

مقایسه‌ی نشانگرهای سطحی CD۱۴ و CD۴۴ در سلول‌های بنیادی مشتق از چربی (ADSCs) و سلول‌های کندروسیت تمایز یافته طی فرایند کندروژنز

روناک زارعی^۱، دکتر بتول هاشمی بنی^۲، دکتر ابراهیم اسفندیاری^۳، دکتر علی والیانی^۴، فریبرز کیانپور^۴، مریم علی اکبری^۵

مقاله پژوهشی

چکیده

مقدمه: امروزه به صورت گسترده‌ای از سلول‌های بنیادی مشتق از چربی (ADSCs یا Adipose tissue-derived stem cells) جهت مهندسی بافت غضروف استفاده می‌شود. بیشتر مطالعاتی که تاکنون در این زمینه انجام شده است، پیرامون داربست‌ها، عوامل رشد و روش‌های تحریک مکانیکی بوده است و مطالعات کمی در زمینه‌ی تغییرات نشانگرهای سطحی طی کندروژنز انجام شده است. بر این اساس، هدف تحقیق حاضر بررسی تغییرات نشانگرهای سطحی CD۱۴ و CD۴۴ طی فرایند کندروژنز است.

روش‌ها: بافت چربی زیر جلدی انسانی ۳ نفر تحت تأثیر آنزیم کلاژناز تجزیه و سلول‌های بنیادی کشت داده شدند. سلول‌های پاساژ دوم جهت بررسی نشانگرهای سطحی CD۱۴ و CD۴۴ به وسیله‌ی فلوسیتومتری مورد استفاده قرار گرفتند. همچنین این سلول‌ها در داربست آلژینات و تحت تأثیر مدیوم کندروژنیک کشت داده شدند و سلول‌های تمایز یافته در روزهای ۷ و ۱۴ جهت بررسی نشانگرهای سطحی CD۱۴ و CD۴۴ مورد استفاده قرار گرفتند.

یافته‌ها: بیان نشانگر CD۴۴ در ۹۶/۸ درصد از ADSCs مشخص گردید؛ اما CD۱۴ در ۹۸/۶ درصد از این سلول‌ها بیان نشد. نشانگر CD۴۴ در سلول‌های بنیادی تمایز یافته در داربست آلژینات در روز ۷ در ۹۶/۳ درصد بیان شد؛ اما در روز ۱۴ کاهش پیدا کرد و به ۵۲/۸ درصد رسید. بیان نشانگر CD۱۴ در این سلول‌ها در روز ۷ و ۱۴ به ترتیب ۹۹/۷ و ۹۹/۹ درصد بود.

نتیجه‌گیری: نشانگر CD۴۴ در سلول‌های بنیادی و سلول‌های تمایز یافته در روز ۷ با درصد بالا بیان می‌شود، اما در روز ۱۴ کاهش پیدا می‌کند. نشانگر CD۱۴ در سلول‌های بنیادی بیان نمی‌شود، اما در سلول‌های تمایز یافته، با درصد بالا بیان می‌شود. بنابراین پیشنهاد می‌شود با توجه به تغییرات نشانگرهای پیش‌گفته طی کندروژنز، می‌توان از این نشانگرها جهت تشخیص کندروژنز و مقایسه‌ی سلول‌های تمایز یافته با کندروسیت‌های طبیعی استفاده کرد.

واژگان کلیدی: سلول‌های بنیادی مشتق از چربی، کندروژنز، مهندسی بافت، نشانگر سطحی CD۴۴، نشانگر سطحی CD۱۴

ارجاع: زارعی روناک، هاشمی بنی بتول، اسفندیاری ابراهیم، والیانی علی، کیانپور فریبرز، علی اکبری مریم. مقایسه‌ی نشانگرهای سطحی CD۱۴ و CD۴۴ در سلول‌های بنیادی مشتق از چربی (ADSCs) و سلول‌های کندروسیت تمایز یافته طی فرایند کندروژنز. مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۳۹۳؛ ۳۲ (۲۸۴): ۶۳۰-۶۲۱

* این مقاله حاصل پایان‌نامه‌ی دوره‌ی کارشناسی ارشد در دانشکده علوم پزشکی اصفهان است.

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه علوم تشریحی، دانشکده پزشکی و کمیته‌ی تحقیقات دانشجویی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

۲- استادیار، گروه علوم تشریحی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

۳- استاد، گروه علوم تشریحی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

۴- کارشناس ارشد، گروه ایمنی‌شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

۵- کارشناس، گروه علوم تشریحی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

Email: hashemibeni@med.mui.ac.ir

نویسنده‌ی مسؤول: دکتر بتول هاشمی بنی

مقدمه

غضروف مفصلی، یک بافت همبند اختصاصی است که شامل کندروسیت‌ها و ماتریکس خارج سلولی است و ممکن است به دلایل مختلف از جمله استئوآرتریت دچار آسیب شود. با توجه به این که غضروف مفصلی فاقد عروق خونی و اعصاب است و تغذیه‌ی سلول‌های آن فقط از طریق انتشار صورت می‌گیرد و همچنین تراکم سلولی آن پایین است، توانایی غضروف مفصلی در ترمیم آسیب‌ها ضعیف است. از این رو، امروزه کاربرد مهندسی بافت جهت جایگزین کردن بافت‌های آسیب دیده از جمله غضروف مفصلی مورد توجه قرار گرفته است (۱-۳). چندین سال است که از سلول‌های بنیادی با منشأهای مختلف جهت مهندسی بافت از جمله مهندسی بافت غضروف استفاده می‌شود. سلول‌های بنیادی مزانشیمی (MSCs یا Mesenchymal stromal cells)، سلول‌های Multipotent و Nonhematopoietic هستند (۴). این سلول‌ها از منابع مختلف از جمله مغز استخوان، بافت چربی، عضله، سینوویوم، پری کندروم، پریوست، پالپ دندان و ... استخراج می‌شوند (۵-۸).

امروزه جمعیت‌های سلولی که دارای ویژگی‌های زیر باشند، تحت عنوان MSC شناخته می‌شوند: توانایی چسبندگی به پلاستیک را داشته و از لحاظ مورفولوژی شبه فیروبلاست باشند. از لحاظ عملکردی توانایی بازسازی خود را داشته باشند و در شرایط کشت مناسب، توانایی تمایز به رده‌های مزانشیمی (استئوسیت، کندروسیت و آدیپوسیت)، اندودرمی (هپاتوسیت) و اکتودرمی (نورون) را داشته باشند. از لحاظ فنوتیپی گروهی از نشانگرهای

سطحی را در سطح خود بیان کنند و گروهی دیگر را بیان نکنند (۹-۱۰).

مطالعات نشان داده‌اند که سلول‌های بنیادی مشتق از مغز استخوان (BMSCs یا Bone marrow stromal cells)، نشانگرهای سطحی CD۷۳، CD۱۰۵، CD۹۰، CD۱۶۴ و STRO۱ را در سطح خود بیان می‌کنند و فاقد نشانگرهای سطحی CD۳۴ و CD۴۵ هستند (۱۱-۱۲).

مطالعاتی نیز که در زمینه‌ی نشانگرهای سطحی سلول‌های بنیادی مشتق از سینوویوم انجام شده‌اند، نشان داده‌اند که تفاوت مشهودی بین نشانگرهای سطحی این سلول‌ها و BMSCs وجود ندارد (۱۳).

سلول‌های بنیادی مشتق از چربی (ADSCs یا Adipose tissue-derived stem cells) دسته‌های شاخصی از نشانگرهای پروتئینی سطحی را بیان می‌کنند که شامل مولکول‌های چسبندگی مثل CD۲۹ و CD۴۹e، مولکول‌های گیرنده مثل هیالورونات (CD۴۴)، کاده‌رین (CD۱۴۴)، آنزیم‌های سطحی (CD۷۳)، پروتئین‌های ماتریکس خارج سلولی (CD۹۰، CD۱۰۵)، مولکول‌های چسبندگی داخل سلولی (CD۵۴)، مولکول‌های چسبندگی عروقی (CD۱۰۶)، پروتئین‌های تنظیمی کمپلمان و آنتی‌ژن‌های سازگاری بافتی است (۱۴-۱۵، ۵)؛ اما این سلول‌ها فاقد نشانگرهای خون‌ساز از قبیل CD۴۵، CD۳۱، CD۳۳، CD۳۴، CD۱۴ یا CD۱۱b، CD۷۹a، CD۱۹ یا HLA-DR هستند (۱۶).

مطالعه‌ای که در زمینه‌ی نشانگرهای سطحی سلول‌های بنیادی مشتق از پالپ دندان (SHED یا Stem cells from human exfoliated deciduous teeth) انجام شده است، نشان داده است که

بنیادی نشان داده است که تنظیم فرایندهای تکثیر، آپوپتوز و تمایز تحت تأثیر مولکول‌های سطحی غشای پلاسمایی است و از طریق بیان مولکول‌های سطحی زیر مجموعه‌های سلولی و وضعیت‌های تمایزی مختلف توصیف می‌شود (۲۸). همان‌طور که گفته شد، مطالعات زیادی در رابطه با نشانگرهای سطحی سلول‌های بنیادی با منشأهای مختلف انجام شده است (۱۷-۱۴)؛ اما اطلاعات کمی در رابطه با بیان نشانگرهای سطح بعد از تمایز کندروژنیک وجود دارد. در مطالعه‌ی Lee و همکاران نشانگرهای سطحی BMSCs بعد از تمایز کندروژنیک مورد بررسی قرار گرفت. در این مطالعه مشخص شد بیان نشانگرهای سطحی CD۴۴، CD۵۸، CD۹۰، CD۱۰۵ و CD۱۶۶ در داربست آلژینات کاهش پیدا می‌کند و بیان نشانگرهای سطحی CD۱۴، CD۲۶، CD۵۴ و CD۱۰۶ در سطوح پایین حفظ می‌شود (۲۱). با این حال، در رابطه با بیان نشانگرهای سطحی بعد از تمایز کندروژنیک در ADSCs مطالعه‌ای یافت نشد. در این مطالعه به منظور افزایش اطلاعات در ارتباط با تغییرات فنوتیپی که بعد از فرایند تمایز صورت می‌گیرد، نشانگر CD۴۴ که در ADSCs مثبت است و همچنین نشانگر CD۱۴ که در این سلول‌ها منفی است، قبل و بعد از تمایز کندروژنیک مورد بررسی قرار گرفتند.

روش‌ها

جداسازی و کشت اولیه‌ی سلول‌های بنیادی از بافت چربی

بافت چربی از چربی زیر جلدی ناحیه‌ی شکم سه نفر با کسب رضایت شخصی به دست آمد و پس از

نشانگرهای سطحی این سلول، مشابه ADSCs است؛ با این تفاوت که این سلول‌ها CD۵۶ و CD۱۴۶ را نیز در سطح خود بیان می‌کنند (۱۷). با این حال، بیان این نشانگرهای سطحی، بسته به چگونگی کشت و روش‌های تحریک، دارای تغییراتی نیز هست.

مدت‌های مدیدی سلول‌های بنیادی مشتق از مغز استخوان (BMSCs) به عنوان اصلی‌ترین منشأ سلول‌های بنیادی برای مهندسی بافت محسوب می‌شدند (۱۵)، اما امروزه به دلیل فراوانی و استخراج آسان سلول‌های بنیادی مشتق از چربی (ADSCs)، این سلول‌ها به عنوان یکی از منابع اصلی جهت مهندسی بافت غضروف به صورت گسترده‌ای مورد استفاده قرار می‌گیرند (۱۸). این سلول‌ها می‌توانند به صورت *In vitro* کشت داده شوند و به صورت مطمئن و سریع رشد کنند (۱۹). به علاوه، مشخص شده است که ADSCs پتانسیل کندروژنیک بیشتری نسبت به BMSCs دارند (۲۰) و می‌توانند به رده‌های مختلف کندروژنیک تمایز یابند؛ در حالی که طی پاساژهای مختلف فنوتیپ آن‌ها حفظ می‌شود (۲۱).

بیشتر مطالعاتی که تاکنون پیرامون کندروژنز انجام شده است، روی آگاهی از وضعیت کندروژنیک مؤثر از قبیل داربست‌های سه بعدی، عوامل رشد و روش‌های تحریک مکانیکی تمرکز داشته است (۲۲-۲۵). ارزیابی تمایز کندروژنیک بر اساس بیان فنوتیپ‌های کندروسیتی از قبیل SOX۹، کلاژن نوع II و پروتئوگلیکان‌ها است؛ اما اطلاعات کمی درباره‌ی مکانیسم‌های مولکولی، تغییرات ویژه‌ی الگوی بیان ژن‌ها و تغییرات نشانگرهای سطحی وجود دارد (۲۶-۲۷).

مطالعات انجام شده در زمینه‌ی انواع سلول‌های

آلبومین سرم گاوی (Bovine serum albumin) (Sigma) BSA ۳ μ l شستشو داده شد. سپس ۳ μ l آنتی‌بادی علیه نشانگرهای سطحی CD۴۴ (IQ Products) و CD۱۴ (Becton/Dickinson) به هر لوله به طور مجزا اضافه شد. این دو آنتی‌بادی با ماده‌ی فلورسنت فیکواریترین نشان‌دار شدند. سلول‌ها در آنتی‌بادی به مدت ۳۰ دقیقه در تاریکی و در دمای آزمایشگاه انکوبه شدند. سپس با PBS شستشو داده شدند و پس از سانتریفیوژ به رسوب سلولی ۵۰۰ μ l PBS اضافه شد و سلول‌های نشان‌دار توسط دستگاه فلوسیتومتر (Becton/Dickinson, San Jose, CA) بررسی شد.

کشت در داربست آلزینات و القای تمایز کندروژنیک

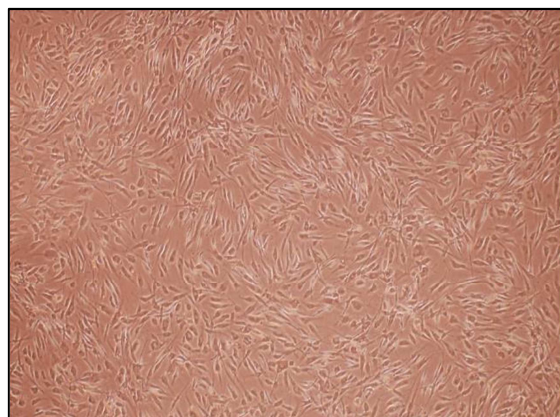
برای کشت در داربست آلزینات و القای تمایز کندروژنیک فلاسک‌های حاوی سلول‌های بنیادی پاساژ سوم با PBS شستشو داده و تریپسینه شدند. پس از جدا شدن سلول‌ها سوسپانسیون سلولی سانتریفیوژ شد و شمارش سلولی انجام گردید و رسوب سلولی به دست آمده با آلزینات ۱/۵ درصد مخلوط شد. به این صورت که به ازای هر ۵ میلیون سلول، ۱ ml آلزینات استفاده شد. سپس مخلوط آلزینات - سلول با استفاده از سرنگ Gage ۲۲ به صورت قطره قطره به محلول کلرید کلسیم ۱۰۵ mM (Merck) موجود در چاهک پلیت ۱۲ خانه (۲/۵ ml) در هر چاهک) اضافه گردید و قطرات (Beads) ژل ماندی حاوی سلول شکل گرفتند. سپس کلرید کلسیم تخلیه شد و به بیدهای آلزینات محلول کلرید سدیم ۰/۹ درصد (۲/۵ ml در هر چاهک) اضافه شد و پس از ۱۰ دقیقه تخلیه گردید و این عمل دوباره

انتقال به آزمایشگاه کشت سلول، تحت شرایط استریل و در زیر هود به قطعات چند میلی‌متری بریده شد و با فسفات بافر سالین (PBS یا Phosphate buffered saline) (Sigma) شستشو داده شد و بافت همبند و عروق خونی آن جدا شد. سپس بافت چربی در محلول کلاژناز نوع IA (Sigma) به میزان ۱ mg به ازای هر گرم بافت چربی قرار داده شد و در دمای 37°C به مدت ۶۰ دقیقه انکوبه شد. پس از اطمینان از تجزیه شدن کامل برای خنثی کردن آنزیم هم حجم آنزیم به کار رفته‌ی محیط کشت (Dulbecco's modified Eagle's medium) DMEM (Sigma) حاوی ۱۰ درصد FBS (Fetal bovine serum) (Gibco) و ۱ درصد Penicillin/streptomycin (Gibco) اضافه شد.

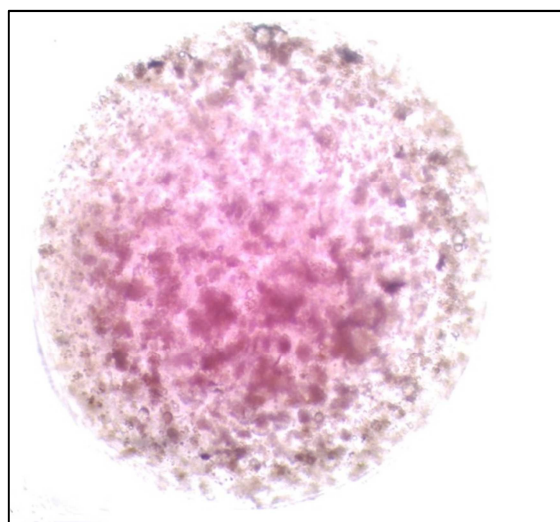
محلول بافتی به دست آمده، سانتریفیوژ شد و رسوب سلولی به دست آمد. به رسوب سلولی به دست آمده، محیط کشت DMEM (Sigma) حاوی ۱۰ درصد FBS (Gibco) اضافه شد و در فلاسک‌های T۲۵ گسترده و در انکوباتور 37°C ، CO_2 ۵ درصد و رطوبت نسبی قرار داده شد. جهت تخلیه‌ی سلول‌های اضافی، بعد از ۲۴ ساعت تعویض مدیوم انجام شد. پس از آن هر ۳-۴ روز یک بار تعویض مدیوم انجام شد. بعد از پر شدن کف فلاسک‌ها، سلول‌ها به چند فلاسک جدید انتقال پیدا کردند و سلول‌های پاساژ دوم جهت فلوسیتومتری و بررسی نشانگرهای سطحی CD۴۴ و CD۱۴ مورد استفاده قرار گرفتند.

تکنیک فلوسیتومتری

تعداد 1×10^5 سلول در لوله‌های فلوسیتومتری ریخته شد و توسط PBS (Sigma) حاوی ۰/۵ درصد



شکل ۱. تصویر سلول‌های بنیادی مشتق از چربی پاساژ دوم در کشت تک لایه‌ای $\times 4$



شکل ۲. سلول‌های بنیادی کشت داده شده در داربست آلژینات در مدیوم کندروژنیک

این مطالعه با استفاده از استخراج سلول‌های بنیادی جدا شده از بافت چربی سه نفر انجام شد و نتایج به دست آمده از هر سه یکسان بود. بر اساس نتایج به دست آمده از فلوسیتومتری ADSCs، نشانگر سطحی CD۴۴ را در سطوح بالایی بیان می‌کنند و میانگین بروز این نشانگر در این سلول‌ها، ۹۶/۸ درصد به دست آمده است. این نشانگر همچنین در سلول‌های بنیادی تمایز یافته در داربست آلژینات

تکرار شد. بعد از آن هم ۱/۵ ml محیط کشت DMEM-high glucose (Sigma) خالص به هر چاهک اضافه و تخلیه شد. در نهایت، به هر چاهک که حاوی بیدهای آلژینات بود، ۲ ml مدیوم کندروژنیک حاوی DMEM highglucose، (Sigma) TGF- $\beta 3$ (۱۰ ng/ml)، (Sigma) ITS (transferrin-sodium) ۱ درصد (Gibco)، (Sigma) ASP (۵۰ μ g/ml) BSA، ۱ درصد (Gibco)، Penicillin/streptomycin ۱ درصد (Gibco) و Dexamethasone 10^{-7} M (Sigma) و Linoleic acid (Sigma) اضافه شد و در انکوباتور 37°C و ۵ درصد CO_2 نگهداری و هر ۴ روز، مدیوم آن تعویض گردید.

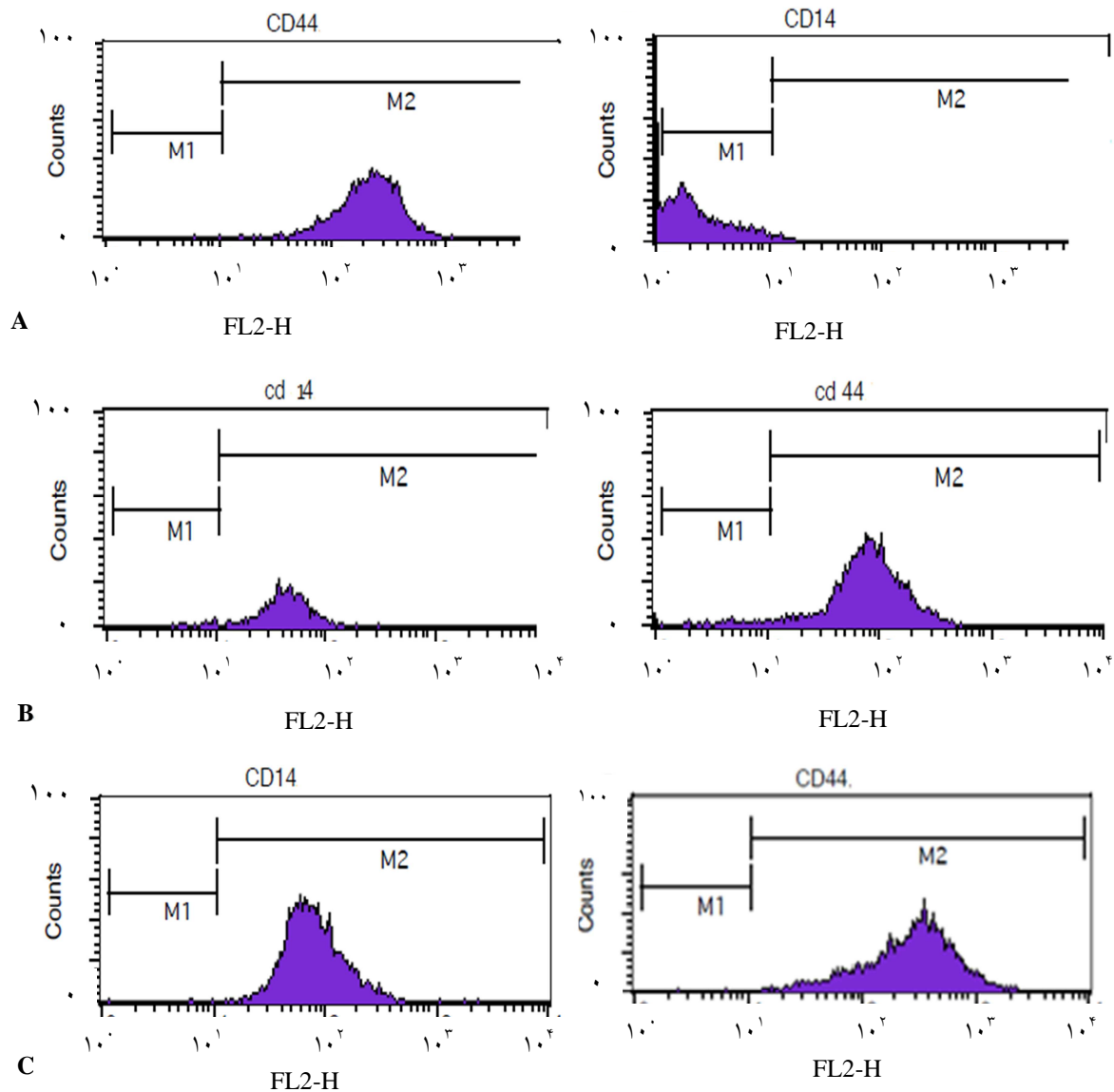
یک گروه از این سلول‌ها پس از ۷ روز و گروه دیگر پس از ۱۴ روز با استفاده از سدیم سیترات از آلژینات خارج گردید؛ به این صورت که ابتدا مدیوم رویی تخلیه و سپس ۲ بار با PBS شستشو داده شد و به هر چاهک ۱/۵ ml سدیم سیترات اضافه شد. پس از کمی پیپت کردن، بیدها تجزیه و سلول‌ها شناور شدند و سانتیفریوژ و شمارش سلولی انجام شد و از این سلول‌ها جهت بررسی نشانگرهای CD۴۴ و CD۱۴ از طریق فلوسیتومتری (Becton Dickinson, San Jose, CA) استفاده شد.

یافته‌ها

در بررسی سلول‌های بنیادی مشتق از چربی با استفاده از میکروسکوپ اینورت سلول‌ای پاساژ دوم در کشت تک لایه‌ای، دوکی شکل، دارای زواید سیتوپلاسمی و به صورت یکنواخت قابل مشاهده بودند (شکل ۱).

نشانگر در سلول‌های بنیادی تمایز یافته در داربست آلژینات بیان شد و میانگین بروز آن در روز ۷ و روز ۱۴ بررسی شد که به ترتیب ۹۹/۷ و ۹۹/۹ درصد بود (شکل ۳).

(شکل ۲) در روز ۷ و روز ۱۴ بررسی شد که میانگین بروز آن به ترتیب ۹۶/۳ و ۵۲/۸ درصد بود. نشانگر سطحی CD۱۴ نیز در ADSCs بررسی شد و در ۹۸/۶ درصد از این سلول‌ها بیان گردید، اما این



شکل ۳. A) در ADSCs (Adipose tissue-derived stem cells) نشانگر سطحی CD۴۴ در ۹۶/۸ درصد از سلول‌ها بیان شد، اما CD۱۴ در ۹۸/۶ درصد از این سلول‌ها بیان نشد. B) در کندروسیت‌های تمایز یافته در داربست آلژینات در روز ۷ نشانگر سطحی CD۴۴ در ۹۶/۳ درصد از سلول‌ها بیان شد و نشانگر سطحی CD۱۴ در ۹۹/۷ درصد از سلول‌ها بیان شد. C) در کندروسیت‌های تمایز یافته در داربست آلژینات در روز ۱۴، نشانگر سطحی CD۴۴ در ۵۲/۸ درصد از سلول‌ها بیان شد و نشانگر سطحی CD۱۴ در ۹۹/۹ درصد از سلول‌ها بیان شد.

بحث

کرد که با نتایج Lee و همکاران موافق بود (۲۱). در مطالعه‌ی آن‌ها نشانگر CD۴۴ در سلول‌های بنیادی مشتق از مغز استخوان (BMSCs) در پاساژ سوم در ۹۸/۵۲ درصد سلول‌ها بیان شد و میزان بیان آن در سلول‌های بنیادی کشت داده شده در داربست آلژینات، پس از ۲ هفته ۴۲/۷۱ درصد بود که مشابه با نتایج مطالعه‌ی حاضر در روز ۱۴ بود.

در مطالعه‌ی Diaz-Romero و همکاران مشخص شد که CD۴۴ در سطح کندروسیت‌های طبیعی انسان (HAC یا Human articular chondrocytes) بیان می‌شود و بیان آن ۲۴ ساعت پس از جدا شدن، ۹۷/۶۱ درصد گزارش شده است (۳۷). بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که CD۴۴ نشانگر سطحی سلول‌های بنیادی است؛ به علاوه، این نشانگر در کندروسیت‌های طبیعی نیز بیان می‌شود، اما بیان آن طی تمایز کندروژنیک ADSC کاهش می‌یابد. این امر می‌تواند نشانگر این باشد که محیط کشتی که در آزمایشگاه به صورت مصنوعی جهت کندروژنز فراهم می‌شود، به طور کامل مشابه حالت طبیعی آن در موجود زنده نیست و این موضوع نیاز به تحقیقات بیشتری دارد.

CD۱۴ رسپتور لیوپولی ساکارید است و در ماکروفاژها و مونوسیت‌ها بیان می‌شود، اما این نشانگر در ADSCs بیان نمی‌گردد (۳۸). در مطالعه‌ی Diaz-Romero و همکاران مشخص شد که این نشانگر در کندروسیت‌های طبیعی انسان (HAC) که ۲۴ ساعت از جدا شدن آن‌ها می‌گذرد، بیان می‌شود؛ اما بیان آن بعد از ۲ هفته به طور قابل توجهی کاهش می‌یابد که به علت تمایزدایی (Dedifferentiation) سلول‌ها طی کشت است (۳۷).

یکی از ویژگی‌های اساسی که برای سلول‌های بنیادی مطرح می‌شود، بیان نشانگرهای سطحی خاص در سطح این سلول‌ها است (۲۹-۳۰). مطالعات زیادی در این باره انجام شده و مشخص گردیده است که گروهی از این نشانگرهای سطحی در سطح این سلول‌ها بیان می‌شوند و گروهی دیگر بیان نمی‌شوند (۳۱-۳۳، ۱۴-۱۵). یکی از این نشانگرهای سطحی مثبت در سلول‌های بنیادی، CD۴۴ است (۱۴). CD۴۴ رسپتور هیالورونان است و نقش مهمی در تکامل ماتریکس خارج سلولی دارد و به عنوان یک رابط ضروری در حفظ تراکم هیالورونان-پروتوگلیکان دارد (۱۵).

این نشانگر در مراحل اولیه‌ی کندروژنز در هنگام متراکم شدن (Condensation) سلول‌های بنیادی بیان می‌شود و نقش مهمی در کندروژنز دارد (۳۴). همچنین جمعیت‌های سلولی دارای CD۴۴، GAG (Glycosaminoglycan) و کلاژن II بیشتری تولید می‌کنند (۹). در این مطالعه، CD۴۴ در ADSCs در سطح بالایی بیان شد و با مطالعات قبلی مطابقت دارد. در مطالعه‌ای که هاشمی بنی و همکاران روی ADSCs انجام دادند، این نشانگر در ۸۷/۱۴ درصد سلول‌ها بیان شد (۳۵). همچنین در مطالعه‌ی علی‌پور و همکاران CD۴۴ هم در ADSCs و هم SHED در سطوح بالایی بیان شد (۱۷). در مطالعه‌ای که Jo و همکاران روی سلول‌های بنیادی مشتق از سینوویوم انجام دادند، CD۴۴ در ۹۰/۵۳ درصد سلول‌ها بیان شد (۳۶).

در مطالعه‌ی حاضر CD۴۴ در سلول‌های بنیادی تمایز یافته در داربست آلژینات در روز ۷ در سطوح بالایی بیان شد، اما بیان آن در روز ۱۴ کاهش پیدا

CD۱۴ و همکاران مشخص شد که CD۱۴ نشانگری است که در کندروسیت‌های طبیعی بیان می‌شود. بنابراین می‌توان از این نشانگر برای تشخیص کندروسیت‌های تمایز یافته در کنار روش‌های دیگر استفاده کرد (۳۷).

با توجه به این که تعداد زیادی از نشانگرهای سطحی در سطح ADSCs و HAC بیان می‌شود، برای مشخص کردن تغییرات تمام این نشانگرها طی فرایند کندروژنز نیاز به مطالعات بیشتری است.

بنابراین انتظار می‌رود طی تمایز کندروژنیک ADSCs و القای کندروژنز، این نشانگر در سطح کندروسیت‌های تمایز یافته بیان شود. در مطالعه‌ی حاضر CD۱۴ در ADSCs در ۹۸/۶ درصد از سلول‌ها بیان نشد که با مطالعات Jo و همکاران (۳۶)، هاشمی بنی و همکاران (۳۵) و علی پور و همکاران (۱۷) موافق بود؛ اما این نشانگر در سلول‌های تمایز یافته در داربست آلزینات در روز ۷ و ۱۴ در سطوح بالایی بیان شد و همان‌طور که گفته شد، در مطالعات

References

- Hardingham T, Tew S, Murdoch A. Tissue engineering: chondrocytes and cartilage. *Arthritis Res* 2002; 4(Suppl 3): S63-S68.
- Mansour JM, Mow VC. The permeability of articular cartilage under compressive strain and at high pressures. *J Bone Joint Surg Am* 1976; 58(4): 509-16.
- Campbell DD, Pei M. Surface markers for chondrogenic determination: a highlight of synovium-derived stem cells. *Cells* 2012; 1(4): 1107-20.
- Josh F, Kobe K, Tobita M, Tanaka R, Suzuki K, Ono K, et al. Accelerated and safe proliferation of human adipose-derived stem cells in medium supplemented with human serum. *J Nippon Med Sch* 2012; 79(6): 444-52.
- Al-Nbaheen M, Vishnubalaji R, Ali D, Bouslimi A, Al-Jassir F, Megges M, et al. Human stromal (mesenchymal) stem cells from bone marrow, adipose tissue and skin exhibit differences in molecular phenotype and differentiation potential. *Stem Cell Rev* 2013; 9(1): 32-43.
- Hutmacher DW, Sittering M. Periosteal cells in bone tissue engineering. *Tissue Eng* 2003; 9(Suppl 1): S45-S64.
- Cao B, Zheng B, Jankowski RJ, Kimura S, Ikezawa M, Deasy B, et al. Muscle stem cells differentiate into haematopoietic lineages but retain myogenic potential. *Nat Cell Biol* 2003; 5(7): 640-6.
- De Bari C, Dell'Accio F, Tylzanowski P, Luyten FP. Multipotent mesenchymal stem cells from adult human synovial membrane. *Arthritis Rheum* 2001; 44(8): 1928-42.
- Chen Y, Shao JZ, Xiang LX, Dong XJ, Zhang GR. Mesenchymal stem cells: a promising candidate in regenerative medicine. *Int J Biochem Cell Biol* 2008; 40(5): 815-20.
- Crop M, Baan C, Weimar W, Hoogduijn M. Potential of mesenchymal stem cells as immune therapy in solid-organ transplantation. *Transpl Int* 2009; 22(4): 365-76.
- Jones E, McGonagle D. Human bone marrow mesenchymal stem cells in vivo. *Rheumatology (Oxford)* 2008; 47(2): 126-31.
- Phinney DG, Prockop DJ. Concise review: mesenchymal stem/multipotent stromal cells: the state of transdifferentiation and modes of tissue repair--current views. *Stem Cells* 2007; 25(11): 2896-902.
- Djouad F, Bony C, Haupl T, Uze G, Lahlou N, Louis-Plence P, et al. Transcriptional profiles discriminate bone marrow-derived and synovium-derived mesenchymal stem cells. *Arthritis Res Ther* 2005; 7(6): R1304-R1315.
- Gimble J, Guilak F. Adipose-derived adult stem cells: isolation, characterization, and differentiation potential. *Cytotherapy* 2003; 5(5): 362-9.
- Strem BM, Hicok KC, Zhu M, Wulur I, Alfonso Z, Schreiber RE, et al. Multipotential differentiation of adipose tissue-derived stem cells. *Keio J Med* 2005; 54(3): 132-41.
- Dominici M, Le BK, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 2006; 8(4): 315-7.
- Alipour R, Sadeghi F, Hashemi-Beni B, Zarkesh-Esfahani SH, Heydari F, Mousavi SB, et al. Phenotypic characterizations and

- comparison of adult dental stem cells with adipose-derived stem cells. *Int J Prev Med* 2010; 1(3): 164-71.
18. da Silva ML, Chagastelles PC, Nardi NB. Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues. *J Cell Sci* 2006; 119(Pt 11): 2204-13.
19. Lin TM, Tsai JL, Lin SD, Lai CS, Chang CC. Accelerated growth and prolonged lifespan of adipose tissue-derived human mesenchymal stem cells in a medium using reduced calcium and antioxidants. *Stem Cells Dev* 2005; 14(1): 92-102.
20. De Ugarte DA, Morizono K, Elbarbary A, Alfonso Z, Zuk PA, Zhu M, et al. Comparison of multi-lineage cells from human adipose tissue and bone marrow. *Cells Tissues Organs* 2003; 174(3): 101-9.
21. Lee HJ, Choi BH, Min BH, Park SR. Changes in surface markers of human mesenchymal stem cells during the chondrogenic differentiation and dedifferentiation processes in vitro. *Arthritis Rheum* 2009; 60(8): 2325-32.
22. Angele P, Yoo JU, Smith C, Mansour J, Jepsen KJ, Nerlich M, et al. Cyclic hydrostatic pressure enhances the chondrogenic phenotype of human mesenchymal progenitor cells differentiated in vitro. *J Orthop Res* 2003; 21(3): 451-7.
23. Indrawattana N, Chen G, Tadokoro M, Shann LH, Ohgushi H, Tateishi T, et al. Growth factor combination for chondrogenic induction from human mesenchymal stem cell. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; 320(3): 914-9.
24. Lee HJ, Choi BH, Min BH, Son YS, Park SR. Low-intensity ultrasound stimulation enhances chondrogenic differentiation in alginate culture of mesenchymal stem cells. *Artif Organs* 2006; 30(9): 707-15.
25. Goldring MB, Tsuchimochi K, Ijiri K. The control of chondrogenesis. *J Cell Biochem* 2006; 97(1): 33-44.
26. Sekiya I, Vuoristo JT, Larson BL, Prockop DJ. In vitro cartilage formation by human adult stem cells from bone marrow stroma defines the sequence of cellular and molecular events during chondrogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; 99(7): 4397-402.
27. Ylostalo J, Smith JR, Pochampally RR, Matz R, Sekiya I, Larson BL, et al. Use of differentiating adult stem cells (marrow stromal cells) to identify new downstream target genes for transcription factors. *Stem Cells* 2006; 24(3): 642-52.
28. Diaz-Romero J, Gaillard JP, Grogan SP, Nestic D, Trub T, Mainil-Varlet P. Immunophenotypic analysis of human articular chondrocytes: changes in surface markers associated with cell expansion in monolayer culture. *J Cell Physiol* 2005; 202(3): 731-42.
29. Tapp H, Hanley EN, Jr., Patt JC, Gruber HE. Adipose-derived stem cells: characterization and current application in orthopaedic tissue repair. *Exp Biol Med (Maywood)* 2009; 234(1): 1-9.
30. Pilz GA, Braun J, Ulrich C, Felka T, Warstat K, Ruh M, et al. Human mesenchymal stromal cells express CD14 cross-reactive epitopes. *Cytometry A* 2011; 79(8): 635-45.
31. Varma MJ, Breuls RG, Schouten TE, Jurgens WJ, Bontkes HJ, Schuurhuis GJ, et al. Phenotypical and functional characterization of freshly isolated adipose tissue-derived stem cells. *Stem Cells Dev* 2007; 16(1): 91-104.
32. Kolf CM, Cho E, Tuan RS. Mesenchymal stromal cells. *Biology of adult mesenchymal stem cells: regulation of niche, self-renewal and differentiation. Arthritis Res Ther* 2007; 9(1): 204.
33. Mitchell JB, McIntosh K, Zvonic S, Garrett S, Floyd ZE, Kloster A, et al. Immunophenotype of human adipose-derived cells: temporal changes in stromal-associated and stem cell-associated markers. *Stem Cells* 2006; 24(2): 376-85.
34. Knudson CB, Knudson W. Hyaluronan and CD44: modulators of chondrocyte metabolism. *Clin Orthop Relat Res* 2004; (427 Suppl): S152-S162.
35. Hashemibeni B, Razavi Sh, Esfandiary E, Salehi M, Karbasi S, Mardani M, et al. The effect of BMP-6 growth factor on differentiation of adipose-derived stem cells into chondrocyte in pellet culture system. *J Isfahan Med Sch* 2009; 27(100): 618-31. [In Persian].
36. Jo CH, Ahn HJ, Kim HJ, Seong SC, Lee MC. Surface characterization and chondrogenic differentiation of mesenchymal stromal cells derived from synovium. *Cytotherapy* 2007; 9(4): 316-27.
37. Diaz-Romero J, Nestic D, Grogan SP, Heini P, Mainil-Varlet P. Immunophenotypic changes of human articular chondrocytes during monolayer culture reflect bona fide dedifferentiation rather than amplification of progenitor cells. *J Cell Physiol* 2008; 214(1): 75-83.
38. Ziegler-Heitbrock HW, Ulevitch RJ. CD14: cell surface receptor and differentiation marker. *Immunol Today* 1993; 14(3): 121-5.

Comparison of CD44 and CD14 Surface Markers in Adipose-Derived Stem Cells and Differentiated Chondrocytes during Chondrogenesis

Ronak Zarei¹, Batoul Hashemibeni PhD², Ebrahim Esfandiary MD, PhD³, Ali Valiani PhD², Fariborz Kianpuor MSc⁴, Maryam Aliakbri⁵

Original Article

Abstract

Background: Nowadays, adipose-derived stem cells (ADSCs) are widely used for cartilage tissue engineering. However, most studies are in the field of scaffolds, growth factors and mechanical stimulation methods. But, few studies have been conducted regarding changes in surface markers during chondrogenesis. Accordingly, this study aimed to assess the changes in surface markers CD14 and CD44 during chondrogenesis.

Methods: Human subcutaneous adipose tissue were isolated and cultured from 3 persons influenced by collagenase enzyme and stem cells. The cells of second passage were used for flow cytometry analysis of CD14 and CD44 surface markers. Second passage cells were cultured in alginate scaffolds under the influence of chondrogenic medium. Differentiated cells at the days 7 and 14 were used to evaluate CD14 and CD44 surface markers.

Findings: The mean expression of CD44 in ADSCs was 96.8% but CD14 did not expressed in 98.6% of the cells. In stem cells, the mean expression of CD44 differentiated in alginate scaffolds on the day 7 was 96.3%; but on the day 14, it fell to 52.8%. The mean expression of CD14 at the days 7 and 14 was 99.7% and 99.9%, respectively.

Conclusion: Our investigation revealed that the stem cells and differentiated cells at the day 7 express CD44 at high level, but at day 14, the expression of CD44 in differentiated cells is reduced. CD14 is not expressed on stem cells but in differentiated cells is expressed in high level. Due to these changes in surface markers during chondrogenesis, using them can be offered to determine chondrogenesis and to compare differentiated and normal chondrocytes.

Keywords: Adipose-derived stem cells, Chondrogenesis, Tissue engineering, CD44, CD14

Citation: Zarei R, Hashemibeni B, Esfandiary E, Valiani A, Kianpuor F, Aliakbri M. **Comparison of CD44 and CD14 Surface Markers in Adipose-Derived Stem Cells and Differentiated Chondrocytes during Chondrogenesis.** J Isfahan Med Sch 2014; 32(284): 621-30

* This paper is derived from a MSc thesis in Isfahan University of Medical Sciences.

1- MSc Student, Department of Anatomical Sciences, School of Medicine AND Student Research Committee, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran

2- Assistant Professor, Department of Anatomical Sciences, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran

3- Professor, Department of Anatomical Sciences, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran

4- Department of Immunology, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran

5- Department of Anatomical Sciences, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran

Corresponding Author: Batoul Hashemibeni PhD, Email: hashemibeni@med.mui.ac.ir