

Isolation, Characterization and Cellular Uptake of Exosomes Derived from Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells

Katayoon Pakravan¹, Sadegh Babashah^{2*}, Mohammad Javan³, Majid Sadeghzadeh⁴, Seyed Javad Mowla⁴

1- M.Sc. Student, Department of Molecular Genetics, Faculty of Biological Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

2- Assistant Professor, Department of Molecular Genetics, Faculty of Biological Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

3- Professor, Department of Physiology, School of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

4- Professor, Department of Molecular Genetics, Faculty of Biological Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

**Corresponding Address: Postal Code: 1411713116, Department of Molecular Genetics, Faculty of Biological Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran
Email: babashah@modares.ac.ir*

Received: 29/Nov/2016, Accepted: 11/Jan/2017

Abstract

Objective: Cell-derived microvesicles are described as a new mechanism for cell-to-cell communication. Stem cell-derived exosomes have been described as a new mechanism for the paracrine effects of mesenchymal stem cells (MSCs). In this regard, exosomes may play a relevant role in the intercellular communication between MSCs and tumor cells.

Methods: Exosomes were purified from the conditioned medium of MSCs by differential centrifugation. Exosome size and morphology were examined by scanning electron microscope and sized with dynamic light scattering (DLS). Western blot analysis confirmed the exosomes by using CD9 as a marker. Purified exosomes were labeled with a PKH26 red fluorescent labeling kit. The labeled exosomes were incubated with SKOV3 ovarian tumor cells for 12 h at 37°C, and we used an inverted fluorescence microscope to monitor cellular uptake.

Results: Scanning electron microscopy revealed that the purified MSCs-derived exosomes had a spherical shape with a diameter of approximately 30-100 nm. Exosome size measurement by dynamic light scattering analysis also showed a single bell-shaped size distribution with a peak of ~80 nm. Western blot analysis also demonstrated the presence of CD9 (a representative marker of exosomes) in the purified exosomes. These data confirmed that the vesicles isolated from MSCs-conditioned media were the exosomes based on their size and presence of the protein marker CD9. Florescent microscopy showed that PKH26-labeled exosomes could be taken up by SKOV3 tumor cells with high efficiency.

Conclusion: Our approach for isolation, characterization and cellular uptake of exosomes derived from MSCs is valuable and a prerequisite for future studies that intend to discover exosome function in tumor cells. The ability to study the biology of exosome uptake in cancer cells could provide opportunities for functional studies of these natural nanovesicles and their contents in cancer therapy.

Keywords: Mesenchymal stem cells, Exosomes, Differential centrifugation, Cellular uptake, Tumor cells

Pathobiology Research, Vol. 19 (2016-2017), No.3, Pages: 17-31

جداسازی، تأیید هویت و بررسی قابلیت جذب سلولی اگزوزوم‌های مشتق از سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان انسانی

کتایون پاکروان^۱، صادق باباشاه^{۲*}، محمد جوان^۳، مجید صادقی زاده^۴، سید جواد مولی^۴

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه ژنتیک، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

۲- استادیار، گروه ژنتیک، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

۳- استاد، گروه فیزیولوژی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

۴- استاد، گروه ژنتیک، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

*آدرس نویسنده مسئول: ایران، تهران، کدپستی: ۴۱۱۷۱۳۱۱۶ دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم زیستی، گروه ژنتیک

Email: babashah@modares.ac.ir

پذیرش مقاله: ۹۵/۱۰/۲۲

دریافت مقاله: ۹۵/۰۹/۰۹

چکیده

هدف: میکروویکول‌های مشتق از سلول به‌عنوان مکانیسمی نوین در زمینه ارتباطات سلول-سلول شناخته می‌شوند. اگزوزوم‌های مشتق از سلول‌های بنیادی مزانشیمی به‌عنوان مکانیسمی نوین در زمینه عملکرد پاراکراین سلول‌های بنیادی مزانشیمی قلمداد می‌شوند. در این راستا، اگزوزوم‌ها نقشی مهم در ارتباطات بین سلولی مابین سلول‌های بنیادی مزانشیمی و سلول‌های توموری بر عهده دارند.

مواد و روش‌ها: اگزوزوم‌ها از محیط کشت سلول‌های بنیادی مزانشیمی توسط سانتریفوژ افتراقی تخلیص شد. اندازه و شکل ظاهری اگزوزوم‌های مشتق از سلول‌های بنیادی مزانشیمی توسط میکروسکوپ الکترونی نگاره بررسی شد. همچنین، اندازه اگزوزوم‌ها توسط تفرق دینامیکی نور سنجیده شد. آنالیز وسترن بلات برای نشانگر اگزوزومی CD9 انجام شد. اگزوزوم‌های تخلیص شده با رنگ فلورسنت PKH نشان‌دار شد. سلول‌های توموری تخمدان SKOV3 با اگزوزوم‌های نشان‌دار شده تیمار و جذب سلولی توسط میکروسکوپ فلورسنت بررسی شد.

نتایج: میکروسکوپ الکترونی نگاره نشان داد که اگزوزوم‌های مشتق از سلول‌های بنیادی مزانشیمی دارای شکلی کروی با قطر مابین ۳۰ الی ۱۰۰ نانومتر است. همچنین اندازه اگزوزوم‌ها توسط سنجش فرق دینامیکی نور توزیع اندازه زنگوله‌ای شکل با بیشینه فراوانی ۸۰ نانومتر را نشان داد. آنالیز وسترن بلات نیز بیان CD9 (نشانگر ویژه اگزوزومی) در اگزوزوم‌های تخلیص شده را نشان داد. همچنین بررسی میکروسکوپ فلورسنت نشان داد که اگزوزوم‌های نشان‌دار شده با رنگ PKH26 می‌تواند توسط سلول‌های توموری SKOV3 با کارآمدی بالا جذب شود.

نتیجه‌گیری: روش ارایه شده در زمینه جداسازی اگزوزوم‌ها از سلول‌های بنیادی مزانشیمی و تأیید ماهیت و جذب آن‌ها توسط سلول‌های توموری، گامی مهم و پیش نیاز در زمینه درک عملکرد اگزوزوم‌ها در سلول‌های توموری برای مطالعات آینده است. بدیهی است توانایی در مطالعه زیستی جذب اگزوزوم‌ها توسط سلول‌های سرطانی فرصت‌های جدیدی در زمینه بررسی‌های عملکردی این نانویکول‌های طبیعی و محتویات آن‌ها در زمینه درمان سرطان فراهم می‌آورد.

کلیدواژگان: سلول‌های بنیادی مزانشیمی، اگزوزوم، سانتریفوژ افتراقی، جذب سلولی، سلول‌های توموری

پژوهش‌های آسیب شناسی زیستی، دوره ۱۹، شماره ۳، پاییز ۱۳۹۵، صفحات: ۱۷-۳۱

مقدمه

سلول‌های بنیادی از لحاظ منشأ به دو دسته عمده سلول‌های بنیادی جنینی (Embryonic stem cells) و سلول‌های بنیادی بزرگسالان (Adult stem cells) تقسیم‌بندی می‌شوند. از مهم‌ترین سلول‌های بنیادی بزرگسالان که امروزه مورد توجه بسیاری از محققین قرار گرفته است، می‌توان به سلول‌های بنیادی مزانشیمی (Mesenchymal stem cells) اشاره کرد. این سلول‌ها از بافت‌های با منشأ مزودرمی قابل جداسازی هستند و در ترمیم بافت‌هایی نظیر استخوان، غضروف، ماهیچه، تاندون و چربی مشارکت دارند [۱]. طی سال‌های اخیر، سلول‌های بنیادی مزانشیمی به دلیل توانایی لانه‌گزینی در محل جراحات، التهاب و نئوپلازی (Neoplasia) در زمینه طب بازساختی و اهداف ژن درمانی بسیار مورد توجه محققان قرار گرفته‌اند. این سلول‌ها قابلیت مهاجرت به بافت‌های آسیب‌دیده و رهاسازی سایتوکاین‌ها (Cytokines)، میانجی‌های التهابی، ترکیبات ماتریکس خارج سلولی و پروتئین‌های ضد میکروبی را دارند و بنابراین میکرومحیطی مناسب برای ترمیم بافت را فراهم می‌کنند [۲]. در این راستا، در سال‌های گذشته، گزارش‌هایی مبنی بر مهاجرت سلول‌های بنیادی مزانشیمی به ریز محیط توموری منتشر شده است. مکانیسم درگیر در جای‌گیری سلول‌های بنیادی مزانشیمی در تومورها با فرآیند مهاجرت و فعال شدن سلول‌های التهابی در فرایند ترمیم بافت هم‌پوشانی دارد [۳، ۴].

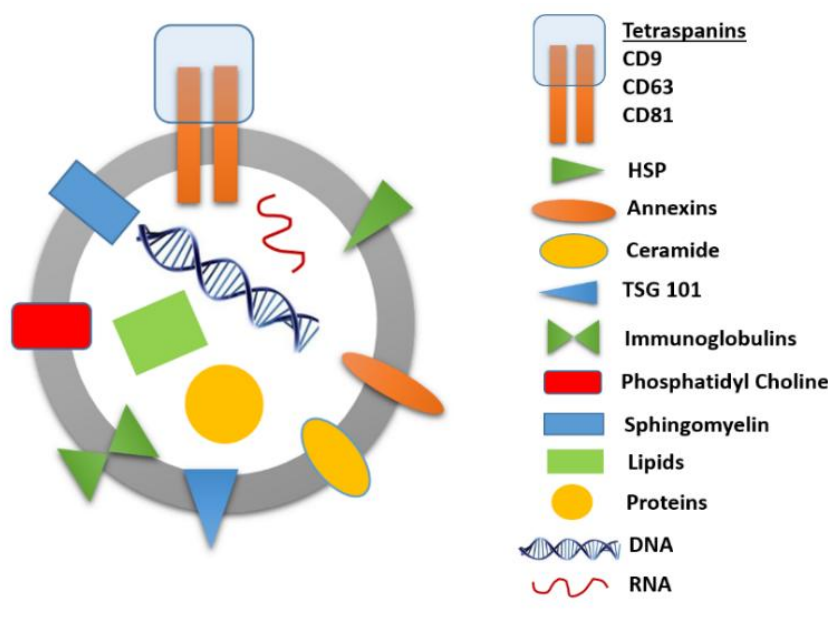
در ارتباطات سلول-سلول، عوامل محلول (Soluble factors) زیادی نظیر کموکاین (Chemokines)، سایتوکاین، عوامل رشد و پروتئین‌های ماتریکس خارج سلولی دخیل هستند. تحقیقات اخیر نشان داده است که سلول‌ها از اشکال دیگری از ارتباطات که شامل میکروویزیکول‌های غشایی است نیز استفاده می‌نمایند. میکروویزیکول‌های غشایی شامل مولکول‌های زیستی فعال نظیر اسیدهای نوکلئیک، لیپیدها و پروتئین‌ها هستند که به‌صورت افقی بین سلول‌ها انتقال یافته

و دامنه وسیعی از فعالیت‌ها را در سلول پذیرنده انجام می‌دهند [۵-۷]. اگزوزوم‌ها دسته ویژه‌ای از وزیکول‌های کوچک ترشحی با منشأ اندوزومی هستند که توسط بسیاری از انواع سلولی از جمله سلول‌های بنیادی مزانشیمی ترشح می‌شوند [۸]. اگزوزوم‌ها دارای ویژگی‌های ساختاری و ظاهری می‌باشند و می‌توان آن‌ها را ذراتی کروی شکل با دو لایه لیپیدی نامید که اندازه‌ای بین ۳۰ الی ۱۰۰ نانومتر و چگالی شناور (Floating density) ۱/۱ الی ۱/۲۱ گرم/میلی‌لیتر در شیب غلظت سوکروز دارند. اگزوزوم‌ها همچنین دارای پروتئین‌های نشانگری در سطح خود هستند که بازگو کننده منشأ اندوزومی آن‌ها است (شکل ۱). اگزوزوم‌ها دارای نقش‌های متعددی هستند که از مهم‌ترین آن‌ها می‌توان به برقراری ارتباطات سلول-سلول در فواصل نزدیک (میکرومحیط سلول‌ها) و فواصل دور در بدن اشاره کرد. در دهه گذشته علاقمندی‌های زیادی در زمینه مطالعه عملکرد اگزوزوم‌ها ایجاد شده است و مطالعات زیادی اشاره به این نکته دارند که اگزوزوم‌ها به‌عنوان ابزارهای مهم ارتباطات سلول-سلول در فرآیندهای مختلف فیزیولوژیکی و آسیب‌شناختی که از نظر تکاملی حفاظت شده هستند، عمل می‌نمایند. وقایعی نظیر دفع پروتئین‌های زاید، عرضه آنتی‌ژن، پاسخ ایمنی، رگ‌زایی، التهاب، متاستاز (Metastasis)، گسترش بیماری‌زها و بسیاری از فعالیت‌های دیگر از جمله نقش‌های این وزیکول‌ها بسته به محتوای آن‌ها در بدن است [۹، ۱۰].

شواهد زیادی وجود دارد که سلول‌های بنیادی مزانشیمی به شیوه پاراکراین عمل می‌نمایند و این می‌تواند تأکیدی بر اهمیت عوامل زیستی موجود در محیط کشت شرایطی آن‌ها از جمله اگزوزوم‌ها و عوامل محلول باشد. مطالعات مختلف گزارش داده‌اند که اگزوزوم‌های مشتق از سلول‌های بنیادی مزانشیمی دارای عملکردهای مشابهی با سلول‌های بنیادی مزانشیمی هستند. این عملکردها شامل ترمیم آسیب بافتی، حمایت از پاسخ‌های التهابی و تعدیل سیستم ایمنی است

[۱۱، ۱۲]. در این مطالعه، روشی کارآمد مبتنی بر سانتریفوژ افتراقی در زمینه جداسازی اگزوزوم‌های مشتق از سلول‌های بنیادی مزانشیمی ارایه می‌شود. همچنین به منظور تأیید درستی هویت اگزوزوم‌های مشتق از سلول‌های بنیادی مزانشیمی،

اندازه، شکل ظاهری و بیان نشانگرهای سطحی ویژه اگزوزوم‌ها بررسی می‌شود. در خاتمه، جذب سلولی اگزوزوم‌های نشان‌دار شده با رنگ فلورسنت توسط سلول‌های توموری بررسی می‌شود.



شکل ۱ ساختار و محتوای اگزوزوم‌ها؛ اگزوزوم‌ها مشتمل بر یک دولایه غشایی لیپیدی (حاوی اسفنگومیلین (Sphingomyelin)، کلسترول، سرامید (Ceramide)، فسفاتیدیل کولین و فسفاتیدیل اتانولامین) که یک فضای سیتوزولی کوچک را احاطه دارد، هستند. ساختار لیپیدی اگزوزوم‌ها حاوی پروتئین‌های مختلفی از جمله گیرنده‌ها، تتراسپنین‌ها (Tetraspanin)، ایموگلوبولین‌ها و غیره هستند. محتوای اگزوزوم‌ها می‌تواند از سلول مبدأ به سلول‌های هدف در میکرومحیطشان انتقال یابند.

مواد و روش‌ها

جداسازی و کشت سلول‌های بنیادی مزانشیمی

مغز استخوان

سلول‌های بنیادی مزانشیمی انسانی از آسپیره‌های مغز استخوان شش فرد سالم (با دامنه سنی بین ۲۰ الی ۳۵ سال) پس از اخذ رضایت نامه آگاهانه جداسازی شد. همچنین این مطالعه طی نامه شماره ۵۲۵/۳۷۰۸ مورخ ۱۱/۰۶/۱۳۹۴ به تأیید کمیته اخلاق پزشکی رسیده است. پس از جداسازی

سلول‌های تک هسته‌ای از نمونه‌های مغز استخوان به کمک فایکول و شستشو، سلول‌ها در فلاسک کشت داده شدند. جمعیت سلول‌های موجود در مغز استخوان شامل جمعیتی از سلول‌های مختلف از جمله سلول‌های خونی، سلول‌های بنیادی خون‌ساز، سلول‌های چربی، سلول‌های بنیادی مزانشیمی و غیره است. با چند بار تعویض محیط کشت در بازه‌های دو الی سه روزه، سلول‌های کروی خارج و تنها سلول‌های بنیادی مزانشیمی چسبنده به کف پلیت باقی ماندند.

به منظور تمایز ادیپوزنیک و تأیید تشکیل واکوئل‌های چربی از سلول‌های مرحله کشت سلولی سوم استفاده شد. محیط تمایزی چربی برای سلول‌ها هر ۳ روز یک بار تعویض شد. محیط تمایزی چربی همانند محیط تمایز به استخوان است با این تفاوت که دگزامتازون آن ۷-۱۰ مولار و به جای بتا گلیسرول فسفات از ایندومتاسین (Indometacin) با غلظت نهایی ۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر استفاده شد. سلول‌ها به مدت ۲۱ روز در شرایط رشد نگهداری و در پایان این مدت تمایز با روش رنگ‌آمیزی Oil Red O ارزیابی شدند.

جداسازی اگزوزوم‌های مشتق از سلول‌های بنیادی مزانشیمی

اگزوزوم‌ها از مایع رویی سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از مغز استخوان در مرحله کشت سلولی سوم توسط سانتریفوژ افترقی مطابق آنچه پیشتر گزارش شده بود [۱۳] و با انجام تغییراتی محدود جدا شد. برای جداسازی اگزوزوم‌های مشتق از سلول‌های بنیادی مزانشیمی و اجتناب از آلودگی با اگزوزوم‌های موجود در FBS، سلول‌ها به مدت ۷۲ ساعت پیش از برداشت مایع رویی سلولی در BSA (Bovine serum albumin) ۱ درصد نگهداری شدند. به طور خلاصه، مایع رویی سلولی جمع‌آوری شده، به منظور حذف سلول‌های باقیمانده موجود در آن به مدت ۱۰ دقیقه در دور ۳۰۰xg سانتریفوژ شد. همچنین به منظور حذف سلول‌های مرده و وجود هرگونه باقی مانده سلولی، مایع رویی به ترتیب به مدت ۲۰ دقیقه در دور ۲۰۰۰xg و ۳۰ دقیقه در دور ۱۰/۰۰۰xg سانتریفوژ شد. پس از عبور از فیلتر ۰/۲۲ میکرونی، از اولتراسانتریفوژ (Beckman Coulter، آلمان) با دور ۱۰۰/۰۰۰xg و به مدت ۷۰ دقیقه به منظور رسوب دادن اگزوزوم‌ها استفاده شد. رسوب اگزوزومی در PBS حل شد و به منظور حذف آلودگی پروتئینی، سوسپانسیون اگزوزومی به طور مجدد در دور ۱۰۰/۰۰۰xg و به مدت ۷۰ دقیقه

ارزیابی فلوسایتومتری نشانگرهای سطحی سلول‌های بنیادی مزانشیمی

به منظور بررسی فلوسایتومتری نشانگرهای سطحی سلول‌های بنیادی مزانشیمی، سلول‌ها از کف پلیت ترپسینه شدند، پس از سانتریفوژ و شستشو با PBS (Phosphate Buffered Saline)، میزان ۱۰۰ میکرولیتر سوسپانسیون سلولی با ۱۰ میکرولیتر از آنتی‌بادی‌های اولیه CD73، CD90 و CD34 کوئزوگه با PE (Phycoerythrin) و FITC (Fluorescein isothiocyanate) به همراه ایزوتایپ‌های مربوط به آن‌ها افزوده و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد و شرایط تاریکی انکوبه شدند. سوسپانسیون سلولی پس از شستشو با PBS و سانتریفوژ با دستگاه فلوسیتومتری تجزیه و تحلیل شد.

ارزیابی توانایی تمایز چند رده‌ای سلول‌های بنیادی مزانشیمی

به منظور تأیید بیشتر هویت سلول‌های بنیادی مزانشیمی، توانایی تمایز چند رده‌ای آن‌ها به سلول‌های سازنده استخوانی (استئوژنیک: Osteogenic) و سازنده چربی (ادیپوزنیک: Adipogenic) بررسی شد. به منظور تمایز به استخوان و تأیید معدنی شدن، سلول‌ها در مرحله کشت سلولی سوم با تعداد ۷۰ هزار در چاهک‌های پلیت ۶ خانه در حضور محیط کشت DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) حاوی ۱۰ درصد FBS (Fetal bovine serum) کشت شدند. سپس محیط کشت تمایزی حاوی ۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر آسکوربیک اسید-۲-فسفات، ۱۰ نانومولار دگزامتازون و ۱۰ میلی‌مولار بتا-گلیسرول فسفات جایگزین شد. کشت تمایزی به مدت ۲۱ روز انجام و هر سه روز یک بار محیط کشت تعویض شد و در پایان این مدت وقوع تمایز با رنگ‌آمیزی آلیزارین رد (Alizarin red) ارزیابی شد.

سانتریفوژ شد. رسوب آگروزومی در PBS حل شد و در دمای ۲۰- درجه سانتی گراد نگهداری شد.

میکروسکوپ الکترونی نگاره

به منظور بررسی میکروسکوپ الکترونی نگاره (Scanning electron microscopy: SEM)، حجم اندکی از آگروزوم تخلیص شده، توسط گلو تار آلد هید ۲/۵ درصد تثبیت و با PBS شستشو شد. سپس نمونه توسط اتانول آب گیری و روی سطح شیشه ای خشک و با لایه نازکی از طلا پوشانده شد. اندازه و شکل ظاهری آگروزوم ها توسط میکروسکوپ الکترونی نگاره (Digital SEM- KYKY- M3200، چین) ارزیابی شد.

سنجش تفرق دینامیکی نور

یکی از روش های آنالیز نانو ذرات، روش سنجش تفرق دینامیکی نور (Dynamic light scattering measurement: DLS) است که توانایی اندازه گیری ذرات در داخل محلول را به صورت سریع، ساده و بدون نیاز به آماده سازی نمونه، دارد. برای این منظور آگروزوم های استخراج شده به کمک PBS به حجم ۳۰۰ میکرو لیتر رسانده شد. پس از تکانه شدید محلول، سنجش سایز آگروزوم ها توسط دستگاه Zetasizer Nano (Malvern Instruments، آمریکا) انجام شد.

لکه گذاری و سترن

پروتئین تام با استفاده از بافر RIPA (Radioimmuno- Percipitation Assay) از آگروزوم استخراج و توسط SDS- Sodium Dodecyl Sulfate- Polyacrylamide (PAGE) روی ژل ۱۲/۵ درصد جداسازی شد. سپس لکه ها روی غشای نیتروسلولوزی انتقال یافت و مهار واکنش های غیر اختصاصی توسط انکوباسیون غشا در محلول مسدود کننده (Blocking solution) به مدت ۲

ساعت در دمای اتاق انجام شد. پس از آن، غشا با آنتی بادی اختصاصی علیه CD9 (Abcam, ab92726، آمریکا) به مدت ۵ ساعت و آنتی بادی ثانویه متصل به HRP (Horseradish Peroxidase) به مدت یک ساعت انکوبه شد. علایم توسط کیت ECL (Enhanced chemiluminescence) شناسایی شد.

نشان دار نمودن آگروزوم ها توسط رنگ فلورسنت

قرمز PKH26

آگروزوم های استخراج شده توسط کیت نشانه گذاری رنگ فلورسنت قرمز PKH26 (Sigma، آمریکا) مطابق دستورالعمل سازنده و با انجام تغییرات محدودی نشانه گذاری شد. به طور خلاصه، میزان ۱ میلی لیتر از Diluent C که توسط کیت فراهم می شود به رسوب آگروزومی افزوده شد. محلول رنگ آمیزی شامل ۴ میکرو لیتر از رنگ PKH که توسط Diluent C به حجم ۱ میلی لیتر رسانده شد به سوسپانسیون آگروزومی افزوده و به مدت ۵ دقیقه در دمای اتاق انکوبه شد. به منظور توقف واکنش نشان دار شدن، میزان ۱۰ میلی لیتر محیط کامل به سوسپانسیون افزوده شد. برای رسوب گذاری آگروزوم های نشان دار شده از محلول ۸۰۰۰ PEG (Polyethylene glycol) به نسبت ۵ به ۱ (۱۲ میلی لیتر سوسپانسیون آگروزومی به ۲/۴ میلی لیتر محلول PEG) استفاده شد. سوسپانسیون حاصل به مدت ۱۴ ساعت در دمای ۴ درجه سانتی گراد (Cold room) همراه با لرزش (Shaking) انکوبه شد. پس از انجام سانتریفوژ مدت ۳۰ دقیقه در دور ۱۵۰۰۰ xg در دمای ۴ درجه سانتی گراد، رسوب آگروزوم نشان دار شده در PBS حل شد. در انتها، سلول های هدف توسط آگروزوم های نشان دار شده به مدت ۱۲ ساعت تیمار شد. پس از جایگزینی محیط رویی سلول ها و شستشو با PBS جذب سلولی آگروزوم های نشان دار توسط میکروسکوپ فلورسنت (Olympus, CKX41، ژاپن)

استخوانی و چربی تمایز داده شدند و نتایج آن بررسی شد. در این راستا، پس از کشت سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از مغز استخوان انسان در محیط‌های تمایزی ویژه به سمت چربی و استخوان، رنگ‌آمیزی با رنگ‌های Oil Red O (برای تأیید تمایز به چربی) و آلیزارین رد (برای تأیید معدنی‌شدن و تمایز به استخوان) مشاهدات میکروسکوپی انجام شد. همان‌گونه که در شکل ۳ الف ملاحظه می‌شود، سلول‌های بنیادی مزانشیمی در گروه کنترل ظاهری متقارن و دوکی شکل (شبه فیروبلست) دارند. این در حالی است که سلول‌های بنیادی مزانشیمی در محیط تمایزی ویژه به سمت چربی، پس از تمایز، شکل ظاهری سلول‌های آدیپوسیت (Adipocyte) را به خود گرفته و همان‌طور که در شکل ۳ ب نیز مشخص است پس از رنگ‌آمیزی Oil Red O دانه‌های قرمز حاوی تجمع لیپیدها را در داخل سلول‌های آدیپوسیت نشان می‌دهند. شایان ذکر است که رنگ Oil Red O تری‌گلیسیریدها (وزیکول‌های چربی داخل سلولی) را رنگ‌آمیزی می‌کند و سلول‌های آدیپوسیت را مشخص می‌سازد. همچنین کشت سلول‌های بنیادی مزانشیمی در محیط تمایزی ویژه به سمت استخوان پس از رنگ‌آمیزی با آلیزارین قرمز، رسوب کلسیم در محیط کشت را نشان داد که تأیید کننده تمایز استئوبلاستی است (شکل ۳ ج).

نتایج

فلوسایتومتری نشانگرهای سطحی سلول‌های بنیادی

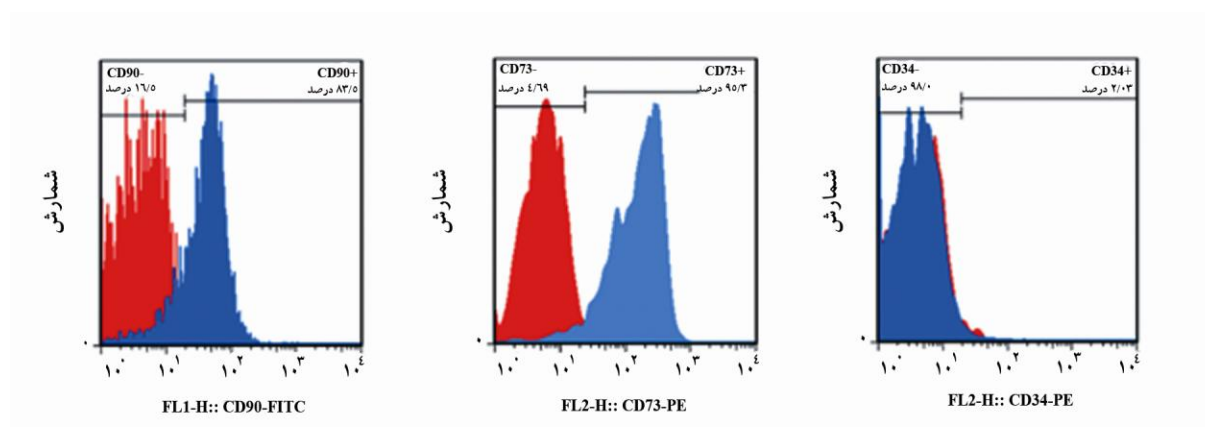
مزانشیمی

نتایج فلوسایتومتری برای نشانگرهای سطحی CD90 و CD73 به‌عنوان نشانگرهای شاخص سلول‌های بنیادی مزانشیمی و نشانگر CD34 به‌عنوان نشانگرهای سلول‌های خونی مشتق از مغز استخوان در شکل ۲ مشخص است. آنالیز فلوسایتومتری بیان مثبت نشانگرهای سطحی CD90 (۸۳/۵ درصد) و CD73 (۹۵/۳ درصد) را برای سلول‌های بنیادی مزانشیمی نشان داد. بیان اندک آنتی‌ژن CD34 (۲/۰۳ درصد) نشان دهنده عدم آلودگی سلول‌های جداسازی شده با سلول‌های خونی مشتق از مغز استخوان است.

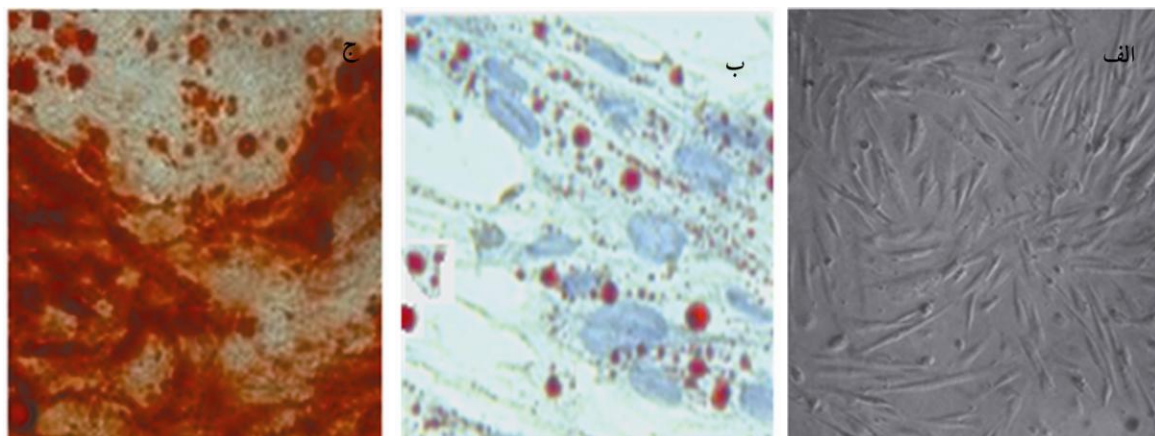
قابلیت تمایز چند رده‌ای سلول‌های بنیادی

مزانشیمی

به‌منظور تأیید بیشتر در زمینه درستی سلول‌های بنیادی مزانشیمی جدا شده از مغز استخوان، این سلول‌ها به رده‌های



شکل ۲ آنالیز فلوسایتومتری به‌منظور تأیید هویت سلول‌های بنیادی مزانشیمی؛ آنالیز فلوسایتومتری بیان مثبت نشانگرهای سطحی CD90 و CD73 و فقدان بیان آنتی‌ژن CD34 را برای سلول‌های بنیادی مزانشیمی نشان داد که نشانگر درستی جداسازی سلول‌های بنیادی مزانشیمی از مغز استخوان است.



شکل ۳ تمایز چند رده‌ای سلول‌های بنیادی مزانشیمی. تمایز آدیپوژنیک و تمایز استئوژنیک تایید کننده درستی سلول‌های بنیادی مزانشیمی جداسازی شده و قابلیت تمایز چند رده‌ای آن‌ها است. شکل (الف): سلول‌های بنیادی مزانشیمی را در مرحله کشت سلولی سوم با ظاهری متقارن و دوکی شکل (شبه فیبروبلاست) نشان می‌دهد: در شکل (ب) سلول‌های تمایز یافته به چربی به رنگ قرمز مشخص است و واکول‌های چربی در آن‌ها دیده می‌شود. در شکل (ج) رنگ قرمز نشانه معدنی شدن و تمایز به استخوان است.

تأیید درستی اگزوزوم‌های مشتق از سلول‌های بنیادی مزانشیمی

به منظور بررسی درستی هویت اگزوزوم‌های مشتق از سلول‌های بنیادی مزانشیمی، ابتدا اگزوزوم‌ها از محیط کشت سلول‌های بنیادی مزانشیمی توسط روش پیش گفته جداسازی شدند. تأیید درستی هویت اگزوزوم‌ها توسط روش‌هایی که اندازه، شکل ظاهری و بیان نشانگرهای سطحی ویژه اگزوزوم را ارزیابی می‌نماید، به صورت زیر انجام شد.

بررسی اگزوزوم‌های جداسازی شده توسط میکروسکوپ الکترونی نگاره

اگزوزوم‌ها ذراتی کروی شکل با دو لایه لیپیدی هستند که اندازه‌ای بین ۳۰ الی ۱۰۰ نانومتر دارند. اندازه و شکل ظاهری اگزوزوم‌ها توسط بررسی SEM ارزیابی شد. نتایج نشان داد اگزوزوم‌های جداسازی شده دارای ظاهری کروی با دامنه اندازه بین ۶۰ الی ۱۰۰ نانومتر هستند (شکل ۴).

بررسی اگزوزوم‌های جداسازی شده توسط سنجش DLS

اندازه اگزوزوم‌ها توسط بررسی DLS ارزیابی شد. سنجش توزیع تعداد توسط DLS نقطه اوج (Peak) حدوداً ۸۰ نانومتری را برای جمعیت اگزوزوم‌های جداسازی شده نشان داد (شکل ۵).

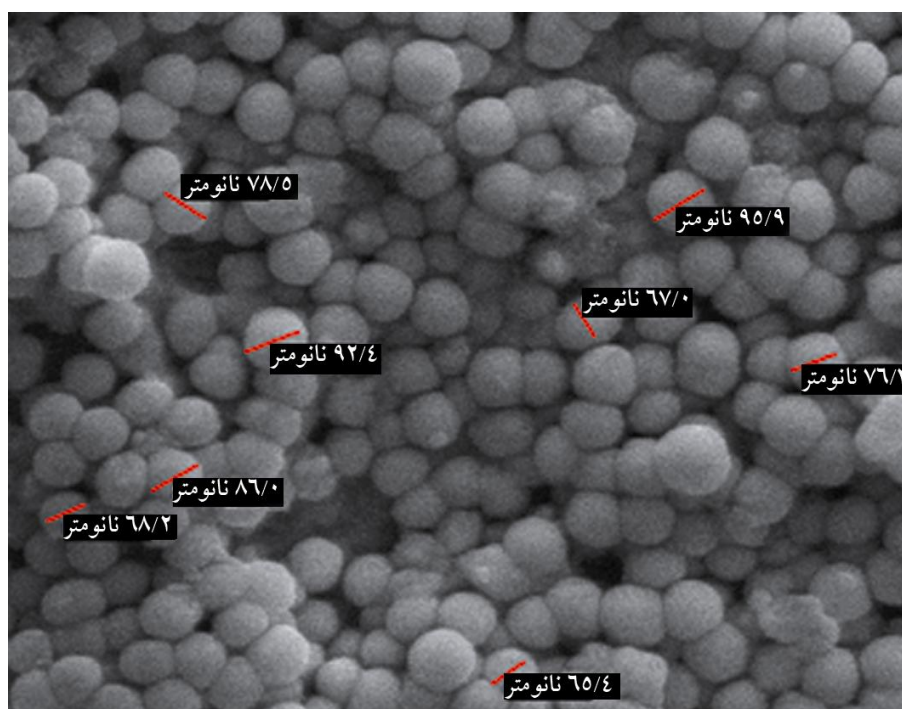
بررسی اگزوزوم‌های جداسازی شده توسط آنالیز وسترن بلات

پروتئین‌هایی که روی لایه غشایی خارجی اگزوزوم‌ها قرار دارند، به عنوان نشانگرهای شناسایی آن‌ها به کار می‌روند. عمومی‌ترین نشانگرها در این زمینه نشانگرهای خانواده تتراسپنین شامل CD9، CD63، CD81 و CD82 هستند که با کمک روش وسترن بلات (Western blot) برای تأیید ماهیت اگزوزوم‌ها شناسایی می‌شوند. در این مطالعه، به منظور تعیین ماهیت اگزوزوم‌های جداسازی شده،

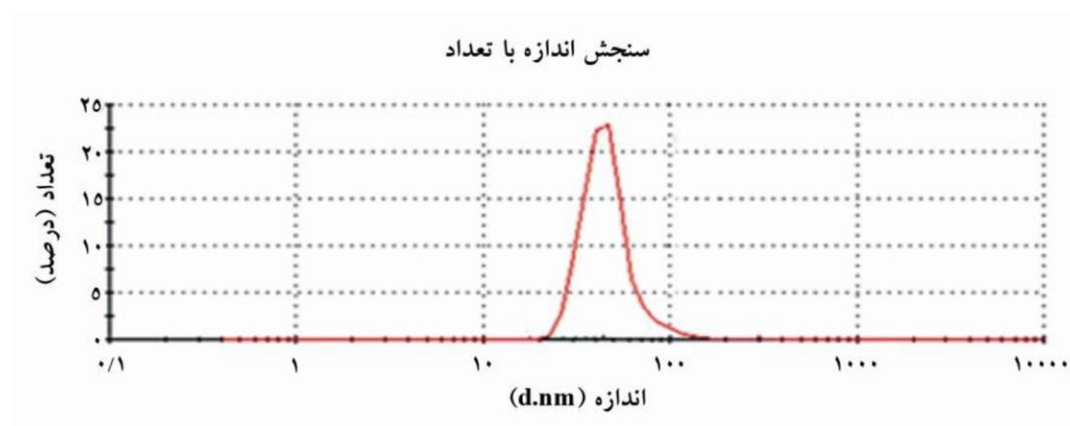
بررسی تنوع ژنوتیپی ویروس پاپیلومای انسانی

می‌شود، آگزوم‌های جداسازی شده پروتئین CD9 را بیان می‌کند.

سطوح بیان نشانگر ویژه آگزومومی (CD9) توسط وسترن بلات ارزیابی شد. همان‌گونه که در شکل ۶ ملاحظه



شکل ۴ میکروگراف‌های SEM از آگزوم‌های جداسازی شده، ذرات کروی محصور شده با غشا با دامنه اندازه ۶۰ الی ۱۰۰ نانومتر را نشان می‌دهد.



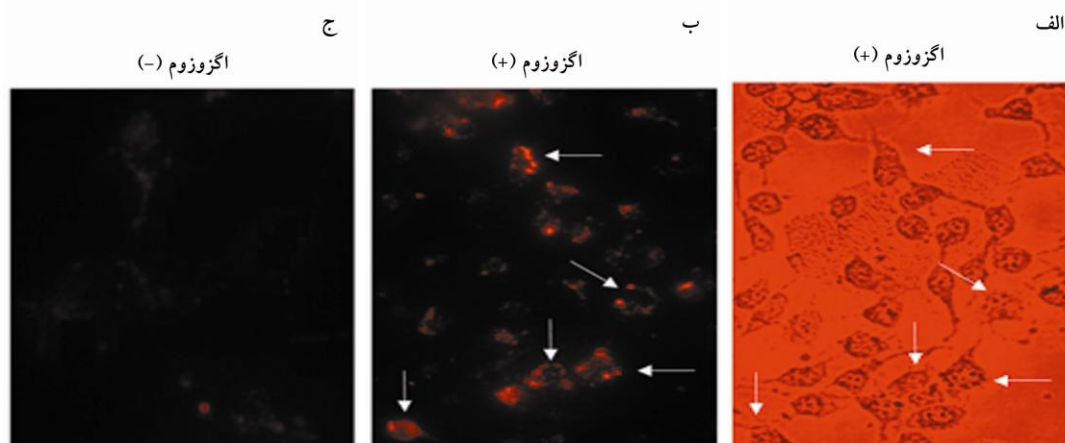
شکل ۵ سنجش اندازه آگزوم‌ها توسط DLS، توزیع اندازه زنگوله‌ای شکل با نقطه اوج حدود ۸۰ نانومتری را نشان داد.

بررسی ورود سلولی اگزوزوم‌های مشتق از سلول‌های بنیادی مزانشیمی

به منظور تعیین قابلیت اگزوزوم‌های مشتق از سلول‌های بنیادی مزانشیمی در ورود به سلول‌های پذیرنده، اگزوزوم‌های نشان‌دار شده با رنگ فلورسنت PKH26 با سلول‌های توموری تخمدان SKOV3 به مدت ۱۲ ساعت انکوبه شدند. آنالیز میکروسکوپ فلورسانس نشان داد که اگزوزوم‌های نشان‌دار شده با رنگ فلورسنت PKH26 در سیتوپلاسم سلول‌های توموری مکان‌یابی می‌شوند (شکل ۷). این امر نشانگر قابلیت جذب اگزوزوم‌های مشتق از مغز استخوان توسط سلول‌های توموری است.



شکل ۶ آنالیز وسترن بلات نشانگر اگزوزومی CD9 در اگزوزوم‌های مشتق از سلول‌های بنیادی مزانشیمی. بیان نشانگر ویژه اگزوزومی (CD9) در اگزوزوم‌های مشتق از سلول‌های بنیادی توسط وسترن بلات شناسایی شد.



شکل ۷ بررسی قابلیت جذب اگزوزوم‌های مشتق از سلول‌های بنیادی مزانشیمی توسط سلول‌های توموری؛ جذب سلولی اگزوزوم‌های نشان‌دار شده و نور فلورسنت قرمز (ب) در مقایسه با نمای مرئی سلول‌ها (الف) نشان داده شده است. نور فلورسنت قرمز در سیتوپلاسم سلول‌های توموری نشان‌دهنده آن است که مقادیر قابل توجهی از اگزوزوم‌های مشتق از سلول‌های بنیادی مزانشیمی توسط سلول‌های توموری جذب شده‌اند. همچنین سلول‌های توموری با رنگ PKH26 در غیاب اگزوزوم به عنوان کنترل منفی انکوبه شدند تا از عدم ورود رنگ تنها به داخل سلول‌های توموری اطمینان حاصل شود (ج).

بحث

اگرچه به کارگیری سلول‌های بنیادی مزانشیمی در میکرومحیط تومور علاقمندی زیادی در چگونگی عملکرد این سلول‌ها در تکوین تومور ایجاد نموده است، مکانیسم دقیقی که در آن سلول‌های بنیادی مزانشیمی با سلول‌های توموری برهم کنش دارند به خوبی شناسایی نشده است. در

این راستا، در دهه گذشته گزارش‌های متناقضی در زمینه آثار پیش‌برنده یا سرکوب‌گر توموری سلول‌های بنیادی مزانشیمی ارائه شده است [۱۴-۱۶]. با وجود این که مطالعات متعدد اشاره به نقش پیش‌برندگی سلول‌های بنیادی مزانشیمی در تومورزایی دارد، مطالعات دیگری نیز وجود دارد که اشاره به آن دارد که سلول‌های بنیادی مزانشیمی پیشرفت تومور را

جدیدی در زمینه کاربردهای درمانی این سلول‌ها در پزشکی بازساختی (Regenerative medicine) ایجاد نموده است. با جایگزینی آگروزوم‌های مشتق از سلول‌های بنیادی مزانشیمی به جای کاربرد مستقیم خود این سلول‌ها، بسیاری از مسایل و نگرانی‌های مرتبط با ایمنی و محدودیت‌های پیوند سلول‌ها از بین می‌رود. به عنوان مثال، استفاده از سلول‌های تکثیرشونده به عنوان عامل درمانی این خطر را به همراه دارد که توانایی زیستی آن طی زمان بیش از حد تشدید یابد و پایدار باقی بماند و پس از آن که درمان خاتمه یافت، آثار آن تخفیف نیابد. این موضوع به‌ویژه اگر قرار باشد درمان به علت بروز نتیجه‌ای ناهنجار خاتمه یابد، می‌تواند نتیجه‌ای وخیم به همراه داشته باشد. علاوه بر از بین رفتن خطر مرتبط با پیوند سلولی (Cell transplantation)، آگروزوم‌ها می‌تواند برخی چالش‌های استفاده از عوامل زیستی کوچک و محلول نظیر عوامل رشد، کموکاین‌ها، سایتوکاین‌ها، عوامل رونویسی، ژن‌ها و RNAها را نیز از بین ببرد. انتقال (Delivery) این عوامل به سلولی که باید به آن وارد شوند یا انتقال به اندام خاصی از سلول در حالی که پایداری، تمامیت و توانایی زیستی‌شان حفظ شود، چالشی پر هزینه است. همانند یک وزیکول غشایی دولایه لیپیدی، آگروزوم نه تنها توانایی حمل یک محموله بزرگ را دارد، بلکه محتوای خود را از اثر عملکرد آنزیم‌های تخریبی و مواد شیمیایی حفظ می‌نماید. به‌عنوان مثال، پروتئین‌ها و RNAها در آگروزوم‌های سلول‌های بنیادی مزانشیمی مادامی که غشای لیپیدی وجود دارد، در مقابل آنزیم‌هایی نظیر تریپسین (Trypsin) و RNase حفاظت می‌شوند [۲۴-۲۶].

آگروزوم‌ها همچنین جذب RNAها و پروتئین‌های درمانی را به سلول آسیب‌دیده تسهیل می‌نمایند. اگرچه جذب سلولی آگروزوم به واسطه اندوسیتوز و ادغام غشایی رخ می‌دهد، مکانیسمی که با آن این فرایندها تنظیم می‌شود نیاز به بررسی‌های بیشتری دارد. در این راستا مشاهده شده است که کارایی جذب آگروزوم ارتباط مستقیمی با اسیدیته درون

مهار می‌نمایند [۱۷-۱۹]. به نظر می‌رسد این تناقض می‌تواند ناشی از مواردی نظیر نوع تومور، مدل توموری (مدل بررسی in vitro یا in vivo)، نا همگونی عملکردی سلول‌های بنیادی مزانشیمی، تنوع در منشأ سلول‌های بنیادی مزانشیمی (به عنوان مثال: سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از مغز استخوان در مقابل سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از بافت نظیر بافت چربی)، دوز (Dosage) یا زمان‌بندی (Timing) سلول‌های بنیادی مزانشیمی تزریق شده، احتمال دخالت مکانیسم‌هایی نظیر پیام‌رسانی کموکاینی (Chemokine signaling)، حمایت عروقی (Vascular support) و تعدیل ایمنی (Immune modulation) باشد [۲۰].

ترشح آگروزوم‌ها توسط سلول‌های بنیادی مزانشیمی به عنوان مکانیسمی نوین در زمینه چگونگی عملکرد پاراکراین (Paracrine) این سلول‌ها در میکرومحیط تومور مطرح است. نقش آگروزوم‌های مشتق از سلول‌های بنیادی مزانشیمی ابتدا در سال ۲۰۱۰ و در مدل موشی آسیب قلبی [۲۱] و پس از آن در سایر مدل‌های بیماری بررسی شد. سلول‌های بنیادی مزانشیمی مقادیر قابل توجهی از میکرووزیکول‌ها و آگروزوم‌ها را ترشح می‌کنند. این آگروزوم‌ها حاوی mRNAهای مختلفی با ویژگی‌های عملکردی و همچنین الگوی ویژه‌ای از microRNAهای بالغ است. این اسیدهای نوکلئیک می‌تواند از طریق آگروزوم‌ها به سلول‌های پذیرنده وارد و از این راه تغییرات عملکردی و فنوتیپی را در آن سلول‌ها القا نماید. این امر این احتمال را بر می‌انگیزد که سلول‌های بنیادی ممکن است آثار زیستی‌شان را با انتقال اطلاعات ژنتیکی و تغییر در بیان ژن‌های سلول هدف به واسطه انتقال آگروزومی mRNAها و miRNAها انجام دهند. بنابراین آگروزوم ممکن است با حمل الگوهای ویژه‌ای از پروتئین‌ها، لیپیدها و اسیدهای نوکلئیک به سلول‌های پذیرنده به عنوان عوامل پاراکراین بالقوه در پیام‌رسانی میان سلول‌های بنیادی و سلول‌های تمایز یافته عمل نماید [۲۲، ۲۳].

فرضیه عملکرد پاراکراین سلول‌های بنیادی مزانشیمی بعد

سلول و میکرومحیط آن دارد [۲۷-۲۹]. با وجود این که اندازه اگزوزوم‌ها از یک سلول کوچک‌تر است موجودیت زیستی پیچیده‌ای به واسطه حضور پروتئین‌ها و RNAهای درونشان دارد و این ویژگی، آن‌ها را به‌عنوان کاندیدای درمانی ایده‌آل برای درمان آسیب‌هایی نظیر آسیب‌های قلبی، التهاب یا سرطانی مطرح می‌نماید [۲۵].

تاکنون استراتژی‌های مختلفی برای جداسازی اگزوزوم‌ها مطرح شده است. یکی از روش‌های قابل قبول برای جداسازی اگزوزوم‌ها استفاده از اولتراسانتریفوژ است. این روش اگزوزوم‌های نسبتاً زیادی را رسوب می‌دهد و قابلیت افزایش تناسب (Scale up) دارد. هرچند ممکن است اگزوزوم جداسازی شده با مولکول‌های زیستی دیگر نظیر پروتئین‌ها آلودگی داشته باشد و تجمعات اگزوزومی (Aggregates) ایجاد شود. پیشنهاداتی وجود دارد که استفاده از اولتراسانتریفوژ همراه با شیب چگالی سوکروز اگزوزوم‌های خالص‌تری عاری از هرگونه آلودگی و تجمعات ایجاد نماید. با این حال آلودگی نهایی اگزوزوم‌ها با سوکروز به‌عنوان واکنش‌گر ایجاد کننده شیب غلظت (Gradient reagent) ممکن است تداخلاتی در زمینه مطالعه عملکرد اگزوزوم‌ها ایجاد نماید [۳۰، ۳۱]. در سال ۲۰۰۷ پرووانکی (Cheruvanky) و همکارانش [۳۲] جداسازی اگزوزوم‌ها را بر اساس روش‌های مبتنی بر اولترافیلتراسیون انجام دادند که در مقایسه با روش اولتراسانتریفوژ زمان کمتری را صرف می‌نماید و نیازی نیز به تجهیزات ویژه ندارد. همچنین در برخی از مطالعات از روش‌های مبتنی بر کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالا (High-Performance Liquid Chromatography: HPLC) برای جداسازی اگزوزوم‌ها استفاده شده است. با این حال این روش نیازمند تجهیزات مرتبط بوده و امکان افزایش تناسب برای آن وجود ندارد [۲۱]. رسوب گذاری با پلیمرها نیز مزایایی نظیر جداسازی ملایم اگزوزوم‌ها در pH خنثی دارد. برخی کیت‌های تجاری از پلی اتیلن گلیکول (Polyethylene glycol: PEG) برای

جداسازی اگزوزوم‌ها استفاده می‌نماید. در این زمینه، شرکت System Biosciences (آمریکا) واکنش‌گری اختصاصی با نام تجاری ExoQuick ارائه داده است که توانایی رسوب گذاری اگزوزوم از محیط کشت، سرم، پلاسما و سایر مایعات بدن را دارد. با این حال آلودگی اگزوزوم‌های جداسازی شده با سایر مولکول‌ها مشکلی عمده در این گونه روش‌های جداسازی مبتنی بر پلیمر (Polymer-based isolation methods) است که می‌تواند تداخلاتی در آزمایش‌های بعدی ایجاد نماید [۳۳]. به نظر می‌رسد هرکدام از روش‌های جداسازی مزایا و معایب خود را داشته باشد؛ بنابراین هنگام انتخاب استراتژی تخلیص در یک آزمایش مشخص، ممکن است استفاده ترکیبی از دو روش (جداسازی براساس صاف کردن پیش از انجام اولتراسانتریفوژ یا کروماتوگرافی) ایده‌آل باشد [۳۱].

در این مطالعه، سلول‌های بنیادی مزانشیمی پس از جداسازی از مغز استخوان کشت داده و تأیید هویت شدند. همچنین در مطالعه حاضر از روشی استفاده شد که در آن راه‌کاری کارآمد مبتنی بر استفاده از سانتریفوژ افتراقی و صاف کردن پیش از انجام اولتراسانتریفوژ برای جداسازی اگزوزوم‌ها از محیط کشت سلول‌های بنیادی مزانشیمی ارائه شد. کارآمدی روش ارائه شده برای جداسازی اگزوزوم‌ها توسط روش‌هایی که اندازه، شکل ظاهری و بیان نشانگرهای سطحی ویژه اگزوزوم را ارزیابی می‌نماید، بررسی شد. یافته‌های مطالعه حاضر نشان داد اگزوزوم‌های مشتق از سلول‌های بنیادی مزانشیمی و زیکول‌های کروی با دامنه اندازه‌ای ۳۰ الی ۱۰۰ نانومتر هستند و نشانگر ویژه اگزوزومی یعنی CD9 را در سطح خود بیان می‌نماید. در ادامه یکی از چالش‌های پیش رو قابلیت جذب سلولی اگزوزوم‌ها است. در این راستا، سلول‌های توموری تخمدان با اگزوزوم‌های نشان‌دار شده با رنگ فلورسنت PKH26 تیمار شدند. روند نشان‌دار شدن به واسطه واکنش رنگ لیوفیل با غشای اگزوزومی انجام می‌شود. شدت نشان‌دار شدن به دو عامل غلظت رنگ و غلظت اگزوزوم بستگی دارد. نشان‌دار شدن

تشکر و قدردانی

مطالعه حاضر بخشی از پایان نامه کارشناسی ارشد رشته ژنتیک مولکولی است که با پشتیبانی مالی دانشگاه تربیت مدرس و ستاد توسعه علوم و فناوریهای سلولهای بنیادی معاونت علمی و فناوری ریاست جمهوری (موافقت نامه ۱۱/۷۶۰۸۹) انجام شده است. نویسندگان مراتب قدردانی خود را نسبت به معاونت محترم پژوهشی دانشگاه تربیت مدرس و همچنین معاونت علمی و فناوری ریاست جمهوری اعلام می‌دارند.

بیش از اندازه سبب از بین رفتن یکپارچگی غشا و کاهش بازیابی اگزوزومها می‌شود. در این مطالعه مشخص شد سلولهای توموری در پی تیمار اگزوزومی، قادر به جذب مقادیر قابل توجهی از اگزوزومهای مشتق از سلولهای بنیادی مزانشیمی بودند. در مجموع، روش ارایه شده در زمینه جداسازی اگزوزومها و تأیید ماهیت و جذب آنها توسط سلولهای توموری تخمدان، گامی مهم و پیش نیاز در زمینه درک عملکرد پاراکراین سلولهای بنیادی مزانشیمی در میکرومحیط تومور است. همچنین توانایی در مطالعه بیولوژی جذب اگزوزومها توسط سلولهای سرطانی می‌تواند فرصت‌های جدیدی در زمینه بررسی‌های عملکردی این نانوزیکول‌های طبیعی و محتویات آنها در زمینه درمان

منابع

- [1] Nombela-Arrieta C, Ritz J, Silberstein LE. The elusive nature and function of mesenchymal stem cells. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2011; 12(2): 126-31.
- [2] Curley GF, Ansari B, Hayes M, Devaney J, Masterson C, Ryan A, Barry F, O'Brien T, Toole DO, Laffey JG. Effects of intratracheal mesenchymal stromal cell therapy during recovery and resolution after ventilator-induced lung injury. *Anesthesiology* 2013; 118(4): 924-32.
- [3] Hall B, Andreeff M, Marini F. The participation of mesenchymal stem cells in tumor stroma formation and their application as targeted-gene delivery vehicles. *Handb Exp Pharmacol* 2007; (180): 263-83.
- [4] Schichor C, Birnbaum T, Etminan N, Schnell O, Grau S, Miebach S, Aboody K, Padovan C, Straube A, Tonn JC, Goldbrunner R. Vascular endothelial growth factor A contributes to glioma-induced migration of human marrow stromal cells (hMSC). *Exp Neurol* 2006; 199(2): 301-10.
- [5] Motavaf M, Pakravan K, Babashah S, Malekvandfard F, Masoumi M, Sadeghizadeh M. Therapeutic application of mesenchymal stem cell-derived exosomes: A promising cell-free therapeutic strategy in regenerative medicine. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* 2016; 62(7): 74-9.
- [6] Abounit S, Zurzolo C. Wiring through tunneling nanotubes--from electrical signals to organelle transfer. *J Cell Sci* 2012; 125(Pt 5): 1089-98.
- [7] Bobrie A, Colombo M, Raposo G, Théry C. Exosome secretion: molecular mechanisms and roles in immune responses. *Traffic* 2011; 12(12): 1659-68.
- [8] Mathivanan S, Fahner CJ, Reid GE, Simpson RJ. *ExoCarta* 2012: database of exosomal proteins, RNA and lipids. *Nucleic Acids Res* 2012; 40(Database issue): D1241-4.

- [9] Vlassov AV, Magdaleno S, Setterquist R, Conrad R. Exosomes: current knowledge of their composition, biological functions, and diagnostic and therapeutic potentials. *Biochim Biophys Acta* 2012; 1820(7): 940-8.
- [10] Yang C, Robbins PD. The roles of tumor-derived exosomes in cancer pathogenesis. *Clin Dev Immunol* 2011; 2011: 842849.
- [11] Tsao CR, Liao MF, Wang MH, Cheng CM, Chen CH. Mesenchymal Stem Cell Derived Exosomes: A New Hope for the Treatment of Cardiovascular Disease? *Acta Cardiol Sin* 2014; 30(5): 395-400.
- [12] Lai RC, Yeo RW, Lim SK. Mesenchymal stem cell exosomes. *Seminars in Cell & Developmental Biology* 2015; 40:82-8.
- [13] Théry C, Ostrowski M, Segura E. Membrane vesicles as conveyors of immune responses. *Nat Rev Immunol* 2009; 9(8): 581-93.
- [14] Djouad F, Plence P, Bony C, Tropel P, Apparailly F, Sany J, Noël D, Jorgensen C. Immunosuppressive effect of mesenchymal stem cells favors tumor growth in allogeneic animals. *Blood* 2003; 102(10): 3837-44.
- [15] Galìè M, Konstantinidou G, Peroni D, Scambi I, Marchini C, Lisi V, Krampera M, Magnani P, Merigo F, Montani M, Boschi F, Marzola P, Orrù R, Farace P, Sbarbati A, Amici A. Mesenchymal stem cells share molecular signature with mesenchymal tumor cells and favor early tumor growth in syngeneic mice. *Oncogene* 2008; 27(18): 2542-51.
- [16] Kamoub AE, Dash AB, Vo AP, Sullivan A, Brooks MW, Bell GW, Richardson AL, Polyak K, Tubo R, Weinberg RA. Mesenchymal stem cells within tumour stroma promote breast cancer metastasis. *Nature* 2007; 449(7162): 557-63.
- [17] Cousin B, Ravet E, Poglio S, De Toni F, Bertuzzi M, Lulka H, Touil I, André M, Grolleau JL, Péron JM, Chavoin JP, Bourin P, Pénicaud L, Casteilla L, Buscail L, Cordelier P. Adult stromal cells derived from human adipose tissue provoke pancreatic cancer cell death both in vitro and in vivo. *PLoS One* 2009; 4(7): e6278.
- [18] Khakoo AY, Pati S, Anderson SA, Reid W, Elshal MF, Rovira II, Nguyen AT, Malide D, Combs CA, Hall G, Zhang J, Raffeld M, Rogers TB, Stetler-Stevenson W, Frank JA, Reitz M, Finkel T. Human mesenchymal stem cells exert potent antitumorigenic effects in a model of Kaposi's sarcoma. *J Exp Med* 2006; 203(5): 1235-47.
- [19] Secchiero P, Zorzet S, Tripodo C, Corallini F, Melloni E, Caruso L, Bosco R, Ingrao S, Zavan B, Zauli G. Human bone marrow mesenchymal stem cells display anti-cancer activity in SCID mice bearing disseminated non-Hodgkin's lymphoma xenografts. *PLoS One* 2010; 5(6): e11140.
- [20] Klopp AH, Gupta A, Spaeth E, Andreeff M, Marini F 3rd. Concise review: Dissecting a discrepancy in the literature: do mesenchymal stem cells support or suppress tumor growth? *Stem Cells* 2011; 29(1): 11-9.
- [21] Lai RC, Arslan F, Lee MM, Sze NS, Choo A, Chen TS, Salto-Tellez M, Timmers L, Lee CN, El Oakley RM, Pasterkamp G, de Kleijn DP, Lim SK. Exosome secreted by MSC

- reduces myocardial ischemia/reperfusion injury. *Stem Cell Res* 2010; 4(3): 214-22.
- [22] Collino F, Deregibus MC, Bruno S, Sterpone L, Aghemo G, Viltono L, Tetta C, Camussi G. Microvesicles derived from adult human bone marrow and tissue specific mesenchymal stem cells shuttle selected pattern of miRNAs. *PLoS One* 2010; 5(7): e11803.
- [23] Mause SF, Weber C. Microparticles: protagonists of a novel communication network for intercellular information exchange. *Circ Res* 2010; 107(9): 1047-57.
- [24] Chen TS, Lai RC, Lee MM, Choo AB, Lee CN, Lim SK. Mesenchymal stem cell secretes microparticles enriched in pre-microRNAs. *Nucleic Acids Res* 2010; 38(1): 215-24.
- [25] Lai RC, Chen TS, Lim SK. Mesenchymal stem cell exosome: a novel stem cell-based therapy for cardiovascular disease. *Regen Med* 2011; 6(4): 481-92.
- [26] Mirotsou M, Jayawardena TM, Schmeckpeper J, Gneccchi M, Dzau VJ. Paracrine mechanisms of stem cell reparative and regenerative actions in the heart. *J Mol Cell Cardiol* 2011; 50(2): 280-9.
- [27] Feng D, Zhao WL, Ye YY, Bai XC, Liu RQ, Chang LF, Zhou Q, Sui SF. Cellular internalization of exosomes occurs through phagocytosis. *Traffic* 2010; 11(5): 675-87.
- [28] Parolini I, Federici C, Raggi C, Lugini L, Palleschi S, De Milito A, Coscia C, Iessi E, Logozzi M, Molinari A, Colone M, Tatti M, Sargiacomo M, Fais S. Microenvironmental pH is a key factor for exosome traffic in tumor cells. *J Biol Chem* 2009; 284(49): 34211-22.
- [29] Tian T, Wang Y, Wang H, Zhu Z, Xiao Z. Visualizing of the cellular uptake and intracellular trafficking of exosomes by live-cell microscopy. *J Cell Biochem* 2010; 111(2): 488-96.
- [30] Zeringer E, Barta T, Li M, Vlassov AV. Strategies for isolation of exosomes. *Cold Spring Harb Protoc* 2015; 4: 319-23.
- [31] Xitong D, Xiaorong Z. Targeted therapeutic delivery using engineered exosomes and its applications in cardiovascular diseases. *Gene* 2016; 575(2 Pt 2): 377-84.
- [32] Cheruvanky A, Zhou H, Pisitkun T, Kopp JB, Knepper MA, Yuen PS, Star RA. Rapid isolation of urinary exosomal biomarkers using a nanomembrane ultrafiltration concentrator. *Am J Physiol Renal Physiol* 2007; 292(5): F1657-61.
- [33] Momen-Heravi F, Balaj L, Alian S, Mantel PY, Halleck AE, Trachtenberg AJ, Soria CE, Oquin S, Bonebreak CM, Saracoglu E, Skog J, Kuo WP. Current methods for the isolation of extracellular vesicles. *Biol Chem* 2013; 394(10): 1253-62.