



## The effect of myeloma cell line-derived conditioned medium on the proliferation and differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells

Kousehlou F<sup>1</sup>, Yasari N<sup>1</sup>, Vahdat S<sup>2\*</sup>, Bagheri F<sup>3\*</sup>

<sup>1</sup> M.Sc., Department of Stem cells Technology and Tissue Regeneration, Faculty of Interdisciplinary Science and Technologies, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

<sup>2</sup> Ph.D., Applied Cell Sciences Division, Department of Hematology, Faculty of Medical Science, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

<sup>3</sup> Ph.D., Biotechnology Department, Faculty of Chemical Engineering, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

### Original Article

Use your device to scan and read the article online



Citation: Kousehlou F, Yasari N, Vahdat S, Bagheri F. The effect of myeloma cell line-derived conditioned medium on the proliferation and differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells. Journal of Cell and Tissue. 2025; 16(3):263-276.

<https://doi.org/10.61882/JCT.263>

### KEY WORDS

mesenchymal stem cells  
multiple myeloma secretome  
conditioned medium

### EXTENDED ABSTRACT

**Introduction:** Mesenchymal stem cells (MSCs) are important cellular components in the microenvironment of various types of cancers, including multiple myeloma (MM); their dynamic interactions with malignant cells can control the tumor microenvironment (TME) to favor the progression, drug resistance, and survival of cancer cells. It is shown that not only are MM cells influenced by the environmental cells, but also malignant cells affect the behavior of other cells in the TME. Secreted signaling factors are important players in this scenario. Accordingly, MSCs derived from TME, affected by cancer cells, are different from normal MSCs; therefore, in cases of disease modeling and drug screening studies, optimization of MSCs culture condition and their priming with cancer cell-derived secretome are crucial considerations to become more similar to the patient-derived MSCs. In this regard, conditioned medium, which is derived from the supernatant culture medium of cultured cells, contains cell-secreted factors and can be used as a source of cell secretome.

**Aims:** This study attempted to evaluate the effect of conditioned medium derived from the myeloma cell line U266 (U266-CM) on the proliferation, cell cycle, and differentiation of bone marrow-derived MSCs (BMMSCs).

\* Corresponding author. Tel: 02182884862

E-mail address: s\_vahdat@modares.ac.ir, f.bagheri@modares.ac.ir

DOI: <https://doi.org/10.61882/JCT.263>

Received: 7 Apr. 2025; Received in revised form: 17 Jun. 2025; Accepted: 28 Jun. 2025

Original Article

© Author



**Materials and methods:** U266 cells were cultured in RPMI-1640 complete culture medium, and their conditioned medium was collected after two days of culture and stored. Since the basal culture medium of the U266 cell line (RPMI-1640) was different from the basal culture medium of BMMSCs (DMEM), in the first step, the impact of changing the culture medium from DMEM to RPMI-1640 on the proliferation and viability of BMMSCs was evaluated. In the next step, the effects of U266-CM treatment on the proliferation, cell cycle, and differentiation of BMMSCs into osteoblasts and adipocytes were assessed. Alkaline phosphatase activity assessment and Alizarin red staining were performed to evaluate the osteogenic differentiation, and Oil red O staining was carried out to assess the adipogenic differentiation. BMMSCs cultured in DMEM complete media were considered as control group.

**Results:** Changing the culture media from DMEM complete media to RPMI-1640 complete media affected the viability and proliferation rate of BMMSCs; however, up to 48 hours, the viability and proliferation rate of cells cultured in both culture media were maintained. Therefore, 48 hours was selected as the optimum incubation time of BMMSCs with U266-CM. Treatment with U266-CM decreased the proliferation rate of BMMSCs, assessed by cell counting and cell cycle analysis. Moreover, BMMSCs cultured in U266-CM showed slightly increased osteogenic differentiation and maintained their adipogenic propensity.

**Discussion:** Our results showed that CM derived from the MM cell line affected the proliferation rate and the differentiation potential of BMMSCs. These observations highlighted the importance of a more similar recapitulation of BMMSCs culture condition to the TME, for disease modeling and drug screening studies. Further experiments, including providing dynamic interactions of MSCs with MM cells in direct or indirect co-culture systems, are required to better recapitulate TME conditions for MSC priming. Moreover, for mechanistic analysis, evaluation of the secreted factors and assessment of expressed transcripts and proteins are highly recommended for future studies.

**Conclusion:** In summary, U266-CM influenced the proliferation rate and the differentiation potential of BMMSCs.



## اثر محیط کشت شرطی شده با رده سلولی میلومایی بر میزان تکثیر و تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان

فاطمه کوسه‌لو<sup>۱</sup>، ندا یساری<sup>۱</sup>، صدف وحدت<sup>۲</sup>، فاطمه باقری<sup>۳\*</sup>

<sup>۱</sup> کارشناسی ارشد، فناوری سلول‌های بنیادی و بازسازی بافت، گروه علوم بنیادین، زیستی و سلامت، دانشکده علوم و فناوری‌های بین‌رشته‌ای، دانشگاه تربیت مدرس

<sup>۲</sup> استادیار، علوم سلولی کاربردی، گروه خون‌شناسی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس

<sup>۳</sup> دانشیار، گروه بیوتکنولوژی، دانشکده مهندسی شیمی، دانشگاه تربیت مدرس

واژگان کلیدی	چکیده
سلول‌های بنیادی مزانشیمی مالتیپل میلوما ترشحات سلول‌های بدخیم محیط کشت شرطی شده	هدف: سلول‌های بنیادی مزانشیمی (MSCها) از اجزای سلولی مهم در ریزمحیط انواع مختلف سرطان‌ها، از جمله مالتیپل میلوما، هستند. بنابراین، به‌منظور کاربرد آن‌ها در مطالعات شبیه‌سازی بیماری‌ها و غربالگری دارویی، بهینه‌سازی شرایط کشت و مواجهه آن‌ها با ترشحات مشتق از سلول‌های سرطانی، به ایجاد شرایطی شبیه‌تر به ریزمحیط بیماری کمک می‌کند. به‌همین دلیل، در این مطالعه تلاش شد تا تاثیر ترشحات رده سلولی میلومایی U266 بر تکثیر و تمایز MSCهای مشتق از مغز استخوان ارزیابی شود. مواد و روش‌ها: سلول‌های رده U266 کشت و محیط شرطی شده با آن‌ها (U266-CM)، پس از دو روز کشت، جمع‌آوری و ذخیره‌سازی شد. از آنجایی که محیط کشت پایه رده سلولی U266 با محیط کشت پایه MSCها متفاوت بود، ابتدا تاثیر تغییر محیط کشت از DMEM به RPMI بر تکثیر و زنده‌مانی MSCها ارزیابی شد. در مرحله بعد، اثر تیمار با U266-CM بر تکثیر، چرخه سلولی و تمایز MSCها به استئوبلاست‌ها و سلول‌های چربی بررسی شد. نتایج: تغییر محیط کشت از DMEM کامل به محیط کامل RPMI بر میزان زنده‌مانی و تکثیر MSCها تاثیر گذاشت، با این وجود، تا ۴۸ ساعت، میزان زنده‌مانی و تکثیر سلول‌های کشت‌شده در هر دو محیط کشت حفظ شد. به علاوه، تیمار با U266-CM سرعت تکثیر MSCها را کاهش داد و تمایز به رده استخوانی و تمایل چربی‌زایی آن‌ها را حفظ نمود. نتیجه‌گیری: نتایج نشان داد که محیط کشت شرطی شده مشتق‌شده از رده سلولی U266 بر میزان تکثیر و پتانسیل تمایز MSCها تاثیر می‌گذارد و در نتیجه، اهمیت شبیه‌سازی شرایط کشت MSCها با ریزمحیط تومور را برجسته می‌کند.
تاریخ دریافت: ۱۴۰۴/۰۱/۱۸	
تاریخ بازنگری: ۱۴۰۴/۰۳/۲۷	
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۴/۰۴/۰۷	

### ۱- مقدمه

مالتیپل میلوما دومین نوع شایع سرطان خون است و پس از لنفوم غیرهوچکین، ۱۰ درصد از سرطان‌های خون را تشکیل می‌دهد (۱، ۲). این بیماری زمانی رخ می‌دهد که سلول‌های پلاسمایی به‌طور غیرقابل‌کنترلی تکثیر شوند. علیرغم پیشرفت در رویکردهای درمانی و ترکیبات دارویی که منجر به بهبود پاسخ و افزایش میزان بقای بیماران می‌شوند، عود و مقاومت درمانی از مشکلات اساسی این بیماری است (۳-۵).

مطالعات مختلف نشان داده‌اند که ایجاد، پیشرفت و رفتار تقریباً همه سرطان‌ها با ترکیب و ساختار ریزمحیط آن‌ها، به‌عنوان

مثال، مغز استخوان در سرطان مالتیپل میلوما، در ارتباط است. شایان ذکر است که سلول‌های بنیادی مزانشیمی (MSCها) انواع سلول‌های فراوان در مغز استخوان هستند که نقش مهمی در تنظیم خون‌سازی طبیعی و همچنین پیشرفت سرطان دارند (۶، ۷). به‌طور کلی، این سلول‌ها که به‌عنوان سلول‌های مزودرمی طبقه‌بندی می‌شوند، می‌توانند از بافت‌های پیوندی، مانند تاندون‌ها و ماهیچه‌ها و همچنین، مغز استخوان (منبع اصلی آن‌ها) مشتق شوند. این سلول‌ها چند توان هستند و می‌توانند در شرایط آزمایشگاهی، به استئوبلاست‌ها، سلول‌های غضروفی و سلول‌های چربی تمایز یابند. همچنین، به ظروف پلاستیکی می‌چسبند و شاخص‌های سطح سلولی غیرخونساز را بیان می‌کنند (۷، ۸). علاوه بر نقش آن‌ها در زیست‌شناسی سرطان، MSCها منابع سلولی امیدوارکننده‌ای در رویکردهای پزشکی بازساختی مبتنی بر سلول در نظر گرفته می‌شوند (۹). در این راستا، یافته‌های اخیر مطرح کرده‌اند که ظرفیت بازسازی MSCها و همچنین ارتباط آن‌ها با توسعه سرطان، به احتمال زیاد به‌دلیل اثرات پاراکرین آن‌ها است (۱۰).

به‌منظور استفاده از MSCها در شبیه‌سازی بیماری‌ها و مطالعات پزشکی بازساختی، نیاز به بهینه‌سازی شرایط کشت این سلول‌ها است. بنابراین، انتخاب محیط کشت مناسب و تقلید از عوامل محیطی خاص، مؤثر بر رفتار آن‌ها، تاثیرگذار خواهد بود (۱۱). متغیرهایی مانند سطح اکسیژن، بستر کشت، پیام‌های خارج سلولی، محرک‌های التهابی و تغییرات ژنتیکی به‌شدت بر ویژگی‌های این سلول‌ها تاثیر می‌گذارند. در این راستا، شبیه‌سازی دقیق این شرایط به مطالعات مدل‌سازی بیماری‌ها و پزشکی بازساختی کمک خواهد کرد (۱۲). بر این اساس، ترشحات مشتق شده از سلول‌های سرطانی می‌تواند مواد شیمیایی پیام‌رسان را برای MSCها فراهم کند تا به ویژگی‌های MSCهای مشتق شده از بیماران شبیه شوند. به همین منظور، در این مطالعه سعی شد تا تاثیر ترشحات رده سلولی میلومایی U266 را بر ویژگی‌های MSCها بررسی کنیم. بنابراین، تکثیر، چرخه سلولی و تمایز MSCها به استئوبلاست‌ها و سلول‌های چربی در حضور محیط شرطی شده مشتق شده از رده سلولی U266، به‌عنوان محیط حاوی ترشحات این رده سلولی، مورد ارزیابی قرار گرفت.

## ۲- مواد و روش‌ها

**کشت MSCهای مشتق شده از مغز استخوان:** سلول‌ها از بانک سلول‌های بنیادی پژوهشگاه رویان (RSCB0787) خریداری شدند و در محیط کشت DMEM با گلوکز کم (Bioidea، شماره کاتالوگ BI-1004، ایران)، همراه با ۱۵ درصد سرم جنین گاوی (FBS) (DNABioTech، شماره کاتالوگ DB9723، ایران) و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، ۵ درصد CO<sub>2</sub> و رطوبت ۹۵ درصد کشت شدند. از این پس، این محیط کشت به‌عنوان محیط کشت کامل DMEM نامیده می‌شود.

**کشت رده سلولی U266 و تهیه و جمع‌آوری محیط کشت شرطی شده:** رده سلولی U266 از مرکز ملی ذخایر ژنتیکی ایران (IBRCC10148) خریداری شد. سلول‌ها با تراکم  $10^5 \times 5$  سلول در میلی‌لیتر در محیط RPMI-1640 (Bonbiotech، شماره کاتالوگ ۴۰۳۰۲۲۴، ایران) حاوی ۱۵ درصد FBS، در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، ۵ درصد CO<sub>2</sub> و رطوبت ۹۵ درصد کشت داده شدند. این محیط از این پس، محیط کامل RPMI نامیده می‌شود.

برای جمع‌آوری محیط کشت شرطی شده، ۴۸ ساعت پس از کشت، سوسپانسیون سلولی با سرعت ۱۲۰۰ دور در دقیقه به‌مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ شد و مایع رویی با استفاده از فیلتر ۰/۲۲ میکرومتر فیلتر شد. در نهایت، محیط فیلتر شده تا استفاده بعدی در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد (۱۳).

**کشت MSCها در محیط کشت شرطی شده توسط رده سلولی U266 (U266-CM):** در مرحله اول، به‌منظور بررسی اثر

تغییر محیط کشت از DMEM به RPMI-1640، MSCها با تراکم  $10^3 \times 4$  سلول بر سانتی‌متر مربع در پلیت ۱۲-چاهکی در محیط‌های کامل DMEM یا RPMI کشت شدند. به‌منظور حذف اثرات احتمالی ناشی از تفاوت در غلظت سرم، محیط‌های کشت مورد استفاده در تمامی گروه‌ها شامل درصد یکسانی از سرم (۱۵ درصد) بودند. سپس، ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت پس از کشت، سلول‌ها با افزودن تریپسین-EDTA (Bioidea) شماره کاتالوگ BI-1602، ایران) جدا شدند و برای محاسبه میزان تکثیر و زنده‌مانی آن‌ها، با استفاده از رنگ‌آمیزی با تریپان بلو (Bioidea) شماره کاتالوگ BI-1803-02، ایران) شمارش شدند.

در مرحله بعد، MSCها با تراکم  $10^3 \times 4$  سلول در سانتی‌متر مربع در محیط کشت کامل DMEM کشت داده شدند و پس از ۲۴ ساعت، محیط کشت با U266-CM جایگزین شد. سلول‌های کشت‌شده در محیط کامل DMEM (با غلظت ثابت ۱۵ درصد سرم، مشابه گروه U266-CM) به‌عنوان گروه کنترل در نظر گرفته شدند. پس از ۴۸ ساعت کشت در U266-CM، سلول‌ها جدا شده، با تریپان بلو رنگ‌آمیزی و شمارش شدند تا میزان تکثیر و زنده‌مانی آن‌ها محاسبه شود.

**بررسی چرخه سلولی با فلوسایتومتری:** به‌منظور انجام آنالیز چرخه سلولی، سلول‌ها بعد از جدا شدن از کف ظرف، در اتانول ۷۰ درصد تثبیت شدند، با PBS (BioBench) شماره کاتالوگ S0201، ایران) شسته شدند و در حضور ۱۰۰ میکرولیتر RNase A، با PI به مدت ۳۰ دقیقه رنگ‌آمیزی شدند. پس از حذف رنگ‌های متصل‌نشده، تجزیه و تحلیل چرخه سلولی توسط سیستم فلوسایتومتر (BD Biosciences، BD FACSCanto II) انجام شد و داده‌ها با نرم افزار Flowjo تجزیه و تحلیل شدند.

**بررسی پتانسیل تمایزی MSCها:** پتانسیل تمایز استخوان‌زایی و چربی‌زایی MSCها، به ترتیب، با کشت سلول‌ها در محیط‌های القاکننده به رده استخوانی یا چربی ارزیابی شد. برای این منظور، MSCها به مدت ۲۴ ساعت در محیط کامل DMEM کشت داده شدند و پس از آن، محیط کشت با U266-CM به مدت ۴۸ ساعت جایگزین شد. سپس، سلول‌ها با محیط‌های القاکننده به رده استخوانی (به مدت ۲۱ روز) یا القاکننده به رده چربی (به مدت ۱۴ روز) تیمار شدند. محیط تمایزی هر سه روز یکبار تعویض می‌شد.

فعالیت آلکالین فسفاتاز (ALP) سلول‌های تیمار شده با محیط القاکننده به رده استخوانی با استفاده از کیت سنجش ALP (Biorexfars) شماره کاتالوگ BXC0187، ایران)، مطابق دستورالعمل کیت، در روز ۲۱ پس از القا ارزیابی شد و میزان جذب در ۴۰۵ نانومتر اندازه‌گیری شد. به‌علاوه، رنگ‌آمیزی آلیزارین رد برای ارزیابی تمایز استخوانی در MSCها انجام شد. بدین منظور، ۲۱ روز پس از القای تمایز، سلول‌های شسته‌شده با PBS به مدت ۱۵ دقیقه در متانول تثبیت شدند. سپس، سلول‌ها با محلول رنگ آلیزارین رد ۱ درصد رنگ‌آمیزی شدند و ۵ دقیقه پس از انکوباسیون، سلول‌ها با آب مقطر شسته شدند. در نهایت، با استفاده از میکروسکوپ فاز کنتراست، تصویربرداری انجام گرفت. برای تجزیه و تحلیل کمی، هر چاهک از پلیت ۴۸-چاهکی با ۲۵۰ میکرولیتر اسید استیک ۱۰ درصد به مدت ۳۰ دقیقه انکوبه شد و میزان جذب در ۴۰۵ نانومتر اندازه‌گیری شد (۱۴).

به‌منظور ارزیابی تمایز به رده چربی، تشکیل واکوئل‌های چربی با رنگ‌آمیزی Oil Red O مورد ارزیابی قرار گرفت. برای این منظور، ۱۴ روز پس از القای تمایز به رده چربی، سلول‌ها با PBS شسته و سپس، به مدت ۱ ساعت در فرمالین ۱۰ درصد تثبیت شدند. فرمالین پس از تثبیت حذف شد و سلول‌ها با محلول ۱ درصد Oil Red O به مدت ۱۵ دقیقه رنگ‌آمیزی شدند. پس از انکوباسیون، سلول‌ها با آب مقطر شسته شدند و تصاویر با استفاده از میکروسکوپ فاز کنتراست گرفته شد.

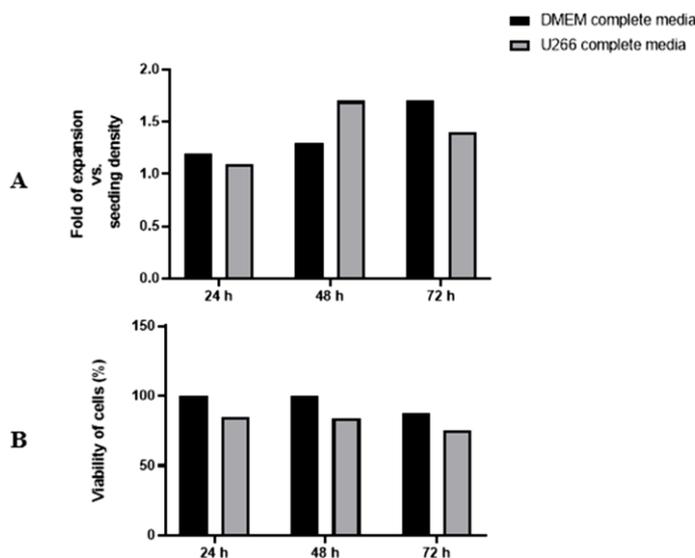
### ۳- آنالیز آماری

در نمودارها، نتایج به صورت میانگین  $\pm$  انحراف معیار (SD) ارائه شده است. گروه‌ها از نظر آماری، با استفاده از روش آزمون  $t$ -test با استفاده از نرم‌افزار آماری GraphPad Prism 7.0 (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, USA) مقایسه شدند. به علاوه، P-value کمتر از ۰/۰۵ از نظر آماری معنی‌دار در نظر گرفته شد.

### ۴- نتایج

#### تاثیر تغییر محیط کشت بر تکثیر و زنده‌مانی MSCها

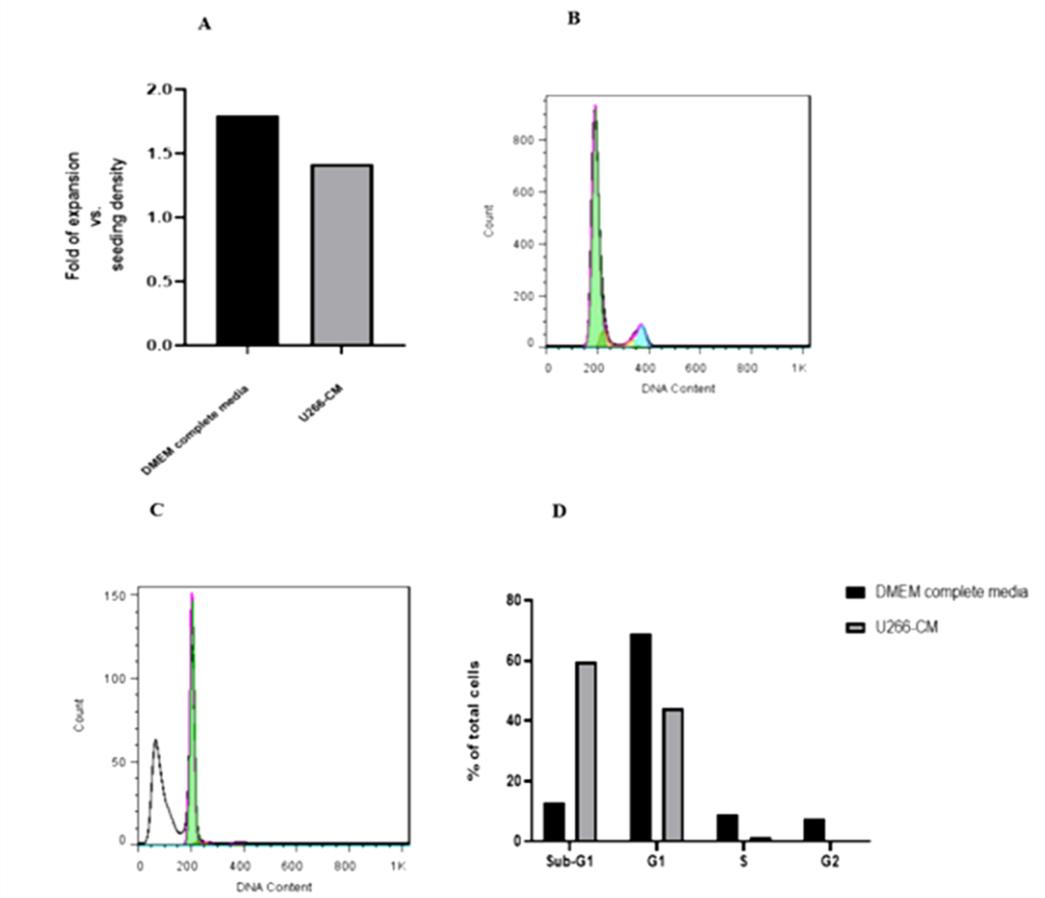
از آنجایی که هدف این مطالعه ارزیابی اثر U266-CM بر ویژگی‌های MSCها بود، و از آنجایی که محیط پایه در محیط شرطی شده RPMI-1640 بود، در گام اول، تاثیر تغییر محیط از DMEM به RPMI-1640 را بر تکثیر و زنده‌مانی MSCها ارزیابی کردیم. همانطور که در شکل ۱A نشان داده شده است، تعداد سلول‌ها در مقایسه با تراکم کشت اولیه (که در نمودار، به صورت افزایش چند برابری کشت ارائه شده است) در هر سه بازه زمانی در هر دو گروه افزایش یافته است. هنگامی که سلول‌ها در محیط کامل DMEM کشت داده شدند، تکثیر طی زمان افزایش یافت. با این وجود، در محیط کامل RPMI، حداکثر میزان تکثیر در ۴۸ ساعت پس از کشت مشاهده شد. به علاوه، زنده‌مانی سلولی تا ۴۸ ساعت پس از کشت در هر دو محیط کامل DMEM و RPMI حفظ شد و ۷۲ ساعت پس از کشت در هر دو محیط کشت کاهش یافت، اگرچه زنده‌مانی سلول‌های کشت شده در محیط کامل RPMI کمتر از سلول‌های کشت شده در محیط کامل DMEM در هر سه بازه زمانی بود (شکل ۱B). بنابراین، ۴۸ ساعت را به عنوان مدت زمان کشت بهینه در محیط‌های کشت مبتنی بر RPMI، مانند U266-CM، برای آزمایش‌های بعدی انتخاب شد.



شکل ۱: تاثیر تغییر محیط کشت بر تکثیر و زنده‌مانی MSCها. (A) ارزیابی تکثیر MSCها که با معیار میزان افزایش سلول نسبت به تراکم سلولی اولیه کشت شده (fold of expansion vs. seeding density) ارائه شده است. (B) میزان زنده‌مانی در زمان‌های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت در دو محیط مورد بررسی. تعداد تکرار=۱.

### تاثیر کشت در U266-CM بر تکثیر و الگوی چرخه سلولی MSCها

در این مرحله، MSCها در U266-CM کشت داده شدند و سرعت تکثیر و چرخه سلولی آنها مورد ارزیابی قرار گرفت. همان طور که در شکل A۲ ارائه شده است، میزان تکثیر سلول‌های کشت‌شده در U266-CM در مقایسه با سلول‌های کشت‌شده در محیط کامل DMEM کاهش یافت. به علاوه، الگوی چرخه سلولی سلول‌های کشت‌شده در U266-CM نسبت به سلول‌های کشت‌شده در محیط کامل DMEM تغییر کرد (شکل B۲، C۲)، و درصد سلول‌های توزیع‌شده در فاز sub-G1 افزایش و در فازهای G1، S و G2/M نسبت به سلول‌های کشت‌شده در محیط کامل DMEM کاهش یافت (شکل D۲).

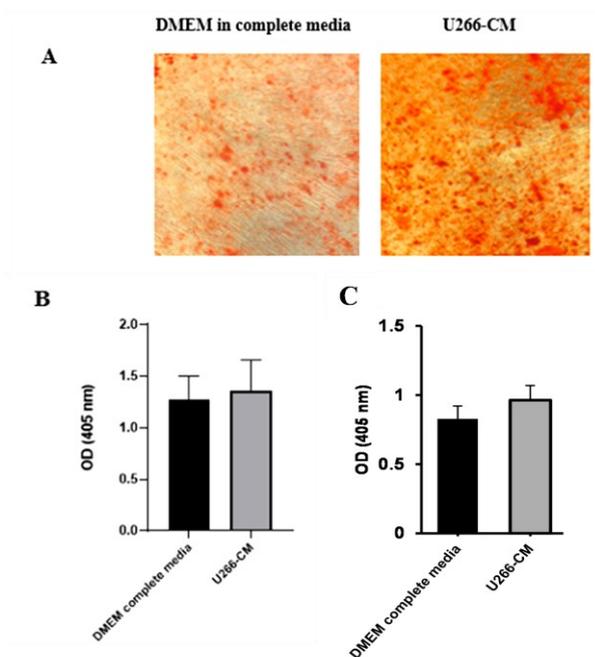


شکل ۱: میزان تکثیر و ارزیابی چرخه سلولی MSCهای کشت‌شده در محیط کامل DMEM یا U266-CM. (A) ارزیابی تکثیر MSCها که با معیار میزان افزایش سلول نسبت به تراکم سلولی اولیه کشت‌شده (fold of expansion vs. seeding density) ارائه شده است. (B و C) نمودارهای هیستوگرام چرخه سلولی MSCهای کشت‌شده در محیط کامل DMEM (B) و U266-CM (C). (D) درصد سلول‌های توزیع‌شده در مراحل مختلف چرخه سلولی. تعداد تکرار=۱.

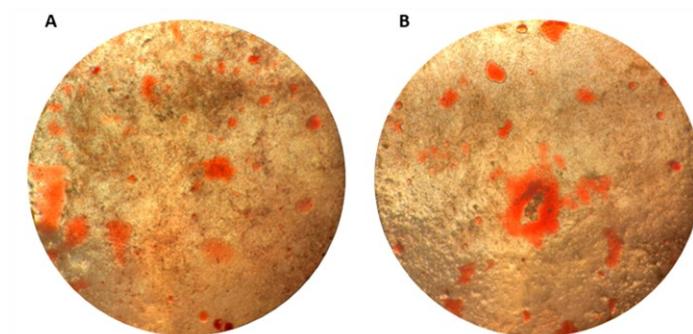
### تاثیر کشت در U266-CM بر تمایز MSCها

به‌عنوان یکی دیگر از ویژگی‌های مهم MSCها، پتانسیل تمایز آنها را پس از کشت در U266-CM ارزیابی کردیم. به‌منظور ارزیابی تمایز استخوانی، رنگ‌آمیزی آلیزارین رد و ارزیابی فعالیت ALP انجام شد. همان‌طور که در شکل A۳ ارائه شده است،

رسوبات کلسیم در هر دو گروه پس از القای تمایز مشاهده شد. به علاوه، تجزیه و تحلیل کمی سلول‌های رنگ‌آمیزی شده با آلیزارین رد، افزایش رسوب کلسیم را در گروه تیمار شده با U266-CM در مقایسه با سلول‌های کشت شده در محیط کامل DMEM نشان داد، اگرچه این تفاوت از نظر آماری معنی‌دار نبود (شکل ۳B). همچنین، همان‌طور که در شکل ۳C نشان داده شده است، مشابه رنگ‌آمیزی آلیزارین رد، فعالیت ALP در گروه کشت شده در U266-CM در مقایسه با گروه کشت شده در محیط کامل DMEM به میزان کمی افزایش یافت که از نظر آماری معنادار نبود. از سوی دیگر، رنگ‌آمیزی Oil Red O تمایز MSCها را به سلول‌های چربی در هر دو گروه نشان داد (شکل ۴).



شکل ۳: ارزیابی تمایز استخوانی MSCهای تیمار شده با U266-CM. (A) تصاویر رنگ‌آمیزی آلیزارین رد (عدسی:  $\times 10$ ). (B) آنالیز کمی رنگ‌آمیزی آلیزارین رد. (C) ارزیابی فعالیت ALP. تعداد تکرار=۳.



شکل ۴: رنگ‌آمیزی Oil Red O سلول‌های کشت شده در محیط کامل DMEM (A) یا تیمار شده با U266-CM (B) (عدسی  $\times 10$ ).

## ۵- بحث

برهم کنش‌های پویای سلول‌های میلومایی با اجزای ریزمحیط آن‌ها نقش مهمی در پیشرفت بیماری مالتیپل میلوما ایفا می‌کند (۱۵، ۱۶). مطالعات نشان داده‌اند که نه تنها سلول‌های میلومایی تحت تاثیر سلول‌های ریزمحیط هستند، بلکه سلول‌های بدخیم نیز بر رفتار سایر سلول‌ها در ریزمحیط تومور تاثیر می‌گذارند (۱۶، ۱۷). عوامل پیام‌رسان ترشح‌شده به‌عنوان بازیگران مهم در این سناریو هستند (۱۸). در این راستا، محیط کشت شرطی شده با ترشحات سلول می‌تواند یک ابزار مناسب را برای شبیه‌سازی ارتباط غیرمستقیم سلول-سلول در ریزمحیط فراهم کند (۱۹). بر این اساس، در این مطالعه، ارزیابی تاثیر U266-CM بر رفتار MSCها، به‌منظور استفاده از آن‌ها در مطالعات آتی شبیه‌سازی بیماری، انجام شد. بنابراین، در گام اول، تاثیر تغییر محیط کشت از محیط کشت کامل DMEM به محیط کشت کامل RPMI ارزیابی شد. نتایج ما میزان زنده‌مانی بیشتر سلول‌های کشت‌شده در محیط کامل DMEM را در مقایسه با سلول‌های کشت‌شده در محیط کامل RPMI نشان داد. نکته قابل توجه این است که در میان این دو محیط کشت رایج (DMEM و RPMI-1640)، DMEM معمولاً برای سلول‌های با رشد سریع مانند فیبروبلاست‌ها و سلول‌های اپیتلیال استفاده می‌شود. در واقع، RPMI-1640 حاوی غلظت کم‌تر گلوکز، کاهش محتوای اسید آمینه و غلظت کم‌تر ویتامین در مقایسه با DMEM است. مشابه سایر سلول‌ها، رفتار و کینتیک رشد MSCها می‌تواند بر اساس محیط کشت و مکمل‌های استفاده‌شده متفاوت باشد (۲۰). بر اساس نتایج این بخش، بازه زمانی ۴۸ ساعت برای ارزیابی اثرات U266-CM بر MSCها انتخاب شد. لازم به ذکر است که مطالعات دیگر نیز از این بازه زمانی برای بررسی اثرات محیط کشت شرطی شده بر سلول‌ها استفاده کرده‌اند (۲۱-۲۳). با این حال، بررسی اثرات بلندمدت می‌تواند اطلاعات بیشتری در مورد پایداری پاسخ‌های سلولی و تغییرات فنوتیپی فراهم آورد. بنابراین، پیشنهاد می‌شود که در مطالعات آینده، بازه‌های زمانی متنوع‌تری برای تحلیل پویای پاسخ MSCها به محیط کشت شرطی شده در نظر گرفته شود.

نتایج ما نشان داد که میزان تکثیر MSCها پس از کشت در U266-CM کاهش یافت. از طرف دیگر، بررسی چرخه سلولی نمایانگر کاهش درصد سلول‌ها در فازهای G1، S و G2/M پس از تیمار با U266-CM نسبت به گروه کنترل بود. همچنین، افزایش درصد سلول‌ها در فاز sub-G1 در گروه کشت شده در U266-CM نسبت به گروه کنترل می‌تواند به‌عنوان شاخصی از وقوع آپوپتوزیس تفسیر شود (۲۴). از آنجایی که تمرکز این مطالعه بر مقایسه ویژگی MSCها در شرایط کشت در محیط استاندارد با شرایط کشت در U266-CM بود، از تیمار اختصاصی با فاکتورهای رشد استفاده نشد. مشاهدات ما در راستای یافته‌های مطالعه‌ای دیگر بود که نشان داده است تکثیر MSCهای جداسازی شده از مغز استخوان بیماران مالتیپل میلوما کمتر از اهداکنندگان سالم بود (۲۵). همچنین، در مطالعه‌ای که در سال ۲۰۰۷ منتشر شد، نشان داده شد که MSCهای جداسازی شده از مغز استخوان بیماران مالتیپل میلوما ظرفیت تکثیری بسیار کم‌تری نسبت به MSCهای جداسازی شده از اهداکنندگان سالم دارند و بیان گیرنده‌های PDGF  $\alpha$  و  $\beta$ ، IGF-1، EFG و NGF روی سطح MSCهای مشتق شده از بیمار در مقایسه با MSCهای طبیعی کاهش می‌یابد (۲۶). به‌علاوه، در مطالعه دیگری نشان داده شد که میزان تکثیر MSCهای طبیعی به‌میزان معناداری بیشتر از MSCهای بیماران مالتیپل میلوما است و MSCهای اهداکنندگان سالم می‌توانند برای مدت زمان طولانی‌تری در کشت نگهداری شوند. به‌طوری‌که، MSCهای بیماران مالتیپل میلوما تکثیر خود را متوقف کردند و پس از چهار پاساژ، مردند (۲۷). از سوی دیگر، در مطالعه دیگری نشان داده شد که کشت همزمان MSCها با رده‌های سلولی مالتیپل میلوما منجر به افزایش میزان مرگ سلولی در MSCها می‌شود، که می‌تواند توجیه احتمالی بر افزایش درصد سلول‌های توزیع شده در فاز sub-G1 پس از کشت در U266-CM باشد (۲۸). ذکر این نکته حائز اهمیت است که در این مطالعه از رنگ‌آمیزی

تربیان بلو برای ارزیابی تعداد سلول و زنده‌مانی استفاده شد. هرچند این یک روش رایج و معتبر است (۲۹، ۳۰)، استفاده از روش‌های ارزیابی دقیق‌تر، از جمله تست MTT، می‌تواند برای تحلیل بهتر تاثیر U266-CM بر MSCها، در مطالعات آتی مورد استفاده قرار گیرد. به‌علاوه، استفاده از شاخص‌های تکمیلی، مانند زمان دو برابر شدن، می‌تواند اطلاعات دقیق‌تری از دینامیک رشد سلولی فراهم سازد. همچنین، بررسی چرخه سلولی و حضور سلول‌ها در فاز sub-G1 پس از کشت در U266-CM می‌تواند به‌صورت غیرمستقیم آپوپتوزیس را نشان دهد (۲۴)؛ از این رو، استفاده از آزمون‌های اختصاصی، مانند ارزیابی فعالیت کاسپازها یا رنگ‌آمیزی Annexin V/PI، می‌تواند اطلاعات دقیق‌تری درباره مرگ سلولی فراهم آورد و برای مطالعات آتی به‌منظور بررسی مکانیسم اثر پیشنهاد می‌شود.

مطالعات مختلف نشان داده‌اند که ویژگی و پتانسیل تمایز MSCها متأثر از محیط‌های کشت است. برای مثال، نشان داده شده است که DMEM با گلوکز کم و  $\alpha$ -MEM، محیط‌های پایه مناسبی برای حفظ ظرفیت تکثیر MSCهای مشتق از چربی زیر جلدی بودند و DMEM/F12 منجر به کاهش تمایز MSCها به رده‌های چربی و استخوانی شد (۳۱). همچنین، مطالعه دیگری نشان داد که محیط کشت و تعداد پاساژ دو عامل موثر بر میزان تکثیر MSCها هستند. علاوه بر این، سن بیماران بر ظرفیت تمایز MSCهای کشت‌شده در محیط‌های مختلف تاثیر می‌گذارد (۲۰). از سوی دیگر، سلول‌های میلومایی می‌توانند بر تمایل تمایز MSCها در ریزمحیط تاثیر بگذارند، که می‌تواند از طریق استفاده از محیط کشت شرطی شده نیز مشاهده شود (۳۲). برخی از سیتوکین‌های موجود در محیط کشت شرطی شده مانند TNF- $\alpha$ ، IL-1 و IL-4 می‌توانند تمایز به استئوبلاست‌ها را مهار کنند، در حالی که برخی دیگر مانند IL-10، IL-1، کاردیوتروفین-1 و IFN- $\alpha$  می‌توانند تمایز به استئوبلاست‌ها را تقویت کنند (۳۳). نتایج ما افزایش کمی در میزان فعالیت ALP را نشان داد که با تمایز به استئوبلاست مرتبط است، گرچه این افزایش از نظر آماری معنادار نبود. نتایج مطالعه‌ای نشان داد که تمایز به رده استخوانی در MSCهای مشتق از مغز استخوان در حضور ۲۰ درصد محیط کشت شرطی شده با ترشحات مشتق از رده سلولی میلومایی مهار شد. ذکر این نکته مهم است که در آن مطالعه، سلول‌ها در محیط کشت شرطی شده که با نسبت ۱:۴ با محیط کامل DMEM مخلوط شده بود، کشت شده بودند، در حالی که در مطالعه ما، سلول‌ها کاملاً در محیط شرطی شده کشت شدند. این مشاهدات متفاوت می‌تواند به غلظت محیط کشت شرطی شده استفاده‌شده نسبت داده شود (۳۴). لازم به ذکر است که در مطالعات دیگر نیز استفاده از محیط کشت شرطی شده به‌صورت ۱۰۰ درصد و جایگزینی کامل محیط کشت سلول متداول بوده است و برای مثال، افزودن کامل محیط شرطی شده، بدون ایجاد رقت از آن، در کشت سلول‌های U266 نیز استفاده شده است؛ به‌طوری‌که، تاثیر محیط کشت شرطی شده با ترشحات MSCها در کشت سلول‌های U266 در مطالعات گوناگون ارزیابی شده است (۲۱، ۳۵). این نوع طراحی آزمایش ابزار رایجی برای مطالعه اثر ترشحات یک رده سلولی بر رده دیگر در شرایط شبه‌هم‌کشتی محسوب می‌شوند (۳۶، ۳۷). لازم به ذکر است که به‌دلیل ماهیت بیماری مالتیپل میلوما، تمایز MSCها به استخوان و چربی مورد بررسی قرار گرفت. در مطالعات آتی می‌توان به‌منظور ارزیابی جامع‌تر عملکرد MSCها، تمایز غضروف را نیز مدنظر قرار داد.

لازم به‌ذکر است که یکی از محدودیت‌های مطالعه ما کم بودن تعداد تکرارهای آزمایشی بود که ممکن است بر داده‌های به‌دست آمده تاثیر گذاشته باشد. همچنین، برای تجزیه و تحلیل مکانیسم اثرگذاری، ارزیابی فاکتورهای ترشح‌شده در محیط کشت شرطی شده و ارزیابی RNAها و پروتئین‌های بیان‌شده برای مطالعات آینده توصیه می‌شود. به‌طوری‌که یکی از محدودیت‌های این طرح عدم بررسی تغییرات بیان ژن‌های خاص در پاسخ به تیمار با U266-CM بود. اگرچه در این مطالعه، برخی اثرات عملکردی، از جمله تکثیر، زنده‌مانی و تمایز ارزیابی گردید، بررسی بیان ژن‌ها می‌تواند برای کشف مکانیسم‌های دخیل، از جمله

مسیرهای مرتبط با التهاب، آپوپتوزیس و تمایز، در مطالعات آتی کمک‌کننده باشد. از آنجایی که مطالعات پیشین به وجود طیف گسترده‌ای از فاکتورهای ترشحی، مانند IL6، TGF $\beta$  و VEGF، در ترشحات سلول‌های میلومایی اشاره کرده‌اند (۳۸، ۳۹)، تحلیل کمی پروفایل فاکتورهای ترشحی در مطالعات آتی می‌تواند به روشن شدن مسیرهای پیام‌رسان دخیل در تعامل MSCها و سلول‌های میلومایی و تنظیم رفتار آنها، از جمله تمایز یا التهاب، کمک کند. به‌علاوه، اگرچه استفاده از محیط کشت شرطی شده ابزار مناسبی برای بررسی اثرات پاراکرائینی سلول‌های میلومایی بر MSCها است، این روش به‌تنهایی قادر به شبیه‌سازی کامل شرایط داخل بدن نیست. به‌ویژه، استفاده از این محیط فاقد تعاملات مستقیم سلول-سلول، پیام‌های مکانیکی و ساختاری ناشی از تماس سلول با ماده زمینه‌ای برون‌سلولی (ECM) و ارتباطات پویای ترشحی بین سلول‌ها است، که در تنظیم رفتار سلول نقش دارند. بنابراین، یافته‌های حاصل از این مطالعه می‌تواند به‌عنوان بخشی از تصویر کلی تعاملات سلولی در نظر گرفته شود. در همین راستا، برهم‌کنش‌های پویای MSCها با سلول‌های میلومایی در سیستم‌های هم‌کشتی مستقیم یا غیرمستقیم، شرایط بهتری را برای آماده‌سازی MSCها فراهم می‌کند تا در مطالعات شبیه‌سازی بیماری‌ها استفاده شوند. همچنین، تولید ساختارهای سلولی سه‌بعدی می‌تواند اطلاعات دقیق‌تری از مکانیسم‌های دخیل در تعاملات این دو نوع سلول فراهم کند. از طرف دیگر، به‌دلیل تلاش برای شبیه‌سازی شرایط هم‌کشتی مستقیم میان سلول‌ها، از تنها یک غلظت (۱۰۰ درصد) -U266 CM استفاده گردید تا اثر تجمعی فاکتورهای ترشحی ارزیابی شود. با این وجود، بررسی اثر غلظت‌های مختلف U266-CM می‌تواند درک دقیق‌تر و اطلاعات بیشتری در خصوص تاثیر وابسته به دوز فاکتورهای ترشح‌شده توسط سلول‌های میلومایی بر زنده‌مانی و تکثیر و مسیرهای تمایزی MSCها فراهم آورد و برای مطالعات آتی پیشنهاد می‌شود.

#### ۶- نتیجه‌گیری

به‌طور خلاصه، در این مطالعه به بررسی اثر U266-CM بر تکثیر و تمایز MSCها پرداخته شد. این امر اهمیت پیش‌تیمار MSCها با ترشحات سلول‌های میلومایی یا هم‌کشتی پویا با آنها را، برای مطالعات مدل‌سازی بیماری و غربالگری دارویی، نشان می‌دهد تا ویژگی‌ها و رفتار MSCها هرچه بیشتر به ویژگی‌های MSCهای مشتق از ریزمحیط میلومایی شبیه شود.

#### ۷- تشکر و قدردانی

این مقاله مستخرج از پایان‌نامه کارشناسی ارشد است و هزینه‌های آن توسط دانشگاه تربیت مدرس تامین شده است.

#### ۸- منابع

1. Sheykhasan M, Ahmadih-Yazdi A, Vicidomini R, Poondla N, Tanzadehpanah H, Dirbaziyan A, et al. CAR T therapies in multiple myeloma: unleashing the future. *Cancer gene therapy*. 2024;31(5):667-86.
2. Binder M, Szalat RE, Talluri S, Fulciniti M, Avet-Loiseau H, Parmigiani G, et al. Bone marrow stromal cells induce chromatin remodeling in multiple myeloma cells leading to transcriptional changes. *Nature communications*. 2024;15(1):4139.
3. Binder M, Nandakumar B, Rajkumar SV, Kapoor P, Buadi FK, Dingli D, et al. Mortality trends in multiple myeloma after the introduction of novel therapies in the United States. *Leukemia*. 2022;36(3):801-8.

4. Kumar SK, Dispenzieri A, Lacy MQ, Gertz MA, Buadi FK, Pandey S, et al. Continued improvement in survival in multiple myeloma: changes in early mortality and outcomes in older patients. *Leukemia*. 2014;28(5):1122-8.
5. Miari KE, Williams MTS. Stromal bone marrow fibroblasts and mesenchymal stem cells support acute myeloid leukaemia cells and promote therapy resistance. *British journal of pharmacology*. 2024;181(2):216-37.
6. de Visser KE, Joyce JA. The evolving tumor microenvironment: From cancer initiation to metastatic outgrowth. *Cancer cell*. 2023;41(3):374-403.
7. Xuan X, Tian C, Zhao M, Sun Y, Huang C. Mesenchymal stem cells in cancer progression and anticancer therapeutic resistance. *Cancer cell international*. 2021;21(1):595.
8. Sotiropoulou PA, Perez SA, Salagianni M, Baxeavanis CN, Papamichail M. Characterization of the optimal culture conditions for clinical scale production of human mesenchymal stem cells. *Stem cells*. 2006;24(2):462-71.
9. Maldonado VV, Patel NH, Smith EE, Barnes CL, Gustafson MP, Rao RR, et al. Clinical utility of mesenchymal stem/stromal cells in regenerative medicine and cellular therapy. *Journal of biological engineering*. 2023;17(1):44.
10. Fan XL, Zhang Y, Li X, Fu QL. Mechanisms underlying the protective effects of mesenchymal stem cell-based therapy. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*. 2020;77(14):2771-94.
11. Peshkova M, Korneev A, Suleimanov S, Vlasova, II, Svistunov A, Kosheleva N, et al. MSCs' conditioned media cytokine and growth factor profiles and their impact on macrophage polarization. *Stem cell research & therapy*. 2023;14(1):142.
12. Costa LA, Eiro N, Fraile M, Gonzalez LO, Saa J, Garcia-Portabella P, et al. Functional heterogeneity of mesenchymal stem cells from natural niches to culture conditions: implications for further clinical uses. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*. 2021;78(2):447-67.
13. Tanaka Y, Abe M, Hiasa M, Oda A, Amou H, Nakano A, et al. Myeloma cell-osteoclast interaction enhances angiogenesis together with bone resorption: a role for vascular endothelial cell growth factor and osteopontin. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2007;13(3):816-23.
14. Habibi H, Abroun S, Hajifathali A, Soleimani M, Kaviani S, Kalantari N, et al. Osteogenic inhibition in multiple myeloma. *Cell journal*. 2013;15(3):266-71.
15. de Jong MME, Kellermayer Z, Papazian N, Tahri S, Hofste Op Bruinink D, Hoogenboezem R, et al. The multiple myeloma microenvironment is defined by an inflammatory stromal cell landscape. *Nature immunology*. 2021;22(6):769-80.
16. Garcia-Ortiz A, Rodriguez-Garcia Y, Encinas J, Maroto-Martin E, Castellano E, Teixido J, et al. The Role of Tumor Microenvironment in Multiple Myeloma Development and Progression. *Cancers*. 2021;13.(۲)
17. Alipoor SD, Chang H. Exosomal miRNAs in the Tumor Microenvironment of Multiple Myeloma. *Cells*. 2023;12.(۷)
18. Lopes R, Caetano J, Barahona F, Pestana C, Ferreira BV, Lourenco D, et al. Multiple Myeloma-Derived Extracellular Vesicles Modulate the Bone Marrow Immune Microenvironment. *Frontiers in immunology*. 2022;13:909880.

19. Zhuang X, Li X, Zhang J, Hu Y, Hu B, Shi Y, et al. Conditioned medium mimicking the tumor microenvironment augments chemotherapeutic resistance via ataxia-telangiectasia mutated and nuclear factor-kappaB pathways in gastric cancer cells. *Oncology reports*. 2018;40(4):2334-42.
20. Haggmann S, Moradi B, Frank S, Dreher T, Kammerer PW, Richter W, et al. Different culture media affect growth characteristics, surface marker distribution and chondrogenic differentiation of human bone marrow-derived mesenchymal stromal cells. *BMC musculoskeletal disorders*. 2013;14:223.
21. Zahedi S, Shamsasenjan K, Movassaghpour A, Akbarzadehlaleh P. NF-Kbeta Activation in U266 Cells on Mesenchymal Stem Cells. *Advanced pharmaceutical bulletin*. 2016;6(3):415-22.
22. Sun J, Zhang Y, Song X, Zhu J, Zhu Q. The Healing Effects of Conditioned Medium Derived from Mesenchymal Stem Cells on Radiation-Induced Skin Wounds in Rats. *Cell transplantation*. 2019;28(1):105-15.
23. Wang X, Gao JL, Zhao MM, Zhu HX, Tian YX, Li R, et al. Therapeutic effects of conditioned medium from bone marrow-derived mesenchymal stem cells on epithelial-mesenchymal transition in A549 cells. *International journal of molecular medicine*. 2018;41(2):659-68.
24. Riccardi C, Nicoletti I. Analysis of apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. *Nature protocols*. 2006;1(3):1458-61.
25. Lu Y, Zheng C, Zhang W, Liu X, Zhou Z, Wang Z, et al. Characterization of the biological and transcriptomic landscapes of bone marrow-derived mesenchymal stem cells in patients with multiple myeloma. *Cancer cell international*. 2024;24(1):116.
26. Garderet L, Mazurier C, Chapel A, Ernou I, Boutin L, Holy X, et al. Mesenchymal stem cell abnormalities in patients with multiple myeloma. *Leukemia & lymphoma*. 2007;48(10):2032-41.
27. Jurczynszyn A, Czepiel J, Gdula-Argasinska J, Perucki W, Skotnicki AB, Majka M. The Analysis of the Relationship between Multiple Myeloma Cells and Their Microenvironment. *Journal of Cancer*. 2015;6(2):160-8.
28. Attar-Schneider O, Zismanov V, Dabbah M, Tartakover-Matalon S, Drucker L, Lishner M. Multiple myeloma and bone marrow mesenchymal stem cells' crosstalk: Effect on translation initiation. *Molecular carcinogenesis*. 2016;55(9):1343-54.
29. Vahdat S, Pahlavan S, Aghdami N, Bakhshandeh B, Baharvand H. Establishment of A Protocol for In Vitro Culture of Cardiogenic Mesodermal Cells Derived from Human Embryonic Stem Cells. *Cell journal*. 2019;20(4):496-504.
30. Vahdat S, Pahlavan S, Mahmoudi E, Barekat M, Ansari H, Bakhshandeh B, et al. Expansion of Human Pluripotent Stem Cell-derived Early Cardiovascular Progenitor Cells by a Cocktail of Signaling Factors. *Scientific reports*. 2019;9(1):16006.
31. Dhanasekaran M, Indumathi S, Rashmi M, Rajkumar JS, Sudarsanam D. Unravelling the retention of proliferation and differentiation potency in extensive culture of human subcutaneous fat-derived mesenchymal stem cells in different media. *Cell proliferation*. 2012;45(6):516-26.
32. Kim HJ, Eom SY, Hwang S, Kim H, Won J, Chung S, et al. Phenotypic and functional alterations of bone marrow MSCs exposed to multiple myeloma cells. *Molecular & Cellular Toxicology*. 2024;20(3):723-33.
33. Amarasekara DS, Kim S, Rho J. Regulation of Osteoblast Differentiation by Cytokine Networks. *International journal of molecular sciences*. 2021;22.(۶)

34. Oshima T, Abe M, Asano J, Hara T, Kitazoe K, Sekimoto E, et al. Myeloma cells suppress bone formation by secreting a soluble Wnt inhibitor, sFRP-2. *Blood*. 2005;106(9):3160-5.
35. Zhao W, Zhang X, Zang L, Zhao P, Chen Y, Wang X. ILK promotes angiogenic activity of mesenchymal stem cells in multiple myeloma. *Oncology letters*. 2018;16(1):1101-6.
36. Wang K, Xie Y, Chen X, Ouyang X, Zhao L, Chen H, et al. The Activation of Muscarinic Acetylcholine Receptors Protects against Neuroinflammation in a Mouse Model through Attenuating Microglial Inflammation. *International journal of molecular sciences*. 2024;25.(۱۹)
37. Yang C, Lei D, Ouyang W, Ren J, Li H, Hu J, et al. Conditioned media from human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells and umbilical cord-derived mesenchymal stem cells efficiently induced the apoptosis and differentiation in human glioma cell lines in vitro. *BioMed research international*. 2014;2014:109389.
38. Giannakoulas N, Ntanasis-Stathopoulos I, Terpos E. The Role of Marrow Microenvironment in the Growth and Development of Malignant Plasma Cells in Multiple Myeloma. *International journal of molecular sciences*. 2021;22.(۹)
39. Kubiczikova L, Sedlarikova L, Hajek R, Sevcikova S. TGF-beta - an excellent servant but a bad master. *Journal of translational medicine*. 2012;10:183.