

ORIGINAL ARTICLE

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

Homa Mohseni Kouchesfehani¹,
Farnoosh Saraei^{2,3},
Masoud Maleki⁴,
Mahin Nikougoftar⁵,
Seyedeh Mahsa Khatami³,
Mohsen Sagha⁶

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).

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

هما محسنی کوچصفهانی^۱

فرنوش سرابی^۲

مسعود ملکی^۳

مهین نیکوگفتار^۴

سیده مهسا خاتمی^۵

محسن سقا^۶

چکیده

سابقه و هدف: ژله وارتون بند ناف منع غنى و در دسترسى از سلول‌های بنیادی است که قدرت تکثیر و تمایز بالای دارد. هدف از تحقیق حاضر، ارزیابی نشانگرهای سطحی و ژن‌های وابسته به آن‌ها در سلول‌های بنیادی هزارسیمی ژله وارتون بود.

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

یافته‌ها: ۵-۷ 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 اندوتیالی پهنه را نشان داد. تحلیل فلوسایتومتری به روش رنگ آمیزی دو گانه بیان نشانگرهای سطحی CD۴۴، CD۴۵ و CD۱۰۵ و عدم بیان CD۳۴ CD۷۳ 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 مورفوژوژی سلول‌های هزارسیمی 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

(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

سلول‌های بنیادی سلول‌های تمایز نیافته‌ای هستند که ویژگی‌های منحصر به فردی از جمله توانایی خودنویزی

E-mail: m.sagha@arums.ac.ir

مؤلف مسئول: محسن سقا - اردبیل: خیابان دانشگاه، دانشکده پزشکی اردبیل، دانشکده پزشکی، گروه علوم تشریحی و پاتولوژی

۱. داشتار، 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 زیست‌شناختی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات تبریز، تبریز، ایران

۴. استادیار، پانک 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

۷. تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۱۰/۱۵ تاریخ ارجاع چهت اصلاحات: ۱۳۹۳/۲/۶ تاریخ تصویب: ۱۳۹۳/۲/۱۰

متفاوت است (۱۷)؛ به طوری که اولین مشخصه مولکولی سلول‌های بنیادی مزانشیمی در شرایط کشت بیان نشانگرهای سطحی CD۴۴، CD۷۳، CD۹۰، CD۱۰۵ و CD۴۵ به همراه عدم بیان نشانگرهای CD۳۴ و CD۴۵ می‌باشد (۱۸، ۱۹).

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 فیرونکتین و کلائز 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-نوکلوتیداز 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 TGF-β^۵ از اعضای خانواده مسیر پیام‌رسانی (Transforming growth factor-β) است که به عنوان یکی از اصلی‌ترین مولکول‌های این مسیر طی تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی عمل می‌کند. حضور توازن آنتی‌ژن‌های پیش‌گفته در سطح سلول‌های بنیادی برای اتصال آن‌ها به کف طروف 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 لکوسيتی (Leukocyte common antigen) یا LCA می‌باشد، 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 وزیرگی‌های مورفولوژیکی این سلول‌ها نشان داده شده است (۲۰، ۲۱)؛ اما

بنیادی قادر است پروفایل بیان ژنی و فنوتیپ عملکردی متغّری 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 (۱-۳).

سلول‌های بنیادی بر اساس منشأ استخراج آن‌ها در سه دسته قرار می‌گیرند که شامل سلول‌های بنیادی رویانی (Embryonic stem cells) و سلول‌های بنیادی بزرگ‌سال می‌باشند (۴-۶). 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 می‌گردد (۷، ۸). این سلول‌ها در بافت بند ناف از بخش‌های مختلفی از جمله عروق خونی (۸، ۹)، غشاء آمنیوتیک (۱۰) و ژله وارتون (۷، ۱۱) به دست می‌آیند.

ژله وارتون بافتی سرشار از سلول‌هایی با مورفولوژی مزانشیمی است و نخستین جداسازی و کشت سلول‌های شبه فیربلاستی از ژله وارتون انسانی توسط مک‌الریوری گزارش شد (۱۲). Mitchell و همکاران نیز ژله وارتون را به عنوان منبعی از سلول‌های بدبوی 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، تحمدان و استئوسارکوم نیز نقش دارند (۱۴-۱۶).

ماهیت سلول‌های رده‌های مختلف به بیان مجموعه پیچیده‌ای از پروتئین‌های سطح سلولی به نام نشانگرهای سطحی بستگی دارد که سرنوشت تکوینی این سلول‌ها را تعین می‌کند. الگوی بیان این نشانگرهای سلول‌های مختلف

بعد از جداسازی غشاء 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 ۲۰ DMEM low glucose E1۵-۸۹۱ (PAA) حاوی ۲۰ درصد سرم جنینی گاو (Fetal bovine serum FBS) یا (PAA) A11-۱۰۱؛ ۱ درصد پنی سیلین/ استرپتومایسین (PAA) P11-۱۰۱ در فلاسک‌های کشت سلولی T2۵ انتقال داده شدند. کشت اولیه این قطعات بافتی در داخل انکوباتور دارای CO₂ در شرایط دمایی ۳۷ درجه سانتی‌گراد و ۵ درصد CO₂ صورت گرفت و محیط کشت فلاسک‌ها هر سه روز یک بار تعویض گردید.

۱۶-۱۸ 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 ۷-۵ دقیقه تحت تأثیر Trypsin/ EDTA (PAA) L11-۰۰۳، ۰/۰۵ (Trypsin/ Ethylenediaminetetraacetic acid) درصد قرار گرفتند. سلول‌های جدا شده بار دیگر در فلاسک‌های T2۵ 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 ۵-۷ روز کشت پس از این که تراکم سلولی به ۷۵-۸۰ درصد رسید، سلول‌ها در محیط کشت DMEM low glucose حاوی ۱۰ درصد سرم جنینی گاو و ۱ درصد پنی سیلین/ استرپتومایسین پاساژ داده شدند.

Immunophenotyping سلول‌های بنیادی مزانشیمی ژله وارتون انسانی با فلوسایتومری بیان نشانگرهای سطحی، CD7۳، CD9۰، CD10۵، CD4۴، CD4۵ و CD۳۴ در سلول‌های بنیادی مزانشیمی ژله وارتون به روش فلوسایتومری مورد بررسی قرار گرفت. سلول‌های بنیادی پاساژ دوم پس از دوبار شستشو با PBS استفاده از ۰/۰۵ Trypsin/EDTA درصد از کف فلاسک

بررسی الگوی بیان نشانگرهای سطحی این سلول‌ها در سطح پرتوئین و نیز ارزیابی تغییرات بیان ژنی این نشانگرهای طی پاساژهای مختلف سلولی در شرایط کشت آزمایشگاهی صورت نگرفت و یا در صورت انجام، تنها به مطالعه تعداد معددی از ژن‌ها و نیز نشانگرهای سطح سلولی با تکنیک فلوسایتومری 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 فلوسایتومری به صورت RT-PCR (Dual staining) و (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 جمع آوری شد و تحت شرایط استریل در داخل نرمال سالین قرار داده شد و بلا فاصله 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 Phosphate buffered saline (PBS) شستشو داده شد.

مورد استفاده قرار گرفت. توالی پرایمرها و طول قطعات تکثیر یافته در جدول شماره ۱ آمده است. محصولات PCR بر روی ژل‌های آگار ۱/۲ درصد حاوی اتیدیوم بروماید (۰/۵ $\mu\text{g}/\text{ml}$) الکتروفورز شدن و باند ایجاد شده به کمک Uvidoc; UK (Ultraviolet) به کمک دستگاه Bioneer مشاهده شد. کلیه پرایمرهای مربوط، از شرکت کمک UV نور (Ultraviolet) (Bioneer; UK) به کمک دستگاه Bioneer مشاهده شد. کلیه پرایمرهای مربوط، از شرکت Bioneer مشاهده شد. کلیه پرایمرهای مربوط، از شرکت Bioneer مشاهده شد. کلیه پرایمرهای خریداری شد.

جمع آوری نمونه‌های مورد مطالعه و کشت قطعه‌ای آن‌ها و نیز انجام RT-PCR برای ژن‌های مورد نظر، حداقل در سه تکرار مستقل از هم صورت گرفت.

یافته‌ها

ویژگی‌های مورفولوژیکی

به دنبال جداسازی قطعات بافتی بند ناف و کشت اولیه آن‌ها در فلاسک (تصویر شماره ۱A) بعد از ۷-۹ روز، سلول‌های بنیادی مزانشیمی انسانی شروع به جدا شدن از اطراف این قطعات نمودند و به کف فلاسک چسبیدند (تصویر شماره ۱B). پس از گذشت ۱۶-۱۸ روز، تعداد زیادی از سلول‌های بنیادی از قطعه بافتی اولیه کشت داده شده جدا شدند و کف فلاسک را پوشاندند (تصویر شماره ۱C). در پایان روز ۱۶-۱۸ پس از برداشتن قطعه بافتی و کشت مجدد سلول‌های چسبیده به فلاسک، دو نوع سلول با مورفولوژی مشخص در آن‌ها مشاهده گردید؛ دسته‌ای به صورت سلول‌های کوچک مسطح با مورفولوژی شبیه به سلول‌های اندوتیالی بودند و گروه دوم، ظاهر دوک مانند شبیه به سلول‌های فیروblastی داشتند (تصویر شماره ۱D).

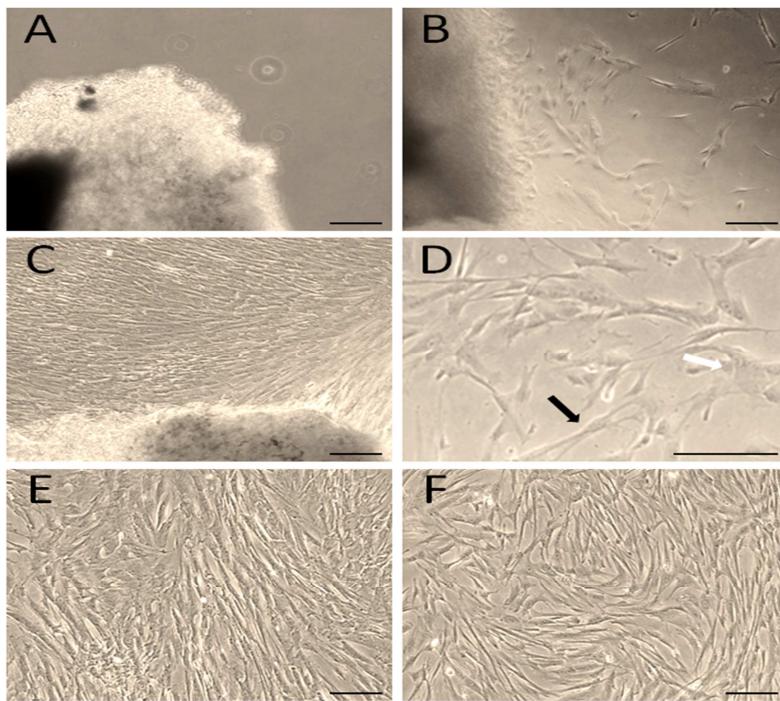
جدا گردیدند و در نهایت تک سلولی شدند. ابتدا ۵۰ میکرولیتر از این سلول‌ها با ۵ میکرولیتر از آنتی‌بادی‌های ایزوتوپیک کتیرل شامل Clone: MOPC-۳۱C؛ Clone: MOPC-۳۱C و IgG1-FITC (BD Pharmingen) IgG1-PE (BD Pharmingen) و همچنین آنتی‌بادی‌های CD۳۴-PE (BD Pharmingen)؛ Clone: ۵۶۳؛ CD۴۴-FITC (BD Pharmingen)؛ Clone: 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 به مدت سی دقیقه در ۴ درجه سانتی گراد مجاور شدند. پس از واکنش، ۵۰ میکرولیتر از محلول پارافرمالدئید ۴ درصد به PBS سوسپانسیون سلولی اضافه شد، سپس سلول‌ها با بافر⁻ شیستشو داده شدند و در نهایت، نمونه‌ها با دستگاه فلوسایتومری Partec PAS III و با استفاده از نرم افزار Flomax مورد آنالیز قرار گرفتند.

نسخه برداری معکوس واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (RT-PCR) استخراج RNA کل سلول با استفاده از محلول ترایزول (Sigma؛ T۹۴۲۴) طبق دستورالعمل شرکت سازنده صورت گرفت. غلظت RNA استخراج شده با دستگاه نانودرآپ تعیین گردید و یک میکروگرم از RNA کل جهت سنتز Complementary DNA (cDNA) ReverseAidTM first strand cDNA؛ ۱۶۲۲ در حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر synthesis fermentase

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 (°C)	Cycle
GAPDH	Forward: CATCACCATCTTCCAGGAGC Reverse: CCTGCTTCACCACCTCTTG	۵۷۵	۵۴	۳۰
CD۳۴	Forward: CAGCTGTGGAGTTAACGA Reverse: CCGTTTCCGTGTAATAAGG	۴۱۱	۵۰	۳۰
CD۹۰	Forward: CATTCTCAGCCACAACCAA Reverse: CCTTTGTAGCCCTCTCCACT	۲۴۴	۵۱	۳۰
CD۱۰۵	Forward: GCCAGCATTGTCTCAATTCA Reverse: TGGAAAGAGAGGCTGTCCAT	۳۹۵	۵۱	۳۰

Bp = Base pair



تصویر شماره ۱: کشت اولیه و پاساز 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 ۷-۸ روز کشت (C: تکثیر و گسترش سلول‌های بنیادی در روزهای ۱۶-۱۸ و (D: کشت مجدد این سلول‌ها پس از حذف قطعه بافتی اولیه در روزهای ۱۶-۱۸. کادر سلولی بالا و راست این تصویر سلول‌هایی با مورفوЛОژی شبه اندوتیالی (علامت پیکان سفید) و شبه فیبروبلاستی (علامت پیکان تیره) را نشان می‌دهد (E: تکثیر و گسترش سلول‌های بنیادی در انتهای پاساز صفر ۵-۷ روز پس از کشت مجدد سلول‌ها) و (F: تراکم بیشتر سلول‌هایی با مورفوЛОژی شبه فیبروبلاستی در پاساز دوم (Scale bar = ۲۰۰ μm)).

CD105 در این سلول‌ها ۷۴/۰۵ درصد بود. با این حال، کمتر از ۵/۰ درصد این سلول‌ها توانستند بیان توأمی از CD34 و CD45 داشته باشند.

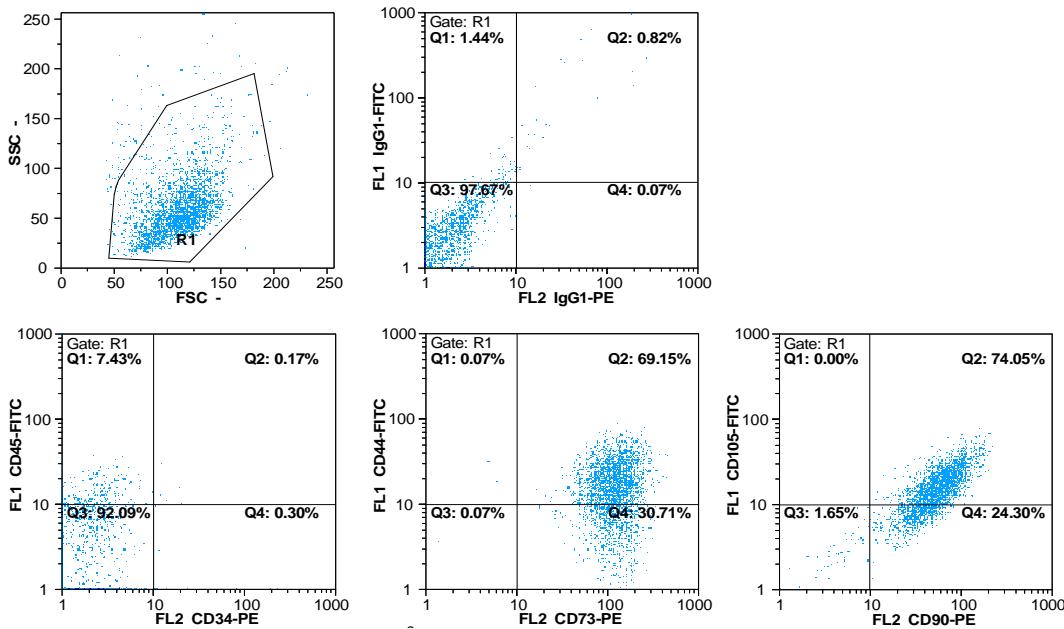
RT-PCR

آنالیز بیان ژن‌های مربوط به نشانگرهای سطحی سلول‌های بنیادی مزانشیمی ژله وارتون یعنی CD105 و CD90 و نیز CD34 و نیز نشانگر سطحی مربوط به سلول‌های بنیادی خون‌ساز (CD34) به روش RT-PCR نشان داد که در سلول‌های استخراج شده، ژن‌های نشانگر سلول‌های بنیادی مزانشیمی از جمله CD90 و CD105 در پاساز صفر و به دنبال آن در پاسازهای دو و چهار بیان خوبی داشتند، در حالی که ژن نشانگر سلول‌های بنیادی خون‌ساز، CD34 در هیچ کدام از پاسازهای سلولی بیان نشد (تصویر شماره ۳).

به دنبال تکثیر و گسترش سلول‌ها در انتهای پاساز صفر (تصویر شماره ۱) و پاساز مجدد آن‌ها از میزان جمعیت سلول‌های با مورفوLOژی اندوتیالی کاسته شد و در عوض، سلول‌هایی که مورفوLOژی شبه فیبروبلاستی داشتند، باقی ماندند و تکثیر یافتند (تصویر شماره ۱F).

آنالیز فلوسايتومتری

از تکنیک فلوسايتومتری به صورت رنگ آمیزی دوگانه برای تعیین خصوصیت نشانگرهای سطحی سلول‌های بنیادی مزانشیمی ژله وارتون بند ناف در پاساز دوم (تصویر شماره ۲). همان‌طور که جدول شماره ۲ نشان می‌دهد؛ ۶۹/۱۵ درصد سلول‌های بنیادی نشانگرهای CD44/CD73 را به صورت توأم بیان کردند. همچنین این بررسی‌ها نشان داد که بیان توأم نشانگرهای CD90 و



تصویر شماره ۲: درصد بیان نشانگرهای سطحی CD₄, CD₈, CD₃, CD₄₅, CD₁₀₅, CD₁₄ و CD₃₄ سلول های بنیادی ماراشمی ژله وارتون بند ناف انسانی. R1. منطقه Gating سلول های بنیادی را بر مبنای پراکنش سلول ها از نظر اندازه سلولی (Forward scatter FSC) و نیز میزان کمپلکسیتی (SSC) با آن ها شناس می دهد. آن تیپ نادی های ایزو-وتاپ کنترل کونزوگ و شده به ترتیب با FITC و PE می باشد. Q1 و Q2 درصد بیان هر یک از نشانگرهای سطحی را به تنهایی و Q3 نشان دهنده درصد عدم بیان نشانگرها در سلول های 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)
CD44 ⁺	۹۹/۲۲
CD73 [*]	۹۹/۱۶
CD44 ⁺ / CD73 [*]	۹۹/۱۵
CD90 ⁺	۹۸/۴۵
CD105 ⁺	۷۴/۰۵
CD105 ⁺ / CD90 ⁺	۷۴/۰۵
CD34 ⁺	۰/۴۷
CD45 ⁺	۷/۶۰
CD45 ⁺ / CD34 ⁺	۰/۱۷

تصویر شماره ۳ بیان ژن های مربوط به نشانگر های سطحی سلول های بنیادی مازنثیمی ژله وارتون CD1۰۵ و CD9۰ و عدم بیان ژن نشانگر سطحی سلول های بنیادی خون ساز، CD3۴ در پاساژ های صفر (P₀، دو (P₂) و چهار (P₄) GAPDH.

ماتریکس بند ناف به روش کشت قطعه‌ای، نشانگرهای سطحی و ژن‌های واپسیت 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

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

کشت سلول‌های بنیادی مزانشیمی ژله وارتون در شرایط آزمایشگاهی، می‌تواند مدل سلولی مناسبی در جهت کشف بیولوژی عملکردی و رفتار تمايزی این سلول‌ها در بدن و نیز بهره‌وری مناسب از آن‌ها برای مقاصد درمانی باشد؛ از این‌رو، 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 CD90، CD44 و CD105 را عرضه می‌کنند؛ در حالی که نشانگرهای سطحی سلول‌های خون‌ساز CD34 و CD45 در این سلول‌ها بیان نمی‌شوند (۳، ۷).

نتایج حاصل از مطالعات حاضر که با روش‌های فلوسایتمتری و RT-PCR صورت گرفت نیز با گزارش‌های ارایه شده مطابقت دارد. نتایج فلوسایتمتری تحقیق حاضر نشان داد که بیش از ۹۸ درصد سلول‌های بنیادی مزانشیمی ژله وارتون نشانگرهای سطحی CD73 و CD90 و حدود ۷۰ درصد سلول‌ها نشانگرهای سطحی CD44 و CD105 را بیان کردنده. در مقابل، میزان بیان نشانگرهای CD34 و CD45 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 CD44، CD90، CD73 و CD105 را در سلول‌های بنیادی مزانشیمی ژله وارتون به ترتیب ۵۵/۸، ۷۴/۵، ۹۳/۰ و ۸۳/۰ درصد گزارش کردند؛ در حالی که میزان بیان CD34 و CD45 به ترتیب ۱۰/۴ و ۵/۴ 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⁺, CD90⁺, CD73⁺, CD105⁺, CD34⁻, CD45⁻ و CD3⁻ هستند (۸، ۲۵، ۲۶).

آنژیمی 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، ۳۸). نتایج تحقیق حاضر نیز حاکی از آن بود که با استفاده از روش کشت قطعه‌ای، طی ۵-۷ روز اول، سلول‌ها از قطعات بافتی جدا شدند و پس از مهاجرت به کف فلاسک چسیدند؛ 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 طرف مدت ۷-۵ روز به تراکم سلولی ۷۵-۸۰ درصد برای پاساژ دادن رسیدند.

مطالعات حاکی از وجود دو نوع مورفولوژی سلولی متفاوت در سلول‌های بنیادی بند ناف در مراحل اولیه چسیدن به کف ظروف کشت است که شامل یک جمعیت از سلول‌های کوچک مسطح با مورفولوژی شبه اندوتیالی و نیز جمعیتی از سلول‌های شبه فیروپلاستی دوک مانند می‌باشد. این سلول‌ها بیان متفاوتی از ژنهای مربوط به رشته‌های بینایین را نشان می‌دهند (۲۳، ۲۴). 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 فیروپلاستی بود. شاید این امر به دلیل استفاده از محیط حداقلی برای رشد سلول‌های بنیادی مزانشیمی بند ناف و فقدان عوامل رشد سلول‌های اندوتیالی در محیط کشت باشد (۲۳، ۲۴).

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 CD105، CD44، CD90، CD13⁺، CD29⁺، CD44⁺ و نیز عدم بیان نشانگرهای CD45 و CD34 صورت می‌گیرد (۲۱، ۲۲، ۱۶، ۷).

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 CD₃₄, CD₇₃, CD₄₄, CD₉₀, CD₁₀₅ در شرایط کشت آزمایشگاهی هستند و در عین حال، بیان نشانگرهای سلول‌های بنیادی خون‌ساز CD₃₄ و CD₄₅ در درصد بسیار کمی از آن‌ها مشاهده می‌شود.

سپاسگزاری

نویسنده‌گان مقاله مراتب تشکر و قدردانی خود را از بیمارستان آرتای اردبیل و همکاری صمیمانه آقای دکتر کمال الدین حمیدی، پزشکان و پرسنل محترم اتاق عمل این بیمارستان که در جمع آوری بند ناف نوزادان ما را یاری نمودند و نیز مساعدت‌های آقای مهدی عدالتی فتح آبادی اعلام می‌دارند.

درصد حضور کم نشانگرهای CD₃₄ و CD₄₅ 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 CD₃₄ و CD₄₅ مثبت نیز کاهش می‌یابد (۲۷).

نتایج RT-PCR مطالعه حاضر نیز نشان داد که در سلول‌های بنیادی مزانشیمی ژله وارتون نشانگرهای CD₉₀ و CD₁₀₅ توансند در طی پاساژهای مختلف با شدت مشابهی بیان شوند؛ در حالی که هیچ گونه بیانی از نشانگر سطحی سلول‌های خون‌ساز (CD₃₄) 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.

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,

- 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 Kalae 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.