

اثر سلول های بنیادی خونساز انسانی بر تمایز سلول های بنیادی مزانشیمی به سلول های استئوبلاست

راضیه فدائی^۱، ناصر امیری زاده^۲، مهین نیکوگفتار ظریف^۳، مهریار حبیبی رودکنار^۴

چکیده

سابقه و هدف

ارتباط سلول های بنیادی خونساز (HSCs) با سلول های موجود در ریز محیط مغز استخوان (نیچ) به ویژه سلول های استئوبلاست، جهت حفظ فعالیت های آنها بسیار ضروری می باشد. البته مدارکی که به صورت مستقیم HSC ها را در توسعه نیچ دخیل کنند، اندک هستند ولی در صورت اثبات، روشن می شود که چرا نقص های 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 می آورند.

مواد و روش ها

در یک مطالعه تجربی، سلول های بنیادی مزانشیمال (MSC) مغز استخوان را در محیط Stem Span به مدت ۳ روز تحت همکشتی با HSC های خون بند ناف قرار دادیم. سپس MSC ها با استفاده از کیت استئوژنیز به استئوبلاست تمایز داده شدند و در روزهای مختلف تمایزی مورد ارزیابی قرار گرفتند که شامل بیان ژن های استئوپونین و استئوکلسین در روزهای ۴ و ۶ تمایزی (RT-PCR)، بیان مارکر CD90 (فلوسیتومتری)، بیان آنزیم آلکالین فسفاتاز (رنگ آمیزی آلکالین فسفاتاز) و مینرالیزه شدن (رنگ آمیزی آلیزارین رد) در روز دهم تمایزی بود.

یافته ها

نتایج، بیان زود هنگام ژن های استئوپونین و استئوکلسین را در همکشتی MSC با HSC نمایان ساخت. این یافته ها از نقش HSC ها در القای تمایز استئوبلاستی MSC ها حمایت می نمایند. هم چنین کاهش بیان CD90 و افزایش فعالیت آلکالین فسفاتاز و مینرالیزاسیون سلولی، این نتایج را تایید نمودند.

نتیجه گیری

نتایج این تحقیق در ارتباط با سلول های بنیادی انسانی در *ex vivo*، اثبات نمود که HSC ها قادرند سبب افزایش تمایز MSC ها به استئوبلاست شده و بدین وسیله در تشکیل نیچ خود سهم باشند.

کلمات کلیدی: سلول های بنیادی خونساز، سلول های بنیادی مزانشیمی، همکشتی، استخوان سازی، استئوبلاست ها

تاریخ دریافت: ۹۰/۵/۱۱

تاریخ پذیرش: ۹۰/۱۰/۱۷

۱- کارشناس ارشد هماتولوژی - مرکز تحقیقات انتقال خون - مؤسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون - تهران - ایران
۲- مؤلف مسئول: 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

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 مورفولوژیک و *in vitro* حاکی از آن است که نیچ‌های HSCها، از مشارکت تعدادی از سلول‌های استرومایی مغز استخوان (BMSCs) با عملکردهای مشابه و محدود، حاصل می‌گردد (۱۱-۱).

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 بقاء، 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 فعالیت‌هایشان را تنظیم می‌نماید (۱۴، ۱۳).

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-کاده‌رین، Jagged، مولکول‌های چسبندگی سلولی واسکولار 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

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

وجود هماهنگی میان هزاران سیگنال دایمی 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 منتهی 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).

آنالیز فلوسیتومتری:

سلول‌های تریپسینه شده در ۱ میلی‌لیتر محلول PBS (Phosphate Buffered Saline) سوسپانسیون شدند. ۵۰ میکرولیتر از سلول‌ها با ۵ میکرولیتر از آنتی‌بادی‌های CD166 و CD105 کنژوگه با فیکواریترین (PE) و آنتی‌بادی‌های CD90، CD34، CD45 و CD44 کنژوگه با فلورسئین ایزوتیوسیانات (FITC) و برای کنترل منفی با آنتی‌بادی‌های PE-IgG1 و FITC-IgG1 مخلوط 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 انتها به منظور فیکس شدن سلول‌ها، ۵۰ میکرولیتر پارافرمالدئید ۱٪ به لوله‌ها اضافه و با دستگاه فلوسیتومتری تجزیه و تحلیل شدند.

جداسازی سلول‌های CD34⁺ از خون بند ناف:

در این مطالعه پس از اخذ رضایت‌نامه از والدین، ۳ نمونه خون بند ناف با میانگین حجمی ۸۰ میلی‌لیتر بلافاصله 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 گلبول قرمز در خون بند ناف با استفاده از روش‌های مناسب (از جمله افزودن هیدروکسی اتیل استارچ) گلبول‌های 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 گرادینت شیب غلظت جداسازی گردیدند. جداسازی سلول‌های CD34⁺ مطابق دستورالعمل MACS (Magnetic Activated Cell Sorting) متعلق به شرکت میلتنی بیوتک صورت گرفت. برای انجام این کار از آنتی‌بادی‌های نشان دار شده با ذرات microbead بر علیه آنتی ژن CD34 استفاده شد و پس از آغشته 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 vivo* و *in vitro* صورت پذیرفته است، در این مطالعه بر آن شدیم 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 منبع 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)، کیت آلكالین فسفاتاز و کیت آلیزارین رد از شرکت سیگما، کیت ساخت cDNA از شرکت بیونیر، کیت استئوژنیز از شرکت کمیکون، کیت PCR از شرکت تاکارا بیوتکنولوژی دالیان و کیت جداسازی سلول‌های CD34⁺ از شرکت بیوتک خریداری شد. تریپسین، سرم حیوانی (FBS) از شرکت اینوبیروژن، 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 گرادینت غلظت جدا شدند و در فلاسک کشت ۲۵ cm² حاوی ۶ میلی‌لیتر محیط کشت DMEM، FBS ۱۰٪ 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 ۸۰٪ کف فلاسک را پوشانند. در این زمان، سلول‌ها پاساژ داده شد و به فلاسک‌های جدید منتقل گردیدند.

بزرگتر ستون متناسب با تعداد سلول) عبور داده شده و به روش Positive selection این سلول ها از سایر سلول های تک هسته ای جدا شدند و مورد شمارش سلولی و آزمایش حیات پذیری (Viability) قرار گرفتند.

ارزیابی درجه خلوص سلول های $CD34^+$:

در این مرحله جهت تعیین خلوص سلول های $CD34^+$ به روش فلوسیتومتری، ابتدا ۵۰ میکرولیتر از سوسپانسیون سلولی (حاوی 10^6 سلول در هر میلی لیتر) با ۵ میکرولیتر از آنتی بادی منوکلونال $CD34^+$ کوئزوگه با FITC (فلورسئین ایزوتیوسیانات) و برای کنترل منفی با آنتی بادی FITC-IgG1 مخلوط شدند و به مدت ۲۰ تا ۳۰ دقیقه در ۴ درجه سانتی گراد و تاریکی انکوبه شدند. در مرحله بعد سلول ها با ۲٪ PBS-BSA شستشو داده شدند و در ۵۰۰ میلی لیتر PBS سوسپانسیون شدند و در انتها به منظور فیکس شدن سلول ها، ۵۰ میکرولیتر پارافرمالدئید ۱٪ به لوله ها اضافه و با دستگاه فلوسیتومتری تجزیه و تحلیل شدند.

کشت هم زمان سلول های 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 سلول های MSC در هر ۲ گروه از یک اهداکننده و از یک پاساژ سلولی برداشت شده اند و تمام مراحل کار ۳ بار تکرار شده است. این دستورالعمل شامل ۳ بخش هم کشتی MSCها با سلول های HSC، تمایز سلول های MSC و ارزیابی های مورد نظر می باشد. ابتدا $10^4 \times 5$ سلول MSC در محیط DMEM حاوی ۱۰ درصد سرم حیوانی در چاهک های پلیت ۲۴ خانه ای که با کلاژن و ویتروکتکین پوشیده شده بودند، کشت داده شد. بعد از این که سلول ها به هم پوشانی ۸۰٪ تا ۹۰٪ رسیدند، محیط DMEM از چاهک ها خارج و پس از شستشوی چاهک ها با PBS، تعداد $10^4 \times 5$ از سلول های $CD34^+$ تازه جدا شده به همراه ۱ میلی لیتر محیط Stem Span حاوی SCF ۱۰ ng/mL

و ۵٪ سرم به هر چاهک افزوده گردید (گروه آزمایش). پس از ۳ روز هم کشتی، سلول های $CD34^+$ را از چاهک ها خارج کرده و جهت تعدیل شرایط MSCها برای ورود به فاز تمایزی، محیط DMEM با غلظت کم گلوکز حاوی ۱۰٪ FBS جایگزین شد. پس از ۲۴ ساعت، محیط ها را از تمام چاهک ها کاملاً خارج کرده و به همه چاهک ها، ۱ میلی لیتر محیط تمایزی سلول های مزانشیمی شامل DMEM حاوی دگزامتازون ۱ میلی مولار، اسید اسکوریک دو فسفات ۰/۱ مولار، گلیسرول دو فسفات ۱ مولار و ۱۰٪ سرم افزوده گردید. در ادامه هر دو روز یک بار محیط های داخل چاهک ها 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 الکتروفورز روی ژل جهت بررسی بیان ژن های استئوپونتین و استئوکلسین انجام شد. استئوپونتین I (multidomain، acid-rich Phosphorylated glycoprotein) توسط سلول های مختلفی در بدن تولید می گردد ولی تولید عمده آن در نیچ اندوستیل توسط استئوبلاست می باشد. OPN (استئوپونتین) یک مولکول خارج سلولی و غیر هماتوپوئیک است و به صورت یک تنظیم کننده منفی بالقوه برای HSC به واسطه کاهش در آپوپتوز این سلول ها عمل می کند، بدین ترتیب به عنوان یک جزء کلیدی نیچ سلول های HSC مطرح است. استئوکلسین که BGLAP (bone gamma- carboxyglutamate acid containing protein) نیز نامیده می شود، پروتئینی غیرکلاژنی بوده، به صورت انحصاری توسط استئوبلاست ترشح می شود و در تنظیم متابولیک بدن، مینرالیزاسیون استخوانی و هموستاز یون کلسیم نقش داشته و ذاتاً یک ماهیت پرواستئوبلاستیک یا استخوان سازی دارد. مارکر مهم دیگر در بررسی استئوژنیز CD90 می باشد، این مارکر به میزان بالایی در سطح MSCها بیان شده و میزان بیان آن در طی تمایز استئوبلاستی و در سلول استئوبلاست کاهش می یابد. در روز ۶ تمایز برای بررسی میزان کاهش بیان این مارکر، بر روی سلول های هر دو گروه آزمایش و کنترل فلوسیتومتری مارکر CD90 انجام شد. در روز ۱۰ تمایز نیز جهت بررسی بیان آنزیم آلکالین فسفاتاز (بیان این آنزیم غشایی در

جدول ۱: آغازگرهای ژن‌های بتا‌کتین، استئوپونین 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

جداسازی 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 چسبیده ظاهر شدند. تعدادی سلول هماتوپوئیتیک 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 و CD44 در سلول‌های جدا شده از مغز استخوان به ترتیب $8/7 \pm 96/8$ ، $12/1 \pm 98/8$ ، $9/5 \pm 93$ و $10/2 \pm 99/5$ می‌باشد. در حالی که مارکرهای ویژه سلول‌های هماتوپوئیتیک از جمله CD45 و CD34 در این سلول‌ها بیان قابل توجهی ($0/3 \pm 3/8$ ، $0/4 \pm 2/8$) را نشان ندادند (شکل ۱).

جداسازی سلول‌های CD34⁺:

میانگین درصد خلوص سلول‌های CD34⁺ جدا شده با

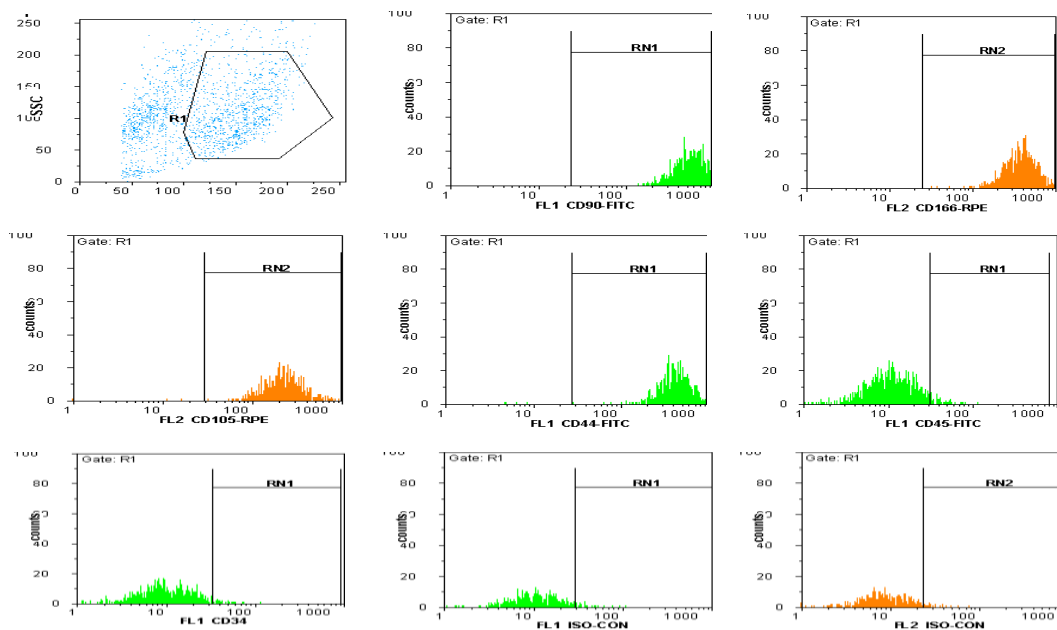
حین تمایز MSC به استئوبلاست، ۴۷ Fold افزایش می‌یابد و به عنوان اولین نشانه این تمایز به روش آنزیماتیک و رنگ‌آمیزی اختصاصی قابل ارزیابی می‌باشد)، رنگ‌آمیزی ALP و جهت بررسی مینرالیزاسیون سلولی و میزان رسوب کلسیم فسفات در MSCها، رنگ‌آمیزی آلیزارین رد بر روی سلول‌های هر دو گروه مذکور صورت گرفت.

جدول ۲: برنامه زمانی و دماهای لازم دستورالعمل کیت Takara جهت انجام PCR

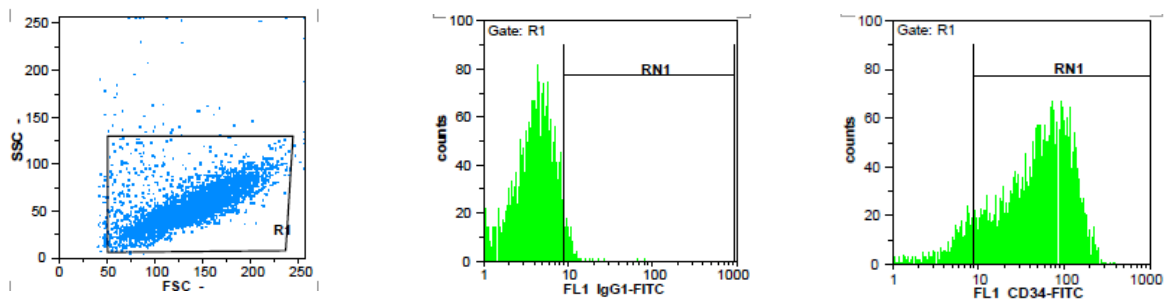
دنا تورا سیون مقدماتی	۹۵ °C	۵ دقیقه
دنا تورا سیون	۹۴ °C	۱ دقیقه
آنیلینگ	۵۸ °C	۴۵ ثانیه
اکستنشن	۷۲ °C	۴۵ ثانیه
اکستنشن نهایی	۷۲ °C	۵ دقیقه

آنالیز RT-PCR:

سلول‌ها از نظر بیان ژن استئوپونین و استئوکلسین مورد بررسی قرار گرفتند. برای این منظور RNA سلول‌های هر دو گروه آزمایش و کنترل جداسازی شد. سپس cDNA در واکنش رونویسی معکوس با استفاده از کیت ساخت cDNA تهیه شد. در ادامه واکنش PCR انجام شد (جدول 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 سلول های مزانشیمی مغز استخوان. ردیف اول از چپ: جمعیت سلول های بزرگ تک هسته ای، واکنش سلول ها با آنتی CD90 و آنتی CD166. ردیف دوم از چپ: واکنش سلول ها با آنتی CD105، آنتی CD44 و آنتی CD45. ردیف سوم از چپ واکنش سلول ها با آنتی CD34 و ایزوتیپ کنترل.



شکل ۲: خصوصیات ایمونوفنوتیپی سلول های CD34⁺ جدا شده با روش MACS. از چپ: شکل اول: جمعیت سلول های بزرگ تک هسته ای. شکل دوم: واکنش سلول ها با آنتی بادی ایزوتیپ. شکل سوم: واکنش سلول ها با آنتی CD34 (RN1=84.27% , R1=97.9% of total cells).

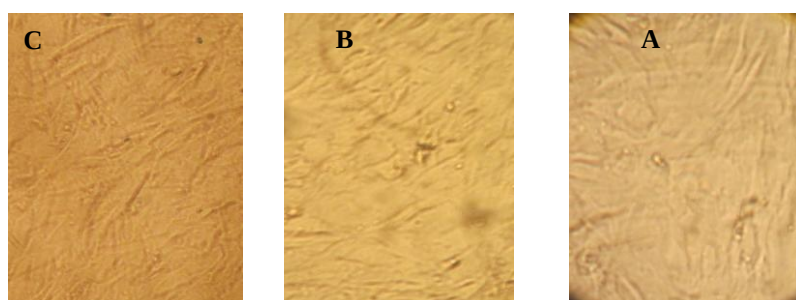
آزمایش و کنترل، عوامل تمایز دهنده (دگزامتازون، اسید اسکوربیک، گلیسرول فسفات) افزوده شد (شکل های ۳ و ۴).

با توجه به این که در طی تمایز محتویات کلسیم در سلول ها افزایش می یابند، از رنگ آمیزی اختصاصی آلیزارین رد رسوبات کلسیم (به رنگ قرمز) در سلول های تمایز یافته در هر دو گروه آزمایش و کنترل بهره جسته شد. هم چنین در سلول های استئوبلاست، فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز افزایش یافته و شاخصی برای تمایز سلول ها

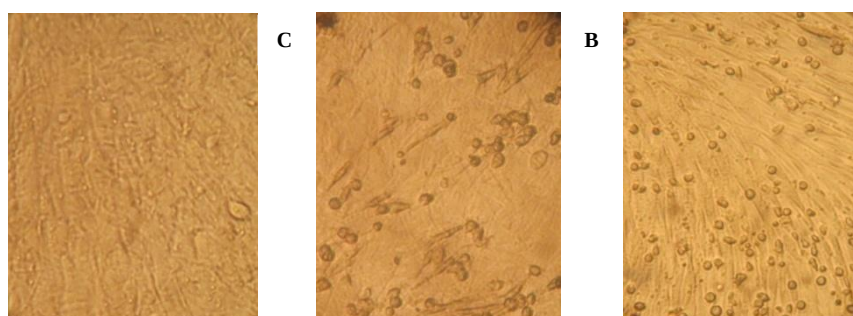
استفاده از روش فلوسیتومتری $5/6 \pm 84/27$ درصد و میانگین درصد زنده ماندن سلول های جدا شده حدود 2 ± 89 درصد بود (شکل ۲).

ارزیابی توانایی تمایز سلول های مزانشیمی به استئوبلاست در دو گروه آزمایش و کنترل:

رنگ آمیزی آلکالین فسفاتاز و آلیزارین رد: به منظور تمایز سلول های مزانشیمی به سلول های استئوبلاست، به محیط کشت پایه سلول های هر دو گروه



شکل ۳: سلول‌های مزانشیمی تمایز داده شده به سمت استئوبلاست بدون هم کشتی با HSC (گروه کنترل) در (A) روز چهارم تمایزی. (B) روز ششم تمایزی. (C) روز دهم تمایزی (بزرگ نمایی ۴۰x).



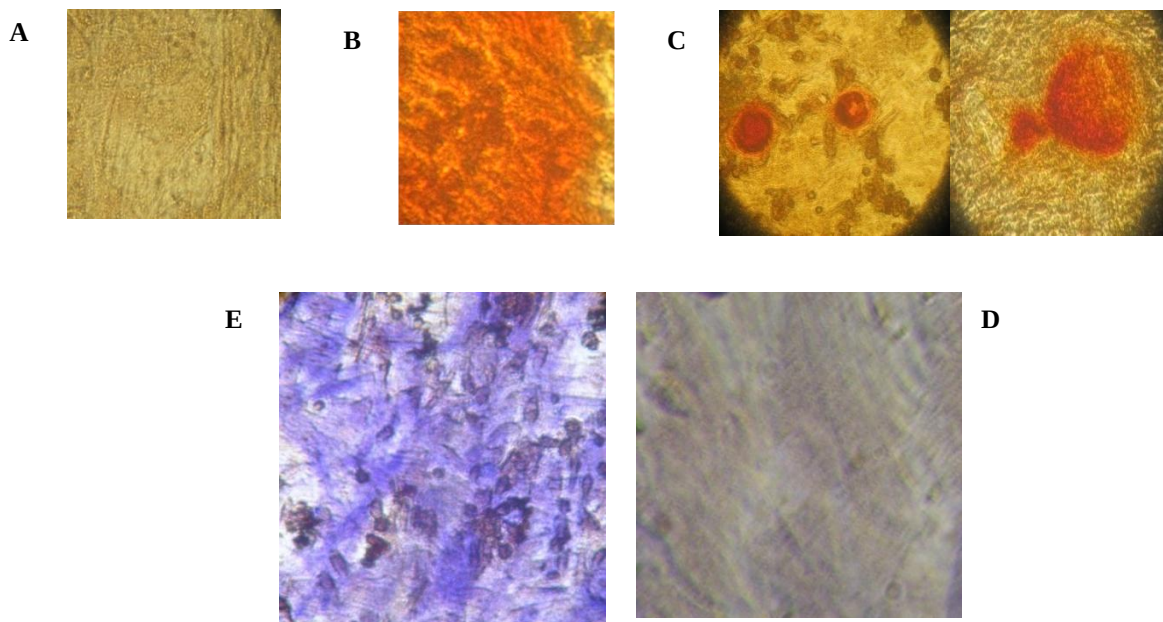
شکل ۴: سلول‌های مزانشیمی تمایز داده شده به سمت استئوبلاست که قبلاً با HSCها هم کشتی داشته‌اند (گروه آزمایش). (A) روز چهارم تمایز. (B) روز ششم تمایز. (C) روز دهم تمایز (بزرگ نمایی ۴۰x).

سلول‌های بنیادی مزانشیمی به استئوبلاست 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 استئوبلاست تمایز می‌یابند. استئوبلاست‌ها دارای نقش در خود نوسازی HSCها بوده لذا تأثیرات 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 استئوبلاستیک می‌باشد. در تمایز سلول‌های MSC به استئوبلاست 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 MSCها به استئوبلاست‌ها، 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 استئوبلاست 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 ۴۰x)، رنگ‌آمیزی آلکالین فسفاتاز در سلول‌های مزانشیمی تمایز داده شده به سمت استئوبلاست در روز دهم تمایزی در گروه کنترل منفی (D) و در گروه آزمایش مثبت بود (E) (بزرگ‌نمایی ۴۰x).

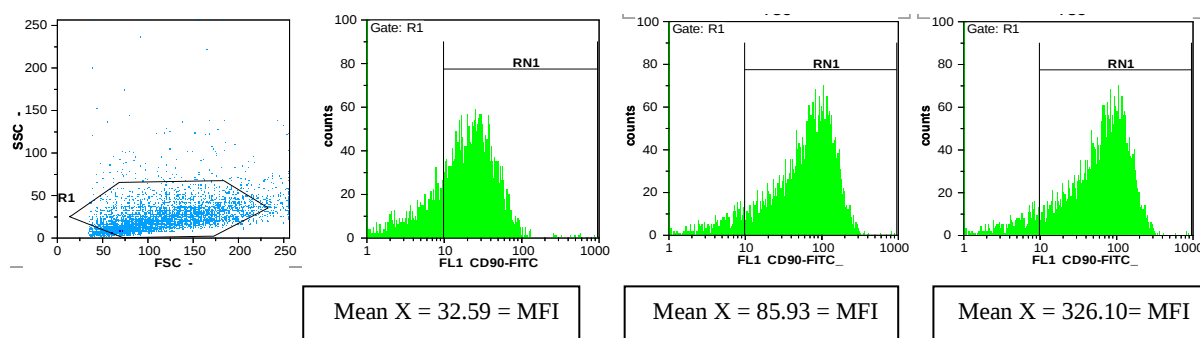
پروتئین را نشان می‌دهند، میانگین شدت رنگ فلورسنت، بیانگر میانگین میزان بیان مارکر CD90 در سلول‌های تحت بررسی می‌باشد.

به همین دلیل میانگین فلورسنت بازتابی سلول‌ها (میزان مارکرهای هدف که به آنتی‌بادی مونوکلونال متصل شده‌اند) به عنوان میزان بیان 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).

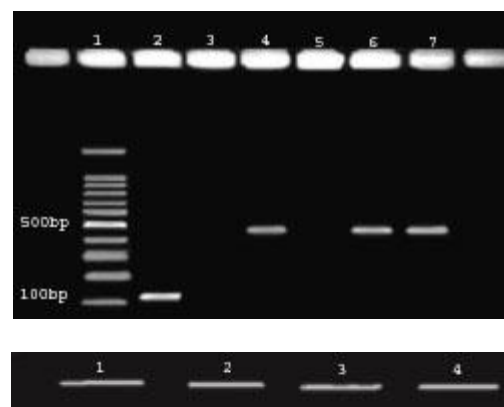
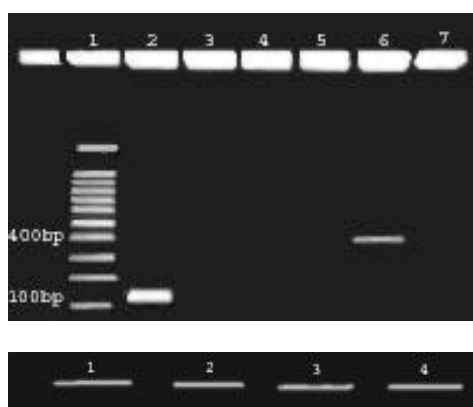
بررسی بیان ژن استئوپوننتین و استئوکلسین:

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

انجام فلوسیتومتری 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 فلوسیتومتری 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 فلوسیتومتری 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: پراکندگی 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 ۸: شکل بالا: بیان ژن‌های استئوکلسین (OCN) و بتا اکتین (β -actin) در سلول‌های مزانشیمی تمایز یافته به استئوبلاست. (۱) نشانگر شاخص وزن مولکولی (DNA Size Marker 100bp) است. (۲) بیان ژن بتا اکتین (۳) کنترل منفی (۴) بیان OCN در روز ۴ تمایز سلول‌های مزانشیمی آزمایش (۵) بیان OCN در روز ۴ تمایز سلول‌های مزانشیمی کنترل (۶) بیان OCN در روز ۶ تمایز سلول‌های مزانشیمی آزمایش (۷) بیان OCN در روز ۶ تمایز سلول‌های مزانشیمی کنترل را نشان می‌دهد.

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

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

شکل پایین: شکل سمت چپ بیان ژن بتا اکتین به ترتیب در سلول‌های (۱) روز ۴ تمایز گروه آزمایش، (۲) روز ۴ تمایز گروه کنترل، (۳) روز ۶ تمایز گروه آزمایش و (۴) روز ۶ تمایز 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 تمایز گردند و به عبارتی بیان این دو

روز سوم شروع و در روز هفتم تمایز به حداکثر 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

ژن در سلول های تمایز یافته زودتر تحقق یابد. نتایج حاصله این مدعا را اثبات نمودند و در سلول های تمایز یافته گروه آزمایش، بیان ژن استئوپونتین در روز چهارم تمایز کاهش و در روز ششم تمایز عدم بیان این ژن مشاهده گردید (شکل ۷). بیان ژن استئوکلسین نیز در این سلول ها از روز ششم تمایز شروع شد در حالی که در سلول های گروه کنترل، بیان این ژن مشاهده نگردید (شکل ۸). این نتایج همگی تایید می نمایند که سلول های HSC باعث افزایش سرعت تمایز سلول های بنیادی مزانشیمی به استئوبلاست می شوند.

بحث

در مطالعه های انجام شده توسط محققین متعددی از جمله تایچمن و همکاران وی در سال ۱۹۹۷، ارتباط تنگاتنگی میان سلول های بنیادی خونساز و سلول های استئوبلاست مشاهده گردید که به موجب آن، HSC ها بیان فعالیت های حمایتی خونسازی را از طریق سلول های استئوبلاست القا می نمایند، لذا این فرضیه مطرح می شود که ارتباط متقابل میان این دو سلول، جهت توسعه و نمو هر دو جمعیت سلولی، امری ضروری می باشد (۱۸). در این مطالعه نشان داده شد که در فرآیند تمایز سلول های بنیادی مزانشیمی، سلول هایی که پیش از تمایز تحت هم کشتی با سلول های بنیادی خونساز $CD34^+$ قرار گرفته اند نسبت به آن هایی که بدون هم کشتی با سلول های مذکور تمایز داده شده اند، زودتر وارد فاز تمایزی به سمت استئوبلاست می گردند و این امر با بررسی بیان دو ژن استئوپونتین و استئوکلسین در روزهای مختلف تمایز، رنگ آمیزی سیتوشیمیایی آلکالین فسفاتاز و آلیزارین رد و نیز بررسی بیان مارکر $CD90$ در این سلول ها، تحقق پذیرفت. با استناد به نتایج حاصله اثبات گردید که سلول های HSC انسانی $CD34^+$ جدا شده از خون بند ناف قادرند سبب افزایش تمایز سلول های MSC انسانی به دست آمده از مغز استخوان به سلول های استئوبلاست شوند و به عبارت دیگر می توانند نیچ خود را تنظیم نموده و سبب گسترش نیچ استئوبلاستیک گردند. جهت بررسی توانایی تمایز MSC ها به رده استئوبلاستی، این سلول ها در

محیط تمایزی استئوزنیک شامل DMEM-LG، FBS، L-آسکوربات، β -گلیسرول فسفات و دگزامتازون کشت داده شدند. نظر به این که میزان بیان ALP و نیز رسوبات کلسیم در طی فرآیند تمایز استئوبلاستی در این سلول ها افزایش می یابد، از رنگ آمیزی سیتوشیمی ALP و آلیزارین رد به عنوان شاخص تمایز استئوبلاستیک استفاده گردید. نتایج به دست آمده با نتایج مطالعه های صورت گرفته توسط محققینی از جمله مولمن و همکاران وی در سال ۲۰۰۶ مطابقت داشت (۱۹). بررسی شاخص های دیگر تمایز استئوبلاستیک شامل استئوپونتین و استئوکلسین نیز به روش مولکولی (RT-PCR) انجام شد که نتایج حاصله در گروه کنترل مطابق با نتایج هایلاک و همکاران وی در سال ۲۰۰۳ و نیز E پوچاز و همکارانش در سال ۲۰۰۷ می باشد (۲۰، ۱۵). مشاهده گردید که بیان ژن OPN در روز ۷ تمایز به حداکثر رسیده و سپس به تدریج کاهش می یابد. بیان ژن OCN نیز وابسته به زمان بوده و از روز ۷ تمایز افزایش می یابد. در این مطالعه مشاهده شد که در سلول های گروه آزمایش، بیان ژن OPN در روز ۴ تمایز بالاتر از بیان ژن OPN در سلول های گروه کنترل بوده و بیان آن در روز ۶ تمایزی در گروه آزمایش، با روش RT-PCR قابل ردیابی نمی باشد در حالی که در گروه کنترل هم چنان بیان ژن مذکور در روز ۶ تمایز قابل مشاهده می باشد. بیان OCN نیز از روز ۶ تمایز قابل ردیابی است. به دلیل این که تاکنون مطالعه مشابهی بر روی HSC و MSC های انسانی صورت نگرفته است لذا نتایج فوق قابل مقایسه با نتایج مطالعه های دیگر نمی باشد. هم چنین در این مطالعه جهت مقایسه روند تمایز بین دو گروه آزمایش و کنترل، 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 MSC ها، با نتایج مطالعه صورت گرفته توسط وایسمن و همکاران وی در سال ۲۰۰۶ مطابقت دارد. البته در مطالعه مذکور از روش ایمونوفلورسانس جهت بررسی بیان $CD90$ استفاده گردیده است (۲۱). هم چنین مشخص گردید کاهش بیان این مارکر در سلول های گروه آزمایش، به میزان قابل توجهی بیشتر از سلول های

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

نتایج به دست آمده از مطالعه دیگریولامو و همکاران وی در سال ۱۹۹۹ و نیز سکيا و همکارانش در سال ۲۰۰۲ همگی نشان می‌دهند که با افزایش سن اهدا کننده، خاصیت تمایز استئوبلاستی 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 (۲۲، ۲۳). در این مطالعه، با توجه به این که هدف از هم کشتی HSC 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 بی‌تاثیری آن بر تمایز MSCها بررسی گردید) + ۵٪ FBS 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 کشتی سلول‌ها، حتی با وجود شستشوی صورت گرفته، هم چنان تعدادی از HSCها به MSCهای در حال تمایز متصل باقی ماندند و نه تنها حذف نشدند بلکه در محیط تمایزی، تکثیر نیز یافتند. مشاهده گردید که این مناطق در رنگ‌آمیزی آلزارین 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 برهمکنش‌های 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 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

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 کشتی مذکور می‌باشد و عنوان گردیده است که احتمالاً افزایش بیان BMP2 و BMP6 تولید شده توسط HSCها، مسئول تمایز MSC به استئوبلاست بوده و نقشی برای اتصال سلول - سلول در این امر مطرح نشده است (۱۷). 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 BMP2 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 استئوبلاست گردند و به عبارتی گسترش نیچ استئوبلاستیک را صورت دهند. اما جزئیات، برهمکنش‌ها 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 استئوپوئیتین 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 آلکالین فسفاتاز و مینرالیزاسیون 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. بدین وسیله از کلیه همکاران مرکز تحقیقات سازمان انتقال خون ایران که در انجام این پایان‌نامه ما را یاری نمودند تشکر و قدردانی می‌نمایم.

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, Matsuo 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, Weibrecht 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, Satourma 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, Hinoi 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.¹, Amirizadeh N.¹, Nikougoftar M.¹, Habibi Roudkenar M.¹

¹Blood 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\