

مقایسه‌ی میزان بروز مارگرهای شاخص استئوبلاست‌های متمایز شده از سلول‌های بنیادی مشتق از چربی در مدل‌های کشت تک لایه‌ای و Pellet

بهنام حیرت^۱، سامان اکبرزاده^۱، فرزانه صادقی^۲، مسعود قربانی^۳، وحید بهرام بیگی^۴،
دکتر وحید گوهریان^۵، دکتر بتول هاشمی‌بنی^۶

چکیده

مقدمه: امروزه با توجه به آمار تصادفات بالا و شکستگی‌های منجر به نقایص استخوانی و عدم امکان پیوند مناسب استخوان، محققان به دنبال راهکارهای نوین برای ترمیم استخوان آسیب دیده می‌باشند. با توجه به به کارگیری سلول‌های بنیادی در مهندسی بافت استخوان و ضرورت بررسی انواع روش‌های کشت، محیط‌ها و داربست‌های مناسب، بر آن شدیم که با استفاده از سلول‌های بنیادی مشتق از چربی (Adipose-derived stem cells یا ADSCs) و القای فرایند استئوژنز در این سلول‌ها و بررسی میزان بروز مارکر استئوکلسین و استئوپوننتین در دو سیستم Monolayer و Pellet culture، گامی در راستای تدوین راهکارهای جدید برای ترمیم آسیب‌های استخوانی برداشته باشیم.

روش‌ها: سلول‌های بنیادی از بافت چربی ۴ فرد توسط روش‌های مکانیکی و آنزیمی جدا گردید و کشت داده شد. سلول‌ها طی فرایند استئوژنز در دو سیستم Monolayer و Pellet culture تمایز داده شد. سپس استخراج RNA از سلول‌های تمایز یافته، سنتز cDNA و تکثیر انجام شد. محصول PCR به روی ژل الکتروفورز انتقال یافت. میزان بروز مارکرهای استخوانی مانند استئوکلسین و استئوپوننتین، با توجه به شدت باندهای تشکیل شده با استفاده از نرم‌افزار Image-J و آزمون Student-t بررسی و مقایسه گردید.

یافته‌ها: میانگین بروز ژن استئوکلسین در سلول‌های تمایز یافته در دو سیستم کشت تفاوت معنی‌داری نداشت، در حالی که میانگین بروز ژن استئوپوننتین در سلول‌های تمایز یافته در دو سیستم کشت تفاوت معنی‌داری داشت و در کشت Pellet در مقایسه با تک لایه‌ای بروز بیشتری داشت ($P < 0.05$).

نتیجه‌گیری: این مطالعه نشان داد که Pellet culture و Monolayer هر دو شرایط کشت مناسبی برای القای استئوژنز به حساب می‌آیند، ولی ژن‌های استئوکلسین و استئوپوننتین به عنوان مارکر و شاخص استخوانی در سیستم Pellet در مقایسه با سیستم Monolayer بروز متفاوتی داشتند.

واژگان کلیدی: استئوژنز، سلول‌های بنیادی مشتق از چربی، استئوکلسین، استئوپوننتین، Pellet culture

مقدمه

بالای تصادفات و شکستگی‌های منجر به نقایص استخوانی، مشکلات ظاهری، عملکردی و روانی ناشی از آن‌ها و نیز محدودیت امکان پیوند مناسب استخوان، محققان به دنبال راهکارهای نوین جهت ترمیم

آسیب‌های استخوانی از تومورها، بیماری‌ها، عفونت‌ها، تروما، اختلالات بیوشیمیایی و ناهنجاری‌های اسکلتی دوران جنینی ناشی می‌شود. امروزه با توجه به آمار

^۱ دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه زیست‌شناسی، دانشکده‌ی علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد جهرم، جهرم، ایران
^۲ کارشناس ارشد، گروه علوم تشریحی و بیولوژی ملکولی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
^۳ دانشجوی دکتری مهندسی، گروه مهندسی بافت، دانشکده‌ی فناوری‌های نوین، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران
^۴ دانشجوی کارشناس ارشد، گروه علوم تشریحی و بیولوژی ملکولی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
^۵ متخصص جراحی، گروه جراحی، بیمارستان امین، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
^۶ استادیار، گروه علوم تشریحی و بیولوژی ملکولی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

ژن‌های ویژه‌ی استخوان را گزارش کردند (۸). مقایسه‌ی تکثیر و میزان زنده بودن استئوبلاست‌های کالواریا در کشت تک لایه‌ای و داربست آلزینات و هیدروکسی آپاتیت-تری‌کلسیم فسفات نیز توسط محققین گزارش شده است (۹).

Gabbay و همکاران روند استئوژنز سلول‌های مشتق از چربی و بیان ژن‌های ویژه‌ی استخوانی در شرایط کشت دو بعدی (تک لایه‌ای) و سه بعدی (ژل کلاژن) را مقایسه نمودند و نشان دادند که بیان ژن‌های کلاژن، الکالین فسفاتاز، استئوکلسین و استئونکتین در شرایط سه بعدی بهتر انجام شده است (۱۰).

مدل کشت Pellet نوعی کشت سه بعدی می‌باشد که برای اولین مرتبه در شرایطی که فنوتیپ تمایز یافته‌ی سلول‌ها حفظ شود توسط Holtzer شرح داده شد. سپس Johnstone و همکاران از این روش جهت تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از مغز استخوان خرگوش استفاده نمودند (۱۱). اگر چه در اکثر مطالعات از مدل کشت سه بعدی برای تمایز کندروسیت‌ها استفاده می‌شود، ولی برای تمایز استئوبلاست‌ها در محیط *in vitro* از کشت دو بعدی استفاده می‌کنند (۱۲-۱۳). این مدل کشت به این دلیل به طور معمول برای افزایش کندروژنز کندروسیت‌های اولیه یا سلول‌های بنیادی مغز استخوان به کار می‌رود که سبب افزایش تمایز سلول‌ها و افزایش ترشح ECM (Extra cellular matrix) می‌شود (۱۴).

کشت تک لایه‌ای نوعی مدل کشت می‌باشد که سلول‌ها در یک لایه‌ی منفرد، در فلاسک حاوی محیط کشت رشد می‌کنند. این نوع کشت برای سلول‌های مستقل ضروری می‌باشد (۱۵).

Ong و همکاران سلول‌های مزانشیمی

استخوان‌های آسیب دیده می‌باشند (۱).

برای ترمیم نقایص سیستم اسکلتی از روش‌های متعددی مانند روش ایلزاروف، پیوند هتروگرافت، پیوند اتوگرافت و پیوند هموگرافت استفاده می‌کنند، ولی این روش‌ها با محدودیت‌هایی مانند تهاجمی بودن روش، رد پیوند و خطر انتقال عفونت همراه است. بنابراین باید به دنبال راهکار مفیدتری بود تا بتوان این محدودیت‌ها را بر طرف کرد. به کارگیری سلول، داربست و روش کشت مناسب جهت دستیابی به بافت استخوانی قابل پیوند، استراتژی درمانی مناسب برای رفع محدودیت‌های مذکور می‌باشد (۲).

مطالعات نشان داده است که فرایند استخوان‌سازی تحت تأثیر عوامل فیزیکی و شیمیایی در یک محیط پیچیده‌ی میکرو همراه با تعامل سلول‌ها انجام می‌گیرد (۳-۴).

جهت دستیابی به بافت استخوانی ایده‌آل مدل‌های متنوع در زمینه‌ی کشت، تکثیر استئوبلاست‌ها و القای روند تمایز استئوژنیک به کار گرفته شده است. کشت تک لایه‌ای از سلول‌های استئوبلاست مشتق از کالواریا (۵) و القای استئوژنیک سلول‌های بنیادی مزانشیمی در شرایط دو و سه بعدی (۶) و مقایسه‌ی انواع روش‌های کشت در این زمینه (۷)، نتایج ارزشمندی به دنبال داشته است، اما تناقضات موجود ضرورت تحقیقات بیشتر را می‌طلبد. طی کشت تک لایه‌ای سلول‌های استخوانی، اختلال در بیان ژن‌ها و رسوب نامناسب ماتریکس گزارش شده است. همچنین مشخص شده است که بین مهار تکثیر و القای بیان ژن‌های درگیر در تمایز سلولی و کامل شدن ماتریکس ارتباط مستقیم وجود دارد (۷). Jahn و همکاران سلول‌های استئوبلاست را در دو مدل کشت تک لایه‌ای و Pellet کشت دادند و بیان متفاوت

سپس شناسایی مارکرهای سلول‌های به دست آمده از طریق تکنیک فلوسایتومتری انجام گرفت. سلول‌ها با روش تریپسینه شدن از کف فلاسک جدا شد و سوسپانسیون سلولی با دور rpm ۱۴۰۰ و به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ شد. سپس با بافر PBS (Phosphate buffered saline) بار دیگر شستشوی سلول‌ها انجام گرفت و سلول‌ها با هموسیتومتر شمارش گردید. 1×10^5 سلول در لوله‌های فلوسیتومتر ریخته شد و پس از شستشو و سانتریفوژ مجدد فرایند فیکس شدن با استفاده از پارافرمالید ۴ درصد (Merck) در PBS به مدت ۱۵ دقیقه در تاریکی و بر روی یخ انجام گرفت.

سپس شستشو توسط بافر PBS حاوی ۰/۵ درصد آلبومین سرم گاوی به انجام رسید. در مرحله‌ی بعد حدود ۱۰ میکرولیتر آنتی‌بادی اولیه ضد مارکرهای سطحی CD44 و CD90 از شرکت IQ product به هر یک از لوله‌ها افزوده شد. سلول‌ها در آنتی‌بادی به مدت ۳۰ دقیقه در تاریکی و دمای ۴ درجه‌ی سانتی‌گراد انکوبه شدند. هر آنتی‌بادی با ماده‌ی فلورسنت فیکسواریتین (PE یا Phycoerythrin) یا فلورسین ایزوتیوسیانات (Fluorescein isothiocyanate) یا FITC نشان‌دار شد. سپس شستشو با بافر انجام گرفت و پس از سانتریفوژ، رسوب سلولی در ۲۰۰ میکرولیتر بافر حل گردید و توسط دستگاه فلوسایتومتر (BD) FACS Calibur 488 بررسی سلول‌های نشان‌دار به انجام رسید.

برای القای تمایز استئوژنیک در کشت تک لایه‌ای، سلول‌های ADSc در فلاسک‌های T25 تا پاساژ دوم کشت داده شدند. سپس تعداد $10^4 \times 25$ سلول در فلاسک دارای مدیوم استئوژنیک حاوی DMEM, FBS

(Mesenchymal stem cells یا MSCs) را به صورت مدل Pellet کشت دادند و گزارش کردند که سلول‌ها در این مدل کشت نسبت به کشت تک لایه‌ای اوره و آلبومین بیشتری در محیط آزاد می‌کنند (۱۶). با توجه به این نکته و با نظر به این که هنوز نظر واحد و قطعی در خصوص مناسب بودن مدل کشت Pellet یا تک لایه‌ای برای کشت استئوبلاست‌ها و ترشح ECM توسط این سلول‌ها گزارش نشده است، در این مطالعه میزان بروز مارکرهای استئوکلسین و استئوپونتین استئوبلاست‌های مشتق از سلول‌های بنیادی مشتق از چربی در دو سیستم Monolayer و Pellet culture مقایسه گردید.

روش‌ها

نوع مطالعه از نوع تجربی و محل مطالعه آزمایشگاه کشت سلول در گروه علوم تشریحی دانشکده‌ی پزشکی اصفهان بود. بافت چربی از ۴ بیمار که در بیمارستان الزهراء (س) اصفهان تحت عمل جراحی قرار گرفته بودند، جمع‌آوری شد. تحت شرایط استریل در زیر هود لامینار کلاس II، بافت چربی با اسکالپل به قطعات چند میلی‌متری بریده شد. جهت تجزیه‌ی بافت، طبق پروتکل مقالات از آنزیم کلاژناز نوع ۱ (Sigma) استفاده گردید. در ادامه‌ی کار سوسپانسیون سانتریفوژ شده در فلاسک ۲۵ سانتی‌متر مربع در محیط کشت استرپتومایسین، پنی‌سیلین ۱ درصد، FBS (Fetal bovine serum) ۱۰ درصد و DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Media) در انکوباتور ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد، CO_2 ۵ درصد و رطوبت نسبی کشت داده شد. با تعویض مدیوم بعد از ۲۴ ساعت سلول‌های اضافی تخلیه گردید.

استاندارد در دمای دناتوریشن ۹۰ درجه‌ی سانتی‌گراد و برای ۱۵ ثانیه و دمای ذوب شدن (Annealing) ۵۵ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه و دمای Extention ۷۵ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۴۵ ثانیه انجام گرفت. پرایمرها در جدول ۱ لیست شده‌اند.

جدول ۱. توالی پرایمرهای به کار رفته

نام ژن	توالی پرایمرها
Osteocalcin	F- AGGTGCGAAGCCCAGCGGT
	R- GCCAGCAGAGCGACACCCT
Osteopontin	F- CACTGGGCTATGGAGAGGAC
	R- GCCCTTGCCCTGCCCTCC
GAPDH	F- GGGCTGCTTTTAACTCTGGT
	R- GCAGGTTTTTCTAGACGG

نتایج به دست آمده توسط نرم‌افزار Image J و SPSS نسخه‌ی ۱۷ (version 17, SPSS Inc., Chicago, IL) مورد بررسی قرار گرفت و در نهایت داده‌ها توسط آزمون Student-t آنالیز و مقایسه گردیدند.

یافته‌ها

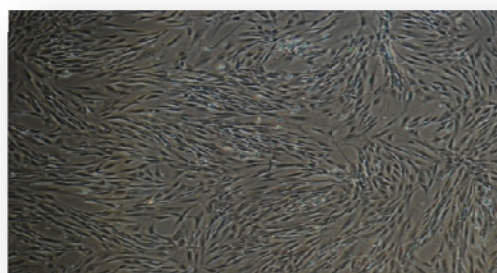
پس از تجزیه‌ی بافت چربی زیر جلدی تحت تأثیر آنزیم کلاژناز، سلول‌های تک هسته‌ای به تدریج مرحله‌ی چسبندگی خود را به کف فلاسک آغاز کردند. سلول‌ها سپس از حالت کروی خارج شدند و به اشکال چندوجهی، ستاره‌ای و دوکی با زواید سیتوپلاسمی کوتاه و اندک مشخص شدند و با انجام تقسیمات میتوزی متوالی، رشد و تکثیر یافتند. پس از ۱۴-۱۰ روز سلول‌ها کف فلاسک را اشغال نمودند. با تکثیر و افزایش تعداد سلول‌ها، اشکال ستاره‌ای و چندوجهی کمتر دیده شد و اکثر سلول‌ها دوکی شکل بودند. پس از رسیدن به پاساژ سوم، یک شکل هموزن و یکنواخت در کشت سلول‌های جدا شده مشخص گردید (شکل ۱).

(۱۰ درصد)، اسید آسکوربیک (۵۰ میلی‌مول)، بتا گلیسروفسفات (۱۰ میلی‌مول) و پنی‌سیلین، استرپتومایسین (۱ درصد) اضافه گردید. فلاسک‌ها درون انکوباتور با دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد و CO₂ ۵ درصد نگهداری شد. هر ۲ تا ۳ روز مدیوم تعویض می‌شد. پس از دو هفته سلول‌ها از نظر بیان ژن‌های استئوکلسین و استئوپوننتین با روش RT-PCR (Reverse transcription polymerase chain reaction) مورد ارزیابی قرار گرفتند.

برای القای تمایز استئوژنیک در سیستم کشت Pellet، سلول‌های ADSc در فلاسک‌های T25 تا پاساژ دوم کشت داده شد. تعداد ۱۰^۴ × ۲۵ سلول پس از ترپسینه کردن به فالكون انتقال داده شد و سانتریفیوژ گردید. سپس مدیوم استئوژنیک حاوی DMEM, FBS (۱۰ درصد)، اسید آسکوربیک (۵۰ میلی‌مول)، بتا گلیسروفسفات (۱۰ میلی‌مول) و پنی‌سیلین، استرپتومایسین (۱ درصد) اضافه گردید. فالكون‌ها درون انکوباتور با دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد و CO₂ ۵ درصد نگهداری شد. هر ۲ تا ۳ روز مدیوم تعویض می‌شد. پس از دو هفته سلول‌ها از نظر بیان ژن‌های استئوکلسین و استئوپوننتین با روش RT-PCR مورد ارزیابی قرار گرفتند.

برای بررسی میزان بیان ژن‌های استئوکلسین و استئوپوننتین از تکنیک RT-PCR استفاده گردید. به طور خلاصه مجموع RNA سلول‌ها طبق پروتکل توسط کیت جداسازی (CinnaGen) RNA isolation plus استخراج گردید. ساخت cDNA طبق دستورالعمل توسط پرایمرهای الگو و کیت RevertAid™ First strand cDNA synthesis kit (Fermentage) انجام شد. تکثیر PCR توسط DNA Tag پلیمرز (Fermentage) و طبق روش

برای بررسی مارکرهای سلول‌های بنیادی مشتق از چربی فلوسایتومتری استفاده شد.



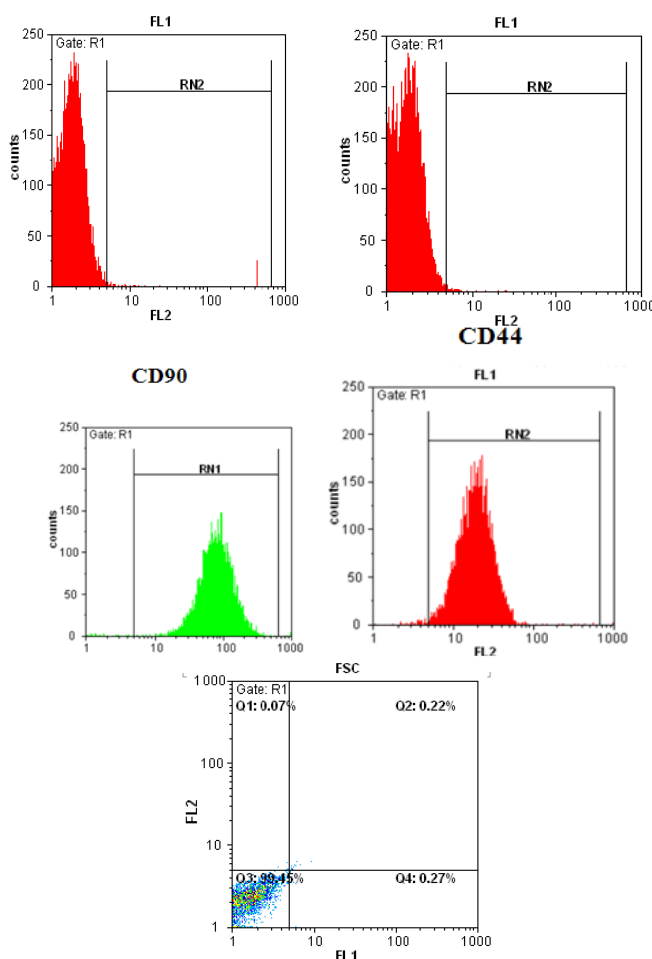
شکل ۱. تصویر سلول‌های بنیادی زنده‌ی به دست آمده از بافت چربی در کشت تک لایه‌ای که با میکروسکوپ اینورت تهیه شده است. سلول‌ها به صورت دوکی با مورفولوژی شبه فیروبلاست مشخص هستند (بزرگ‌نمایی ۴۰×).

مورد نظر و شمارش سلول‌ها توسط دستگاه فلوسیتومتر، حدود ۹۹/۷۵ و ۹۹/۰۶ درصد سلول‌ها به ترتیب دارای مارکر CD90 و CD44 بودند. ۹۹/۵ درصد سلول‌ها فاقد مارکرهای CD14,45 بودند (شکل ۲).

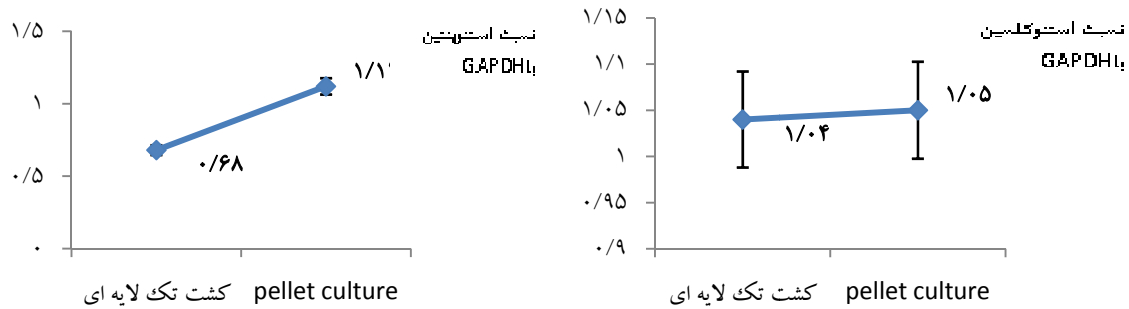
برای بررسی میزان بیان مارکرهای استئوپونتین و استئوکلسین که مختص استئوبلاست‌ها و تمایز استئوژنیک می‌باشند، از RT-PCR استفاده گردید.

نتایج نشان داد که میانگین بروز ژن استئوکلسین، در سلول‌های تمایز یافته در دو سیستم کشت تک لایه‌ای و Pellet تفاوت معنی‌داری نداشت، ولی میانگین بروز ژن استئوپونتین در سیستم Pellete نسبت به کشت تک لایه‌ای افزایش معنی‌داری را نشان داد.

پس از فیکس کردن و انکوباسیون با آنتی‌بادی



شکل ۲. نمودارهای بالا نتایج فلوسیتومتری را نشان می‌دهند. نمودارهای ردیف بالا مربوط به ایزوتایپ شاهد، نمودارهای ردیف میانی مربوط به مارکرهای CD44 و CD90 و نمودار نقطه‌ای در پایین مربوط به مارکرهای منفی CD14,45 می‌باشد.



شکل ۳. نمودار خطی میانگین نسبت‌های دو ژن استئوپتین و استئوکلسین در دو نوع کشت تک لایه‌ای و Pellet

و میزان بالایی کلاژن نوع ۱ را که بیشترین پروتئین ECM استخوان است، ترشح می‌کنند. فاز دوم فاز بلوغ ماتریکس است. در این فاز فعالیت آلكالین فسفاتاز بالا است و ضمن ثابت بودن سلول‌ها، ترشح ECM غیر کلاژنی مانند استئوپوننتین و استئوکلسین شروع می‌شود. در انتهای این فاز کریستال‌های هیدروکسی آپاتیت داخل ماتریکس تشکیل می‌شوند. در فاز سوم یا فاز معدنی شدن ماتریکس ندول‌های معدنی شده تشکیل می‌شوند، استئوبلاست‌ها توسط ECM احاطه و به استئوسیت تبدیل می‌شوند.

در مطالعات گسترده از سیستم کشت سه بعدی استفاده می‌شود. در مطالعه‌ای سلول‌های استئوبلاست بر روی داربست آلزینات کشت داده شدند و با کشت تک لایه‌ای مقایسه گردیدند. نتایج نشان داد که میزان تکثیر سلول‌ها و میزان بیان ژن‌های استئوکلسین و استئوپوننتین در داربست آلزینات بیشتر از کشت تک لایه‌ای می‌باشد محققین پیشنهاد کردند که سلول‌ها در کشت تک لایه‌ای برای رشد بیشتر و طولانی و در نهایت افزایش ترشح ECM به پاساژهای منظمی نیاز دارند (۲۱). در مطالعه‌ی ما هم سیستم Pellet که مانند داربست آلزینات نوعی داربست سه بعدی است نسبت به کشت تک لایه‌ای، تأثیر بیشتری در ترشح ماتریکس خارج سلولی توسط استئوبلاست‌ها داشت.

بحث

در این مطالعه میزان بروز ژن‌های استئوکلسین و استئوپوننتین در استئوبلاست‌های تمایز یافت از ADSc در دو سیستم کشت Pellet و تک لایه‌ای مورد بررسی و مقایسه قرار گرفت.

نتایج RT-PCR نشان داد که میزان بروز ژن استئوکلسین در دو سیستم کشت تک لایه‌ای و Pellet تفاوت معنی‌داری نداشت، ولی میزان بروز ژن استئوپوننتین در سیستم کشت Pellet به صورت معنی‌داری بیشتر از کشت تک لایه‌ای بود.

استئوپوننتین مارکر اولیه‌ی استئوژنیک می‌باشد و نشان دهنده‌ی بلوغ ماتریکس و فاز Remolding استخوان است (۱۷-۱۸). استئوکلسین مارکر نهایی استخوان می‌باشد و فقط توسط استئوبلاست‌ها ترشح می‌شود. این مارکر همچنین سیگنال انتهایی تمایز استئوژنیک است (۱۹).

کشت تک لایه‌ای استئوبلاست‌ها به طور عمده روشی است که برای بررسی تأثیر فاکتورهای رشد یا هورمون‌ها در رفتار استئوبلاست‌ها در *in vitro* به کار می‌رود. استئوبلاست‌ها در کشت تک لایه‌ای سه فاز را طی می‌کنند (۲۰). فاز اول یا فاز تکثیر که سلول‌ها ابتدا تکثیر پیدا می‌کنند و کف ظرف را پر می‌کنند. در طی این فاز سلول‌ها دچار تغییرات مورفولوژیکی می‌شوند

همکاران پیشنهاد کردند که در سیستم Pellet بین هپاتوسیت‌ها و ماتریکس تماس بیشتری وجود دارد و این تماس‌ها سبب بهبود عملکرد و ترشح هپاتوسیت‌ها می‌شود (۱۶).

بنابراین با این که میزان بروز ژن استئوکلسین در دو سیستم Pellet و تک لایه‌ای تفاوت معنی‌داری نداشت، ولی میزان بیان ژن استئوپوننتین در سیستم Pellet به صورت معنی‌داری بیشتر از کشت تک لایه‌ای بود. با توجه به مطالعات دیگران تماس نزدیک سلول‌ها و ماتریکس تولیدی توسط آن‌ها، طولانی بودن زمان تمایز و ترشح ECM در کشت تک لایه‌ای و ارتباط عملکردی که بین توقف تکثیر سلول‌ها و بیان ژن‌های ویژه ECM وجود دارد، دلایل احتمالی بالا بودن بیان ژن استئوپوننتین در سیستم Pellet است.

نتیجه‌گیری

این مطالعه نشان داد که میزان بروز ژن استئوپوننتین به عنوان یک مارکر و شاخص استخوانی که روند استئوزن سلولی بنیادی مشتق از چربی را تأیید می‌کند، در سیستم Pellet در مقایسه با کشت تک لایه‌ای تفاوت دارد. این مسأله نشان دهنده‌ی این است که کشت Pellet، سیستم کشت مناسب‌تری برای بررسی اثر بروز این ژن به حساب می‌آید. این در حالی است که میزان بروز ژن استئوکلسین در سیستم Pellet و تک لایه‌ای اختلاف معنی‌داری نداشت. بنابراین پیشنهاد می‌شود مطالعات وسیع‌تری در خصوص بررسی دیگر مارکرهای استئوژنیک و همچنین بررسی میزان فعالیت آلکالین فسفاتاز در هر دو سیستم کشت در محیط *in vitro* و *in vivo* صورت گیرد.

Jahn و همکاران سلول‌های استئوبلاست ایزوله شده از مفصل ران (Hip) انسان را به صورت تک لایه‌ای و سیستم Pellet کشت دادند و گزارش کردند که بیان ژن‌های استئوکلسین و کلاژن نوع ۱ و ۲ در سیستم Pellet به صورت معنی‌داری بیشتر از کشت تک لایه‌ای بود که مشابه نتایج مطالعه‌ی ما بود. آن‌ها پیشنهاد کردند که سلول‌های استئوبلاست در سیستم Pellet ابتدا تکثیر یافته و سپس با توقف تکثیر، فنوتیپ سلول‌های بالغ را پیدا می‌کنند. Jahn و همکاران دلیل این تغییر فنوتیپ را بلوغ استئوبلاست‌ها و متعهد شدن آن‌ها به ترشح ECM دانستند (۸).

Owen و همکاران نیز سلول‌های کالواریای جنین Rat را به صورت سیستم تک لایه‌ای و Pellet کشت دادند و مشاهده کردند که در سیستم Pellet از همان ابتدا تکثیر سلول‌های استئوبلاست کاهش می‌یابد و سلول‌ها شروع به ترشح ECM می‌کنند. آن‌ها پیشنهاد کردند که ارتباط عملکردی بین مهار تکثیر استئوبلاست‌ها و القای بیان ژن‌ها وجود دارد که در نهایت سبب تشکیل ندول‌های ماتریکس معدنی در سیستم pellet می‌شود (۲۲).

Bellows و همکاران نیز تشکیل ندول‌های ماتریکس معدنی را که سبب تشکیل Micromass می‌شود، نتیجه‌ی افزایش بلوغ استئوبلاست‌ها دانستند (۲۳). در مطالعه‌ای دیگر، سلول‌های MSc بعد از تمایز به هپاتوسیت‌ها به دو صورت سیستم تک لایه‌ای و Pellet کشت داده شدند و گزارش گردید که هپاتوسیت‌ها در سیستم Pellet عملکرد بهتری دارند. زمانی که این سلول‌ها به کبد Rat انتقال یافتند، آلبومین بیشتری به خون ترشح می‌کردند. Ong و

References

1. Cancedda R, Dozin B, Giannoni P, Quarto R. Tissue engineering and cell therapy of cartilage and bone. *Matrix Biol* 2003; 22(1): 81-91.
2. Tabata Y. Recent progress in tissue engineering. *Tabata Y* 2001; 6: 483-97.
3. Gerstenfeld LC, Cullinane DM, Barnes GL, Graves DT, Einhorn TA. Fracture healing as a post-natal developmental process: molecular, spatial, and temporal aspects of its regulation. *J Cell Biochem* 2003; 88(5): 873-84.
4. Palomares KT, Gleason RE, Mason ZD, Cullinane DM, Einhorn TA, Gerstenfeld LC, et al. Mechanical stimulation alters tissue differentiation and molecular expression during bone healing. *J Orthop Res* 2009; 27(9): 1123-32.
5. Yamamoto N, Furuya K, Hanada K. Progressive development of the osteoblast phenotype during differentiation of osteoprogenitor cells derived from fetal rat calvaria: model for in vitro bone formation. *Biol Pharm Bull* 2002; 25(4): 509-15.
6. Cho TJ, Gerstenfeld LC, Einhorn TA. Differential temporal expression of members of the transforming growth factor beta superfamily during murine fracture healing. *J Bone Miner Res* 2002; 17(3): 513-20.
7. Birgersdotter A, Sandberg R, Ernberg I. Gene expression perturbation in vitro--a growing case for three-dimensional (3D) culture systems. *Semin Cancer Biol* 2005; 15(5): 405-12.
8. Jahn K, Richards RG, Archer CW, Stoddart MJ. Pellet culture model for human primary osteoblasts. *Eur Cell Mater* 2010; 20: 149-61.
9. Sadeghi H, Bahramian H, Hashemibeni B, Esfandiary E, Aliakbari F. Comparison of human osteoblast proliferation in alginate and hydroxyapatite-tricalcium phosphate scaffolds. *J Isfahan Med Sch* 2010; 28(111): 579-90.
10. Gabbay JS, Heller JB, Mitchell SA, Zuk PA, Spoon DB, Wasson KL, et al. Osteogenic potentiation of human adipose-derived stem cells in a 3-dimensional matrix. *Ann Plast Surg* 2006; 57(1): 89-93.
11. Johnstone B, Hering TM, Caplan AI, Goldberg VM, Yoo JU. In vitro chondrogenesis of bone marrow-derived mesenchymal progenitor cells. *Exp Cell Res* 1998; 238(1): 265-72.
12. Majeska RJ, Gronowicz GA. Current methodologic issues in cell and tissue culture. In: Bilezikian JP, Raisz LG, Martin J, editors. *Principles of bone biology*. 2nd ed. London: Academic Press; 2002. p. 1529-41.
13. Di Silvio L, Gurav N. Osteoblasts. In: Koller MR, Palsson BO, Masters JR, editors. *Human cell culture*. Philadelphia: Springer; 2001. p. 221-41.
14. Turhani D, Weissenbock M, Watzinger E, Yerit K, Cvinkl B, Ewers R, et al. In vitro study of adherent mandibular osteoblast-like cells on carrier materials. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2005; 34(5): 543-50.
15. Mason WT. *Fluorescent and luminescent probes for biological activity: a practical guide to technology for quantitative real-time analysis*. 2nd ed. London: Academic Press; 1999.
16. Ong SY, Dai H, Leong KW. Inducing hepatic differentiation of human mesenchymal stem cells in pellet culture. *Biomaterials* 2006; 27(22): 4087-97.
17. Balint E, Lapointe D, Drissi H, van der Meijden C, Young DW, van Wijnen AJ, et al. Phenotype discovery by gene expression profiling: mapping of biological processes linked to BMP-2-mediated osteoblast differentiation. *J Cell Biochem* 2003; 89(2): 401-26.
18. Porter K, Hossain M, Wang M, Radano CP, Baker GL, Smith MR, III, et al. Regulation of osteoblast gene expression and phenotype by polylactide-fatty acid surfaces. *Mol Biol Rep* 2006; 33(1): 1-12.
19. Mizuno M, Miyamoto T, Wada K, Watatani S, Zhang GX. Type I collagen regulated dentin matrix protein-1 (Dmp-1) and osteocalcin (OCN) gene expression of rat dental pulp cells. *J Cell Biochem* 2003; 88(6): 1112-9.
20. Lian JB, Stein GS. Concepts of osteoblast growth and differentiation: basis for modulation of bone cell development and tissue formation. *Crit Rev Oral Biol Med* 1992; 3(3): 269-305.
21. Frenkel SR, Bradica G, Brekke JH, Goldman SM, Ieska K, Issack P, et al. Regeneration of articular cartilage--evaluation of osteochondral defect repair in the rabbit using multiphasic implants. *Osteoarthritis Cartilage* 2005; 13(9): 798-807.
22. Owen TA, Aronow M, Shalhoub V, Barone LM, Wilming L, Tassinari MS, et al. Progressive development of the rat osteoblast phenotype in vitro: reciprocal relationships in expression of genes associated with osteoblast proliferation and differentiation during formation of the bone extracellular matrix. *J Cell Physiol* 1990; 143(3): 420-30.
23. Bellows CG, Aubin JE, Heersche JN, Antosz ME. Mineralized bone nodules formed in vitro from enzymatically released rat calvaria cell populations. *Calcif Tissue Int* 1986; 38(3): 143-54.

The Expression of Osteogenic Markers in Differentiated Osteoblasts from Adipose-Derived Stem Cells in Pellet Culture and Monolayer Systems

Behnam Heirat¹, Saman Akbarzadeh¹, Farzaneh Sadeghi MSc², Masoud Ghorbani³,
Vahid Bahrambeigi⁴, Vahid Goharian MD⁵, Batool Hashemibani PhD⁶

Abstract

Background: Nowadays high accident rates, fractures leading to permanent bone disorders, and the impossibility of bone transplant have made scientists to look for new methods of repairing injured bones. Considering the application of stem cells in bone tissue engineering, there exists the necessity to investigate various culture methods and suitable fields and scaffolds. Thus, we decided to induce adipose-derived stem cells into osteoblast cells in two systems of pellet culture and monolayer and compare osteogenic markers.

Methods: Stem cells have been separated via mechanical and enzymatic methods and cultured in osteogenic medium. Then, RNA was separated from differentiated cells, complementary DNA (cDNA) was synthesized and amplified. Polymerase chain reaction (PCR) product was transferred to electrophoresis gel. The intensity of the bands was measured by Image-J software and analyzed by SPSS.

Findings: Osteocalcin gene expression in differentiated cells in the two culture systems showed no significant difference. Therefore, the expression of osteocalcin gene in both monolayer and pellet systems is the same and acceptable. However, average osteopontin gene in differentiated cells in the two culture systems showed a significant difference. The expression of osteopontin gene in pellet system was more than monolayer systems.

Conclusion: This study indicated that pellet and monolayer culture systems are appropriate for bone engineering but osteocalcin and osteopontin gene expressions were different in the two culture system.

Keywords: Adipose-derived stem cells, Osteocalcin, Osteopontin, Pellet culture

¹ MSc Student, Department of Biology, School of Basic Sciences, Jahrom Branch, Islamic Azad University, Jahrom, Iran

² Department of Anatomy and Molecular Biology, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran

³ PhD Student, Department of Tissue Engineering, School of Modern Technologies, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

⁴ MSc Student, Department of Anatomy and Molecular Biology, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran

⁵ Department of Surgery, Amin Hospital, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran

⁶ Assistant Professor, Department of Anatomy and Molecular Biology, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran

Corresponding Author: Batool Hashemibani PhD, Email: hashemibeni@med.mui.ac.ir