مقاله مروری

روش‌های جداسازی سلول‌های بنیادی مزانشیمی موش؛ یک مطالعه مروری نظام‌مند

صمد ندری [۱و۲*]، احسان صبوری[۱]، پریسا ندری[۳]، قاسم براتی[۱]

۱- دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی زنجان، زنجان، ایران
۲- مرکز تحقیقات ژن‌درمانی سرطان، دانشگاه علوم پزشکی زنجان، زنجان، ایران
۳- دانشگاه صنعتی اصفهان، اصفهان، ایران

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۵/۰۲/۱۲ تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۵/۰۵/۲۷

چکیده

سالیان متمادی مغز استخوان را به‌عنوان منبع اولیه سلول‌های بنیادی خون‌ساز می‌دانستند. تحقیقات اخیر نشان داده است که در مغز استخوان علاوه بر سلول‌های خونی مجموعه هتروژنی از سلول‌های بنیادی غیر خون‌ساز وجود دارد. تابه‌حال محققین با روش‌های مختلف و بعضاً مشابهی سلول‌های بنیادی غیرخونساز، با اسامی مختلفی از قبیل سلول‌های بنیادی مزانشیمی و یا سلول‌های پروژنیتور با پتانسیل چند دودمانی را از منابع بافتی و از گونه‌های حیوانی مختلف جداسازی کرده‌اند. توانایی تمایز این سلول‌ها به دودمان‌های مزانشیمی زمینه تحقیقاتی مناسبی را در مهندسی بافت و طب ترمیمی ایجاد نموده است. از سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان موش به‌عنوان مدل مناسبی در تحقیقات پیش کلینیکی روی سلول درمانی انسانی یاد می‌شود. بااین‌وجود جداسازی سلول‌های بنیادی مزانشیمی از مغز استخوان موش به‌عنوان یک مسئله حل‌نشده در پژوهش‌های سلول‌های بنیادی مزانشیمی مطرح است. در این مقاله مروری روش‌های بکار گرفته‌شده در جداسازی سلول‌های بنیادی مزانشیمی موش موردبحث قرار گرفته است.

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

مقدمه

سلول‌های بنیادی(Stem Cells) ، سلول‌های سوماتیک تمایز نیافته‌ای (undifferentiated Somatic cells) هستند که قادرند تحت شرایط خاص به سلول‌های بالغ کاملاً تمایزیافته (Mature Differentiated Cells)تبدیل شوند (۱). سلول‌های بنیادی را بر اساس پتانسیل تمایز به دودمان‌های مختلف در پنج گروه طبقه‌بندی می‌کنند (شکل ۱). مغز استخوان منبع اصلی دو نوع از سلول‌های بنیادی به نام سلول‌های بنیادی خون‌ساز و سلول‌های بنیادی مزانشیمی است. سلول‌های بنیادی مزانشیمی توان تمایز به چندین دودمان سلولی ازجمله استخوان، عصب، غضروف و کبد را دارند (۲). در سال‌های اخیر این سلول‌ها با اسامی دیگر از قبیل سلول‌های فیبروبلاستی تشکیل‌دهنده کلنی (۳)، سلول‌های فیبروبلاست مغز استخوان (۴)، سلول‌های اجدادی مزانشیمی (۵) و سلول‌های استرومایی مغز استخوان (۶) خوانده شده‌اند.

ویژگی سلول‌های بنیادی مزانشیمی در شرایط in Vitro به‌مراتب بیشتر از شرایط in Vivo مورد بررسی و مطالعه قرار گرفته است. سلول‌های بنیادی مزانشیمی درصد خیلی کمی از سلول‌های مغز استخوان را تشکیل داده و تا ۶۰ ساعت بعد از کشت وارد فاز سنتز DNA (S-phase) نمی‌شوند. این سلول‌ها



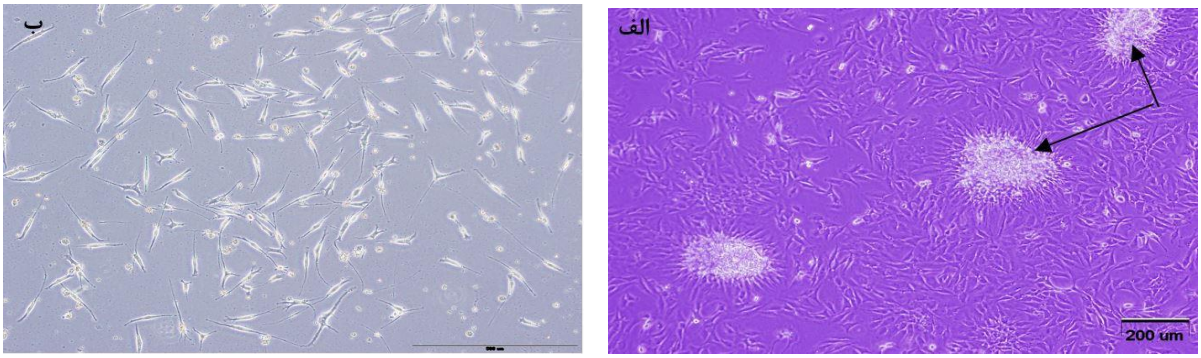
شکل ۱- طبقه‌بندی سلول‌های بنیادی. با توجه به نمودار، سلول‌های تمایز نیافته توانایی شکل‌پذیری بیشتری دارند

به سطح ظروف پلاستیک چسبیده، مورفولوژی دوکی‌شکل داشته و توانایی ایجاد کلنی‌هایی با اشکال مختلف را دارند (شکل ۲ الف و ب) (۳). توانایی بالای تکثیر و تمایز باعث شده

***نویسنده مسئول: دکتر صمد ندری**، دکترا تخصصی نانوتکنولوژی پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی زنجان، زنجان، ایران Email: nadri_s@zums.ac.ir

که از سلول‌های بنیادی مزانشیمی به‌عنوان یک منبع ایده‌آل برای سلول‌درمانی، ژن‌درمانی و به‌عنوان ابزاری برای درمان

ارتباط موضوعی مقالات با بررسی دقیق عنوان و خلاصه مقالات ارزیابی شد. مقالات با هدف بررسی روش‌های ایزولاسیون



شکل ۲- سلول‌های بنیادی مزانشیمی موش در محیط کشت (in vitro). **الف.** مورفولوژی دوکی‌شکل سلول‌ها کاملاً در شکل مشخص است **ب.** سلول‌های موردنظر توانایی تشکیل کلنی دارند (کلنی‌ها با فلش نشان داده‌شده‌اند.) (میکروسکوپ فاز کنتراست معکوس، بزرگنمایی ۱۰۰).

بیماری‌های مادرزادی استفاده گردد (۷). گزارش‌هایی مبنی بر استفاده از این سلول‌ها در مدل‌های حیوانی برای درمان نواقص استخوانی (۸)، جراحات نخاعی (۹، ۱۰)، سکته مغزی (۱۱)، پارکینسون (۱۲) و سکته قلبی (۱۳) وجود دارد.

با وجود اینکه موش به‌عنوان مدل ارزشمند فیزیولوژیکی پستانداران مطرح است اما جداسازی سلول‌های بنیادی مزانشیمی از مغز استخوان به دلیل آلودگی به سلول‌های خونی و ماکروفاژ مشکل است. تابه‌حال روش‌های مختلفی به‌منظور جداسازی و تخلیص این سلول‌ها از مغز استخوان موش گزارش شده است. در این مقاله روش‌های مختلفی که برای جداسازی سلول‌های بنیادی مزانشیمی موشی بکار گرفته شده مورد بحث قرار گرفته است.

مواد و روش‌ها

این مقاله مروری با جستجو در بانک‌های علمی معتبر PubMed, Science Direct, Web of Science, Embase, Magiran SID, IranMedexو با استفاده از کلیدواژه‌های استاندارد: سلول‌های بنیادی مزانشیمی (Mesenchymal Stem cells & Mesenchymal Stromal Cell)، موش (Mice, Murine & Mouse)، جداسازی و ایزولاسیون (Isolation) و مغز استخوان (Bone Marrow) از بین مقالات منتشرشده بین سال‌های ۲۰۱۵-۱۹۹۰ استخراج گردید. در این مطالعه انواع مقالات از جمله کارآزمایی بالینی، کوهورت آینده‌نگر، گذشته‌نگر، مقطعی، مورد- شاهدی مورد بررسی قرار گرفتند.

سلول‌های بنیادی مزانشیمی (Mesenchymal stem cells) وارد مطالعه شدند. مطالعات با گروه هدف انسان و حیواناتی به‌جز موش کوچک آزمایشگاهی و نیز مقالات نگارش شده به زبانی غیر از انگلیسی و فارسی حذف گردیدند. از مجموع ۱۲۹ مقاله به‌دست‌آمده پس از اعمال معیارهای ورود و خروج مقالات، تعداد ۵۳ مقاله حاصل شد که با بررسی دقیق مقالات مذکور و حذف موارد تکراری(Duplicate) ، تعداد ۲۶ مقاله که واجد اطلاعات معتبر و طراحی مطالعه قابل‌اعتماد بودند به‌منظور بررسی در این مطالعه مروری وارد و اطلاعات آن‌ها مورد تجزیه‌وتحلیل قرار گرفتند (جدول ۱).

جداسازی سلول‌های بنیادی مزانشیمی موش

سلول‌های بنیادی مزانشیمی با روش آسپیره کردن مغز استخوان از استخوان ران (Femur) و درشت‌نی (Tibia) استخراج می‌شود. در مطالعات اخیر سلول‌های بنیادی مزانشیمی از مایع آمنیوتیک موش نیز جدا شده است (۱۴). در سال‌های اخیر سلول‌های بنیادی مزانشیمی با روش‌هایی از قبیل چسبیدن به ظرف کشت پلاستیک (plastic adherence)، غنی‌سازی فیزیکی بر اساس اندازه سلول، حذف سلول‌های غیر مزانشیمی با استفاده از مواد سیتوتوکسیک، انتخاب بر اساس تراکم سلولی و مارکرهای سطحی سلول جداسازی گردیده است. سلول‌ها در محیط DMEM با میزان سرم ۲۰-۱۰ درصد کشت داده می‌شوند. سلول‌های بنیادی مزانشیمی در محیط کشت ((Cell culture مورفولوژی شبه- فیبروبلاستی داشته و

جدول ۱- روش‌های بکار گرفته شده برای جداسازی سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان موش

نویسندگان	روش کار	سال انتشار	نژاد موش
Wang و همکاران (۱۸)	تراکم پایین سلولی	1990	C57Bl/6, DBA/2, BDF1
Falla و همکاران (۲۱)	انکوبه کردن با مواد سمی	1993	BALB/c
Van Vlasselaer و همکاران (۳۹)	جداسازی سلولی	1994	Balb/c
Modderman و همکاران (۲۲)	حذف سلول‌های خون‌ساز و ماکروفاژها بر پایه استفاده از ethidium bromide (EB) و potassium thiocyanate (KSCN)	1994	Balb/c
Phinney و همکاران(۲۳)	استفاده از فاکتورهای رشد	1999	BALB/c, C57Bl/6, DBA/1, FVB/N
Baddoo و همکاران (۱۹)	انتخاب منفی	2003	FVB/N, Bl/6
Meirelles Lda و همکاران (۴۸)	استفاده از محیط‌های ویژه	2003	C57/Bl/6, Balb/c
Sun و همکاران (۵)	افزودن bFGF به محیط کشت	2003	C57/Bl/6
Tropel و همکاران (۴۰)	پلیت با پوشش فیبرونکتین، حاوی FBS و فاکتورهای رشد	2004	C57Bl/6J
Peister و همکاران (۱۷)	تراکم بالای سلولی	2004	Bl/6, Balb/c, FVB/N, DBA1, Transgenic strain
Eslaminejad و همکاران (۴۴)	تراکم پایین سلولی در کشت اولیه	2006	NMRI, Balb/c
Nadri و همکاران (۲۰)	انتخاب مثبت	2007	C57/Bl/6
Nadri و همکاران (۴۷)	تعویض مداوم محیط کشت و تیمار با تریپسین	2007	Balb/c
Rivkin و همکاران (۲۹)	استفاده از میکروبیدهای فیبرینی	2007	C57/BL
Phinney و همکاران (۴۹)	خارج کردن سلول‌های خونی با تعویض محیط در فاصله زمانی ۷۲ ساعت	2008	FVB/N
Anjos-Afonso و همکاران (۲۵)	استفاده از محیط کشت عاری از کلسیم و منیزیم و انجام پاساژهای مکرر	2008	C57Bl/6J, 129, FVB/N, C57Bl/6Actb-eGFP, Rosa26-eGFP (FVB/N background), Rosa26-LacZ (129/Bl6 background), NOD/SCID mouse strains
Sung و همکاران (۲۷)	استفاده از محیط اختصاصی رشد و تکثیر سلول‌های بنیادی مزانشیمی StemXVivo medium	2008	BALB/c, C3H and C57BL/6
Eslaminejad و همکاران (۱۶)	سیستم کشت بر پایه تراکم پایین و تراکم بالای سلولی	2009	NMRI
Morikawa و همکاران (۲۶)	هضم آنزیمی قطعات استخوان ساق و ران با استفاده از کلاژناز و استحصال مقادیری زیادی از سلول‌ها به‌منظور کشت و پاساژ دادن	2009	wild-type of C57BL/6 and B6.SJL-Ptprca Pep3b/BoyJ (C57BL/6Ly5.1;Ly5.1)
Liu و همکاران (۲۸)	استفاده از موش ترانس ژن و جداسازی سلول‌های SCA1 and CD29 با فلوسایتومتری	2010	Twist2-Cre x Cre reporter
Shainer و همکاران (۳۰)	استفاده از میکروبیدهای فیبرینی و پوشش کلاژنی سطح پلیت	2010	fluorescent transgenic green protein C57/Bl mice
Yamachika و همکاران (۲۴)	استفاده از bFGF (فاکتور رشد فیبروبلاستی بازی) و LIF (فاکتور مهاری لوکمیا) به‌منظور رشد سلول‌ها	2012	C57-GFP transgenic (C57BL/6 TgN [ACT6EGFP]) and SCID mice
Cheng و همکاران (۳۳)	استفاده از پلیت های پلاستیک کشت سلولی مخصوص که به‌طور موقت زمینه چسبندگی سلول‌ها را فراهم می‌کند transient lower-density plastic adherence (tLDA)	2012	BALB/c و C57BL/6
Ahmadbeigi و همکاران (۳۱)	استفاده از فسفات سالین بافر حاوی هپارین و استفاده از دو عدد فیلترهای نایلونی با قطر منافذ ۲۰ میلی‌متری که روی هم قرار گرفته‌اند	2013	C57BL/6
Bahrebar و همکاران (۳۲)	استفاده از توانایی چسبندگی سلول‌های بنیادی مزانشیمی در اتصال به پلیت پلاستیکی	2013	Balb/c
Habibian و همکاران (۳۴)	استفاده از توانایی چسبندگی سلول‌های بنیادی مزانشیمی در اتصال به پلیت پلاستیکی	2015	NMRI

قادر به اتصال به سطوح پلاستیکی می‌باشند (شکل ۲). این سلول‌ها برای اولین بار توسط فریدنشتین (Friedenstein) از

مغز استخوان رت جداسازی گردید (۱۵). از آنجا که جداسازی این سلول‌ها صرفاً بر اساس خاصیت چسبندگی به ظرف کشت پلاستیک کافی نیست؛ لذا محققین از روش‌های مختلف جهت جداسازی این سلول‌ها بهره جسته‌اند (جدول ۱). از جمله می‌توان به روش تراکم پایین یا بالای سلولی اشاره کرد که بر اساس پژوهش‌های انجام شده هردو روش تا حدودی مؤثر بوده‌اند (۱۶-۱۸). انتخاب منفی (Negative Selection) و همچنین انتخاب مثبت (Positive Selection) نیز با وجود تناقض ظاهری هر دو روش مؤثری در یافته‌های محققین بوده‌اند (۱۹، ۲۰). استفاده از مواد توکسیک و در برخی از موارد موتاژن نیز با وجود خطرات احتمالی بسیار، تاکنون در جداسازی سلول‌های بنیادی مزانشیمی با موفقیت همراه بوده‌اند (۲۱، ۲۲). هرچند که استفاده از فاکتورهای ویژه رشد نیز در اغلب موارد بسیار کاربردی ارزیابی شده است (۵، ۲۳ و ۲۴)، اما امروزه روش‌های به‌مراتب پیشرفته‌تری مانند استفاده از محیط‌های کشت ویژه با طراحی اختصاصی مرسوم گردیده است که غالباً به علت وجود حق تجاری‌سازی چندان عمومیت نیافته‌اند (۲۵-۲۷).

روش‌هایی با استفاده از تکنولوژی مانند سیستم Cre و یا GFP نیز بسیار مؤثر بوده‌اند که به علت هزینه‌های بالا چندان مورد استفاده قرار نگرفته‌اند (۲۸)؛ اما با توجه به نیاز روزافزون آزمایشگاه‌ها به استخراج سلول‌های بنیادی مزانشیمی، اقبال عمومی به سمت استفاده از روش‌هایی با تکرارپذیری بالا و ارزان مانند استفاده از سیستم بسیار کارآمد ریزگویچه‌های فیبرینی (FMB=Fibrin MicroBeads، ۳۰) (29) و نیز روش‌های بسیار ارزانی چون خاصیت چسبندگی پلاستیک فلاسک (۳۱-۳۴) بوده است. البته ریزگویچه‌های فیبرینی مدت‌هاست به‌عنوان حامل تجزیه‌پذیر، کارآمد و طولانی‌مدت سلول‌های بنیادی مزانشیمی مورد استفاده است (۳۵). FMB که بر پایه ترکیبات بیولوژیکی چون فیبرینوژن و ترومبین بر طبق دستورالعملی خاص تولید می‌گردد، غالباً در تمایز و کشت تک لایه سلول‌های بنیادی بخصوص به‌منظور تزریق به جراحات مورد ارزیابی بوده است. کارایی بالا و آماده‌سازی کم‌هزینه برخلاف گویچه‌های سفاروز سبب اقبال بیشتر به آن شده است که البته همچنان مورد بررسی‌های تکمیلی پیش بالینی است (۳۶، ۳۷).

بحث

در این مطالعه روش‌های متداول بکار گرفته شده برای جداسازی سلول‌های بنیادی مزانشیمی موش عنوان شده است. اولین جداسازی موفقیت‌آمیز سلول‌های شبه- فیبروبلاستی از مغز استخوان حدود ۴۰ سال قبل صورت گرفت (۱۵). در این تحقیق روش جداسازی بر اساس خاصیت چسبندگی سلول‌های شبه- فیروبلاستی و عدم چسبیدن سلول‌های خونی به پلیت کشت سلول بود. سلول‌های بنیادی مزانشیمی به‌دست‌آمده با این روش هتروژن بوده و به علت رشد و تکثیر سلول‌های غیر مزانشیمی در محیط کشت مجموعه ناخالص از سلول‌های استرومای مغز استخوان به دست آمد (۶، ۳۸).

تابه‌حال، روش‌های متعدد دیگری به‌منظور حذف سلول‌های خون‌ساز و تخلیص سلول‌های بنیادی مزانشیمی از مغز استخوان موش بکار گرفته شده است. دو گروه از محققین با انکوبه کردن کشت سلول‌های مغز استخوان با مواد سیتوتوکسیک از قبیل تیوسیانات پتاسیم و ۵-فلوئورو اوراسیل، سلول‌های ماکروفاژ و سلول‌های خون‌ساز را از کشت سلول‌های مغز استخوان موش حذف کردند (۲۱، ۲۲). همچنین استفاده از مواد سیتوتوکسیک علیرغم حذف سلول‌های غیر مزانشیمی از محیط کشت موجب از بین بردن توان تمایزی سلول‌های بنیادی مزانشیمی به دودمان‌های مختلف سلولی می‌شد. Van Vlasselaer و همکاران با استفاده از آنتی‌بادی‌های Sca-1 و Wheat germ agglutinin و با به‌کارگیری دستگاه Cell sorter سلول‌های بنیادی مزانشیم را از مغز استخوان موش نژاد Balb/c جداسازی کردند (۳۹). ایراد این روش کاهش توان کلن زایی و پتانسیل تمایز به دودمان استخوانی سلول‌ها بود.

تحقیقات به‌منظور کشف روشی مناسب جهت جداسازی سلول‌های بنیادی مزانشیمی موش ادامه داشت تا اینکه توجه محققین به استفاده از مارکر (آنتی‌ژن)های سطح سلول معطوف گردید. در این مسیر مشکلی که سد راه محققین، عدم شناسایی مارکر اختصاصی برای سلول‌های بنیادی مزانشیمی موش بود. محققین دریافته بودند که مارکر سلول‌های خون‌ساز (CD11b و CD45) در سلول‌های مزانشیمی موش بیانی ندارند؛ لذا در روش انتخاب منفی (Negative Selection) سلول‌های خونی با استفاده از آنتی‌بادی‌های CD11b و CD45 حذف

شدند. در این روش باوجوداینکه در مدت‌زمان بسیار کمی جمعیت خالص از سلول‌های دوکی‌شکل به دست آمد و سلول‌های مزانشیمی توان تمایزی به دودمان‌های مختلف سلولی را داشتند اما بیان ژن‌هایی که در تکثیر سلول‌ها دخالت داشتند کاهش یافت (۱۹). در ضمن تروپل (Tropel) و همکاران گزارش دادند که علیرغم انتخاب منفی سلول‌های مشتق از مغز استخوان با استفاده از آنتی‌بادی CD11b، این سلول‌ها یک هفته پس از کشت اولیه در پلیت کشت سلولی ظاهر شدند (۴۰). در تحقیق اخیر صورت گرفته توسط ندری، سلول‌های بنیادی مزانشیمی $CD34^+$ با استفاده از روش انتخاب ایمنی مثبت (Positive Selection) از موش C57Bl/6 جداسازی شد (۴۱). سلول‌های جداشده در این مطالعه توانایی تکثیر بالایی نسبت به سلول‌های جداشده با روش انتخاب ایمنی منفی داشتند و توان تکثیری خود را بدون احتیاج به فاکتورهای رشد و میتوژنی تا پاساژ سوم حفظ کردند. علاوه بر این در کشت سلول‌ها هیچ آلودگی به سلول‌های غیر مزانشیمی CD11b و CD45 مشاهده نشد. تحقیقات پیشین نشان داده است که آنتی‌ژن CD11b در مونوسیت‌ها، گرانولوسیت‌ها، ماکروفاژها و سلول‌های کشنده طبیعی و مارکر CD45 در همه دودمان‌های سلول‌های خونی بیان می‌شود (۴۲، ۴۳). به‌هرحال این روش برای جداسازی سلول‌های بنیادی مزانشیمی از نژادهای مختلف مناسب نبود که خود می‌تواند بیانگر این مطلب باشد که روش‌های بکار گرفته شده برای جداسازی سلول‌های بنیادی مزانشیمی محدود به نژاد است.

یکی از روش‌های مرسومی که تابه‌حال برای جداسازی سلول‌های بنیادی مزانشیمی به‌وسیله محققین انجام شده، استفاده از تراکم سلولی است. تراکم سلولی (تراکم بالا و پایین) روش نسبتاً خوبی برای جداسازی سلول‌های بنیادی مزانشیمی موشی است (۴۴، ۱۷). جداسازی سلول‌ها با روش تراکم بالای سلول مستلزم انجام پاساژهای متعدد است. در این روش سلول‌ها با تراکم ۱۰۰۰ سلول در هر سانتی‌متر مربع در ظروف پلاستیکی کشت داده می‌شوند و پس از اینکه بیشتر سطح ظرف کشت به‌وسیله سلول‌ها پر شد، سلول‌های کنده‌شده با پاساژ دادن به ظروف کشت بعدی منتقل می‌شوند. مراحل فوق تا به دست آوردن مجموعه نسبتاً خالصی از سلول‌های دوکی‌شکل ادامه داده می‌شود. با این روش سلول‌ها در پاساژهای ۵ یا ۶ خالص می‌شوند. هرچند استفاده از این روش برای جداسازی سلول‌های بنیادی مزانشیمی موش ساده و راحت به نظر می‌رسد اما دارای معایبی است که می‌توان به موارد زیر اشاره داشت: اولاً امکان به دست آوردن مجموعه کاملاً خالص از سلول‌های بنیادی مزانشیمی موش با این روش بسیار مشکل است و مهم‌تر اینکه با افزایش زمان کشت سلول و تعداد پاساژها، توان تمایزی سلول‌ها کاهش می‌یابد (۴۵). روش دوم که بر اساس آن محققین به جداسازی سلول‌های بنیادی مزانشیمی پرداخته‌اند، روش کشت با تراکم پایین سلولی است. در این روش سلول‌ها با تراکم ۶ تا ۵۰ سلول در هر سانتی‌متر مربع کشت داده می‌شوند. بمانند روش قبل، پس از پر شدن نسبی سطح ظرف کشت پاساژ صورت گرفته و مراحل فوق تا پاساژ ۳ یا ۴ که مجموعه خالص از سلول‌ها به دست آید تکرار می‌گردد. در روش تراکم پایین سلولی با وجود اینکه مشکلات مربوط به روش تراکم بالای سلولی وجود ندارد و در مدت‌زمان کمتری جمعیت خالص از سلول‌های بنیادی مزانشیمی موشی به دست می‌آید اما امکان تأثیر تراکم سلولی بر خصوصیات بیولوژیکی و فنوتیپی سلول‌ها وجود دارد (۴۶). اخیراً، ندری و همکاران موفق به ابداع روشی جدید مبتنی بر تعویض مداوم محیط کشت و کاهش زمان تریپسینه برای جداسازی سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان موش شده‌اند (۴۷). در این روش جمعیت خالص از سلول‌های بنیادی مزانشیمی با توان تکثیر و تمایزی بالا در زمان بسیار کوتاهی (سه هفته بعد از کشت اولیه) به دست آمد. در این روش به‌منظور حذف سلول‌های غیر مزانشیمی و خونی، اقدام به تعویض مداوم محیط کشت در ساعات اولیه کشت سلول‌های مغز استخوان شد. نتایج نشان داد که تعویض پی‌درپی محیط کشت مانع از چسبیدن بیشتر سلول‌های غیرمزانشیمی و سلول‌های خونی به ظرف کشت می‌شود. در ادامه پس از پر شدن نسبی ظرف کشت با کاهش زمان تریپسینه کردن تمام سلول‌های غیر مزانشیمی از محیط کشت حذف گردید و جمعیت کاملاً خالص از سلول‌های بنیادی مزانشیمی پس از پاساژ اول و تنها سه هفته پس از کشت اولیه سلول‌های آسپیره شده از مغز استخوان موش به دست آمد. در این روش از هیچ عامل خارجی (آنتی‌بادی و مواد سیتوتوکسیک) و یا تراکم سلولی که تأثیرات منفی بر رشد، تمایز و خصوصیات بیولوژیکی سلول‌های بنیادی مزانشیمی دارند، استفاده نگردید.

نتیجه‌گیری

در مجموع با وجود اهمیت سلول‌های بنیادی مزانشیمی موش به‌عنوان مدل ارزشمند فیزیولوژیک پستانداران، مطالعه آن‌ها با مشکلاتی از قبیل آلودگی به سلول‌های خون‌ساز، اندوتلیال و ماکروفاژ همراه است (۵، ۱۴، ۴۱، ۴۴ و ۴۷). به همین دلیل محققین حوزه سلول‌های بنیادی مزانشیمی همواره درصدد یافتن روش‌های مناسب، کم‌هزینه و در عین حال با کارایی بالا هستند که در آن کمترین استرس از نظر از دست دادن توانایی تکثیر و تمایز بر سلول‌های بنیادی مزانشیمی وارد گردد. نتایج این مقاله مروری نشان داد که روش‌های بکار گرفته شده توسط محققین پیشین تأثیرات نامطلوب بر خصوصیات سلول‌های بنیادی مزانشیمی داشته و امکان مطالعه و تحقیقات پیش کلینیکی مؤثر بر روی این سلول‌ها را ناموفق می‌کند. کشف مارکر سطح سلول‌های مزانشیمی موش می‌تواند کمک شایانی به این مهم نماید؛ اما تابه‌حال مارکر اختصاصی برای سلول‌های بنیادی مزانشیمی موشی پیشنهاد نشده و در این شرایط ما پیشنهاد می‌کنیم که به‌منظور جداسازی سلول‌های مزانشیمی موش از روش تعویض مداوم محیط کشت و کاهش زمان تریپسینه که کمترین استرس ممکن را بر سلول‌های بنیادی دارد استفاده شود.

تشکر و قدردانی

نویسندگان مقاله از معاونت محترم تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی زنجان کمال تشکر و قدردانی را دارند.

تعارض منافع

نویسندگان هیچ‌گونه تعارض منافعی را اعلام نکرده‌اند.

References

1. Filip S, Mokry J, Hruska I. Adult stem cells and their importance in cell therapy. Folia Biol (Praha). 2003;49(1):9-14.
2. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD and et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. Science. 1999;284(5411):143-7.
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. 1970;3(4):393-403.
4. Bianco P, Riminucci M, Gronthos S, Robey PG. Bone marrow stromal stem cells: nature, biology, and potential applications. Stem Cells. 2001;19(3):180-92.
5. Sun S, Guo Z, Xiao X, Liu B, Liu X, Tang PH and et al. Isolation of mouse marrow mesenchymal progenitors by a novel and reliable method. Stem Cells. 2003;21(5):527-35.
6. Prockop DJ. Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues. Science. 1997;276(5309):71-4.
7. 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(3):301-16.
8. Horwitz EM, Gordon PL, Koo WK, Marx JC, Neel MD, McNall RY and 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(13):8932-7.
9. Hofstetter CP, Schwarz EJ, Hess D, Widenfalk J, El Manira A, Prockop DJ and et al. Marrow stromal cells form guiding strands in the injured spinal cord and promote recovery. Proc Natl Acad Sci USA. 2002;99(4):2199-204.
10. 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(1):26-34.
11. Chen J, Zhang ZG, Li Y, Wang L, Xu YX, Gautam SC and et al. Intravenous administration of human bone marrow stromal cells induces angiogenesis in the ischemic boundary zone after stroke in rats. Circulation research. 2003;92(6):692-9.
12. 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(15):2539-49.
13. Nassiri SM, Khaki Z, Soleimani M, Ahmadi SH, Jahanzad I, Rabbani S and et al. The similar effect of transplantation of marrow-derived mesenchymal stem cells with or without prior differentiation induction in experimental myocardial infarction. J Biomed Sci. 2007;14(6):745-55.
14. De Coppi P, Bartsch G Jr, Siddiqui MM, Xu T, Santos CC, Perin L and et al. Isolation of amniotic stem

cell lines with potential for therapy. Nat Biotechnol. 2007;25(1):100-6.
15. Friedenstein AJ, Piatetzky S, Petrakova KV. Osteogenesis in transplants of bone marrow cells. J Embryol Exp Morphol. 1966;16(3):381-90.
16. Eslaminejad MB, Nadri S. Murine mesenchymal stem cell isolated and expanded in low and high density culture system: surface antigen expression and osteogenic culture mineralization. In Vitro Cell Dev Biol Anim. 2009;45(8):451-9.
17. 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(5):1662-8.
18. Wang QR, Wolf NS. Dissecting the hematopoietic microenvironment. VIII. Clonal isolation and identification of cell types in murine CFU-F colonies by limiting dilution. Exp Hematol. 1990;18(4):355-9.
19. Baddoo M, Hill K, Wilkinson R, Gaupp D, Hughes C, Kopen GC and et al. Characterization of mesenchymal stem cells isolated from murine bone marrow by negative selection. J Cell Biochem. 2003;89(6):1235-49.
20. Nadri S, Soleimani M. Isolation murine mesenchymal stem cells by positive selection. In Vitro Cell Dev Biol Anim. 2007;43(8):276-82.
21. Falla N, Van V, Bierkens J, Borremans B, Schoeters G, Van Gorp U. Characterization of a 5-fluorouracil-enriched osteoprogenitor population of the murine bone marrow. Blood. 1993;82(12):3580-91.
22. Modderman WE, Vrijheid-Lammers T, Lowik CW, Nijweide PJ. Removal of hematopoietic cells and macrophages from mouse bone marrow cultures: isolation of fibroblastlike stromal cells. Exp Hematol. 1994;22(2):194-201.
23. 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(4):570-85.
24. Yamachika E, Tsujigiwa H, Matsubara M, Hirata Y, Kita K, Takabatake K and et al. Basic fibroblast growth factor supports expansion of mouse compact bone-derived mesenchymal stem cells (MSCs) and regeneration of bone from MSC in vivo. J Mol Histol. 2012;43(2):223-33.
25. Anjos Afonso F, Bonnet D. Isolation, culture, and differentiation potential of mouse marrow stromal cells. Curr Protoc Stem Cell Biol. 2008; 2(7):3-11.
26. Morikawa S, Mabuchi Y, Kubota Y, Nagai Y, Niibe K, Hiratsu E and et al. Prospective identification, isolation, and systemic transplantation of multipotent mesenchymal stem cells in murine bone marrow. J Exp Med. 2009;206(11):2483-96.
27. Sung JH, Yang HM, Park JB, Choi GS, Joh JW, Kwon CH and et al. Isolation and characterization of mouse mesenchymal stem cells. Transplant Proc. 2008;40(8):2649-54.
28. Liu Y, Wang L, Fatahi R, Kronenberg M, Kalajzic I, Rowe D and et al. Isolation of murine bone marrow derived mesenchymal stem cells using Twist2 Cre transgenic mice. Bone. 2010;47(5):916-25.
29. Rivkin R, Ben -Ari A, Kassis I, Zangi L, Gaberman E, Levdansky L and et al. High-yield isolation, expansion, and differentiation of murine bone marrow-derived mesenchymal stem cells using fibrin microbeads (FMB). Cloning Stem Cells. 2007;9(2):157-75.
30. Shainer R, Gaberman E, Levdansky L, Gorodetsky R. Efficient isolation and chondrogenic differentiation of adult mesenchymal stem cells with fibrin microbeads and micronized collagen sponges. Regen Med. 2010;5(2):255-65.
31. Ahmadbeigi N, Soleimani M, Vasei M, Gheisari Y, Mortazavi Y, Azadmanesh K and et al. Isolation, characterization, and transplantation of bone marrow-derived cell components with hematopoietic stem cell niche properties. Stem Cells Dev. 2013;22(23):3052-61.
32. Bahrebar K, Mohseni Kouchesfahan H, Delavize H, Nabiuni M, Nazari Z, Havasi P. Surface Markers Expression in the Mesenchymal Stem Cells Derived from Bone Marrow. Armaghane danesh. 2013;18(7):520-9. [in Persian]
33. Cheng CC, Lian WS, Hsiao FS, Liu IH, Lin SP, Lee YH and et al. Isolation and characterization of novel murine epiphysis derived mesenchymal stem cells. PLoS One. 2012;7(4):e36085. doi:10.1371/journal.pone.0036085.
34. Habibian R, Delirezh N, Farshid AA. Effect of mesenchymal stem cells on allergic asthma in mouse model. Tehran University Medical Journal. 2015;73(5):345-53. [in Persian]
35. Gorodetsky R, Vexler A, Levdansky L, Marx G. Fibrin Microbeads (FMB) As Biodegradable Carriers for Culturing Cells and for Accelerating Wound Healing. Biopolymer Methods in Tissue Engineering. Totowa, NJ: Humana Press; 2004, p. 11-24.
36. Gorodetsky R, Clark RA, An J, Gailit J, Levdansky L, Vexler A and et al. Fibrin microbeads (FMB) as biodegradable carriers for culturing cells and for accelerating wound healing. J Invest Dermatol. 1999;112(6):866-72.
37. Gorodetsky R, Levdansky L, Gaberman E, Gurevitch O, Lubzens E, McBride WH. Fibrin microbeads loaded with mesenchymal cells support their long-term survival while sealed at room temperature. Tissue Eng Part C Methods. 2011;17(7):745-55.
38. Friedenstein AJ, Gorskaja JF, Kulagina NN. Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs. Exp Hematol. 1976;4(5):267-74.
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(3):753-63.
40. Tropel P, Noel 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(2):395-406.
41. Nadri S, Soleimani M. Isolation of CD34+ mesenchymal stem cells from mouse bone marrow. Scientific Journal of Iran Blood Transfus Organ. 2007;4(2):143-51. [in Persian]
42. Ledbetter JA, Herzenberg LA. Xenogeneic monoclonal antibodies to mouse lymphoid differentiation antigens. Immunol Rev. 1979;47:63-90.
43. Springer T, Galfre G, Secher DS, Milstein C. Monoclonal xenogeneic antibodies to murine cell surface antigens: identification of novel leukocyte differentiation antigens. Eur J Immunol. 1978;8(8):539-51.
44. 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(6):361-70.
45. Digirolamo CM, Stokes D, Colter D, Phinney DG, Class R, Prockop DJ. Propagation and senescence of human marrow stromal cells in culture: a simple colony-forming assay identifies samples with the greatest potential to propagate and differentiate. Br J Haematol. 1999;107(2):275-81.
46. Phinney DG. Building a consensus regarding the nature and origin of mesenchymal stem cells. J Cell Biochem Suppl. 2002;85 (38):7-12.
47. Nadri S, Soleimani M, Hosseni RH, Massumi M, Atashi A, Izadpanah R. An efficient method for isolation of murine bone marrow mesenchymal stem cells. Int J Dev Biol. 2007;51(8):723-9.
48. Meirelles Lda S, Nardi NB. Murine marrow-derived mesenchymal stem cell: isolation, in vitro expansion, and characterization. Br J Haematol. 2003;123(4):702-11.
49. Phinney DG. Isolation of Mesenchymal Stem Cells from Murine Bone Marrow by Immunodepletion. In: Prockop DJ, Bunnell BA, Phinney DG, editors. Mesenchymal Stem Cells: Methods and Protocols. Totowa, NJ: Humana Press; 2008. p. 171-86.

Review Article

Isolation Methods of Mesenchymal Stem Cells in Mice; a Systematic Review

Nadri S[1, 2]*, Saburi E[1], Nadri P[3], Barati Gh[1]

1- Faculty of Medicine, Zanjan University of Medical Sciences, Zanjan, Iran
2- Cancer Gene Therapy research Center, Zanjan University of Medical Sciences, Zanjan, Iran
3- Isfahan University of Technology, Isfahan, Iran

Received: 01 May 2016 Accepted: 17 Aug 2016

Abstract

Bone marrow (BM) has been regarded as the primarily source of hematopoietic stem cells for many years. Recent researches have shown BM contains not only hematopoietic but also heterogeneous non-hematopoietic stem cells. Until now, similar or overlapping isolation strategies of primitive non-hematopoietic stem cells in BM were named by different investigators and hence were assigned different names (e.g. mesenchymal stem cells, or multipotent adult progenitor cells) from alternative sources and different animal species. The differentiation potential of these cells to mesenchymal lineages has generated a great deal of interest in regenerative medicine and tissue engineering. Murine Mesenchymal stem cells (mMSCs) are appropriate models for preclinical investigations on human cell therapies. The isolation of BM-derived mMSCs is discussed as an unresolved issue in mesenchymal stem cells researches. The objective of the present review is the description of multiple methodological approaches to isolate mMSCs.

Keywords: murine mesenchymal stem cells, bone marrow, isolation

***Corresponding author: Samad Nadri**, PhD of Medical Nanotechnology, Faculty of Medicine, Zanjan University of Medical Sciences, Zanjan, Iran
Email: nadri_s@zums.ac.ir

Journal of Fasa University of Medical Sciences 6 (2017): 417-425