

## غشای نازک کیتوسان - ژلاتین (Ch-G) به همراه سلول‌های مزانشیمی مغز استخوان (BMSCs): مدلی نوین به عنوان یک بیوجسب پانسمان

تاریخ دریافت مقاله: ۹۳/۱۰/۲۹ ؛ تاریخ پذیرش: ۹۳/۱۲/۵

### چکیده

عسگر امامقلی<sup>۱،۴</sup>، غلامرضا کاکا<sup>۲\*</sup>، مینو صدیقی<sup>۳</sup>، غلامرضا حرفه دوست، صالح نجفی<sup>۴</sup>، سید همایون صدراپی<sup>۱</sup>

<sup>۱</sup> کارشناس ارشد نانوتکنولوژی پزشکی، مرکز تحقیقات علوم اعصاب، دانشگاه علوم پزشکی بقیه ا... (عج)، تهران، ایران  
<sup>۲</sup> دانشیار، مرکز تحقیقات علوم اعصاب و گروه آناتومی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه ا... (عج)، تهران، ایران  
<sup>۳</sup> دانشیار، پژوهشکده فناوری‌های زیستی، دانشگاه صنعتی مالک اشتر، تهران، ایران  
<sup>۴</sup> کارشناس ارشد بیوتکنولوژی میکروبی، گروه زیست‌شناسی، دانشگاه پیام‌نور شرق، تهران، ایران

**زمینه و هدف:** روش‌های مختلفی برای ترمیم نقص و آسیب‌های وارده بر بدن مانند انواع زخم‌ها و بریدگی‌ها از دیر باز وجود داشته و مورد استفاده قرار گرفته است. مواد زیست‌سازگار زیادی برای اهداف داخل بدن به کارگیری می‌شوند که کیتوسان و ژلاتین از جمله آن‌ها می‌باشند. از طرفی، اخیراً استفاده و به کارگیری سلول‌ها به ویژه سلول‌های مزانشیمی مغز استخوان (BMSCs) به دلیل تولید انواع و اقسام فاکتورهای رشد و فاکتورهای تروفیک در تسریع بهبود و ترمیم مورد توجه فراوان قرار گرفته است.

**مواد و روش‌ها:** در این مطالعه یک نوع غشای نازک حاصل از محلول پلیمری (Ch-G) از روش ریختگی مخلوط به همراه سلول‌های BMSCs تهیه گردید. برای این منظور سلول‌های BMSCs پس از چهار مرحله پاساژ، بر روی غشای نازک (Ch-G) کشت داده شد. چسبندگی و شکل سلول‌های BMSCs توسط میکروسکوب اینورت، میزان خلوص و بنیادی بودن آن‌ها پس از روز ششم به روش ایمنوسیتوشیمی مورد بررسی قرار گرفت.

**یافته‌ها:** تصاویر نشان داد که این سلول‌ها در طول این مدت تکثیر مناسب و مرگ سلولی اندک بر روی غشا داشتند. نتایج حاکی از عدم اختلاف معنی دار بین سلول‌ها بر روی غشای نازک (Ch-G) در مقایسه با گروه شاهد داشت.

**نتیجه‌گیری:** با توجه به اینکه سلول‌های BMSCs به راحتی می‌توانند بر روی غشای نازک (Ch-G)، رشد و تکثیر مناسب داشته باشند، بنابراین می‌تواند پوشش مناسب از سلول-غشا به عنوان یک بیوجسب پانسمان جهت ترمیم بعضی از نقص‌ها، زخم‌ها و شکستگی‌های استخوانی مورد استفاده قرار گیرد.

**کلمات کلیدی:** ژلاتین، کیتوسان، سلول‌های BMSCs، غشای نازک

### نویسنده مسئول:

دانشیار مرکز تحقیقات علوم اعصاب و گروه آناتومی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه ا... (عج)، تهران، ایران

۰۹۱۲-۷۲۰۲۵۶۳  
E-mail: Gh\_kaka@yahoo.com

## مقدمه

فاکتورهای تروفیک و سایتوکاینها می‌باشند.<sup>۵</sup> یکی از اهداف تحقیق بر روی سلول‌های BMSCs، استفاده از آنها در کلینیک و جهت درمان بیماریها و ضایعات وارد بر ارگان‌های مختلف بدن می‌باشد. که به نظر می‌رسد سلول‌های BMSCs، گزینه‌ای مناسب برای این منظور باشند.<sup>۶</sup> با توجه به آنچه بیان شد برای اینکه این دو روش درمانی را در هم ادغام، و به طور هم زمان انجام داد، لازم بود که زیست سازگاری این سلول‌ها به همراه غشای نازک (Ch-G)، مورد بررسی و ارزیابی قرار گیرد تا بتوان مدلی کاربردی از پوشش جهت ترمیم و بهبود نقص، زخم و شکستگی‌های جزئی استخوان به همراه سلول‌های BMSCs ارائه داد.

## مواد و روش

### مواد

کیتوسان با وزن ملکولی پایین (Mw=190kd) با ۸۵٪ دی‌استیله از شرکت سیگما، استیک اسید گلاسیال، پودر ژلاتین، تریپسین ۰/۲۵٪، اتیلن دی تترآمین ۰/۰۴٪ (EDTA 0.04%)، معرف‌ها و رنگ‌ها از شرکت مرک آلمان، کتامین و زایلازین از شرکت آلفاسن هلند، محیط کشت  $\alpha$ -MEM از شرکت جیبکوی و موش‌های رت جهت استخراج (BMSCs)، از آزمایشگاه حیوانات آزمایشگاهی مرکز تحقیقات علوم اعصاب پژوهشگاه بقیه ... (عج) تهیه شد.

### تکنیک ساخت غشای نازک

برای تهیه غشا از روش ریختگی مخلوط<sup>۷</sup> استفاده شد، بدین منظور طبق جدول (۱) ابتدا کیتوسان با نسبت ۱٪ وزنی به محلول آب مقطر دو بار تقطیر که در بشری روی درجه حرارت ۴۰ درجه سانتی گراد در حال هم خوردن است اضافه شد. سپس میزان ۰/۵ میلی لیتر اسید استیک خالص به آن اضافه شد. در بشر دیگری ژلاتین با نسبت ۱۰٪ وزنی به محلول آب مقطر ۲ بار تقطیر اضافه و سپس محلول به بشر اول روی همزن اضافه شد. برای تهیه نمونه‌ها با درصدهای مختلف از همین شیوه استفاده شد. نمونه‌های محلول به مدت ۲ ساعت و دمای ۳۷ درجه روی دستگاه گرم کننده-همزن قرار داده شد تا کاملاً هم خورد. سپس به تمام نمونه‌ها ۰/۲۵٪ گلو تاردهید اضافه شد.

تاکنون روش‌های مختلفی برای ترمیم نقص به ویژه نقص‌های جزئی استخوان ابداع شده و مورد استفاده قرار گرفته اند، در روش‌های قبلی، مشکلاتی همچون، عدم زیست سازگاری و زیست تخریب پذیری پانسما، نیاز به تعویض پانسما و در نتیجه درد، عفونت و ایجاد اسکار وجود داشت.<sup>۱</sup> تلاش‌های زیادی برای رفع این مشکل انجام گرفته و امروزه موفقیت‌های چشمگیری برای دستیابی و معرفی موادی که کمترین ضرر را برای بدن داشته باشند به دست آمده است. کیتوسان یک کوپلیمر متشکل از دو واحد N-glucosamine و N-acetyl-glucosamine است که در کنار هم قرار گرفته اند. کیتوسان یک کربوهیدرات اصلاح شده از کیتین می‌باشد و به عنوان دومین بیوپلیمر فراوان در طبیعت پس از سلولز شناخته می‌شود.<sup>۲</sup> سیستیک مربوط به چسبندگی، مهاجرت و رشد تعدادی از سلول‌ها مانند کراتینوسیت‌ها و فیروبلاست‌ها بستگی به درجه استیلایسیون (DDA) کیتوسان دارد. تخریب پذیری آنزیمی کیتوسان همراه با شباهت ساختاری که به ماتریس خارج سلولی (گلیکوز آمینو گلیکان‌ها) دارد باعث می‌شود که در ترمیم بعضی از بافت‌ها مانند بافت استخوان بسیار با اهمیت باشد. ژلاتین پلیمری طبیعی است که از کلاژن مشتق می‌شود و کاربردهای بسیاری را در زمینه پزشکی به خود اختصاص داده است. ساختار ژلاتین متشکل از زنجیره‌های پلی پپتیدی است اما نسبت به ساختار کلاژن از نظم کمتری برخوردار است به طوری که فاقد ساختمان رشته‌های درهم پیچیده است. ژلاتین یکی از معدود موادی است که محتوی پلیمری آن بالاست بطوریکه حدود ۹۸٪ آن را آمینواسیدها تشکیل می‌دهند. یکی از ویژگی‌های مفید ژلاتین حلالیت خوب آن در آب است که می‌تواند با آب وارد واکنش شده و ایجاد پیوند هیدروژنی نماید.<sup>۳</sup> مشکل اصلی در استفاده از این پلیمر طبیعی در کاربردهای پزشکی، عدم استحکام کافی این ماده است. همچنین ژلاتین در محیط بدن به تنهایی پایداری لازم را ندارد و به سرعت دچار تخریب می‌شود که به همین دلایل ترجیح داده می‌شود به صورت کامپوزیت با مواد دیگر مورد استفاده قرار بگیرد.<sup>۴</sup> از طرفی مطالعات نشان می‌دهند که سلول‌های BMSCs در محیط کشت، قادر به تولید انواعی از فاکتورهای رشد، مانند HGF, VEGF, NGF و BDNF و

جدول ۱: میزان حضور مواد مختلف در تهیه نمونه ها

نمونه‌ها	کیتوسان		ژلاتین		گلو تار آلدهید
	گرم	غلظت (%)	گرم	غلظت (%)	
(Ch3-G1)	۰/۵	۱	۰/۱۶۵	۱۰	۰/۲۵
(Ch1-G1)	۰/۵	۱	۰/۵	۱۰	۰/۲۵
(Ch1-G3)	۰/۵	۱	۱/۵	۱۰	۰/۲۵

آن‌ها توسط تریپان بلو، تعداد  $5 \times 10^3$  سلول به هر کدام از پلیت‌های کشت سلولی اضافه شد و سپس در انکوباتور CO<sub>2</sub> ۵٪ و دمای ۳۷ درجه سانتیگراد قرار داده شد. برای بررسی میزان رشد و تکثیر سلول‌های زنده، هر کدام از خانه‌های مورد نظر در روزهای دوم، چهارم و ششم با میکروسکوپ اینورت (Leica / آلمان) مشاهده و توسط دوربین دیجیتال متصل به میکروسکوپ (INFINITY1 کانادا) عکس گرفته شد. جهت شمارش سلول‌ها، ۵ میدان میکروسکوپی با بزرگنمایی 100x به صورت تصادفی انتخاب، و تعداد سلول‌ها در هر میدان شمارش و میانگین آن گرفته شد و این کار تا سه بار، و هر دفعه در چهار خانه تکرار شد.

#### ایمونوسیتوشیمی

سلول‌ها در پایان روز ششم جهت ثبوت به مدت ۳۰ دقیقه در معرض فرمالین ۱۰٪ قرار گرفته، سپس سلول‌ها با PBS سه مرتبه ۵ دقیقه‌ای شسته شدند. نمونه‌ها در معرض مخلوط سرم بز ۱۰٪ و Triton X-100 ۰/۳ درصد به مدت یک ساعت قرار داده شد. پس از رقیق نمودن ۱:۱۰۰ آنتی بادی‌های اولیه ضد موشی Fibronectin و CD44 جهت تعیین بنیادی و استرومایی بودن سلول‌ها، مدت یک شب در درجه حرارت ۴ درجه سانتیگراد انکوبه شد. سلول‌ها پس از انجام شستشو با PBS مانند قبل مدت دو ساعت در دمای محیط در معرض آنتی بادی ثانویه ضد موشی (۱:۲۰۰) کونزوگه به FITC قرار گرفت. سپس شستشو با PBS انجام شد. نمونه‌ها توسط میکروسکوپ فلورسانس اینورت (Leica / آلمان) مورد بررسی قرار گرفت. جهت شمارش سلول‌ها از اتیدیوم بروماید ۰/۰۱ درصد به مدت یک دقیقه استفاده و شستشو توسط PBS انجام شد.

سپس از هر کدام از نمونه‌ها به میزان ۷ میلی لیتر در پتری دیش‌هایی به قطر ۷۵ میلی متر ریخته شد. سپس در دمای اتاق (۲۵ درجه) قرارداده شد تا با تبخیر حلال، غشاها تشکیل شود. سپس غشاها به آرامی به مدت ۱۰ دقیقه داخل اتانول ۱۰۰ درصد گذاشته شد تا تثبیت شود. سپس با آب دوبار تقطیر شست و شو داده شد.

#### استخراج سلول‌های BMSCs

با رعایت اصول کار با حیوانات آزمایشگاهی، مغز استخوان حاوی سلول‌های BMSCs از داخل کانال استخوان ران موش صحرائی بالغ نژاد ویستار اسپیره شد. با استفاده از یک سرنگ ۵ml حاوی یک میلی لیتر محیط کشت  $\alpha$ -MEM، محتوی داخل سرنگ در زیر هود در پلیت ۶ سانتی حاوی محیط و 10% FBS ریخته، و سپس در انکوباتور CO<sub>2</sub> (MMM/انگلیس) قرار گرفت. پس از گذشت ۲۴ ساعت محیط کشت سلولی با محیط تازه تعویض شد. سلول‌های استرومائی چسبیده به کف فلاسک باقی مانده و سلول‌های خونی شناور حذف شدند. هنگامی که تراکم سلول‌های چسبیده به کف فلاسک به ۷۰ تا ۸۰ درصد رسید سلول‌ها توسط 0.25% Trypsin و 0.04% EDTA پاساژ داده شدند. این عمل تا چهار پاساژ ادامه یافت.

#### کشت سلول و بررسی تکثیر آن

ابتدا غشاهای مورد نظر توسط ژلاتین ۱٪ به کف پلیت ۲۴ خانه‌ای چسبانده شد، و سپس توسط الکل ۷۰٪ استریل شدند. از سلول‌های BMSCs پاساژ چهارم مرحله قبل سوسپانسیون سلولی تهیه و پس از بررسی تعداد در واحد حجم و زنده و مرده بودن

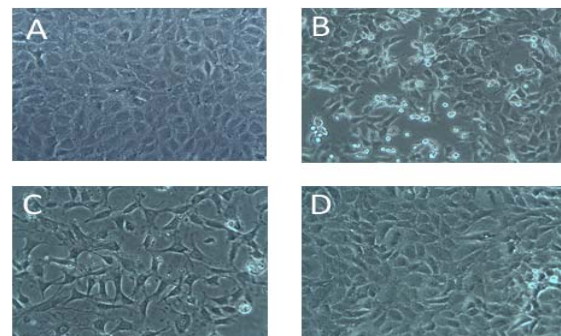
## تجزیه و تحلیل آماری

تمام مقادیر پس از سه دفعه تکرار بر حسب Mean±SEM ارایه شده است. اطلاعات بدست آمده توسط روش آماری آنالیز واریانس یک طرفه (ANOVA) و آزمون Tukey مورد مقایسه قرار گرفته و سطح معنی داری در حد  $P < 0.05$  در نظر گرفته شد.

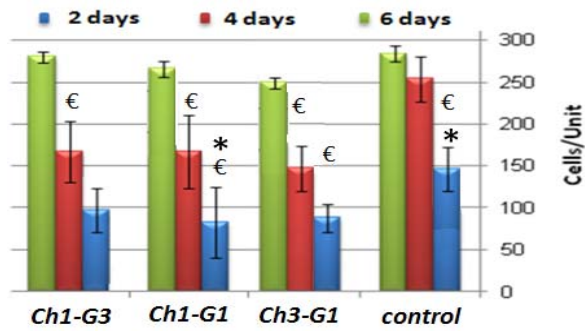
## نتایج

### میزان تکثیر

همانطور که در شکل (A-1) مشاهده می‌شود، میزان حضور و چسبندگی سلول‌ها در سطح نمونه کنترل (شاهد) بالاست، تمام سلول‌ها زنده و دارای اشکال چند وجهی هستند و تمام سطح پلیت را پوشانده اند و تکثیر به طور کامل صورت گرفته است. با توجه به شکل (B-1) تعداد سلول‌های چسبیده به غشا نسبت به نمونه شاهد کاهش پیدا کرده اند و سلول‌های کمتری ساختار چند وجهی مناسبی روی غشا دارند و تعدادی سلول‌های کروی (احتمالاً مرده) در نمونه‌ها دیده می‌شود. با توجه به شکل (C-1) میزان چسبندگی سلول‌ها در نمونه حاوی درصدی یکسان از کیتوسان و ژلاتین به سطح غشا به طرز قابل توجهی افزایش پیدا کرده و اما همچنان سلول‌های کروی یافت می‌شوند که نتوانسته اند به سطح بچسبند. با توجه به شکل (D-1) سلول‌ها دارای اشکال کاملاً چند وجهی بوده، سطح نمونه غشا را به طور کامل پر نموده اند و سلول‌های کمتری در آن وجود دارد که نشان از چسبندگی بسیار بالای سلول‌ها به نمونه دارد.

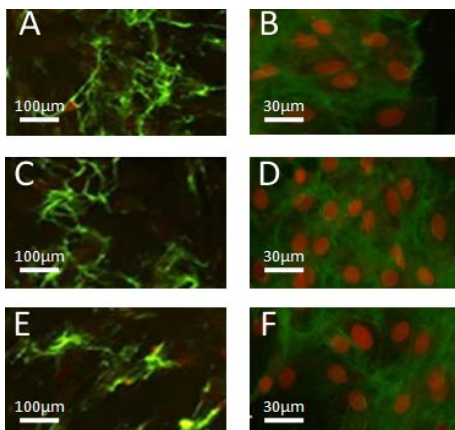


شکل ۱: تصاویر سلول‌های BMSCs بر روی غشای نازک کیتوسان - ژلاتین. (A) گروه شاهد، (B) گروه (Ch3-G1)، (C) گروه (Ch1-G1) و (D) و (G1) گروه (Ch1-G3)



\* وجود اختلاف معنی دار با روز ۴ € وجود اختلاف معنی دار با روز ۶  
شکل ۲: مقایسه میانگین میزان تکثیر سلول‌های BMSCs در گروه‌های مختلف را نشان می‌دهد.

همانطور که در شکل (۲) نشان داده می‌شود در گروه‌های شاهد، و Ch1-G1 افزایش معنی داری در روز چهارم نسبت به روز دوم مشاهده می‌شود در حالی که این اختلاف در گروه Ch3-G1 و Ch1-G3 معنی دار نیست. میانگین میزان تکثیر سلول‌ها در هر سه نوع غشا در روز ششم بطور معنی داری نسبت به روز چهارم بیشتر است در حالی که در بین روزهای چهارم و ششم فقط در گروه شاهد این گونه نیست.



شکل ۳: رنگ آمیزی ایمونوفلورسانس آنتی بادیهای اولیه Fibronectin (تصاویر سمت چپ) و CD44 (تصاویر سمت راست) از سلول‌های BMSCs می‌باشد. تابش نور فلورسانس مرتبط با FITC کوئژوگه به آنتی بادی ثانویه ضد موشی است که به رنگ سبز دیده می‌شود. (A) و (B) (Ch3-G1)، (C) و (D) (Ch1-G1)، (E) و (F) (Ch1-G3) می‌باشد.

## ایمونوسیتوشیمی

جهت ارزیابی خلوص و اثبات عدم تمایز سلول‌های BMSCs، از رنگ آمیزی ایمونوسیتوشیمی استفاده گردید.

شکل ۳ تصاویر فلوروسنت از رنگ آمیزی ایمونوفلورسانس آنتی‌بادی اولیه آنتی Fibronectin و آنتی CD44 سلول‌های BMSCs را نشان می‌دهد در این مرحله سلول‌های سبز رنگ با هسته‌های قرمز نشان دهنده بنیادی بودن و استرومایی بودن سلول‌ها بوده و نشان دهنده این است که سلول‌ها در مواجهه با غشای نازک کیتوسان - ژلاتین تمایز نیافتند و اختلاف مشخصی بین گروه‌ها وجود نداشت.

## بحث

امروزه روش‌های درمانی نقص یا آسیب در بدن، استفاده از لایه‌های بسیار نازک تهیه شده از پلیمرهای زیست سازگار و زیست تخریب پذیر به ویژه کیتوسان و ژلاتین می‌باشد. آزمایشات و تجربیات مختلف، نشان داده است که در این روش سرعت ترمیم جراحی و بهبود نقص و آسیب، نسبت به سایر روش‌های مرسوم، بیشتر بوده و خود این پلیمرها به لحاظ زیست سازگاری و عدم تحریک پاسخ‌های دفاعی بدن نقش موثری در ترمیم و بهبودی دارند.<sup>۸-۹</sup>

در مطالعه‌ای که شهرام و همکارانش انجام دادند، نشان دادند که می‌توان غشاهای نازک کیتوسان و ژلاتین با نسبت‌های متفاوت از آنها ساخت که دارای مقاومت مناسب از لحاظ مکانیکی باشند. همچنین نشان دادند که نمونه‌هایی با درصد گلو تار آلدهید کمتر از ۱ درصد، سلول‌های فیبروبلاست رشد و تکثیر یافته اند و افزایش درصد گلو تار آلدهید بیش از ۱ درصد اثر مخربی روی زیست سازگاری نمونه غشاها دارد و عنوان کردند که نمونه غشاها با ۲۵٪ گلو تار آلدهید نتایج مثبتی برای کاربرد داشته اند و در مواجهه با سلول‌های فیبروبلاست سمیتی از خودشان نشان ندادند. باتوجه به این به نظر می‌رسد یکی از دلایل عدم تمایل سلول‌ها به چسبیدن روی غشای کیتوسانی را باید در ساختار، و نیز درجه DDA آن جستجو نمود که DDA در کیتوسان استفاده شده در تحقیقش کم و در حدود ۳۳ درصد بوده است.<sup>۴</sup> DDA در کیتوسان استفاده شده در

تحقیق ما در حدود ۷۵-۸۰ درصد می‌باشد و نتایج حاصل از تحقیق ما چسبندگی نسبتاً بهتری از سلول‌های BMSCs به غشای CH3-G1 را نشان می‌دهد که با نتایج شهرام از این نظر هم خوانی ندارد زیرا پایین بودن DDA و در نتیجه حضور بالای واحدهای استیله مانع چسبندگی سلول‌ها به غشا شده است. از آنجائی که سلول‌های استرومائی به آسانی در دسترس بوده و جمع آوری و کشت می‌شوند کاربردشان در درمان عدم جوش خوردگی، تاخیر جوش خوردگی و شکستگی‌های ترکیبی استخوان ممکن است با ارزش باشد. در این تحقیق برای تعیین درصد خلوص سلول‌های استرومائی به دلیل وجود گلیکوپروتئین فیرونکتین در سلول‌های با منشأ مزانشیمی، سلول‌های BMSC بر علیه این گلیکوپروتئین به روش ایمونوسایتوشیمی رنگ شدند، بیان ۹۲ درصدی این پروتئین در سلول‌ها مؤید بنیادی بودن آنها بود. برای اثبات بنیادی بودن خالص بودن محققین روش‌های متفاوتی را انجام داده اند به طور مثال Lamoury و همکارانش سلول‌های BMSCs حیوان و انسان را در دو محیط جداگانه کشت داده و با استفاده از آنتی بادی ضد فیرونکتین و بیان mRNA ژن Oct-4 هویت بنیادی بودن آنها را تایید کردند.<sup>۱۰</sup>

## نتیجه گیری

در نتیجه گیری نهایی می‌توان گفت با توجه به اینکه سلول‌های BMSCs به راحتی می‌توانند بر روی غشای نازک (Ch-G)، رشد و تکثیر مناسب داشته باشند و مرگ سلولی بسیار کمی داشتند و با توجه به اینکه سلول‌ها در این مدت دچار تمایز نشده و همچنان بنیادی بودن خودشان را حفظ کردند، بنابراین پوشش مناسبی از سلول-غشا به عنوان یک بیوچسب پانسمان جهت ترمیم بعضی از نقص‌ها، زخم‌ها و شکستگی‌های استخوانی در مدت زمان کوتاهی بدست آمد.

## تشکر و قدردانی

از مرکز تحقیقات علوم اعصاب و مرکز تحقیقات نانو بیوتکنولوژی پژوهشگاه علوم پزشکی بقیه ... (عج) که ما را در اجرای این تحقیق یاری نمودند تقدیر و تشکر می‌شود.

## References

1. Jayaraman K, Kotaki M, Zhang YZ. Recent advances in polymer nanofibers. *J Nanosci Nanotechnol.* 2004; 4: 52–65.
2. Khora E, Yong L. Implantable applications of chitin and chitosan. *J Biomaterials.* 2003; 24: 2339-2349.
3. Bhattaraia N, Edmondson D, Veiseha O, Matsenb FA, Zhang M. Electrospun chitosan-based nanofibers and their cellular compatibility. *Biomaterials* 2005; 26: 6176–6184.
4. Shahram E, Sadraie SH, Kaka G, Khoshmohabat H, Hosseinalipour M, Panahi F, Naimi-Jamal MR. Evaluation of chitosan-gelatin films for use as postoperative adhesion barrier in rat cecum model. *Int J Surg.* 2013;11(10):1097-102.
5. Araki T, Nagarajan R, Milbrandt J. Identification of genes induced in peripheral nerve after injury. *J Biol Chem.* 2001; 276(1): 34131- 41.
6. Tohill M, Mantovani C, Wiberg M, Terenghi G. Rat bone marrow mesenchymal stem cells express glial markers and stimulate nerve regeneration. *Neurosci Lett.* 2004; 362(3): 200-3.
7. Mingyu C, Jinguang D, Yang F, Yandao G, Nanming Z, Zhang X. Study on physical properties and nerve cell affinity of composite films from chitosan and gelatin solutions. *Biomaterials* 2003: 2871–2880.
8. Kim S, Nimni ME, Yang Z, Han B. Chitosan/Gelatin-Based Films Crosslinked by Proanthocyanidin, Wiley InterScience 2005; 75(2): 442-50.
9. Hua X, Yashodhan S, Jeffrey S and Brian S. Use of a chitosan-based hemostatic dressing in laparoscopic partial nephrectomy. *J Journal of Biomedical Materials* 2008; 85(1): 267-71.
10. Lamoury FM, Croitoru-Lamoury J, Brew BJ. Undifferentiated mouse mesenchymal stem cells spontaneously express neural and stem cell markers Oct-4 and Rex-1. *Cytotherapy* 2006; 210(2): 228-42.