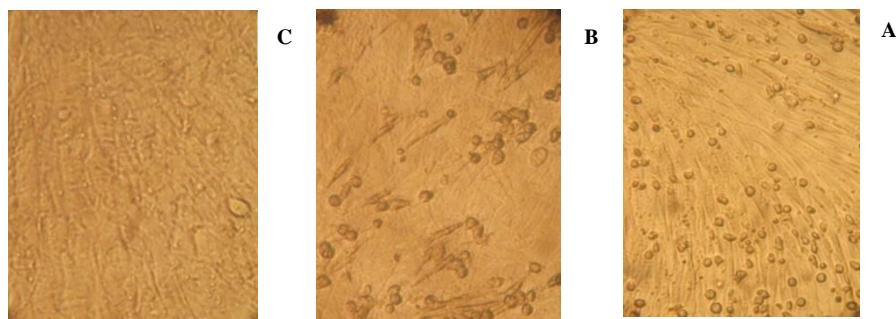
با توجه به این که در طی تمایز محظیات کلسیم در سلول‌ها افزایش می‌یابند، از رنگ‌آمیزی اختصاصی آلیزارین رد رسوبات کلسیم (به رنگ قرمز) در سلول‌های تمایز یافته در هر دو گروه آزمایش و کنترل بهره جسته شد. هم چنین در سلول‌های استئوبلاست، فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز افزایش یافته و شاخصی برای تمایز سلول‌ها

استفاده از روش فلوسیتومتری  $5/6$  درصد و میانگین درصد زنده ماندن سلول‌های جدا شده حدود  $2 \pm 89$  درصد بود(شکل ۲).

ارزیابی توانایی تمایز سلول‌های مزانشیمی به استئوبلاست در دو گروه آزمایش و کنترل: رنگ‌آمیزی آلکالین فسفاتاز و آلیزارین رد: به منظور تمایز سلول‌های مزانشیمی به سلول‌های استئوبلاست، به محیط کشت پایه سلول‌های هر دو گروه



شکل ۳: سلول‌های مزانشیمی تمایز داده شده به سمت استئوپلاست بدون هم کشتی با HSC (گروه کنترل) در (A) روز چهارم تمایزی. (B) روز ششم تمایزی. (C) روز دهم تمایزی (بزرگ نمایی  $\times 40$ ).



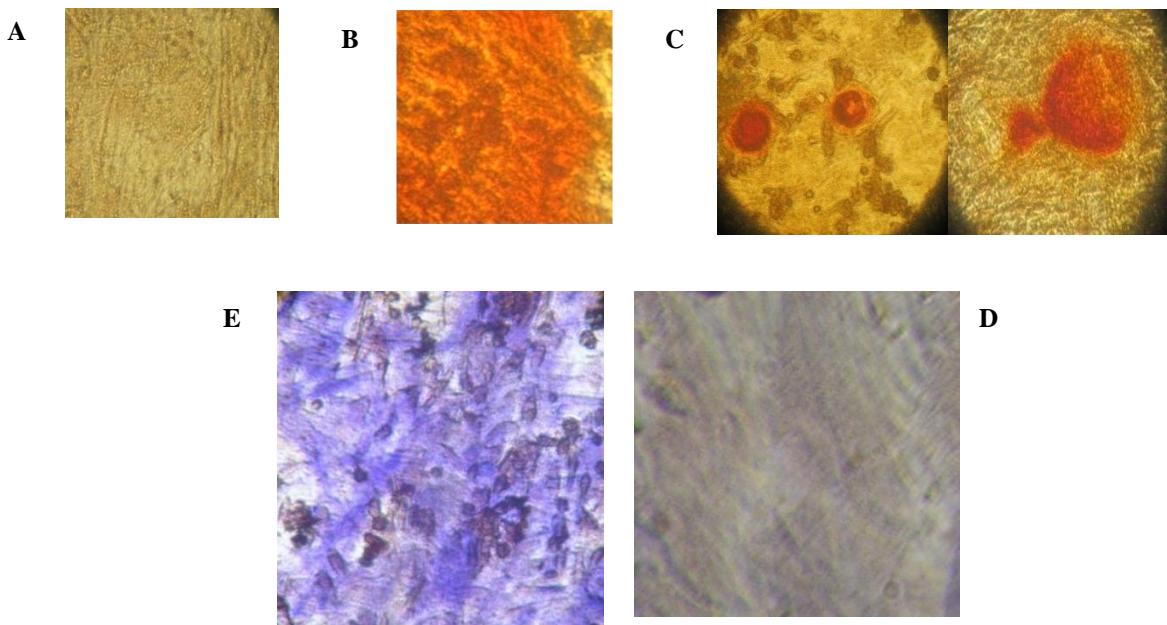
شکل ۴: سلول‌های مزانشیمی تمایز داده شده به سمت استئوپلاست که قبلًا با HSC‌ها هم کشتی داشته‌اند (گروه آزمایش). (A) روز چهارم تمایز. (B) روز ششم تمایز. (C) روز دهم تمایز (بزرگ نمایی  $\times 40$ ).

سلول‌های بنیادی مزانشیمی به استئوپلاست می‌شوند در حالی که در گروه کنترل، زودتر از روز ۱۴ رنگ‌آمیزی مثبتی مشاهده نگردید. هم چنین چند ناحیه در رنگ‌آمیزی سلول‌های گروه آزمایش نمایان شد که به صورت کانونی رنگ گرفته بودند. احتمال می‌رود در این مناطق HSC‌ها در اتصال و تماس مستقیم با MSC‌ها بوده و بر همکنش‌های میان این دو سلول، یکی از عوامل دخیل در اثر مذکور باشند.

در همین رابطه مشخص شد در مناطق فوق، با افزایش روزهای تمایز (تا روز ۱۰)، سلول‌های HSC نه تنها کاهش نیافته بلکه تکثیر پیدا می‌کنند. این امر نیز دلیل دیگری بر تماس مستقیم MSC و HSC می‌باشد که در واقع تا روز دهم سلول‌ها به استئوپلاست تمایز می‌یابند. استئوپلاست‌ها دارای نقش در خود نوسازی HSC‌ها بوده لذا تاثیرات متقابل این دو سلول در نواحی مذکور قابل مشاهده است (شکل ۵).

محسوب می‌گردد، لذا سلول‌های تمایز یافته در هر دو گروه آزمایش و کنترل با انجام این رنگ‌آمیزی، مورد ارزیابی قرار گرفتند. در سلول‌های مزانشیمی تمایز یافته، میزان فعالیت این آنزیم افزایش یافته که بیانگر تمایز این سلول‌ها به سلول‌های رده استئوپلاستیک می‌باشد. در تمایز سلول‌های MSC به استئوپلاست به روش استاندارد (گروه کنترل)، دو رنگ‌آمیزی مذکور از روز ۱۴ تمایز مثبت شدند. در این مطالعه انتظار می‌رفت به دلیل هم کشتی این سلول‌ها با HSC‌ها و تأثیر آن‌ها بر تمایز HSC‌ها به استئوپلاست‌ها، سلول‌های بنیادی مزانشیمی زودتر وارد فاز تمایزی گردند.

در بررسی این امر در گروه آزمایش، به دنبال تکرارهای متوالی و رنگ‌آمیزی‌های فوق در روزهای مختلف بعد از هم کشتی، مشخص شد که از روز ۱۰ تمایز به بعد، رنگ‌آمیزی‌ها مثبت می‌گردند. این مطلب حاکی از آن است که سلول‌های بنیادی خونساز باعث افزایش سرعت تمایز



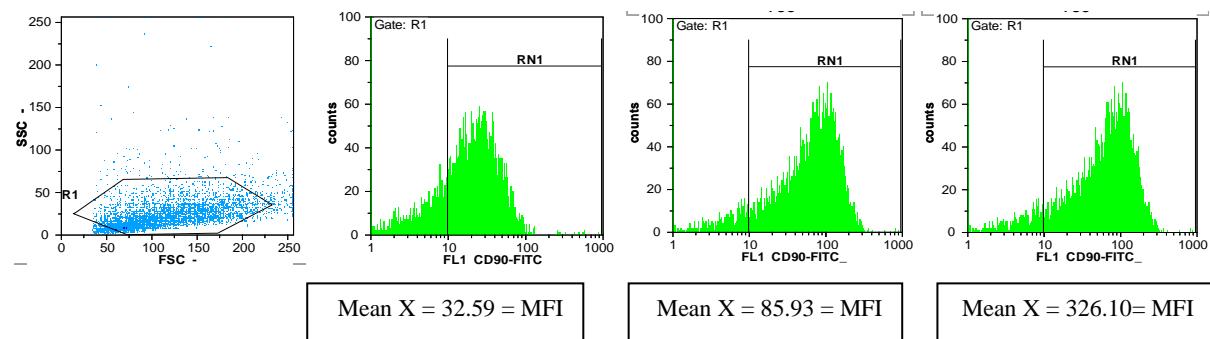
شکل ۵: رنگ‌آمیزی آلیزارین رد در سلول‌های مزانشیمی تمایز داده شده به سمت استئوپلاست در روز دهم تمایزی در گروه کنترل منفی (A) و در گروه آزمایش مثبت بود (B) و نیز در نواحی از سلول‌های تمایز یافته گروه آزمایش این رنگ‌آمیزی به صورت کانونی مثبت بود (C) (بزرگنمایی  $\times 40$ )، رنگ‌آمیزی آلکالین فسفاتاز در سلول‌های مزانشیمی تمایز داده شده به سمت استئوپلاست در روز دهم تمایزی در گروه کنترل منفی (D) و در گروه آزمایش مثبت بود (E) (بزرگنمایی  $\times 40$ ).

پروتئین را نشان می‌دهند، میانگین شدت رنگ فلورسنت،  
بیانگر میانگین میزان بیان مارکر CD90 در سلول‌های تحت بررسی می‌باشد.

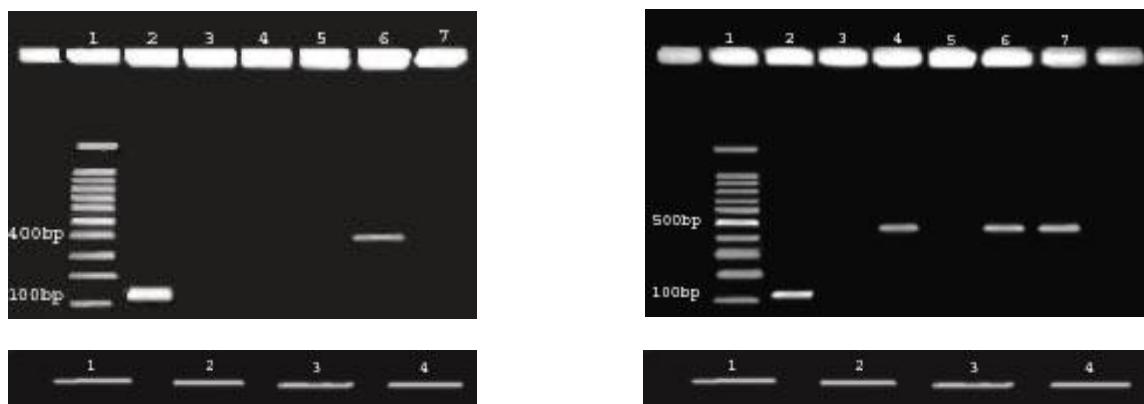
به همین دلیل میانگین فلورسنت بازتابی سلول‌ها (میزان مارکرهای هدف که به آنتی‌بادی منوکلونال متصل شده‌اند (MFI = Mean Fluorescent Intensity مارکر مورد نظر در سلول‌های دو گروه آزمایش و کنترل بررسی گردید. نتایج نشان دادند که با توجه به میزان بیان مارکر  $CD90^+$  در سلول‌های مزانشیمی پیش از تمایز، میزان بیان آن در سلول‌های مزانشیمی در روز ششم تمایزی، در سلول‌های گروه آزمایش نسبت به سلول‌های مذکور در گروه کنترل بسیار بیشتر کاهش یافته است (شکل ۶).

بررسی بیان ژن استئوپوتین و استئوکلسین:  
تمایز سلولی با استفاده از بیان ژن استئوپوتین و استئوکلسین مورد ارزیابی قرار گرفت. طبق آن چه که در مطالعه‌های مختلف گزارش گردیده، بیان ژن استئوپوتین از

انجام فلوسیتوometری جهت تایید کاهش بیان مارکر  $CD90^+$  همان طور که در مطالعه‌های مختلف اشاره شده است، در تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی جدا شده از مغز استخوان، میزان بیان مارکر  $CD90^+$  کاهش می‌یابد. در این مطالعه از این امر جهت مقایسه سرعت تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی بین دو گروه آزمایش و کنترل استفاده نمودیم. برای انجام این کار جمعیت سلول‌های بنیادی مزانشیمی  $CD90^+$ ، مارکری که در سلول‌های MSC به میزان بالایی بیان می‌شود، جهت بررسی فلوسیتوometری جداسازی گردیدند. جهت مقایسه میزان بیان  $CD90^+$  در سطح سلول‌های دو گروه آزمایش و کنترل در روز ۶ تمایزی، از آن جا که آنتی‌بادی‌های مونوکلونال به مولکول‌های فلورسنت متصل بوده و در واکنش اختصاصی به مولکول‌های  $CD90^+$  متصل می‌شوند و به همین دلیل شدت رنگ فلورسنت بازتابی نمایانگر مقدار حضور مارکر مذکور در سطح سلول‌ها می‌باشد. لذا در بررسی فلوسیتوometری ضمن تعیین درصد سلول‌هایی که بیان



شکل ۶: نتایج فلوسیتومتری بررسی مقایسه میزان بیان مارکر CD90 که به صورت میانگین فلورسنت بازتابی ارایه شده است. از چپ: پراکنده‌گری سلولی در جمعیت مورد مطالعه و بیان مارکر CD90 سلول‌های گروه آزمایش در روز ۶ تمایز، بیان مارکر CD90 سلول‌های گروه کنترل در روز ۶ تمایز و بیان مارکر CD90 در سلول‌های MSC پیش از تمایز.



شکل ۷: شکل بالا: بیان ژن‌های استئوکلسین (OCN) و بتا اکتین ( $\beta$ -actin) در سلول‌های مزانشیمی تمایز یافته به استئوپلاست. (۱) نشانگر شاخص وزن مولکولی (DNA Size Marker 100bp) است. (۲) بیان ژن بتا اکتین (۳) کنترل منفی (۴) بیان OCN در روز ۶ تمایزی سلول‌های مزانشیمی آزمایش (۵) بیان OCN در روز ۴ تمایزی سلول‌های مزانشیمی کنترل (۶) بیان OPN در روز ۴ تمایزی سلول‌های مزانشیمی آزمایش (۷) بیان OPN در روز ۴ تمایزی سلول‌های مزانشیمی آزمایش (۷) بیان OCN در روز ۶ تمایزی سلول‌های مزانشیمی کنترل را نشان می‌دهد.

شکل پایین: بیان ژن بتا اکتین به ترتیب در سلول‌های (۱) روز ۴ تمایزی گروه آزمایش، (۲) روز ۴ تمایزی گروه کنترل، (۳) روز ۶ تمایزی گروه آزمایش و (۴) روز ۶ تمایزی گروه کنترل.

مزانشیمی پیش از تمایز، ژن استئوکلسین بیان نمی‌گردد. در این مطالعه انتظار می‌رفت که هم کشتی سلول‌های HSC با سلول‌های MSC باعث شود این سلول‌ها زودتر از زمان ذکر شده وارد فاز تمایزی گردند و به عبارتی بیان این دو

روز سوم شروع و در روز هفتم تمایز به حداقل می‌رسد و بعد از آن به تدریج کاهش می‌یابد و متعاقب کاهش آن، بیان ژن استئوکلسین از روز هفتم افزایش می‌یابد. این در حالی است که در سلول‌های بنیادی

-L ، FBS ، DMEM-LG ، محیط تمایزی استئوژنیک شامل آسکوربات،  $\beta$ -گلیسرول فسفات و دگراماتازون کشت داده شدند. نظر به این که میزان بیان ALP و نیز رسوپات کلسیم در طی فرآیند تمایز استئوبلاستی در این سلول‌ها افزایش می‌یابد، از رنگ‌آمیزی سیتوشیمی ALP و آلیزارین رد به عنوان شاخص تمایز استئوبلاستیک استفاده گردید. نتایج به دست آمده با نتایج مطالعه‌های صورت گرفته توسط محققینی از جمله مولمن و همکاران وی در سال ۲۰۰۶ مطابقت داشت(۱۹). بررسی شاخص‌های دیگر تمایز استئوبلاستیک شامل استئوپوتین و استئوکلسین نیز به روش مولکولی (RT-PCR) انجام شد که نتایج حاصله در گروه کترل مطابق با نتایج هایلک و همکاران وی در سال ۲۰۰۳ و نیز E پوچاز و همکارانش در سال ۲۰۰۷ می‌باشد(۲۰، ۱۵). مشاهده گردید که بیان ژن OPN در روز ۷ تمایز به حداقل رسیده و سپس به تدریج کاهش می‌یابد. بیان ژن OCN نیز وابسته به زمان بوده و از روز ۷ تمایز افزایش می‌یابد. در این مطالعه مشاهده شد که در سلول‌های گروه آزمایش، بیان ژن OPN در روز ۴ تمایز بالاتر از بیان ژن OPN در سلول‌های گروه کترل بوده و بیان آن در روز ۶ تمایزی در گروه آزمایش، با روش RT-PCR قابل ردیابی نمی‌باشد در حالی که در گروه کترل هم چنان بیان ژن مذکور در روز ۶ تمایز قابل مشاهده می‌باشد. بیان OCN نیز از روز ۶ تمایز قابل ردیابی است. به دلیل این که تاکنون مطالعه مشابهی بر روی HSC و MSC‌های انسانی صورت نگرفته است لذا نتایج فوق قابل مقایسه با نتایج مطالعه‌های دیگر نمی‌باشد. هم چنین در این مطالعه جهت مقایسه روند تمایز بین دو گروه آزمایش و کترل، بررسی بیان مارکر CD90 به روش فلوسیتومتری قبل و بعد از تمایز در هر دو گروه صورت پذیرفت و نتایج به دست آمده مبنی بر کاهش بیان این مارکر در طی تمایز استئوبلاستی MSC‌ها، با نتایج مطالعه صورت گرفته توسط وايسمن و همکاران وی در سال ۲۰۰۶ مطابقت دارد. البته در مطالعه مذکور از روش ايمونوفلورسانس جهت بررسی بیان CD90 استفاده گردیده است(۲۱). هم چنین مشخص گردید کاهش بیان این مارکر در سلول‌های گروه آزمایش، به میزان قابل توجهی بیشتر از سلول‌های

زن در سلول‌های تمایز یافته زودتر تحقق یابد. نتایج حاصله این مدعای اثبات نمودند و در سلول‌های تمایز یافته گروه آزمایش، بیان ژن استئوپوتین در روز چهارم تمایز کاهش و در روز ششم تمایز عدم بیان این ژن مشاهده گردید(شکل ۷). بیان ژن استئوکلسین نیز در این سلول‌ها از روز ششم تمایز شروع شد در حالی که در سلول‌های گروه کترل، بیان این ژن مشاهده نگردید(شکل ۸). این نتایج همگی تایید می‌نمایند که سلول‌های HSC باعث افزایش سرعت تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی به استئوبلاست می‌شوند.

## بحث

در مطالعه‌های انجام شده توسط محققین متعددی از جمله تایچمن و همکاران وی در سال ۱۹۹۷، ارتباط تنگاتنگی میان سلول‌های بنیادی خونساز و سلول‌های استئوبلاست مشاهده گردید که به موجب آن، HSC‌ها بیان فعالیت‌های حمایتی خونسازی را از طریق سلول‌های استئوبلاست القا می‌نمایند، لذا این فرضیه مطرح می‌شود که ارتباط متقابل میان این دو سلول، جهت توسعه و نمو هر دو جمعیت سلولی، امری ضروری می‌باشد(۱۸). در این مطالعه نشان داده شد که در فرآیند تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی، سلول‌هایی که پیش از CD34<sup>+</sup> تمایز تحت هم کشته با سلول‌های بنیادی خونساز قرار گرفته‌اند نسبت به آن‌هایی که بدون هم کشته با سلول‌های مذکور تمایز داده شده‌اند، زودتر وارد فاز تمایزی به سمت استئوبلاست می‌گردند و این امر با بررسی بیان دو ژن استئوپوتین و استئوکلسین در روزهای مختلف تمایز، رنگ‌آمیزی سیتوشیمیایی آلکالین فسفاتاز و آلیزارین رد و نیز بررسی بیان مارکر CD90 در این سلول‌ها، تحقق پذیرفت. با استناد به نتایج حاصله اثبات گردید که سلول‌های HSC انسانی CD34<sup>+</sup> جاذبه از خون بند ناف قادرند سبب افزایش تمایز سلول‌های MSC انسانی به دست آمده از مغز استخوان به سلول‌های استئوبلاست شوند و به عبارت دیگر می‌توانند نیچ خود را تنظیم نموده و سبب گسترش نیچ استئوبلاستیک گردند. جهت بررسی توانایی تمایز MSC‌ها به رده استئوبلاستی، این سلول‌ها در

به عبارتی condition media وارد محیط تمایزی MSC می‌شود. فاکتورهای مورد نظر در این مطالعه نیز شامل بررسی مقادیر IL6، SCF، OCN، BMP2 و BMP6 در هم کشته مذکور می‌باشد و عنوان گردیده است که احتمالاً افزایش بیان<sup>2</sup> BMP و BMP<sub>6</sub> تولید شده توسط HSCها، مسؤول تمایز MSC به استئوپلاست بوده و نقشی برای اتصال سلول - سلول در این امر مطرح نشده است<sup>(17)</sup>. در حالی که با توجه به نتایجی که در این مطالعه حاصل گشت، تصور می‌شود که بر همکنش‌های سلول - سلول نیز علاوه بر افزایش بیان<sup>2</sup> BMP و BMP6 نقش به سزایی را در این پدیده ایفا می‌نمایند. در نهایت در این مطالعه اثبات گردید که HSC‌های انسانی جدا شده از خون بند ناف، قادرند سبب افزایش سرعت تمایز MSC‌های انسانی جدا شده از مغز استخوان به استئوپلاست گردند و به عبارتی گسترش نیچ استئوپلاستیک را صورت دهند. اما جزئیات، بر همکنش‌ها و عوامل دخیل در این امر هنوز مشخص نمی‌باشد و نیاز به بررسی‌های سلولی و مولکولی دقیق در این رابطه است. امید است که با نیل به این هدف، گامی مؤثر در دستیابی به اهداف درمانی جدید در حوزه هماتوپوئیتیک برداشته شود.

### نتیجه‌گیری

نتایج ما بیان زود هنگام ژن‌های استئوپونین و استئوکلسین را در همکشی MSC با HSC نمایان ساخت. این یافته‌ها از نقش HSC‌ها در القای تمایز استئوپلاستی MSC‌ها حمایت می‌نمایند. هم چنین کاهش بیان CD90 و افزایش فعالیت آکالالین فسفاتاز و میزالیزاسیون سلولی این نتایج را تایید نمودند.

### تشکر و قدردانی

این مقاله حاصل پایان‌نامه کارشناسی ارشد مصوب مرکز تحقیقات مؤسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون وابسته به سازمان انتقال خون ایران می‌باشد. بدین‌وسیله از کلیه همکاران مرکز تحقیقات سازمان انتقال خون ایران که در انجام این پایان‌نامه ما را یاری نمودند تشکر و قدردانی می‌نماییم.

گروه کنترل می‌باشد که این امر نیز گواه دیگری بر تاثیر سلول‌های HSC بر افزایش سرعت تمایز MSC‌ها به سلول‌های استئوپلاست می‌باشد.

نتایج به دست آمده از مطالعه دیگرولامو و همکاران<sup>2002</sup> وی در سال ۱۹۹۹ و نیز سکیا و همکارانش در سال ۲۰۰۲ همگی نشان می‌دهند که با افزایش سن اهدا کننده، خاصیت تمایز استئوپلاستی MSC‌ها کاهش می‌یابد. با توجه به این که در مطالعه‌های قبلی صورت گرفته در آزمایشگاه نیز این امر مشاهده گردید لذا در این مطالعه از نمونه‌های مغز استخوان کودکان استفاده شد<sup>(22, 23)</sup>. در این مطالعه، با توجه به این که هدف از هم کشته MSC و MSC، حفظ MSC‌ها در محیط کشت می‌باشد، لذا پس از بررسی‌های متعدد بهترین محیط آزمایش + Stem Span + SCF (جهت جلوگیری از تمایز HSC‌ها و خود نوساز ماندن آن‌ها به کار برده شد و نیز بی‌تأثیری آن بر تمایز HSC‌ها بررسی گردید) FBS ۵٪ می‌باشد. به علاوه نمایان گشت که محیط Stem Span ، تاثیر سویی بر رشد و تمایز MSC‌ها ندارد.

نکته دیگر این بود که در گروه آزمایش، پس از اتمام هم کشته سلول‌ها، حتی با وجود شیستشوی‌های صورت گرفته، هم چنان تعدادی از HSC‌ها به MSC‌ها در حال تمایز متصل باقی مانندند و نه تنها حذف نشدن بلکه در محیط تمایزی، تکثیر نیز یافتنند. مشاهده گردید که این مناطق در رنگ‌آمیزی آلیزارین رد، به صورت کانونی رنگ می‌گیرند. با توجه به شواهد موجود احتمال می‌رود در این مناطق، HSC‌ها در اتصال و تماس مستقیم با MSC‌ها بوده و بر همکنش‌های میان این دو سلول، یکی از عوامل دخیل در اثر مذکور باشند. لازم به ذکر است که به دلیل عدم وجود مطالعه مشابه بر روی سلول‌های انسانی مذکور، این نتایج قابل مقایسه با نتایج دیگر نمی‌باشد.

البته در سال ۲۰۰۸، مطالعه نسبتاً مشابهی توسط یانگ هون جانگ و همکاران<sup>20</sup> وی بر روی سلول‌های مذکور موشی در *in vitro* و *in vivo* صورت پذیرفته است ولی در آن مطالعه جهت هم کشتی از پلیت‌های Transwell استفاده شده که در آن دو سلول HSC و MSC با هم تماس سلول - سلول نداشته و صرفاً فاکتورهای مترشحه از HSC‌ها یا

### References :

- 1- Taichman RS, Emerson SG. Human osteoblasts support hematopoiesis through the production of granulocyte colony-stimulating factor. *J Exp Med* 1994; 179(5): 1677-82.
- 2- Adams GB, Chabner KT, Alley IR, Olson DP, Szczepiorkowski ZM, Poznansky MC, et al. Stem cell engraftment at the endosteal niche is specified by the calcium-sensing receptor. *Nature* 2006; 439(7076): 599-603.
- 3- Arai F, Hirao A, Ohmura M, Sato H, Matsuoka S, Takubo K, et al. Tie2/angiopoietin-1 signaling regulates hematopoietic stem cell quiescence in the bone marrow niche. *Cell* 2004; 118(2): 149-61.
- 4- Calvi LM, Adams GB, Weibrech KW, Weber JM, Olson DP, Knight MC, et al. Osteoblastic cells regulate the haematopoietic stem cell niche. *Nature* 2003; 425(6960): 841-6.
- 5- Nilsson SK, Johnston HM, Whitty GA, Williams B, Webb RJ, Denhardt DT, et al. Osteopontin, a key component of the hematopoietic stem cell niche and regulator of primitive hematopoietic progenitor cells. *Blood* 2005; 106(4): 1232-9.
- 6- Beresford JN. Osteogenic stem cells and the stromal system of bone and marrow. *Clin Orthop Relat Res* 1989; 240: 270-80.
- 7- Dorheim MA, Sullivan M, Dandapani V, Wu X, Hudson J, Segarini PR, et al. Osteoblastic gene expression during adipogenesis in hematopoietic supporting murine bone marrow stromal cells. *J Cell Physiol* 1993; 154(2): 317-28.
- 8- Gordon MY, Clarke D, Atkinson J, Greaves MF. Hemopoietic progenitor cell binding to the stromal microenvironment *in vitro*. *Exp Hematol* 1990; 18(7): 837-42.
- 9- Quesenberry PJ. Stromal cells in long-term bone marrow cultures. In: Tavassoli M, editor. *Handbook of the Hematopoietic Microenvironment*. Clifton, NJ: Humana Press; 1989. p. 253-85.
- 10- Kaigler D, Krebsbach PH, West ER, Horger K, Huang YC, Mooney DJ. Endothelial cell modulation of bone marrow stromal cell osteogenic potential. *FASEB J* 2005; 19(6): 665-7.
- 11- Krebsbach PH, Kuznetsov SA, Satourna K, Emmons RV, Rowe DW, Robey PG. Bone formation *in vivo*: comparison of osteogenesis by transplanted mouse and human marrow stromal fibroblasts. *Transplantation* 1997; 63(8): 1059-69.
- 12- Taichman RS. Blood and bone: two tissues whose fates are intertwined to create the hematopoietic stem-cell niche. *Blood* 2005; 105(7): 2631-9.
- 13- Li Z, Li L. Understanding hematopoietic stem-cell microenvironments. *Trends Biochem Sci* 2006; 31(10): 589-95.
- 14- Wilson A, Trumpp A. Bone-marrow haematopoietic-stem-cell niches. *Nat Rev Immunol* 2006; 6(2): 93-106.
- 15- Haylock DN, Nilsson SK. Osteopontin: a bridge between bone and blood. *Br J Haematol* 2006; 134(5): 467-74.
- 16- Murrell W, Féron F, Wetzig A, Cameron N, Splatt K, Bellette B, et al. Multipotent stem cells from adult olfactory mucosa. *Dev Dyn* 2005; 223(2): 496-515.
- 17- Jung Y, Song J, Shiozawa Y, Wang J, Wang Z, Williams B, et al. Hematopoietic stem cells regulate mesenchymal stromal cell induction into osteoblasts thereby participating in the formation of the stem cell niche. *Stem Cells* 2008; 26(8): 2042-51.
- 18- Taichman RS, Reilly MJ, Emerson SG. Human osteoblasts support human progenitor cells *in vitro* bone marrow cultures. *Blood* 1996; 87(2): 518-24.
- 19- Meuleman N, Tondreau T, Delforge A, Massy M, Libertalis M, Bron D, et al. Human marrow mesenchymal stem cell culture: serum-free medium allows better expansion than classical alpha-MEM medium. *Eur J Haematol* 2006; 76(14): 309-16.
- 20- Lee NK, Sowa H, Hinoh E, Ferron M, Ahn JD, Confavreux C, et al. Endocrine regulation of energy metabolism by the skeleton. *Cell* 2007; 130(3): 456-69.
- 21- Wiesmann A, Bühring HJ, Mentrup C, Wiesmann HP. Decreased CD90 expression in human mesenchymal stem cells by applying mechanical stimulation. *Head Face Med* 2006; 2: 8.
- 22- Sekiya I, Larson BL, Smith JR, Pochampally R, Cui JG, Prockop DJ. Expansion of human adult stem cells from bone marrow stroma: conditions that maximize the yields of early progenitors and evaluate their quality. *Stem Cells* 2002; 20(6): 530-41.
- 23- 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.

**Original Article**

## **Effect of human hematopoietic stem cells on differentiation of mesenchymal stem cells to osteoblast cells**

**Fadaei R.<sup>1</sup>, Amirizadeh N.<sup>1</sup>, Nikougoftar M.<sup>1</sup>, Habibi Roudkenar M.<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Blood Transfusion Research Center, High Institute for Research and Education in Transfusion Medicine, Tehran, Iran

### **Abstract**

#### **Background and Objectives**

The correlation between hematopoietic stem cells (HSCs) and the cells comprising the niche especially osteoblast cells is critical for maintaining stem cell activities. Yet little evidence supports the concept that HSCs regulate development of the niche. If true, it may explain why many hematopoietic defects are accompanied by changes in the osseous architecture and provide new therapeutic targets for regulating bone formation.

#### **Materials and Methods**

In this experimental study, we cocultured bone marrow mesenchymal stem cells (MSCs) with umbilical cord blood HSCs in stem span media for 3 days. Then MSCs were differentiated to osteoblast cells by using osteogenesis kit. Evaluation of osteogenic differentiation of MSCs in different days came out to be: expression of osteopontin and osteocalcin (RT-PCR on days 4 and 6), expression of CD90 (flow cytometry on day 6), expression of alkaline phosphatase enzyme (alkaline phosphatase staining) and mineralization of MSCs (alizarin red staining on day 10).

#### **Results**

Our results showed early expression of osteopontin and osteocalcin in HSCs coculture with MSCs. These findings support the role of HSCs in induction of osteoblastic differentiation of MSCs. Decrease in the expression of CD90, higher activation in cell alkaline phosphatase enzyme, and mineralization confirmed the results.

#### **Conclusions**

In the field of human stem cells, our *ex vivo* findings demonstrated that HSCs can enhance differentiation of MSCs toward osteoblast cells thereby participating in formation of their niche.

**Key words:** Hematopoietic Stem Cells, Mesenchymal Stem Cell, Coculture, Osteogenesis, Osteoblasts

*Received: 2 Aug 2011*

*Accepted: 6 Feb 2012*

**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](mailto:n.amirizadeh@ibto.ir)