

## جداسازی سلول‌های بنیادی مزانشیمی از مغز استخوان موش با تعویض مداوم محیط کشت

### چکیده

مسعود سلیمانی<sup>۱\*</sup>

صمد نادری<sup>۲</sup>

دکتر رضا ایزد پناه<sup>۳</sup>

۱- گروه هماتولوژی، دانشگاه تربیت مدرس

۲- گروه بیوشیمی، دانشگاه پیام‌نور واحد تهران

۳- گروه بیولوژی سلول‌های بنیادی و مهندسی

بافت، مرکز فناوری بن یاخته

۴- گروه ژن درمانی، دانشگاه تولین، آمریکا

\* نویسنده مسئول، تهران، دانشگاه تربیت مدرس

تلفن: ۸۹۵۳۸۵۱

email: soleim\_m@modares.ac.ir

کلمات کلیدی: موش، مغز استخوان، سلول‌های بنیادی مزانشیمی، جداسازی

**زمینه و هدف:** از ویژگی‌های منحصر به فرد سلول‌های بنیادی مزانشیمی که از آن در جداسازی استفاده شده است توانایی چسبیدن به پلاستیک است. به‌کارگیری این ویژگی در جداسازی سلول‌های بنیادی مزانشیمی گونه‌های مختلف پستانداران به‌جز موش با موفقیت همراه بوده است. در مطالعه حاضر با بهینه‌سازی روش چسبیدن به سطح ظرف پلاستیکی، جمعیت هموژن سلول‌های بنیادی مزانشیمی از مغز استخوان موش جداسازی شد. اساس این روش بر تعویض مداوم محیط کشت بلافاصله پس از کشت سلول‌های مغز استخوان است. **روش بررسی:** موش‌های نژاد Balb/c کشته شدند و مغز استخوان از فمور و تیبیا خارج و در ظرف شش‌خانه‌ای کشت گردید. سه ساعت پس از آغاز کشت محیط کشت رویی دور ریخته شد و محیط جدید اضافه گردید. تعویض محیط کشت در هر هشت ساعت و در فاصله زمانی ۷۲ ساعت ادامه داشت. این کشت تا زمان پر شدن نسبی ظرف توسط سلول‌های فیبروبلاستی نگهداری شد و پس از آن پاساژ اول انجام گرفت. این سلول‌ها برای مطالعات بیشتر مورد بررسی قرار گرفتند. به‌منظور اثبات ماهیت مزانشیمی، سلول‌ها به دودمان‌های مزانشیمی تمایز داده شدند. در ضمن سلول مورد نظر از نظر کلونوژنیک بودن و آنتی‌ژن‌های سطح سلول مورد ارزیابی قرار گرفتند. **یافته‌ها:** در این مطالعه دو هفته پس از کشت اولیه، جمعیت خالص از سلول‌های شبه فیبروبلاستی به‌دست آمد. این سلول‌ها که در آن‌ها مارکرهای سطحی CD44، Sca-1، CD90 بیان داشت، به آسانی به استخوان و چربی تمایز یافتند. **نتیجه‌گیری:** به نظر می‌رسد، روش ما روش توانمندی در جداسازی جمعیت خالص از سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان موش است.

### مقدمه

سلول‌های بنیادی (Stem cells)، سلول‌های تمایز نیافته با توانایی تکثیر و تولید سلول‌های تمایز یافته هستند.<sup>۱</sup> مغز استخوان منبع اصلی دو نوع از این سلول‌ها به نام سلول‌های بنیادی خون‌ساز و سلول‌های بنیادی مزانشیمی می‌باشد. سلول‌های بنیادی مزانشیمی توان تمایز به چندین دودمان سلولی از جمله استخوان، عصب، غضروف و کبد را دارند.<sup>۲</sup> در سال‌های اخیر این سلول‌ها با اسامی دیگر از قبیل سلول‌های فیبروبلاستی تشکیل‌دهنده کلونی،<sup>۳</sup> سلول‌های بنیادی استرومایی مغز استخوان فیبروبلاست‌ها،<sup>۴</sup> سلول‌های اجدادی مزانشیمی<sup>۵</sup> و سلول‌های استرومایی مغز استخوان<sup>۶</sup> خوانده شده‌اند. سلول‌های بنیادی مزانشیمی به‌عنوان یک منبع ایده‌آل برای

سلول‌درمانی، ژن‌درمانی و به‌عنوان ابزاری برای درمان بیماری‌های مادرزادی محسوب می‌گردند.<sup>۷</sup> گزارشاتی مبنی بر استفاده از این سلول‌ها در مدل‌های حیوانی برای درمان نواقص استخوانی،<sup>۸</sup> جراحات نخاعی،<sup>۹</sup> سکتۀ مغزی<sup>۱۱</sup> و پارکینسون<sup>۱۲</sup> وجود دارد. تا به حال سلول‌های بنیادی مزانشیمی از مغز استخوان پستاندارانی مثل رت،<sup>۱۳</sup> گربه،<sup>۱۴</sup> سگ،<sup>۱۵</sup> بابون،<sup>۱۶</sup> خرگوش،<sup>۱۷</sup> خوک،<sup>۱۸</sup> بز،<sup>۱۹</sup> گوسفند،<sup>۲۰</sup> با موفقیت جداسازی و ویژگی‌های آن‌ها مورد بررسی قرار گرفته است. اما این درحالی است که به علت رشد و تکثیر ناخواسته سلول‌های غیرمزانشیمی و خونی در جریان کشت سلول‌های مغز استخوان موش، جداسازی و خالص‌سازی سلول‌های بنیادی مزانشیمی آن بسیار مشکل‌تر از انسان و دیگر گونه‌ها است.<sup>۵</sup> تا به

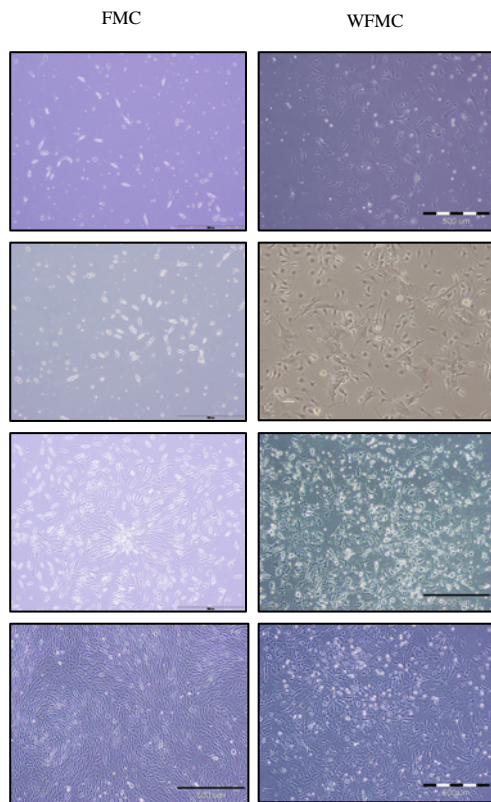
استخوان مطابق پروتکل بالا کشت داده شدند با این تفاوت که ۷۲ ساعت پس از کشت اولیه تعویض محیط کشت انجام گرفت. در این مطالعه از واژه WFCM (Without Frequent Medium Change) برای نام‌گذاری این نوع روش کشت استفاده شده است. Colony Forming Unit-Fibroblast; CFU-F assay برای ارزیابی قدرت تکثیر سلول‌های جداشده، از روش سنجش واحد کلونی فیروپلاستی استفاده شد. بدین ترتیب که ۱۰۰ سلول از پاساژ اول شمارش گردید و در یک دیش ۶۰ میلی‌لیتری به مدت یک هفته کشت گردید. در انتهای دوره کشت، سلول‌ها با استفاده از کریستال ویولت ۳٪ به مدت ۱۰ دقیقه رنگ شدند و کلون‌های حاصل شمارش شد. تمایز به استخوان و چربی: به منظور اثبات ماهیت مزانشیمی سلول‌های مورد بررسی در این مطالعه از تست تمایز به استخوان و چربی استفاده شد. برای این منظور حدود ۵۰۰۰۰ سلول در ظروف شش‌خانه‌ای در محیط DMEM حاوی ۱۵ درصد سرم گاوی و آنتی‌بیوتیک کشت داده شد. پس از مرحله confluency محیط سلول‌ها با محیط تمایز به استخوان DMEM و چربی جایگزین شد. محیط تمایز به استخوان شامل DMEM محتوی ۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر اسکوربیک اسید سه فسفات (Sigma; USA) ، ۱۰ نانومولار دگزامتازون (Sigma; USA) و ۱۰ میلی‌مولار بتا-گلیسرول فسفات (Sigma, USA) و محیط چربی شامل DMEM حاوی ۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر اسکوربیک ۳-فسفات (Sigma; USA) ، ۱۰ نانومولار دگزامتازون (Sigma; USA) و ۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر ایندومتاسین (Sigma, USA) بود. ارزیابی تمایز: در پایان هفته سوم، تمایز سلول‌ها مورد ارزیابی قرار گرفت. برای استخوان از رنگ‌آمیزی آلیزارین رد و برای چربی از رنگ آمیزی اوایل رد استفاده شد. رنگ‌آمیزی آلیزارین رد: تک لایه سلولی با PBS شسته و به مدت ۱۰ دقیقه با متانول (Merck; Germany) فیکس شد و سپس رنگ‌آمیزی با محلول رنگی (۱٪ آلیزارین رد در آب آمونیاکی ۲۵٪) (Sigma, USA) به مدت دو دقیقه انجام شد. در ادامه سلول‌ها با آب مقطر شسته و پس از خشک شدن با میکروسکوپ مشاهده شد. رنگ‌آمیزی اوایل رد: سلول‌ها به مدت یک ساعت در دمای اتاق با فرمالین ۴٪ فیکس شدند و سپس با الکل ۷۰٪ شسته و به مدت ۱۵-۱۰ دقیقه با محلول Oil red ۰/۵٪ (۹۹٪ الکل ایزوپروپانل، Sigma USA) رنگ‌آمیزی شد و در انتها محلول رنگی خارج و سه بار با الکل ۷۰٪ شستشو داده و با میکروسکوپ مشاهده شد.

حال چندین مطالعه به منظور کاهش سلول‌های غیرمزانشیمی و تخلیص سلول‌های مغز استخوان موش انجام گرفته است،<sup>۲۵-۲۱</sup> اما با این وجود همچنان جداسازی سلول‌های فیروپلاستی خالص از مغز استخوان موش به‌عنوان یک مسأله حل‌نشده در تحقیقات سلول‌های بنیادی مزانشیمی موشی مطرح است. لذا در مطالعه حاضر روش نوین و جدیدی برای جداسازی سلول‌های مزانشیمی موشی ارائه شده است. اساس این پروتکل بر تعویض سریع و مداوم محیط کشت (Frequent Medium Change; FMC) در ساعات اولیه از کشت سلول‌های مغز استخوان موش Balb/c است.

## روش بررسی

مطالعه انجام شده از نوع تجربی بود. جداسازی و کشت سلول‌های بنیادی مزانشیمی: موش‌های نژاد Balb/c با سن تقریبی ۶-۸ هفته با روش دررفته کردن مهره‌های گردنی (cervical dislocation) (طبق مصوبه کمیته اخلاق کار با حیوانات آزمایشگاهی دانشگاه تربیت مدرس در سال‌های ۸۶-۱۳۸۵) در آزمایشگاه گروه هماتولوژی دانشگاه تربیت مدرس، کشته شدند. استخوان‌های ران و درشت نی جدا گردید و عضلات و بافت نرم اطراف پاک شد و داخل محیط DMEM قرار داده شد. لوله محتوی استخوان‌های ران و درشت نی بر روی یخ قرار داده شده و به زیر هود منتقل گردید. دو انتهای استخوان‌ها قطع گردیده و با استفاده از سرنگ و سرسوزن شماره ۲۲ مغز استخوان خارج گردید و در دو میلی‌لیتر HBSS حل گردید. در مرحله بعد سلول‌ها با تراکم ۱۰۶×۲۵ سلول در خانه در ظروف شش‌خانه‌ای کشت گردیدند. محیط مورد استفاده DMEM حاوی FBS ۱۵٪ و آنتی‌بیوتیک‌های پنی‌سیلین و استرپتومایسین بود. به فاصله سه ساعت بعد از کشت سلول‌ها، به آرامی محیط کشت سلول‌ها تعویض گردید. در ادامه در یک دوره ۷۲ ساعته، هر هشت ساعت یک بار محیط کشت سلول‌ها تعویض گردید. به مدت دو هفته، هر سه روز یک‌بار محیط کشت سلول‌ها تعویض شد و در پایان این مدت، پاساژ اول انجام گرفت. بدین ترتیب که با استفاده از Trypsin-EDTA (Gibco, Germany) در مدت دو دقیقه سلول‌ها از محیط کشت جدا گردیدند. سلول‌های کنده شده از محیط کشت تحت عنوان پاساژ اول از نظر ویژگی‌های تمایزی و مارکرهای سطح سلولی مورد بررسی قرار گرفتند. برای کنترل، سلول‌های مغز

۱۰۰ سلول کشت یافته به‌طور متوسط ۶۵ کلون تشکیل شد. تمایز به استخوان و چربی: سلول‌های پاساژ اول که به مدت سه هفته در معرض محیط‌های استخوان‌ساز و چربی قرار گرفته بودند با رنگ‌آمیزی اختصاصی آلیزارین رد (برای تمایز به استخوان) و اوایل رد (برای چربی) مورد ارزیابی قرار گرفتند. در محیط تمایز به استخوان سلول‌های کشت شده با روش FMC مناظر نمودول ماندی، که به‌رنگ قرمز در آمده بودند، بیشتری در مقایسه با روش WFMC



شکل- ۱: کشت سلول‌های مغز استخوان موش. ردیف سمت چپ. الف) سه روز پس از آغاز کشت، سلول‌های دوکی شکل منفرد در ظرف کشت مشاهده شد. ب) در روز هشتم، تعداد سلول‌های دوکی شکل زیاد شد. پ) در روز چهاردهم، بیش از ۸۰٪ ظرف کشت توسط جمعیت خالص از سلول‌های دوکی شکل پر شد. ت) جمعیت سلول‌های دوکی شکل در پایان پاساژ اول. ردیف سمت راست. الف) سه روز پس از آغاز کشت، سلول‌های مختلف که در بین آنها سلول‌های دوکی وجود داشت مشاهده گردید. ب) در روز هشتم، مجموعه‌ای هتروژن از انواع سلول‌ها شامل سلول‌های پهن، دوکی شکل و چندوجهی بر کشت غالب شده است. ج) در روز چهاردهم، سلول‌های مدور و دایره‌ای شکل بر سطح سلول‌های چسبیده به محیط کشت قرار گرفتند. د) جمعیت هتروژن سلول‌ها در پایان پاساژ اول (تمام شکل‌ها با میکروسکوپ فاز کنتراست معکوس و بزرگ‌نمایی ۱۰۰ تهیه شده است).

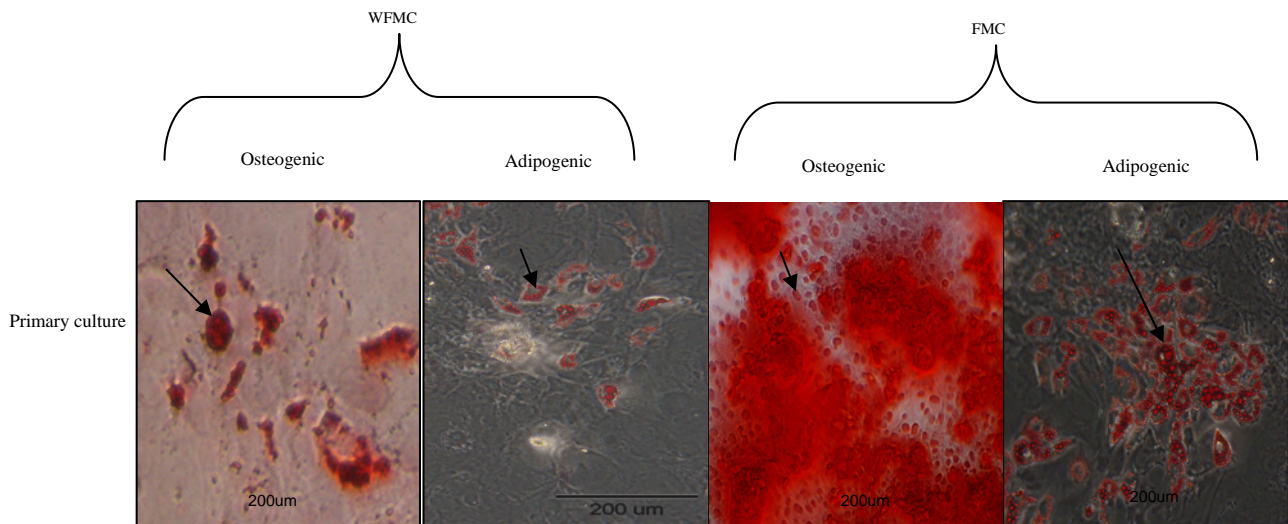
آماده‌سازی سلول‌ها برای فلوسایتومتری: تعداد ۲۰۰۰۰۰ سلول در لوله‌های فالكون ریخته و به هر کدام ۱۰۰ میکرولیتر سرم رت ۳٪ اضافه و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۴°C نگهداری شد. سلول‌ها با ۵۰۰ میکرولیتر بافر شستشو حاوی یک میلی‌لیتر (Fetal Bovine serum: FBS) در صد میلی‌لیتر (Phosphate Buffer Solution: PBS) شسته شدند و پس از سانتریفوژ (۴۰۰g به مدت ۱۰ دقیقه) به مدت ۳۰ دقیقه روی یخ و در یخچال با آنتی‌بادی‌های اولیه CD31, CD34, Sca-1, Vcam-1, c-Kit, CD45, CD11b, Thy 1.2, FITC (فلورسینس ایزوتیوسیانات) (ebioscience) و با CD135, CD44 کونژوگه با PE (فیکواریترین) انکوبه شدند و برای کنترل منفی سلول‌ها با آنتی‌بادی‌های FITC-IgG2a, IgG2b و PE-IgG2a, IgG2b انکوبه شدند. در مرحله بعد سلول‌ها پس از شستشو به مدت ۱۰ دقیقه با ۴۰۰g سانتریفوژ شدند. سپس به سلول‌ها بافر فیکس کننده (پارافرم آلدئید ۱٪ و ۱٪ FBS در PBS) اضافه شد و با دستگاه فلوسایتومتری (Becton Dickenson) و نرم‌افزار WinMDI آنالیز شدند. آنالیز آماری آنتی‌ژن‌های سطح سلول با استفاده از نرم‌افزار تحلیل داده‌های آماری spss ویراست ۱۳، آزمون t-test و به صورت (میانگین  $\pm$  انحراف معیار) بررسی گردید. رسم نمودارها در نرم‌افزار Excel انجام گرفت. مقادیر  $p < 0.001$  معنی‌دار در نظر گرفته شد.

## یافته‌ها

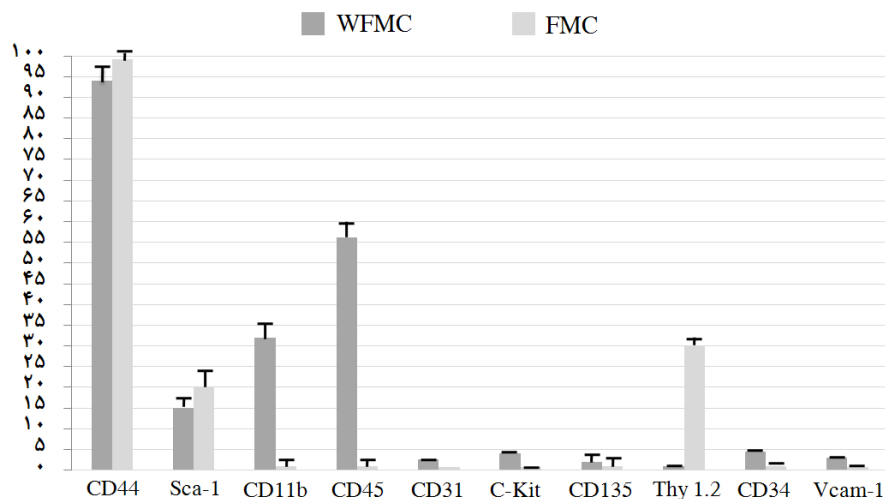
کشت سلول: در روز سوم کشت سلول‌های دوکی شکل چسبندۀ به‌صورت سلول‌های منفرد در ظرف کشت مشاهده گردید (شکل ۱ الف، ردیف سمت چپ). بین روزهای چهارم تا هشتم، بر تعداد سلول‌های دوکی شکل افزوده شد (شکل ۱ ب، ردیف سمت چپ). پس از دو هفته، مجموعه خالص سلول‌های شبه- فیبروبلاستی دوکی شکل با ۷۵-۷۰٪ confluency مشاهده شد (شکل ۱ ج، ردیف سمت چپ). در این زمان به منظور تکثیر سلول‌ها پاساژ اول انجام گرفت. در نمونه کنترل کشت سلولی (بدون تعویض مداوم محیط کشت، WFMC)، جمعیت هتروژن از سلول‌ها با مورفولوژی‌های مختلف از قبیل پهن، دوکی شکل و سلول‌های چندوجهی مشاهده شد و در روزهای آخر کشت سلول‌های مدور و دایره‌ای شکلی بر روی سلول‌های چسبیده به ظرف قرار گرفتند (شکل ۱ الف-ج، ردیف سمت راست). CFU-F assay: براساس نتایج حاصله به‌ازای هر

WFMC در حد بسیار بالایی بیان می‌شوند اما در سلول‌های FMC بیانی مشاهده نشد. مارکرهای CD31, C-Kit, CD34, Vcam-1, CD135, CD31, در سلول‌های FMC بیان نداشتند اما در سلول‌های WFMC کمتر از ۵٪ بیان شدند. مارکرهای CD44, Sca-1 در FMC کمی بیشتر از WFMC بیان شدند. مارکر CD90 در ۳۰٪ از سلول‌های FMC بیان داشت.

مشاهده شد (شکل ۲). در محیط تمایز به چربی سلول‌های کشت شده با روش FMC قطرات چربی بیشتری به رنگ قرمز در مقایسه با روش WFMC مشاهده شد (شکل ۲). مارکرهای سطح سلولی: در نمودار ۱ آنتی‌ژن‌های سطح سلول‌های FMC و WFMC نشان داده شده است. نتایج نشان داد که مارکرهای CD45, CD11b در سلول‌های



شکل - ۲: پتانسیل تمایز سلول‌ها به استخوان و چربی. سلول‌ها با رنگ‌آمیزی الیزارین رد قرمز شده‌اند (محل تشکیل ندول‌های استخوانی با فلش نشان داده شده است) و در نتیجه رنگ‌آمیزی اوایل رد، قطرات چربی قرمز شده‌اند (قطرات چربی که رنگ قرمز گرفته‌اند با فلش نشان داده شده است). میزان تمایز در سلول‌های FMC (تعویض مداوم محیط کشت) در مقایسه با سلول‌های WFMC (بدون تعویض مداوم محیط کشت) بیشتر نمایان است (میکروسکوپ فاز کنتراست معکوس، بزرگ‌نمایی ۱۰۰).



نمودار - ۱: منحنی مقایسه مارکر سطحی سلول‌های کشت شده با روش FMC (تعویض مداوم محیط کشت) و WFMC (بدون تعویض مداوم محیط کشت) ( $p < 0.001$ )

## بحث

سلول‌های بنیادی مزانشیمی استفاده کرده‌اند.<sup>۳۹-۴۱</sup> تا به حال بر اساس اینکه روش چسبیدن به پلاستیک روش ایده‌آل جداسازی سلول‌های بنیادی مزانشیمی موش نمی‌باشد، چند روش مختلف به کار رفته است. در این زمینه، Baddo از تکنیک ایمونودپلشن منفی (Negative Immunodepletion) برای جداسازی mMSCs استفاده کرده‌اند.<sup>۲۴</sup> این محققین پس از کشت سلول‌های آسیپره شده مغز استخوان، با پاساژ و انکوبه کردن سلول‌های مغز استخوان موش‌های نژاد FVB/N با دانه‌های آهن‌ربایی متصل به آنتی‌بادی‌های CD34، CD45، CD11b، اقدام به حذف سلول‌های خونی و جداسازی سلول‌های بنیادی مزانشیمی نمودند و دریافتند در این روش، پس از ایمونو دپلشن، بیان ژن‌های که در تکثیر سلولی و در پیشرفت سیکل سلولی دخالت دارند کاهش می‌یابد که این امر رشد کم سلول‌های بنیادی مزانشیمی را در پی دارد. در ضمن Tropel مشاهده کرد که یک هفته بعد از حذف دودمان گرانولوسیت-مونوسیت با استفاده از دانه‌های آهن‌ربایی متصل به آنتی‌بادی CD11b بعضی از این سلول‌ها در محیط کشت پدیدار می‌شوند.<sup>۴۲</sup> در این مطالعه بدون کمترین استرس بر سلول‌ها و با بهبود روش چسبیدن به کشت پلاستیک از طریق تعویض سریع محیط کشت در ساعات اولیه از کشت سلول‌های مغز استخوان موش، مانع از چسبیدن سلول‌های غیر مزانشیمی به ظرف کشت گردید. از جنبه‌های ناشناخته در مورد سلول‌های بنیادی مزانشیمی موش، معرفی آنتی‌ژن (مارکر) سطحی ویژه این سلول‌ها است. در گزارشات پیشین محققین در مورد مارکر سطحی این سلول‌ها اختلاف نظر داشتند.<sup>۲۴،۲۵</sup> در این مطالعه مارکرهای CD44، CD90، Sca-1 در حد قابل توجهی بیان شد. هرچند این مارکرها به عنوان مارکر سلول‌های غیرخونی، اندوتلیال و سلول‌های خونی مطرح می‌باشند.<sup>۲۳،۳۰</sup> اما به نظر می‌رسد که بعضی از مارکرهای شناخته دودمان‌های سلول‌های اندوتلیالی و خونی، در سلول‌های بنیادی مزانشیم موشی بیان شوند و با این مکانیسم که بسیار ساده و کم هزینه می‌باشد در کوتاه‌ترین زمان ممکن از خاصیت چسبندگی سلول‌های بنیادی مزانشیمی و تعویض مداوم محیط کشت در آغازین ساعات کشت سلول‌های مغز استخوان موش برای تخلیص سلول‌های دوکی بنیادی مزانشیمی استفاده شد. سپاسگزاریم: مطالعه حاضر با حمایت‌های مالی شرکت فن‌آوری بن‌یاخته انجام گرفته و مولفین مراتب تشکر خود را از آقایان امیر آنتی، محمد معصومی دارند.

جداسازی و خلوص سلول‌های بنیادی مزانشیمی موش به علت تعداد کم سلول‌های مزانشیمی در مغز استخوان و رشد ناخواسته سلول‌های غیرمزانشیمی به مراتب مشکل‌تر از دیگر گونه‌های جانوری است.<sup>۲۵</sup> در مطالعه حاضر، سلول‌های شبه-فیروبلاست دوکی شکل با استفاده از تغییر مداوم محیط کشت در ساعات اولیه کشت، از مغز استخوان موش Balb/c جدا گردید. سلول‌های چسبیده مشتق از مغز استخوان شامل فیروبلاست‌ها، سلول‌های اجدادی خونی، ماکروفاژها، سلول‌های اندوتلیالی و چربی می‌باشد.<sup>۲۸-۳۱</sup> مطالعات قبلی نشان دادند این سلول‌ها در کشت سلول‌ها باقی مانده و باعث آلوده‌سازی سلول‌های فیروبلاستی می‌شوند.<sup>۲۹،۳۱</sup> نتایج این مطالعه نشان داد تعویض پی‌درپی محیط کشت مانع از چسبیدن سلول‌های غیر مزانشیمی و خونی به پلیت پلاستیکی کشت می‌شوند. نتایج ما نشان داد مارکرهای CD34، Cam-1، CD31، CD11b، CD45، C-Kit، CD135 در سلول‌های کشت یافته با FMC بیان نمی‌شوند. این مارکرها به عنوان آنتی‌ژن‌های سطحی سلول‌های اندوتلیالی، میلوئیدی و خونی مطرح هستند.<sup>۳۸-۳۰</sup> در سلول‌های کنترل (WFMC)، جمعیت هتروژن با مورفولوژی‌های مختلف مشاهده شد. این جمعیت سلولی تمایز نسبی به دودمان‌های مزانشیمی داشت و بعضی مارکرهای سطحی اشاره شده فوق از جمله CD11b و CD45 در این سلول‌ها در حد بالایی بیان شدند که در راستای گزارش محققین پیشین می‌باشد که حضور سلول‌های خونی در کشت اولیه سلول‌های مغز استخوان موش گزارش دادند.<sup>۲۹،۳۴</sup> با این روش، مجموعه خلوص سلول‌های شبه‌فیروبلاستی با توانایی تکثیر بالا و توان تمایز به دودمان‌های مزانشیمی در دو هفته بعد از کشت اولیه به دست آمد. تمایز به استخوان از روی قرمز شدن ماتریکس معدنی شده (رنگ‌آمیزی الیزارین رد) و تمایز به چربی از قرمز شدن قطرات چربی موجود در سیتوپلاسم سلول‌ها (رنگ آمیزی اوایل رد) نمایان شد. در مجموع عدم بیان مارکرهای شاخص سلول‌ای خونی، مورفولوژی دوکی شکل سلول‌ها، کلونوژنیک بودن و توان تکثیر بالا و تمایز به دودمان‌های مزانشیمی (استخوان و چربی) ما را متقاعد ساخت سلول‌های به دست آمده در این مطالعه جمعیت خلوص از سلول‌های بنیادی مزانشیمی می‌باشند. محققین پیشین به دفعات از این خصوصیات در شناسایی

## References

- Fuchs E, Segre JA. Stem cells: a new lease on life. *Cell* 2000; 100: 143-55.
- 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: 143-7.
- Friedenstein AJ, Gorskaja JF, Kulagina NN. Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs. *Exp Hematol* 1976; 4: 267-74.
- Bianco P, Riminucci M, Gronthos S, Robey PG. Bone marrow stromal stem cells: nature, biology, and potential applications. *Stem Cells* 2001; 19: 180-92.
- Sun S, Guo Z, Xiao X, Liu B, Liu X, Tang PH, et al. Isolation of mouse marrow mesenchymal progenitors by a novel and reliable method. *Stem Cells* 2003; 21: 527-35.
- Prockop DJ. Marrow Stromal cells as stem cells for non-hematopoietic tissues. *Science* 1997; 276:71-74.
- Baksh D, Song L, Tuan RS. Adult mesenchymal stem cells: characterization, differentiation, and application in cell and gene therapy. *J Cell Mol Med* 2004; 8: 301-16.
- Horwitz EM, Gordon PL, Koo WK, Marx JC, Neel MD, McNall RY, et al. Isolated allogeneic bone marrow-derived mesenchymal cells engraft and stimulate growth in children with osteogenesis imperfecta: Implications for cell therapy of bone. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; 99: 8932-7.
- Sasaki M, Honmou O, Akiyama Y, Uede T, Hashi K, Kocsis JD. Transplantation of an acutely isolated bone marrow fraction repairs demyelinated adult rat spinal cord axons. *Glia* 2001; 35: 26-34.
- Hofstetter CP, Schwarz EJ, Hess D, Widenfalk J, El Manira A, Prockop DJ, et al. Marrow stromal cells form guiding strands in the injured spinal cord and promote recovery. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; 99: 2199-204.
- Chen J, Zhang ZG, Li Y, Wang L, Xu YX, Gautam SC, et al. Intravenous administration of human bone marrow stromal cells induces angiogenesis in the ischemic boundary zone after stroke in rats. *Circ Res* 2003; 92: 692-9.
- Schwarz EJ, Alexander GM, Prockop DJ, Azizi SA. Multipotential marrow stromal cells transduced to produce L-DOPA: engraftment in a rat model of Parkinson disease. *Hum Gene Ther* 1999; 10: 2539-49.
- Martin DR, Cox NR, Hathcock TL, Niemeyer GP, Baker HJ. Isolation and characterization of multipotential mesenchymal stem cells from feline bone marrow. *Exp Hematol* 2002; 30: 879-86.
- Kadiyala S, Young RG, Thiede MA, Bruder SP. Culture expanded canine mesenchymal stem cells possess osteochondrogenic potential in vivo and in vitro. *Cell Transplant* 1997; 6: 125-34.
- Devine SM, Bartholomew AM, Mahmud N, Nelson M, Patil S, Hardy W, et al. Mesenchymal stem cells are capable of homing to the bone marrow of non-human primates following systemic infusion. *Exp Hematol* 2001; 29: 244-55.
- Wakitani S, Goto T, Pineda SJ, Young RG, Mansour JM, Caplan AI, et al. Mesenchymal cell-based repair of large, full-thickness defects of articular cartilage. *J Bone Joint Surg Am* 1994; 76: 579-92.
- Awad HA, Butler DL, Boivin GP, Smith FN, Malaviya P, Huibregtse B, et al. Autologous mesenchymal stem cell-mediated repair of tendon. *Tissue Eng* 1999; 5: 267-77.
- Mosca JD, Hendricks JK, Buyaner D, Davis-Sproul J, Chuang LC, Majumdar MK, et al. Mesenchymal stem cells as vehicles for gene delivery. *Clin Orthop Relat Res* 2000; 379 Suppl: 71-90.
- Jessop HL, Noble BS, Cryer A. The differentiation of a potential mesenchymal stem cell population within ovine bone marrow. *Biochem Soc Trans* 1994; 22: 248.
- Meirelles Lda S, Nardi NB. Murine marrow-derived mesenchymal stem cell: isolation, in vitro expansion, and characterization. *Br J Haematol* 2003; 123: 702-11.
- Phinney DG, Kopen G, Isaacson RL, Prockop DJ. Plastic adherent stromal cells from the bone marrow of commonly used strains of inbred mice: variations in yield, growth, and differentiation. *J Cell Biochem* 1999; 72: 570-85.
- Peister A, Mellad JA, Larson BL, Hall BM, Gibson LF, Prockop DJ. Adult stem cells from bone marrow (MSCs) isolated from different strains of inbred mice vary in surface epitopes, rates of proliferation, and differentiation potential. *Blood* 2004; 103: 1662-8.
- Modderman WE, Vrijheid-Lammers T, Löwik CW, Nijweide PJ. Removal of hematopoietic cells and macrophages from mouse bone marrow cultures: isolation of fibroblastlike stromal cells. *Exp Hematol* 1994; 22: 194-201.
- Baddoo M, Hill K, Wilkinson R, Gaupp D, Hughes C, Kopen GC, Phinney DG. Characterization of mesenchymal stem cells isolated from murine bone marrow by negative selection. *J Cell Biochem* 2003; 89: 1235-49.
- Eslaminejad MB, Nikmahzar A, Taghiyar L, Nadri S, Massumi M. Murine mesenchymal stem cells isolated by low density primary culture system. *Dev Growth Differ* 2006; 48: 361-70.
- Tavassoli M, Takahashi K. Morphological studies on long-term culture of marrow cells: characterization of the adherent stromal cells and their interactions in maintaining the proliferation of hemopoietic stem cells. *Am J Anat* 1982; 164: 91-111.
- Dexter TM, Spooncer E, Simmons P, Allen TD. Long-term marrow culture: an overview of techniques and experience. *Kroc Found Ser* 1984; 18: 57-96.
- Zuckerman KS, Wicha MS. Extracellular matrix production by the adherent cells of long-term murine bone marrow cultures. *Blood* 1983; 61: 540-7.
- Xu CX, Hendry JH, Testa NG, Allen TD. Stromal colonies from mouse marrow: characterization of cell types, optimization of plating efficiency and its effect on radiosensitivity. *J Cell Sci* 1983; 61: 453-66.
- Baldwin HS, Shen HM, Yan HC, DeLisser HM, Chung A, Mickanin C, et al. Platelet endothelial cell adhesion molecule-1 (PECAM-1/CD31): alternatively spliced, functionally distinct isoforms expressed during mammalian cardiovascular development. *Development* 1994; 120: 2539-53.
- Kinashi T, St Pierre Y, Springer TA. Expression of glycosphosphatidylinositol-anchored and -non-anchored isoforms of vascular cell adhesion molecule 1 in murine stromal and endothelial cells. *J Leukoc Biol* 1995 Jan; 57(1):168-73.
- Ikuta K, Weissman IL. Evidence that hematopoietic stem cells express mouse c-kit but do not depend on steel factor for their generation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992; 89: 1502-6.
- Simmons PJ, Torok-Storb B. CD34 expression by stromal precursors in normal human adult bone marrow. *Blood* 1991; 78: 2848-53.
- Wang QR, Yan ZJ, Wolf NS. Dissecting the hematopoietic microenvironment. VI. The effects of several growth factors on the in vitro growth of murine bone marrow CFU-F. *Exp Hematol* 1990; 18: 341-7.
- Springer T, Galfrè G, Secher DS, Milstein C. Monoclonal xenogeneic antibodies to murine cell surface antigens: identification of novel leukocyte differentiation antigens. *Eur J Immunol* 1978; 8: 539-51.
- Ledbetter JA, Herzenberg LA. Xenogeneic monoclonal antibodies to mouse lymphoid differentiation antigens. *Immunol Rev* 1979; 47: 63-90.
- Oostendorp RA, Dörmer P. VLA-4-mediated interactions between normal human hematopoietic progenitors and stromal cells. *Leuk Lymphoma* 1997; 24: 423-35.

38. Janowska-Wieczorek A, Majka M, Ratajczak J, Ratajczak MZ. Autocrine/paracrine mechanisms in human hematopoiesis. *Stem Cells* 2001; 19: 99-107.
39. Van Vlasselaer P, Falla N, Snoeck H, Mathieu E. Characterization and purification of osteogenic cells from murine bone marrow by two-color cell sorting using anti-Sca-1 monoclonal antibody and wheat germ agglutinin. *Blood* 1994; 84: 753-63.
40. Muraglia A, Cancedda R, Quarto R. Clonal mesenchymal progenitors from human bone marrow differentiate in vitro according to a hierarchical model. *J Cell Sci* 2000; 113: 1161-6.
41. Trowbridge IS, Lesley J, Schulte R, Hyman R, Trotter J. Biochemical characterization and cellular distribution of a polymorphic, murine cell-surface glycoprotein expressed on lymphoid tissues. *Immunogenetics* 1982; 15: 299-312.
42. Tropel P, Noël D, Platet N, Legrand P, Benabid AL, Berger F. Isolation and characterisation of mesenchymal stem cells from adult mouse bone marrow. *Exp Cell Res* 2004; 295: 395-406.

## Isolation of mesenchymal stem cells from mouse bone marrow: frequent medium change method

### Abstract

Soleimani M.<sup>1\*</sup>  
Nadri S.<sup>2,3</sup>  
Izadpanah R<sup>4</sup>

1- Department of Hematology,  
Tarbiat Modares University

2- Department of Biochemistry,  
Payam Noor University, Tehran

3- Stem Cells and Tissue  
Engineering Department, Stem  
Cell technology Company,  
Tehran

4- Department of Gene  
Therapy, Tulane University,  
USA

**Background:** MSCs have been isolated from a variety of mammals by the plastic adherence method. However, this method can be problematic due to the unwanted growth of hematopoietic cells and non-MSCs. The potential of MSCs to differentiate along multiple lineages is the key to the identification of stem cell populations in the absence of molecular markers. In the present study, we describe a homogeneous population of MSCs from mouse bone marrow isolated using an improved plastic adherence method that employs frequent medium change (FMC) at the initial hours of harvested bone marrow cell culture.

**Methods:** Balb/c mice were sacrificed and whole bone marrow cells were aspirated from the femur and tibia and then cultivated in six-well plates. After 3-4 hours of culture, old medium was removed and fresh medium was added. FMC was performed every eight hours over a 72 hour period. When primary cultures became nearly confluent, the first passage was performed. These cells were then used for further examination. To investigate their mesenchymal nature, the cells were allowed to differentiate into mesenchymal lineages and examined at each passage up to the tenth passage for surface antigens by flow cytometry.

**Results:** We achieved purified populations of fibroblast-like cells in the two weeks after culture initiation. The cells were capable of differentiating into osteocytes and adipocytes. Isolated MSCs were reactive to the CD44, Sca-1, and CD90 cell surface markers. MSCs were negative for hematopoietic surface markers such as CD34, CD11b, CD45, CD31, CD106, CD117 and CD135.

**Conclusions:** This protocol provides an efficient isolation of homogeneous populations of MSCs from mouse bone marrow.

**Keywords:** Murine, bone marrow, mesenchymal stem cells, isolation

\*Corresponding author: Tarbiat  
Modares University  
Tel: +98-21-88953851  
email: soleim\_m@modares.ac.ir