

## Original Paper

# Assessment of neurotrophic factors expression and cell proliferation in the coculture of neural and mesenchymal stem cells

Falsafinia Gh (MSc)<sup>1</sup>, Ghorbanian MT (PhD)<sup>\*2</sup>  
Lashkarbolouki T (PhD)<sup>2</sup>, Elahdadi Salmani M (PhD)<sup>2</sup>

<sup>1</sup>MSc in Developmental Cell Biology, Department of Cellular and Molecular Biology, School of Biology, Damghan University, Damghan, Iran. <sup>2</sup>Assistant Professor, Department of Cellular and Molecular Biology, School of Biology and Institute of Biological Sciences, Damghan University, Damghan, Iran.

---

### Abstract

**Background and Objective:** Neurotrophic factors are diffusible polypeptides that have critical roles in survival, proliferation and differentiation of stem cells. This study was done to assess the role of neurotrophic factors (CNTF, BDNF, GDNF, NT-3) expression and proliferation rate of neural stem cells (NSCs) in coculture with mesenchymal stem cells (MSCs).

**Materials and Methods:** In this experimental study, NSCs and MSCs were isolated from adult Wistar rat. Initially, NSCs was harvested from temporal lobe after mechanical digestion by a sterile flamed Pasteur pipette and enzymatic digestion with trypsin and Dnase. The cell suspension was cultivated in a flask with DMEM/F12 medium supplemented with 10% FBS 100U/ml Penicillin and 100 mg/ml Streptomycin. To obtain MSCs, bone marrow of femur and tibia bones were flushed out and cultured. MSCs and NSCs cocultured by transwell system in DMEM/F12 medium supplemented with 10% FBS 100U/ml Penicillin and 100 mg/ml Streptomycin. Haemocytometer, immunocytochemistry and RT-PCR methods were performed to identify and evaluate cell proliferation, purity levels and neurotrophic factors expression.

**Results:** There is no differences in NTFs profile of neurotrophic factors expression between coculture group and control NSCs, but interactions between MSCs and NSCs significantly promoted NSCs proliferation ( $P < 0.05$ ).

**Conclusion:** This study showed that coculture of NSCs with MSCs might be preferred in cell-therapy than NSCs.

**Keywords:** Stem cell, Neural cell, Mesenchymal cell, Coculture, CNTF, BDNF, GDNF, NT-3

---

**\* Corresponding Author: Ghorbanian MT (PhD), E-mail: ghorbanian@du.ac.ir**

Received 19 April 2011

Revised 6 June 2011

Accepted 6 June 2011

## تحقیقی

### ارزیابی بیان عوامل رشد عصبی و تکثیر سلولی

#### در هم‌کشتی سلول‌های بنیادی مزانشیمی با سلول‌های بنیادی عصبی

قدرت اله فلسفی نیا<sup>۱</sup>، دکتر محمدتقی قربانیان<sup>۲\*</sup>، دکتر تقی لشکر بلوکی<sup>۲</sup>، دکتر محمود اله دادی سلمانی<sup>۲</sup>

۱- کارشناسی ارشد زیست‌شناسی سلولی تکوینی، گروه سلولی و مولکولی، دانشکده زیست‌شناسی، دانشگاه دامغان.

۲- استادیار، گروه سلولی و مولکولی، دانشکده زیست‌شناسی و پژوهشکده علوم زیستی، دانشگاه دامغان.

## چکیده

**زمینه و هدف:** هم‌کشتی سلول‌های بنیادی یکی از روش‌های مورد استفاده محققین علم سلول‌درمانی است. با این روش می‌توان باعث بهبود شرایط کشت و تمایز بهتر سلول‌های بنیادی شد. عوامل رشد عصبی، مولکول‌هایی هستند که نقش‌های بسیار حیاتی در بقا، تکثیر و تمایز سلول‌های بنیادی دارند. این مطالعه به منظور ارزیابی بیان عوامل نوروتروفیک یا رشد عصبی و سرعت تکثیر سلول‌های بنیادی عصبی (Neural Stem Cells: NSCs) در هم‌کشتی این سلول‌ها با سلول‌های بنیادی مزانشیمی (Mesenchymal Stem Cells: MSCs) انجام شد. **روش بررسی:** این مطالعه تجربی روی ۴۰ سر موش صحرایی بالغ نژاد ویستار در دانشکده زیست‌شناسی دانشگاه دامغان انجام شد. سلول‌های NSC و MSC از موش‌های صحرایی استخراج شدند. برای جداسازی NSCs، ناحیه شکنج دندان‌های هیپوکامپ برداشته شد. پس از هضم مکانیکی و آنزیمی، توده سلولی در محیط DMEM/F12 حاوی FBS کشت داده شد. برای جداسازی MSCs مغز استخوان، استخوان‌های فمور و تیبیا تخلیه و در محیط فوق‌الذکر کشت داده شد. هم‌کشتی NSCs با MSCs در ظرف ترانس‌ول و در محیط DMEM/F12 حاوی FBS انجام شد. تعیین هویت سلولی، سرعت تکثیر و نیز بیان عوامل نوروتروفیک (CNTF, BDNF, GDNF, NT-3) به ترتیب با روش‌های ایمنوسیتوشیمی، هموسایتمتر و RT-PCR انجام گردید.

**یافته‌ها:** مقایسه نیمه کمی بیان عوامل نوروتروفیک بین گروه‌های NSC هم‌کشتی و NSCs که به تنهایی (کنترل) کشت شده بود؛ تفاوتی نشان نداد؛ ولی نتایج نشان داد که الگوی بیان NTFs (neurotrophins) در NSCs و MSCs مشابه یکدیگر هستند. تکثیر NSCs در شرایط هم‌کشتی به‌طور معنی‌داری افزایش یافت ( $P < 0/05$ ).

**نتیجه‌گیری:** برای مقاصد سلول‌درمانی، NSCs هم‌کشت شده با BMSC مناسب‌تر بوده و قابلیت بیان عوامل رشد عصبی توسط سلول بنیادی بالغ، آنها را به عنوان گزینه مناسب برای درمان بیماری‌های عصبی مطرح می‌نماید.

**کلید واژه‌ها:** سلول‌های بنیادی مزانشیمی، سلول‌های بنیادی عصبی، هم‌کشتی، عوامل رشد عصبی

\* نویسنده مسؤول: دکتر محمدتقی قربانیان، پست الکترونیکی ghorbanian@du.ac.ir

نشانی: دامغان، دانشگاه دامغان، دانشکده زیست‌شناسی و پژوهشکده علوم زیستی، کد پستی ۳۶۷۱۶۴۱۱۶۷، تلفن ۰۲۳۲-۵۲۴۷۱۴۶، نامبر ۵۲۴۷۱۴۶

وصول مقاله: ۹۰/۱۳/۳۰، اصلاح نهایی: ۹۰/۳/۱۶، پذیرش مقاله: ۹۰/۳/۱۶

## مقدمه

Subventricular zone (SVZ) و Subgranular zone (SGZ) مغز و نخاع بزرگسال وجود دارد (۵و۴). سلول‌های بنیادی مزانشیمی (Mesenchymal Stem Cells: MSCs) سلول‌هایی چسبنده، کلون‌شونده و غیر فاگوسیتوزی هستند و رفتاری شبیه به فیبروبلاست دارند (۷و۶). جداسازی و کشت این سلول‌ها آسان بوده (۸)؛ قابلیت تمایزی بالایی داشته و می‌توانند به سلول‌های با منشأ مزودرمی و غیر مزودرمی تبدیل گردند (۷). همچنین می‌توانند از سدخونی مغزی عبور کرده و به طور انتخابی به ناحیه آسیب دیده مهاجرت کنند (۹-۱۱). همچنین عواملی تولید کرده که بر سلول‌های مجاور

استفاده از ظرفیت طبیعی بدن برای بازسازی و ترمیم یکی از اصول مهمی است که دانش سلول‌های بنیادی برای درمان بیماری‌ها دنبال می‌نماید (۱).

سلول‌های بنیادی عصبی (Neural Stem Cells: NSCs) در دهه ۱۹۹۰ شناخته شدند. این سلول‌ها دارای ظرفیت خودتکثیری و تمایز به نورون، آستروسیت و الیگودندروسیت هستند (۳-۱). سلول‌های بنیادی عصبی که در نوروتزیس دخالت دارند؛ در نواحی مختلف دستگاه عصبی مرکزی مانند

اثر می‌گذارند (۱۲). لذا گزینه‌ای مناسب برای درمان بیماری‌های عصبی به روش سلول درمانی هستند. این سلول‌ها را می‌توان برای تحریک نوروزن نیز به کار برد؛ زیرا موجب افزایش نوروزن می‌شوند (۱۳).

تحقیقات زیادی روی هم‌کشتی انجام شده و مشاهده شده که MSCs موجب ازدیاد تکثیر و بقای NSCs و تمایز آنها به نورون، آستروسیت و الیگودندروسیت می‌گردند (۱۵ و ۱۴ و ۱۵). به منظور بهبود شرایط محیط کشت برای تمایز بهتر سلول‌های بنیادی، از هم‌کشتی انواع سلول‌ها مثل آستروسیت‌ها، سلول‌های گرانولی مخچه و MSC ها با سلول‌های بنیادی استفاده می‌شود (۱۶ و ۱۷). تمایز سلولی که حاصل هم‌کشتی است؛ بادوام‌تر و بهتر از تمایز حاصل از کاربرد مواد شیمیایی می‌باشد (۱۶). تمایز MSC ها به سلول‌های عصبی به کمک مواد شیمیایی واقعی نیست؛ بلکه با القای MSC ها، اکترین اسکلت سلولی تخریب شده و سلول چروکیده می‌گردد. در نتیجه سلول‌ها دارای مورفولوژی عصبی شده و به نشانگرهای عصبی پاسخ مثبت می‌دهند (۱۸)؛ ولی دقیقاً معلوم نیست که چرا طی هم‌کشتی، تمایز سلول‌های بنیادی بهتر می‌گردد. با توجه به این که در *in vitro* از انواع NTFها (neurotrophins) برای بقا، تکثیر و تمایز سلول‌های بنیادی استفاده می‌کنند (۱۶ و ۱۹ و ۲۰)؛ عوامل نوروتروفیک در افزایش تمایز و بقای نورونی نقش دارند و طی تکوین، تکثیر و تمایز سلول‌های بنیادی یا پیش‌ساز را در دستگاه عصبی مرکزی تنظیم می‌کنند (۲۱-۲۳).

به نظر می‌رسد که MSCها با تولید عوامل نوروتروفیک یا رشد عصبی، سبب بهبود شرایط کشت طی هم‌کشتی می‌گردند و لازم است که نقش این عوامل بررسی گردد. این مطالعه به منظور مقایسه تکثیر NSCs و بیان عوامل نوروتروفیک در شرایط کشت جداگانه و هم‌کشتی با سلول‌های MSCs انجام شد.

## روش بررسی

### جداسازی و کشت سلولی

این مطالعه تجربی روی ۴۰ سر موش صحرایی بالغ نژاد ویستار با وزن تقریبی ۲۵۰-۲۰۰ گرم خریداری شده از انستیتوی رازی کرج در دانشکده زیست‌شناسی دانشگاه دامغان انجام شد.

اصول اخلاقی کار بر روی حیوانات براساس دستور کار کمیته اخلاقی دانشکده زیست‌شناسی دانشگاه دامغان رعایت شد.

سلول‌های بنیادی مزانشیمی از استخوان‌های فمور و تیبیای موش‌ها استخراج شد. سلول‌ها در محیط DMEM.F12 (USA, Gibco) غنی شده با FBS (Gibco) ۱۰ درصد و پنی‌سیلین-استرپتومایسین (Gibco) یک‌درصد در فلاسک (۲۵ سانتی‌متر مربع، Falcon) کشت داده شدند و در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و با دی‌اکسید کربن ۵ درصد و شرایط

مرطوب نگهداری شدند. پس از ۴۸ ساعت با تعویض محیط، سلول‌های شناور جدا گردیدند. پس از رسیدن سلول‌ها به تراکم ۸۰-۷۰ درصد به کمک تریپسین (USA, Sigma) ۰/۲۵ درصد به همراه EDTA ۰/۰۲ درصد (Sigma) سلول‌ها از کف فلاسک جدا و به نسبت ۱:۲ پاساژ داده شدند. هر ۳-۴ روز یک‌بار تعویض محیط انجام شد. در این مطالعه از سلول‌های پاساژ سوم استفاده شد.

سلول‌های بنیادی عصبی از بافت شکنج دندانه‌ای هیپوکامپ موش‌ها جدا گردید. برای برداشت SGZ دو نیمکره مغز از هم جدا شدند و هضم مکانیکی به وسیله پیست پاستور استریلی که نوک آن با شعله نازک شده بود؛ انجام شد. سپس برای هضم آنزیمی در معرض DNase ۰/۰۴ درصد (Sigma) و تریپسین ۰/۱ درصد قرار گرفت. توده سلولی با محیط DMEM/F12 غنی شده با FBS ۱۰ درصد و پنی‌سیلین-استرپتومایسین یک درصد به فلاسک کشت منتقل گردید و در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و دی‌اکسید کربن ۵ درصد و شرایط مرطوب قرار داده شد. محیط سلول‌ها پس از ۷۲ ساعت تعویض شد. در این حالت سلول‌های بنیادی عصبی به کف فلاسک چسبیده بودند. پس از رسیدن سلول‌ها به تراکم ۸۰-۷۰ درصد با استفاده از تریپسین ۰/۲۵ درصد به همراه EDTA ۰/۰۲ درصد از کف فلاسک جدا و با نسبت ۱:۲ پاساژ داده شدند. هر ۳-۴ روز یک‌بار تعویض محیط انجام شد. در این مطالعه از سلول‌های پاساژ سوم استفاده گردید.

سلول‌ها به سه گروه کنترل MSCs (کشت MSCs به تنهایی)، گروه کنترل NSCs (کشت NSCs به تنهایی) و گروه هم‌کشتی NSCs (کشت MSCs با NSCs) تقسیم شدند. برای هر گروه حداقل سه بار تکرار صورت گرفت.

### ایمنوسیتوشیمی

به منظور تعیین هویت NSCs، پس از کشت سلول‌ها بر روی لامل آغشته به ژلاتین با تراکم ۵×۱۰<sup>۴</sup> سانتی‌متر مربع به روش ایمنوسیتوشیمی، از آنتی‌بادی آنتی nestin (۱:۲۵۰) (Sigma, N5413) و آنتی GFAP (۱:۱۰۰۰) (Sigma, G6171) استفاده شد. برای تعیین هویت MSCs، نمونه‌ها با آنتی‌بادی آنتی CD71 (۱:۲۰) (Sigma, C2063) انکوبه شدند. پس از شستشوی سلول‌ها با PBS به مدت ۲۰ دقیقه در پارافرمالدهید ۴ درصد (Merck) ثبوت انجام شد. سپس به مدت ۱۵ دقیقه در معرض Triton ۱۰۰-X/۰۳ درصد و مدت ۱۵ دقیقه در سرم ۱۰ درصد بز قرار داده شدند. پس از آن نمونه‌ها به مدت یک شب در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد و شرایط مرطوب در معرض آنتی‌بادی اولیه انکوبه شدند. در ادامه نمونه‌ها به مدت یک ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و شرایط مرطوب به ترتیب با آنتی‌بادی ثانویه ضد موش (۱:۱۰۰) و ضد خرگوش (۱:۱۲۰) کوئزوگه به FITC

شرایط فوق‌الذکر ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت پس از هم‌کشتی به روش هموسایتومتر شمارش شدند.

#### ارزیابی RT-PCR

RNA کل سلولی با استفاده از RNX- Plus به روش کیت سیناژن استخراج شد. برای اطمینان از کمیت و کیفیت RNA اسپکتروفوتومتری و الکتروفورز ژل آگارز انجام شد. سپس از ۰/۵ میکروگرم RNA براساس دستور کار کیت (Fermentas-K1622) با استفاده از پرایمر Oligo dT، cDNA تهیه شد. در ادامه با استفاده از ۵ میکرولیتر cDNA ساخته شده به همراه بافر، ۵۰MgCl<sub>2</sub> میلی‌مولار، ۱۰dNTP میلی‌مولار، پرایمر بالا و پایین دست ۱۰ پیکومولار، آنزیم Taq polymerase ۰/۲۵ میکرولیتر و آب تزریقی تا حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر، طبق برنامه در ۳۴ سیکل توسط دستگاه ترمال سایکلر، تکثیر DNA انجام شد. پرایمرهای مورد استفاده، اندازه محصول و شماره دست‌یابی آنها در Genbank در جدول یک آمده است. ژن  $\beta 2M$  به عنوان ژن کنترل داخلی استفاده شد. برنامه PCR عبارت از دناتوراسیون اولیه ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲ دقیقه بود و هر سیکل شامل دناتوراسیون ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، انیلینگ ۵۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، اکستنشن ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه بود و پس از اتمام ۳۴ سیکل، آخرین مرحله اکستنشن نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه انجام شد. پس از اتمام واکنش ۸ میکرولیتر از محصولات واکنش PCR بر روی ژل آگارز ۱/۵ درصد و با حضور اتیدیوم بروماید الکتروفورز شد و با دستگاه نمایشگر ژل داک (UVIDOC, UK) مورد مشاهده و بررسی قرار گرفت. برای هر نمونه سه بار تکرار صورت گرفت و در مرحله تهیه cDNA با حذف نمونه RNA و آنزیم Reverse Transcriptase و در مرحله RT-PCR با حذف آنزیم Taq polymerase و محصول cDNA تمامی مراحل کنترل شد. بیان ژن‌ها در سیکل‌های مختلف بررسی شد. در سیکل پایین‌تر از ۲۰ بانندی مشاهده نشد و ژن BDNF (Brain derived neurotrophic factor) از سیکل ۲۵ و سایر ژن‌ها در سیکل ۲۸ بیان شدند.

میزان بیان نسبی هر یک از ژن‌های توسط نرم‌افزار UVIDOC

(Chemicon, AP132F) در تاریکی انکوبه شدند.

برای رنگ‌آمیزی هسته سلول‌ها از اتیدیوم بروماید (۵ $\mu$ g/ml) یا DAPI (۰/۲۵ $\mu$ g/ $\mu$ l) (Sigma) استفاده شد. بعد از شستشو، سلول‌ها با میکروسکوپ فلورسنت (E600-Eclipse Nikon) و دوربین دیجیتال (DXM 120 Nikon Digital Camera) مطالعه و عکسبرداری شدند.

برای آزمودن درستی روش کار با حذف آنتی‌بادی اولیه، واکنش مثبت کاذب کنترل گردید. برای هر یک از آنتی‌بادی‌ها در هر گروه سه بار تکرار انجام شد.

#### تایید هویت سلول‌های بنیادی مزانشیمی به روش ردیابی آنزیمی آلکالین فسفاتاز

ابتدا سلول‌ها به پتری دیش حاوی لامل آغشته شده به ژل‌انین منتقل شدند و پس از رسیدن به تراکم مناسب (۷۰-۸۰ درصد)، ردیابی آنزیمی آلکالین فسفاتاز طبق دستور کیت (SCR004, Millipore) صورت گرفت. تثبیت سلول‌ها با پارافمالدهید ۴ درصد (فیکساتیو) به مدت ۱-۲ دقیقه انجام شد. سپس برداشت فیکساتیو و شستشو انجام گردید. در ادامه محلول رنگی به سلول‌ها اضافه و پتری دیش در تاریکی به مدت ۱۵ دقیقه انکوبه شد. بعد از برداشتن مایع رنگی و شستشو، سلول‌ها با میکروسکوپ معمولی مشاهده شدند.

#### هم‌کشتی سلول‌های بنیادی مزانشیمی با سلول‌های بنیادی عصبی - برای هم‌کشتی از ظرف Transwell

(cat. 657641, TM ThinCert) استفاده شد (۲۴). ابتدا  $10^4 \times 7/4$  سلول NSCs در هر چاهک از ترانس‌ول به مدت ۲ روز کشت داده شدند. پس از تعویض محیط،  $5 \times 10^4$  سلول MSCs به هر اینسرت ترانس‌ول انتقال یافتند. برای هم‌کشتی از محیط DMEM.F12 غنی شده با FBS ۱۰ درصد و پنی‌سیلین-استرپتومایسین یک درصد استفاده شد. ۳-۴ روز بعد از هم‌کشتی، تعویض محیط صورت گرفت. از کشت NSCs به تنهایی، به عنوان گروه کنترل استفاده شد. پس از ۷ روز سلول‌ها برای بررسی‌های مولکولی برداشت شدند. این آزمایش سه بار تکرار گردید.

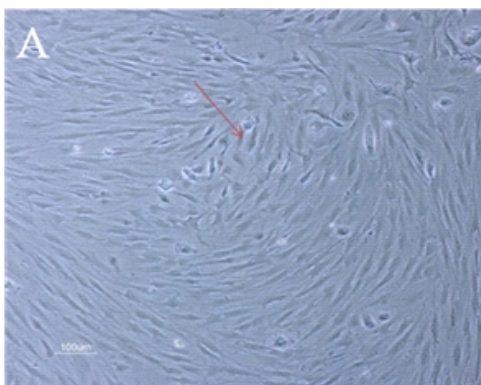
برای بررسی سرعت تکثیر سلول‌های NSC کشت شده در

جدول ۱: توالی پرایمرهای مورد استفاده، اندازه و شماره دست‌یابی آنها در Genbank با دمای انیلینگ ۵۵ درجه سانتی‌گراد

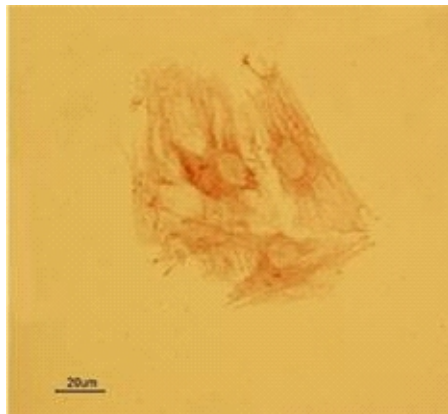
نام ژن	کد بانک ژن	اندازه (bp)	توالی پرایمر
BDNF	D 10938	۴۰۵	F: 5'-GCC CAA CGA AGA AAA CCA TA-3' R: 5'-GAT TGG GTA GTT CCG CAT TG-3'
CNTF	NM-013166	۷۰	F: 5'-CTG GCT AGC AAG GAA GAT TCG-3' R: 5'-CAG GCC CTG ATG TTT TAC ATA AGA-3'
GDNF	NM-019139	۲۵۴	F: 5'-GAC TCC AAT ATG CCC GAA GA-3' R: 5'-TAG CCC AAA CCC AAG TCA GT-3'
NT3	NM-031073	۱۸۱	F: 5'-AGG TCA GAA TTC CAG CCG AT-3' R: 5'-GTT-TCC-TCC-GTG-GTG-ATG-TT-3'
$\beta 2M$	NM-012512	۳۱۸	F: 5'-CCG TGA TCT TTC TGG TGC TT-3' R: 5'-TTT TGG GCT TCA GAG TG-3'

نشانگرها را به میزان  $95 \pm 2$  درصد بیان می‌کنند. به منظور تعیین هویت MSCs نیز ایمنوسیتوشیمی برای نشانگر CD71 انجام و مشاهده شد که  $90 \pm 2/4$  درصد از این سلول‌ها این نشانگر را بیان می‌کنند (شکل‌های ۴ و ۵ و ۶).

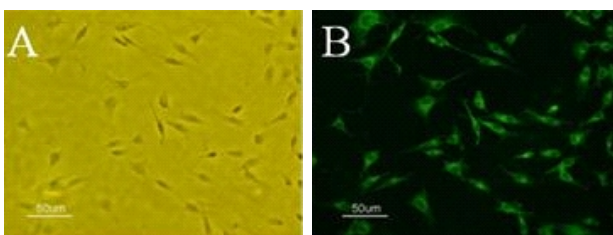
هم‌کشتی سلول‌های بنیادی مزانشیمی با سلول‌های بنیادی عصبی مورفولوژی NSC در گروه‌های کنترل حالت دوکی شکل و کشیده و در گروه هم‌کشتی علاوه بر سلول‌های دوکی شکل، سلول‌های نوروئمانند هم دیده شد که در روزهای اول جسم سلولی کوچکی داشتند؛ ولی در روزهای انتهایی این جسم سلولی درشت‌تر شده بود (شکل ۷).



شکل ۲: تصویر فاز کنتراست NSCs کشت داده شده در محیط DMEM/F12 حاوی سرم ۱۰ درصد



شکل ۳: کشت MSC پس از جداسازی از مغز استخوان در محیط DMEM/F12 حاوی سرم ۱۰ درصد با رنگ‌آمیزی به روش الکلین فسفاتاز



شکل ۴: تایید هویت سلول‌های بنیادی مزانشیمی با نشانگر CD71  
A: تصویر فاز کنتراست MSCs، B: تصویر فلورسانس

اندازه‌گیری شد. به منظور تعیین میزان نسبی بیان ژن‌ها، شدت باند هر یک از ژن‌ها نسبت به شدت باند ژن  $\beta 2M$  (به عنوان ژن کنترل داخلی) محاسبه گردید. در این مرحله نیز برای هر گروه حداقل سه بار تکرار صورت گرفت.

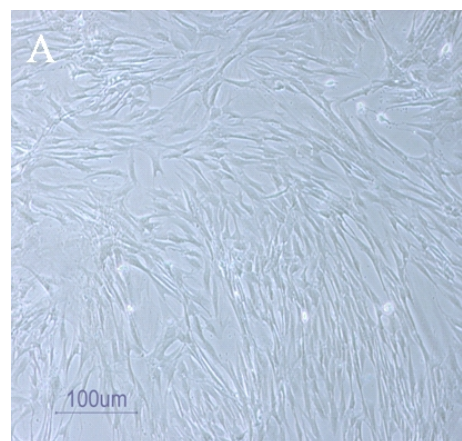
تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS-18 انجام شد. محاسبات آماری برای بررسی اختلاف بین گروه‌ها با استفاده از آزمون واریانس یک طرفه و به دنبال آن آزمون تکمیلی Tukey انجام شد. مرز استنتاج آماری نتایج کمتر و مساوی ۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

#### یافته‌ها

نتایج بخش کشت سلولی نشان داد که سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان، به سادگی به ظرف کشت چسبیده و تکثیر شدند. این سلول‌ها در شرایط کشت به سه شکل دیده شدند. تعدادی از سلول‌های در حال تکثیر ظاهری گرد، کروی و کوچک داشتند و برخی به شکل دوکی و شبه‌فیبروبلاستی و مابقی، سلول‌های با مورفولوژی پهن، چسبنده‌تر و بزرگ‌تر، در محیط کشت دیده شدند (شکل یک).

سلول‌های بنیادی عصبی به کف فلاسک کشت چسبیده و با سرعتی کمتر از MSCs تکثیر شدند. این سلول‌ها در شرایط مناسب حدود ۹ روز به پاساژ رسیدند. بیشتر آنها به صورت دوکی شکل، کشیده و تعداد کمی نیز مورفولوژی شبه‌گلیالی و عصبی داشتند (شکل ۲).

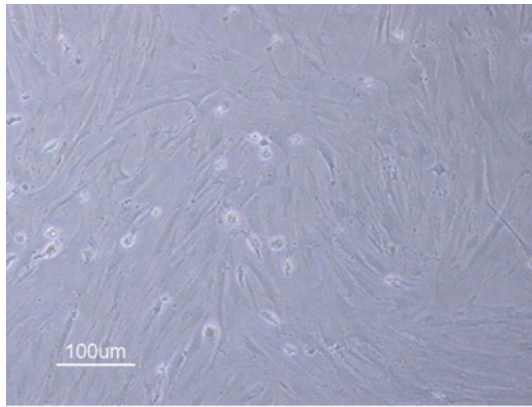
سلول‌های بنیادی مزانشیمی به روش ردیابی آنزیم الکلین فسفاتاز تعیین هویت شدند و  $30 \pm 1/8$  درصد از سلول‌ها با رنگ‌آمیزی الکلین فسفاتاز واکنش دادند (شکل ۳).



شکل ۱: تصویر فاز کنتراست MSCs کشت داده شده در محیط DMEM/F12 حاوی سرم ۱۰ درصد

#### ایمنوسیتوشیمی

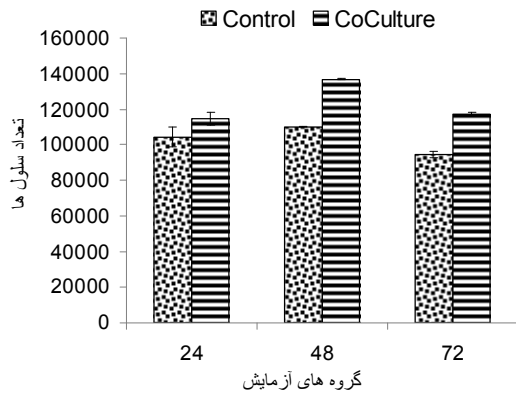
برای نشانگرهای nestin و GFAP به منظور تایید هویت NSCs به روش ایمنوسیتوشیمی انجام شد. نتایج نشان داد که NSCs این



شکل ۷: تصویر فاز کنتراست NSCs هم کشت شده با BMSCs در محیط DMEM/F12 حاوی سرم ۱۰ درصد به مدت ۷ روز

### اثر تکثیری سلول‌های بنیادی مزانشیمی بر سلول‌های بنیادی عصبی

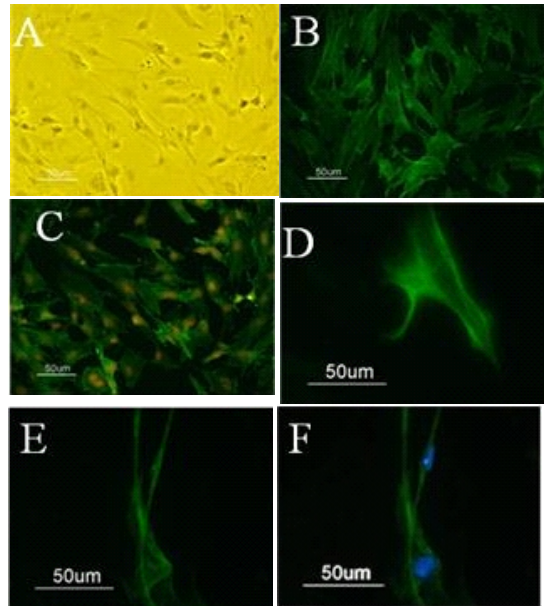
هم کشتی سلول‌های بنیادی مزانشیمی با سلول‌های بنیادی عصبی در سه گروه ۲۴ ساعت، ۴۸ ساعت و ۷۲ ساعت انجام شد و مشاهده گردید که  $98 \pm 1/5$  درصد سلول‌ها زنده‌اند. نتایج شمارش سلولی نشان داد که در همه گروه‌ها تعداد سلول‌ها در گروه هم کشتی بیشتر از گروه کنترل می‌باشد (نمودار یک). در زمان ۴۸ ساعت و ۷۲ ساعت، تعداد NSC در گروه هم کشتی نسبت به گروه کنترل افزایش آماری معنی‌داری نشان داد (نمودار یک) ( $P < 0/05$ ).



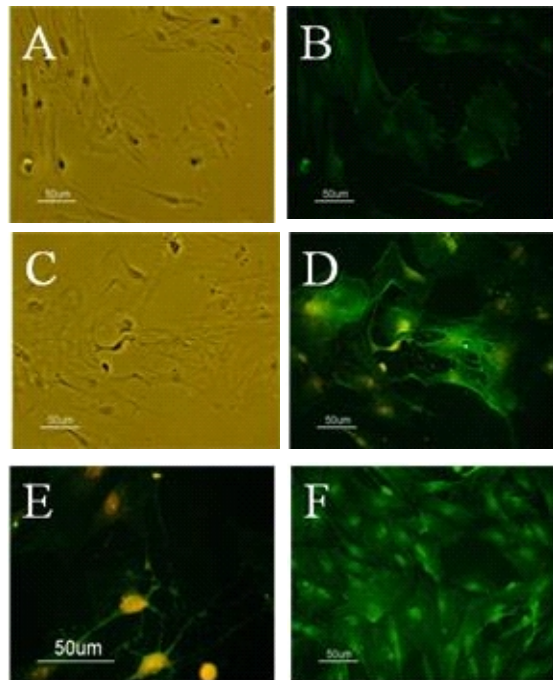
نمودار ۱: اثر تکثیری سلول‌های بنیادی مزانشیمی بر سلول‌های بنیادی عصبی در شرایط هم کشتی با اختلاف معنی‌دار در زمان ۴۸ و ۷۲ ساعت ( $P < 0/05$ )

### RT-PCR

نتایج این بخش نشان داد که ژن‌های CNTF (Ciliary Neurotrophic Factor)، NT3 (Neurotrophin-3)، و GDNF (glial cell line-derived neurotrophic factor) در گروه‌های کنترل MSCs و NSCs که به تنهایی کشت شدند و گروه NSCs هم کشتی، بیان شدند (شکل ۸). بیان نسبی (نیمه کمی) ژن‌های NTF در گروه NSC هم کشتی نسبت به گروه NSCs تفاوت آماری معنی‌داری نشان نداد (نمودار ۲). مقایسه بیان عوامل نوروتروفیک در سیکل‌های ۲۵، ۲۸، ۳۰ و

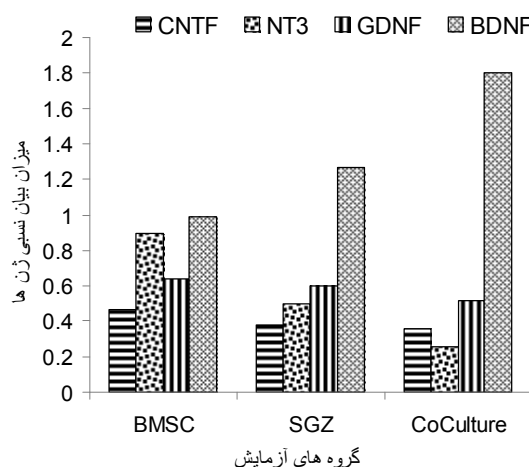


شکل ۵: تایید هویت سلول‌های بنیادی عصبی به روش ایمنوسیتوشیمی برای نشانگر GFAP  
A: تصویر فاز کنتراست NSCs  
B, D, E: تصویر فلورسانس  
C: رنگ آمیزی هسته‌های NSCs با اتیدیوم بروماید  
F: رنگ آمیزی هسته با DAPI



شکل ۶: تایید هویت سلول‌های بنیادی عصبی به روش ایمنوسیتوشیمی NSC برای نشانگر nestin  
A: تصویر فاز کنتراست NSCs ، B, F: تصویر فلورسانس  
C, D, E: رنگ آمیزی هسته‌های NSCs با اتیدیوم بروماید  
G: مرج FITC با DAPI

۳۴ نشان داد که ژن BDNF در همه گروه‌ها نسبت به سایر ژن‌ها در سیکل پایین‌تری بیان شد.



نمودار ۲: مقایسه الگوی بیان نسبی NTF ها در سه گروه BMSC، NSC و هم‌کشتی ۷ روز پس از کشت به روش RT-PCR ژن  $\beta 2M$  به عنوان ژن کنترل (خانگی) ( $P < 0.05$ )

## بحث

نتایج مطالعه حاضر نشان داد که الگوی بیان NTFs در NSCs و MSCs مشابه یکدیگر هستند. همچنین تکثیر NSCs در شرایط هم‌کشتی به طور معنی‌داری افزایش یافت.

سلول‌های NSC را می‌توان به دو روش چسبنده و نورواسفر کشت داد. در این مطالعه از کشت چسبنده استفاده شد. در پژوهش حاضر، روش استخراج و شرایط کشت استفاده شده برای NSCs در مقایسه با مطالعات قبلی جدید می‌باشد.

تحقیقات زیادی برای بررسی برهم‌کنش MSCs با NSCs یا دیگر سلول‌های عصبی انجام شده است. در این تحقیقات اثرات سلول‌های بنیادی مزانشیمی بر بقاء، تکثیر و تمایز سلول‌های بنیادی عصبی و نیز اثرات سلول‌های بنیادی عصبی بر سلول‌های بنیادی مزانشیمی مورد ارزیابی قرار گرفته است (۳ و ۸ و ۱۴ و ۱۵ و ۱۸ و ۲۸-۲۵). تاکنون نقش NTFs در هم‌کشتی MSCs با NSCs بررسی نشده است. تنها Rivera و همکارانش اثر CNTF را بررسی کرده‌اند (۱۵ و ۲۵).

برای بهبود شرایط محیط کشت و تمایز بهتر سلول‌های بنیادی، از هم‌کشتی انواع سلول‌ها مثل MSCs با سلول‌های بنیادی استفاده شده است. تمایز سلولی که حاصل هم‌کشتی است؛ بادوام‌تر و بهتر از تمایز حاصل از کاربرد مواد شیمیایی می‌باشد (۱۶). تمایز MSCs به سلول‌های عصبی به کمک مواد شیمیایی واقعی نیست (۱۸). علت تمایز بهتر سلول‌های بنیادی طی هم‌کشتی دقیقاً معلوم نیست. با توجه به اینکه در *in vitro* از انواع NTFs برای بقاء، تمایز و تکثیر سلول‌های بنیادی استفاده می‌شود (۱۶ و ۱۹ و ۲۰)؛ به نظر می‌رسد که MSCs با تولید عوامل نوروتروفیک سبب بهبود شرایط کشت در

هم‌کشتی می‌گردد و لازم است که نقش این عوامل بررسی گردد. MSC با منشأ مزودرمی در مغز استخوان برای سلول‌های بنیادی خونساز نقش تروفیک و حمایت‌کننده دارند و قادرند انواع عوامل تروفیک را تولید کنند (۱ و ۷ و ۱۲ و ۲۹). پس می‌توان از این ویژگی سلول‌ها برای بهبود شرایط کشت و همچنین تمایز سایر سلول‌های بنیادی مانند NSCs بهره برد. در این مطالعه در روش هم‌کشتی علاوه بر بهبود شرایط کشت، بیان عوامل رشد عصبی توسط MSCs نیز نشان داده شد.

در مطالعه حاضر MSCs در محیط کشت به سه شکل دیده شدند. بخشی از سلول‌ها کروی و کوچک و تعدادی از سلول‌ها فیروبلست مانند بودند که در مراحل بعدی کشت بخش زیادی از سلول‌ها را شامل شدند. تعدادی سلول پهن و چندوجهی نیز در محیط وجود داشت. این مشاهدات موافق با گزارشات قبلی است (۱۵ و ۲۶ و ۳۵-۳۰). سلول‌های بنیادی عصبی در محیط کشت حاوی سرم، اکثراً دوکی شکل و کشیده هستند و تعداد کمی نیز مورفولوژی شبه‌عصبی دارند. اطلاعات به دست آمده نشان داد که همه افرادی که تاکنون هم‌کشتی بین NSCs و MSCs را انجام داده‌اند؛ از محیط فاقد سرم استفاده کرده‌اند (۳ و ۱۴ و ۱۵ و ۱۸ و ۲۶ و ۲۷ و ۳۶ و ۳۷). تنها Rivera و همکارانش (۱۵) از محیط  $\alpha$ -MEM حاوی سرم بهره برده‌اند. استفاده از سرم در محیط، شرایط کشت چسبنده را برای NSCs فراهم کرد.

در مطالعات قبلی برای تایید استرومایی بودن MSCs از نشانگر اختصاصی CD71 استفاده شده است که این نشانگر به میزان ۹۵ درصد توسط MSCs بیان شده است (۴۳-۳۵). مطالعه حاضر نشان داد که حدود  $90 \pm 2/4$  درصد سلول‌ها به CD71 پاسخ مثبت داده‌اند. به منظور تایید هویت NSCs از نشانگرهای nestin و GFAP که نشانگرهای سلول‌های بنیادی عصبی هستند (۱۴ و ۴۴ و ۴۵)؛ استفاده شد. مطالعات نشان می‌دهند که سلول‌های بنیادی عصبی، آستروسیت‌هایی هستند که GFAP و nestin را تولید می‌کنند (۵ و ۴۸). در این مطالعه یکی از نتایج بخش جداسازی و کشت سلول‌های بنیادی عصبی، تعیین خلوص سلول‌ها به میزان  $95 \pm 2$  درصد و پاسخ مثبت این سلول‌ها به نشانگر سلول‌های نوروآپتیلیال (نستین) و سلول‌های آستروسیتی (GFAP) بود. با توجه به روش کشت چسبنده و استفاده از سرم در محیط کشت، درصد بالای خلوص سلول‌ها که به این دو نشانگر عصبی پاسخ دادند؛ یکی از بخش‌های قابل توجه این پژوهش محسوب می‌شود. درصد قابل توجه سلول‌های مثبت به این دو نشانگر، نشان از بهبود روش و شرایط کشت و همچنین ظرفیت تمایزی این NSCs دارد.

پس از هم‌کشتی مشاهده شد که تعداد سلول‌های NSC در گروه هم‌کشتی، در مدت زمان ۴۸ ساعت و ۷۲ ساعت به طور معنی‌داری نسبت به گروه کنترل زیاد شده است که این نتیجه موافق با تحقیقات قبلی است (۱۴ و ۲۶). احتمالاً یکی از دلایل افزایش تکثیر NSC،

تنظیمی و کنترلی دارد. ممکن است شروع بیان ژن‌های NTF به بیان ژن BDNF بستگی داشته باشد. MSCs با تولید این عوامل می‌تواند اثر تروفیک بسیار قوی در شرایط هم‌کشتی بر سلول‌های بنیادی عصبی داشته باشد. نقص مشترک در بسیاری از بیماری‌های عصبی از بین رفتن نورون‌ها می‌باشد. لذا یکی از انتخاب‌های بسیار مناسب برای پیوند و درمان بیماری‌های عصبی NSCs و MSCs هستند.

### نتیجه‌گیری

نتایج این مطالعه نشان داد که سلول‌های بنیادی مزانشیمی و عصبی عوامل نوروتروفیک CNTF، NT3، GDNF و BDNF را بیان می‌کنند. الگوی بیان NTFs در این دو نوع سلول و در شرایط هم‌کشتی مشابه بود. اثرات تروفیک MSCs، قابلیت تکثیر NSCs را در شرایط هم‌کشتی افزایش داد. کشت چسبیده NSCs میزان خلوص نسبتاً بالایی از سلول‌ها را فراهم نمود.

### تشکر و قدردانی

این مقاله حاصل بخشی از پایان‌نامه آقای قدرت اله فلسفی نیا برای اخذ درجه کارشناسی ارشد زیست‌شناسی سلولی تکوینی از دانشگاه دامغان بود. از دانشکده زیست‌شناسی و پژوهشکده علوم زیستی دانشگاه دامغان به خاطر پرداخت هزینه مواد، وسایل و در اختیار گذاشتن امکانات آزمایشگاهی صمیمانه تشکر می‌نمایم. همچنین از خانم لیلی حسین‌پور سپاسگزاری می‌گردد.

### References

- Serakinci N, Keith WN. Therapeutic potential of adult stem cells. *Eur J Cancer*. 2006 Jun;42(9):1243-6.
- Li L, Xie T. Stem cell niche: structure and function. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2005;21:605-31.
- Bai L, Caplan A, Lennon D, Miller RH. Human mesenchymal stem cells signals regulate neural stem cell fate. *Neurochem Res*. 2007 Feb;32(2):353-62.
- Duan X, Kang E, Liu CY, Ming GL, Song H. Development of neural stem cell in the adult brain. *Curr Opin Neurobiol*. 2008 Feb; 18(1):108-15.
- Alvarez-Buylla A, Lim DA. For the long run: maintaining germinal niches in the adult brain. *Neuron*. 2004 Mar 4;41(5): 683-6.
- Morikawa S, Mabuchi Y, Niibe K, Suzuki S, Nagoshi N, Sunabori T, et al. Development of mesenchymal stem cells partially originate from the neural crest. *Biochem Biophys Res Commun*. 2009 Feb;379(4):1114-9.
- He Q, Wan C, Li G. Concise review: multipotent mesenchymal stromal cells in blood. *Stem Cells*. 2007 Jan;25(1):69-77.
- Alexanian AR. Neural stem cells induce bone-marrow-derived mesenchymal stem cells to generate neural stem-like cells via juxtacrine and paracrine interactions. *Exp Cell Res*. 2005 Nov; 310(2):383-91.
- Chen J, Li Y, Katakowski M, Chen X, Wang L, Lu D, et al. Intravenous bone marrow stromal cell therapy reduces apoptosis and promotes endogenous cell proliferation after stroke in female rat. *J Neurosci Res*. 2003 Sep;73(6):778-86.

ترشح NTs از MSCs است (۱۴). از طرفی بیان سریع تر BDNF در سطح mRNA نشان‌دهنده نقش تنظیمی و مؤثر این عامل بر تکثیر NSCs است که با نتایج مطالعه Sairanen و همکاران هم‌خوانی دارد (۴۷). در مطالعه حاضر بقاء NSCs در شرایط هم‌کشتی نیز بیشتر از گروه کنترل بود. یکی از عواملی که در بقای نورون‌ها در این شرایط نقش مهمی دارد؛ BDNF می‌باشد (۲۶). در ضمن بیان این نشانگر عصبی در شرایط هم‌کشتی در سطح mRNA برای اولین بار در این مطالعه گزارش شده است.

در این مطالعه الگوی بیان عوامل GDNF، NT3، CNTF و BDNF در گروه‌های کنترل شامل MSCs و NSCs که به تنهایی کشت شده بودند و گروه هم‌کشتی بررسی شد. پس از هم‌کشتی MSCs و NSCs به مدت ۷ روز، بیان ژن‌ها مورد ارزیابی قرار گرفت و مشاهده شد که در هر سه گروه، همه عوامل ذکر شده؛ بیان می‌گردند و تفاوت آماری معنی‌داری بین الگوی بیان نیمه کمی عوامل نوروتروفیک در سه گروه وجود ندارد. سلول‌های MSC عوامل CNTF، NT3، GDNF و BDNF را تولید می‌نمایند (۴۸). همچنین سلول‌های بنیادی یا پیش‌ساز عصبی به طور طبیعی عوامل CNTF، NT3، GDNF و BDNF را ترشح می‌کنند (۴۸ و ۵۰). مقایسه بیان عوامل نوروتروفیک در سیکل‌های ۲۲، ۲۵، ۲۷ و ۳۱ نشان داد که ژن BDNF در همه گروه‌ها نسبت به سایر ژن‌ها در سیکل پایین‌تری بیان می‌شود. احتمالاً این ژن بر بیان سایر ژن‌ها اثر

- Chen J, Zhang ZG, Li Y, Wang L, Xu YX, Gautam SC, et al. Intravenous administration of human bone marrow stromal cells induces angiogenesis in the ischemic boundary zone after stroke in rats. *Circ Res*. 2003 Apr;92(6):692-9.
- Barry FP, Murphy JM. Mesenchymal stem cells: clinical applications and biological characterization. *Int J Biochem Cell Biol*. 2004 Apr;36(4):568-84.
- Roufosse CA, Direkze NC, Otto WR, Wright NA. Circulating mesenchymal stem cells. *Int J Biochem Cell Biol*. 2004 Apr; 36(4):585-97.
- Chen J, Li Y, Zhang R, Katakowski M, Gautam SC, Xu Y, et al. Combination therapy of stroke in rats with a nitric oxide donor and human bone marrow stromal cells enhances angiogenesis and neurogenesis. *Brain Res*. 2004 Apr 16;1005(1-2):21-8.
- Wang Y, Tu W, Lou Y, Xie A, Lai X, Guo F, et al. Mesenchymal stem cells regulate the proliferation and differentiation of neural stem cells through Notch signaling. *Cell Biol Int*. 2009 Nov;33(11):1173-9.
- Rivera FJ, Couillard-Despres S, Pedre X, Ploetz S, Caioni M, Lois C, et al. Mesenchymal stem cells instruct oligodendrogenic fate decision on adult neural stem cells. *Stem Cells*. 2006 Oct; 24(10):2209-19.
- Chen Y, Teng FY, Tang BL. Coaxing bone marrow stromal mesenchymal stem cells towards neuronal differentiation: progress and uncertainties. *Cell Mol Life Sci*. 2006 Jul;63(14):1649-57.
- Croft AP, Przyborski SA. Mesenchymal stem cells expressing neural antigens instruct a neurogenic cell fate on neural stem cells. *Exp Neurol*. 2009 Apr;216(2):329-41.



18. Hokari M, Kuroda S, Shichinohe H, Yano S, Hida K, Iwasaki Y. Bone marrow stromal cells protect and repair damaged neurons through multiple mechanisms. *J Neurosci Res.* 2008 Apr; 86(5):1024-35.
19. Crigler L, Robey RC, Asawachaicharn A, Gaupp D, Phinney DG. Human mesenchymal stem cell subpopulations express a variety of neuro-regulatory molecules and promote neuronal cell survival and neurogenesis. *Exp Neurol.* 2006 Mar;198(1):54-64.
20. Lladó J, Haenggeli C, Maragakis NJ, Snyder EY, Rothstein JD. Neural stem cells protect against glutamate-induced excitotoxicity and promote survival of injured motor neurons through the secretion of neurotrophic factors. *Mol Cell Neurosci.* 2004 Nov; 27(3):322-31.
21. Korsching S. The neurotrophic factor concept: a reexamination. *J Neurosci.* 1993 Jul;13(7):2739-48.
22. van Praag H, Kempermann G, Gage FH. Neural consequences of environmental enrichment. *Nat Rev Neurosci.* 2000 Dec; 1(3):191-8.
23. Huang EJ, Reichardt LF. Neurotrophins: roles in neuronal development and function. *Annu Rev Neurosci.* 2001;24:677-736.
24. Shen Q, Goderie SK, Jin L, Karanth N, Sun Y, Abramova N, et al. Endothelial cells stimulate self-renewal and expand neurogenesis of neural stem cells. *Science.* 2004 May; 304(5675):1338-40.
25. Rivera FJ, Kandasamy M, Couillard-Despres S, Caioni M, Sanchez R, Huber C, et al. Oligodendrogenesis of adult neural progenitors: differential effects of ciliary neurotrophic factor and mesenchymal stem cell derived factors. *J Neurochem.* 2008 Nov; 107(3):832-43.
26. Lou S, Gu P, Chen F, He C, Wang M, Lu C. The effect of bone marrow stromal cells on neuronal differentiation of mesencephalic neural stem cells in Sprague-Dawley rats. *Brain Res.* 2003 Apr; 968(1):114-21.
27. Li QM, Fu YM, Shan ZY, Shen JL, Zhang XM, Lei L, et al. MSCs guide neurite directional extension and promote oligodendrogenesis in NSCs. *Biochem Biophys Res Commun.* 2009 Jul;384(3):372-7.
28. Jin GZ, Cho SJ, Choi EG, Lee YS, Yu XF, Choi KS, et al. Rat mesenchymal stem cells increase tyrosine hydroxylase expression and dopamine content in ventral mesencephalic cells in vitro. *Cell Biol Int.* 2008 Nov;32(11):1433-8.
29. Tuan RS, Boland G, Tuli R. Adult mesenchymal stem cells and cell-based tissue engineering. *Arthritis Res Ther.* 2003;5(1):32-45.
30. Yaghoobi MM, Mowla SJ, Tiraihi T. Nucleostemin, a coordinator of self-renewal, is expressed in rat marrow stromal cells and turns off after induction of neural differentiation. *Neurosci Lett.* 2005 Dec;390(2):81-6.
31. Colter DC, Sekiya I, Prockop DJ. Identification of a subpopulation of rapidly self-renewing and multipotential adult stem cells in colonies of human marrow stromal cells. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2001 Jul;98(14):7841-5.
32. Vogel W, Grünebach F, Messam CA, Kanz L, Brugger W, Bühring HJ. Heterogeneity among human bone marrow-derived mesenchymal stem cells and neural progenitor cells. *Haematologica.* 2003 Feb;88(2):126-33.
33. Wang FW, Jia DY, Du ZH, Fu J, Zhao SD, Liu SM, et al. Roles of activated astrocytes in bone marrow stromal cell proliferation and differentiation. *Neuroscience.* 2009 May; 160(2):319-29.
34. Dvorakova J, Hrubá A, Velebný V, Kubala L. Isolation and characterization of mesenchymal stem cell population entrapped in bone marrow collection sets. *Cell Biol Int.* 2008 Sep;32(9): 1116-25.
35. Ye M, Chen S, Wang X, Qi C, Lu G, Liang L, et al. Glial cell line-derived neurotrophic factor in bone marrow stromal cells of rat. *Neuroreport.* 2005 Apr;16(6):581-4.
36. Glaser T, Pollard SM, Smith A, Brüstle O. Tripotential differentiation of adherently expandable neural stem (NS) cells. *PLoS One.* 2007 Mar 14;2(3):e298.
37. Pollard SM, Conti L, Sun Y, Goffredo D, Smith A. Adherent neural stem (NS) cells from fetal and adult forebrain. *Cereb Cortex.* 2006 Jul;16 Suppl 1:i12-20.
38. Ghorbanian MT, Tiraihi T, Mesbah-Namin SA, Fathollahi Y. Selegiline is an efficient and potent inducer for bone marrow stromal cell differentiation into neuronal phenotype. *Neurol Res.* 2010 Mar;32(2):185-93.
39. Deans RJ, Moseley AB. Mesenchymal stem cells: biology and potential clinical uses. *Exp Hematol.* 2000 Aug;28(8):875-84.
40. Pountos I, Corscadden D, Emery P, Giannoudis PV. Mesenchymal stem cell tissue engineering: techniques for isolation, expansion and application. *Injury.* 2007 Sep;38(Suppl 4): S23-33.
41. Bae JS, Han HS, Youn DH, Carter JE, Modo M, Schuchman EH, et al. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells promote neuronal networks with functional synaptic transmission after transplantation into mice with neurodegeneration. *Stem Cells.* 2007 May;25(5):1307-16.
42. Baksh D, Song L, Tuan RS. Adult mesenchymal stem cells: characterization, differentiation, and application in cell and gene therapy. *J Cell Mol Med.* 2004 Jul-Sep;8(3):301-16.
43. Sethe S, Scutt A, Stolzing A. Aging of mesenchymal stem cells. *Ageing Res Rev.* 2006 Feb;5(1):91-116.
44. Ma DK, Bonaguidi MA, Ming GL, Song H. Adult neural stem cells in the mammalian central nervous system. *Cell Res.* 2009 Jun; 19(6):672-82.
45. Hagg T. Molecular regulation of adult CNS neurogenesis: an integrated view. *Trends Neurosci.* 2005 Nov;28(11):589-95.
46. Harting MT, Sloan LE, Jimenez F, Baumgartner J, Cox CS Jr. Subacute neural stem cell therapy for traumatic brain injury. *J Surg Res.* 2009 May;153(2):188-94.
47. Sairanen M, Lucas G, Ernfors P, Castrén M, Castrén E. Brain-derived neurotrophic factor and antidepressant drugs have different but coordinated effects on neuronal turnover, proliferation, and survival in the adult dentate gyrus. *J Neurosci.* 2005 Feb; 25(5):1089-94.
48. Kamei N, Tanaka N, Oishi Y, Hamasaki T, Nakanishi K, Sakai N, et al. BDNF, NT-3, and NGF released from transplanted neural progenitor cells promote corticospinal axon growth in organotypic cocultures. *Spine (Phila Pa 1976).* 2007 May; 32(12):1272-8.
49. Lu P, Jones LL, Snyder EY, Tuszynski MH. Neural stem cells constitutively secrete neurotrophic factors and promote extensive host axonal growth after spinal cord injury. *Exp Neurol.* 2003 Jun; 181(2):115-29.
50. Pan HC, Cheng FC, Chen CJ, Lai SZ, Lee CW, Yang DY, et al. Post-injury regeneration in rat sciatic nerve facilitated by neurotrophic factors secreted by amniotic fluid mesenchymal stem cells. *J Clin Neurosci.* 2007 Nov;14(11):1089-98.