Physiology and Pharmacology, 13 (1), 57 - 67
Spring 2009 [Article in Persian]

Physiology and Pharmacology

Bromoindirubin-3-Oxime treatment enhances the in vitro proliferation and viability of rat marrow-derived mesenchymal stem cells

Mohamadreza Baghaban Eslaminejad [1,3*], Farimah Salami [2], Malek Soleymani Mehranjani [2], Mohammad Hossein Abnoosi [2], Poopak Eftekhari-Yazdi [3]

1. Dept. Stem Cell, Cell Sciences Research Center, Royan Institute, ACECR, Tehran, Iran
2. Dept. Biology, Arak University, Arak, Iran
3. Dept. Embryology, Reproductive Medicine Research Center, Royan Institute, ACECR, Tehran, Iran

Received: 26 Aug 2008 **Revised: 12 Feb 2009** **Accepted: 19 Feb 2009**

Abstract

Introduction: Previous investigations have indicated that the presence of BIO (6-Bromoindirubin-3-Oxime) in the culture medium of some cell types enhances both cell proliferation and viability. The aim of the present study was to investigate the effect of BIO on rat marrow-derived mesenchymal stem cells (MSCs) expansion in culture.

Methods: In the present experimental study, bone marrow cells from 7 rats were plated in the presence of 0.05, 0.01, 0.1, 1 and 1.5 µM of BIO and expanded through 3 successive subcultures. During the cultivation period, the cultures were statistically compared in terms of indices of cell growth including the diameter and number of colonies, population doubling number (PDN) and the number of viable cells. Passaged-3 cells from all groups were examined for their differentiation capacity into bone and adipose cells.

Results: According to our results, the largest colonies were formed in the cultures with 0.1 and 1 µm BIO with diameters of 1262.27 ± 43.96 and 1335.71 ± 19.16 micrometer, respectively ($P<0.05$). These 2 groups were also superior over other experimental and control groups in terms of colonies numbers. During 3 successive passages, significantly more PDN was occurred in 0.1 and 1 µM BIO-treated cultures compared with other experimental and control groups ($P<0.05$). Additionally, in these two BIO-treated cultures, the number of viable cells was significantly higher than that in other BIO-treated cultures as well as the control group ($P<0.05$). Alizarin red staining for bone and oil red for adipose cells indicated that the cells from all studied groups maintained the differentiation potential into bone and adipose cells.

Conclusion: Our findings indicate that the presence of BIO in marrow cell cultures enhances the in vitro cell expansion and viability.

Keywords: Mesenchymal stem cells, rat, BIO, proliferation.

* Corresponding author e- mail: eslami@royaninstitute.org
Available online @: www.phypha.ir/ppj

فیزیولوژی و فارماکولوژی ۱۳ (۱)، ۵۷ – ۶۷
بهار ۱۳۸۸

فیزیولوژی و فارماکولوژی

تیمار با BIO سبب افزایش میزان تکثیر و توان زیستی سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از مغز استخوان موش صحرایی در محیط کشت می‌شود.

محمدرضا باغبان اسلامی‌نژاد[۱،۳*]، فریماه سلامی[۲]، ملک سلیمانی، مهرنجانی[۲]، محمدحسین آبنوسی[۲]، پوپک افتخاری یزدی[۳]
۱. گروه سلول‌های بنیادی، مرکز تحقیقات علوم سلولی جهاد دانشگاهی، پژوهشکده رویان، تهران
۲. بخش زیست شناسی، دانشگاه اراک، اراک
۳. گروه جنین شناسی، مرکز تحقیقات پزشکی تولید مثل، پژوهشکده رویان جهاد دانشگاهی، تهران

دریافت: ۴ شهریور ۸۷ بازبینی: ۲۳ بهمن ۸۷ پذیرش: ۳۰ بهمن ۸۷

چکیده

مقدمه: بر اساس مطالعات پیشین، حضور BIO (6-Bromoindirubin-3′-Oxime) در محیط کشت برخی سلول‌ها سبب افزایش بقا و تکثیر آن می‌شود. هدف تحقیق حاضر بررسی اثرات این ماده بر تکثیر سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از مغز استخوان موش صحرایی است.

روش‌ها: در این مطالعه تجربی، سلول‌های مغز استخوان ۷ سر موش صحرایی در حضور غلظت‌های ۰/۰۱، ۰/۰۵، ۰/۱، ۱ و ۱/۵ میکرومولار BIO کشت شد و با انجام سه پاساژ متوالی تکثیر گردید. کشت سلول در گروه‌های مختلف، در طول مدت کشت از لحاظ برخی شاخص‌های رشد شامل قطر و تعداد کلونی‌های تشکیل شده، میزان دو برابر شدگی جمعیت سلولی و تعداد سلول‌های زنده مقایسه شد. در پایان سلول‌های پاساژ ۳ در گروه‌های مختلف از لحاظ حفظ توان تمایز به استخوان و چربی ارزیابی شد.

یافته‌ها: بر اساس نتایج، بزرگترین کلونی‌ها در گروه‌های ۱/ ۰ و۱ میکرومولار و به ترتیب با قطر ۴۳/۹۶ ±۱۲۶۲/۲۷ و۱۹/۱۶± ۱۳۳۵/۷۱ میکرومترو تشکیل شد. از لحاظ تعداد کلونی نیز این دو گروه به گروه‌های آزمایشی دیگر و کنترل برتری داشتند ($P<0.05$). در طی ۳ پاساژ متوالی درگروه ۰/۱ و ۱میکرومولار جمعیت سلولی نسبت به گروه‌های آزمایشی و کنترل دو برابر شد ($P<0.05$). همچنین، در این دو گروه، تعداد سلول‌های زنده بیش از گروه‌های دیگر بود ($P<0.05$). رنگ آمیزی آلیزارین رد برای استخوان و اویل رد برای چربی نشان داد که سلول‌های گروه‌های مختلف توان تمایزی خود را حفظ کرده‌اند.

نتیجه‌گیری: در مجموع می‌توان گفت که تیمار کشت سلول‌های مغز استخوان موش صحرایی با BIO بویژه با غلظت‌های ۱ و ۰/۱ میکرومولار سبب افزایش سرعت رشد و نیز توان زیستی سلول‌ها می‌شود.

واژه‌های کلیدی: سلول بنیادی مزانشیمی، موش صحرایی، BIO، تکثیر.

مقدمه

سلول‌های بنیادی مزانشیمی نوعی سلول غیرخونساز ساکن در مغز استخوان و سایر بافت‌های اسکلتی توصیف می‌شود. حضور این سلول‌ها در مغز استخوان توسط Cohnheim، پاتولوژیست آلمانی، در حدود ۱۴۰ سال (۱۸۶۷) پیشتر حدس زده شده بود [۱۷]، ولی اولین شواهد قطعی توسط Friedenstein و همکاران در اواسط سال ۱۹۷۰ ارائه شد [۳]. این محققین نمونه‌های مغز استخوان را در یک ظرف پلاستیکی

* نویسندهٔ مسئول مکاتبات: eslami@royaninstitute.org
وبگاه مجله: www.phypha.ir/ppj

کشت دادند و پس از ۴ ساعت یا بیشتر سلول‌های غیر چسبنده را دور ریختند. در اصل سلول‌های دور ریخته شده سلول‌های بنیادی رده خونساز بود. آن‌ها گزارش کردند که سلول‌های چسبنده مغز استخوان از لحاظ ظاهر هتروژن بوده و تعدادی از آن‌ها که مورفولوژی دوکی شکل داشته و تجمعات دو تا چهار سلولی ایجاد می‌کنند، اتصالات محکمی با سطح دیش کشت برقرار میکنند. بر اساس گزارش این محققین، این تجمعات به مدت ۲-۴ روز خاموش باقی ماندند، پس از آن به سرعت تکثیر یافتند و به صورت یکدست دوکی ظاهر شدند. مهمترین ویژگی این سلول‌ها، داشتن توانایی ایجاد کلون‌هایی شبیه بافت استخوان و غضروف بود. مشاهدات ابتدایی Friedenstein، توسط چندین محقق به ویژه Piersma و همکاران و Owen و همکاران در طول سال ۱۹۸۰ توسعه پیدا کرد [۱۵،۱۲].

سلول‌های بنیادی مزانشیمی به دلیل راحتی دسترسی و نیز داشتن پتانسیل خود تجدیدی هم اکنون به عنوان یک کاندید مناسب برای استفاده در راهبردهای ژن درمانی، سلول درمانی و مهندسی بافت محسوب می‌شود [۷-۶، ۱۴]. یکی از مشکلات اصلی استفاده از این سلول‌ها برای اهداف فوق، کاهش پتانسیل تکثیری سلول در طول دوره کشت است که به این موضوع Yeon و همکاران در سال ۲۰۰۶ اشاره کرده است. مطالعات این محققین نشان داده است که تکثیر سلول‌های بنیادی مزانشیمی با افزایش دوره کشت کاهش می‌یابد این کاهش ظرفیت تکثیری در پاساژهای بالا و در کشت طولانی مدت به آپوپتوزیس خودبخودی این سلول‌ها نسبت داده شد [۲۵].

تحقیقات نشان داده است که ماده‌ای موسوم به (BIO) 6-Bromoindirubin-3′-Oxime قادر است تکثیر سلولی را در محیط کشت بهبود بخشد. بایو یکی از مشتقات ایندیروبین است که از یک نرم تن دریایی به نام Trypan purple به دست می‌آید [۱]. این ماده در فرورفتگی اتصال ATP به مولکول GSK3-β قرار گرفته و با مهار GSK3-β در فعال کردن مسیر سیگنال دهی کانونیکال Wnt موثر است (Meijer-Chen). مسیر Wnt signaling از مسیرهای مهم در کنترل تکثیر، تمایز، قطبیت و آپوپتوزیس در تمام سلول‌های جانوری است [۲۲-۲۱]. تا به حال تاثیرات مثبت BIO در بهبود رشد سلول‌هایی نظیر سلول‌های عصبی هیپوکامپ [۸]، سلول‌های لوله پروکسیمال کلیه [۲۰] و سلول‌های بنیادی جنینی انسان و موش بررسی شده [۱۹]، اما هیچ گونه گزارشی مبنی بر اثر این ماده بر سلول‌های بنیادی مزانشیمی وجود ندارد. لذا درتحقیق حاضر اثر Bio بر کشت و تکثیر سلول‌های بنیادی مزانشیمی موش صحرایی بررسی شده است. هدف این مطالعه بررسی تاثیر غلظت‌های مختلف BIO بر برخی شاخص‌های تکثیر سلول‌های بنیادی مزانشیمی از قبیل کلون زایی و میزان دوبله شدن جمعیت سلولی و همچنین تاثیر آن بر زیستایی این سلول‌ها در شرایط کشت است. مطالعاتی نظیر تحقیق حاضر که به دنبال یافتن راهی برای افزایش تکثیر و Viability سلول‌های بنیادی مزانشیمی است ضرورت فراوانی دارد، زیرا در راهبردهای سلول درمانی و مهندسی بافت، به تعداد زیادی از سلول بنیادی نیاز است.

مواد و روش‌ها

در تحقیق حاضر از ۷ سر رت نر نژاد Wistar با سن تقریبی۳ ماهه استفاده شد. حیوان مورد نظر از موسسه رازی و پاستور تهیه گردید. آب مورد استفاده، آب معمولی بدون هیچ گونه ماده افزودنی بود. غذای حیوان، پلیت‌های آماده تهیه شده از شرکت به پخش بود. این پلیت‌ها دارای کربوهیدرات، پروتئین، ویتامین و فیبراست.

پس از قربانی کردن حیوان با کلروفرم، بافتهای نرم اطراف استخوان‌های درشت نی و ران با اسکالپل وقیچی جدا شد، آنگاه استخوان‌ها در محیط DMEM (Gibco, Germany, Dulbecco's Modified Eagle Medium,) حاوی ۱۵٪ سرم گاوی (Fetal Bovin Serum, Gibco, Germany) در فالکون ۱۵ قرار گرفتند و باقی مراحل استخراج در زیر هود استریل انجام شد. ابتدا دو سر استخوان توسط قیچی استریل بریده شده و پس از اطمینان از ایجاد سوراخ در هر دو سر با سر سوزن متصل به سرنگ ml ۲ محیط DMEM حاوی ۱۵٪ سرم از یک سر استخوان وارد شده و با فشار پیستون از سر دیگر خارج گردید. با ۳ بار تکرار این عمل، همه محتویات کانال استخوانی به داخل لوله استریل منتقل شد. مغز استخوان داخل لوله تحت g ۱۲۰۰ به مدت ۵ دقیقه سانتریفوژ شد. آنگاه محیط رویی تخلیه و پلت سلولی باml ۱۰ محیط DMEM واجد ۱۵٪ سرم FBS و۱۰۰ واحد بین‌المللی آنتی‌بیوتیک پنی‌سلین

و۱۰۰واحد بین‌المللی استرپتومایسین (Gibco; Germany) تازه معلق گردید و پس از شمارش با تراکم 10^5 سلول در سانتیمتر مربع در فلاسکهای ۲۵ سانتیمتر مربعی کشت شد. سلول‌های مغز استخوان در چندین فلاسک و تحت تیمار با غلظت‌های مختلف BIO شامل غلظت‌های ۰/۰۱، ۰/۰۵، ۰/۱، ۱ و ۱/۵ میکرو مولارکشت شد. گروه بدون Bio به عنوان گروه کنترل در نظر گرفته شد. فلاسک‌ها در دمای ۳۷ °C و در ۵٪ CO2 انکوبه شد. دو روز پس از آغاز کشت، سلول‌ها با +PBS که حاوی ۱۳۲ میلی گرم در لیترCaCl2 و ۱۰۰ میلی گرم در لیتر MgCl2 بود، شستشو شدند و محیط تازه بر روی آن‌ها اضافه شد. کشت اولیه سلول تا زمان پر شدن کف فلاسک ادامه یافت، در این زمان سلول‌ها تریپسینه شدند وبا تراکم 10^5 سلول در سانتیمتر مربع پاساژ داده شدند. کشت سلولی تا پاساژ ۳ ادامه یافت. در مطالعه حاضر، برای هر گروه تیمار با BIO و کنترل چندین فلاسک کشت تهیه شد. برخی از این کشت‌ها جهت بررسی و شمارش کلونی‌ها در کشت اولیه استفاده شد (این گروه در پتری دیش‌های ۱۰ سانتیمتری کشت شد). برخی دیگر در پاساژ اول تا سوم مورد استفاده قرار گرفت تا میزان دو برابر شدن جمعیت سلولی در غلظت‌های مختلف BIO و کنترل محاسبه گردد و برخی دیگر در پاساژ سوم استفاده شد تا تعداد سلول‌های زنده در هر گروه محاسبه و مقایسه شود. بالاخره برخی از فلاسک‌های تهیه شده جهت بررسی پتانسیل تمایز به استخوان و چربی سلول‌ها مصرف گردید.

شمارش CFU-F (Colony Forming Unit- Fibroblast) به منظور بررسی اثر تیمار با BIO در تحریک به رشد سلول‌های فیبروبلاستی مغز استخوان در کشت اولیه انجام شد. برای هر موش حداقل سه پتری دیش مورد بررسی قرار گرفت. در این روش سلول‌های کشت اولیه که به مدت ۵ روز در پتری دیش‌های ۱۰ سانتیمتری، تحت تیمار با غلظت‌های مختلف BIO در کشت اولیه قرار داشتند، دو بار با محلول PBS^- شسته و به مدت ۱ دقیقه با رنگ کریستال ویولت (۰/۵ ٪ کریستال ویولت در متانول) رنگ آمیزی شدند. کلون‌های تشکیل شده در گروه‌های تیمار و کنترل در زیر میکروسکوپ نوری مشاهده گردیده، مورد شمارش قرار گرفتند. میانگین تعداد کلون‌ها برای سلول‌های هر گروه محاسبه گردید و گروه‌ها از این نظر مقایسه آماری شدند.. بعلاوه در تحقیق حاضر، برای هر غلظت BIO و گروه کنترل، قطر کلونی‌ها با استفاده از نرم افزار Image تعیین شد و میانگین آن‌ها محاسبه گردید. گروه‌های مختلف از لحاظ این میانگین‌ها نیز مقایسه آماری شدند. برای هر موش حداقل سه پتری دیش مورد بررسی قرار گرفت.

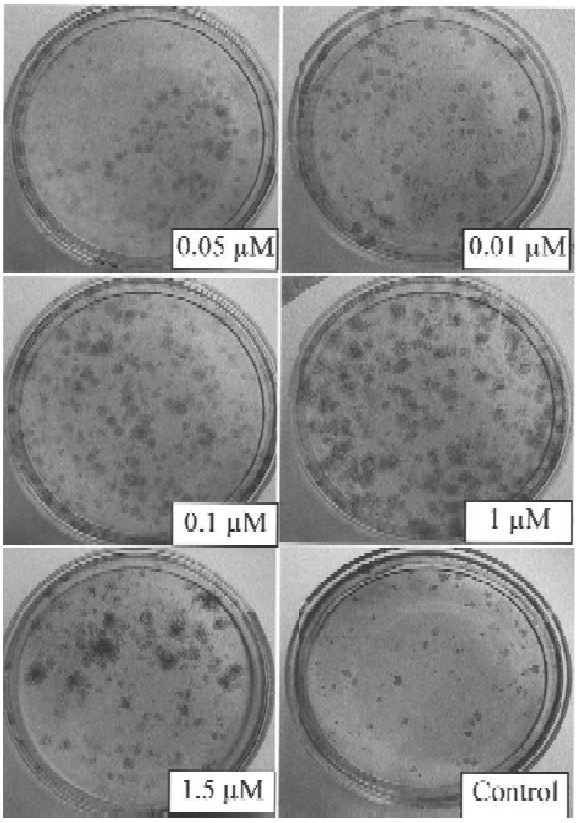
محاسبه تعداد وزمان دو برابر شدگی جمعیت سلولی Population Doubling Number (PDN) و Doubling time (DT) به عنوان شاخصی برای تعیین پاسخ سلول‌ها به شرایط کشتی محرک یا بازدارنده از قبیل تغییر در غلظت مواد غذایی، اثرات هورمونی یا داروهای سمی استفاده می‌شود. در این مطالعه، تعداد دو برابر شدگی جمعیت سلولی برای پاساژهای اول، دوم و سوم بررسی شد. بدین ترتیب که ۵ روز پس از آغاز پاساژ سلولی، کشت سلول در گروه‌های تیمار با BIO و کنترل تریپسینه شد و سلول‌ها مورد شمارش قرار گرفتند و طبق فرمول (PDN=(logN/N0 ×3.31 میزان دوبرابر شدن جمعیت سلولی محاسبه گردید [۴]. در این فورمول N تعداد سلول‌ها در پایان دوره و N0 تعداد سلول‌ها در آغاز کشت می‌باشد. دو برابر شدن جمعیت سلولی (PDN) برای سلول‌های پاساژ دوم و سوم نیز به روش بالا محاسبه شد و PDN کل با فرمول زیر محاسبه گردید:

$$\text{Total population doubling} = PD_{p1}+PD_{p2}+PD_{p3}$$

برای محاسبه زمان دو برابر شدن جمعیت Doubling time (DT) و یا به عبارتی مدت زمان لازم برای اینکه تعداد سلول‌های مغز استخوان در هر گروه دوبرابر شود، طبق فرمول زیر محاسبه گردید.

$$\text{Doubling Time} = \frac{\text{Total Time of cellculture}}{\text{Total Population Doubling}}$$

برای ارزیابی تعداد سلول‌های زنده تیمار شده با BIO از روش MTT استفاده شد. اساس این روش فعالیت متابولیکی سلول‌های زنده می‌باشدکه درآن تترازولیوم زرد 3- (5,2 dimethylthiazolyl) -2, 5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) توسط سیستم سوکسینات – تترازولیوم ردوکتاز متعلق به زنجیره تنفسی میتوکندریایی که تنها در سلول‌های زنده فعال است به کریستالهای فورمازان بنفش رنگ غیر قابل حل در آب تبدیل می‌شود که در ضمن این واکنش، کوفاکتورهای NADH و NADPH آزاد می‌شوند. در این روش ابتدا یک منحنی استاندارد رسم شد تا رابطه بین



سیگنال بهینه (OD در طول موج ۶۳۰–۵۴۰ نانومتر) و تعداد سلول‌ها یافت شود.

در مطالعه حاضر برای اینکه تاثیر BIO در حفظ Viability سلول‌ها بهتر ارزیابی شود ابتدا سلول‌های پاساژ ۳ گروه‌های تیمار و کنترل که در پلیت‌های ۲۴ چاهکی به تعداد هر چاهک 10^4 کشت شده بودند ودر مرحله Confluency قرار داشتند، به مدت ۹ ساعت در معرض محیط فاقد سرم قرار گرفتند و پس از آن محیط دارای غلظت‌های مناسب BIO و ۱۰٪ FBS جایگزین محیط فاقد سرم شد. بعد از ۲۴ ساعت با استفاده از تکنیکcolorimetry بر پایهMTT میزان زیستایی سلول‌ها بررسی گردید. به این منظور محیط رویی پلیت با ۶۰ میکرولیترمحلول MTT (۵ میلی گرم در میلی لیتر) تعویض گردید. پس از ۱/۵–۱ ساعت انکوباسیون در 37 °C و ۵٪ CO2 کریستالهای فورمازون تشکیل شد. پس از حل کردن کریستال‌ها در ۳۰۰ میکرولیتر DMSO (Germany/Sigma) میزان جذب طول موج (630-540) نانومتر توسط دستگاه ELISA-reader اندازه‌گیری شد. تعداد سلول‌ها از طریق منحنی استانداردی که برای تعداد مشخصی سلول رسم گردیده بود، تعیین گردید.

در مطالعه حاضر آزمون آماری ANOVA برای ارزیابی تعداد سلول‌های زنده و آزمون NPar Test (Mann-Whitney Test) برای ارزیابی سایر نتایج شامل مقایسه تعداد و قطر کلونی‌ها در گروه‌های مختلف، مقایسه PDN و DT استفاده شد. نتایج بدست آمده حاصل میانگین ۷ بار تکرار آزمایش بر روی سلول‌های مغز استخوان ۷ سر موش صحرایی بود. داده‌ها به صورت میانگین ± انحراف از استاندارد (SD) بیان شدند. تفاوت‌های با $P<0.05$ معنی دار در نظر گرفته شد.

برای تعیین ماهیت بنیادی مزانشیمی سلول‌های مورد بررسی از روش تمایز به استخوان و چربی استفاده شد. بدین ترتیب که سلول‌های پاساژ ۳ از گرو ه‌های مختلف مورد مطالعه در ظروف ۶ چاهکی کشت شد و پس از آنکه تک لایه سلولی سطح کشت را پر کرد محیط کشت با محیط استئوژنیک جایگزین محیط معمولی شد. این محیط شامل محیط DMEM حاوی بتاگلیسرول فسفات ۱۰ میلی مولار، دگزامتازون 10^{-8} مولار، اسکوربیک ۳- فسفات ۵۰ میکروگرم در میلی لیتر بود. محیط کشت هر ۳ روز یکبار تعویض شد. سه هفته پس از آغاز تمایز، وقوع آن با رنگ آمیزی اختصاصی آلیزارین رد بررسی شد.

برای تمایز به چربی به این ترتیب عمل شد که سلول‌های پاساژ ۳ در ظروف ۶ چاهکی کشت شد و پس از مرحله Confluency محیط تمایز شامل DMEM حاوی ۵۰ میکروگرم در میلی لیتر اسکوربیک اسید، 10^{-7} مولار دگزامتازون ،۵۰ میکروگرم در میلی لیتر ایندومتاسین جایگزین محیط کشت گردید. محیط تمایز هر ۴–۳ روز یکبار عوض شد. ۲۱ روز پس از آغاز کشت تمایز، به منظور بررسی وقوع تمایز، کشت سلولی با رنگ آمیزی Oil Red مورد ارزیابی قرار گرفت.

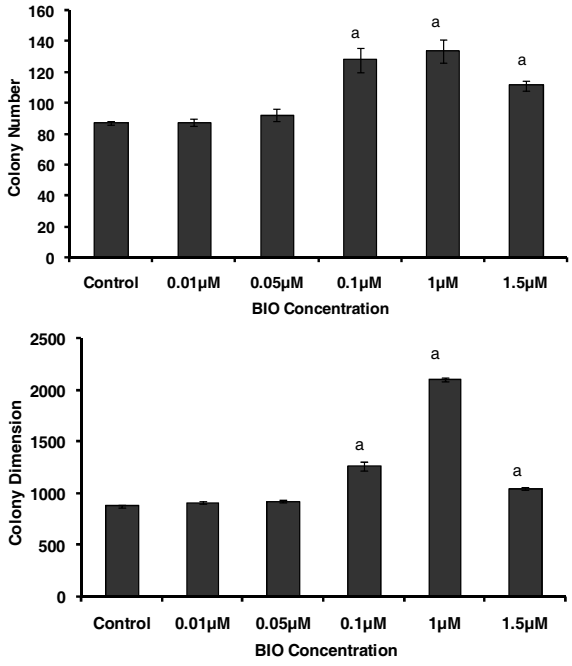
یافته‌ها

شمارش CFU-F : کلونی‌های رنگ آمیزی شده با کریستال ویولت در گروه‌های تیمار با BIO و گروه کنترل در شکل ۱ نشان داده شده است. همچنین میانگین تعداد و قطر کلونی‌ها در غلظت‌های ۰/۰۱، ۰/۰۵، ۰/۱، ۱، ۱/۵ میکرو مولار و گروه کنترل در جدول ۱ نشان داده شده است. تفاوت میانگین کلونی در گروه‌های تیمار شده با Bio با غلظت ۱، ۰/۱ و ۱/۵ میکرومولار در مقایسه با گروه کنترل و Bio با غلظت ۰/۰۱ و ۰/۰۵ میکرو مولار معنی‌دار بود ($p<0.05$). از این نظر گروه‌های

جدول ۱- میانگین مقادیر مربوط به تعداد و قطر کلونی‌ها در گروه‌های مختلف BIO و کنترل

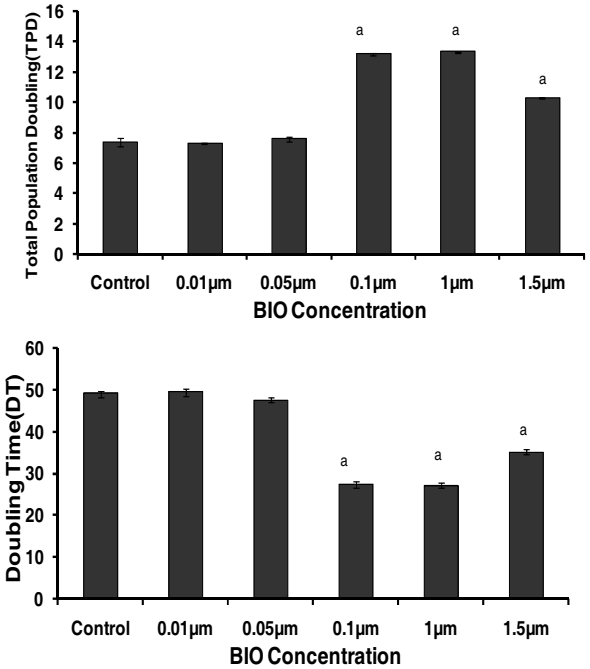
قطرCFU-F	تعداد کلونی	
۱۰۴۶/۱۸۳ ±۱۰/۱۳	۱۱۷/۵۷± ۲/۸۲،	۱/۵
۱۳۳۵/۷۱ ±۱۹/۱۶	۱۴۴/۱۴۲ ±۴/۵۹	۱
۱۲۶۲/۲۷ ±۴۳/۹۶	۱۳۵/۲۵۸±۵/۰۸	۰/۱
۹۰۶/۶۳ ±۸/۰۰	۸۷.۴۲۸± ۲.۸۷۸	۰/۰۱
۹۲۴/۱۸ ±۱۱/۴۴	۹۱.۸۵۷±۲.۴۷۸	۰/۰۵
۸۷۸/۱۱ ±۱۴/۳	۸۷.۴۲۸ ± ۳/۲۰۷	کنترل

تیمار شده با BIO ۰/۰۱ و ۰/۰۵ میکرمولار تفاوت معنی داری با گروه کنترل نداشت. در گروه‌های تیمار شده با غلظت‌های ۱ و ۰/۱ میکرو مولار تعداد کلونی بیشتری در مقایسه با غلظت ۱/۵ ایجاد شده بود ($p<0.05$) ولی تفاوت بین آن دو (۱ و ۰/۱)، با وجودیکه تعداد کلونیها در غلظت ۱ بیش از غلظت ۰/۱ بود، از لحاظ آماری معنی دار نبود (شکل ۲ ردیف بالا). بررسی قطر کلنی‌های ایجاد شده در کشت اولیه نشان داد که تفاوت‌های تقریبا مشابه با آنچه که برای تعداد کلونی‌ها ذکر شد در بین گروه‌ها از لحاظ میانگین قطر کلونی برقرار است (شکل ۲ ردیف پایین)، با این تفاوت که اختلاف بین گروه تیمار ۱ با ۰/۱ میکرومولار معنی‌دار بود و نیز تفاوت بین گروه ۱ میکرومولار با کنترل معنی‌دار نبود.



شکل۲- بالا:. مقایسه تعداد کلونی‌ها در گروهای مختلف. در حضور BIO با غلظت ۱ و ۰/۱ میکرو مولار بطور معنی‌داری کلونی‌های بیشتری در کشت اولیه تشکیل شد . پایین: کلونی‌های تشکیل شده در تیمار با غلظت ۱ و ۰/۱ میکرو مولار BIO از لحاظ اندازه بطور معنی‌داری بزرگتر از کلونی‌های سایر غلظت‌ها و گروه کنترل بود. a: تفاوت گروه تیمار با BIO با گروه کنترل با $P<0.05$.

ارزیابی PDN و DT: بر اساس نتایج، در حضور BIO سرعت تکثیر سلولی بطور قابل توجهی افزایش یافت. درجدول ۲، میانگین مقادیر تعداد دو برابر شدگی جمعیت سلولی (PDN) در طی سه پاساژ متوالی و مدت زمان هر دو برابر شدن آن (DT) بر حسب ساعت درج شده است. بر اساس این اطلاعات، بیشترینPDN مربوط به غلظت‌های ۱ و ۰/۱ بوده و تفاوت آن‌ها با گروه‌های دیگر ازجمله گروه کنترل و گروه‌های ۱/۵، ۰/۰۱ و ۰/۰۵ میکرومولار BIO از لحاظ آماری معنی‌دار بود



شکل۳- بالا: مقایسه PDN در گروه‌های مختلف. در حضور BIO با غلظت ۱ و ۰/۱ میکرو مولار بطور معنی‌داری PDN بیشتری در طول دوره کشت از پاساژ اول تا پاساژ سوم اتفاق افتاد. پایین: مقایسه DT در گروه‌های مختلف. در حضور BIO با غلظت ۱ و ۰/۱ میکرو مولار زمان هر دوبرابر شدن جمعیت سلولی بطور معنی‌داری کمتر از گروه‌های دیگر بود. a: تفاوت گروه تیمار با BIO با گروه کنترل با $P<0.05$.

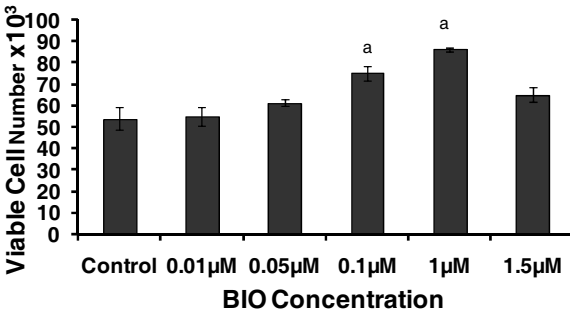
جدول۲- میانگین مقادیر مربوط به PDN و DT در گروه‌های مختلف BIO و کنترل وسط.

DT	PDN	
۳۶/۹۲۲±۱/۸۵	۹/۷۶۷±۰/۹۳۹	۱/۵
±۱/۰۰ ۲۶/۰۶۲	۱۳/۸۲۷±۰/۰۳۷	۱
۲۷/۴۱۴±۱/۲۷۵	۱۳/۱۵۱±۱/۲۵	۰/۱
۵۰/۹۷±۱/۳۰۴	±۰/۱۸ ۷/۰۶	۰/۰۱
۴۸/۰۷±۱/۸۳۶	۷/۵۰۷±۰/۴۲۰	۰/۰۵
۵۰/۵۷۵±۱/۰۵	۷/۱۲۷±۱/۳۰۴	کنترل

($P<0.05$). از این نظر دو غلظت ۱ و ۰/۱ در مقایسه با همدیگر تفاوت بسیار اندکی داشتند (شکل ۳ ردیف بالا). همچنین گروه‌های ۰/۰۱ و ۰/۰۵ BIO تفاوتی با گروه کنترل نداشت ولی تفاوت آن‌ها با غلظت ۱/۵ میکرومولار BIO معنی‌دار بود ($P<0.05$).

از لحاظ مدت زمان لازم برای دو برابر شدگی جمعیت سلولی، دو گروه ۱ و ۰/۱ میکرومولار کمترین زمان را داشتند که نشانه‌ای از سرعت بالای تکثیر سلولی در این دو گروه بود. تفاوت این دو گروه با سایر غلظت‌های BIO و نیز گروه کنترل از نظر آماری معنی دار بود ($P<0.05$). از این نظر دو گروه ۰/۰۱ و ۰/۰۵ میکرومولار BIO با گروه کنترل تفاوت معنی‌داری نداشت ولی تفاوت آن‌ها با غلظت ۱/۵ میکرومولار معنی‌دار بود (شکل ۳ ردیف پایین).

ارزیابی تعداد سلول‌های زنده: تعداد سلول‌های زنده در گروه‌های مختلف مورد مطالعه در جدول ۳ نشان داده شده است. براساس آزمون MTT درگروه‌های ۱ و ۰/۱ میکرومولارBIO تعداد سلول‌های زنده بطور معنی داری بیش از گروه‌های دیگر BIO و گروه کنترل بود. در گروه ۱ میکرومولار اگرچه تعداد



شکل۴- بالا: پایین مقایسه تعداد سلول‌های زنده در کشت confluent پاساژ سوم از گروه‌های مختلف. در حضور BIO با غلظت ۱ و ۰/۱ میکرو مولار بطور معنی‌داری تعداد سلول‌های زنده بیش از سایر گروه‌ها بود. a: تفاوت گروه تیمار با BIO با گروه کنترل با $P<0.05$.

سلول‌های زنده بیش از گروه ۰/۱ میکرومولار بود ولی تفاوت معنی‌داری بین آن‌ها نبود. از این نظر بین گروه‌های ۱/۵، ۰/۰۱، ۰/۰۵ و کنترل تفاوت معنی‌داری وجود نداشت (شکل ۴).

تمایز: رنگ آمیزی آلیزارین رد نشان داد که در کشت پاساژ سوم سلول‌های تیمار شده با غلظت‌های مختلف BIO و گروه کنترل ماتریکس معدنی ایجاد شده و در نتیجه تمایز استخوانی اتفاق افتاده است. شدت رنگ پذیری در گروه‌های مختلف Bio در مقایسه با گروه کنترل کمتر بود. همچنین در اثر رنگ آمیزی اویل رد مناطق رنگ شده در گروه‌های مختلف BIO در مقایسه با گروه کنترل کمتر بود (شکل ۵).

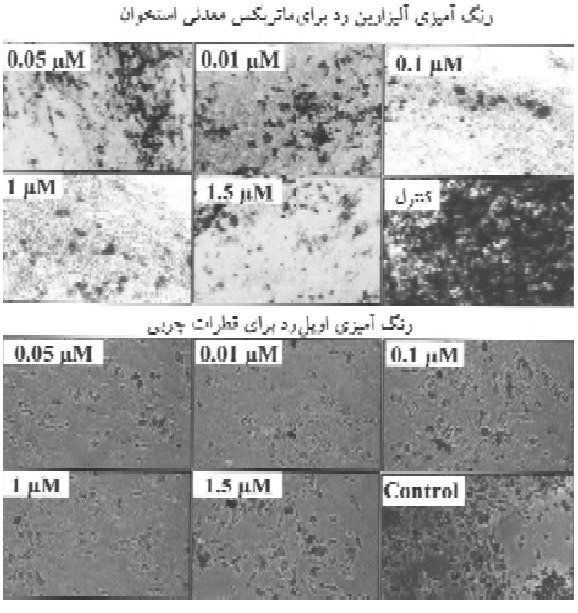
بحث

در این مطالعه، سلول‌های مغز استخوان موش صحرایی در حضور برخی غلظت‌های BIO به مدت سه پاساژ متوالی کشت شد و در طی دوره کشت، گروه‌های مختلف مورد مطالعه از لحاظ برخی شاخص‌های رشد و تکثیر مورد ارزیابی و مقایسه قرار گرفتند. نتایج ما نشان داد که حضور غلظت‌های ۱ و ۰/۱ میکرومولار BIO در کشت، بطور معنی داری سبب افزایش تکثیرسلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان می‌شود. افزایش تکثیر سلول‌های بنیادی مزانشیمی، یکی از اهداف اصلی در اکثر آزمایشگاههای کشت سلول می‌باشد، زیرا این سلول‌ها به تعداد خیلی اندک در مغز استخوان وجود داشته [۱۶] و از طرفی در مهندسی بافت و استراتژیهای سلول درمانی به تعداد بسیار فراوانی از آن‌ها نیاز است. تا به حال اثر BIO بر کشت برخی سلول از جمله سلول‌های عصبی، سلول‌های لوله پروکسیمال کلیه و سلول‌های بنیادی جنینی انسان و موش بررسی شده [۸، ۲۰-۱۹] ولی در ارتباط با اثر این ماده بر تکثیر آزمایشگاهی سلول‌های بنیادی مزانشیمی گزارشی در دست نیست.

جدول۳- میانگین مقادیر مربوط به OD و تعداد سلول‌های زنده در گروهای مختلف BIO و کنترل

Cell Number	
۷۰/۷×۱۰^{۳}±۳/۸۷×۱۰^{۳}	۱/۵
۹۰/۲×۱۰^{۳}±۲/۵×۱۰^{۳}	۱
۸۰/۱×۱۰^{۳}±۳/۰۲×۱۰^{۳}	۰/۱
۵۶/۵×۱۰^{۳}±۳/۱۲×۱۰^{۳}	۰/۰۱
۶۷/۲×۱۰^{۳}±۳/۷۶×۱۰^{۳}	۰/۰۵
۵۵/۵×۱۰^{۳}±۷/۷۷×۱۰^{۳}	کنترل

در سال ۲۰۰۴ Sato و همکاران گزارش کرد که غلظت‌های کمتر از یک میکرو مولار BIO سبب افزایش تکثیر سلول‌های بنیادی جنینی موش می‌گردد [۱۹]. از طرفی دیگر، بررسی‌های Sinha و همکاران در سال ۲۰۰۴ موید این نکته بود که حضور BIO با غلظت‌های ۰/۰۱، ۰/۰۵ و ۰/۱ میکرومولار افزایش تکثیر سلول‌های پوششی لوله پروکسیمال موش را به همراه دارد و از این نظر غلظت ۰/۱ میکرومولار بیشترین میزان تکثیر را به دنبال دارد [۲۰]. با توجه به این موارد در این تحقیق اثر برخی غلظت‌های BIO که در دو دامنه بالای یک میکرو مولار و زیر یک میکرو مولار قرار داشتند انتخاب شد و تاثیر آن‌ها بر کشت سلول‌های بنیادی مزانشیمی موش صحرایی بررسی شد. نتایج ما نشان داد که در حضور دو غلظت ۱ و ۰/۱ میکرو مولار تکثیر سلول‌های بنیادی مزانشیمی بطور معنی‌داری بهبود می‌یابد. در مطالعه حاضر، از لحاظ تمام شاخص‌های



شکل۵- تمایز به استخوان و چربی سلول‌های پاساژ سوم از گروه‌های مختلف BIO و کنترل. شدت رنگ آمیزی با آلیزارین رد و اویل رد در گروه‌هایBIO کمتر از کنترل است.

تکثیری مورد مطالعه غلظت ۱ میکرومولار بهتر از ۰/۱ عمل کرد و تنها از لحاظ قطر کلونی‌ها با غلظت ۰/۱ میکرومولار تفاوت معنی داری داشت. این یافته ما با نتایج Sinha و همکاران مبنی بر بهتر بودن غلظت ۰/۱ میکرومولار BIO تفاوت دارد. دلیل این اختلاف می‌تواند تفاوت سلول‌های مورد مطالعه ما (سلول‌های بنیادی مزانشیمی) و سلول‌های مطالعه Sinha و همکاران (سلول‌های بنیادی جنینی) و پاسخ‌های متفاوت آن‌ها به حضور BIO در محیط کشت باشد.

افزایش توان تکثیر سلول‌های بنیادی مزانشیمی از مدت‌ها پیشتر مورد توجه پژوهشگران بوده است بطوریکه تا به حال برای این منظور از روش‌های مختلفی از جمله افزودن برخی فاکتورهای رشد نظیر Fibroblast Growth Factor به محیط کشت این سلول‌ها استفاده شده است [۱۰]. مطالعه حاضر نیز تلاشی در این راستا بوده و با افزودن BIO سعی بر این داشت که میزان و سرعت تکثیر سلول‌های بنیادی مزانشیمی را افزایش دهد.

بر اساس نتایج بدست آمده در تحقیق حاضر، در کشت اولیه گروه‌های تیمار با BIO و کنترل، تعداد کلونی‌های ایجاد شده متفاوت بود. بیشترین تعداد کلونی در غلظت ۱ و ۰/۱ میکرو مولار و کمترین تعداد آن‌ها در غلظت‌های ۰/۰۱ و ۰/۰۵ میکرومولار وجود داشت. با توجه به اینکه تعداد کلونی‌ها در کشت اولیه نماینده تعداد سلول‌های بنیادی مزانشیمی با خاصیت کلونزایی در مغز استخوان است به نظر می‌رسد که در غلظت‌های ۱ و ۰/۱ میکرومولار BIO تعداد بیشتری از سلول‌های بنیادی مزانشیمی موجود در مغز استخوان تحریک به تکثیر و تشکیل کلونی شده اند. تاثیرات تکثیری BIO نتیجه‌ای از خاصیت آن در مهار GSK-3β است که سبب فعال شدن مسیر Wnt شده، متعاقبا تکثیر سلولی تحریک می‌شود. تاثیرات تکثیری BIO در اندازه کلونی‌های ایجاد شده نیز به خوبی

مشهود بود. از طرف دیگر شاخص‌های PDN و DT نشان دهنده این واقعیت بود که سرعت تکثیر سلول‌های مغز استخوان در گروه‌های تیمار با BIO بویژه غلظت‌های ۱ و ۰/۱ میکرو مولار نیز افزایش یافته است که این پدیده را نیز می‌توان به مهار آنزیم GSK3 و فعال سازی مسیر Wnt نسبت داد. در مطالعات پیشین این خاصیت BIO در کشت سلول‌های دیگر نیز گزارش شده است [۸، ۲۰-۱۹].

مطالعات نشان داده است که BIO بقا و توان زیستی را در سلول‌های اپیتلیال کلیه، به وسیله فعال کردن مسیر آنتی آپوپتوتیک PI3K/Akt که به موازات فعال سازی مسیر Wnt انجام می‌شود، بهبود می‌بخشد [۱۱]. در گزارش حاضر، نتایج رنگ سنجی (MTT) برای بررسی Viability نشان داد تعداد سلول‌های زنده در غلظت‌های۱ و ۰/۱ میکرومولار بطور معنی‌داری افزایش یافته است ولی اینکه این افزایش به دنبال فعال شدن مسیر آنتی آپوپتوتیک PI3K/Akt اتفاق افتاده است مورد بررسی قرار نگرفت. این موضوع به مطالعه بیشتری نیاز دارد.

اگر چه تلاش‌های زیادی در جهت شناسایی مارکرهای سطحی سلول‌های بنیادی مزانشیمی انجام شده است، با این وجود مارکر ویژه منفردی معرفی نشده است. در این ارتباط چندین مارکر از جمله CD133، LNGFR (Low affinity nerve growth factor receptor) و STRO-1 برای سلول‌های بنیادی مزانشیمی انسانی پیشنهاد شده است ولی برای سلول‌های بنیادی مزانشیمی حیوانی مارکر اختصاصی ذکر نشده است [۵، ۹، ۱۸]. به همین دلیل در مطالعات پیشین از توان تمایز سلولی برای ارزیابی بنیادی مزانشیمی استفاده شده است [۱۳، ۲۴-۲۳]. در این مطالعه نیز با تمایز سلول‌های جدا شده به رده‌های استخوان و چربی ماهیت بنیادی مزانشینمی آن‌ها به اثبات رسید. بر اساس نتایج رنگ آمیزی به نظر رسید که در گروه‌های BIO در مقایسه با گروه کنترل ماتریکس معدنی کمی تشکیل شده و نیز تمایز به سلول‌های چربی کمی به وقوع پیوسته است. البته روش کیفی بکارگرفته شده در مطالعه حاضر، روش مناسب و کافی برای اثبات این ادعا نیست و مطالعات بیشتری با روش‌های کمی نیاز است تا میزان تمایز به استخوان و چربی را در گروه‌های تیمار و کنترل مقایسه نماید.

یکی از محدودیت‌های مطالعه حاضر این بود که PDN برای کشت اولیه قابل محاسبه نبود زیرا معمولا، در کشت اولیه به منظور استخراج سلول بنیادی مزانشیمی، تعداد معدودی از سلول‌های کشت شده به سطح کشت چسبیده و منشا کشت می‌شوند و اکثر آن‌ها با تعویض محیط کشت دور ریخته می‌شوند. لذا تعداد سلول در آغاز کشت (NO) بدرستی قابل محاسبه نیست. از آنجایی که یکی از خواص مهم سلول بنیادی مزانشیمی خاصیت کلونی زایی آن هاست، می‌توان از این خاصیت به عنوان شاخص تکثیر این سلول‌ها استفاده کرد. لذا در مطالعه حاضر PDN (تعداد دو برابر شدن جمعیت سلولی) و DT (زمان لازم برای دوبرابر شدن جمعیت سلولی) با در نظر گرفتن شمارش سلولی در پاساژ اول تا سوم محاسبه شد و در کشت اولیه منظور نگردید [۴]. در عوض برای بررسی اثرات BIO در کشت اولیه از سنجش کلونوژنیک (شمارش تعداد و قطر کلونی‌ها) استفاده شد.

در مجموع بر اساس یافته‌های مطالعه حاضر می‌توان گفت که تیمار کشت سلول‌های مغز استخوان موش صحرایی با BIO بویژ با غلظت‌های ۱ و ۰/۱ میکرومولار سبب افزایش سرعت رشد سلولی می‌شود. به نظر می‌رسد سلول هایی که با استفاده از چنین سیستمی (کشت در حضور غلظت‌های ۰/۱ و ۱ میکرومولار BIO) استخراج و تکثیر می‌گردند از توان زیستی بالایی برخوردار هستند.

References

[1] Atilla-Gokcumen GE, Williams DS, Bregman H, Pagano N, Meggers E, Organometallic compounds with biological activity: a very selective and highly potent cellular inhibitor for glycogen synthase kinase 3. ***Chembiochem*** 7 (2006) 1443-50.

[2] Chen S, Hilcove S, Ding S, Exploring stem cell biology with small molecules. ***Mol Biosyst*** 2 (2006) 18-24.

[3] Friedenstein AJ Chailakhjan RK, Lalykina KS, The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells. ***Cell Tissue Kinet*** 3 (1970) 393-403.

[4] Eslaminejad MB, Talkhabi M, Zainali B, Effect of Lithium chloride on proliferation and bone differentiation of rat marrow-derived mesenchymal stem cells in culture. ***Iranian J Basic Med Sci*** 3 (2008) 143-151.

[5] Gronthose S, Simmons PJ, The growth factor requirements of STRO-1-positive human bone marrow stromal precursors under serum-derived condisions in vitro. ***Blood*** 85 (1995) 929-940.

[6] Horwitz EM, Prockop DJ, Gordon PL, Koo WW, Fitzpatrick LA, Neel MD, Et al, Clinical response to bone marrow transplantation in children with severe osteogenesis imperfecta. ***Blood*** 97 (2001) 1227-1231.

[7] Ishaug SL,Crane GM, Miller MJ, Yasko AW, Yaszemsski MJ, Mikos AG, Bone formation by three dimensional stromal osteoblast culture in biodegradable polymere scaffolds. ***J Biomed Mater Res*** 36 (1997) 17-28.

[8] Kim WY, Zhou FQ, Zhou J, Yokota Y, Wang YM, Yoshimura T, et al,Kaibuchi K, Essential roles for GSK-3s and GSK-3-primed substrates in neurotrophin-induced and hippocampal axon growth. ***Neuron*** 52 (2006) 981-96.

[9] Kuçi S, Wessels JT, Bühring HJ, Schilbach K, Schumm M, Seitz G, et al. Identification of a novel class of human adherent CD34- stem cells that give rise to SCID-repopulating cells. ***Blood*** 3 (2003) 869-876.

[10] Martin I, Muraglia A, Campanile G, Cancedda R, Quarto R, Fibroblast growth factor-2 supports ex vivo expansion and maintenance of osteogenic precursors from human bone marrow. ***Endocrin*** 138 (1997) 4456-4462.

[11] Meijer L, Skaltsounis AL, Magiatis P, Polychronopoulos P, Knockaert M, Leost M, et al, GSK-3-selective inhibitors derived from Tyrian purple indirubins. ***Chem Biol*** 10 (2003)1144-1146.

[12] Owen M, Marrow stromal stem cells. ***J Cell Sci*** 3 (1988) 63-76.

[13] Peister A, Mellad JA, Larsen LL, 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*** 103 (2004) 1662-1668.

[14] Petite H, Viateau V, Bensaid W, Meunier A, Pollak C, Bourguignon M, et al. Tissue-engineered bone regeneration. ***Nature*** 18 (2000) 959-962.

[15] Piersma, AH, Brockbank KG, Ploemacher RE, Van Vliet E, Brakel-van Peer KM, Visser PJ, Characterization of fibroblastic stromal cells from murine bone marrow. ***Exp Hematol*** 13 (1985) 237-243.

[16] Pittenger MF, Makay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, et al, Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. ***Science*** 248 (1999) 143-147.

[17] Prockop DJ, Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues. ***Science*** 276 (1997) 71-74.

[18] Quirici N, Soligo D, Bossolasco P, Servida F, Lumini C, Deliliers GL, Isolation of bone marrow mesenchymal stem cells by anti-nerve growth factor receptor antibodies. ***Exp Hematol*** 7 (2002) 783-791

[19] Sato N, Meijer L, Skaltsounis L, Greengard P, Brivanlou AH, Maintenance of pluripotency in human and mouse embryonic stem cells through activation of Wnt signaling by a pharmacological GSK-3-specific inhibitor. ***Nat Med*** 10 (2004) 23-24.

[20] Sinha D, Wang Z, Ruchalski KL, Levine JS, Krishnan S, Lieberthal W, et al, Lithium activates the Wnt and phosphatidylinositol 3-kinase Akt signaling pathways to promote cell survival in the absence of soluble survival factors. ***Am J Physiol Renal Physiol*** 288 (2005) F703-713.

[21] Stambolic V, Ruel L,Woodgett JR, Lithium inhibits glycogen synthase kinase-3 activity and mimics wingless signalling in intact cells. ***Curr Bio*** 6 (1996)1664–1668.

[22] Stefan H, Claire LK, Wnt signalling: variety at the core. ***J Cell Science*** 120 (2007) 385-393.

[23] Sun S, Guo Z, Xiao X, Liu B, Liu X, Tang P-H et al, Isolation of mouse marrow mesenchymal progenitors by a novel and reliable methods. ***Stem Cells*** 21 (2003) 527-535.

[24] Tropel P, Noel D, Platet N, Legrand P, Benabid AL, Berger F, Isolation and characterization of mesenchymal stem cells from adult mouse bone marrow. ***Exp Cell Res*** 295 (2004) 395-406.

[25] Yeon Lim J, Jeun SS, Lee KJ, Oh JH, Kim SM, Park SI, et al, Multiple stem cell traits of expanded rat bone marrow stromal cells. ***Exp Neurol*** 199 (2006) 416-426.