تمایز سلول‌های بنیادی مشتق از کوریون جفت انسان به سلول‌های استئوبلاست

*عباس علی‌آقایی شفیع‌آبادی(MSc)[1]- دکتر سید سعید سیدجعفری(Ph D)[1]

*نویسنده مسئول: کرمان، دانشگاه علوم پزشکی کرمان، دانشکده پزشکی، آزمایشگاه سلولی و مولکولی گروه آناتومی

پست الکترونیک: aghaei60@gmail.com

تاریخ دریافت مقاله: ۸۷/۱۲/۱۹ تاریخ پذیرش: ۸۸/۲/۲۳

چکیده

مقدمه: سلول‌های بنیادی مزانشیمی(MSCs) با منشأ مختلف، در شرایط کشت‌های خاص توانایی تمایز به رده‌های متفاوت سلولی را دارند. اخیراً به نظر می‌رسد جفت انسان منبع خوبی برای مطالعه در این مورد باشد. سلول‌های بنیادی مشتق از پرزهای کوریونی جفت انسان، سلول‌هایی با قدرت تکثیر بالا و چندتوانی هستند که قادرند به سلول‌های دیگر تمایز یابند.

هدف: تمایز سلول‌های بنیادی مشتق از کوریون جفت انسان به سلول‌های استئوبلاست.

مواد و روش‌ها: سلول‌های بنیادی از پرزهای کوریونی جفت ترم انسان جدا، سپس با محلول کلاژناز تیپ ۱ هضم شدند. سلول‌ها را جمع‌آوری کرده، در محیط DMEM/F12کشت دادیم. تمایز استئوژنی با کشت این سلول‌ها در محیط حاوی DMEM/F12 با FBS ۱۰٪ همراه با ۱/. میکرومولار دگزامتازون و ۵۰ میکرومولار اسید آسکوربیک ۳ فسفات القا شد. برای ارزیابی ماتریکس معدنی شده رنگ‌آمیزی von kossa بکار رفت.

نتایج: سلول‌های بنیادی مشتق از پرزهای کوریونی جفت هنگام کشت جمعیتی از سلول‌هایی با مورفولوژی شبه فیبروبلاست بودند. این سلول‌ها در محیط کشت استئوژنی حاوی دگزامتازون و فسفات آسکوربات پس از ۷ روز تغییر مورفولوژی نشان دادند و بتدریج از حالت کشیده و فیبروبلاستی به گرد و مکعبی درآمدند. سلول‌های کشت داده شده در حضور عوامل استئوژن که با von kossa رنگ‌آمیزی شده بودند برای ساختارهای ندولی معدنی شده مثبت بودند. ترشح ماتریکس خارج سلولی کلسیفیه، به شکل ندول‌های تیره دیده می‌شد ولی در گروه کنترل که حاوی سلول‌های بنیادی مشتق از کوریون در محیط کشت بدون عوامل استئوژن(دگزامتازون و آسکوربات فسفات) بود، دیده نمی‌شد.

نتیجه‌گیری: سلول‌های بنیادی مشتق از کوریون جفت می‌توانند تمایز استوژنی پیدا کنند. بنابراین نتایج این مطالعه in vitro پیشنهاد می‌کند که سلول‌های بنیادی مشتق از کوریون جفت می‌توانند منابع آلوژنی برای مهندسی بافت در بیماری‌های استخوان باشند.

کلید واژه‌ها: استئوبلاستوم/ سلول‌های بنیادی مزانشیمال/ کوریون

مجله دانشگاه علوم پزشکی گیلان، دوره هجدهم شماره ۷۱، صفحات: ۶-۱

مقدمه

سلول‌های بنیادی مزانشیم (MSCs) از منابع مختلفی بدست می‌آیند و قادرند در شرایط کشت خاص به سایر دودمان‌های سلولی تمایز یابند(۳-۱). به نظر می‌رسد جفت انسان، خون بند ناف و آمنیون منبع خوبی برای مطالعه سلول‌های بنیادی مزانشیم باشد چون براحتی در دسترس‌اند و کاربرد آنها مشکل اخلاقی به دنبال ندارد (۶-۴). سلول‌های بنیادی مشتق از کوریون که از جفت‌های سه ماهه اول و از جفت کامل(ترم) جدا شده بودند توانستند به سایر سلول‌های دودمان مزودرم مثل استئوبلاست، کندروسیت و آدیپوسیت تمایز یابند. البته این سلول‌ها نشان دادند که قادرند به سلول‌هایی با منشا اکتودرم مثل سلول‌های عصبی نیز تمایز یابند. گفته شده سلول‌های بنیادی مشتق از جفت پلاستی‌سیته بالا دارند ولی هنوز اطلاعات اندکی در این مورد وجود دارد(۹-۷).

سلول‌های بنیادی مشتق از کوریون در سطح خود نشانگرهایی مثل CD90,CD73,CD49e MHC1, CD29, CD166, CD105 بیان می‌کنند(۷).

تکامل استخوان شامل مراحل مختلفی مثل تکثیر سلول‌های استئوپروژنیتور در شروع تمایز استوئیدها به استئوبلاست‌هاست. محصول اصلی استئوبلاست‌ها رسوب خارج سلولی قابل مشاهده مانند رسوب اصلی کلسیم و کلاژن است(۱۰). به‌نظر می‌رسد چندین عوامل شناخته شده معدنی‌شدن ماتریکس خارج سلولی که توسط استئوبلاست‌ها In vitro تولید می‌شود را افزایش دهد. یکی از این عوامل اسید آسکوربیک است که سبب تحریک رسوب ماتریکس خارج سلولی تولید شده توسط استئوبلاست‌ها می‌شود. همچنین ثابت شده که اسید اسکوربیک سبب مینیرالیزاسیون رده‌های سلولی-MC3T3

۱. کرمان، دانشگاه علوم پزشکی کرمان، دانشکده پزشکی، آزمایشگاه سلولی و مولکولی گروه آناتومی

E1 و رده C1 مشتق از تراتوکارسینومای موش می‌شود (۱۲-۱۱). استئوبلاست‌ها پیش از تمایز ماتریکس کلاژن ترشح می‌کنند. در آزمایشگاه(In vitro)، مهارتولیدکلاژن‌در نبودن اسید آسکوربیک سبب بلوک تمایز استئوبلاست‌ها می‌شود (۱۳). جفت انسان منبع مناسبی برای بدست‌آوردن سلول‌های بنیادی مزانشیم است و چون سلول‌های بنیادی مشتق از جفت قابلیت چندتوانی‌دارند، در این مطالعه برآن شدیم تا در آزمایشگاه(In vitro) قابلیت تمایز این‌سلول‌ها را به استئوبلاست‌تحت‌تاثیرعوامل‌تمایزخاصی بررسی‌کنیم.

مواد و روش‌ها

جداسازی سلول‌های بنیادی مشتق از کوریون جفت: جفت‌های کامل(ترم) از مادرانی که به روش سزارین زایمان کرده‌بودند تهیه و به آزمایشگاه منتقل شد. پس از جداکردن پرده آمنیون و لایه کوریونی، برش‌هایی بر جفت ایجاد کرده و بافت کوریون به دقت جدا و به لوله‌های فالکون حاوی ۷ میلی‌لیتر محلول فسفات بافر سالین (PBS) و آنتی‌بیوتیک منتقل شد. نمونه‌ها و محیط کشت به دقت با PBS شسته شدند و سپس نمونه‌ها در زیر هود، در درون یک بشقاب پتری به قطعه‌های کوچک بریده شدند. این قطعه‌ها به یک لوله حاوی ۵ میلی‌لیتر کلاژناز تیپ۱(270 u/ml) منتقل شده و به مدت ۴۵ دقیقه در این محلول نگهداری شدند. لوله حاوی آنزیم ونمونه‌ها هر ۱۰ دقیقه چند بار تکان داده شدند تا سلول‌های بیشتری از بافت‌ها آزاد شوند. بافت‌ها پس از ۴۵ دقیقه از محلول حذف شدند و حجم برابری از سرم جنین گاو FBS و محیط کشت به لوله اضافه شد تا فرایند هضم خنثی شود. سپس، نمونه‌ها به مدت ۵ دقیقه در دور 1500 rpm سانتریفوژ شدند و پس از حذف محیط روئی، محیط زیرین که حاوی سلول‌ها بود، پس از پیپت‌کردن و شمارش سلول با تریپان بلو به فلاسک‌های کشت T25 حاوی محیط کشت DMEM/F12 همراه با 20% FBS و پنی‌سیلین/ استرپتومایسین و آمفوتریسین B منتقل شدند. سلول‌ها به مدت یک شب در دمای ۳۷ درجه در 5% CO2 و 95%O2 انکوبه شدند. روز بعد از آن تمام محیط کشت را خالی کرده و محیط کشت تازه‌ای به فلاسک حاوی سلول‌ها اضافه شد. این کار برای حذف گلبول‌های قرمزی به‌کار می‌رود که ممکن است در حین روند جداسازی بافت وجود داشته باشد. سلول‌ها به مدت ۳ هفته انکوبه شدند. پس از رسیدن سلول‌ها به تراکم مناسب، با تریپسین ٪۲۵/. پاساژ داده شدند.

تمایز سلول‌های بنیادی مشتق از کوریون جفت به استئوبلاست: پس از پاساژ دوم سلول‌ها، برای تمایز به استئوبلاست، در درون بشقاب کشت داده شدند و پس از رسیدن سلول‌ها به تراکم مورد نظر، محیط کشت به سمت تمایز استئوبلاستی تغییر یافت. این محیط شامل DMEM/F12 و 10% FBS ، 1μM دگزامتازون و 50μM اسید آسکوربیک ۳- فسفات بود. در گروه کنترل سلول‌ها فقط در محیط کشت DMEM/F12 و 10% FBS کشت داده شدند. هر دوروز یک بار نصف محیط کشت قبلی با محیط کشت جدید تعویض می‌شد و روزانه سلول‌ها با میکروسکوپ اینورت بررسی می‌شدند.

رنگ‌آمیزی von kossa: پس از یک هفته تمایز، تمام محیط کشت سلول‌ها خالی شد و سلول‌ها یک بار با PBS شسته شدند. سپس، سلول‌ها با محلول بافری پارافرمالدئید ۴٪ ثابت شدند. برای رنگ‌آمیزی سلول‌های فیکس شده، آنها را مجاور نیترات نقره ۵٪ در تاریکی قرار دادند و پس از یک شب سلول‌ها را با آب مقطر شسته و با نور UV مواجه کردند. سپس، نمونه‌ها یک بار با محلول تیوسولفات سدیم شسته شدند و زیر میکروسکوپ نوری معمولی بررسی قرار شدند.

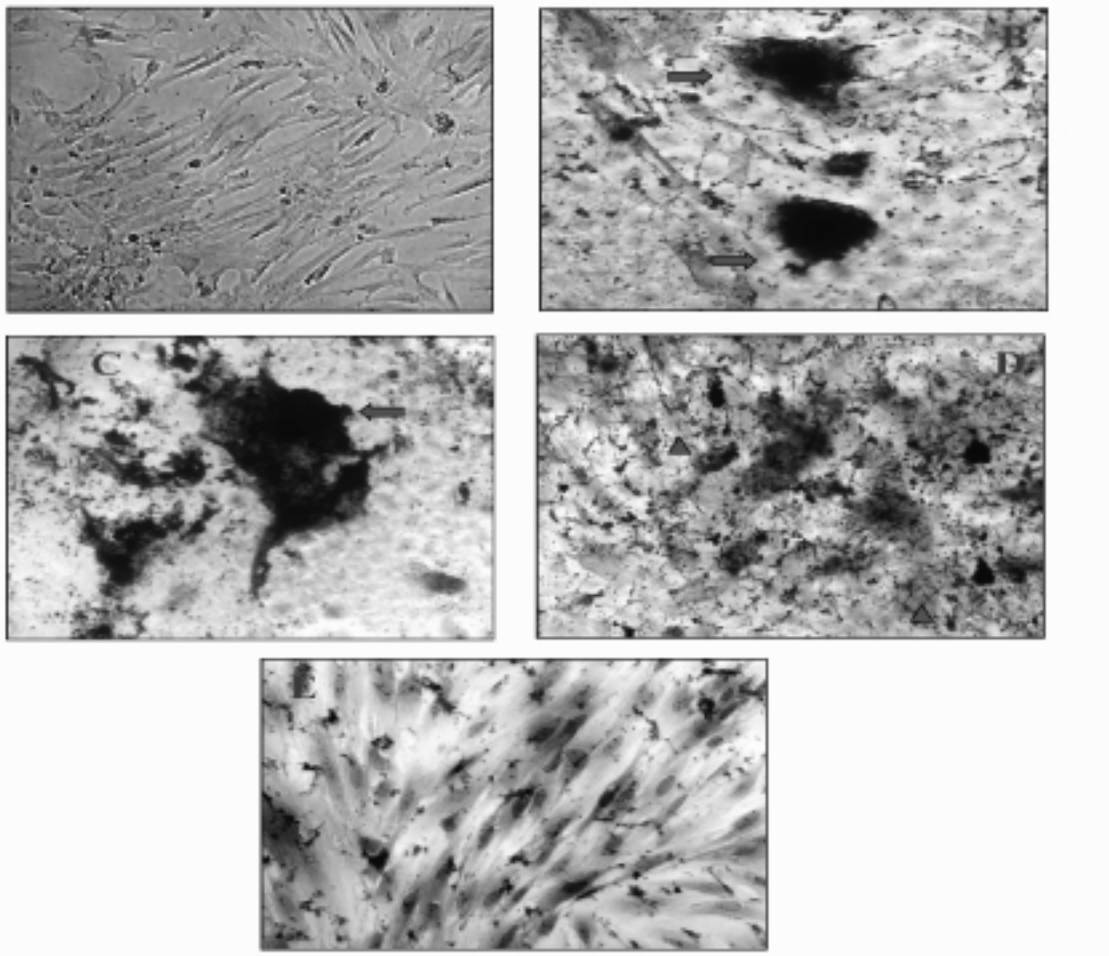
توضیح: رنگ‌آمیزی von kossa به‌طور شایع در شناسایی رسوب کلسیم توسط سلول‌های استئوبلاست بکار می‌رود به‌طوری‌که حتی در برخی بررسی‌ها تنها وسیله شناسایی تمایز سلول‌های بنیادی به رده‌های استخوانی بوده است

نتایج

یک هفته پس از کشت سلول‌های بنیادی مشتق از کوریون

جفت، شکل‌های فیبروبلاستی و ستاره‌ای در کف فلاسک دیده شد. سلول‌ها به مرور پهن شده و شروع به تکثیر کردند. سرعت دو برابرشدن جمعیت آنها در حدود ۳ تا ۴/۵ روز بود(شکل A). پس از تماس سلول‌ها با محیط استئوژن(آسکوربات فسفات و دگزامتازون)، سلول‌ها بتدریج از حالت دوکی خارج شده و بیشتر گرد یا مکعبی شدند و زائده‌های خود را از دست دادند. تعدادی از سلول‌ها نیز به همان حالت فیبروبلاست باقی ماندند. رنگ‌آمیزی von kossa کاملاً وجود ندول‌های معدنی شده کلسیم را در محیط نشان می‌داد(شکل‌های Bو C). ولی در گروه کنترل که سلول‌های بنیادی فقط در محیط کشت حاوی سرم کشت داده شده بودند این ندول‌ها دیده نشد یعنی فقط سلول‌های بنیادی کوریونی و هسته آنها دیده‌می‌شد (شکل E).

ظهور ندول‌های سیاه رنگ و معدنی شده کلسیم پس از ۷ روز در گروه سلول‌های کشت داده شده در حضور عوامل تمایز نشاندهنده تمایز سلول‌های بنیادی کوریون به استئوبلاست بود که با رسوب کلسیم موجود در محیط با رنگ‌آمیزی به خوبی قابل تشخیص بودند. به علاوه، به‌نظر می‌رسید که وجود تیغه‌هایی در گروه تمایز نشان‌دهنده رسوب بلورهای هیدروکسی آپاتیت در محیط باشد که این تیغه‌ها در گروه کنترل دیده نمی‌شدند (شکل D).



شکل A- سلول‌های بنیادی مزانشیمال مشتق از کوریون جفت، سلول‌های دارای مورفولوژی دوکی شکل هستند. B و C- رنگ‌آمیزی von kossa ، وجود ندول‌های معدنی که به رنگ سیاه دیده می‌شوند. سلول‌های تمایز یافته سبب رسوب کلسیم روی خودشان شده و درنتیجه به رنگ سیاه دیده می‌شوند. D- وجود تیغه‌های معدنی شده که به نظر رسوب بلورهای هیدروکسی آپاتیت را نشان می‌دهد و با فلش مشخص شده است. E- سلول‌های مزانشیمال مشتق از کوریون که بدون فاکتورهای تمایزی کشت داده شدند. رنگ آمیزی هیچ ندول معدنی را نشان نمی‌دهد و فقط هسته سلول‌ها دیده می‌شود.

بحث و نتیجه‌گیری

جفت منبع سرشاری از سلول‌های بنیادی مزانشیمی (MSCs) است و ما قادریم با روش‌های معمولی کشت سلولی، سلول‌های بنیادی مشتق از تمام قسمت‌های جفت را اعم از پرده آمنیون، کوریون و ماتریکس بند ناف جدا کنیم. در مراحل اولیه کشت سلول‌های بنیادی مشتق از کوریون جفت، سلول‌های شبه فیبروبلاست و غیرفیبروبلاست دیده شدند اما به هر حال پس از چند پاساژ فقط سلول‌های شبه فیبروبلاست توانستند در محیط رشد و تکثیر یابند. هیچ تفاوت مورفولوژی بین سلول‌های بنیادی مزانشیمی کوریون جفت، مایع آمنیوتیک و ماتریکس بند ناف که ما جدا کرده بودیم وجود نداشت و تقریبا هر سه گونه سلولی از این لحاظ یکسان بودند (توضیح: نتایج این یافته چاپ نشده و در حین انجام پروژه بدست آمده بود چون ما غیر از کوریون از دیگر قسمت‌های جفت نیز توانستیم سلول‌های بنیادی تهیه کنیم. این بررسی فقط بر سلول‌های کوریون جفت انجام شد و یافته مذکور فقط مقایسه‌ای بود). استفاده از سلول‌های بنیادی مزانشیمی در مهندسی بافت برای ترمیم ضایعات اسخوانی می‌تواند از مهم‌ترین نتایج استفاده از این سلول‌ها در طب پیوند باشد. مثلاً مکعب‌های سرامیکی که به دقت توسط سلول‌های بنیادی مزانشیمال که به استئوبلاست‌ها تمایز یافته بودند پر شد و در ترمیم استخوان فمور در رت استفاده شد. نتایج نشان داد که در حیواناتی که از این سیستم مهندسی بافت در ترمیم شکستگی استفاده شد، ترمیم ضایعه بهتر صورت گرفت(۱۴). در این تحقیق برای بررسی تمایز سلول‌های بنیادی مشتق از کوریون به استئوبلاست‌ها، به نظر حضور دگزامتازون ضروری می‌رسید. دگزامتازون شکل تغییر یافته گلوکوکورتیکوئیدها و قادر به تمایز سلول‌های بنیادی به سمت استئوبلاست‌ها است(۱۵و۱۶). سلول‌های بنیادی به حضور دگزامتازون در محیط کشت به شکل فشرده‌شدن در محیط پاسخ می‌دهند. این سلول‌ها از حالت دوکی به شکل گرد یا چند وجهی درآمدند. البته تعدادی از سلول‌ها نیز به همان حالت فیبروبلاستی باقی ماندند. این در نتایجی که ما بدست آورده بودیم نیز دیده شد. وجود دگزامتازون به تنهایی قادر است که کلونی‌های حاصل از کشت سلول‌های بنیادی مشتق از کوریون جفت را به حالت فشرده درآورد ولی این کلونی‌ها قادر به تلاقی نیستند. نتایج بررسی بر MSCs انسانی نشان داد که افزودن دگزامتازون در مقادیر فیزیولوژی باعث تحریک تمایز سلول‌های استرومایی می‌شود(۱۶). مطالعات قبلی نیز نشان داده بود که استفاده از هورمون‌های گلوکوکورتیکوئیدی در محیط کشت سلول‌های بنیادی مشتق از مغز قرمز استخوان باعث افزایش فعالیت‌های متابولیک مانند افزایش سنتز آلکالن فسفاتاز و کلاژن تیپ یک در آنها می‌شود که نشانه تمایز این سلول‌ها به سلول‌های استئوبلاست است(۱۶).

نتیجه: جفت منبع سرشاری از سلول‌های بنیادی است و استفاده از سلول‌های بنیادی مشتق از جفت دارای مزایایی چون نداشتن مشکل اخلاقی و دسترسی آسان به آن است. سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از کوریون جفت می‌توانند کاندیدایی مناسب برای تمایز به رده‌های استخوانی باشند و می‌توان از این سلول‌ها در درمان انواع ضایعات استخوانی استفاده کرد.

منابع

1. Pittenyer MF. Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, et al. Multilineage Potential Of Adult Human Mesenchymal Stem Cells. Science 1999; 248: 143-147.

2. Zuk PA, Zhu M, Ashjiam PA, Deugarte DA, Hung JI, Mizuno H, Alfonso ZC, et al. Human Adipose Tissue Is A Source Of Multipotent Stem Cells. Mol Biol Cell 2002; 13: 4279-4295.

3. Kogler G, Sensken S, Airey JA Trapp T, Muschen M, Feldhan N, et al: A New Human Somatic Stem Cell From Placental Cord Blood

With Intrinsic Pluripotent Differentiation Potential J Exp Med 2004;200:123-135.

4. Ochsenbein-Kolble N, Bilic G, Hall H, Huch R, Zimmermann R. Inducing Proliferation Of Human Amnion Epithelial and Mesenchymal Cells For Prospective Engineering Of Membrane Rapair. J Prinat Med 2003; 31: 287-294.

5. Fu YS, Cheng YC, Lin M Y, Cheng H, Chu Pm, et al. Conversion Of Human Umbilical Mesenchymal Stem Cells In Wartons Jelly To Dopaminergic Neurons In Vitro Potential Therapeutic Application For Parkinsonism. Stem Cells 2006; 24(1): 115-24.

6. Li CD, Zhang WY, Li HL, Jiang XX. Isolation and Identification of A Multilineage Potential Mesenchymal Cell From Human Placenta. Placenta 2005; [E Pub Ahead Of Print].

7. C.Bettina Portmann-Lanz, Andreina Schoeberlein , Alexander Huber, et al. Placental Mesenchymal Stem Cells Potential Autologous Graft For Pre -And Perinatal Neuroregeneration. American Journal Of Obsterics And Gynecology 2006; 194: 667-673.

8. Miki T,Lehmann T,Cai H Stolz DB, Strom SC. Stem Cell Characteristics Of Amniotic Epithelial Cells . Stem Cells 2005; 23:(10): 1549-59.

9. Tamagawa T, Ishiwata I,Saitos : Establishment And Characterization Of A Pluripotent Stem Cell Line Derived From Human Amniotic Membarane And Initiation Of Germ Layers In Vitro. Hum Cell 2004; 17: (3): 151-6.

10. Termine JD, Robey PG. Bone Matrix Proteins And The Mineralization Process. In: Favus M J (Ed) Primer on the Metabolic Bone Disease and Disorders Of Mineral Metabolism. Lippin Cott-Raven,Philadelphia.

11. Flanceschi R T, Lyer BS Relationship Between Collag en Synthesis And Expression Of The Osteoblast Phenotype In MC3 T3 –E Cells. J. Bone Miner Res 1992; 7(2):235-246.

12. Chentoufi J,Hott M,Lamblin D, Buc-Caron M H, et al. Kinetics Of In Vitro Mineralization By An Osteogenic Clonal Cell Line (C1) In Vitro Modeling Of The Bone Implant Interface.. Anat Rec 1993; 245(2): 426-445.

13. Price PA, Baukol SA. 1,25dihydroxy Vitamin D3 Increases Synthesis of Vitamin K-Dependent Bone Protein By Osteosarcoma Cells. J Biol Chem 1980; 255(240): 11660-11663.

14. Kadiyala S, Jaiswal N, Bruder SP. Culture Expanded, Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells Can Regenerate A Critical –Sized Segmental Bone Defect. Tissu Eng 1997; 6(2):125-34.

15. Neelam Jaiswal, Stephen E, Haynes Worth, Amoid I, Caplan, Scottp,Bruder. Osteogenic Differentiation Of Purified , Culture-Expanded Human Mesenchymal Stem Cells In Vitro. J Cell Biochem 1977; 64: 295-317.

16. Bellws CG, Aubin JE, Jeersche JNM. Physiological Concentration Of Glucocortocoids Stimulate Formation Of Bone Noudules From Isolated Rat Calvaria Cells In Vitro. Endocrinology 1987; 121: 1985-1992.

Differentiation of Human Placenta-derived Chorionic Stem Cells into Osteoblasts

*Ali Aghaei Shafi Abadi A.(MSc)[1] - Seyyed Jaafari S.S.(Ph D)[1]

*** Corresponding Author:** Cellular and Molecular Laboratory, Medical Faculty, Kerman University of Medical Sciences, Kerman, Iran

E-mail: aghaei60@gmail.com

Received: 9/Mar/2009 **Accepted: 13/May/2009**

Abstract

Introduction: Mesenchymal Stem Cells (MSCs) from various sources are capable of differentiating into different cell lineages under proper culture condition. Recently, human placenta appeared on the stage in the search for MSCs. Human derived chorionic villi stem cells, are cells with high proliferation and multipotential and will be differentiate other cells.

Objective: Differentiation of Human Placenta-derived Chorionic Stem Cells into Osteoblasts.

Materials and Methods: Chorionic derived Villi Stem Cells isolated from the human term placenta. Cells collected and cultured at DMEM/F12 medium. Osteogenic differentiation was induced with DMEM/F12 media(10%FBS) with ./1µM dexamethasone and 50µM Ascorbic Acid 3-Phosphate. Mineralized matrix was evaluated by von kossa staining.

Results: The chorionic stem cells when plated, exhibited a population of fibroblast –like cells morphologically. This cells in osteogenic media containing Dexamethasone and Ascorbat Phosphate exhibited morphologic changes in cell structure after 7 days in culture. Cells changed from an elongated fibroblastic appearance to a rounded more cuboidal shape.The cells cultured with osteogenic factors were stained positively for mineralized nodular structures, as confirmed by von kossa staining. Secretion of calcified extracellular matrix was observed as black nodules. Secretion of cacified extracellular matrix was not observed in control group containing only chorionic stem cells without osteogenic media.

Conclusion: we have reported osteogenic differentiation with using placenta derived chorionic stem cells. The results of these in vitro studies suggested that placenta derived chorionic stem cells one of the possible allogeneic sources for tissue engineering in the bone diseases

Key words: Chorion/ Mesenchymal Stem Cells/ Osteoblast

Journal of Guilan University of Medical Sciences, No: 71, Pages:1-6

1. Cellular and Molecular Laboratory, Medical Faculty, Kerman University of Medical Sciences, Kerman, Iran