خون
فصلنامه پژوهشی
دوره ۵ شماره ۲ تابستان ۸۷ (۹۸-۸۹)

تمایز سلول‌های بنیادی جنینی موشی به رده مگاکاریوسیتی در محیط کشت عاری از لایه تغذیه کننده

محمد قربانی[۱]، دکتر مسعود سلیمانی[۲]، دکتر سعید کاویانی[۳]، امیر آتشی[۴]

چکیده

سابقه و هدف

سلول‌های بنیادی جنینی، سلول‌های بالقوه چند ظرفیتی اند که ازتوده سلول داخلی مرحله بلاستوسیت جنینی مشتق می‌شوند. تاکنون تمایز سلول‌های بنیادی جنینی به رده مگاکاریوسیتی، از هم کشتی با سلول‌های استرومایی مغز استخوان بوده است که دارای معایبی چون احتمال انتقال آلودگی از لایه تغذیه کننده به سلول‌های بنیادی وهمچنین ترشح فاکتورهای نامشخص از این لایه در ایجاد تمایز ناخواسته و ایجاد تغییرات ژنتیکی در سلول‌های بنیادی جنینی می‌باشد.در این مطالعه با حذف لایه تغذیه کننده، سلول‌های بنیادی جنینی موش به رده مگاکاریوسیتی تمایز داده شد.

مواد وروش‌ها

مطالعه انجام شده از نوع تجربی بود. به روش قطره گذاری آویزان، از سلول‌های بنیادی جنینی موش رده R1 ، اجسام شبه جنینی حاصل شدو سپس اجسام شبه جنینی، در دو گروه آزمون (محیط IMDM حاوی FBS ، ال گلوتامین، اسیدهای آمینه غیرضروری،بتامرکاپتواتانول و فاکتورهای رشد TPO وIL3) وگروه کنترل(همان محیط کشت آزمون و فاقد فاکتورهای رشد) کشت شدند.بعد از گذشت ۴ روز، آزمون سنجش کلونی و پس از ۸ روز رنگ آمیزی ایمونوسیتوشیمی مولکول CD41 وآزمون نسخه برداری از ژن PF4 توسط RT-PCR برای اثبات تمایز به رده مگاکاریوسیتی انجام گرفت.

یافته‌ها

نتایج سنجش کلونی نشان داد که سلول‌های مورد نظر توانایی تشکیل کلونی را دارند. تعداد کل کلونی‌های تشکیل شده ۶/۱ ± ۵۷ و کلونی‌های بنزیدین مثبت ۳/۶ ± ۱۸ بود. از طرفی رنگ آمیزی ایمونوسیتوشیمی و RT-PCR نشان داد که مولکول CD41 و ژن PF4 در سلول‌های تمایز یافته بیان می‌شوند.

نتیجه گیری

نتایج ما نشان داد که سلول‌های بنیادی جنینی موش بدون استفاده از لایه تغذیه کننده به رده سلول‌های مگاکاریوسیتی تمایز می‌یابند و می‌توان از سلول‌های بنیادی جنینی به عنوان منبع نامحدود وجدید برای تولید رده مگاکاریوسیتی وانجام تحقیقات پایه‌ای وبیولوژیکی این رده استفاده نمود.

کلمات کلیدی: **سلول‌های بنیادی جنینی، مگاکاریوسیت، تمایز سلولی**

تاریخ دریافت : ۸۷/ ۱/۳۱
تاریخ پذیرش : ۸۷/ ۵/ ۲

۱ـ دانشجوی کارشناس ارشد هماتولوژی ـ دانشگاه تربیت مدرس
۲ـ مؤلف مسؤول: PhD هماتولوژی ـ استادیار دانشگاه تربیت مدرس ـ صندوق پستی: ۱۱۱-۱۴۱۱۵
۳- PhD هماتولوژی ـ استادیار دانشگاه تربیت مدرس
۴- دانشجوی PhD هماتولوژی ـ دانشگاه تربیت مدرس

مقدمه

سلول‌های بنیادی جنینی، سلول‌های بالقوه چند ظرفیتی می‌باشند که از توده سلولی داخلی مرحله بلاستوسیت جنینی به دست می‌آیند(۲، ۱). دو ویژگی آن‌ها را از بقیه سلول‌ها متمایز می‌کند، اول این که آن‌ها می‌توانند به صورت جمعیت خالص سلولی بدون تمایز برای مدت زمان طولانی در کشت نگه داشته شده و تکثیر یابند و برخلاف رده‌های سلول‌های تومروی، سلول‌های بنیادی جنینی، کاریوتیپ طبیعی را به دنبال تقسیم‌های متوالی در کشت حفظ می‌کنند(خاصیت نامیرایی بدون جهش). دومین ویژگی این است که سلول‌های بنیادی جنینی چند ظرفیتی‌اند و این توانایی را دارند که در شرایط مناسب به هر سه لایه زاینده(اندودرم، مزودرم، اکتودرم) هم در *in vivo* و هم در *in vitro* تمایز یابند و این تمایز به وسیله اجسام شبه جنینی(EB= embryoid bodies) در *in vitro* و تراتوماها (teratomas) در *in vivo* مشخص می‌گردد.

زمانی که سلول‌های بنیادی جنینی به موش SCID (Severe Combined Immuno deficient) تزریق شوند، انواع بافت‌ها از جمله اپی‌تلیوم روده، غضروف، استخوان، اپی‌تلیوم عصبی و ... به وجود می‌آورند(۵-۳) در واقع اجسام شبه جنینی به عنوان تجمعی از سلول‌های تمایز کننده‌اند که دارای توانایی تشکیل هر سه لایه زاینده جنینی می‌باشند(۶). از سلول‌های بنیادی جنینی به راحتی می‌توان در آزمایش‌های مربوط به دستکاری ژنتیکی استفاده نمود(۸، ۷). اغلب کشت سلول‌های بنیادی جنینی موش بر روی لایه تغذیه کننده(سلول‌های فیبروبلاست جنین موش یا MEF) و با حضور فاکتور مهارکننده لوکمی(LIF) انجام می‌شود. پس از پیشرفت‌هایی که در زمینه کشت بدون لایه تغذیه کننده سلول‌های بنیادی جنینی صورت گرفت، استفاده از محیط‌های بدون سرم با حضور LIF و BMP4 (Bone Morphogenetic Protein4) توسط ییِنگ و همکاران در سال ۲۰۰۳ معرفی گردید(۹).

به طور کلی برای شروع تمایز سلول‌های بنیادی جنینی به سلول‌های رده خونساز، روش‌های زیر وجود دارد:

۱- حذف فاکتورهای ممانعت کننده تمایزی و اجازه دادن به سلول‌های بنیادی جنینی برای تشکیل کلونی‌های سه بعدی(اجسام شبه جنینی) موجب می‌گردد تا پدیده تمایز در سلول‌ها شروع شود.

۲- در روش دوم سلول‌های بنیادی جنینی به صورت مستقیم روی سلول‌های استرومایی کشت می‌شوند و شروع تمایز در اثر تماس مستقیم با این سلول‌ها اتفاق می‌افتد(معمولاً رده سلولی OP9).

۳- تمایز روی تک لایه‌ای از پروتئین‌های ماتریکس خارج سلولی(ECM)(۹، ۶).

رده مگاکاریوسیتی یکی از رده‌های سلول‌های خونساز است که کمتر از یک درصد سلول‌های مغز استخوان را تشکیل می‌دهد(۱۰). تولید مگاکاریوسیت یا مگاکاریوپوئز توسط یک سری از فاکتورهای رشد کنترل می‌شود. علی‌رغم آگاهی‌های اخیر در زمینه مگاکاریوپوئز، هنوز مکانیسم‌های مربوط به این فرآیند به میزان زیادی ناشناخته است. یک مانع اصلی برای انجام این موضوع مشکلات مربوط به تکثیر و تمایز جمعیت مگاکاریوسیتی برای مطالعه وقایع سلولی و مولکولی می‌باشد(۱۱). کشت سلول‌های بنیادی خونساز $CD34^+$ برای بلوغ مگاکاریوسیتی از منابع مختلف(مغز استخوان، خون محیطی، بند ناف) در محیط آزمایشگاهی، موفقیت‌آمیز بوده است اما مشکلاتی هم چون به دست آوردن تعداد کافی سلول‌های بنیادی $CD34^+$ و مشکلات تکثیر این سلول‌ها در محیط آزمایشگاهی، تولید مقدار کافی مگاکاریوسیت برای کاربردهای بالینی و تحقیقات پایه‌ای را محدود کرده است(۷). سلول‌های بنیادی جنینی منبع خوب دیگری هستند، چرا که قادرند به سرعت تکثیر و به انواع مختلف سلول تمایز یابند و محصولات خونی مشتق از آن‌ها می‌تواند در مقادیر بسیار زیاد تولید شود(۶).

جهت شروع تمایز سلول‌های بنیادی جنینی به سلول‌های رده مگاکاریوسیتی، تاکنون از هم کشتی سلول‌های استرومایی مغز استخوان(OP9) استفاده شده است. این روش دارای معایبی می‌باشد که به طور خلاصه در زیر بیان شده است:

۱- عدم شناسایی فاکتورهای مترشحه از سلول‌های استرومایی که موجب تمایز می‌شوند(۱۲).

۲- احتمال انتقال آلودگی از رده سلول‌های استرومایی به

سلول‌های بنیادی جنینی(۱۳، ۴).

۳- وقت‌گیر بودن تکثیر و زحمت داشتن نگهداری سلول‌های تغذیه کننده(۱۴).

۴- ایجاد تمایز ناخواسته سلول‌های بنیادی جنینی توسط سلول‌های استرومایی با ترشح فاکتورهای نامشخص(۹).

۵- مشکل بودن جداسازی سلول‌های تمایز یافته از سلول‌های استرومایی(۹).

برای بررسی بهتر مکانیسم‌های بیوشیمی، مولکولی و سلولی در تکامل سلول‌های بنیادی جنینی و هم چنین با این تصور که در آینده از مشتقات سلول‌های بنیادی جنینی برای پیوند و سلول درمانی استفاده خواهد شد، حذف کردن یا به حداقل رساندن استفاده از سلول‌های استرومایی ضروری به نظر می‌رسد. این مطالعه به منظور حذف لایه تغذیه‌کننده در تمایز سلول‌های بنیادی جنینی به رده مگاکاریوسیتی صورت گرفته است. این مطالعه برای این منظور، با تشکیل اجسام شبه جنینی با روش قطره آویزان(Hanging drop) و سپس تمایز جهت‌دار این سلول‌ها در مجاورت با فاکتورهای رشد خونساز و بدون حضور لایه تغذیه کننده، انجام شد.

مواد و روش‌ها

کشت سلول‌های بنیادی جنینی موش(R1)

مطالعه انجام شده از نوع تجربی بود. سلول‌های بنیادی جنینی موش(R1) از نژاد ۱۲۹(هدیه از دکتر اسماعیلی، استادیار دانشگاه شهرکرد) روی لایه تغذیه کننده MEF (Mouse Embryonic Fibroblast) کشت داده شدند(شکل ۱).

شکل ۱: سلول‌های بنیادی جنینی موشی کشت شده بر روی فیبروبلاست جنینی موش

محیط کشت برای تکثیر سلول‌های بنیادی جنینی عبارت بود از Knock out D-MEM (جیبکو)، ۱۵ درصد FCS (جیبکو)، ۰/۱ میلی مولار بتامرکاپتواتانول(سیگما)، ۲ میلی مولار ال‌گلوتامین(جیبکو)، ۰/۱ میلی‌مولار اسیدهای آمینه غیر ضروری(جیبکو) و فاکتور ممانعت کننده لوکمیایی(Chemicon) با غلظت U/ml ۱۰۰۰.

برای تهیه لایه تغذیه کننده از جنین‌های ۱۲/۵ تا ۱۴ روزه موش سفید نژاد NMRI با سن ۸ تا ۱۲ هفته که از انستیتو پاستور تهیه شدند، استفاده شد. پس از خروج جنین‌ها از رحم، اندام‌های جنینی به همراه ارگان‌های داخلی و قسمت بالای سر از جنین جدا شدند. لاشه جنین ۳ بار با DMEM با رعایت موارد استریل شستشو داده شدند. سپس جنین‌ها به قطعات بسیار ریزی قطعه قطعه شدند و توسط محلول تریپسین -EDTA به سلول‌های تکی تبدیل شدند و بعد در محیط کشت DMEM به همراه ۱۰٪ سرم جنین گاو کشت شدند. روز بعد تعویض محیط انجام گرفت و اجازه داده شد تا سلول‌ها کاملاً رشد کرده و کف پلیت را پر کنند.

به منظور کشت سلول‌های بنیادی جنینی یک روز قبل، لایه پشتیبان یا تغذیه کننده با استفاده از غلظت mg/ml ۱۰ میتومایسین C غیر فعال شد، پس از غیر فعال سازی، به لایه تغذیه کننده محیط نگهدارنده سلول‌های بنیادی جنینی اضافه گردید. به سلول‌های بنیادی نباید اجازه داد که زیاد رشد کنند و ایجاد کلونی‌های بزرگی نمایند که علایم مورفولوژیکی تمایز در آن‌ها دیده شود. لذا هر ۲ تا ۳ روز باید سلول‌ها را به وسیله محلول تریپسین -EDTA به صورت تکی در آورده و به فلاسک جدیدی که لایه تغذیه آن در روز قبل غیر فعال شده‌اند منتقل کرد(۱۶، ۱۵).

تشکیل اجسام شبه جنینی

پس از ارزیابی محیط کشت سلول‌های بنیادی جنینی، موش رده R1 که اولاً نباید بیش از ۳۰ تا ۵۰ درصد سطح ناحیه کشت را پوشانده باشد و ثانیاً هیچ تمایز مرفولوژیکی مشاهده نشود، با تریپسین ۰/۰۵ درصد و ۰/۳۵ میلی مولار EDTA جدا شدند و به صورت سوسپانسیون تک سلولی در آمدند.

علایم تمایز مرفولوژیکی سلول‌های بنیادی جنینی به صورت زیر می‌باشد:

۱- حضور سلول‌هایی با کناره مضرس و تیره در اطراف کلونی‌ها که از نظر مرفولوژیکی با حالت تمایز نیافته سلول‌های بنیادی جنینی که در مرکز وجود دارند متفاوت می‌باشد.

۲- کلونی‌های بزرگ با مرکز نکروتیک که بیانگر پاساژ نیافتن سلول‌های بنیادی جنینی در چند روز گذشته می‌باشد.

۳- به نظر رسیدن کلونی‌ها به صورت سلول‌های واحد، به جای این که به صورت توده‌ای باشند و اغلب هسته‌های سلولی در این سلول‌ها به وضوح قابل مشاهده‌اند.

۴- کلونی‌های مسطح که به صورت لایه‌های تک سلولی به نظر می‌رسند و توسط یک مرز دایره مانند احاطه می‌شوند.

با مشاهده هر یک از علایم تمایز خود به خودی، کیفیت سلول‌های بنیادی جنینی برای تکثیر، فریز یا آزمایش‌های تمایزی مناسب نخواهد بود(۱۵).

تعیین درصد زنده بودن سلول‌ها به وسیله رنگ‌آمیزی حیاتی تریپان بلو صورت گرفت. پس از رنگ‌آمیزی و شمارش توسط لام نئوبار مشخص گردید که ۹۸ درصد سلول‌ها زنده‌اند. برای تشکیل اجسام شبه جنینی(EBs) مورد استفاده در این مطالعه از روش قطره آویزان استفاده شد، در این روش تعداد ۸۰۰ سلول بنیادی جنینی موش در هر قطره به صورت آویزان در محیط کشت سلول‌های بنیادی جنینی موش کشت شدند.

این محیط شامل محیط کشت Knock out DMEM (جیبکو) با افزودنی‌های زیر بود:

۱۵ درصد FCS (جیبکو)، ۰/۱ میلی مولار بتا مرکاپتو اتانول(سیگما)، ۲ میلی مولار ال گلوتامین(جیبکو)، ۰/۱ میلی مولار اسیدهای آمینه غیر ضروری(جیبکو)، U/ml ۱۰۰ پنی‌سیلین و µg/ml ۱۰۰ استرپتومایسین(جیبکو) که پس از دو روز انکوباسیون در ۳۷ درجه سانتی‌گراد و ۵ درصد CO_2 ،اجسام شبه جنینی تشکیل شدند. اجسام شبه جنینی از میان قطرات برداشته شدند و در ظروف کشت باکتری(Griner) با همان محیط کشت قبلی کشت شدند(۱۷، ۶).

تمایز به رده مگاکاریوسیتی

پس از گذشت ۳ روز از کشت در ظروف کشت باکتری، تعداد دو جسم شبه جنینی به هر خانه از پلیت ۱۲ خانه‌ای(TPP) در دو گروه آزمون و کنترل منتقل شدند. محیط کشت مورد استفاده برای تمایز به رده مگاکاریوسیتی در گروه آزمون، شامل: محیط کشت IMDM (Iscovs Modified Dullbecco Medium)، ۱۵ درصد FCS (جیبکو)، ۲ میلی مولار ال‌گلوتامین(جیبکو)، ۰/۱ میلی مولار بتامر کاپتواتانول(سیگما)، ۰/۱ میلی مولار اسیدهای آمینه غیر ضروری(جیبکو)، µg/ml ۱۰۰ استرپتومایسین (جیبکو)، U/ml ۱۰۰ پنی‌سیلین به همراه فاکتورهای رشد IL3(ng/ml ۲۰) و TPO(ng/ml ۲۵)، که هر دو فاکتور از شرکت پیپروتک خریداری شدند. محیط کشت در گروه کنترل شامل همان محیط ذکر شده در گروه آزمون بدون فاکتورهای رشد بود. تا ۴ روز پس از انتقال سلول‌ها در محیط تمایزی، نصف محیط کشت برداشته شد و به همان اندازه محیط تازه به سلول‌ها اضافه گردید، در روز چهارم سلول‌های سه خانه از گروه‌های آزمون و کنترل بعد از تک سلولی کردن برای آزمون سنجش کلونی به محیط کشت سنجش کلونی منتقل شدند و سلول‌های خانه‌های دیگر در همان محیط القا کننده تمایز با تعویض محیط کامل تا روز ۸ نگهداری شدند که در این مدت اجسام شبه جنینی به کف پلیت چسبیده و تغییرات مربوط به تکثیر و تمایز در آن‌ها دیده شد. در روز ۸ پس از کشت در محیط القا کننده، اجسام شبه جنینی تمایز یافته از کف پلیت با کمک پیپتاژ کنده شده و با استفاده از تریپسین ۰/۰۵ درصد و ۰/۳۵ میلی مولار EDTA به صورت تک سلولی درآمده و برای انجام رنگ‌آمیزی ایمونوسیتوشیمی مارکر CD41 و آزمون RT-PCR به منظور بررسی تمایز به رده مگاکاریوسیتی از طریق پی‌گیری بیان ژن اختصاصی رده مگاکاریوسیتی PF4(Platelet Factor 4) استفاده شد.

آزمون سنجش کلونی

سنجش کلونی به منظور بررسی توانایی تشکیل

کلونی‌های خونساز در *in vitro* صورت گرفت. برای این منظور از محیط کامل و مخصوص آزمون سنجش کلونی شرکت استم سل تکنولوژیز استفاده گردید. سلول‌ها را با محیط کشت IMDM حاوی ۲٪ FBS رقیق کرده تا به غلظت ۲×۱۰^{۵} (X ۱۰) برسد، سپس ۳۰۰ میکرولیتر از سلول رقیق شده به ۳ میلی‌لیتر از محیط آماده methocult اضافه شد. ویال مخلوط، به شدت ورتکس گردید و به مدت ۵-۲ دقیقه فرصت داده شد تا حباب‌ها خارج گردند، سپس با استفاده از سرنگ با سوزن گاژ ۱۶، مخلوط سلول و محیط به ظروف کشت باکتری ۳۵ میلی‌متری آماده با سطح کم چسبنده منتقل گردید و ظروف کشت به مدت ۱۶-۱۴ روز در انکوباتور با ۵٪ CO_2 و دمای ۳۷°C با رطوبت بالا نگهداری شد. در نهایت ۲×۱۰^{۴} /ml سلول در هر میلی‌لیتر محیط کشت خواهد بود. پس از مدت ذکر شده به منظور ارزیابی کشت از نظر وجود کلونی‌های خونساز رده اریتروئیدی، رنگ‌آمیزی بنزیدین صورت گرفت. بعد از گذشت ۱۴ تا ۱۶ روز، کشت از لحاظ کلونی‌های بنزیدین مثبت بررسی و کل کلونی‌ها شمارش شد. سلول‌های رده مگاکاریوسیتی غالباً به همراه کلونی‌های خونساز CFU-Mixed هستند. این کلونی‌های خونساز حاوی سلول‌های رده اریتروئیدی نیز هستند که با رنگ‌آمیزی بنزیدین قابل تشخیص می‌باشند. این آزمون سه بار تکرار شد(۱۵، ۵).

روش رنگ‌آمیزی بنزیدین

رنگ بنزیدین را به مدت ۱۵ دقیقه روی کلونی‌ها درون ظروف کشت سنجش کلونی ریخته و بدون شستشوی رنگ، محلول حاوی ۵۰٪ متانول و ۵۰٪ درصد آب مقطر و ۱ میلی‌لیتر آب اکسیژنه را به آن اضافه کرده، مدت ۲۰ دقیقه نگه می‌داریم. کلونی‌ها از لحاظ وجود رنگ آبی تیره پس از رنگ‌آمیزی بررسی می‌شوند.

رنگ‌آمیزی ایمونوسیتوشیمی مولکول CD41

مولکول CD41 یا گلیکوپروتئین IIb پلاکتی در رده مگاکاریوسیتی بیان می‌شود. به منظور بررسی این مولکول از رنگ‌آمیزی ایمونوسیتوشیمی با آنتی‌بادی مونوکلونال Rat antimouse CD 41 غیر کونژوگه(R & D systems) و سپس از آنتی‌بادی ثانویه mouse anti rat IgG کونژوگه با FITC (ebioscience) استفاده شد. سلول‌ها بعد از روز هشتم در محیط کشت القا کننده توسط تریپسینیزه کردن و شستشو با PBS ، با پارافرمالدئید ۴٪ فیکس گردیدند و پس از شستشو و سانتریفیوژ به ۱۰۰ میکرولیتر از سلول‌ها، آنتی‌بادی اولیه رقیق شده در ۰/۱٪ BSA/PBS اضافه گردید و یک ساعت در ۴°C انکوبه شد. سپس با PBS شستشو داده و آنتی‌بادی ثانویه رقیق شده در ۰/۱٪ BSA/PBS اضافه شد. بعد از گذشت یک ساعت در دمای اتاق و تاریکی باPBS شستشو داده شدند. سپس رنگ‌آمیزی هسته توسط DAPI انجام شد، از آن‌ها گستره تهیه گردید و توسط میکروسکوپ فلورسنت از نظر بیان سطحی مولکول CD41 بررسی شد. برای اطمینان از پاسخ به دست آمده ایمونوسیتوشیمی مولکول CD41 ، رنگ‌آمیزی کنترل منفی با افزودن آنتی‌بادی ثانویه و بدون استفاده از آنتی‌بادی اولیه انجام گرفت. برای مشخص نمودن هسته، سلول‌ها توسط DAPI رنگ‌آمیزی شدند.

آنالیز RT-PCR

برای بررسی تمایز به رده مگاکاریوسیتی، بیان اختصاصی ژن این رده(PF4) بررسی گردید. برای این منظور، RNA سلول‌های مورد نظر با استفاده از دستورالعمل شرکت فرمنتاز جداسازی شد. در ادامه ساخت cDNA در واکنش رونویسی معکوس(RT)، از ۵ m/µl آنزیم Revert Aid^{Tm} m-mulv RT و ۰/۱ میکرومول آغازگر هگزامر تصادفی(فرمنتاز) استفاده شد. سپس واکنش PCR با ۱ x PCR buffer، ۲ µg cDNA، ۱ µM dNTP (سیناژن، AMS^{Tm})، ۱ µM $MgCl_2$، ۱/۵ unit Tag DNA polymerase (فرمنتاز)، ۰/۱ میکرومول از آغازگر ژن اختصاصی رده مگاکاریوسیتی(PF4) [F: AGC CCT AGA CCC ATT TCC TC و R: GGC AAA TTT TCC TCC CAT TC] با سایز مارکر ۳۳۶ bp در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳ دقیقه، دمای دناتوره ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، دمای اتصال آغازگرها ۵۸ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۵ ثانیه و دمای بسط آغازگرها ۷۲ درجه سانتی‌گراد به

مدت ۴۵ ثانیه در ۳۰ سیکل و سپس برای بسط نهایی آغازگرها ۷ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. در پایان محصول PCR درون چاهک‌های ژل ۲ درصد آگارز ریخته شد و پس از الکتروفورز با رنگ اتیدیوم بروماید رنگ‌آمیزی و سپس ارزیابی شد(۱۱).

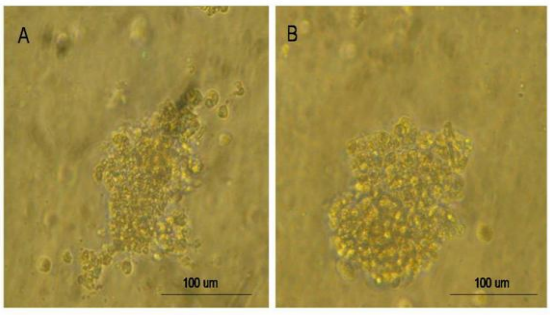
یافته‌ها

آزمون سنجش کلونی

با توجه به این نکته که فعالیت عملکردی سلول‌های خونساز با توانایی آن‌ها در تشکیل کلونی همراه است، این آزمون انجام گرفت(جدول ۱ و شکل ۲).

جدول ۱: تعداد کل کلونی‌ها و کلونی‌های بنزیدین مثبت و شمارش شده توسط آزمون سنجش کلونی از رده سلول بنیادی جنینی موش R1

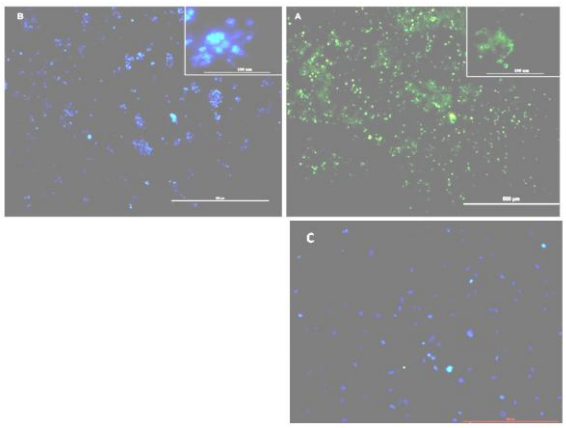
تکرار آزمایش	تعداد کل کلونی‌ها	تعداد کلونی‌های بنزیدین مثبت
بار اول	۶۳	۲۳
بار دوم	۵۱	۱۵
بار سوم	۵۹	۱۷
جمع کل	۱۷۳	۵۴
Mean ± SD	۵۷ ± ۶/۱	۱۸ ± ۳/۶



شکل ۲: نمایی از رنگ‌آمیزی بنزیدین روی کلونی‌های حاصل از کشت سلول‌های بنیادی جنینی در محیط کشت Methocult بزرگ‌نمایی X ۱۰۰

رنگ‌آمیزی ایمونوسیتوشیمی مولکول CD41

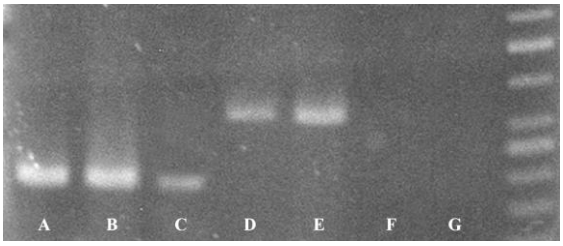
نتایج رنگ‌آمیزی ایمونوسیتوشیمی سلول‌های بنیادی جنینی تمایز یافته نشان داد که مولکول αIIb یا CD41 در آن‌ها بیان می‌گردد(شکل ۳).



شکل ۳: A سلول‌های رنگ شده با anti CD41 را نشان می‌دهد. B همان فیلد را نشان می‌دهد که سلول‌ها به وسیله DAPI رنگ‌آمیزی هسته شده‌اند و C تصویر کنترل منفی آزمون CD41 می‌باشد.

نتایج مربوط به RT-PCR

در سلول‌هایی که به مدت ۸ روز در محیط تمایزی قرار گرفتند ژن PF4 بیان شد. نتایج RT-PCR نشان داد ژن PF4 در سلول‌های بنیادی جنینی که در محیط کشت آزمون قرار گرفتند بیان می‌شود در حالی که در سلول‌های قرار گرفته در محیط کنترل بیان نمی‌شود(شکل ۴).



شکل ۴: الکتروفورز محصولات RT-PCR . A ، B و C به ترتیب بیان ژن B2M به عنوان کنترل داخلی PCR در سلول‌های گروه آزمون مغز استخوان موش و سلول‌های گروه کنترل را نشان می‌دهد، D بیان ژن PF4 در سلول‌های گروه آزمون، E بیان ژن PF4 در سلول‌های مغز استخوان موش به عنوان کنترل مثبت، F عدم بیان ژن PF4 در سلول‌های گروه کنترل و G کنترل منفی PCR است.

بحث

این مطالعه با هدف توانایی تمایز سلول‌های بنیادی جنینی موش R1 به رده مگاکاریوسیتی در محیط کشت

بدون حضور لایه تغذیه کننده انجام گرفت. رده مگاکاریوسیتی یکی از رده‌های سلول‌های خونساز است که کمتر از یک درصد سلول‌های مغز استخوان را تشکیل می‌دهند(۱۰). درصد بسیار پایین رده مگاکاریوسیتی، مطالعه تکامل و بیولوژی این رده را دشوار کرده است که می‌توان از سلول‌های بنیادی جنینی به عنوان منبع نامحدود و جدید با تمایز به رده مگاکاریوسیتی برای مطالعه تکامل و بیولوژی این رده استفاده نمود(۱۸). در مطالعه‌های گذشته برای تمایز سلول‌های بنیادی جنینی به سلول‌های خونساز از سلول‌های استرومایی به عنوان لایه تغذیه کننده استفاده شده است. یکی از رده‌های سلول‌های استرومایی OP9 است(۲۲-۱۹). رده OP9 به علت عدم توان تولید M-CSF با استفاده از دستکاری ژنتیکی، سبب تمایز بیشتری نسبت به سایر سلول‌های استرومایی مغز استخوان دست نخورده به سلول‌های خونساز می‌شود(۱۷). القای تمایز توسط سلول‌های تغذیه کننده به وسیله برهم کنش سلول ـ سلول انجام نمی‌گیرد، بلکه سلول‌های تغذیه کننده با آزاد کردن فاکتورهای محلول نامشخصی باعث القای تمایز می‌شوند(۲۳). در این مطالعه از هیچ یک از سلول‌های تغذیه کننده استفاده نشد و تمایز این سلول‌ها در محیط کشت مایع انجام گرفت. از جمله مزیت‌های این روش کشت در مقایسه با سایر روش‌های تمایز، آن است که در روش‌های دیگر مانند استفاده از یک لایه تغذیه کننده برای حمایت از تمایز سلول‌های بنیادی جنینی فاکتورهای تمایز دهنده مترشحه از سلول‌های تغذیه کننده، مشخص نشده و مورد بررسی قرار نمی‌گیرند، این در حالی است که در این روش می‌توان اثر هر یک از فاکتورهای رشد را در محیط مایع بررسی کرد و از آن طریق به مکانیسم‌های مولکولی انتقال دهنده پیام در داخل سلول پی برد(۱۲). مزیت دیگر استفاده از این روش، حذف احتمال انتقال آلودگی(رتروویروس‌ها و دیگر پاتوژن‌ها) از رده سلول‌های تغذیه کننده به سلول‌های بنیادی جنینی می‌باشد، برای این منظور آمیت و همکاران در سال ۲۰۰۴ و گزو و همکاران در سال ۲۰۰۵ سیستم کشت feeder-free و conditioned medium-Free را برای تکثیر و نگهداری سلول‌های بنیادی جنینی انسان در حالت تمایز نیافته گزارش کردند، هر چند تمایز این سلول‌ها به رده‌های دیگر نیازمند مجاورت با سلول‌های تغذیه کننده بود(۱۳). در این تحقیق برای اولین بار تمایز سلول‌های بنیادی جنینی به رده مگاکاریوسیتی در غیاب سلول‌های تغذیه کننده انجام گرفت.

علاوه بر این، حضور سلول‌های تغذیه کننده ممکن است باعث تغییرات ژنتیکی در سلول‌های بنیادی جنینی شود و موجب محدود کردن کشت سلول‌های بنیادی جنینی به میزان زیاد(به علت وقت‌گیر بودن و زحمت تهیه لایه تغذیه کننده) و محدودیت در کاربرد درمانی آن شود(۱۴).

در مطالعه‌ای که در سال ۲۰۰۴ صورت گرفت ون‌جی‌ژانگ و همکاران به مقایسه دو روش عمده مورد استفاده در تمایز سلول‌های بنیادی جنین موش به سلول‌های خونساز پرداختند. این محققین دریافتند که روش تشکیل EB در مقایسه با استفاده از سلول‌های تغذیه کننده استرومایی OP9 به عنوان عامل القاکننده تمایز، بازدهی بیشتری در ایجاد رده خونساز دارد(۲۴). در مطالعه حاضر هم با روش تشکیل EB و بدون استفاده از لایه تغذیه کننده، القای جهت‌دار سلول‌های بنیادی جنینی به رده خونساز مگاکاریوسیتی انجام شد.

در این مطالعه برای بررسی تمایز از ژن اختصاصی رده مگاکاریوسیتی(PF4) و رنگ‌آمیزی CD41 استفاده شد. کتیا راوید و همکاران در سال ۱۹۹۱ نشان دادند که پلاکت‌ها تنها سلول‌های در گردش خون و مگاکاریوسیت‌ها تنها پیش‌ساز خونی هستند که ژن PF4 را بیان می‌کنند و هیچ کدام از سلول‌های مغز، قلب، کلیه، کبد، ریه، روده و ماهیچه اسکلتی آن را بیان نمی‌کنند(۲۵). نتایج RT-PCR ما بر روی سلول‌های تمایز داده شده، نشان داد که نسخه‌برداری از ژن PF4 در این سلول‌ها انجام شده است.

مولکول CD41 ، مارکر مهم دیگری در رده مگاکاریوسیتی می‌باشد. این مارکر به عنوان گلیکوپروتئین IIb یا مولکول αIIb شناخته می‌شود. این گلیکوپروتئین سطح سلولی، پیوند غیر کووالانسی با اینتگرین B3 یا GPIII (CD61) نیز دارد. CD41 در رده مگاکاریوسیتی از سلول‌های پروژنیتور تا پلاکت‌ها بیان می‌شود(۲۶). ما در رنگ‌آمیزی ایمونوسیتوشیمی بر روی سلول‌های تمایز داده

شده نشان دادیم که این مارکر مهم، رده مگاکاریوسیتی را بر سطح سلول‌ها بیان داشت.

در این مطالعه نتایج آزمون سنجش کلونی بیانگر تمایز سلول‌های بنیادی جنینی به سمت رده خونساز است و نتایج حاصل از رنگ‌آمیزی ایمونوسیتوشیمی مولکول CD41 و RT-PCR بیانگر تمایز سلول‌های بنیادی جنینی به رده مگاکاریوسیتی بدون حضور لایه تغذیه کننده و با القای تمایز جهت‌دار به وسیله فاکتورهای رشد TPO و IL3 می‌باشد. در حالی که در مطالعات گذشته که توسط فوجی موتو و همکاران یا گور و همکاران بر روی تمایز سلول‌های بنیادی جنینی به رده مگاکاریوسیتی صورت گرفته از هم کشتی رده سلول‌های استرومایی استفاده شده

است(۱۸، ۷).

نتیجه‌گیری

در این مطالعه، حذف لایه تغذیه کننده در تمایز سلول‌های بنیادی جنینی به رده مگاکاریوسیتی موفقیت‌آمیز بود، اما برای بهینه کردن و افزایش میزان تمایز، نیاز به انجام تحقیقات تکمیلی و بررسی اثر دیگر فاکتورهای رشد و مقایسه با تمایز در حالت هم کشتی با سلول‌های تغذیه کننده می‌باشد. هم چنین پیشنهاد می‌گردد برای ارزیابی بهتر سلول‌های تمایز یافته، بیان مولکول CD41 با آزمون فلوسایتومتری و بیان PF4 توسط Real-Time PCR صورت گیرد.

References :

1- Evans MJ, Kaufman MH. Estabblishment in culture of pluripotent cells from mouse embryos. Nature 1981; 292:154-6.
2- Martin GR. Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. Proc Natl acad Sci USA 1981;78: 7634-8.
3- Markey K. Differentiation of embryonic stem cells: analysis of haematopoietic progress. The university of Queesland 2004:1.
4- Mallon BS, Park KY, Chen KG, Hamilton RS, McKay RDG. Toward xeno-free culture of human embryonic stem cells. The International Journal of Biochemistry and Cell Biology 2005;12: 2145-57.
5- Kaufman DS, Hansont ET, Lewist R, Auerbach R, Thomson JA. Hematopoietic colony-forming cells derived from human embryonic stem cells. PNAS 2001;98:10716–21.

6- Kurosawa H, Imamura T, Koike M, Sasaki K, Amano Y. A simple method for forming embryoid body from mouse embryonic stem cells. Journal of Bioscience and Bioengineefling 2003;96:409-11.
7- Fujimoto TT, Kohata.S, Suzuki H, Miyazaki H, Fujimura K. Production of functional platelets by differentiated embryonic stem (ES) cells in vitro. Blood 2003;102:4044-51.
8- Wobus AM, Boheler KR. Embryonic stem cells: prospects for developmental biology and cell therapy. Physiol Rev 2005; 85(2): 635-678.
9- Keller M. Embryonic stem cell differentiation: emergence of a new era in biology and medicine. Genes & Develpment 2005;19:1129-55.
10- Levine RF. Isolation and characterization of normal human megakaryocytes. Br J Haematol 1980; 45: 487-497.
11- Shim MH, Hoover A, Blake N, Drachman JG, Reems JA. Gene expression profile of primary human $CD34^{+}CD38lo$ cells differenting along the megakaryocyte lineage. experimental hematology 2004;32 638-648.
12- Soleimani M, Atashi A, Baharvand H, Masomi M. Differentiation of mouse embryonic stem cells to hematopoietic cells. Iranian Journal of Anatomical Science 2005: 11-18.
13- Klimanskaya I, Chung Y, Meinser L, Johnson J, West M, Lanza R. Human embryonic stem cells derived without feeder cells. Lancet 2005; 365(9471):1636-41.
14- Stojkovic M, Lako M, Strachan T, Murdoch A. Derivation, growth and applications of human embryonic stem cells. Reproduction 2004;128:259-67.
15- Helgason CD. In vitro Hematopoietic Differentiation of murine embryonic stem (ES) cells, protocols for maintenance of murine ES cells, generation of embryoid bodies (EBs), and quantitation of hematopoietic progenitors. Stem Cell Technologies 2003; 2(1)1:1-28.
16- Khademhosseini A, Ferreira L, Blumling J, Yeh J, Karp JM, Fukuda J, *et al*. Co-culture of human embryonic stem cells with murine embryonic fibroblasts on microwell-patterned substrates. Biomaterials 2006; 27: 5968-77.
17- Dang Sm, Kyba M, Perlingeiro R, Daley GQ, Zandstra PW. Efficiency of embryoid body formation and hematopoietic development from embryonic stem cells in different culture systems. Biotechnol Bioeng 2002; 78: 442-53.
18- Gaur M, Kamata T, Wang S, Moran B, Shattil SJ, Leavitt AD. Megakaryocytes derived from human embryonic stem cells: a genetically tractable system to study megakaryocytopoiesis and integrin function. J Thromb Haemost 2006; 4: 436-42.
19- Kodama H, Nose M, Niida S, Nishikawa S. Involvement of the c-kit receptor in the adhesion of hematopoietic stem cells to stromal cells. Exp Hematol 1994; 22: 979-84.
20- Nakano T. In vitro development of hematopoietic system from mouse embryonic stem cells: a new approach for embryonic hematopoiesis. Int J Hematol 1996; 65: 1-8.
21- Nakano T, Kodama H, Nishikawa S, Nishikawa S. Preferential proliferation of murine colony-forming units in culture in a chemically defned condition with a macrophage colony-stimulating factor-negative stromal cell clone. J Exp Med 1996; 184: 2301-9.
22- Movassagh Pour AA, Salehnia M, Pourfatollah AA, Soleimani M. CFU-GM like colonies derived from embryonic stem cells cultured on the bone marrow stromal cells. Iranian Biomedical Journal 2004; 8: 1-5.
23- Tian X, Morris JK, Linehan JL, Kaufman DS. Cytokine requirements differ for stroma and Embryoid body-mediated hematopoiesis from human embryonic stem cells. Exp Hematol 2004; 32: 1000-9.
24- Zhang WJ, Park C, Arenston E, Choi K. Modulation of hematopoietic and endothelial cell differentiation from mouse embryonic stem cells by different culture conditions. Blood 2005; 105: 111-4.
25- Ravid K, Beeler DL, Rabin MS, Ruley HE, Rosenberg RD. Selective targeting of gene products with the megakaryocyte platelet factor 4 promoter. Cell Biology 1991; 88: 1521-5.
26- Long MW, Hoffman R. Thrombocytopoiesis. In: Hoffman R, Benz Jr EJB, Shattil SJ, Furie B, Cohen HJ, Silberstein LE, *editors*. Hematology, basic principle and practice. 4^{th} edition. Philadelphia: Elsevier Churchill Livingstone;2005:303-15.

Differentiation of murine embryonic stem cells into megakaryocytic lineage cultured in feeder layer-free media

Ghorbani M.[1](BS), Soleimani M.[1](PhD), Kavyani S.[1](PhD), Atashi A.[1](MS)

[1]Tarbiat Modarres University, Tehran, Iran

Abstract

Background and Objectives

Embryonic stem cells are potential pluripotent stem cells derived from inner cell mass of embryonic blastocyst stage. So far, differentiation of embryonic stem cells to megakaryocyte lineage has resulted from coculture with bone marrow stromal cells with disadvantages such as possibility of stem cell contamination from feeder layer and secretion of unknown factors from this layer ending in unwanted differentiation and genetic changes in embryonic stem cells. In this study, while excluding feeder layer, we differentiated murine bone marrow cells to megakaryocyte lineage.

Materials and Methods

In this experimental study, embryoid bodies resulted from R1 murine embryonic stem cells. The embryoid bodies were then cultured in two groups of test (containing IMDM with FBS, L-glutamin, non-essential aminoacids, beta mercaptoethanol, and TPO and IL-3 as growth factors) and control (the same culture medium used in test group without growth factors). After four days the colony assay test was performed, and after eight days immunohistochemistry staining for CD41 molecule, and finaly transcription test for PF4 gene using RT-PCR to demonstrate differentiation to megakaryocyte lineage.

Results

Results of the colony assay test indicated that the cells considered had the capacity to give rise to colonies. The total number of colonies and banzidine positive colonies were 57±6.1 and 18±3.6 respectively. On the other hand, immunocytochemistry analysis and PCR showed that the CD41 molecule and PF4 gene are expressed in differentiated cells.

Conclusions

Our results indicated that murine embryonic stem cells differentiate into megakaryocyte lineage cells without utilizing feeder layer, and embryonic stem cells can be used as an immortal new source for producing megakaryocyte lineage cells on which basic biological research can be conducted.

Key words: Embryonic stem cells, Megakaryocytic, Cell differentiation
SJIBTO 2008; 5(2): 89-98

Received: 19 Apr 2008
Accepted: 23 July 2008

Correspondence: Soleimani M, PhD of Hematology. Tarbiat Modarres University.
P.O.Box: 14115-111, Tehran, Iran. Tel: (+9821) 88011001; Fax : (+9821) 88013030
E-mail: *Soleimani.masoud@gmail.com*