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

Homa Mohseni Kouchesfehani, Farnoosh Sarae, Masoud Maleki, Mahin Nikougoftar, Seyyedeh Mahsa Khatami, Mohsen Sagha

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
ارزیابی نشانگر های سطحی و آنزیمی زلع و آنتی‌ژن به آنها در سلول‌های بینیادی مراقب‌تبدیلی زلع و آنتی‌ژن

چکیده
سالم و هدف: زلع و آنتی‌ژن نشانگر های سطحی و آنزیمی مورد مطالعه قرار گرفتند. هدف از تحقیق محاسبه میزان ثابت و نسبت به آنها در سلول‌های بینیادی مراقب‌تبدیلی زلع و آنتی‌ژن بود.

مواد و روش‌ها: اصلی‌ترین نشانگر سطحی و آنزیمی از زلع و آنتی‌ژن بین‌ناف انسانی تشریح و در میان علوم با خاصیت فعالیت دارد. در کارهایی که شرکت دارند یا تعدادی از سلول‌های بین‌ناف مراقب‌تبدیلی زلع و آنتی‌ژن به آنها در سلول‌های بین‌ناف مراقب‌تبدیلی زلع و آنتی‌ژن ترکیب می‌شوند.

ناگهانی: نشانگر های سطحی و آنزیمی در کمیتی هدف‌مند و نشانگر های سطحی و آنزیمی در کمیتی هدف مند برای ترکیب، یافته‌های RT-PCR و نیز به آنها را همکاری کرده که کننده فاز آنها در یافته‌های RT-PCR می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: سلول‌های بین‌ناف زلع، زلع، RT-PCR

مقدمه
سلول‌های بین‌ناف زلع تشخیص تهیه‌های هسته‌ای که ویژگی‌های منحصر به فردی از جمله نوآوری کوکئائی (Self-renewal) و برجسته‌سازی از نوع مختلف رشد در سلول‌های بین‌ناف دارد. از دیگر مشخصات سلول‌های بین‌ناف انعطاف‌پذیری بالایی آنها است که طوری که پک سلول

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

کلمات کلیدی: سلول‌های بین‌ناف زلع، زلع، RT-PCR

(Reverse-transcriptase polymerase chain reaction)
نماهنگ‌های سطح‌سازی پلی‌نیترات مازئینیمی 
از وارتون

متفاوت است (*) به طوری که اولین مشخصه مولکولی سلول‌های بنیادی مازئینی از شرایط کشت بنیان نشان‌گر می‌باشند. 
CD10، CD44 و سطحی CD56 و CD43 و CD65 می‌باشد (11). 

اعداد این نشان‌گران سطحی به عنوان گیاه‌نگاری با لیگاند در می‌گردد. 
یکی از اصل مولکولی این امکان از ترکیب سطحی CD90 و CD110 
یکی از ویژگی‌ها و صفاتی است که در 

متفاوت است (*) به طوری که اولین مشخصه مولکولی سلول‌های بنیادی مازئینی از شرایط کشت بنیان نشان‌گر می‌باشند. 
CD10، CD44 و سطحی CD56 و CD43 و CD65 می‌باشد (11). 

اعداد این نشان‌گران سطحی به عنوان گیاه‌نگاری با لیگاند در می‌گردد. 
یکی از اصل مولکولی این امکان از ترکیب سطحی CD90 و CD110 

است. 

متفاوت است (*) به طوری که اولین مشخصه مولکولی سلول‌های بنیادی مازئینی از شرایط کشت بنیان نشان‌گر می‌باشند. 
CD10، CD44 و سطحی CD56 و CD43 و CD65 می‌باشد (11). 

اعداد این نشان‌گران سطحی به عنوان گیاه‌نگاری با لیگاند در می‌گردد. 
یکی از اصل مولکولی این امکان از ترکیب سطحی CD90 و CD110 

است. 

متفاوت است (*) به طوری که اولین مشخصه مولکولی سلول‌های بنیادی مازئینی از شرایط کشت بنیان نشان‌گر می‌باشند. 
CD10، CD44 و سطحی CD56 و CD43 و CD65 می‌باشد (11). 

اعداد این نشان‌گران سطحی به عنوان گیاه‌نگاری با لیگاند در می‌گردد. 
یکی از اصل مولکولی این امکان از ترکیب سطحی CD90 و CD110 

است. 

متفاوت است (*) به طوری که اولین مشخصه مولکولی سلول‌های بنیادی مازئینی از شرایط کشت بنیان نشان‌گر می‌باشند. 
CD10، CD44 و سطحی CD56 و CD43 و CD65 می‌باشد (11). 

اعداد این نشان‌گران سطحی به عنوان گیاه‌نگاری با لیگاند در می‌گردد. 
یکی از اصل مولکولی این امکان از ترکیب سطحی CD90 و CD110 

است. 

متفاوت است (*) به طوری که اولین مشخصه مولکولی سلول‌های بنیادی مازئینی از شرایط کشت بنیان نشان‌گر می‌باشند. 
CD10، CD44 و سطحی CD56 و CD43 و CD65 می‌باشد (11). 

اعداد این نشان‌گران سطحی به عنوان گیاه‌نگاری با لیگاند در می‌گردد. 
یکی از اصل مولکولی این امکان از ترکیب سطحی CD90 و CD110 

است.
پرسی اگلی بیاب نشانگرها سطحی این سلنول‌ها در سطح بروئینئ و نیز از ارزیابی تغییرات بین زنی این نشانگرها طی پاسخ‌های مختلف سلول‌های در شرایط کشته آزمایشگاهی صورت نگرفت و از نظر اساس این نشانگرها سطح سلول‌ها تکیهگاهی نمودند از آنجا که علاوه بر پرسی مورفولوژی سلول‌های کشت داده شده ارایه شوهد مولکولی مانند بیان نشانگرها سطحی سلول‌ها نیز یکی از معیارهای بسیار مهم در کشت سلول‌های بیان‌ساز می‌گردد و از این نشانگرها پاسخ‌گویی می‌کند. این نشانگرها به دنبال آن، بروeidی نشانگرها از مهم‌ترین نشان‌گرها برای سلول‌ها و نیز بخشی از زندگی مربوط به آن‌ها استفاده از تکنیک‌های فلوسیمیتری به صورت RT-PCR و (Dual staining) و (Reverse-transcriptase- polymerase chain reaction) انجام شد.

مواد و روش‌ها
جداسازی و کشت سلول‌های بیتاید از زلنج بند ناف پس از کسب رضایت مادران پزشکان بند ناف نوزادان سالم پس از انجام عمل سرایین جمع آوری شد و تحت شرایط استریل در داخل نمای سالیان قرار داده شد و بلافاصله به کمک فلاکسیم‌ها بین‌ریخته و آزمایش گردید. جداسازی سلول‌های بند ناف انسانی به روش کشته قطعه‌های از فطر بین سه‌ای اول بعد از زاپاس های می‌گرفت در این روش بین نزدیک‌تر از نیز کشت قطعه‌های یافته و ۴ تا ۶ ساعت از این کشت در زمینه‌های مورفولوژیک (Phosphate buffered saline) PBS

شهرویحی

بعد از جداسازی شنای آمینوئون و عروق خونی، قطعات کوچکی به حجم تقریباً ۵ میلی‌متر مکعب از ناحیه زلنج وارد شده که پس از شستن با PBS (PAA; E15-891) DMEM low glucose (Fetal bovine serum) با پروئین A1-110 (PAA; A1-110) در فلامسکسی‌های کشت سلول‌های ۳۵ تا ۴۵ انتقال داده شدند. کشت اولیه این قطعات با فاشت در داخل درکنیز در دارای CO۲ در ضریب دما ۳۷ درجه سانتی‌گراد و ۵ درصد صورت گرفت و محیط کشت فلاکسیم‌ها در سه روز یکبار تغییر گردید.

سپس به از نظر ۵ تا ۷ روز کشت پس از این که تراکم سلنول سولو ۷۵ درصد رسید، سلنول‌ها در محیط کشت حاوی ۱۰ درصد سرم جنینی گاو و ۱ درصد پی‌سی/استریوتیپیاس پاساژ داده شدند.

سولول‌های بیتاید مراقبی وارد سولول‌های بیتاید از زلنج بند ناف PBS به دست آمده سولول‌ها در محیط کشت حاوی ۱۰ درصد سرم جنینی گاو و ۱ درصد پی‌سی/استریوتیپیاس پاساژ داده شدند.

فقط معیارهای بسیار مهم در کشت سلول‌های بیتاید مراقبی به دست آمده سولول‌ها در محیط کشت حاوی ۱۰ درصد سرم جنینی گاو و ۱ درصد پی‌سی/استریوتیپیاس پاساژ داده شدند.

Immunophenotyping

وارد سولول‌های بیتاید مراقبی، CD۴۳، CD۴۴، CD۵۴ و CD۵۴ در سلول‌ها نشانگر مراقبی Z۰ در سلول‌ها وارد شدند. PBS به دست آمده PBS به دست آمده بر روی سلول‌های پاساژ داده شدند.

Downloaded from imums.mazums.ac.ir at 20:26 +0330 on Wednesday December 12th 2018
مورد استفاده قرار گرفت. توالی پراپرهای و طول قطعات
PCR تکرار یافت به درجه اکتاسی ۱ آمده است. محصولات
بر روی زلیاغ آمپار/۲ درصد حاوی این پروتئین بوده است.
(۱/۵ μg/ml) الکتروروز شده و باند ایجاد شده به کمک
Uvidoc; UK به کمک دستگاه Bioneer مشاهده شد. کله براپرهای مربوط از شرکت
کره جنوبی خریداری شد.
جمع آوری نمونه‌های مورد مطالعه و کشتن قطعه‌های آنها و
برای زنده‌مورد تکرار مستقل از هم صورت گرفت.

یافته‌ها
ویژگی‌های مورفولوژیکی
به دنبال جداسازی قطعات بافتی بند ناف و کشک اولیه
آن‌ها در فلاسک (تصویر شماره ۱۳) بعد از ۵-۷ یا ۹ روز
سولهای نهایی مزمن شده مشاهده شد. از اطراف این قطعات نمونه و به کف فلاسک چسبیده (تصویر
شماره ۱۱) پس از گذشت ۱۴-۱۶ روز، تعداد زیادی از
سولهای نهایی به قطعه بافتی اولیه کشک داده شد. جدای
شدن و کف فلاسک با پوششانده (تصویر شماره ۱۱). در
پایان روز ۱۰-۱۶ پس از برداشت قطعه بافتی و کشک مجدد
سولهای به سه بخش (تصویر شماره ۱۱) دو نمونه سوله
با مورفولوژی مشابه در آن‌ها مشاهده گردید. در حاشیه
سولهای کرونکی مسطح با مورفولوژی مشابه به سلول‌های
مانند بودند و گروه دوم، ظاهر دوک مانند مشابه به
سولهای فیروپلاستی داشتند (تصویر شماره ۲۳).

جدول شماره ۱: توالی پراپرهای مورد استفاده، طول محصل، حاصل انستان و تعداد جره با پراپرها

<table>
<thead>
<tr>
<th>فرآیند</th>
<th>شرایط</th>
<th>حاصل اکتاسی</th>
<th>تعداد جره با پراپر</th>
<th>نتیجه‌گیری</th>
</tr>
</thead>
<tbody>
<tr>
<td>RT-PCR</td>
<td>ظرفیتی</td>
<td>۹۷٪</td>
<td>۶۰</td>
<td>سبک فعال</td>
</tr>
</tbody>
</table>
تصویر شماره ۱: کشت باله و پاسخ سلول‌های بیانی شده در انتهای پاسخ صفر (تصویر شماره۱E) و پاسخ مجدد آنها از میان جمعیت سلول‌های با مورفولوژی اندونریالی کاشف شد و در عوض سلول‌هایی که مورفولوژی شبیه اندونریالی داشتند باقی ماندند. و تکثیر یافتند.

RT-PCR آنالیز

آنتی‌ژن پان زن‌های مربوط به نشانگرهای سطحی سلول‌های بیانی مزمنشی زل وارثون یعنی CD۱۰۵ در انتهای پاسخ صفر (تصویر شماره۱E) و CD۳۴ در انتهای پاسخ مجدد، در روش RT-PCR نشان داد که در سلول‌های استخراج شده، Zن‌های نشانگر سلول‌های بیانی مزمنشی از جمله CD۱۰۵ در پاسخ صفر و به ندرت آن در پاسخ مجدد و جهار بیان خوبی داشتند، در حالی که Zن‌ها نشانگر سلول‌های بیانی مزمنشی از جمله CD۳۴ در هیچ کدام از پاسخ‌های سلولی بیان نشد. (تصویر شماره۱D).
مطالعه نشان‌دهنده سطح سلول‌های بنیادی مراکشیمی زله وارتون

بحث

در زمینه بررسی مورفولوژیکی، روش‌های جداسازی، ویژگی‌های فنوتیپی و قدرت تنبزیت‌سازی سلول‌های بنیادی مراکشیمی از زله وارتون مطالعه اثرات مثبت و مثبت بر روی NEC است. در تحقیق حاضر، بررسی مولکول‌های بیروزی در سلول‌های این سلول‌ها از یافته‌های می‌باشد.

جدول شماره ۳: درصد بینانوان نشان‌دهنده سطح سلول‌های بنیادی مراکشیمی زله وارتون به ترتیب مورد گریزده و تأمین

<table>
<thead>
<tr>
<th>نوع نشان‌دهنده سطحی</th>
<th>سلول‌های بنیادی (درصد)</th>
</tr>
</thead>
<tbody>
<tr>
<td>Q1</td>
<td>1.44%</td>
</tr>
<tr>
<td>Q2</td>
<td>0.17%</td>
</tr>
<tr>
<td>Q3</td>
<td>69.15%</td>
</tr>
<tr>
<td>Q4</td>
<td>24.30%</td>
</tr>
</tbody>
</table>

جدول شماره ۴: درصد بینانوان نشان‌دهنده سطح سلول‌های بنیادی مراکشیمی زله وارتون به ترتیب مورد گریزده و تأمین

<table>
<thead>
<tr>
<th>نوع نشان‌دهنده سطحی</th>
<th>سلول‌های بنیادی (درصد)</th>
</tr>
</thead>
<tbody>
<tr>
<td>Q1</td>
<td>0.00%</td>
</tr>
<tr>
<td>Q2</td>
<td>74.05%</td>
</tr>
<tr>
<td>Q3</td>
<td>1.65%</td>
</tr>
<tr>
<td>Q4</td>
<td>24.30%</td>
</tr>
</tbody>
</table>

ملاحظه: مولکول‌های مرتبط با روش‌های NEC می‌باشد.
کشت سلول‌های بیان‌دار ملانیسی بینایی زلو و ارتو در شرایط آزمایشگاهی، می‌توانند مناسبی در جهت کشف بیولوژی عملکرد و رفتار تاریکی این سلول‌ها در بدن و نیز به‌صورت مناسب از آنها برای مقایسه درمانی باشد. این روش برای مطالعات مورفولوژیکی بررسی‌های گروهی مبانی نشان‌گهای سطحی سلول‌های بیان‌دار ملانیسی و زلوهای وابسته به آنها در این سلول‌ها ضروری است. مطالعات انجام شده توسط محقق می‌دهد که سلول‌های بیان‌دار استخراج شده از زلو و ارتو همانند سایر سلول‌های بیان‌دار ملانیسی، پان‌شبدی‌ی برخی نشان‌گهای سطحی مانند CD90، CD44 و CD115 را عرضه می‌کنند. حاصل که نشان‌گر سطحی سلول‌های بینایی در این سلول‌ها بیان می‌شود. نمی‌تواند (۷۳).

نتایج حاصل از مطالعات حاضر که با روش‌های فلوروسیمتری و RT-PCR صورت گرفت نیز با گزارش‌های ارائه‌شده مطابقت دارد. نتایج فلوروسیمتری حاصل نشان داد که بیش از ۹۸ درصد سلول‌های بینایی ملانیسی زلو و ارتو نشان‌گر سطحی مانند CD90، CD44 و CD115 را در این سلول‌های بیان‌دار ملانیسی زلو و ارتو به ترتیب ۹۹/۳، ۱۸/۷ و ۸۵/۵ درصد نشان‌گر سطحی در حالی که سلول‌های بینایی ملانیسی زلو و ارتو به ترتیب ۴/۵ و ۱۰۴/۱ درصد CD90، CD44 و CD115. محققان همکاری داشتند. آنها نیز بیان نشان‌گرهای سطحی را در این سلول‌های بیان‌دار ملانیسی زلو و ارتو به ترتیب ۹۸/۳/۹۲/۳ و ۸۵/۵ درصد گزارش کردند. در حالی که میزان بیان سلول‌های بینایی ملانیسی بینایی از محققین توسط مشابه شد. البته این امر به دلیل استفاده از حیات حیاتی برای سلول‌های بینایی ملانیسی بینایی ناف و فقدان عامل رشد سلول‌های هندوتیپی در محیط کشت باشد (۷۳).

نتایج حاصل در تحقیق حاضر بیان‌دار ملانیسی را برای سلول‌های بینایی ملانیسی بینایی و غیره نشان می‌آورد. البته این امر به دلیل استفاده از حیات حیاتی برای سلول‌های بینایی ملانیسی بینایی ناف و فقدان عامل رشد سلول‌های هندوتیپی در محیط کشت باشد (۷۳).

سمول‌های رده‌های مختلف مجموعه پیچیده‌ای از گلیکوپروتئین‌های غشایی را ریان می‌کند که از آنها سی متان در جهت شناسایی و تعبیر هویت سلولی استفاده نمی‌شود. این نشان‌گاه‌های سطحی در ایجاد تعاملات بین سلول‌ها و نیز اتصال سلول‌ها به مکانیسم خارج سلولی و حیات در تعیین تکنولوژی نشان دهنده برای مثال، خصوصیات مولکولی سلول‌های بینایی ملانیسی به واسطه حضور نشان‌گرها سطحی CD90، CD44، CD115، CD44 و نیز عدم بیان نشان‌گرهای CD29، CD45 و CD44 صورت می‌گیرد (۷۱).
در مجموع، می توان اذعان داشت که زله و اورتون بند نافین تنها معنی غذی در دسترس از سلول های بیمارستانی است که با استفاده از تکنیک های زنده کشت قطعه ای زله و اورتون به دست می آید. ارزیابی مولکولی سلول های بیمارستانی زله و اورتون نشان می دهد که این سلول‌ها قادر به بیان شدیدی از نشانگرهای سطحی CD105, CD34, CD45 در شرایط کشت آزمایشگاهی مستند و در عین حال، بیان نشانگرهای سلول های بیمارستانی زله و اورتون در CD34 و CD45 در کشت

سپاسگزاری
نویسندهان مقاله مراثی نشکر و فردیانی خود را از بیمارستان آرمان اردبیل و همکاری صنیمانه آقای دکتر کمال الدین حمیدی، پرستو و پرسل مختصر اتفاق عمل این بیمارستان که در جمع آورد بنده نویسندگان ما را می‌دارند و نیز مساعدت‌های آقای مهدی عادلی فتح آبادی اعلام می‌دارند.

References


