

## جداسازی، تکثیر و تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی جنینی موش صحرایی به رده‌ی سلول‌های استئوژنیک و آدیپوژنیک

عباس صادقی<sup>۱</sup>، کاوه خزائیل<sup>۲</sup>، محمدرضا تابنده<sup>۳</sup>، معصومه عزتی گیوی<sup>۴</sup>، فرشته نژاددهباشی<sup>۵</sup>

### مقاله پژوهشی

### چکیده

**مقدمه:** توده‌ی بدن جنین، منبع بسیاری از سلول‌های بنیادی است که پتانسیل زیادی در ترمیم و بازسازی بافت‌های مختلف دارند و می‌توانند به انواعی از سلول‌ها از جمله استئوبلاست و آدیپوسیت تمایز یابند. با این حال جداسازی و توان تمایزی این سلول‌ها در محیط کشت، کمتر بررسی شده است. لذا هدف از مطالعه‌ی حاضر، تعیین روش جداسازی، تکثیر و توان تمایزی سلول‌های بنیادی مزانشیمی جنینی (fMSCs) مشتق شده از جنین موش صحرایی بود.

**روش‌ها:** در این مطالعه‌ی تجربی، fMSCs با استفاده از روش هضم با تریپسین، از جنین‌های ۱۵ روزه موش صحرایی جداسازی و تا پاساژ سوم کشت داده شدند. سپس، ماهیت fMSC با فلوسایتومتری مشخص شدند و به رده‌ی سلول‌های استئوبلاست و آدیپوسیت تمایز داده شدند. تکثیر سلولی و بیان ژن‌های اختصاصی رده‌ی استئوژنیک و آدیپوژنیک در سلول‌های تمایز یافته مورد بررسی قرار گرفت.

**یافته‌ها:** مارکرهای سطح سلولی fMSC در پاساژ ۳ برای CD105 و CD90 مثبت و برای CD45 و CD34 منفی بودند. سلول‌های جدا شده مورفولوژی فیبروبلاست مانند را نشان دادند. این سلول‌ها، رسوب کلسیم را در تمایز به استئوژنیک و تجمع قطرات چربی در تمایز به آدیپوژنیک داشتند. ژن‌های رده‌ی استئوژنیک شامل استونکتین، ALP، BMP-6، Runx-2 و ژن‌های رده‌ی آدیپوژنیک شامل PPAR $\gamma$  و CREBBP به ترتیب در کشت تمایز استئوژنیک و آدیپوژنیک بیان شدند.

**نتیجه‌گیری:** با توجه به یافته‌های مطالعه‌ی حاضر به نظر می‌رسد که سلول‌های بنیادی مزانشیمی جدا شده با استفاده از روش هضم آنزیمی با تریپسین از جنین موش صحرایی، دارای توان بالقوه‌ای در تکثیر و تمایز به رده‌ی سلول‌های استئوبلاست و آدیپوسیت هستند.

**واژگان کلیدی:** سلول‌های بنیادی مزانشیمی؛ آدیپوسیت‌ها؛ استئوبلاست‌ها؛ جنین

**ارجاع:** صادقی عباس، خزائیل کاوه، تابنده محمدرضا، عزتی گیوی معصومه، نژاددهباشی فرشته. جداسازی، تکثیر و تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی

جنینی موش صحرایی به رده‌ی سلول‌های استئوژنیک و آدیپوژنیک. مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۴۰۲؛ ۴۱ (۷۱۳): ۲۰۵-۱۹۶

### مقدمه

سلول‌های بنیادی، سلول‌های تمایز نیافته‌ای با توانایی تکثیر و تولید سلول‌های تمایز یافته هستند که بر اساس منشأ به دسته سلول‌های بنیادی رویانی (Embryonic stem cells)، سلول‌های بنیادی جنینی (Fetal stem cells)، سلول‌های بنیادی بالغ (Adult stem cells) و سلول‌های بنیادی پرتوان القایی (Induced pluripotent stem cells)

تقسیم‌بندی می‌شوند (۱). جنین موش صحرایی در مراحل مختلف تکامل خود حاوی جمعیتی از سلول‌های بنیادی است که این سلول‌ها در مراحل بعدی فرایند تکوینی و پس از دوران جنینی، مسؤول به وجود آوردن بافت‌های مختلف بدن می‌باشند (۲). سلول‌های بنیادی جنینی دارای ویژگی‌های منحصر به فردی هستند از جمله: این سلول‌ها، خاصیت نامیرایی داشته که به صورت طبیعی و بدون ایجاد

۱- دانشجوی دکتری تخصصی، گروه علوم پایه، بخش آناتومی و جنین‌شناسی، دانشکده‌ی دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران

۲- استادیار، گروه علوم پایه، بخش آناتومی و جنین‌شناسی، دانشکده‌ی دامپزشکی و مرکز تحقیقات سلول‌های بنیادی و فناوری ترانسژنیک، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران

۳- دانشیار، گروه علوم پایه، بخش بیوشیمی و بیولوژی مولکولی، دانشکده‌ی دامپزشکی و مرکز تحقیقات سلول‌های بنیادی و فناوری ترانسژنیک، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران

۴- استادیار، گروه علوم پایه، بخش فارماکولوژی و سم‌شناسی، دانشکده‌ی دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران

۵- استادیار، مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، پژوهشکده‌ی علوم پایه پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز، اهواز، ایران

**نویسنده‌ی مسؤول:** کاوه خزائیل؛ استادیار، گروه علوم پایه، بخش آناتومی و جنین‌شناسی، دانشکده‌ی دامپزشکی و مرکز تحقیقات سلول‌های بنیادی و فناوری ترانسژنیک، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران

Email: k.khazaeil@scu.ac.ir

می‌توان به پروتکل‌های کارآمد برای جداسازی تعداد زیادی از انواع سلول‌های مورد نظر به شکل خالص و تأیید ماهیت و توان تمایزی آنها اشاره کرد.

لذا هدف از مطالعه‌ی حاضر، تعیین روش کارآمد جداسازی، تکثیر سلولی و توان تمایزی سلول‌های بنیادی مزانشیمی جنینی مشتق شده از جنین موش صحرایی به رده‌ی سلول‌های استئوژنیک و آدیپوژنیک بود.

### روش‌ها

**آماده‌سازی حیوانات:** در این مطالعه، از ۱۲ سر موش صحرایی ماده بالغ جوان نژاد ویستار و همچنین ۴ عدد موش صحرایی نر بالغ نژاد ویستار جهت انجام آزمایشات استفاده گردید. حیوانات در خانه‌ی حیوانات دانشکده‌ی دامپزشکی دانشگاه شهید چمران اهواز تحت شرایط استاندارد (۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی) و درجه حرارت  $23 \pm 2$  درجه‌ی سانتی‌گراد در قفس‌های فلزی مخصوص پرورش، نگهداری شدند. تمام مراحل آزمایش بر اساس دستورالعمل کمیته‌ی اخلاق کار با حیوانات آزمایشگاهی دانشکده‌ی دامپزشکی دانشگاه شهید چمران اهواز، طراحی و با کد اخلاق EE/99.3.02.69104/scu.ac.ir اجرا شد. بعد از دو هفته، به ازای هر ۳ سر موش صحرایی ماده یک موش صحرایی نر در قفس موش‌های صحرایی قرار گرفت. از صبح روز بعد از مدخل واژن موش‌های صحرایی ماده، اسمیر واژینال تهیه کرده و با استفاده از میکروسکوپ نوری مورد بررسی قرار گرفت. روز مشاهده‌ی اسپرم در اسمیر واژینال هر موش صحرایی، به عنوان روز صفر بارداری آن موش صحرایی در نظر گرفته شد.

**نمونه‌گیری:** در روز ۱۵ بارداری، موش‌ها به وسیله‌ی تزریق داخل صفاقی کتامین (۷۵ میلی‌گرم/کیلوگرم) و زایلازین (۱۰ میلی‌گرم/کیلوگرم) بی‌هوش شده و با استفاده از جابجایی مهره‌های گردنی آسان‌کشی شدند. سپس با ایجاد برش در ناحیه‌ی شکم حیوان، شاخ‌های رحم موش‌های صحرایی را خارج کرده و بعد از برش آنها، جنین‌ها خارج شدند. سپس جنین‌ها به پلیت‌های حاوی محیط کشت DMEM و ۱ درصد آنتی‌بیوتیک (پنی‌سیلین/استرپتومایسین) منتقل شدند. کلیه‌ی این مراحل با رعایت شرایط اسپتیک و زیر هود انجام شد.

**روش استخراج سلول‌های بنیادی مزانشیمی جنینی:** در پتری دیش حاوی جنین‌های به دست آمده، احشای جنینی به علاوه سر و اندام‌های جنین جدا شدند. لاشه‌ی جنین‌ها در لوله‌ی درب پیچ‌دار پلاستیکی ۵۰ میلی‌لیتری حاوی محیط کشت DMEM ریخته شده و سه بار یا بیشتر با محیط کشت استریل شستشو داده شدند. سپس جنین‌ها در پتری دیش‌های ۱۰ سانتی‌متری قرار گرفته و به وسیله‌ی تیغ اسکالپل استریل به قطعات بسیار ریزی تقسیم شدند. جنین‌های

جهش ژنی و یا آلودگی این حالت را از خود نشان می‌دهند و این توانایی را دارند که به انواع رده‌های سلولی تمایز یابند و به راحتی می‌توان در آزمایشات مختلفی استفاده نمود (۳).

به طور کلی شناسایی سلول‌های بنیادی از طریق خاصیت چسبندگی سلول‌های بنیادی به ظرف محیط کشت پلاستیکی و ظرفیت تمایز آنها به استئوبلاست‌ها، آدیپوسیت‌ها و کندروبلاست‌ها و همچنین بیان مارکرهای سطحی معمول (CD29، CD44، CD105، CD90، CD73، CD166) و عدم بیان مارکرهای CD34، CD14، CD19 انجام می‌شود (۴). تمایز استئوژنیک و آدیپوژنیک معمولاً برای شناسایی پتانسیل تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی استفاده می‌شود (۵). عملکرد سلول‌های بنیادی سالم شامل تکثیر سلولی متعادل و ظرفیت کافی برای تمایز مناسب است. در فرایند تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی به استئوبلاست، ژن‌های مختلفی دخالت دارند که بعضی از آنها عبارتند از استئوپونتن، استوکلسین، Runx-2، BMPها، آلكالین فسفاتاز و غیره که البته آلكالین فسفاتاز به عنوان اولین ژنی که در روند تمایز بیان می‌شود مطرح است (۶). نوکلئوسپتور PPAR $\gamma$  در سطوح بالا در بافت‌های چربی بیان شده و به همراه CREBBP نقش اصلی در تمایز آدیپوسیت‌ها دارد (۷).

تعداد بسیار زیادی از انواع سلول‌های بنیادی در مقالات توصیف شده است که از منشأ رویانی، جنینی یا بالغ مشتق شده‌اند. بر اساس توانایی خودنوسازی و توان تمایزی، سلول‌های بنیادی مشتق شده از رویان به طور سلسله‌مراتبی خواص بالاتری از سایر انواع سلول‌ها دارند (۸). سلول‌های بنیادی مزانشیمی جنینی همانند سلول‌های بنیادی مزانشیمی بالغ با ظاهر فیروبلاستی دوکی شکل خود، توانایی چسبیدن به فلاسک کشت سلولی و گسترش یافتن را دارند که ویژگی‌های ضروری برای جداسازی سلول‌های بنیادی هستند. با این حال، سلول‌های بنیادی مزانشیمی جنینی سریع‌تر از سلول‌های بنیادی مزانشیمی بالغ رشد می‌کنند (۹).

شواهدی وجود دارد که نشان می‌دهد سلول‌های بنیادی جنینی تفاوت‌های مهمی در بیان ژن دارند. برخی از سلول‌های بنیادی جنینی پتانسیل تکثیر بالاتری نسبت به هم‌تایان بالغ خود دارند، مفهومی که به منفعت استفاده از چنین سلول‌هایی برای پیوند اندام یا بافت‌ها است (۱۰). استفاده از ظرفیت تمایزی سلول‌های بنیادی به رده‌های آدیپوژنیک و استئوژنیک، برای مرمت هر آسیب بافتی یا اندام ضروری است. کاربرد متداول کلینیکی آنها در موارد مختلف از جمله درمان استئوژنز ناقص، التیام شکستگی، پاره شدن تاندون، احیاء غضروف و درمان نارسایی‌های مختلف دیگر در بدن به خوبی نشان داده شده است (۱۱). با این حال، مسائل اساسی بیشتری برای کشت و استفاده از سلول‌های بنیادی جنینی وجود دارد که از جمله آنها

اسنتوزنیک شامل DMEM-HG حاوی ۱۰ درصد FBS، ۱۰ نانومولار دگزاتازون، ۰/۰۵ نانومولار آسکوربیک اسید-۲- فسفات و ۱۰ میکرومولار بتا-گلیسروفسفات (Sigma-Aldrich, Louis St, MO) کشت داده شدند. به عنوان گروه شاهد، محیط برخی از خانه‌ها با محیط معمولی یعنی DMEM-HG حاوی ۱۰ درصد سرم گاوی جایگزین شد. محیط تمایز هر سه روز یکبار عوض می‌شد. در نهایت مورفولوژی نرمال استئوسیت‌ها با رنگ‌آمیزی Alizarin Red S بررسی شد. این رنگ‌آمیزی برای تعیین رسوب کلسیم در سلول‌های بنیادی مزانشیمی تمایز یافته استفاده شد. بدین منظور سلول‌ها با استفاده از فرمالدئید ۴ درصد به مدت ۶۰ دقیقه تثبیت شدند و سپس به مدت ۴۵ دقیقه در دمای اتاق با استفاده از ۴۰ میلی‌مولار رنگ Alizarin Red S، رسوب کلسیم در سلول‌ها رنگ‌آمیزی شدند.

**بررسی توان تمایز آدیپوژنیک fMSCها:** برای القای تمایز آدیپوژنیک، سلول‌های بنیادی مزانشیمی در پاساژ سوم به مدت ۲۱ روز در محیط تمایز آدیپوژنیک کشت داده شدند. محیط تمایز آدیپوژنیک حاوی DMEM-HG همراه با ۱۰ درصد FBS، ۰/۰۵ نانومولار آسکوربیک اسید-۲-فسفات، ۱۰۰ نانومولار دگزاتازون، و ۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر ایندومتاسین (Sigma-Aldrich, St. Louis, Mo) بود. محیط تمایز آدیپوژنیک هر سه روز یکبار تعویض می‌شد. پس از تمایز، سلول‌ها با استفاده از فرمالدئید ۴ درصد به مدت ۶۰ دقیقه تثبیت شده و با استفاده از رنگ Oil red O در ایزوپروپانول به مدت ۴۵ دقیقه رنگ‌آمیزی شدند. در نهایت، تشکیل واکوئل‌های چربی در سلول‌های بنیادی مزانشیمی جنینی تمایز یافته مورد ارزیابی و مقایسه قرار گرفت.

**استخراج RNA کل و سنتز cDNA:** سلول‌های تمایز یافته برای بیان ژن‌های ردهی استئوزنیک و آدیپوژنیک مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. در این آزمایش، RNA کل fMSCها پس از ۲۱ روز تمایز استئوزنیک و آدیپوژنیک با استفاده از RNXTM طبق دستورالعمل سازنده (SinaClon, Inc، ایران) جدا شد. سنتز cDNA با استفاده از ۱ میکروگرم RNA کل طبق دستورالعمل کیت سنتز cDNA (یکتا) تجهیز، ایران) انجام شد. پرایمرهای ژن‌های استئونکتین، ALP، BMP-6، Runx-2، PPAR $\gamma$ ، CREBBP و HPRT از پایگاه دادهی NCBI به دست آمدند (جدول ۱).

**واکنش Real-time PCR** واکنش‌های RT-PCR طبق پروتکل کیت SYBR Green qPCR Master Mix (یکتا تجهیز، ایران) انجام شد. واکنش‌ها در حجم ۱۲/۵ میکرولیتر شامل ۶/۲۵ میکرولیتر Syber Green qPCR Master Mix 2x، ۰/۲۵ میکرولیتر از هر پرایمر با غلظت نهایی ۲۰۰ nM، ۳ میکرولیتر cDNA با غلظت نهایی ۲۰۰ nM و ۲/۷۵ میکرولیتر ddH<sub>2</sub>O بود.

قطعه قطعه شده در لوله‌ی درب پیچ‌دار ۱۵ میلی‌متری حاوی ۲ میلی‌لیتر محلول تریپسین EDTA و در انکوباتور ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد شیک‌ر دار به مدت ۱۵ دقیقه قرار گرفتند. پس از ۱۵ دقیقه، جهت خنثی‌سازی اثر تریپسین، مقدار ۵ میلی‌لیتر محیط کشت DMEM به همراه ۱۵ درصد سرم جنین گاو (FBS (Fetal Bovine Serum) به فالكون اضافه شد. سپس محتویات فالكون را از مش ۴۰ میکرومتر کشت سلول عبور داده شد. سوسپانسیون حاصل را در دور ۱۵۰۰ به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ کرده و مایع رویی را دور ریخته و به رسوب سلولی محیط کشت DMEM به همراه ۱۵ درصد سرم جنین گاو (FBS) و ۱ درصد آنتی‌بیوتیک (پنی‌سیلین / استرپتوماستین) اضافه کرده و به داخل فلاسک کشت سلول منتقل شدند. روز بعد، تعویض محیط انجام گرفته و اجازه داده شد تا سلول‌ها کاملاً رشد کرده و کف فلاسک را پر کنند. سلول‌های دیگری که علاوه بر سلول بنیادی در محیط کشت دیده می‌شدند با چندین کشت متوالی از بین می‌روند. سلول‌ها در انکوباتور CO<sub>2</sub> و دمای ۳۷ نگهداری و هر ۳ تا ۴ روز محیط کشت آن‌ها تعویض می‌شد (۱۲).

**تأیید سلول‌های بنیادی جنینی با استفاده از روش فلوسایتومتری:** از روش فلوسایتومتری برای تأیید هویت سلول‌های بنیادی مزانشیمی جنینی با بررسی بیومارکرهای سطح سلولی از جمله CD45، CD34، CD90 و CD105 در سلول‌های بنیادی مزانشیمی استفاده شد. fMSCهای کشت شده در پاساژ سوم با استفاده از تریپسین ۰/۰۵ درصد (Bioidea، ایران) جمع‌آوری شد (۱۵۰۰ RPM × ۵ دقیقه) و با ۲ میلی‌لیتر بافر شستشو (بافر PBS حاوی ۵ درصد FBS) سانتریفیوژ و شسته شدند. سلول‌ها به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۴ درجه‌ی سانتی‌گراد با ۵ میکرولیتر از آنتی‌بادی‌های اختصاصی نشان‌دار شده با FITC (eBioscience, UK) در تاریکی انکوبه شدند. پس از دوبار سانتریفیوژ برای حذف آنتی‌بادی‌های اضافی، سلول‌ها در ۱ میلی‌لیتر PBS معلق شدند و با استفاده از فلوسیتومتر Galaxy (Dako, USA) مورد ارزیابی قرار گرفتند (۹).

**بررسی تکثیر سلولی:** از fMSCها در پاساژ سوم برای اندازه‌گیری تکثیر سلولی و رسم منحنی رشد سلولی استفاده شد. fMSCها در پلیت ۱۲ چاهکی با تراکم  $5 \times 10^4$  سلول در هر چاهک کشت داده شدند و به مدت ۲۴ ساعت اجازه داده شد تا سلول‌ها به کف پلیت‌ها بچسبند (۱۳). چاهک‌ها در روزهای ۱، ۳، ۵ و ۷ تریپسینه شدند و شمارش سلولی انجام شد و نتایج شمارش سلولی در روزهای مختلف به صورت منحنی رشد با استفاده از نرم افزار GraphPad Prism ترسیم شد.

**بررسی توان تمایز استئوزنیک fMSCها:** برای القای تمایز استئوزنیک، fMSCها در پاساژ سوم به مدت ۲۱ روز در محیط تمایز

جدول ۱. لیست پرایمرهای مورد استفاده برای واکنش RT-PCR

| Gene name     | Sequences   | Product (bp) | GenBank        |
|---------------|---|--------------|----------------|
| Osteonectin   | F: AGTCACAGCATTTTCCACG<br>R: TTCCAACACAGCCAGTGAGA     | 100          | Y13714.1       |
| Runx-2        | F: ACTCTGCCGAGCTACGAAAT<br>R: AAGTGAAACTCTTGCCCTCGTC  | 105          | XM_006244550.3 |
| BMP-6         | F: CTCCAGTGCTTCAGACTACAAC<br>R: TCTCCGTCACAATAGTTGGCA | 141          | NM_013107.1    |
| ALP           | F: TCCCAAAGGCTTCTTCTTGCT<br>R: TTTCCGATGGCCTCATCCAT   | 114          | J03572.1       |
| PPAR $\gamma$ | F: CCGAAGAACCATCCGATTGAA<br>R: AACCTGATGGCATTGTGAGAC  | 143          | NM_013124      |
| CREBBP        | F: TACAGGGCCTGCAGACATTA<br>R: ATCACCAGAGGCAGCTTGA     | 143          | NM_031017.2    |
| HPRT          | F: ACAGGCCAGACTTTGTTGGA<br>R: TGGCTTTTCCACTTTCGCTG    | 123          | NM_012583.2    |

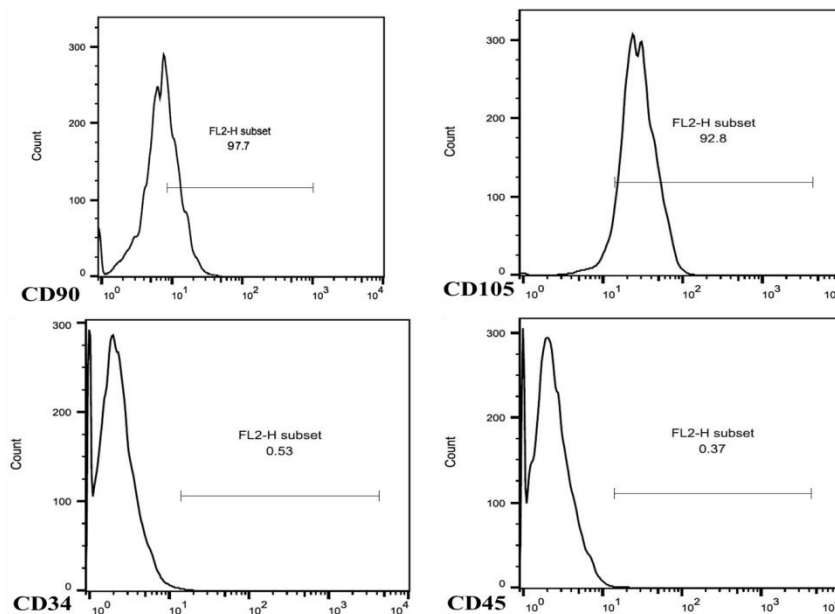
نمایش داده شده‌اند.

### یافته‌ها

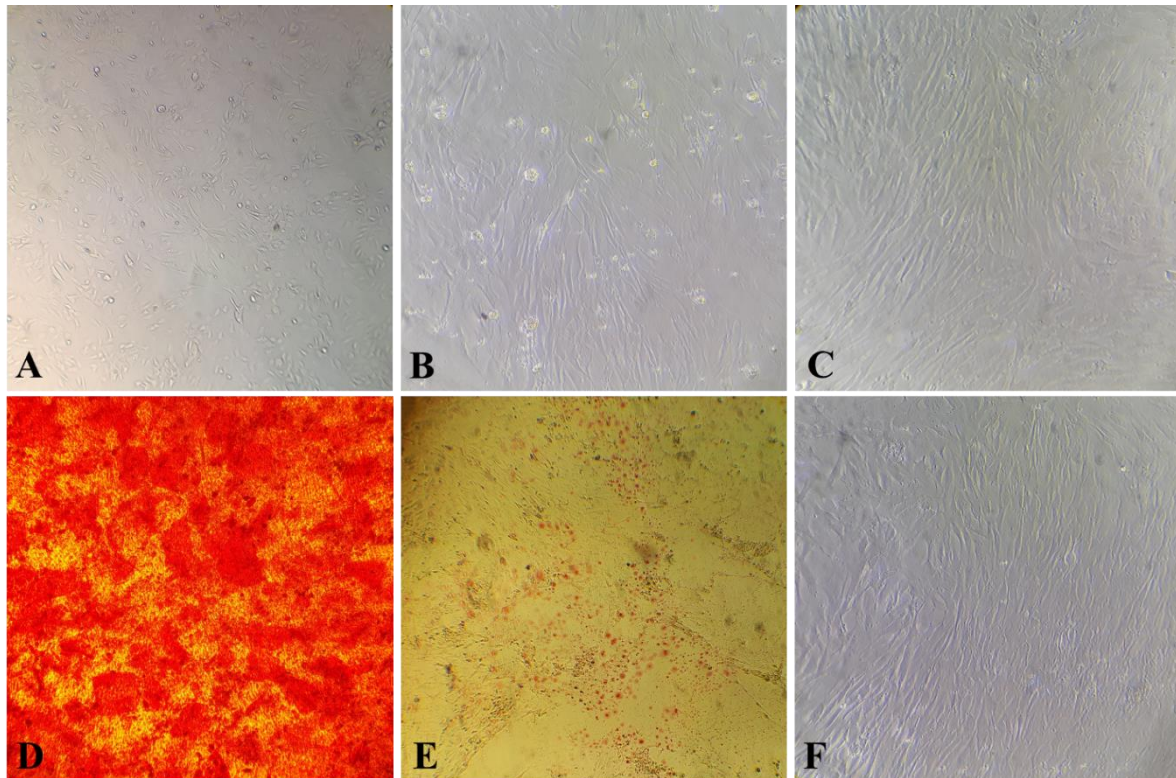
آنالیز فلوسایتومتری مارکرهای سلول بنیادی: آنالیز فلوسایتومتری مارکرهای سطحی نشان داد که سلول‌های بنیادی مزانشیمی جنینی، مارکرهای CD90 (۹۷/۷۰ درصد) و CD105 (۹۲/۸۰ درصد) را بیان می‌کنند. در حالی که این سلول‌ها از نظر بیان مارکرهای خونسازی مانند CD34 (۰/۵۳ درصد) و CD45 (۰/۳۷ درصد) منفی بودند (شکل ۱). این نتایج نشان می‌دهد که سلول‌های جدا شده در این مطالعه دارای ویژگی‌های معمولی سلول‌های بنیادی مزانشیمی بودند و تعریف سلول‌های جداسازی شده به عنوان سلول‌های بنیادی مزانشیمی را تأیید می‌کند.

چرخه‌ی دما شامل ۹۴ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه به عنوان اولین دناتوراسیون، ۴۵ چرخه شامل ۹۴ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۱۵ ثانیه و ۶۰ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه بود. نتایج با استفاده از نرم‌افزار LightCycler SW1.1 مورد ارزیابی قرار گرفت و بر اساس فرمول  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  محاسبه شد.

**تجزیه و تحلیل داده‌ها:** تجزیه و تحلیل‌های آماری داده‌های به دست آمده با استفاده از نرم‌افزار آماری SPSS نسخه‌ی ۲۴ (version 24, IBM Corporation, Armonk, NY) انجام شد و برای مقایسه‌ی میانگین بین گروه‌ها از آنالیز واریانس یک طرفه و تست تعقیبی Tukey استفاده شد. سطح معنی‌داری در آزمون‌ها  $P < 0/05$  منظور گردید. داده‌ها به صورت میانگین  $\pm$  انحراف معیار



شکل ۱. آنالیز فلوسایتومتری بیومارکرهای سطح سلولی CD34، CD45، CD90، CD105 در MSCها. بیان CD90 و CD105 در MSCها مثبت بود در حالی که بیان مارکرهای خونساز CD45 و CD34 منفی بود.



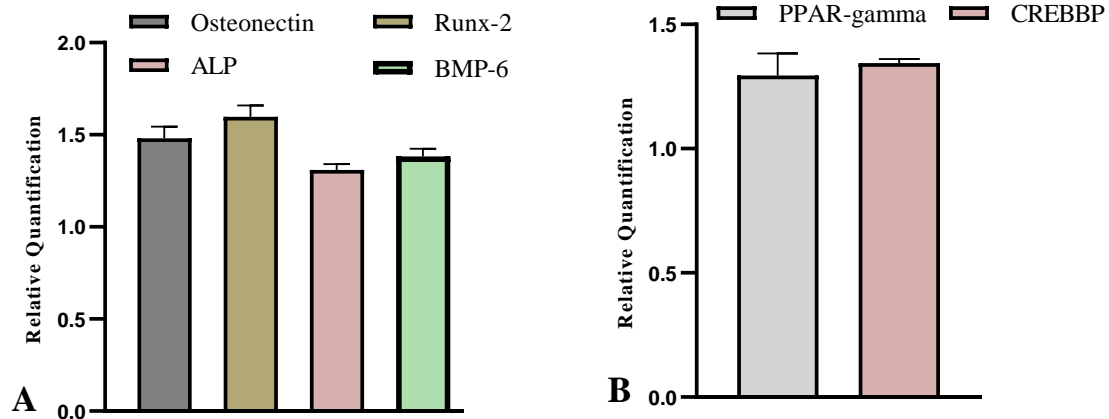
**شکل ۲.** سلول‌های بنیادی مزانشیمی جنینی (fMSC) مشتق شده از جنین ۱۵ روزه موش صحرایی و تمایز آنها به رده سلول‌های استئوژنیک و آدیپوژنیک. **A:** جمعیت اولیه سلول‌های جدا شده از جنین موش صحرایی در کشت اولیه. **B:** در پاساژ دوم از کشت‌های فوق، سلول‌های دوکی‌شکل شروع به ازدیاد نموده و سرعت رشد آنها افزایش یافت. **C:** در پاساژ سوم جمعیت یکنواختی از سلول‌های دوکی‌شکل مشاهده شد. **D:** رسوب کلسیم با رنگ آمیزی Alizarin Red S پس از ۲۱ روز کشت fMSC در محیط استئوژنیک رنگ آمیزی شد. **E:** پس از تمایز آدیپوژنیک fMSCها به مدت ۲۱ روز، ایجاد قطرات چربی در محیط آدیپوژنیک با رنگ آمیزی Oil red O مشخص شد. **F:** کشت fMSCها در محیط عادی به مدت ۲۱ روز به عنوان گروه کنترل که هیچگونه رسوب کلسیم یا قطرات چربی ایجاد نشد.

نتایج کشت و مشاهدات مورفولوژی: در کشت اولیه، سلول‌های جداسازی شده از جنین موش صحرایی به شکل گروه‌های سلولی ناممکن و هتروژن دیده شدند که البته تعداد بیشتری از سلول‌ها دارای مورفولوژی دوکی و چند وجهی بودند (شکل ۲-۱). سلول‌های دوکی شکل نسبت به سلول‌های دیگر سرعت رشد بیشتری داشتند و پس از اولین پاساژ بیشترین درصد سلولی را تشکیل دادند (شکل ۲-۲). در پاساژهای بعدی تعداد سلول‌های دوکی شکل بیشتر شدند و جمعیت همگن‌تری از سلول‌های دوکی شکل با هسته‌های مشخص، که مورفولوژی تیبیک سلول‌های بنیادی مزانشیمی است کف فلاسک را اشغال کرد (شکل ۲-۳).

**تمایز استئوژنیک fMSCها:** پس از تمایز fMSCها به مدت ۲۱ روز با استفاده از محیط‌های تمایز استئوژنیک، تغییر مورفولوژی دوکی شکل fMSCها را به ظاهر مثلثی، چند ضلعی و مسطح مشاهده شد. همچنین سطوح رسوب کلسیم با استفاده از رنگ آمیزی Alizarin Red S تعیین شد (شکل ۲-۴). نتایج RT-PCR حاکی از بیان ژن‌های اختصاصی رده‌ی استئوژنیک شامل استئونکتین، ALP، BMP-6 و Runx-2 در fMSCهای تمایز یافته به رده استئوژنیک بود (شکل ۳-۱).

**تمایز آدیپوژنیک fMSCها:** جهت تمایز آدیپوژنیک نیز، fMSCها به مدت ۲۱ روز با استفاده از محیط تمایزی آدیپوژنیک به سلول‌های آدیپوسیت تمایز داده شدند تا تشکیل قطرات چربی مشخص شود. از روز ۳ الی ۵ تمایز آدیپوژنیک، ظاهر fMSCها از دوکی شکل بلند به اشکال چند ضلعی تغییر کرد. پس از ۷ روز تمایز، سلول‌ها گرد و کروی شدند و قطرات لیپید گرد و شفاف در سیتوپلاسم این سلول‌ها مشاهده شد. نتایج رنگ‌آمیزی سلول‌ها با Oil red O، توزیع قطرات لیپید را در داخل و خارج سیتوپلاسم سلول‌ها نشان داد (شکل ۲-۵). بر اساس نتایج RT-PCR در سلول‌های تمایز یافته به رده‌ی آدیپوژنیک، ژن‌های اختصاصی رده‌ی آدیپوژنیک شامل PPAR $\gamma$  و CREBBP بیان شده بود (شکل ۳-۲).

مجله دانشکده پزشکی اصفهان - سال ۴۱ / شماره ۷۱۳ / هفته‌ی اول خرداد ۱۴۰۲

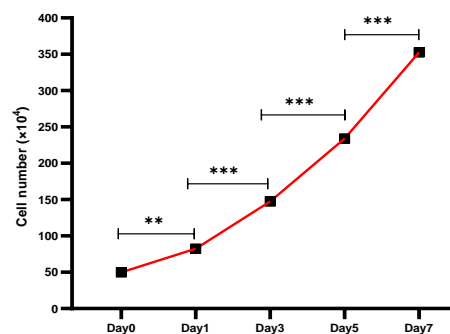


شکل ۳. آنالیز RT-PCR بیان ژن‌های اختصاصی رده استئوژنیک و آدیپوژنیک. A: میزان بیان ژن‌های اختصاصی رده استئوژنیک (استونکتین، Runx-2، BMP-6، ALP). B: میزان بیان ژن‌های اختصاصی رده آدیپوژنیک (CREBBP، PPAR $\gamma$ ).

سلول‌درمانی شناخته شده‌اند. کاربرد گسترده‌ی این سلول‌ها به دلیل ظرفیت بالای تکثیر و خودنوسازی، تمایز به سایر رده‌های مزانشیمی و مهار واکنش‌های ایمنی می‌باشد (۱۴). رایج‌ترین منبع دسترسی به سلول‌های بنیادی مزانشیمال تا مدت‌ها مغز استخوان بود. در سال‌های اخیر مقالات متعددی چاپ شده و حضور این سلول‌ها را در بسیاری از بافت‌های جنینی اثبات کرده‌اند (۱۵، ۱۶). در این مطالعه، با موفقیت fMSCها از توده‌ی بدن جنین‌های ۱۵ روزه موش صحرایی با استفاده از روش هضم آنزیمی با تریپسین به دست آورده شد و تکثیر و پتانسیل تمایز آن‌ها در شرایط آزمایشگاهی مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج حاصل نشان داد که fMSCها از نظر تمایز قادرند با فراهم شدن شرایط مناسب در محیط آزمایشگاه، به رده‌های استخوانی و چربی تمایز یابند. همسو با مطالعه‌ی حاضر، مطالعات پیشین نشان داده‌اند که سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق شده از بافت ریه جنین موش صحرایی چند توان بوده و می‌توانند به استئوسیت‌ها، آدیپوسیت‌ها، سلول‌های کبدی و سلول‌های عصبی در شرایط آزمایشگاهی تمایز یابند (۵).

مطالعه‌ی Hashemi-Tabar و همکاران نیز نشان داد که سلول‌های بنیادی مزانشیمی جدا شده از توده‌ی بدن جنین ۱۴ روزه‌ی موش، دارای خاصیت تکثیر و تمایز بالایی بوده و القای این سلول‌ها می‌تواند آبخاری از ژن‌ها را بیان کرده که در نهایت منجر به تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی جنینی به سلول‌های اندودرمی شود (۱۲). بر اساس پژوهش‌های انجام شده، اگر سلولی واجد ظاهر دوکی شکل، توانایی چسبندگی به کف ظرف کشت و قابلیت تمایز به رده‌های سلولی مزودرمی باشد در گروه سلول‌های بنیادی مزانشیمی

نتایج تکثیر سلولی: با توجه به منحنی رسم شده در شکل ۴، fMSCها در روز اول بلافاصله پس از کشت سلول به کف پلیت کشت سلول چسبیده و شروع به تکثیر کردند. تکثیر fMSCها در روز سوم افزایش معنی‌داری نسبت به روز اول نشان داد ( $P < 0/05$ ). همچنین، تکثیر این سلول‌ها در روز پنجم افزایش معنی‌داری را در مقایسه با روز سوم داشت ( $P < 0/05$ ). علاوه بر این، تکثیر fMSCها در روز هفتم نیز نسبت به سایر روزها افزایش معنی‌داری را نشان داد ( $P < 0/05$ ) (شکل ۴).



شکل ۴. منحنی رشد برای fMSCهای مشتق شده از جنین‌های ۱۵ روزه موش صحرایی.

$P > 0/01$ ،  $^{**} P > 0/001$ ،  $^{***}$  نشان دهنده تفاوت معنی‌دار بین روزها است.

## بحث

امروزه سلول‌های بنیادی مزانشیمی به عنوان منبع سلولی با ارزشی در

قرار می‌گیرد (۱۷). بر این اساس در مطالعه‌ی حاضر برای جداسازی اولیه جمعیت سلولی، از ویژگی چسبندگی به سطوح پلاستیک بر خلاف سلول‌های خونی که فاقد این خاصیت هستند استفاده شد. با تکثیر و افزایش تعداد سلول‌ها به تدریج جمعیت سلولی هموزن و همگونی از سلول‌های شبه فیروبلاستی دوکی شکل به دست آمد. شناسایی سلول‌های بنیادی مزانشیمی جنینی معمولاً بر اساس بیان مثبت چندین مارکرهای سطحی خاص و بیان منفی چندین نشانگر دیگر است (۵، ۱۸). سلول‌های بنیادی مزانشیمی جنینی موش صحرایی به وسیله‌ی بیان هم زمان مارکرهای ویژه‌ی سلول‌های بنیادی CD90 و CD105 و عدم بیان مارکرهای سلول‌های بنیادی هماتوپوئیتیک CD34 و CD45 تأیید گردیدند. نتایج آنالیز فلوسایتومتری از مارکرهای سطحی سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق شده از جنین‌های موش صحرایی مشابه با سایر تحقیقات بود (۵). توانایی تکثیر بالا و پتانسیل تمایز چند رده‌ای برای سلول‌های بنیادی مزانشیمی بسیار مهم است تا ابزاری امیدوارکننده برای پزشکی ترمیمی و درمان با سلول‌های بنیادی باشند (۱۹). تمایز استئوژنیک و آدیپوژنیک معمولاً برای شناسایی پتانسیل تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی استفاده می‌شود (۲۰). تمایز سلول‌های مزانشیمی به دودمان‌های استخوان و چربی تحت تأثیر محرک‌های شیمیایی از قبیل دگزامتازون و انسولین صورت می‌پذیرد. به طوری که وقتی سلول‌های بنیادی مزانشیمی در حضور اسکوربیک اسید-۲- فسفات، B-گلیسروفسفات و دگزامتازون کشت شوند سلول‌ها فنوتیپ استخوانی به خود گرفته و ماتریکس خارج سلولی از جنس فسفات کلسیم از خود ترشح می‌کنند که به صورت کریستال‌های هیدروکسی آپاتیت رسوب می‌کند (۲۱). در این مطالعه، تمایز استئوژنیک fMSCها با ظاهر شدن توده‌های ندولار همراه بود که با رنگ‌آمیزی Alizarin Red S مشخص شدند. مکانیسم عمل رنگ Alizarin Red S بدین صورت است که با کلسیم تشکیل کیلات می‌دهد و به رنگ قرمز دیده می‌شود (۲۲).

استئوژنیک نقش دارد و برای معدنی شدن بافت استخوان ضروری است. ALP و استئونکتین نقش مهمی در میزان معدنی شدن ماتریکس استخوانی سلول‌ها و تشکیل استخوان دارند، بنابراین می‌توان سطح بیان آن‌ها، میزان فعالیت ALP و همچنین میزان رسوب کلسیم را یکی از مهم‌ترین شاخص‌های تمایز استئوژنیک دانست (۲۴). ژن‌های استئونکتین و آلکالین فسفاتاز به واسطه‌ی پروتئین Runx-2 بیان می‌شوند. پروتئین Runx-2 یک تنظیم‌کننده‌ی ضروری برای فرایند استئوبلاستوژنیز و تنظیم توده استخوانی می‌باشد (۲۵). بیان ژن‌های BMP-6، Runx-2 برای حفظ شبکه‌ی استخوانی و معدنی شدن ماتریکس استخوان ضروری هستند. علاوه بر این، تمایز سلول‌های مزانشیمال به سلول استخوانی با افزایش بیان ژن مارکر اولیه آنزیم ALP همراه است (۲۶). که این تمایز با روش‌های مختلفی مانند تشخیص بیان ژن‌های Runx-2، BMP-6، استئونکتین و یا تست Alizarin Red S قابل تشخیص است (۲۷).

در این پژوهش، توان تمایزی fMSCها به سلول‌های چربی نیز در محیط تمایزی آدیپوژنیک مورد بررسی قرار گرفت که مشابه مطالعات قبلی، fMSCها تیمار شده با محیط تمایزی آدیپوژنیک، قادر به تشکیل واکوئل‌های لیپیدی بودند که با رنگ‌آمیزی Oil Red O مشخص شدند و همچنین ژن‌های مخصوص رده‌ی آدیپوژنیک PPAR $\gamma$  و CREBBP را بیان کردند (۲۸). آدیپوژن فرایندی است که فاکتورهای مختلفی در بروز آن نقش دارد. PPAR $\gamma$  یکی از فاکتورهای لازم جهت تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی به سلول‌های چربی است زیرا به طیف وسیعی از ژن‌های مؤثر در تمایز به چربی متصل گردیده و سبب القای بیان آن‌ها می‌شود (۲۹). نتایج حاصل با کارهای انجام شده در مورد اثبات مزانشیمی بودن سلول‌های بنیادی جنینی از طریق تمایز آن‌ها به سلول‌های چربی همسو می‌باشد (۳۰).

### نتیجه‌گیری

در مطالعه‌ی حاضر، تمایز استئوژنیک fMSCها علاوه بر تأیید با رنگ Alizarin Red S، با بیان ژن‌های اختصاصی رده‌ی استئوژنیک شامل استئونکتین، ALP، BMP-6 و Runx-2 در fMSCهای تمایز یافته به رده‌ی استئوژنیک نیز تأیید شد. بافت استخوانی از ماتریکسی معدنی شده به همراه سلول‌های استخوانی تشکیل شده است. آنزیم آلکالین فسفاتاز نقش کلیدی در پروسه‌ی تمایز سلول‌های استخوانی ایفا کرده و اندازه‌گیری میزان فعالیت این آنزیم به عنوان یکی از مارکرهای اصلی تمایز به استخوان محسوب می‌شود (۲۳). در این پژوهش علاوه بر ALP، سطح بیان ژن استئونکتین نیز مورد بررسی قرار گرفت. استئونکتین در تمایز

توانایی تکثیر بالا و پتانسیل تمایز چند رده‌ای برای سلول‌های بنیادی مزانشیمی بسیار مهم است تا ابزاری امیدوارکننده برای پزشکی ترمیمی و درمان با سلول‌های بنیادی باشند (۱۹). تمایز استئوژنیک و آدیپوژنیک معمولاً برای شناسایی پتانسیل تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی استفاده می‌شود (۲۰). تمایز سلول‌های مزانشیمی به دودمان‌های استخوان و چربی تحت تأثیر محرک‌های شیمیایی از قبیل دگزامتازون و انسولین صورت می‌پذیرد. به طوری که وقتی سلول‌های بنیادی مزانشیمی در حضور اسکوربیک اسید-۲- فسفات، B-گلیسروفسفات و دگزامتازون کشت شوند سلول‌ها فنوتیپ استخوانی به خود گرفته و ماتریکس خارج سلولی از جنس فسفات کلسیم از خود ترشح می‌کنند که به صورت کریستال‌های هیدروکسی آپاتیت رسوب می‌کند (۲۱). در این مطالعه، تمایز استئوژنیک fMSCها با ظاهر شدن توده‌های ندولار همراه بود که با رنگ‌آمیزی Alizarin Red S مشخص شدند. مکانیسم عمل رنگ Alizarin Red S بدین صورت است که با کلسیم تشکیل کیلات می‌دهد و به رنگ قرمز دیده می‌شود (۲۲).

در مطالعه‌ی حاضر، تمایز استئوژنیک fMSCها علاوه بر تأیید با رنگ Alizarin Red S، با بیان ژن‌های اختصاصی رده‌ی استئوژنیک شامل استئونکتین، ALP، BMP-6 و Runx-2 در fMSCهای تمایز یافته به رده‌ی استئوژنیک نیز تأیید شد. بافت استخوانی از ماتریکسی معدنی شده به همراه سلول‌های استخوانی تشکیل شده است. آنزیم آلکالین فسفاتاز نقش کلیدی در پروسه‌ی تمایز سلول‌های استخوانی ایفا کرده و اندازه‌گیری میزان فعالیت این آنزیم به عنوان یکی از مارکرهای اصلی تمایز به استخوان محسوب می‌شود (۲۳). در این پژوهش علاوه بر ALP، سطح بیان ژن استئونکتین نیز مورد بررسی قرار گرفت. استئونکتین در تمایز

دانشگاه شهید چمران اهواز با شماره گرنت SCU.VB1400.293 و کد اخلاق EE/99.3.02.69104/scu.ac.ir برای انجام این تحقیق تشکر و قدردانی می‌گردد.

### تشکر و قدردانی

این اثر تحت حمایت مادی صندوق حمایت از پژوهشگران و فناوران کشور برگرفته شده از طرح شماره ۴۰۰۰۵۹۱ انجام شده است. همچنین بدین‌وسیله از حمایت مالی معاونت پژوهش و فناوری

### References

- Motwani BK, Singh M, Kaur G, Singh S, Gangde PO. Stem cells: A new paradigm in dentistry. *Stem Cells* 2016; 2(1): 140-45.
- Linta L, Stockmann M, Kleinhans KN, Böckers A, Storch A, Zaehres H, et al. Rat embryonic fibroblasts improve reprogramming of human keratinocytes into induced pluripotent stem cells. *Stem Cells Dev* 2012; 21(6): 965-76.
- Rathjen J, Rathjen PD. Mouse ES cells: experimental exploitation of pluripotent differentiation potential. *Curr Opin Genet Dev* 2001; 11(5): 87-94.
- Eirin A, Lerman LO. Mesenchymal stem cell treatment for chronic renal failure. *Stem Cell Res Ther* 2014; 5(4): 83.
- Ma C, Liu Y, Ma Y, Jiang L, Huang Q, Liu G, et al. Identification and characterization of pulmonary mesenchymal stem cells derived from rat fetal lung tissue. *Tissue Cell* 2021; 73: 101628.
- Kendal JK, Singla A, Affan A, Hildebrand K, Al-Ani A, Ungrin M, et al. Is use of BMP-2 associated with tumor growth and osteoblastic differentiation in murine models of osteosarcoma? *Clin Orthop Relat Res* 2020; 478(12): 2921-33.
- Lee JE, Schmidt H, Lai B, Ge K. Transcriptional and epigenomic regulation of adipogenesis. *Mol Cell Biol* 2019; 39(11): e00601-18.
- Gorecka J, Kostiuik V, Fereydooni A, Gonzalez L, Luo J, Dash B, et al. The potential and limitations of induced pluripotent stem cells to achieve wound healing. *Stem Cell Res Ther* 2019; 10(1): 87.
- Gucciardo L, Lories R, Ochsenbein-Kölble N, Done' E, Zwijsen A, Deprest J. Fetal mesenchymal stem cells: isolation, properties and potential use in perinatology and regenerative medicine. *BJOG* 2009; 116(2): 166-72.
- Gotherstrom C, West A, Liden J, Uzunel M, Lahesmaa R, Le Blanc K. Difference in gene expression between human fetal liver and adult bone marrow mesenchymal stem cells. *Haematologica* 2005; 90(8): 1017-26.
- Torres-Torrillas M, Rubio M, Damia E, Cuervo B, Del Romero A, Peláez P, et al. Adipose-derived mesenchymal stem cells: a promising tool in the treatment of musculoskeletal diseases. *Int J Mol Sci* 2019; 20(12): 3105.
- Hashemi-Tabar M, Orazizadeh M, Ghanbari A, Dehbashi FN. Kinetics of gene expression during exposure of mouse stem cells to activin A. *Pak J Biol Sci* 2009; 12(4): 324-31.
- Heng BC, Zhao X, Xiong S, Ng KW, Boey FY, Loo JS. Cytotoxicity of zinc oxide (ZnO) nanoparticles is influenced by cell density and culture format. *Arch Toxicol* 2011; 85(6): 695-704.
- Han Y, Yang J, Fang J, Zhou Y, Candi E, Wang J, et al. The secretion profile of mesenchymal stem cells and potential applications in treating human diseases. *Signal Transduct Target Ther* 2022; 7(1): 92.
- Chinnici CM, Pietrosi G, Iannolo G, Amico G, Cuscino N, Pagano V, et al. Mesenchymal stromal cells isolated from human fetal liver release soluble factors with a potential role in liver tissue repair. *Differentiation* 2019; 105: 14-26.
- Wang B, Pang M, Song Y, Wang H, Qi P, Bai S, et al. Human fetal mesenchymal stem cells secretome promotes scarless diabetic wound healing through heat-shock protein family. *Bioeng transl med* 2023; 8(1): e10354.
- Meesuk L, Suwanprateeb J, Thammarakcharoen F, Tanrawatpan C, Kheolamai P, Palang I, et al. Osteogenic differentiation and proliferation potentials of human bone marrow and umbilical cord-derived mesenchymal stem cells on the 3D-printed hydroxyapatite scaffolds. *Sci Rep* 2022; 12(1): 19509.
- Martinello T, Bronzini I, Maccatrozzo L, Mollo A, Sampaolesi M, Mascarello F, et al. Canine adipose-derived-mesenchymal stem cells do not lose stem features after a long-term cryopreservation. *Res Vet Sci* 2011; 91(1): 18-24.
- Kumar A, Xu Y, Yang E, Wang Y, Du Y. Fidelity of long-term cryopreserved adipose-derived stem cells for differentiation into cells of ocular and other lineages. *Exp Eye Res* 2019; 189: 107860.
- Shi L, Li B, Zhang B, Zhen C, Zhou J, Tang S. Mouse embryonic palatal mesenchymal cells maintain stemness through the PTEN-Akt-mTOR autophagic pathway. *Stem Cell Res Ther* 2019; 10(1): 217.
- Garzon I, Chato-Astrain J, Campos F, Fernandez-Valades R, Sanchez-Montesinos I, Campos A, et al. Expanded differentiation capability of human Wharton's jelly stem cells toward pluripotency: A systematic review. *Tissue Eng Part B Rev* 2020; 26(4): 301-12.
- Kim Y, Lee D, Song D, Kim HM, Kim SY. Biocompatibility and bioactivity of set direct pulp capping materials on human dental pulp stem cells. *Materials (Basel)* 2020; 13(18): 3925.
- Gutgesell RM, Jamshed L, Frank RA, Hewitt LM, Thomas PJ, Holloway AC. Naphthenic acid fraction components from oil sands process-affected water from the Athabasca Oil Sands Region impair murine osteoblast differentiation and function. *J Appl Toxicol* 2022; 42(12): 2005-15.
- Lin SY, Kang L, Wang CZ, Huang HH, Cheng TL, Huang HT, et al. Epigallocatechin-3-gallate (EGCG) enhances osteogenic differentiation of human bone



- marrow mesenchymal stem cells. *Molecules* 2018; 23(12): 3221.
25. Westhauser F, Karadjian M, Essers C, Senger AS, Hagmann S, Schmidmaier G, et al. Osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells is enhanced in a 45S5-supplemented  $\beta$ -TCP composite scaffold: an in-vitro comparison of Vitoss and Vitoss BA. *PLoS One* 2019; 14(2): e0212799.
  26. Glemžaitė M, Navakauskienė R. Osteogenic differentiation of human amniotic fluid mesenchymal stem cells is determined by epigenetic changes. *Stem Cells Int* 2016; 2016: 6465307.
  27. Berbéri A, Al-Nemer F, Hamade E, Noujeim Z, Badran B, Zibara K. Mesenchymal stem cells with osteogenic potential in human maxillary sinus membrane: an in vitro study. *Clin Oral Investig* 2017; 21(5): 1599-609.
  28. Ma C, Guo Y, Liu H, Wang K, Yang J, Li X, et al. Isolation and biological characterization of a novel type of pulmonary mesenchymal stem cells derived from Wuzhishan miniature pig embryo. *Cell Biol Int* 2016; 40(10): 1041-9.
  29. Feng S, Reuss L, Wang Y. Potential of natural products in the inhibition of adipogenesis through regulation of PPAR $\gamma$  expression and/or its transcriptional activity. *Molecules* 2016; 21(10): 1278.
  30. Huang B, Qian C, Ding C, Meng Q, Zou Q, Li H. Fetal liver mesenchymal stem cells restore ovarian function in premature ovarian insufficiency by targeting MT1. *Stem Cell Res Ther* 2019; 10(1): 362

## Isolation, Characterization and Differentiation of Rat Fetal Mesenchymal Stem Cells into Osteogenic and Adipogenic Cells

Abbas Sadeghi<sup>1</sup>, Kaveh Khazaeel<sup>2</sup>, Mohammad Reza Tabandeh<sup>3</sup>,  
Masoumeh Ezzati Givi<sup>4</sup>, Fereshteh Nejaddehbashi<sup>5</sup>

### Original Article

#### Abstract

**Background:** The fetus is the source of many stem cells that have great potential in repairing and regenerating various tissues and can differentiate into various cell types including osteoblast and adipocyte. However, less attention has been paid to the isolation and differentiation ability of these cells in the culture medium. Therefore, the present study aimed to determine the isolation method, proliferation, and differentiation of fetal mesenchymal stem cells (fMSCs) obtained from rat fetuses.

**Methods:** In this experimental study, fMSCs were isolated from 15-day-old rat fetuses using trypsin enzymatic digestion and were cultured up to the third passage. Then, the fMSCs were characterized by flow cytometry and differentiated into osteoblast and adipocyte cells. The proliferation of cells and the expression of osteogenesis- and adipogenesis-related genes were evaluated in differentiated cells.

**Findings:** Cell surface markers of fMSCs at passage 3 were positive for CD105 and CD90 and negative for CD45 and CD34. These cells exhibited a fibroblast-like morphology. These cells had calcium deposition in osteogenic differentiation and accumulation of fat droplets in adipogenic differentiation. The osteogenesis-related genes including osteonectin, ALP, BMP-6, and Runx-2, and adipogenesis-related genes such as PPAR $\gamma$  and CREBBP were expressed in osteogenic and adipogenic differentiation cultures, respectively.

**Conclusion:** According to the findings of the present study, it seems that mesenchymal stem cells isolated from rat fetuses have the potential to proliferate and differentiate into osteoblast or adipogenic lineages.

**Keywords:** Mesenchymal stem cells; Adipocytes; Osteoblasts; Fetus

**Citation:** Sadeghi A, Khazaeel K, Tabandeh MR, Ezzati Givi M, Nejaddehbashi F. **Isolation, Characterization and Differentiation of Rat Fetal Mesenchymal Stem Cells into Osteogenic and Adipogenic Cells.** J Isfahan Med Sch 2023; 41(713): 196-205.

1- PhD Candidate, Department of Basic Sciences, Division of Anatomy and Embryology, School of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran

2- Assistant Professor, Department of Basic Sciences, Division of Anatomy and Embryology, School of Veterinary Medicine AND Stem Cells and Transgenic Technology Research Center (STTRC), Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran

3- Associate Professor, Department of Basic Sciences, Division of Biochemistry and Molecular Biology, School of Veterinary Medicine AND Stem Cells and Transgenic Technology Research Center (STTRC), Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran

4- Assistant Professor, Department of Basic Sciences, Division of Pharmacology and Toxicology, School of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran

5- Assistant Professor, Cellular and Molecular Research Center, Medical Basic Sciences Institute, Ahvaz Jundishapur University of Medical Sciences, Ahvaz, Iran

**Corresponding Author:** Kaveh Khazaeel, Assistant Professor, Department of Basic Sciences, Division of Anatomy and Embryology, School of Veterinary Medicine AND Stem Cells and Transgenic Technology Research Center (STTRC), Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran; Email: k.khazaeel@scu.ac.ir