ORIGINAL ARTICLE

Evaluation of surface markers and related genes of the human umbilical cord derived Wharton's jelly mesenchymal stem cells

Homa Mohseni Kouchesfehani[1],
Farnoosh Saraee[2,3],
Masoud Maleki[4],
Mahin Nikougoftar[5],
Seyedeh Mahsa Khatami[3],
Mohsen Sagha[6]

[1] PhD, Associate Professor, Department of Animal Sciences, School of Life Sciences, University of Kharazmi, Tehran, Iran
[2] MSc, Department of Animal Sciences, School of Life Sciences, University of Kharazmi, Tehran, Iran
[3] MSc, Assistant Professor, Research Laboratory for Embryology and Stem Cells, Department of Anatomical Sciences and Pathology, School of Medicine, Ardabil University of Medical Sciences, Ardabil, Iran
[4] PhD, Assistant Professor, Department of Biology, East Azerbaijan Sciences and Research Branch, Islamic Azad University, Tabriz, Iran
[5] MSc, Cord Blood Bank, Blood Transfusion Research Center, High Institute for Research and Education in Transfusion Medicine, Tehran, Iran
[6] PhD, Assistant Professor, Research Laboratory for Embryology and Stem Cells, Department of Anatomical Sciences and Pathology, School of Medicine, Ardabil University of Medical Sciences, Ardabil, Iran

(Received January 5, 2014; Accepted April 30, 2014)

Abstract

Background and purpose: Umbilical cord derived Wharton's jelly is an enriched and accessible source of stem cells with highly proliferative and differentiation potential. This study aimed to evaluate the surface markers and related genes of the stem cells isolated from the human Wharton's jelly.

Materials and methods: Explants of the human umbilical cord derived Wharton's jelly was dissected and cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with 20% Fetal bovine serum (FBS). Then, those cells migrated from explant's boundary were replated and passaged in DMEM containing 10% FBS. Finally, by using flowcytometry and (Reverse–transcriptase polymerase chain reaction) RT-PCR techniques different surface markers and related genes were analyzed.

Results: 5-7 days post-plating, the stem cells initiated the migration from cultured explants and showed up to 80% densities on days 16-18. Light microscopy demonstrated two distinct cell populations including fibroblast-like and flat endothelial-like cells. Dual staining with flowcytometry also revealed that the cultured cells were found to be positive for CD44, CD73, CD90, CD105 and negative for CD34 and CD45. RT-PCR showed no changes in CD marker expression pattern during different passages.

Conclusion: Human Wharton's jelly derived stem cells appear mesenchymal cell morphology and express related surface markers but no hematopoietic stem cell markers.

Keywords: Wharton's jelly-derived stem cell, explant culture, CD markers

J Mazand Univ Med Sci 2014; 24(112): 24-32 (Persian).

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-03]

پژوهشی

مجله دانشگاه علوم پزشکی مازندران
دوره بیست و چهارم شماره ۱۱۲ اردیبهشت سال ۱۳۹۳ (۳۲-۲۴)

ارزیابی نشانگرهای سطحی و ژن‌های وابسته به آن‌ها در سلول‌های بنیادی مزانشیمی ژله وارتون بند ناف انسانی

هما محسنی کوچصفهانی[۱]
فرنوش سرایی[۲]
مسعود ملکی[۳]
مهین نیکوگفتار[۴]
سیده مهسا خاتمی[۵]
محسن سقا[۶]

چکیده

سابقه و هدف: ژله وارتون بند ناف منبع غنی و در دسترسی از سلول‌های بنیادی است که قدرت تکثیر و تمایز بالایی دارد. هدف از تحقیق حاضر، ارزیابی نشانگرهای سطحی و ژن‌های وابسته به آن‌ها در سلول‌های بنیادی مزانشیمی ژله وارتون بود.

مواد و روش‌ها: قطعاتی از ژله وارتون بند ناف انسانی تشریح و در محیط DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) حاوی سرم جنین گاوی (Fetal bovine serum یا FBS) ۲۰ درصد کشت داده شد. سپس آن دسته از سلول‌های بنیادی مهاجرت کرده از کناره‌های این قطعات دوباره در محیط DMEM حاوی FBS ۱۰ درصد کشت و پاساژ داده شدند. در نهایت، نشانگرهای سطحی و ژن‌های وابسته به آن‌ها در سلول‌های بنیادی مزانشیمی ژله وارتون به روش فلوسایتومتری و نیز RT-PCR (Reverse-transcriptase polymerase chain reaction) مورد بررسی قرار گرفت.

یافته‌ها: ۷-۵ روز بعد از کشت، سلول‌های بنیادی شروع به مهاجرت از قطعه بافتی کشت داده شده کردند و پس از ۱۸-۱۶ روز به تراکم سلولی ۸۰ درصد رسیدند. مشاهدات میکروسکوپی سلول‌های بنیادی در کشت اولیه دو جمعیت متفاوت، سلول‌های شبه فیبروبلاستی و شبه اندوتلیالی پهن را نشان داد. تحلیل فلوسایتومتری به روش رنگ‌آمیزی دوگانه بیان نشانگرهای سطحی CD۴۴، CD۷۳، CD۹۰ و CD۱۰۵ و عدم بیان CD۳۴ و CD۴۵ را در این سلول‌ها به تصویر کشید. یافته‌های RT-PCR نیز نشان داد که بیان این نشانگرها در پاساژهای مختلف تغییری نکرد.

استنتاج: سلول‌های بنیادی ژله وارتون از مورفولوژی سلول‌های مزانشیمی برخوردار هستند و نشانگرهای سطحی مربوط به آن‌ها را بیان می‌کنند. هم‌زمان، نشانگرهای سطحی سلول‌های بنیادی خون‌ساز در آن‌ها بیان نمی‌شود.

واژه‌های کلیدی: سلول‌های بنیادی ژله وارتون، کشت قطعه‌ای، نشانگرهای سطحی

مقدمه

سلول‌های بنیادی سلول‌های تمایز نیافته‌ای هستند که ویژگی‌های منحصر به فردی از جمله توانایی خودنوزایی (Self-renewal) و تمایز به انواع مختلف رده‌های سلولی بدن را دارند. از دیگر مشخصات سلول‌های بنیادی انعطاف‌پذیری (Plasticity) بالای آن‌ها است؛ به طوری که یک سلول

مولف مسئول: محسن سقا – اردبیل: خیابان دانشگاه، دانشگاه علوم پزشکی اردبیل، دانشکده پزشکی، گروه علوم تشریحی و پاتولوژی E-mail: m.sagha@arums.ac.ir

۱. دانشیار، گروه علوم جانوری، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه خوارزمی، تهران، ایران
۲. کارشناسی ارشد، گروه علوم جانوری، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه خوارزمی، تهران و آزمایشگاه تحقیقاتی جنین‌شناسی و سلول‌های بنیادی، گروه علوم تشریحی و پاتولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اردبیل، اردبیل، ایران
۳. استادیار، گروه زیست‌شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات تبریز، تبریز، ایران
۴. استادیار، بانک خون بند ناف، مرکز تحقیقات انتقال خون، مؤسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون، تهران، ایران
۵. کارشناسی ارشد، آزمایشگاه تحقیقاتی جنین‌شناسی و سلول‌های بنیادی، گروه علوم تشریحی و پاتولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اردبیل، اردبیل، ایران
۶. استادیار، آزمایشگاه تحقیقاتی جنین‌شناسی و سلول‌های بنیادی، گروه علوم تشریحی و پاتولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اردبیل، اردبیل، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۱۰/۱۵ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات: ۱۳۹۳/۲/۶ تاریخ تصویب: ۱۳۹۳/۲/۱۰

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-03]

بنیادی قادر است پروفایل بیان ژنی و فنوتیپ عملکردی متفاوتی از منشأ اولیه خود به نمایش بگذارد. از این رو، به عنوان یک منبع سلولی مناسب جهت درمان بسیاری از بیماری‌ها به شمار می‌روند که طی سال‌های اخیر توجه بسیاری از محققین را به خود معطوف کرده‌اند (۳-۱).

سلول‌های بنیادی بر اساس منشأ استخراج آن‌ها در سه دسته قرار می‌گیرند که شامل سلول‌های بنیادی رویانی (Embryonic stem cells)، سلول‌های بنیادی جنینی (Fetal stem cells) و سلول‌های بنیادی بزرگسال می‌باشند (۶-۴). سلول‌های بنیادی مزانشیمی با منشأ مزودرمی از بخش استرومایی بافت‌های جنینی مانند قسمت‌های خاصی از جفت و بند ناف و یا از بافت‌های بزرگسال نظیر بافت چربی، خون محیطی، مغز استخوان و غیره استخراج می‌گردند (۷، ۴). این سلول‌ها در بافت بند ناف از بخش‌های مختلفی از جمله عروق خونی (۹، ۸)، غشای آمنیوتیک (۱۰) و ژله وارتون (۱۱، ۷) به دست می‌آیند.

ژله وارتون بافتی سرشار از سلول‌هایی با مورفولوژی مزانشیمی است و نخستین جداسازی و کشت سلول‌های شبه فیبروبلاستی از ژله وارتون انسانی توسط مک الریوری گزارش شد (۱۲). Mitchell و همکاران نیز ژله وارتون را به عنوان منبعی از سلول‌های بدوی که توانایی تمایز به سایر رده‌های سلولی از جمله سلول‌های عصبی را دارند، معرفی کردند (۱۳). از آن زمان تاکنون، از این سلول‌ها در مطالعات بالینی مختلفی استفاده و توانایی تمایز این سلول به سلول‌های عصبی، سلول‌های ترشح کننده انسولین پانکراسی، سلول‌های شبه کبدی و بافت‌های قلبی- عروقی نشان شده است. همچنین مشخص شده است که سلول‌های بنیادی ژله وارتون در مهار رشد سرطان پستان، تخمدان و استئوسارکوم نیز نقش دارند (۱۶-۱۴).

ماهیت سلول‌های رده‌های مختلف به بیان مجموعه پیچیده‌ای از پروتئین‌های سطح سلولی به نام نشانگرهای سطحی بستگی دارد که سرنوشت تکوینی این سلول‌ها را تعیین می‌کنند. الگوی بیان این نشانگرها در سلول‌های مختلف متفاوت است (۱۷)؛ به طوری که اولین مشخصه مولکولی سلول‌های بنیادی مزانشیمی در شرایط کشت بیان نشانگرهای سطحی CD۴۴، CD۷۳، CD۹۰ و CD۱۰۵ به همراه عدم بیان نشانگرهای CD۳۴ و CD۴۵ می‌باشد (۱۸، ۱۱).

اغلب این نشانگرهای سطحی به عنوان گیرنده یا لیگاند در مسیرهای پیام رسانی مختلف عمل می‌کنند و یا نقش‌های مهم دیگری نظیر برقراری اتصالات سلولی دارند. به عنوان مثال، آنتی‌ژن CD۴۴ که گیرنده ماتریکس خارج سلولی ۳ نیز نامیده می‌شود، با فیبرونکتین و کلاژن در ارتباط است و به اتصال سلول به سلول و سلول به ماتریکس کمک می‌کند؛ از این رو، نقش مهمی در چسبیدن و مهاجرت سلولی دارد. نشانگر سطحی CD۷۳ نیز نوعی اکتو-´۵- نوکلئوتیداز است که در مهاجرت سلول‌های بنیادی مزانشیمی و نیز تطبیق این سلول‌ها در مقابل سیستم ایمنی نقش دارد.

آنتی‌ژن CD۹۰ نوعی گلیکوپروتئین سطح سلولی است که با حضور در بخش استرومایی بافت‌هایی همچون بند ناف اتصال سلول به سلول را باعث می‌شود. از طرفی، نشانگر CD۱۰۵ از اعضای خانواده مسیر پیام‌رسانی TGF-β (Transforming growth factor- β) است که به عنوان یکی از اصلی‌ترین مولکول‌های این مسیر طی تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی عمل می‌کند. حضور توأم آنتی‌ژن‌های پیش‌گفته در سطح سلول‌های بنیادی برای اتصال آن‌ها به کف ظروف کشت، تکثیر و تمایز آن‌ها لازم است. نشانگرهای CD۳۴ نیز نوعی آنتی‌ژن‌های سطح سلولی بیان شونده در سلول‌های بنیادی خون‌ساز است که در چسبندگی سلول به سلول و سلول به ماتریکس نقش دارد. آنتی‌ژن CD۴۵ نیز به عنوان نوعی گلیکوپروتئین سطح سلولی که آنتی‌ژن مشترک لکوسیتی (LCA یا Leukocyte common antigen) هم نامیده می‌شود، در تنظیم رشد و تمایز سلولی نقش دارد (۱۹).

در مطالعات گذشته جداسازی سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از ژله وارتون با استفاده از روش‌های کشت قطعه‌ای (Explant culture) و هضم آنزیمی و نیز ویژگی‌های مورفولوژیکی این سلول‌ها نشان داده شده است (۲۱، ۲۰)؛ اما

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-03]

بررسی الگوی بیان نشانگرهای سطحی این سلول‌ها در سطح پروتئین و نیز ارزیابی تغییرات بیان ژنی این نشانگرها طی پاساژهای مختلف سلولی در شرایط کشت آزمایشگاهی صورت نگرفت و یا در صورت انجام، تنها به مطالعه تعداد معدودی از ژن‌ها و نیز نشانگرهای سطح سلولی با تکنیک فلوسایتومتری آن هم به روش تک رنگ (Monostaining) بسنده شده است که نمی‌تواند ارزیابی مولکولی جامعی در این زمینه باشد.

از آن‌جایی که علاوه بر بررسی مورفولوژی سلول‌های کشت داده شده، ارایه شواهد مولکولی مانند بیان نشانگرهای سطحی سلول‌ها نیز یکی از معیارهای بسیار مهم در کشت سلول‌های بنیادی محسوب می‌گردد و تأییدی بر ماهیت مزانشیمی و بنیادی سلول‌های مشتق شده از ژله وارتون انسانی در محیط آزمایشگاهی است، این مطالعه با هدف استخراج سلول‌های بنیادی مزانشیمی ژله وارتون به روش کشت قطعه‌ای و به دنبال آن، بررسی تعدادی از مهم‌ترین نشانگرهای سطحی این سلول‌ها و نیز برخی از ژن‌های مربوط به آن‌ها با استفاده از تکنیک‌های فلوسایتومتری به صورت رنگ‌آمیزی دوگانه (Dual staining) و RT-PCR (Reverse-transcriptase- polymerase chain reaction) انجام شد.

مواد و روش‌ها

جداسازی و کشت سلول‌های بنیادی از ژله بند ناف

پس از کسب رضایت مادران باردار، بند ناف نوزادان سالم پس از انجام عمل سزارین جمع‌آوری شد و تحت شرایط استریل در داخل نرمال سالین قرار داده شد و بلافاصله به کمک فلاسک حاوی یخ به آزمایشگاه منتقل گردید. جداسازی سلول‌های بند ناف انسانی به روش کشت قطعه‌ای بافت و طی ۶ ساعت اول بعد از زایمان صورت گرفت. در این روش جهت ضد عفونی، ابتدا بند ناف به مدت ۳۰ ثانیه در معرض الکل ۷۰ درصد قرار گرفت و به دنبال آن، دو بار با PBS^- (Phosphate buffered saline) شستشو داده شد.

بعد از جداسازی غشای آمنیونی و عروق خونی، قطعات کوچکی به حجم تقریبی ۵ میلی‌متر مکعب از ناحیه ژله وارتون برش داده شدند که پس از شستشو با PBS^- به محیط کشت DMEM low glucose (E۱۵-۸۹۱؛ PAA) حاوی ۲۰ درصد سرم جنینی گاو (FBS یا Fetal bovine serum) (A۱۱-۱۰۱؛ PAA) و ۱ درصد پنی سیلین/ استرپتومایسین (P۱۱-۰۱۰؛ PAA) در فلاسک‌های کشت سلولی T۲۵ انتقال داده شدند. کشت اولیه این قطعات بافتی در داخل انکوباتور دارای CO_2 در شرایط دمایی ۳۷ درجه سانتی‌گراد و ۵ درصد CO_2 صورت گرفت و محیط کشت فلاسک‌ها هر سه روز یک بار تعویض گردید.

۱۸-۱۶ روز بعد، به دنبال خروج تعداد بسیار زیادی از سلول‌ها از اطراف بافت‌های کشت داده شده اولیه، این قطعات بافتی خارج گردید و جهت جداسازی سلول‌ها از کف فلاسک و نیز کشت مجدد آن‌ها، این سلول‌ها به مدت ۵-۷ دقیقه تحت تأثیر Trypsin/ EDTA (PAA ؛L۱۱-۰۰۳) (Trypsin/ Ethylenediaminetetraacetic acid) ۰/۰۵ درصد قرار گرفتند. سلول‌های جدا شده بار دیگر در فلاسک‌های T۲۵ کشت داده شدند تا توزیع یکنواختی از آن‌ها به دست آید. این مرحله به عنوان پاساژ صفر در نظر گرفته شد.

سپس، به ازای هر ۷-۵ روز کشت پس از این که تراکم سلولی به ۸۰-۷۵ درصد رسید، سلول‌ها در محیط کشت DMEM low glucose حاوی ۱۰ درصد سرم جنینی گاو و ۱ درصد پنی‌سیلین/ استرپتومایسین پاساژ داده شدند.

Immunophenotyping سلول‌های بنیادی مزانشیمی ژله وارتون انسانی با فلوسایتومتری

بیان نشانگرهای سطحی CD۱۰۵، CD۹۰، CD۷۳، CD۴۵، CD۴۴ و CD۳۴ در سلول‌های بنیادی مزانشیمی ژله وارتون به روش فلوسایتومتری مورد بررسی قرار گرفت. سلول‌های بنیادی پاساژ دوم پس از دوبار شستشو با PBS^- با استفاده از Trypsin/EDTA ۰/۰۵ درصد از کف فلاسک

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-03]

جـدا گردیدنـد و در نهایـت تـک سـلولی شـدند. ابتـدا ۵۰ میکرولیتـر از ایـن سـلول‌هـا بـا ۵ میکرولیتـر از آنتی‌بـادی‌هـای ایزوتایـــپ کنتـــرل شـــامل (Clone :MOPC-۳۱C؛ BD Pharmingen) IgG۱-FITC و (Clone :MOPC-۳۱C؛ BD Pharmingen) IgG۱-PE و همچنـین آنتـی‌بـادی‌هـای CD۳۴-PE (BD Pharmingen؛ Clone :۵۶۳)، CD۴۴-FITC (BD Pharmingen؛ Clone :G۴۴-۲۶)، CD۴۵-FITC (BD Pharmingen؛ Clone :۲D۱)، CD۷۳-PE (BD Pharmingen؛ Clone :AD۲)، CD۹۰-FITC (BD Pharmingen؛ Clone :۵E۱۰) و CD۱۰۵-FITC (BD Pharmingen؛ Clone :۲۶۶) بـــه مدت سی دقیقه در ۴ درجه سانتی‌گراد مجاور شـدند. پـس از واکـنش، ۵۰ میکرولیتـر از محلـول پارافرمالدئیـد ۴ درصـد بـه سوسپانسیون سلولی اضافه شد، سـپس سـلول‌هـا بـا بـافر PBS^- شستشـو داده شـدند و در نهایـت، نمونـه‌هـا بـا دسـتگاه فلوسایتومتری Partec PAS III و با استفاده از نرم‌افزار ۲/۴e Flomax مورد آنالیز قرار گرفتند.

نسخه‌برداری معکوس واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (RT-PCR)

استخراج RNA کل سلول با استفاده از محلـول ترایـزول (T۹۴۲۴؛ Sigma) طبق دستورالعمل شرکت سازنده صورت گرفت. غلظـت RNA اسـتخراج شـده بـا دسـتگاه نـانودراپ تعیین گردیـد و یـک میکروگـرم از RNA کـل جهـت سـنتز cDNA (Complementary DNA) بـــا کیـــت ReverseAid^{TM} first strand cDNA (۱۶۲۲؛ synthesis fermentase) در حجـم نهـایی ۲۰ میکرولیتـر مورد اسـتفاده قـرار گرفـت. تـوالی پرایمرهـا و طـول قطعـات تکثیر یافته در جدول شماره ۱ آمده است. محصـولات PCR بـر روی ژل‌هـای آگـار ۱/۲ درصـد حـاوی اتیـدیوم بروماید (۰/۵ µg/ml) الکتروفورز شدند و باند ایجاد شده بـه کمـک نور UV (Ultraviolet) بـه کمـک دسـتگاه Uvidoc; UK مشاهده شد. کلیـه پرایمرهـای مربـوط، از شـرکت Bioneer کره جنوبی خریداری شد.

جمع‌آوری نمونه‌های مورد مطالعه و کشت قطعه‌ای آن‌ها و نیز انجام RT-PCR برای ژن‌هـای مـورد نظـر، حـداقل در سـه تکرار مستقل از هم صورت گرفت.

یافته‌ها

ویژگی‌های مورفولوژیکی

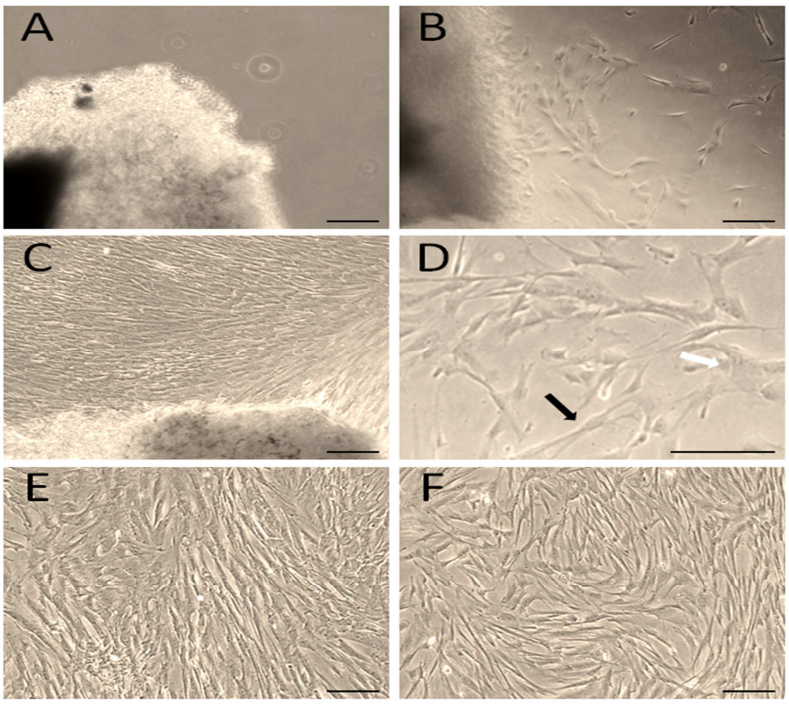
به دنبال جداسازی قطعـات بـافتی بنـد نـاف و کشـت اولیـه آن‌هـا در فلاســک (تصــویر شــماره ۱A) بعــد از ۹-۷ روز، سـلول‌هـای بنیـادی مزانشـیمی انسـانی شـروع بـه جـدا شـدن از اطراف این قطعات نمودند و به کف فلاسک چسبیدند (تصویر شـماره ۱B). پـس از گذشـت ۱۸-۱۶ روز، تعـداد زیـادی از سلول‌های بنیـادی از قطعـه بـافتی اولیـه کشـت داده شـده جـدا شـدند و کـف فلاسـک را پوشـاندند (تصـویر شـماره ۱C). در پایان روز ۱۸-۱۶ پس از برداشتن قطعـه بـافتی و کشـت مجـدد سلول‌های چسبیده بـه فلاسـک، دو نـوع سـلول بـا مورفولـوژی مشـخص در آن‌هـا مشـاهده گردیـد؛ دسـته‌ای بـه صـورت سلول‌های کوچک مسطح بـا مورفولـوژی شـبیه بـه سـلول‌هـای انـدوتلیالی بودنـد و گـروه دوم، ظـاهر دوک ماننـد شـبیه بـه سلول‌های فیبروبلاستی داشتند (تصویر شماره ۱D).

جدول شماره ۱: توالی پرایمرهای مورد استفاده، طول محصول، دمای اتصال و تعداد چرخه پرایمرها

Gene	Primer Sequence (5´toward 3´)	Size (bp)	Annealing Temperature (ºC)	Cycle
GAPDH	Forward: CATCACCATCTTCCAGGAGC Reverse: CCTGCTTCACCACCTTCTTG	۵۷۵	۵۴	۳۰
CD۳۴	Forward: CAGCTGTGCGGAGTTTAAGA Reverse: CCGTTTTCCGTGTAATAAGG	۴۱۱	۵۰	۳۰
CD۹۰	Forward: CATTCTCAGCCACAACCAAA Reverse: CCTTTGTAGCCCTCTCCACT	۲۴۴	۵۱	۳۰
CD۱۰۵	Forward: GCCAGCATTGTCTCACTTCA Reverse: TGGAAAGAGAGGCTGTCCAT	۳۹۵	۵۱	۳۰

Bp = Base pair

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-03]



تصویر شماره ۱: کشت اولیه و پاساژ سلول‌های بنیادی مشتق از ژله وارتون بند ناف (A: کشت قطعه بافتی اولیه ژله وارتون و (B: جدا شدن و مهاجرت اولیه این سلول‌ها پس از ۷-۹ روز کشت (C: تکثیر و گسترش سلول‌های بنیادی در روزهای ۱۸-۱۶ و (D: کشت مجدد این سلول‌ها پس از حذف قطعه بافتی اولیه در روزهای ۱۸-۱۶. کادر سلولی بالا و راست این تصویر سلول‌هایی با مورفولوژی شبه اندوتلیالی (علامت پیکان سفید) و شبه فیبروبلاستی (علامت پیکان تیره) را نشان می‌دهد (E: تکثیر و گسترش سلول‌های بنیادی در انتهای پاساژ صفر (۷-۵ روز پس از کشت مجدد سلول‌ها) و (F: تراکم بیشتر سلول‌هایی با مورفولوژی شبه فیبروبلاستی در پاساژ دوم (Scale bar = ۲۰۰ µm).

به دنبال تکثیر و گسترش سلول‌ها در انتهای پاساژ صفر (تصویر شماره 1E) و پاساژ مجدد آن‌ها از میزان جمعیت سلول‌های با مورفولوژی اندوتلیالی کاسته شد و در عوض، سلول‌هایی که مورفولوژی شبه فیبروبلاستی داشتند، باقی ماندند و تکثیر یافتند (تصویر شماره 1F).

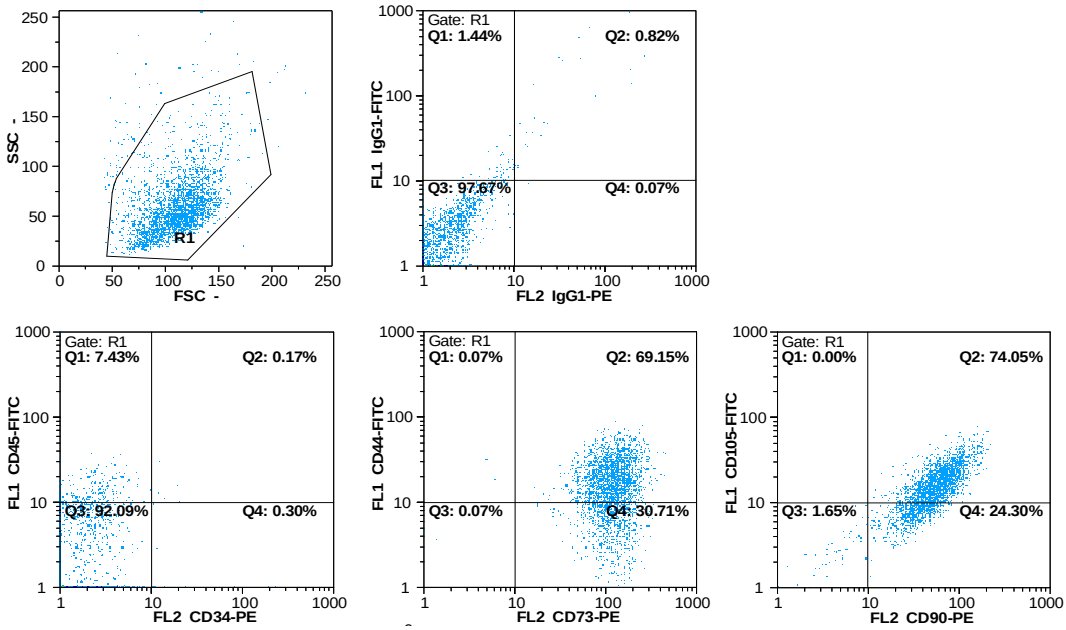
آنالیز فلوسایتومتری

از تکنیک فلوسایتومتری به صورت رنگ‌آمیزی دوگانه برای تعیین خصوصیت نشانگرهای سطحی سلول‌های بنیادی مزانشیمی ژله وارتون بند ناف در پاساژ دوم استفاده شد (تصویر شماره ۲). همان‌طور که جدول شماره ۲ نشان می‌دهد؛ ۶۹/۱۵ درصد سلول‌های بنیادی نشانگرهای CD۴۴/CD۷۳ را به صورت توأم بیان کردند. همچنین این بررسی‌ها نشان داد که بیان توأم نشانگرهای CD۹۰ و CD۱۰۵ در این سلول‌ها ۷۴/۰۵ درصد بود. با این حال، کمتر از ۰/۵ درصد این سلول‌ها توانستند بیان توأمی از CD۳۴ و CD۴۵ داشته باشند.

آنالیز RT-PCR

آنالیز بیان ژن‌های مربوط به نشانگرهای سطحی سلول‌های بنیادی مزانشیمی ژله وارتون یعنی CD۱۰۵ و CD۹۰ و نیز نشانگر سطحی مربوط به سلول‌های بنیادی خون‌ساز (CD۳۴) به روش RT-PCR نشان داد که در سلول‌های استخراج شده، ژن‌های نشانگر سلول‌های بنیادی مزانشیمی از جمله CD۹۰ و CD۱۰۵ در پاساژ صفر و به دنبال آن در پاساژهای دو و چهار بیان خوبی داشتند، در حالی که ژن نشانگر سلول‌های بنیادی خون‌ساز، CD۳۴ در هیچ کدام از پاساژهای سلولی بیان نشد (تصویر شماره ۳).

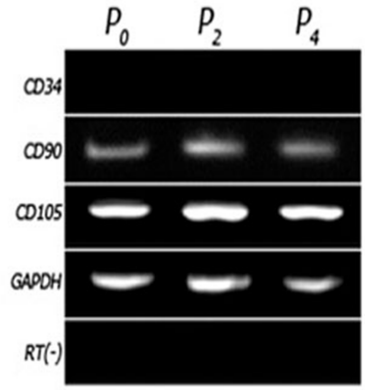
[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-03]



تصویر شماره ۲: درصد بیان نشانگرهای سطحی CD۱۰۵، CD۹۰، CD۷۳، CD٤٥، CD٤٤ و CD۳٤ سلول‌های بنیادی مزانشیمی ژله وارتون بند ناف انسانی. R۱، منطقه Gating سلول‌های بنیادی را بر مبنای پراکنش سلول‌ها از نظر اندازه سلولی (FSC یا Forward scatter) و نیز میزان کمپلکسیتی (SSC یا Side scatter) آن‌ها نشان می‌دهد. IgG۱–FITC و IgG۱–PE آنتی‌بادی‌های ایزوتایپ کنترل کونژوگه شده به ترتیب با FITC و PE می‌باشند. Q۱ و Q٤ درصد بیان هر یک از نشانگرهای سطحی را به تنهایی و Q۲ درصد بیان توأم این نشانگرها را نشان می‌دهند. Q۳ نشان دهنده درصد عدم بیان نشانگرها در سلول‌های بنیادی است.

جدول شماره ۲: درصد بیان انواع نشانگرهای سطحی سلول‌های بنیادی مزانشیمی ژله وارتون بند ناف انسانی به صورت منفرد و توأم

نوع نشانگر سطحی	سلول‌های بیان کننده (درصد)
$CD۴۴^{+}$	۶۹/۲۲
$CD۷۳^{+}$	۹۹/۸۶
$CD۴۴^{+}/CD۷۳^{+}$	۶۹/۱۵
$CD۹۰^{+}$	۹۸/۳۵
$CD۱۰۵^{+}$	۷۴/۰۵
$CD۱۰۵^{+}/CD۹۰^{+}$	۷۴/۰۵
$CD۳۴^{+}$	۰/۴۷
$CD۴۵^{+}$	۷/۶۰
$CD۴۵^{+}/CD۳۴^{+}$	۰/۱۷



تصویر شماره ۳: بیان ژن‌های مربوط به نشانگرهای سطحی سلول‌های بنیادی مزانشیمی ژله وارتون CD۱۰۵ و CD۹۰ و عدم بیان ژن نشانگر سطحی سلول‌های بنیادی خون‌ساز، CD۳٤ در پاساژهای صفر (P۰)، دو (P۲) و چهار (P٤). GAPDH (Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase) ژن خانگی می‌باشد.

بحث

در زمینه بررسی مورفولوژیکی، روش‌های جداسازی، ویژگی‌های فنوتیپی و قدرت تمایزی سلول‌های بنیادی مزانشیمی از ژله وارتون مطالعات زیادی صورت گرفته است (۷). در تحقیق حاضر، پس از جداسازی این سلول‌ها از بافت ماتریکس بند ناف به روش کشت قطعه‌ای، نشانگرهای سطحی و ژن‌های وابسته به آن‌ها مورد بررسی قرار گرفتند تا هویت بنیادی و مزانشیمی سلول‌های بنیادی مزانشیمی ژله وارتون در شرایط آزمایشگاهی به اثبات برسد.

مطالعات نشان دادند که در مقایسه با روش استخراج

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-03]

آنزیمی هر چند مدت زمان خروج سلول‌های بنیادی از کشت اولیه بافتی در روش کشت قطعه‌ای بیشتر است، اما میزان آسیب سلولی کم است و سلول‌ها توان حیات بیشتری دارند و حتی از سرعت تکثیر و فعالیت زیستی بالایی نیز برخوردارند (۲۲، ۸، ۳).

نتایج تحقیق حاضر نیز حاکی از آن بود که با استفاده از روش کشت قطعه‌ای، طی ۷-۵ روز اول، سلول‌ها از قطعات بافتی جدا شدند و پس از مهاجرت به کف فلاسک چسبیدند؛ به طوری که در روز هجدهم در اطراف هر قطعه بافتی، تراکم سلولی فراوانی ایجاد شد که این سلول‌ها پس از جداسازی نیز از قدرت تکثیر بالایی برخوردار بودند و ظرف مدت ۷-۵ روز به تراکم سلولی ۸۰-۷۵ درصد برای پاساژ دادن رسیدند.

مطالعات حاکی از وجود دو نوع مورفولوژی سلولی متفاوت در سلول‌های بنیادی بند ناف در مراحل اولیه چسبیدن به کف ظروف کشت است که شامل یک جمعیت از سلول‌های کوچک مسطح با مورفولوژی شبه اندوتلیالی و نیز جمعیتی از سلول‌های شبه فیبروبلاستی دوک مانند می‌باشند. این سلول‌ها بیان متفاوتی از ژن‌های مربوط به رشته‌های بینابینی را نشان می‌دهند (۲۴، ۲۳). در مطالعه حاضر نیز در کشت‌های اولیه، دو نوع مورفولوژی پیش‌گفته از سلول‌های بنیادی مشاهده شد. به دنبال افزایش تعداد پاساژ، جمعیت غالب سلولی از نوع سلول‌هایی با مورفولوژی شبه فیبروبلاستی بود. شاید این امر به دلیل استفاده از محیط حداقلی برای رشد سلول‌های بنیادی مزانشیمی بند ناف و فقدان عوامل رشد سلول‌های اندوتلیالی در محیط کشت باشد (۲۴، ۲۳).

سلول‌های رده‌های مختلف مجموعه پیچیده‌ای از گلیکوپروتئین‌های غشایی را بیان می‌کنند که از آن‌ها می‌توان در جهت شناسایی و تعیین هویت سلولی استفاده نمود. این نشانگرهای سطحی در ایجاد تعاملات بین سلول‌ها و نیز اتصال سلول‌ها به ماتریکس خارج سلولی و حتی در تعیین سرنوشت تکوینی سلول‌ها نقش دارند. برای نمونه، خصوصیت مولکولی سلول‌های بنیادی مزانشیمی به واسطه حضور نشانگرهای سطحی CD۴۴، CD۹۰، CD۱۰۵ و نیز عدم بیان نشانگرهای CD۳۴ و CD۴۵ صورت می‌گیرد (۲۱، ۱۷، ۱۶، ۷).

کشت سلول‌های بنیادی مزانشیمی ژله وارتون در شرایط آزمایشگاهی، می‌تواند مدل سلولی مناسبی در جهت کشف بیولوژی عملکردی و رفتار تمایزی این سلول‌ها در بدن و نیز بهره‌وری مناسب از آن‌ها برای مقاصد درمانی باشد؛ از این رو، علاوه بر مطالعات مورفولوژیکی بررسی الگوی بیانی نشانگرهای سطحی سلول‌های بنیادی مزانشیمی و ژن‌های وابسته به آن‌ها در این سلول‌ها ضروری است. مطالعات انجام شده توسط محققین نشان می‌دهد که سلول‌های بنیادی استخراج شده از ژله وارتون همانند سایر سلول‌های بنیادی مزانشیمی، بیان شدیدی از نشانگرهای سطحی CD۴۴، CD۹۰ و CD۱۰۵ را عرضه می‌کنند؛ در حالی که نشانگرهای سطحی سلول‌های خون‌ساز CD۳۴ و CD۴۵ در این سلول‌ها بیان نمی‌شوند (۷، ۳).

نتایج حاصل از مطالعات حاضر که با روش‌های فلوسایتومتری و RT-PCR صورت گرفت نیز با گزارش‌های ارایه شده مطابقت دارد. نتایج فلوسایتومتری تحقیق حاضر نشان داد که بیش از ۹۸ درصد سلول‌های بنیادی مزانشیمی ژله وارتون نشانگرهای سطحی CD۷۳ و CD۹۰ و حدود ۷۰ درصد سلول‌ها نشانگرهای سطحی CD۴۴ و CD۱۰۵ را بیان کردند. در مقابل، میزان بیان نشانگرهای CD۳۴ و CD۴۵ در سلول‌های بنیادی جداسازی شده کمتر از ۸ درصد بود.

نتایج به دست آمده در تحقیق حاضر با مطالعه صالحی‌نژاد و همکاران همخوانی داشت. آن‌ها نیز بیان نشانگرهای سطحی CD۴۴، CD۷۳، CD۹۰ و CD۱۰۵ را در سلول‌های بنیادی مزانشیمی ژله وارتون به ترتیب ۹۳/۰، ۷۴/۵، ۵۵/۸ و ۸۳/۰ درصد گزارش کردند؛ در حالی که میزان بیان CD۳۴ و CD۴۵ به ترتیب ۵/۴ و ۱۰/۴ درصد بود (۳).

محققین مختلفی از جمله Ishige و همکاران (۸)، Fong و همکاران (۲۵) و Quintiliano (۲۶)، سلول‌های بنیادی ژله وارتون انسانی را از نظر بیان نشانگرهای سطحی مختلفی بررسی کرده بودند. یافته‌های آن‌ها نیز تأیید می‌کند که این سلول‌ها $CD13^+$، $CD29^+$، $CD44^+$، $CD73^+$، $CD90^+$، $CD105^+$، $CD31^-$، $CD34^-$ و $CD45^-$ هستند (۸، ۲۵، ۲۶).

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-03]

درصد حضور کم نشانگرهای CD۳۴ و CD۴۵ در کشت سلول‌های بنیادی ژله وارتون باعث اطمینان از عدم آلودگی آن‌ها با سلول‌های خون‌ساز می‌باشد؛ چرا که این آنتی‌ژن‌ها با حضور در سطح سلول‌های بنیادی خون‌ساز در چسبندگی این سلول‌ها نقش دارند و به عنوان تنظیم کننده رشد و تمایز سلولی عمل می‌کنند (۱۹). مطالعات نشان می‌دهد که با افزایش پاساژ و تعویض مداوم محیط کشت، همین مقدار کم سلول‌های CD۳۴ و CD۴۵ مثبت نیز کاهش می‌یابد (۲۷).

نتایج RT-PCR مطالعه حاضر نیز نشان داد که در سلول های بنیادی مزانشیمی ژله وارتون نشانگرهای CD۹۰ و CD۱۰۵ توانستند در طی پاساژهای مختلف با شدت مشابهی بیان شوند؛ در حالی که هیچ گونه بیانی از نشانگر سطحی سلول‌های خون‌ساز (CD۳۴) حتی در پاساژهای پایین‌تر مانند پاساژ سلولی صفر و دو مشاهده نشد. این عدم تغییر بیان نشانگرها در پاساژهای مختلف، می‌تواند گویای این واقعیت باشد که سلول‌های بنیادی مزانشیمی ژله وارتون با افزایش تعداد پاساژ وارد مرحله تمایز نمی‌شوند و همچنان حالت بنیادی خود را حفظ می‌کنند.

در مجموع، می‌توان اذعان داشت که ژله وارتون بند ناف یک منبع غنی و در دسترس از سلول‌های بنیادی است که با استفاده از تکنیک کم هزینه کشت قطعه‌ای ژله وارتون به دست می‌آیند. ارزیابی مولکولی سلول‌های بنیادی مزانشیمی ژله وارتون نشان می‌دهد که این سلول‌ها قادر به بیان شدیدی از نشانگرهای سطحی CD۴۴، CD۷۳، CD۹۰ و CD۱۰۵ در شرایط کشت آزمایشگاهی هستند و در عین حال، بیان نشانگرهای سلول‌های بنیادی خون‌سازCD۳۴ و CD۴۵ در درصد بسیار کمی از آن‌ها مشاهده می‌شود.

سپاسگزاری

نویسندگان مقاله مراتب تشکر و قدردانی خود را از بیمارستان آرتای اردبیل و همکاری صمیمانه آقای دکتر کمال‌الدین حمیدی، پزشکان و پرسنل محترم اتاق عمل این بیمارستان که در جمع‌آوری بند ناف نوزادان ما را یاری نمودند و نیز مساعدت‌های آقای مهدی عدالتی فتح‌آبادی اعلام می‌دارند.

References

1. Fortier LA. Stem cells: classifications, controversies, and clinical applications. Vet Surg 2005; 34(5): 415-23.
2. Bongso A, Richards M. History and perspective of stem cell research. Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol 2004; 18(6): 827-42.
3. Salehinejad P, Alitheen NB, Ali AM, Omar AR, Mohit M, Janzamin E, et al. Comparison of different methods for the isolation of mesenchymal stem cells from human umbilical cord Wharton's jelly. In Vitro Cell Dev Biol Anim 2012; 48(2): 75-83.
4. Li L, Xie T. Stem cell niche: structure and function. Annu Rev Cell Dev Biol 2005; 21: 605-31.
5. Martin GR. Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. Proc Natl Acad Sci U S A 1981; 78(12): 7634-8.
6. O'Donoghue K, Fisk NM. Fetal stem cells. Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol 2004; 18(6): 853-75.
7. Weiss ML, Troyer DL. Stem cells in the umbilical cord. Stem Cell Rev 2006; 2(2): 155-62.
8. Ishige I, Nagamura-Inoue T, Honda MJ, Harnprasopwat R, Kido M, Sugimoto M, et al. Comparison of mesenchymal stem cells derived from arterial, venous, and Wharton's jelly explants of human umbilical cord. Int J Hematol 2009; 90(2): 261-9.
9. Qiao C, Xu W, Zhu W, Hu J, Qian H, Yin Q, et al. Human mesenchymal stem cells isolated from the umbilical cord. Cell Biol Int 2008; 32(1): 8-15.
10. Jeschke MG, Gauglitz GG, Phan TT, Herndon DN, Kita K. Umbilical Cord Lining Membrane and Wharton's Jelly-Derived Mesenchymal Stem Cells: the Similarities and Differences. Open Tissue Engineering & Regenerative Medicine Journal 2011; 4: 21-7.
11. Karahuseyinoglu S, Cinar O, Kilic E, Kara F, Akay GG, Demiralp DO, et al. Biology of stem cells in human umbilical cord stroma: in situ and in vitro surveys. Stem Cells 2007; 25(2): 319-31.
12. La Rocca G, Anzalone R, Corrao S, Magno F, Loria T, Lo IM, et al. Isolation and characterization of Oct-4+/HLA-G+ mesenchymal stem cells from human umbilical cord matrix: differentiation potential and detection of new markers. Histochem Cell Biol 2009; 131(2): 267-82.
13. Mitchell KE, Weiss ML, Mitchell BM, Artin P,

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-03]

Davis D, Morales L, et al. Matrix cells from Wharton's jelly form neurons and glia. Stem Cells 2003; 21(1): 50-60.
14. Yoon HH, Jung BY, Seo YK, Song KY, Park JK. In vitro hepatic differentiation of umbilical cord-derived mesenchymal stem cell. Process Biochemistry 2010; 45(12): 1857-64.
15. Semenov OV, Breymann C. Mesenchymal Stem Cells Derived from Wharton's Jelly and their Potential for Cardio-Vascular Tissue Engineering. The Open Tissue Engineering and Regenerative Medicine Journal, 2011; 4: 64-71.
16. Taghizadeh RR, Cetrulo KJ, Cetrulo CL. Wharton's Jelly stem cells: future clinical applications. Placenta 2011; 32(Suppl 4): S311-S315.
17. Zola H, Swart B, Banham A, Barry S, Beare A, Bensussan A, et al. CD molecules 2006--human cell differentiation molecules. J Immunol Methods 2007; 319(1-2): 1-5.
18. 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.
19. Boxall SA, Jones E. Markers for Characterization of Bone Marrow Multipotential Stromal Cells. Stem Cells International 2012; 2012: 1-12.
20. Zahri S, Maleki M, Hamidi K, Khatami SM. Isolation and Characterization of Human Umbilical Cord Wharton's jelly Stem Cells. J Ardabil Univ Med Sci 2013; 13(47): 35-43. (Persian).
21. Ebrahimi Vosta Kalaee S, Shirmohamadi M, Bakhtiari M. Administration of Human Umbilical Cord Wharton's Jelly-Derived Mesenchymal Stem Cells on Rat Sciatic Nerve Regeneration. J Babol Univ Med Sci 2013; 15(2): 69-78. (Persian).
22. Walker KE. Effects of isolation methods on proliferation and GD2 expression by porcine umbilical cords stem cells [Thesis]. Manhattan, KS: Kansas State University; 2011.
23. Kestendjieva S, Kyurkchiev D, Tsvetkova G, Mehandjiev T, Dimitrov A, Nikolov A, et al. Characterization of mesenchymal stem cells isolated from the human umbilical cord. Cell Biol Int 2008; 32(7): 724-32.
24. Marzban M, Bakhtiary M, Mehdizadeh M, Taghi Joghataei M, Khoei S, Pirhajati Mahabadi V, et al. Intravenous injection of human umbilical cord matrix stem cell (Wharton Jelly Stem Cell) provides functional recovery in a rat model of traumatic brain injury. Cell J Yakhteh 2010; 12(1): 87-96. (Persian).
25. Fong CY, Richards M, Manasi N, Biswas A, Bongso A. Comparative growth behaviour and characterization of stem cells from human Wharton's jelly. Reprod Biomed Online 2007; 15(6): 708-18.
26. Quintiliano K. Comparing two human umbilical cord mesenchymal stem cell isolation protocols [Thesis]. Porto Alegre, Brazil: Federal University of Rio Grande do Sul; 2010.
27. Chamberlain G, Fox J, Ashton B, Middleton J. Concise review: mesenchymal stem cells: their phenotype, differentiation capacity, immunological features, and potential for homing. Stem Cells 2007; 25(11): 2739-49.

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-03]