خون
فصلنامه پژوهشی
تابستان ۸۴ دوره ۲ شماره ۴

تأثیر کیفی هم کشتی سلول‌های کیسه زرده با رده سلولی M2-10B4 در حضور و غیاب اریتروپویتین بر تمایز آن‌ها به ردهٔ اریتروئیدی

دکتر مژده صالح نیا[1]، طیبه رهبر پور[2]، دکتر مسعود سلیمانی[3]

چکیده

سابقه و هدف

سلول‌های بنیادی خون‌ساز کیسه زرده به علت تکثیر زیاد و نداشتن آنتی‌ژن‌های وابسته به MHC برای مطالعات هماتوپویتیک مناسب‌تر هستند. با توجه به اثرات مثبت استفاده از سیستم هم کشتی در تمایز سلول‌های بنیادی، در این تحقیق سعی شد از رده سلول M2-10B4 به همراه اریتروپویتین برای تمایز سلول‌های بنیادی کیسه زرده استفاده شود.

مواد وروش‌ها

کیسه زرده از موش‌های حامله ۱۰ روزه جدا گردید و با استفاده از سرنگ و سرسوزن‌های مختلف (۱۹G، ۲۳G و ۲۷G) و آنزیم کلاژناز ۰/۱٪ و یا تریپسین ۰/۲۵٪ دارای EDTA ۰/۰۲٪ به سلول‌های منفرد تبدیل شدند. سپس از سلول‌های رده M2-10B4 که فعالیت میتوزی آن‌ها با میتومایسین متوقف شده بود برای هم کشتی استفاده شد و به محیط کشت حاوی ۵۰ng/ml فاکتور سلول بنیادی و ۱ U/ml اریتروپویتین اضافه و در۳۷ درجه سانتی‌گراد و فشار ۵ درصد CO_2 نگهداری شد. بعد از گذشت یک هفته رشد و تمایز سلول‌ها، بررسی و سنجش کلنی در محیط نیمه جامد و رنگ آمیزی بنزیدین صورت گرفت.

یافته‌ها

سلول‌ها برروی این رده سلولی به‌خوبی رشد و تکثیر یافتند. البته درمحیط حاوی اریتروپویتین، رشد بهتری نسبت به محیط فاقدآن صورت گرفته بود وسلول‌های بنزیدین مثبت یا ردهٔ اریتروئیدی بیشتری مشاهده شد.

نتیجه گیری

می‌توان با انتخاب لایه پشتیبان مثل سلول‌های استرومایی مغزاستخوان و به‌کار بردن هورمون اریتروپویتین، درصد بیشتری رده اریتروئیدی به دست آورد، گرچه برای تعیین نوع خون سازی اولیه یا ثانویه نیازبه انجام تحقیقات تکمیلی است.

کلمات کلیدی: **سلول‌های کیسه زرده ، اریتروپویتین ، تمایز، سلول‌های اریتروئیدی**

تاریخ دریافت : ۸۴/۲/ ۳
تاریخ پذیرش : ۸۴/۴/۲۵

۱- مؤلف مسؤول: PhD بافت شناسی و جنین شناسی- دانشیار دانشگاه تربیت مدرس- صندوق پستی ۱۱۱-۱۴۱۱۵
۲- کارشناس ارشد هماتولوژی- دانشگاه تربیت مدرس
۳- PhD هماتولوژی- دانشگاه تربیت مدرس

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2025-05-17]

مقدمه

با آغاز اولین ماه زندگی قبل از تولد، اولین سلول‌های خونی در خارج رویان و از مزانشیم کیسهٔ زرده به‌صورت جزایر خونی منشا می‌گیرند. این سلول‌ها عمدتاً اریتروبلاست‌های اولیه‌ای[1] هستند که بزرگ و مگالوبلاستی بوده و داخل عروق شکل می‌گیرند و هسته‌های خود را حفظ می‌کنند (۱).

جزایر خونی کیسه زرده اولین بار توسط ماکسیمو در اوایل دهه ۱۹۰۰ مشاهده شدند (۲) . مطالعات دقیق با استفاده از میکروسکوپ الکترونی و نوری در چندین‌گونه پستانداران از جمله موش و انسان انجام شده است (۵، ۴، ۳).

پس از تکوین اولین اریتروبلاست‌ها در جزایر خونی کیسه زرده، این سلول‌ها وارد عروق تازه تشکیل شده بدن جنین می‌شوند (۶).

خصوصیات سلول‌های بنیادی خون‌ساز کیسه زرده[2] عبارت است از: قدرت تکثیر بالا و عدم بروز آنتی‌ژن‌های وابسته به آنتی‌ژن‌های سازگاری نسجی[3] (۷). دو روش اساسی متفاوت برای بررسی تمایل تکوینی YS-HSC وجود دارد: یکی رشد و تمایز این سلول‌ها در *In vitro* است و دیگری تکوین رده‌های مختلف سلولی در *In vivo*. انتقال این سلول‌های بنیادی به حیوانات میزبان عامل ایجاد نقص خون‌سازی می‌باشد. شرایطی که منجر به تمایز به سلول‌های مختلف می‌شود برای هر ردهٔ سلولی متفاوت است (۸).

اریتروپوئز در مغز استخوان به شدت به فاکتور رشد اریتروپویتین (EPO) وابسته است. EPO نه تنها تکثیر و تمایز پیش‌سازهای اریتروسیت‌های قطعی را تحریک می‌کند بلکه بقای پیش‌سازهای اریتروئیدی ثانویه را نیز کنترل می‌کند (۹).

به‌هرحال نقش EPO در اریتروپوئز کیسه زرده هنوز به‌صورت قابل بحث باقی مانده است. مطالعات اولیه نشان داده است زمانی که جنین‌های مرحلهٔ گاسترولاسیون موش کشت داده می‌شوند، اضافه کردن EPO اثری روی سنتز هموگلوبین ندارد. این نتایج نشان می‌دهد که اریتروپوئز اولیه به EPO بستگی ندارد (۱۰).

همچنین مطالعات دیگر نشان داد که اضافه کردن EPO خارجی به کیسه‌های زرده جدا شده از جنین‌های موش روز ۸/۵–۷/۵ جنینی باعث افزایش تعداد سلول‌های اریتروئیدی اولیه و افزایش تجمع نسخه‌های گلوبین رویانی می‌شود (۱۱). این یافته‌ها نشان می‌دهد که سلول‌های اریتروئیدی کیسه زرده به EPO پاسخ می‌دهند و EPO به‌عنوان یک فاکتور حیاتی برای مراحل اولیه بلوغ اریتروبلاست‌های اولیه عمل می‌کند.

با توجه به امکان کشت و تکثیر سلول‌های YS-HSC در *In vitro* و این‌که تمایز آن‌ها به انواع رده‌های سلولی خونی صورت می‌گیرد، مطالعه مکانیسم‌های درگیر در تکوین و تمایز آن‌ها راهی برای شناخت بهتر خون‌سازی فراهم می‌سازد (۸، ۷).

مواد و روش‌ها

به‌منظور به‌دست آوردن موش‌های حامله از نژاد NMRI[4]، موش‌های ماده به‌صورت یک‌به‌یک به‌مدت یک شب در کنار موش‌های نر قرار گرفتند. برای تعیین حاملگی، صبح روز بعد موش‌های ماده از نظر وجود پلاک واژن بررسی شدند و موش‌های دارای پلاک واژینال، به‌عنوان موش‌های حامله (روز صفر حاملگی) در نظر گرفته شدند. موش‌های حامله در روز دهم با جابه‌جایی مهرهٔ گردنی کشته شدند. سپس پوست حیوان کاملاً با الکل ۷۰٪ تمیز شده و به‌وسیله وسایل جراحی پوست شکم و پرده صفاق برش داده شد تا ارگان‌های داخل شکم نمایان شود. با قیچی و پنس استریل، شاخ‌های رحمی جدا شده و به پلیت یک‌بار مصرف ۱۰ سانتی‌متر، حاوی محیط کشت RPMI[5] (سیگما) دارای ۵ درصد سرم جنین گاو (FBS[6] سیگما) انتقال داده شدند. با استفاده از استریومیکروسکوپ با قدرت پایین، جنین‌های شامل کیسه زرده از دیگر بافت‌های خارج جنینی و رحم جدا شدند. سپس کیسه‌های

1- Primitive erythroblasts
2- Yolk Sac- Hematopoietic Stem Cell (YS-HSC)
3- Molecular Histocompatibility Complex
4- National Medical Research Institue
5- Rouswell Park Memorial Institue
6- Fetal Bovin Serum

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2025-05-17]

زرده از جنین‌ها جدا شدند و ۵-۳ بار در محیط RPMI حاوی ۵ درصد FBS شسته شدند و کیسه‌های زرده به پلیت حاوی محیط MEM[1] دارای ۲۰ درصد FBS منتقل شدند.

روش جداسازی سلول‌های کیسه زرده

برای این‌کار ابتدا کیسه‌های زرده به‌صورت مکانیکی به‌وسیله پنس در محیط DMEM[2] قطعه قطعه شدند. سپس توسط سرسوزن‌های شمارهٔ ۱۹G و۲۳G و بعد از آن ۲۷G آسپیره شدند.

کیسه‌های زردهٔ تکه‌تکه شده در آنزیم ۰/۱ درصد کلاژناز به همراه ۲۰ درصد FBS به مدت یک‌ساعت در ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند که با این کار سلول‌های تک کیسه زرده به‌دست آمدند.

برای جداسازی سلول‌های کیسه زرده، از تریپسین ۰/۲۵ درصد و ۰/۰۲ درصد EDTA در DMEM استفاده شد. بعد از آن سلول‌ها به‌مدت ۱۰ دقیقه در ۵۰۰ دور سانتریفوژ شدند و مایع رویی دور ریخته شد. سپس سلول‌ها در محیط تازه DMEM دارای ۲۰ درصد FBS سوسپانسیه شدند و شمارش سلولی از آن‌ها صورت گرفت و تعداد کل سلول‌های زندهٔ کیسه زرده به‌دست آمد.

کشت سلول‌های کیسه زرده برروی رده سلولی M2-10B4

رده سلولی M2-10B4، سلول‌های استرومایی مشتق از مغزاستخوان موش هستند که با انتقال ژن توسط رتروویروس‌ها به‌داخل این سلول‌ها طراحی شده‌اند و می‌توانند فاکتورهای اختصاصی را تولید کنند. سلول‌های M2-10B4، IL-3 و G-CSF تولید می‌کنند که قادرند نگهداری و تمایز اولیه سلول‌های خون‌ساز را بدون کاهش قدرت تکثیری آن‌ها افزایش دهند. همچنین این رده سلولی تمایز سلول‌های خون‌ساز اولیه را در کشت‌های طولانی مدت تنظیم می‌کنند(۱۲). این سلول‌ها از بانک سلولی انستیتو پاستور ایران تهیه شده‌اند.

تعداد ۵۰ هزار سلول در ۱ میلی لیتر محیط DMEM دارای ۱۰ درصد FBS در هر چاهک پلیت ۴۸ خانه‌ای ریخته شد. این رده سلولی خاصیت چسبندگی بسیار بالایی دارند و سریعاً به کف پلیت می‌چسبند. سپس پلیت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد و فشار ۵ درصد CO_2 قرار گرفت. تعویض محیط با توجه به تغییر رنگ محیط صورت می‌گرفت.

برای توقف فعالیت میتوزی آن‌ها از میتومایسین C استفاده شد: بدین طریق که پس از تخلیه محیط رویی سلول‌ها، به لایه چسبنده، غلظت ۱۰μg/ml از میتومایسین C (که در PBS[3] و از شرکت سیگما تهیه شده است) در محیط DMEM دارای ۵ درصد FBS اضافه گشت. سپس پلیت‌ها به مدت ۳-۲ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند بعد از ۳ بار شستشو مجدداً خانه‌های پلیت با محیط کامل تعویض شد تا لایه مغذی غیر فعال به‌دست آید و پشتیبان[4] برای انتقال سلول‌های کیسه زرده، برروی آن‌ها آماده شد.

انتقال سلول‌های کیسه زرده برروی رده سلولی M2-10B4

برای این کار تعداد ۱۰۰ هزار سلول کیسه زرده در هر میلی‌لیتر محیط DMEM دارای ۲۰ درصد FBS به هر چاهک پلیت حاوی رده سلولی غیرفعال شده M2-10B4 اضافه شد.

سپس ۵۰ng/ml فاکتور سلول بنیادی (SCF[5] سیگما) و EPO ۱U/ml (سیگما) به آن اضافه گشت و در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد و فشار ۵ درصد CO_2 نگهداری شد. همراه کار یک گروه کنترل بدون EPO نیز گذاشته شد. بعد از گذشت یک هفته رشد و تمایز سلول‌ها بررسی شدند وسنجش کلنی انجام شد و از رنگ‌آمیزی بنزیدین برروی پلیت حاوی سلول‌های تشکیل شده برای بررسی تمایز اریتروئیدی سلول‌های کیسه زرده برروی این پشتیبان استفاده شد و دو گروه دارای EPO و فاقد آن با هم از نظر کیفی مقایسه شدند

1- Modified Eagle medium
2- Dulbecco's Modified Minimal Essential Medium
3- Phosphate Buffer Solution
4- Feeder
5- Stem Cell Factor

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2025-05-17]

روش انجام سنجش کلنی:

محیط سنجش کلنی از مخلوط کردن ۳۰ درصد FBS، ۴۰ درصد محیط DMEM و ۳۰ درصد آگار ۱٪ به‌دست آمد. ۴۰ درصد محیط DMEM شامل مخلوط سلول‌های موردنظر، ۱۰درصد محیط کشت تعریف شده (Condition medium) ریه و فاکتورهای رشد اینترلوکین ۳ (IL-3: سیگما) به مقدار ۴۰ng/ml، SCF به‌مقدار ۵۰ng/ml و EPO ۱ U/ml بود.

سپس این مواد کاملاً با هم مخلوط شده و به چاهک پلیت ۲۴ خانه‌ای منتقل شدند. حجم نهایی هر چاهک ۱ میلی‌لیتر بود.

پلیت به مدت ۷ روز در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد و فشار ۴ درصد CO_2 قرار داده شد.

رنگ آمیزی بنزیدین برروی کلنی

رنگ بنزیدین را به مدت ۱۵ دقیقه برروی کلنی‌های درون پلیت ریخته و پس از این مدت بدون شستشوی رنگ، محلول حاوی ۵۰ درصد متانول، ۵۰ درصد آب مقطر و ۱ میلی‌لیتر آب اکسیژنه ۳۰ درصد به آن اضافه شد و به‌مدت ۲۰ دقیقه نگه داشته شد. بعد از این زمان کلنی‌های قهوه‌ای یا آبی به‌عنوان کلنی‌های اریتروئیدی در نظر گرفته شدند.

یافته‌ها

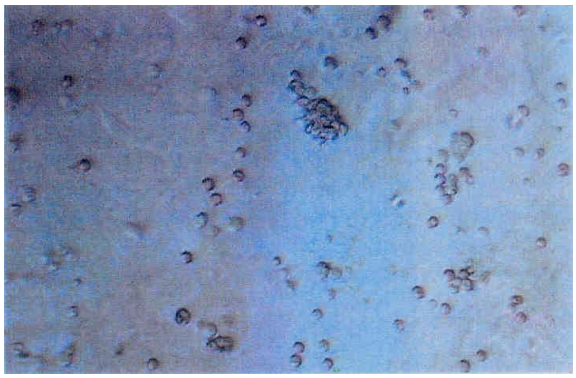
بررسی کشت سلول‌های کیسه زرده برروی لایه پشتیبان ردهٔ سلولی M2-10B4

از لایه پشتیبان M2-10B4 نیز برای بررسی تمایز سلول‌های کیسه زرده به‌ردهٔ اریتروئیدی و اثر EPO برروی این تمایز استفاده شد. برای این‌کار سلول‌های کیسه زرده برروی ردهٔ سلولی M2-10B4 غیرفعال شده در حضور فاکتورهای مناسب و غلظت EPO ۱U/ml کشت داده شدند، همچنین یک گروه فاقد EPO نیز کشت داده شد.

در هفتمین روز کشت این دو گروه با هم مقایسه شدند و دیده شد که سلول‌ها برروی این رده سلولی به خوبی رشد می‌کنند و تکثیر می‌یابند. البته در محیط حاوی EPO، نسبت به محیط فاقد EPO رشد بهتری صورت گرفته بود.

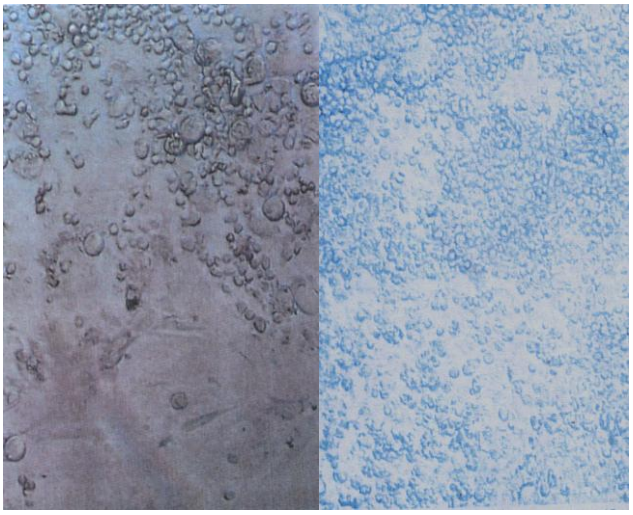
از سلول‌های رشد کرده برروی این لایه پشتیبان، رنگ‌آمیزی بنزیدین تهیه شد و سلول‌های بنزیدین مثبت مشاهده شدند که نشان دهندهٔ تمایز سلول‌های کیسه زرده به ردهٔ اریتروئیدی است.

شکل ۱، نمایی از سلول‌های کیسه زرده انتقال داده شده برروی لایه پشتیبان M2-10B4 را نشان می‌دهد.



شکل ۱: نمایی از سلول‌های کیسه زرده انتقال داده شده برروی لایه پشتیبان M2-10B4 (روز صفر) با بزرگنمایی اولیه ۲۰۰×

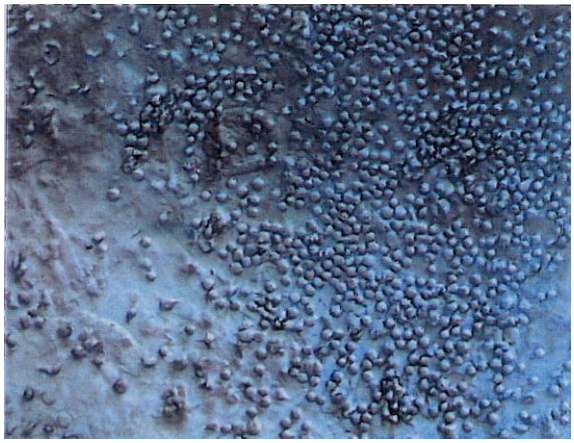
شکل ۲ مقایسه‌ای از رشد سلول‌های کیسه زرده، برروی این لایه پشتیبان در محیط حاوی EPO و در غیاب آن را در روز ٤ کشت نشان می‌دهد.



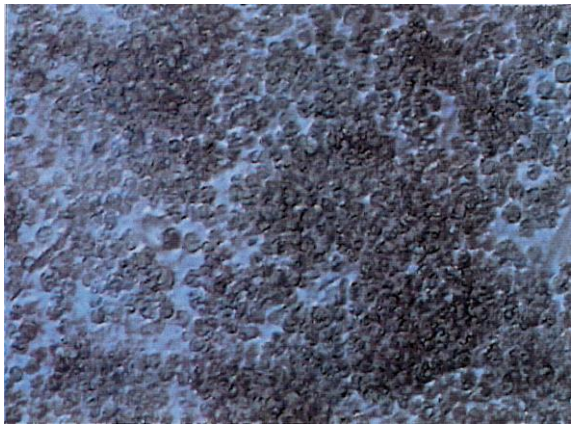
شکل۲: مقایسه سلول‌های کیسه زرده کشت داده شده برروی لایه پشتیبان M2-10B4 در حضور (سمت راست) و در غیاب (سمت چپ) EPO روز چهارم با بزرگنمایی اولیه ۱۰۰×

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2025-05-17]

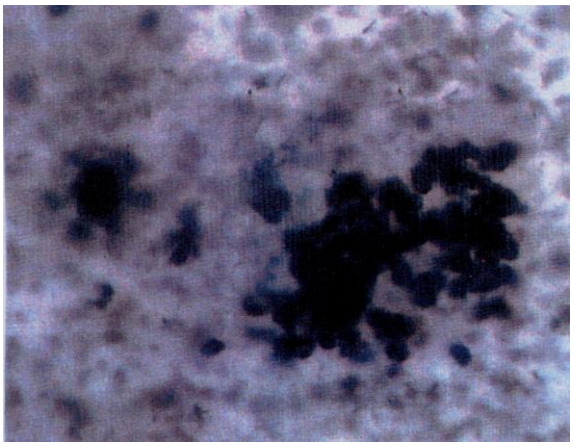
همچنین شکل‌های ۳ و۴ نمایی از رشد سلول‌های کیسه زرده برروی این لایه پشتیبان به‌ترتیب در حضور و غیاب EPO را در روز هفتم کشت نشان می‌دهد که به وضوح دیده می‌شود رشد این سلول‌ها در محیط حاوی EPO خیلی بهتر صورت گرفته است و کلنی نیز تشکیل داده‌اند. کلنی‌های اریتروئیدی به‌علت وجود هموگلوبین، نمای تیره متمایل به قرمز دارند. همان‌گونه که از تصاویر نیز مشخص است، در حضور اریتروپویتین تعداد سلول‌های کلن‌ها نیز بیشتر شده است. در رنگ آمیزی بنزیدین نیز مشخص شده که این کلن‌ها بنزیدین مثبت هستند (شکل ۵).



شکل ۳: نمایی از رشد سلول‌های کیسه زرده برروی لایه پشتیبان M2-10B4 در غیاب EPO (روز هفتم) با بزرگنمایی اولیه ۱۰۰×



شکل۴: نمایی از رشد سلول‌های کیسه زرده برروی لایه پشتیبان M2-10B4 در حضور EPO (روز هفتم) با بزرگنمایی اولیه ۱۰۰×



شکل۵: رنگ‌آمیزی بنزیدین برروی سلول‌های برداشته شده از کلنی‌های محیط نیمه جامد در روز۷ با بزرگنمایی اولیه ۱۰۰۰×

بحث

ما برای بررسی اثرEPO و هم کشتی در تمایز سلول‌های کیسه زرده به رده اریتروئیدی، از کشت سلول‌های کیسه زرده بر روی لایه پشتیبان M2-10B4 در حضور و غیاب EPO استفاده کردیم. این رده سلولی برای تمایز سلول‌های خون‌ساز اولیه در کشت‌های طولانی مدت به‌کار رفته است (۱۲). بعد از یک هفته هم‌کشتی سلول‌های کیسه زرده با این لایه پشتیبان، از سلول‌ها در حضور و غیاب EPO ، سنجش کلنی صورت گرفت و سپس رنگ‌آمیزی بنزیدین انجام شد و مشاهده شد که در حضور EPO تعداد کلن و سلول‌های بنزیدین مثبت بیشتر می‌باشد که نشان‌دهنده تأثیر EPO در افزایش تمایز اریتروئیدی سلول‌های کیسه زرده است.

شکل ۳و۴ نیز مقایسه‌ای بین سلول‌های کیسه زرده هم‌کشتی شده با این رده سلولی را به ترتیب در غیاب و در حضور EPO نشان می‌دهد که درحضور EPO رشد بسیار بهتری مشاهده می‌گردد. با این یافته‌ها نتیجه می‌گیریم که EPO نقش مهمی در تمایز سلول‌های کیسه زرده به رده اریتروئیدی دارد.

در تحقیقات مشخص شده که اریتروپویتین تنظیم کننده اصلی اریتروپوئز قطعی است که به وسیله اتصال با رسپتور خود فعالیت می‌کند و رسپتور آن روی سلول‌های پیش‌ساز اریتروئیدی بیان می‌شود (۱۳،۱۴). EPO نه تنها

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2025-05-17]

تکثیر و تمایز پیش‌سازهای اریتروسیت‌های قطعی را تحریک می‌کند و باعث افزایش تعداد اریتروسیت‌ها می‌شود، بلکه بقا و حیات پیش‌سازهای اریتروئیدی قطعی را نیز کنترل می‌کند (۹). اختلال هدفمند در EPO یا در رسپتور آن منجر به توقف کامل اریتروپوئز کبد جنینی یا مرگ در روزهای ۱۳ تا ۱۵ جنینی می‌شود، اگرچه سیگنال‌دهی EPO در تولید اریتروپوئز قطعی نقش اصلی را ایفا می‌کند، اما نقش آن در اریتروپوئز اولیه جنین (کیسه زرده) کمتر شناخته شده است و نظرات متفاوتی در مورد تأثیر آن بر اریتروپوئز اولیه وجود دارد (۱۶، ۱۵).

مطابق با نقش EPO در تمایز سلول‌های قرمز اولیه، نسخه‌های ژنی رسپتور EPO در اولین مراحل تشکیل جزایر خونی کیسه زرده در موش وجود دارد. مطالعات مشخص کرده است که تجمع mRNA رسپتور اریتروپویتین در توده‌های سلولی مزودرم کیسه زرده در حال تکوین در روز ۷/۵ جنینی شروع می‌شود، یعنی قبل از اینکه اریتروبلاست‌ها هنوز از لحاظ ظاهری قابل تشخیص باشند (۱۱). همچنین mRNA رسپتور EPO در جزایر خونی کیسه زرده در اولین مراحل سومیتی (روز ۸/۵ جنینی) وجود دارد (۱۷، ۱۱).

اگرچه ممکن است که سنتز EPO اندوژن بستگی به ظهور کبد و کلیه جنینی در روز ۱۱ داشته باشد، ولی مدارکی وجود دارد که EPO مادری می‌تواند زودتر از جفت عبور کند (۱۸). EPO توسط RT-PCR[1] در روز ۸/۵-۶/۵، هم در جنین‌های موش و هم در بافت‌های دسیدوایی[2] مادری دیده شده است (۱۹). ولی هنوز مشخص نشده که آیا سلول‌های جنینی این سیتوکاین‌ها را قبل از تکامل کبد جنینی بیان می‌کنند یا این‌که از مادر به جنین منتقل شده است.

درموارد ازهم‌گسیختگی ژن‌ها ورسپتور اریتروپویتین، ۵ تا ۲۰ برابر در تعداد اریتروبلاست‌های اولیه در گردش روز ۱۱/۵ جنینی کاهش ایجاد می‌شود و جنین‌های موتاسیون یافته به علت آنمی شدید در روز ۱۳/۵ جنینی می‌میرند. این امر نشان می‌دهد که سیگنال‌دهی EPO نقش عملکردی در اریتروپوئز اولیه دارد و در مجموع این یافته‌ها بیانگر این هستند که سلول‌های اریتروئیدی کیسه زرده به EPO پاسخ می‌دهند و EPO به عنوان فاکتور حیاتی برای مراحل اولیه بلوغ اریتروبلاست‌های اولیه عمل می‌کند (۲۱، ۲۰، ۴،۱۶).

در بخش دیگری از تحقیق حاضر برای بررسی تکثیر و تمایز سلول‌های کیسه زرده، کشت مستقیم آن‌ها در غیاب لایه پشتیبان انجام شد ولی به علت مشکلاتی که در کشت این سلول‌ها به صورت مستقیم وجود داشت، کشت آن‌ها بدین شکل موفقیت‌آمیز نبود که علت این امر می‌تواند مربوط به دلایل زیر باشد:

۱- اشکالات تکنیکی، چرا که جداسازی سلول‌های مذکور بدون آسیب رساندن به آن‌ها تقریباً غیرممکن بود.

۲- خصوصیات خود سلول‌ها که به علت خاصیت غیرچسبندگی آن‌ها، این سلول‌ها به صورت معلق در محیط می‌ماندند و ارتباطات بین سلولی انجام نمی‌شد. در نتیجه سلول‌های مرده و سلول‌هایی که خوب از هم جدا نشده بودند باعث مرگ دیگر سلول‌های کیسه زرده در چند روز اول کشت مستقیم آن‌ها می‌شدند.

همچنین در بیشتر تحقیقات برای کشت این سلول‌ها از لایه‌های پشتیبان مناسب استفاده کرده بودند. به همین دلیل از کشت آن‌ها بر روی لایه‌های پشتیبان استفاده شد.

در این رابطه کادنک و همکارانش در سال ۱۹۸۱ از هم‌کشتی سلول‌های کیسه زرده بر روی لایه پشتیبان حاصل از کبد اولیه استفاده کردند و مشاهده کردند که سلول‌های کیسه زرده بر روی این پشتیبان، سلول‌های اریتروئیدیی ایجاد کردند که گلوبین‌های بالغین را داشتند (۲۲).

در سال ۱۹۹۵ نیز لو و همکارانش از هم‌کشتی سلول‌های بنیادی خون‌ساز کیسه زرده جنین ۱۰ روزه موش با لایه پشتیبان سلول‌های اندوتلیال (مشتق از کیسه زرده) اشعه دیده استفاده کردند و نشان دادند که این سلول‌های کیسه زرده در عرض ۸ روز می‌توانند بیشتر از ۲۰۰ برابر تکثیر یابند (۲۳).

همچنین در سال ۱۹۹۵ فنی و همکارانش نیز از سیستم هم‌کشتی سلول‌های بنیادی خون‌ساز $CD34^+$ کیسه زرده با سلول‌های اندوتلیال $CD34^+$ مشتق از کیسه زرده

1- Reverse Transcriptase
2- decidual

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2025-05-17]

استفاده کردند و تمایز رده اریتروئیدی و میلوئیدی را نشان دادند (۲۴).

لو و همکارانش در سال ۱۹۹۶ و اورباخ و همکارانش در سال ۱۹۹۷ نیز نشان دادند که تمایز سلول‌های پیش‌سازخونی کیسه زرده به سلول‌های B، T و میلوئیدی در هم‌کشتی با رده سلولی اندوتلیالی مشتق از کیسه زرده در *In vivo* و *In vitro* ، ۱۰۰ برابر افزایش می‌یابد (۲۵، ۲۳). آن‌ها گزارش کردند که رده سلولی اندوتلیالی مشتق از کیسه زرده C_{166}، توانایی فراهم کردن ریزمحیط مناسب برای تکثیر این سلول‌های پیش‌ساز اولیه را دارند. همچنین دانشمندان از سلول‌های پشتیبان استرومایی مغزاستخوان (معمولاً رده سلولی S17) برای تمایز سلول‌های کیسه زرده به سلول B در حضور IL-7 استفاده کردند (۲۷، ۲۶).

نتیجه گیری

نتایج تحقیق حاضر نشان داد که می‌توان با انتخاب یک لایه پشتیبان مناسب مثل سلول‌های استرومایی مغز استخوان و به‌کار بردن هورمون اریتروپویتین، درصد بیشتری رده اریتروئیدی به‌دست آورد. گرچه برای تعیین نوع هماتوپویتز اولیه یا ثانویه نیازبه انجام تحقیقات تکمیلی با به‌کارگیری تکنیک‌هایی در سطح مولکولی است.

منابع

1- Kumaravelu P, Hook L, Morrison AM, *et al*. Quantitative developmental anatomy of definitive haematopoietic stem cells/long term repopulating units (HSC/RUs): role of the aorta-gonad-mesonephros (AGM) region and the yolk sac in colonisation of the mouse embryonic liver. evelopment, 2002; 129: 4891-4899
2- Maximow AA. Untersuchungen uber blut und bindegewebe 1. Die fruhesten entwick lungsstadien der blut und bindegewebeszellan bein saugeberembryo, bis zum anfang der blutbilding unden leber. Arch Mikroskop Anat, 1909; 73: 444.
3- Haar JL, Ackerman GA. A phase and electron microscopic study of vasculogenesis and erythropoiesis in the yolk sac of the mouse. Anat Rec, 1971; 170: 199.
4- Sasaki K, Matsamura G. Hematopoietic cells of yolk sac and liver in the mouse embryo: a light and electron microscopical study. J Anat, 1986; 148: 87.
5- Palis Y, Yoder MC. Yolk sac hematopoiesis: the first blood cells of mouse and man. Exp Hematol, 2001; 29: 927-936.
6- Sangiorgi F, Woods CM, Lazarides E. Vimentin down regulation is an inherent feature of murine erythropoiesis and occurs independently of lineage. Development, 1990; 110: 85.
7- Huang H, Auerbach R. Identification and characterization of hematopoietic stem cells from the yolk sac of the early mouse embryo. Proc Natl Acad Sci USA, 1993; 90: 110-114.
8- Lu LS, Wang SJ, Auerbach R. *In vitro* and *in vivo* differentiation into B cells, T cells and myeloid cells of primitive yolk sac hematopoietic precursor cells expanded > 100-fold by coculture with a clonal yolk sac endothelial cell line. Proc Natl Acad Sci USA, 1996; 93: 14782-14787.
9- Koury M, Bondurant M. The molecular mechanism of EPO action. Eur J Biochem, 1992; 210: 649.
10- Cole RJ, Paul J. The effects of EPO on haem synthesis in mouse yolk sac and cultured foetal liver cells. J Emb Exp Morph, 1966; 15: 245.
11- Mc Gann JK, Silver L, Liesveld J, *et al*. Epo-receptor and function during the initiation of murine yolk sac erythropoiesis. Exp Hematol, 1997; 25: 1149.
12- Sutherland HJ, Eaves CJ, Lansdrop PM, *et al*. Differential regulation of primitive human hematopoietic cells in long-term cultures maintained on genetically engineered murine stromal cells. Blood, 1991; 78(3): 666.
13- Wei YZ, Li J, Wagner TE. Long-term expression of human growth hormone (hGH) in mice containing allogenic yolk sac cell derived neovascular implants expressing hGH. Stem Cells, 1996; 14: 232-238.
14- Metcalf D, Moore MAS. Embryonic aspects of haemopoiesis. In: Haemopoietic cells Amsterdam, London: North-Holland Publishing Co. 1971; pp. 1550.
15- Wu H, Liu X, Jaenisch R, *et al*. Generation of committed erythroid BFU-E and CFU-E progenitors does not require erythropoietin or the erythropoietin receptor. Cell, 1995; 83: 59.
16- Lin C-S. Differential effects of an EPO receptor gene disruption on primitive and definitive erythropoiesis. Gene Dev, 1996; 10: 154.
17- Lee R, Kertesz N, Joseph SB, *et al*. Epo and EPOR expression and 2 waves of erythropoiesis. Blood, 2001; 98(5): N:S: 1408-1415.
18- Boussios T, Bertles JF, Goldwasser E. Epo-receptor characteristics during the ontogeny of hamster yolk sac erythroid cells. J Biol Chem, 1989; 264: 16017.
19- Seth R, Shum L, Wu F, *et al*. Role of epidermal growth factor expression in early mouse embryo lung branching morphogenesis in culture: Antisense oligodeoxynucleotide inhibitory strategy. Dev Biol, 1993; 158: 555.

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2025-05-17]

20- Kieran MW, Pirkins AC, Orkin SH, *et al*. Thrombopoietin rescues in vitro erythroid colony formation from mouse embryos lacking the EPOR. Proc Natl Acad Sci USA, 1996; 93: 9126.
21- Neubauer H, Cumano A, Muller M, *et al*. Jak2 deficiency defines an essential development checkpoint in definitive hematopoiesis. Cell, 1998; 93: 397.
22- Cudennec CA, Thiery J-P, Le Douarin NM. *In vitro* induction of adult erythropoiesis in early mouse yolk sac. Proc Natl Acad Sci USA, 1981; 78: 2412.
23- Lu L-S, Wang S-J, Auerbach R. Primitive hematopoietic stem cells and endothelial cells in the mouse yolk sac. In: Gluckman E, Coulombel L, eds. Montrouge, France/London : Colloque INSERM/John Libbey Eurotext Ltd. 1995; 235: 33-36.
24- Fennie C, Cheng J, Young P, *et al*. CD_{34}^{+} endothelial cell lines derived from murine yolk sac induce the proliferation and differentiation of yolk sac CD_{34}^{+} hematopoietic progenitors. Blood. 1995; 86(12): 4454-4467.
25- Auerbach R, Wang SJ, Yu D, *et al*. Role of endothelium in the control of mouse yolk sac stem cell differentiation. Dev Comparative Immunol, 1998; 22(3): 333-338.
26- Cumano A, Dorshkind K, Gillis S, *et al*. The influence of S17 stromal cells and IL-7 on B cell development. Eur J Immunol, 1990; 20: 2183-2189.
27- Dorshkind K. Regulation of hemopoiesis by bone marrow stromal cells and their products. Annu Rev Immunol, 1990; 8: 111-137.

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2025-05-17]

خون
فصلنامه پژوهشی

Quality effect of co-culturing of yolk sac cells with M2-10B4 line on their differentiation in the presence and absence of erythropoietin

Salehnia M.[1](PhD), Rahbarpour T.[1] (MS), Soleimani M.[1](PhD)

[1]Tarbiat Modarres University

Abstract

Background and Objectives
The embryonic yolk sac cells have two unique characteristics: high proliferative capacity and lack of MHC associated antigen. According to the positive effects of co-culturing system on the differentiation of stem cells, in this study we evaluate the effect of M2-10B4 stromal cell line and erythropoietin (EPO) on the differentiation of embryonic yolk sac cells to erythroid cells.

Materials and Methods
The yolk sacs were dissected from 10-day mice and their cells were separated using syring needles and enzyme digestions (0.1% collagenase/20 fetal calf serum (FBS) or 0.25% trypsin – 0.02% EDTA at 37°C). The M2-10B4 stromal cells were cultured in the DMEM medium and mitotically inactivated using mitomycin C. These cells were co-cultured with yolk stem cells in the medium containing stem cell factor (50 ng/ml); EPO (1U/ml) and the colony assay of these cells (5×10^4 cells/ml) have been done in the presence of interleukin-3 (40 ng/ml), stem cell factor (50 ng/ml) and EPO (1U/ml) in semisolid medium. After 7 days, benzidine staining on the colonies was carried out and positive benzidine colonies were considered as erythroid colonies.

Results
The colony assay showed that in the presence of EPO the growth of erythroid colonies were better than the other group and they had more benzidine colonies and cells.

Conclusions
By using the stromal feeder layer such as bone marrow stromal cells and erythropoietin the differentiation and proliferation of YSC was improved; however, further studies are needed.

***Key words**:* Yolk sac cells, Erythropoietin, Differentiation, Erythroid cells
SJIBTO 2005; 2(4): 73-81

Received: 23 Apr 2005
Accepted:16 Jul 2005

Correspondence: Salehnia M., PhD of Emberyology and Histology, Tarbiat Modarres University
P.O.Box: 14115-111, Tehran, Iran. Tel: (+9821) 88011001; Fax : (+9821) 88013030
E-mail: *mogdeh@dr.com*

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2025-05-17]