خون
فصلنامه پژوهشی
دوره ۹ شماره ۳ مکرر پاییز ۹۱
ویژه‌نامه سلول‌های بنیادی (۲۵۰-۲۳۹)

مقاله پژوهشی

افزایش جمعیت سلول‌های بنیادی خونساز بند ناف $CD34^+$ با استفاده از افزایش بیان ژن HOXB4 در طی کشت ازدیادی این سلول‌ها

مهدی اله‌بخشیان فارسانی[۱]، مهدی فروزنده مقدم[۲]، ناصر امیری‌زاده[۳]، مسعود سلیمانی[۴]، علی‌اکبر پورفتح‌اله[۵]

چکیده

سابقه و هدف

سلول‌های بنیادی خونساز بند ناف، یکی از ارزشمندترین منابع سلول‌های بنیادی خونساز به حساب می‌آیند، اما متاسفانه تعداد ناکافی این سلول‌ها، بهره‌گیری از آن‌ها را در موارد پیوند مغز استخوان بزرگسالان با مشکل مواجه می‌سازد. یکی از رویکردهای موجود برای غلبه بر این مشکل، ازدیاد این سلول‌ها در محیط آزمایشگاه است. مطالعه های فراوان در مدل‌های موشی، حاکی از اثرات قوی پروتئین HOXB4 در القای فعالیت خود تکثیری سلول‌های بنیادی خونساز موش است. در این مطالعه سعی شده است تا با افزایش بیان این پروتئین در سلول‌های بنیادی خونساز بند ناف، بر مشکل تعداد اندک سلول‌های بنیادی خونساز بند ناف غلبه شود.

مواد و روش‌ها

در یک مطالعه بنیادی ـ کاربردی، سلول‌های بنیادی خونساز بند ناف به وسیله ویروس‌های لنتی حاوی ژن HOXB4 ، ترانس داکت شدند. سپس این سلول‌ها به مدت ۸ روز در محیط آزمایشگاه کشت داده شدند، در طول دوران کشت این سلول‌ها، بیان ژنHOXB4 توسط RT-PCR مورد ارزیابی قرار گرفت و پس از آن با بهره‌گیری از آزمون فلوسیتومتری به بررسی مارکر سطحی $CD34^+$ که یک شاخص سلول‌های بنیادی خونساز است پرداخته شد.

یافته‌ها

بررسی‌های فنوتیپی در سلول‌های بنیادی خونساز، نشان‌دهنده تاثیر فزونی بیان ژن HOXB4 در افزایش جمعیت سلول‌های بنیادی خونساز $CD34^+$ ، طی ازدیاد این سلول‌ها در محیط آزمایشگاه بود.

نتیجه گیری

افزایش بیان ژن HOXB4 در سلول‌های بنیادی خونساز بند ناف، موجب افزایش قابل توجه تعداد سلول‌های $CD34^+$ می‌شود و بنابراین می‌تواند در غلبه بر تعداد کم سلول‌های بنیادی خونساز بند ناف در رویکردهای درمانی بسیار مؤثر باشد.

کلمات کلیدی: **سلول‌های بنیادی خونساز، پروتئین HOXB4 انسانی، لنتی‌ویروس**

تاریخ دریافت : ۹۰/۳/۲۳
تاریخ پذیرش : ۹۰/۴/۱۵

۱ـ دانشجوی PhD هماتولوژی ـ دانشکده علوم پزشکی دانشگاه تربیت مدرس ـ تهران ـ ایران
۲ـ مؤلف مسؤول: PhD بیوشیمی بالینی ـ دانشیار دانشکده علوم پزشکی دانشگاه تربیت مدرس ـ تهران ـ صندوق پستی: ۳۳۱-۱۴۱۱۵
۳ـ PhD هماتولوژی و بانک خون ـ استادیار مرکز تحقیقات انتقال خون ـ مؤسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون ـ تهران ـ ایران
۴- PhD هماتولوژی ـ دانشیار دانشکده پزشکی دانشگاه تربیت مدرس ـ تهران ـ ایران
۵- PhD ایمونولوژی ـ استاد دانشکده پزشکی دانشگاه تربیت مدرس ـ تهران ـ ایران

مقدمه

هر ساله شمار زیادی از بیماران در سرتاسر جهان به صورت گسترده‌ای برای درمان بیماری خود نیاز به پیوند مغز استخوان به عنوان یک درمان حیاتی و نجات‌بخش دارند. یکی از بهترین منابع سلول‌های بنیادی خونساز، سلول‌های بنیادی خونساز بند ناف هستند که به خاطر مزایای زیاد از جمله سهولت تهیه و دسترسی، فقدان خطر برای مادران اهداکننده، حساسیت بالا جهت القای تولرانس، پایین‌بودن آلوآنتی‌ژن‌ها و آنتی‌ژن‌های HLA سطحی و در نتیجه عدم نیاز به سازگاری بالا بین دهنده و گیرنده، به شکل روز افزونی توجه بخش درمانی را معطوف خود ساخته‌اند(۱). اما متاسفانه تعداد محدود سلول‌های بنیادی در نمونه‌های خون بند ناف، به کارگیری این منبع با ارزش سلولی را در درمان پیوند مغز استخوان بزرگسالان ناتوان ساخته است. یکی از راه‌کارهای موجود برای غلبه بر این مشکل، ازدیاد سلول‌های بنیادی خونساز بند ناف در محیط آزمایشگاه(*Ex vivo* expansion of HSCs) می‌باشد. القای مطلوب فعالیت خود تجدید شوندگی سلول‌های بنیادی خونساز، پیش شرط ازدیاد آن‌ها است، لذا ما نیازمند شناخت درستی از عوامل متعددی هستیم که شاهد فعالیت خود تکثیری این سلول‌ها باشند.

تصمیم سلول در جهت رفتن به سمت تمایز یا خود تجدید شوندگی، به مقدار زیادی بستگی به سیگنال‌هایی دارد که سلول از محیط خارج و یا داخل دریافت می‌کند. این سیگنال‌ها گاهی اوقات سلول را وادار به تکثیر و رشد می‌نمایند مانند فاکتورهای رشد از جمله SCF و یا فاکتورهای رونویسی از جمله HOXB4 و در پاره‌ای از موارد نقش‌های مهاری خواهند داشت؛ مانند $TNF^{-\alpha}$ و یا TGF-b (۲). از بین فاکتورهای رونویسی که اهمیت بسیار زیادی در فعالیت خود تکثیری دارند، می‌توان به ژن‌های خانواده HOX اشاره کرد. ژن‌های HOX دارای چهار دسته A ، B ، C و D هستند و هر یک از این دسته‌ها دارای ۱۳ پارالوگ می‌باشند(۴، ۳). چندین عضو از دسته‌های A ، B ، C و D در سلول‌های بنیادی خونساز بیان می‌شوند. بیان ژن‌های مهم مرتبط با فعالیت خود تکثیری، بیشتر محدود به سلول‌های بنیادی اولیه $CD34^+$ و $CD38^-$ است و بیان آن در سلول‌های بالغ‌تر دچار تنظیم منفی خواهد شد. الگوی بیان ژن‌های HOX ، پیشنهاد کننده این موضوع است که این ژن‌ها در سلول‌های بنیادی اولیه خونساز، ایفای نقش می‌کنند(۵). فاکتورهای رونویسی HOX که به DNA متصل می‌شوند، نقش مهمی در بلوغ جنین و هم چنین در بلوغ سیستم خونسازی هم در دوران قبل از تولد و هم در دوران پس از تولد دارند(۶، ۵). ژن‌های فوق در بررسی مکانیسم‌هایی از قبیل فعالیت خود تکثیری و تمایز و تعهد به یک رده خاص، نقشی مهم بازی می‌کنند(۹-۷).

فاکتور رونویسی HOXB4 از بین فاکتورهای رونویسی خانواده HOX ، بیشترین توجه را در زمینه ازدیاد سلول‌های بنیادی خونساز به خود جلب کرده است. این موضوع مربوط به ویژگی‌های منحصر به فرد این فاکتور رونویسی می‌باشد. با این وجود، مکانیسم دقیق مولکولی عملکرد HOXB4 و این که چطور در سلول‌های نابالغ عمل می‌کند، هنوز به خوبی مشخص نشده است. ولی به نظر می‌رسد از طریق تحت تاثیر قرار دادن مولکول‌های کلیدی، در تنظیم سیکل سلولی عمل می‌نماید و بیان مولکول‌های کلیدی مؤثر در فعالیت خود تکثیری این سلول‌ها را تغییر می‌دهد. برای مثال موجب افزایش بیان مولکول‌های مسیر Wnt و Notch می‌شود(۱۰). در مدل‌های پیوندی سلول‌های بنیادی موشی که ژن HOXB4 با کمک وکتورهای رتروویروسی در آن‌ها دچار افزایش بیان شده است، به طور قابل توجهی قابلیت قدرت بازسازی این سلول‌ها در گیرندگان اولیه و ثانویه پیوند افزایش می‌یابد(۱۱). ذکر این نکته حایز اهمیت است که ازدیاد سلول‌های بنیادی خونساز با کمک HOXB4 در داخل بدن تا زمانی ادامه می‌یابد که نیاز بدن به سلول‌های بنیادی خونساز مرتفع شود و اندازه حوضچه سلول‌های بنیادی خونساز به حالت طبیعی در آید. بنابراین افزایش بیان پروتئین HOXB4 در سلول‌های بنیادی خونساز، موجب مختل شدن مکانیسم‌های تنظیمی سلول که منجر به حفظ خونسازی در حالت پایا می‌شوند، نمی‌گردد. در مطالعه‌هایی که تاکنون انجام شده است، این افزایش بیان ژن HOXB4 علی‌رغم این که فعالیت خود تکثیری سلول‌ها را به طور قابل توجهی افزایش می‌دهد اما هیچ‌گونه ناهنجاری خون شناختی و تکثیر افسار گسیخته

منتهی به بدخیمی را در گیرندگان پیوند سلول‌های بنیادی که دارای افزایش بیان HOXB4 بوده‌اند، ایجاد نکرده است(۱۲). از سوی دیگر بیان این ژن، تمایز سلول‌های بنیادی به رده‌های خونی مختلف را مختل نخواهد کرد و تمایز به همه رده‌های خونی صورت می‌پذیرد. هم چنین افزایش توانایی خود تکثیری همراه با حفظ سلول‌هایی بوده است که حالت بنیادی خود را حفظ کرده‌اند و توانایی تشکیل کلنی رده‌های مختلف خونی خود مؤید این نکته می‌باشد، این چنین سلول‌هایی با توانایی حفظ شده خود تکثیری در فرآیند پیوند مغز استخوان و ژن درمانی بسیار حایز اهمیت می‌باشند(۱۳، ۸). به علاوه این فاکتور رونویسی، موجب تکثیر سلول‌های اولیه که توانایی خود تکثیری بالا و توانایی تمایز به رده‌های مختلف را دارند، خواهد شد که برای مقاصد درمانی به خصوص در مورد پیوند مغز استخوان و ژن درمانی بسیار حایز اهمیت هستند. در مجموع این یافته‌ها پیشنهاد می‌کنند که HOXB4 می‌تواند هم چنان به عنوان یک رویکرد بدیع در تحریک رشد سلول های بنیادی خونساز و فعالیت خود تکثیری آن‌ها عمل نماید.

از آن جایی که سلول‌های بنیادی خونساز از منشاء بند ناف در سال‌های اخیر توجه بسیار زیادی را به خود جلب کرده‌اند، این مطالعه با هدف پاسخ به این سؤال که آیا افزایش بیان HOXB4 با استفاده از وکتورهای لنتی ویروسی در سلول‌های بنیادی خونساز بند ناف می‌تواند با بالا بردن میزان فعالیت خود تکثیری و ازدیاد سلول‌های بنیادی خونساز بند ناف، مشکل تعداد محدود سلول‌های بنیادی خونساز را در واحدهای خون بند ناف برطرف می‌سازد یا خیر، انجام شد.

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری نمونه و جداسازی سلول‌های بنیادی خونساز:

در این مطالعه که به شکل بنیادی- کاربردی انجام شد، تعداد ۳۰ واحد خون بند ناف بر اساس روش‌های مصوب کمیته اخلاق پزشکی دانشگاه تربیت مدرس از بیمارستان شریعتی جمع‌آوری شدند. در حین نمونه‌گیری، از هر یک از افراد جامعه رضایت‌نامه کتبی گرفته شد. نمونه‌های به دست آمده به صورت جداگانه مورد بررسی قرار گرفتند. در مرحله اول جداسازی، خون بند ناف به دست آمده در فالکون‌های ۵۰ mL ، با هیدروکسی اتیل استارچ مخلوط شده و به مدت ۲ ساعت در دمای اتاق نگهداری شد که این موضوع به سهولت جداسازی سلول‌های تک هسته‌ای خون بند ناف کمک می‌کرد. پس از اتمام مدت زمان انکوباسیون، دو فاز تشکیل شد. در پایین توده نسبتاً متراکم گلبول‌های قرمز و در بالا پلاسما همراه با سلول‌های تک هسته‌ای خون بند ناف و مقدار کمی گلبول قرمز قرار گرفت. در این مرحله جهت جداسازی لایه سلول‌های تک هسته‌ای از سایر عناصر خون بند ناف، محیط رویی سانتریفیوژ شده و رسوب حاصل از آن که حاوی سلول‌های تک هسته‌ای همراه با قدری گلبول قرمز از مرحله قبل بود، به روی فایکول منتقل شد و دوباره سانتریفیوژ گردید. پس از سانتریفیوژ، لایه سلول‌های تک هسته‌ای در قسمت بالایی فایکول قرار گرفت. این لایه تک هسته‌ای جدا شده جهت جداسازی سلول‌های بنیادی خونساز $CD34^+$ با آنتی‌بادی‌های نشاندار شده با مگنت که از شرکت بیوتک(آلمان) تهیه شده بودند، مجاور شد و سپس با استفاده از ستون‌های LS separation (بیوتک، آلمان) جدا شدند.

سلول‌های جدا شده در محیط IMDM (Iscove's Modified Dulbecco's Media) حاوی ۱۰٪ FBS و ترکیب سایتوکاینی(سایتوکاین‌های عمل‌کننده اولیه) شامل(SCF) Stem Cell Factor ۱۰۰ ng/mL ، ۱۰۰ ng/mL (FLT-3L) FMS-like Tyrosine kinase 3 Ligand (Tpo) ، Thrombopoietin ۵۰ ng/mL ، IL-6 ۳۰ ng/mL و IL-3 ۳۰ کشت داده شدند.

پلاسمیدهای ویروسی:

وکتور رتروویروسی SF91-HOXB4-IRES-Venus که HOXB4 را همراه با پروتئین فلورسانس Venus به عنوان مارکر فلورسانس بیان می‌کرد، توسط دکتر دیوید ویلیامز از بخش هماتولوژی و انکولوژی بیمارستان کودکان بوستون و مؤسسه سلول‌های بنیادی هاروارد به ما اهدا شد. این وکتور رتروویروسی سپس برای تهیه کردن قسمت

کدکننده(CDS) پروتئین HOXB4 مورد استفاده قرار گرفت. ابتدا با آزمون PCR و آغازگرهای اختصاصی ژن HOXB4 ، صحت وجود قطعه کدکننده ژن HOXB4 در داخل پلاسمید مورد بررسی قرار گرفت. سپس با استفاده از دو آنزیم محدود کننده NotI در ناحیه فرا دست و آنزیم XhoI در ناحیه فرو دست قطعه HOXB4-IRES-Venus ، اقدام به برداشت قطعه HOXB4-IRES-Venus از وکتور رتروویروسی و کلون‌سازی آن در وکتور لنتی ویروسیpLEX-MSC به عنوان وکتور انتقال‌دهنده ژن که از شرکت اُپن‌بیوسیستم تهیه شده بود، نمودیم. در نتیجه وکتور لنتی ویروسی pLEX- MSC- HOXB4- IRES- Venus ساخته شد. هم‌چنین از وکتور pLEX-TurboGFP (اُپن‌بیوسیستم) به عنوان شاهد ویروسی استفاده شد که تنها GFP (Green Fluorescein Protein) را بیان می‌نمود.

تولید ویروس:

از مخلوط پلاسمیدی Trans-Lentiviral packaging که یک مخلوط بهینه شده از ۵ پلاسمید بسته‌بندی‌کننده و شامل پلاسمیدهای(pTLA1-Rev ، pTLA1-Env ، pTLA1- Enz ، pTLA1-Pak و pLA1-TOFF) بود، به عنوان پلاسمیدهای کمکی همراه با pLEX-TurboGFP و pLEX-MSC-HOXB4-IRES-Venus برای تولید ویروس در سلول‌های HEK293T به عنوان سلول‌های تولید کننده ویروس، استفاده شد. پلاسمیدهای کمکی همراه با پلاسمید pLEX-MSC به عنوان پلاسمید انتقال دهنده قطعه ژنی HOXB4-IRES-Venus و پلاسمید pLEX-TurboGFP به عنوان شاهد از شرکت اُپن‌بیوسیستم تهیه شدند. مخلوط پلاسمیدی فوق به صورت هم زمان بر اساس دستورالعمل شرکت تولید کننده به داخل سلول‌های HEK293T ترانسفکت شدند. به طور مختصر سلول‌های 293T در پلیت‌های کشت ۱۰۰ mm به مقدار ۵ الی ۶ میلیون سلول به ازای هر پلیت روز قبل از ترانسفکشن کشت داده شدند. روز ترانسفکشن، مخلوط پلاسمیدهای کمکی همراه با پلاسمید انتقال‌دهنده ژن pLEX-HOXB4-IRES-Venus و یا پلاسمید شاهد pLEX-TurboGFP با کمک معرف ترانسفکشن Express-In تهیه شده توسط شرکت اُپن‌بیوسیستم با هم مخلوط گردیده و به مدت ۲۰ دقیقه در دمای اتاق انکوبه شدند. پس از اتمام مدت زمان انکوباسیون، ترانسفکشن در سلول‌های 293T که از روز قبل کشت داده شده بودند بر اساس دستورالعمل شرکت سازنده انجام شد.

محیط رویی سلول‌های ترانسفکت شده در فواصل ۴۸ ساعت و ۷۲ ساعت پس از ترانسفکشن برداشته و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. در مرحله بعد تغلیظ ویروس‌ها از محیط رویی برداشت شده از روی سلول‌ها با استفاده از سانتریفیوژ سیگما در دور RPM ۲۳۰۰۰ به مدت۱/۵ ساعت در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد انجام شد. رسوب به دست آمده از سانتریفیوژ در حجم‌های کوچکتر در دمای ۸۰°C- تا زمان استفاده نگهداری شد. برای تیتراسیون لنتی ویروس‌های تولید شده از مارکر GFP ویا Venus و دستورالعمل تهیه شده توسط شرکت اُپن‌بیوسیستم استفاده شد.

کشت ازدیادی سلول‌های بنیادی خونساز $CD34^+$:

برای بررسی اثر افزایش بیان ژن HOXB4 بر روی میزان ازدیاد سلول‌های بنیادی خونساز، سلول‌های بنیادی خونساز هر واحد را به صورت جداگانه مورد بررسی قرار دادیم. ابتدا سلول‌های جدا شده را به دو گروه تقسیم کرده و به صورت جداگانه بر روی آن ها ترانس داکشن در روز نخست ازدیاد سلول‌های بنیادی خونساز انجام شد. گروه اول شامل سلول‌هایی بودند که باpLEX-HOXB4 لنتی ویروس ترانس داکت شدند، گروه دوم گروه شاهد که با pLEX-Turbo GFP مواجه شدند. از گروه شاهد به منظور ارزیابی هرگونه اثرات ناخواسته که ممکن است به دنبال ترانس داکشن ویروسی رخ دهد استفاده شد. سلول‌ها برای ازدیاد در محیط IMDM حاوی ۱۰٪ سرم و سایتوکاین‌های عمل کننده اولیه کشت داده شدند. سپس سلول‌های بنیادی خونساز را با ذخیره ویروسی که از قبل تهیه شده بود، ترانس‌داکت نمودیم. بعد از ۷۲ ساعت از زمان ترانس‌داکشن، بیان ترانس کریپت ژن HOXB4 با استفاده از RT-PCR ارزیابی شد و پس از گذشت ۸ روز، سلول‌های کشت داده شده از نظر ایمونوفنوتیپی با استفاده

از فلوسیتومتری مورد بررسی قرار گرفتند.

ترانس‌داکشن ویروسی:

جهت انتقال ویروس‌ها، ۲ گروه جداگانه با دو بار تکرار در هر آزمایش(duplicate) در نظر گرفته شد. در ابتدا سلول‌های بنیادی به مدت ۲۴ ساعت قبل از ترانس‌داکشن ویروسی توسط سایتوکاین‌های عمل کننده اولیه تحریک شدند. در هر خانه پلیت ۲۴ تایی، حدود ۳۰۰ هزار سلول که در حدود ۵۰۰ میکرولیتر محیط کشت بودند قرار گرفتند. پس از این که تیتر ویروس‌ها در یک حجم مشخص به دست آمد، ویروس‌های تغلیظ شده به مقدار ۵ تا ۱۰ واحد ویروس عفونی به ازای هر سلول بنیادی یا به عبارت دیگر با MOI (multiplicity of infection) حدود ۵ تا ۱۰ افزوده شدند و ترانس‌داکشن انجام شد. سلول‌ها به مدت ۱۲ ساعت با ویروس مجاور شدند و پس از اتمام این مدت، سلول‌های برداشت شده سه بار با PBS (Phosphate Buffer Saline) شستشو و سپس در محیط تازه حاوی FBS و سایتوکاین‌های عمل‌کننده اولیه برده شدند. بعد از این مرحله به آرامی پلیت را به سمت جلو و عقب تکان داده تا به خوبی کمپلکس‌ها با محیط کشت مخلوط شوند. سپس پلیت‌ها در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد و CO_2 ۵٪ قرار داده شدند.

بررسی بیان ژن HOXB4 با استفاده از Reverse transcriptase PCR:

در این مطالعه به بررسی افزایش میزان بیان ژن HOXB4 در گروه آزمون و شاهد پرداخته شد. به این منظور تعداد مساوی از سلول‌ها در گروه شاهد و آزمون برای استخراج RNA استفاده شد، سپس برای تهیه cDNA ، مقادیر مساوی از RNA به کار گرفته شد. در مرحله آخر، مقادیر مساوی از cDNA (حدود ۱۰۰ نانوگرم) برای واکنش PCR در گروه آزمون و شاهد در نظر گرفته شد. در نهایت از ژن بتا اکتین به عنوان شاهد داخلی جهت نرمال‌سازی میزان بیان ژن HOXB4 در گروه آزمون و شاهد استفاده گردید.

بنابراین پس از ۷۲ ساعت از زمان ترانس داکشن ویروسی، از سلول‌های ترانس‌داکت شده با ویروس با استفاده از محلول RNA x-plus بر اساس دستورالعمل شرکت سازنده(شرکت سیناژن ـ ایران) RNA سلولی تهیه شد. قبل از تهیه cDNA ، DNaseI (فرمنتاز) به نمونه RNA افزوده شد. تجزیه و تحلیل cDNA با استفاده از هگزامر راندوم و آنزیم MMLV-RT (فرمنتاز) بر اساس دستورالعمل ارایه شده انجام شد. سپس با استفاده از دستگاه PCR ترموسایکلر مربوط به شرکت کوربت، نمونه‌ها مورد ارزیابی قرار گرفتند. برای انجام واکنش، μL ۱۲/۵ از مستر میکس شرکت رُوش با μL ۱ از آغازگر (۱۰ pmol) و μL ۱ از cDNA (حدود ۱۰۰ ng) با هم مخلوط شده و با استفاده از آب مقطر، حجم به μL ۲۵ رسید. برای آغازگرهای به کار رفته، پارامترهای استفاده شده برای طراحی بهترین آغازگر با استفاده از نرم افزار اولیگو ۶ لحاظ شد. توالی آغازگرهای به کار رفته از قرار زیر بود:

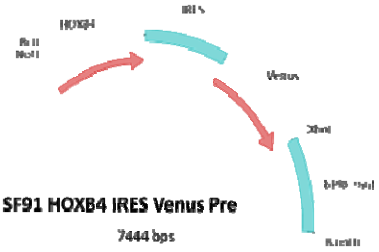
HOXB4: 5-GGA GCC CGG CCA آغازگر جلوبرنده
GCG CTG CGA GG-3
HOXB4: 5-ACC CGA GCG GAT آغازگر معکوس
CTT GGT GTT GGG CAA-3

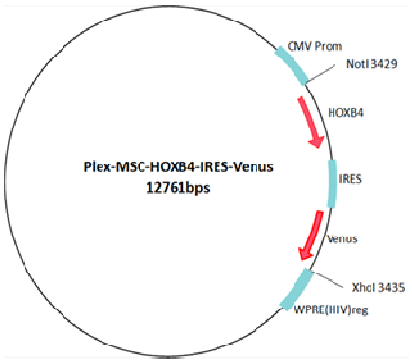
جهت انجام واکنش PCR از برنامه زیر استفاده شد:

دناچوراسیون اولیه ۵ دقیقه در ۹۵ درجه سانتی‌گراد، دناچوراسیون ثانویه،۳۰ ثانیه در ۹۵ درجه سانتی‌گراد، ۳۰ ثانیه آنیلینگ در ۵۶ درجه سانتی‌گراد و۴۵ ثانیه اکستنشن در ۷۲ درجه سانتی‌گراد برای ۳۰ سیکل همراه با یک اکستنشن نهایی در ۷۲ درجه سانتی‌گراد برای ۱۰ دقیقه.

فلوسیتومتری:

قبل و بعد از ازدیاد، با استفاده از فلوسیتومتری (پارتک، آلمان) سلول‌های بنیادی خونساز از نظر مارکرهای سطحی مورد ارزیابی قرار گرفتند. حدود ۶×۱۰^{۴} عدد از سلول‌های کشت داده شده ابتدا با محلول PBS حاوی FBS ۲٪ شستشو داده شده و سپس با استفاده از آنتی‌بادی‌های کونژوگه شده با فلوروکروم فیکواریترین (PE) رنگ‌آمیزی ضد $CD34^{+}$ انجام شد. از آنتی‌بادی PE-mouse IgG1 به عنوان یک ایزوتیپ شاهد جهت تضمین اختصاصی بودن واکنش استفاده گردید. برای تعیین محدوده‌ای از نمودار





A : وکتور رتروویروسی SF91-HOXB4-IRES-Venus

B : وکتور لنتی ویروسی Plex-MSC-HOXB4-IRES-Venus پس از کلون قطعه HOXB4-IRES-Venus در وکتور لنتی ویروسی

شکل ۱: در این مطالعه قطعه HOXB4-IRES-Venus از وکتور رتروویروسی SF91-HOXB4-IRES-Venus برداشته شده و در وکتور لنتی ویروسی pLEX-MSC کلون گردید که در نتیجه وکتور لنتی ویروسی Plex-MSC-HOXB4-IRES-Venus ایجاد شد.

که سلول‌های بنیادی خونساز در آن ناحیه قرار می‌گیرند، از منطقه‌ای که دارای پراکنش نوری پایین بود بهره‌گیری شد. در نهایت اطلاعات به دست آمده با استفاده از نرم افزار فلومکس مورد ارزیابی قرار گرفتند. تحلیل نتایج پس از انجام فلوسیتومتری با استفاده از آزمون t انجام شد.

یافته‌ها

تولید ویروس و ترانس‌داکشن ویروس به داخل سلول‌های بنیادی خونساز:

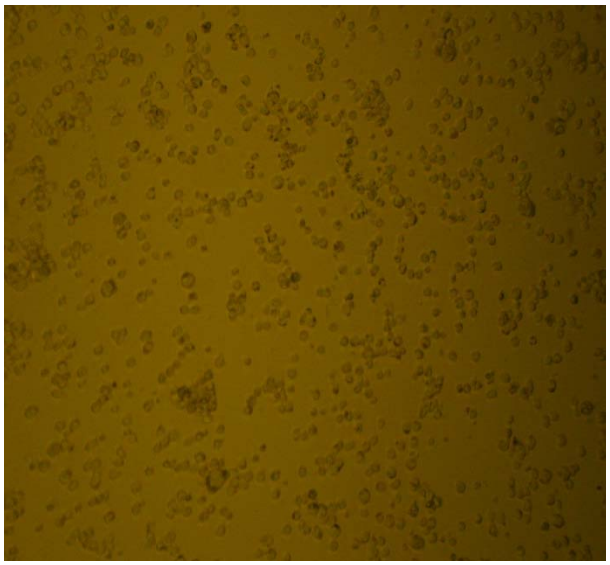
به دلیل توانایی بالای لنتی ویروس‌ها در ترانس داکشن سلول‌های در حال تقسیم و غیر از در حال تقسیم، تصمیم گرفته شد تا از وکتورهای لنتی ویروسی به جای وکتور رتروویروسی استفاده شود. لذا قطعه HOXB4-IRES-Venus را از وکتور اهدایی رتروویروسی برداشته و در داخل وکتور لنتی ویروسی Plex-MSC کلون کردیم و وکتور حاصله را Plex-MSC-HOXB4-IRES-Venus نام‌گذاری نمودیم(شکل ۱).

با استفاده از دستورالعمل معرفی شده توسط شرکت اُپن‌بیوسیستم، تیتراسیون ویروس تغلیظ شده انجام شد. در این مرحله با کمک میکروسکوپ فلورسانس و بهره‌گیری از پروتئین فلورسانس تولید شده توسط ویروس‌ها در سلول‌ها، تیتر ویروس‌های تغلیظ شده مشخص شد که به طور متوسط به ترتیب برای ویروس‌های حاوی Venus و GFP حدود 1×10^8 /mL و 3×10^8 /mL بود. از آن جایی که تعداد سلول‌ها ۳۰۰۰۰۰ و تیتر ویروس‌ها مشخص بود، برای هر سلول بنیادی ۵ تا ۱۰ واحد ویروس عفونی یا MOI حدود ۵ تا ۱۰ استفاده شد. بر اساس یافته‌های به دست آمده توسط گرسون و همکارانش مبنی بر کاهش میزان انتقال لنتی ویروس‌ها به سلول‌های بنیادی خونساز بدون تحریک اولیه با سایتوکاین‌های اولیه شامل ترومبوپویتین، Flt3 و SCF ، یک تحریک مختصر اولیه سایتوکاینی در روز اول ازدیاد برای سلول‌های بنیادی خونساز به کار برده شد(۱۴). همان طوری که قبلاً هم گزارش شده بود، یافته‌ها نشان می‌داد که این تحریک اولیه سایتوکاینی در افزایش میزان ترانس‌داکشن سلول‌ها مؤثر بوده است(۱۵). پس از ۷۲ ساعت از زمان ترانس‌داکشن، میزان موفقیت‌آمیز بودن ترانس‌داکشن با استفاده از میکروسکوپ فلورسانس مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج حدود ۸۰٪ تا ۹۰٪ موفقیت آمیز بودن ترانس‌داکشن را در سلول‌های بنیادی خونساز نشان می‌داد (شکل ۲).

آزمون RT- PCR:

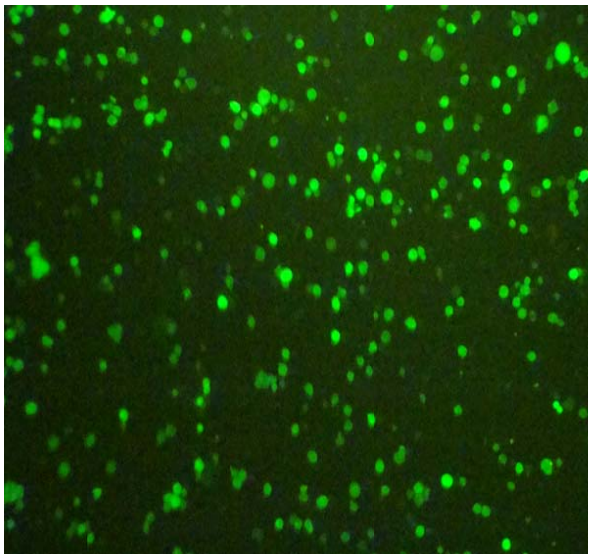
از این آزمون جهت بررسی میزان بیان ترانس‌کریپت ژن HOXB4 در سلول‌های بنیادی خونساز مورد نظر بهره‌گیری شد. بعد از ۷۲ ساعت از زمان ترانس‌داکشن، سلول‌ها از

A



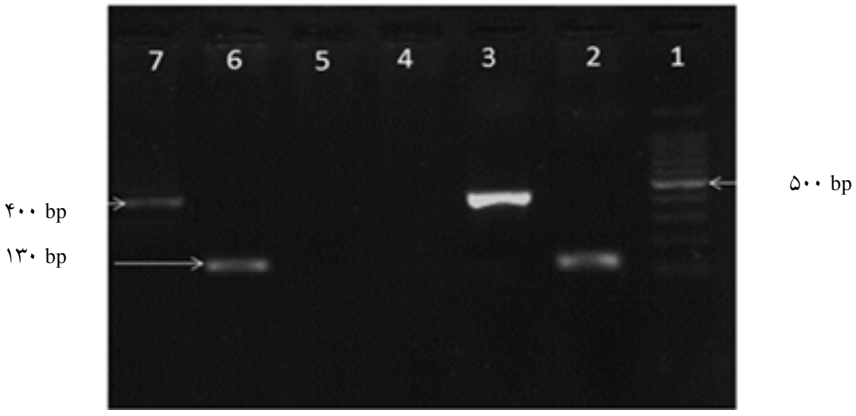
A : مشاهده سلول‌های بنیادی خونساز با نور مرئی میکروسکوپ فاز کنتراست

B



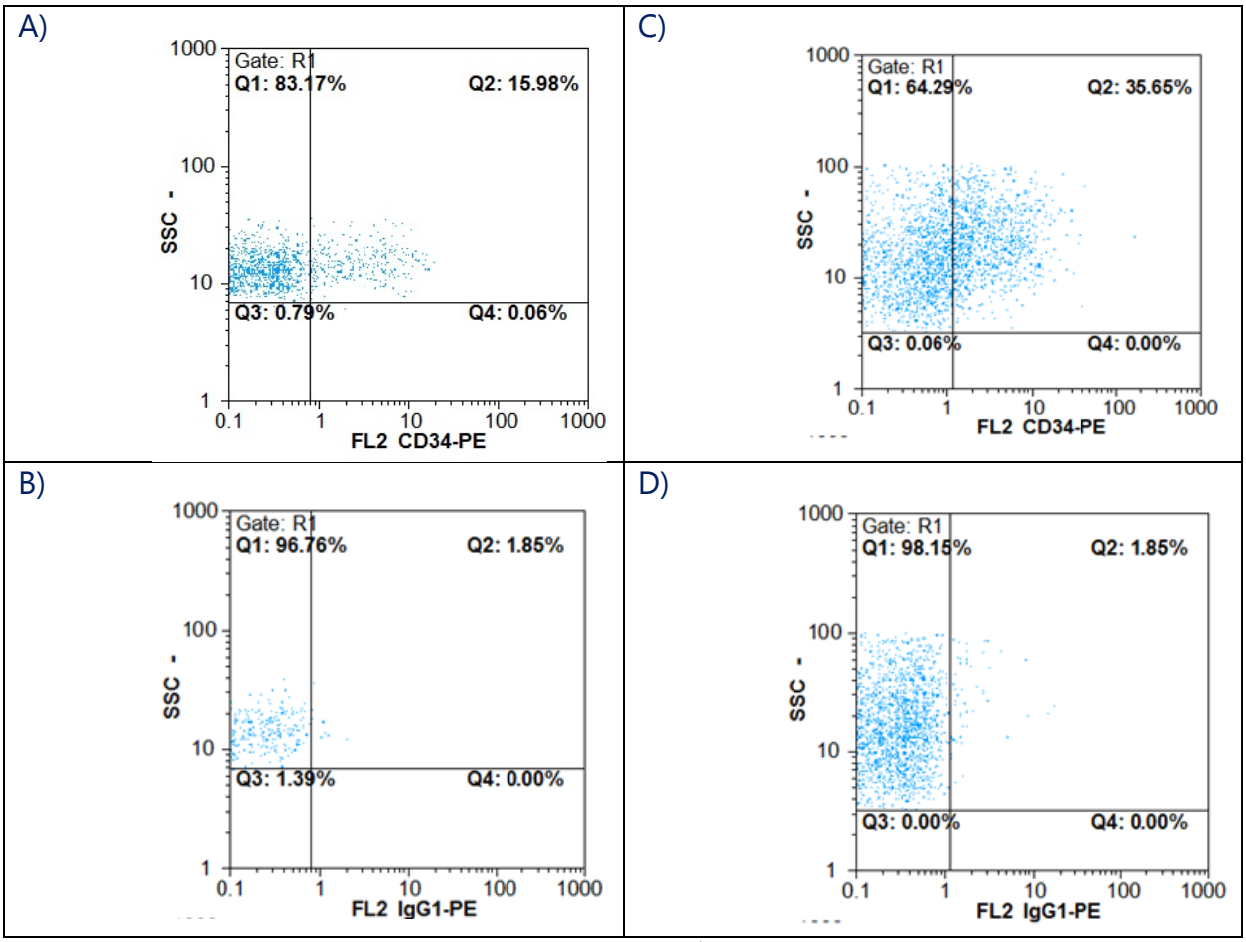
B : مشاهده بیان مارکر فلورسانس ونوس در سلول‌های ترانس‌داکت شده در همان زمینه

شکل۲: ارزیابی میزان ترانس‌داکشن سلول‌های بنیادی خونساز با لنتی ویروس HOXB4-Venus پس از ۷۲ ساعت از زمان ترانس داکشن



شکل۳: انجام آزمون RT-PCR بر روی cDNA به دست‌آمده از سلول‌های ترانسفکت شده با ویروس‌های حاوی HOXB4 پس از ۷۲ ساعت از زمان ترانس‌داکشن نشان‌دهنده باند ۴۰۰ bp مربوط به تکثیر HOXB4 با آغازگرهای داخلی بود که در نمونه آزمون نسبت به شاهد به مراتب قوی‌تر است. چاهک شماره ۱ مربوط به ladder با اندازه ۱۰۰ bp، چاهک شماره ۲ و ۶ مربوط به بتا اکتین با اندازه ۱۳۰ bp به ترتیب در نمونه آزمون و شاهد، چاهک ۳ و ۷ باند مربوط به تکثیر ژن HOXB4 به ترتیب در نمونه‌های آزمون و شاهد با استفاده از آغازگرهای داخلی که باندی حدود ۴۰۰ bp ایجاد می‌کنند، چاهک ۴ مربوط به شاهد منفی می‌باشد.

نظر بیان ترانس‌کریپت ژن مربوطه مورد ارزیابی قرار گرفتند. برای بررسی بیان ژن HOXB4 و مقایسه آن با گروه آزمون، از ژن bact به عنوان شاهد داخلی و نرمالیزه‌کننده بیان ژن HOXB4 در گروه آزمون و شاهد استفاده شد. نتایج نشان داد که پس از حدود ۷۲ ساعت از ترانس‌داکشن ، بیان ژن HOXB4 در سلول‌های ترانس‌داکت



C: نمودار فلوسیتومتری سلول‌های بنیادی خونساز در گروه آزمون از نظر میزان بروز مارکر $CD34^+$ در سطح سلول‌ها، نمودار مربوط به آنتی $CD34^+$ نشاندار با PE . D : نمودار فلوسیتومتری مربوط به کنترل ایزوتیپ منفی نمودار C

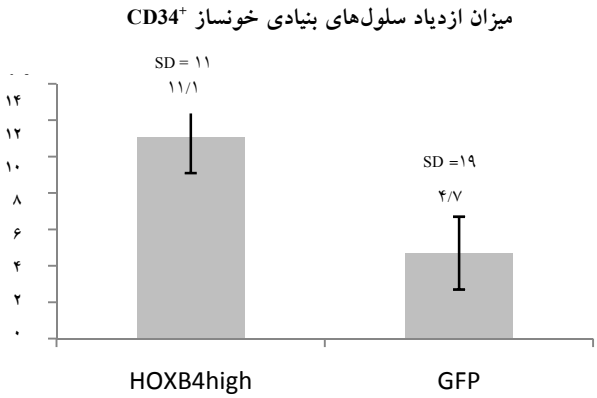
A: نمودار فلوسیتومتری سلول‌های بنیادی خونساز در گروه شاهد از نظر میزان بروز مارکر $CD34^+$ در سطح سلول‌ها، نمودار مربوط به آنتی $CD34^+$ نشاندار با PE . B : نمودار فلوسیتومتری مربوط به کنترل ایزوتیپ منفی نمودار A

شکل۴: ارزیابی فلوسیتومتریک سلول‌های بنیادی خونساز در گروه آزمون و گروه شاهد از نظر شاخص $CD34^+$

شده با ویروس به طور قابل توجهی بیشتر از گروه شاهد بود(شکل۳).

بررسی فلوسیتومتریک سلول‌های بنیادی خونساز در محیط ازدیادی از نظر شاخص $CD34^+$:

میزان شاخص سطحی $CD34^+$ در دو فاصله زمانی روز اول و روز هشتم کشت مورد ارزیابی قرار گرفت. در روز اول در ازدیاد سلول‌های بنیادی خونساز به طور متوسط ۳۰۰۰۰۰ سلول بنیادی خونساز وجود داشت که دارای خلوص حدود ۸۵٪ بودند.پس از ۸ روز ازدیاد این سلول‌ها در محیط آزمایشگاه، جمعیت سلول‌های کشت داده شده به طور متوسط به ۸۰۰۰۰۰۰ عدد رسید که به طور میانگین در گروه شاهد ۱۵/۶٪ و در گروه آزمون که دچار افزایش بیان HOXB4 بودند، حدود ۳۵/۶٪ سلول بنیادی خونساز $CD34^+$ وجود داشت(شکل۴). بنابراین با توجه به تعداد اولیه سلول $CD34^+$ در زمان شروع کشت و تعداد سلول‌های $CD34^+$ در روز پایان کشت، در گروه آزمون سلول‌های $CD34^+$ پس از اتمام دوره کشت از نظر فنوتیپی ۱۱/۱ برابر و در گروه شاهد، سلول‌های بنیادی $CD34^+$ حدود ۴/۷ برابر ازدیاد داشتند.



نمودار ۱: میزان ازدیاد سلول‌های بنیادی خونساز بر اساس ارزیابی‌های ایمونوفنوتیپی در گروه آزمون و شاهد

تفاوت‌های بین گروه آزمون و کنترل با آزمون Student's t-test مورد بررسی قرار گرفتند که نشان‌دهنده تفاوت معنادار بین دو گروه بود(نمودار۱)(p= ۰/۰۵).

بحث

دسترسی بالا به سلول‌های بنیادی خونساز بند ناف و هم‌چنین ظرفیت بیولوژیکی بسیار بالای این سلول‌ها، آن‌ها را به اهداف بسیار مهمی برای سلول درمانی، ژن درمانی و پیوند مغز استخوان تبدیل کرده است. مطالعه‌های گذشته حاکی از توانایی بالای فاکتورهای درون‌زاد در کنترل فعالیت‌های کلیدی سلول‌های بنیادی خونساز از جمله فعالیت خود تکثیری و هم چنین تمایز سلولی می‌باشد. شمار زیادی از گزارش‌ها وجود دارند که نشان می‌دهند در میان فاکتورهای درون‌زاد، ژن‌های هموباکس HOX به عنوان عوامل کلیدی در جهت کنترل تعادل بین فعالیت خود تکثیری و تعهد به تمایز به رده‌های خاص در طی تقسیم سلولی در سلول‌های بنیادی خونساز و پیش‌سازهای خونی، عمل می‌کنند. در بین ژن‌های HOX توجه ما به HOXB4 به عنوان تقریباً بهترین عامل درون‌زاد شناخته شده و ارتقادهنده فعالیت خود تکثیری سلول‌های بنیادی خونساز، معطوف شد. بیان اکتوپیک HOXB4 ، می‌تواند منجر به القای تکثیر و فعالیت خود تکثیری سریع سلول‌های بنیادی خونساز موشی در شرایط آزمایشگاه شود، بدون این که تداخلی در تمایز این سلول‌ها ایجاد نماید(۱۶، ۱۳، ۸).

بیشتر مطالعه‌های انجام شده در مورد HOXB4 ، در سلول‌های بنیادی خونساز موش بوده است و اثر افزایش بیان HOXB4 بر روی میزان پیوند و توانایی بازسازی بافت خونساز توسط این سلول‌های بنیادی مورد ارزیابی قرار گرفته است(۱۸-۱۶، ۱۳). در این مطالعه سعی بر آن بود که با به کارگیری افزایش بیان HOXB4 با استفاده از وکتورهای لنتی ویروسی، فعالیت خود تکثیری را در سلول‌های بنیادی خونساز بند ناف القا نماییم و از این طریق با افزایش جمعیت سلول‌های بنیادی خونساز بند ناف و ازدیاد آن‌ها در محیط آزمایشگاه، به دنبال یافتن رویکردی مناسب برای غلبه بر مشکل تعداد محدود سلول‌های بنیادی در واحدهای خون بند ناف باشیم.

در این بررسی از شاخص سطحی $CD34^+$ به عنوان یکی از مولکول‌هایی که در سطح سلول‌های بنیادی خونساز بیان می‌شود، برای ردیابی آن‌ها استفاده شد. لذا از ارزیابی‌های فنوتیپی فلوسیتومتریک جهت ارزیابی اولیه بودن یا نبودن این سلول‌ها بهره برده شد. بررسی‌های آنتون چاک و همکارانش در ۲۰۰۱ نشان داد که بیان HOXB4 در محیط آزمایشگاه، مانع رفتن سلول‌های بنیادی خونساز موش به سمت تمایز می‌شود و میزان تمایز این سلول‌ها را کاهش می‌دهد. هم چنین در سال ۲۰۰۲ در بررسی دیگری که توسط آنتون چاک و همکارانش انجام شد، افزایش بیان HOXB4 در سلول‌های بنیادی خونساز موش و در پی آن کشت این سلول‌ها در محیط آزمایشگاه، موجب ازدیاد ۴۰ برابر سلول‌های بنیادی خونساز در طی ۱۴ روز کشت آن‌ها در محیط آزمایشگاه شد. در سال ۲۰۰۵، اشمیت ولف و همکاران کاهش میزان تمایز سلول‌های بنیادی خونساز موش را در مطالعه‌ای جداگانه به دنبال افزایش بیان HOXB4 در طول کشت سلول‌های بنیادی در محیط آزمایشگاه گزارش کردند(۱۹).

در مطالعه حاضر بر روی سلول‌های بنیادی خونساز با منشاء بند ناف، در گروه آزمون افزایش حدود ۱۱/۱ برابری تعداد سلول‌های $CD34^+$ نسبت به گروه شاهد که تنها حدود ۴/۷ برابر افزایش را نسبت به روز اول نشان می‌دادند، مشاهده شد که از یک سو حاکی از کاهش میزان تمایز سلول‌های بنیادی خونساز بند ناف در گروه آزمون

نسبت به گروه شاهد بود و از سوی دیگر با افزایش میزان فعالیت خود تکثیری این سلول‌ها همراهی داشت، که با گزارش‌های آنتون چاک و اشمیت ولف و همکارانشان در سلول‌های بنیادی خونساز موشی هم‌خوانی دارد. به علاوه شواهد به دست آمده در این بررسی هماهنگ با یافته‌های قبلی در مدل‌های موشی، به شکل واضحی از تاثیر افزایش بیان HOXB4 بر سلول‌های بنیادی خونساز با منشاء بند ناف حکایت دارد.

در این مطالعه در نظر گرفتن Venus به عنوان یک مارکر فلورسانت در کنار ژن HOXB4 ، ما را قادر ساخت تا رفتار و میزان رشد سلول‌هایی را که ژن HOXB4 در آن‌ها دچار افزایش بیان می‌شد، در محیط آزمایشگاه مورد ردیابی قرار بدهیم. در این بررسی‌ها در ابتدا کشت با ۵۰٪ سلول‌های $Venus^+$ و ۵۰٪ $Venus^-$ شروع شد، سلول‌های بنیادی خونساز $Venus^+$ که با ویروس ترانس داکت شده بودند، نسبت به سایر سلول‌های موجود در محیط کشت که فاقد بیان Venus بودند، مزیت بیشتری را در رشد داشتند که این موضوع بیانگر اثرات آندوژن پروتئین HOXB4 بر روی این سلول‌ها می‌باشد و به بیانی دیگر نشان می‌دهد که بیان این پروتئین در یک سلول، بر سلول‌های مجاوری که پروتئین را بیان نمی‌کنند تاثیری نخواهد داشت، زیرا مزیت رشد در سلول‌هایی که ویروس وارد آن‌ها نشده بود اما همراه با سلول‌های $Venus^+$ بودند، دیده نشد. در گروه شاهد که فقط GFP را به تنهایی بیان می‌کردند، چنین اثری مشاهده نشد. با این وجود یافته‌های این تحقیق، با یافته‌های به دست آمده توسط آن و همکارانش در تضاد بود. در مطالعه آن، تفاوتی بین سلول‌های ترانس داکت شده با ویروس‌های حاوی HOXB4 و سلول‌های ترانس‌داکت نشده فاقد ژن، مشاهده نشد، که احتمالاً به دلیل سطوح بسیار بالای بیان HOXB4 بوده است(۲۰).

در این بررسی‌ها، ازدیاد سلول‌های بنیادی خونساز در گروه آزمون کاملاً سریع بود. مکانیسم محتمل برای اثر HOXB4 بر روی ازدیاد جمعیت سلول‌های خونساز $CD34^+$ می‌تواند به دلیل پاسخ‌دهی سلول‌های بنیادی خونساز به فاکتورهای رشد خونساز باشد. هم چنین این احتمال وجود دارد که افزایش بیان HOXB4 ، پاسخ‌دهی سلول‌ها را در برابر عوامل مهارکننده و تنظیم کننده‌های منفی کاهش دهد.

بیشتر مطالعه‌هایی که تاکنون انجام شده، با استفاده از وکتورهای رترو ویروسی بوده‌اند که در مقایسه با وکتورهای لنتی ویروسی در ترانسفکت کردن سلول‌های بنیادی خونساز که بخشی از آن‌ها در حالت خفتگی هستند، کارایی کمتری دارند. یکی از مشکلاتی که در کار با وکتورهای رترو ویروسی وجود دارد، تیتر و عفونت‌زایی نسبتاً پایین می‌باشد(۲۱). بنابراین در این مطالعه از وکتورهای لنتی ویروسی برای انتقال ژن به داخل سلول‌های بنیادی خونساز استفاده شد که هم تیترهای بالایی به دست می‌داد و هم چنین توانایی عفونت‌زایی بالایی داشت.

نتیجه‌گیری

یکی از مشکلات بسیار جدی که در طی ازدیاد سلول‌های بنیادی خونساز در محیط آزمایشگاه اتفاق می‌افتد، از دست رفتن این سلول‌ها در طی مدت ازدیاد آن‌ها در محیط آزمایشگاه است. بر اساس مطالعه حاضر، به کارگیری HOXB4 می‌تواند با افزایش فعالیت خود تکثیری و کاهش تمایز سلول‌های بنیادی، ابزاری بسیار مفید برای جلوگیری از ازدست رفتن سلول‌های بنیادی خونساز بندناف در شرایط ازدیاد در آزمایشگاه باشد. حال آن که مطالعه‌های انجام شده در مدل‌های حیوانی در داخل بدن، هیچ موردی از بروز بدخیمی و افسار گسیختگی سلول‌ها را گزارش نکرده‌اند(۲۲، ۱۶، ۸).

از این رو این روش می‌تواند با غلبه بر مشکل تعداد اندک سلول‌های بنیادی خونساز واحدهای خون بند ناف، در به کارگیری این منبع سلولی بسیار با ارزش در رویکردهایی از قبیل پیوند مغز استخوان، سلول درمانی و ژن درمانی بسیار با اهمیت باشد.

تشکر و قدردانی

این تحقیق از پایان‌نامه دکترای گروه هماتولوژی استخراج شده و با حمایت مالی مرکز تحقیقات مؤسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون وابسته به سازمان انتقال خون ایران و دانشگاه تربیت مدرس به انجام

رسیده است. نویسندگان از مسؤولین بیمارستان شریعتی که نمونه‌های خون بند ناف را در اختیار ما قرار دادند، صمیمانه تشکر و قدردانی به عمل می‌آورند. هم چنین از آقای عسگریان(بخش فلوسیتومتری آزمایشگاه نور) که همکاری صمیمانه‌ای در انجام این تحقیق داشتند، تشکر و قدردانی می‌نماییم.

References :

1- To LB, Haylock DN, Simmons PJ, Juttner CA. The biology and clinical uses of blood stem cells. Blood 1997; 89(7): 2233-58.
2- Ogawa M. Differentiation and proliferation of hematopoietic stem cells. Blood 1993; 81(11): 2844-53.
3- Svingen T, Tonissen KF. Hox transcription factors and their elusive mammalian gene targets. Heredity (Edinb) 2006; 97(2): 88-96.
4- Sauvageau G, Lansdorp PM, Eaves CJ, Hogge DE, Dragowska WH, Reid DS, *et al.* Differential expression of homeobox genes in functionally distinct CD34+ subpopulations of human bone marrow cells. Proc Natl Acad Sci U S A 1994; 91(25): 12223-7.
5- Lee GS, Kim BS, Sheih JH, Moore M. Forced expression of HoxB4 enhances hematopoietic differentiation by human embryonic stem cells. Mol Cells 2008; 25(4): 487-93.
6- Chauvet S, Merabet S, Bilder D, Scott MP, Pradel J, Graba Y. Distinct hox protein sequences determine specificity in different tissues. Proc Natl Acad Sci USA 2000; 97(8): 4064-9.
7- Lawrence HJ, Sauvageau G, Humphries RK, Largman C. The role of HOX homeobox genes in normal and leukemic hematopoiesis. Stem Cells 1996; 14(3): 281-91.
8- Antonchuk J, Sauvageau G, Humphries RK. HOXB4 overexpression mediates very rapid stem cell regeneration and competitive hematopoietic repopulation. Exp Hematol 2001; 29(9): 1125-34.
9- Buske C, Humphries RK. Homeobox genes in leukemogenesis. Int J Hematol 2000; 71(4): 301-8.
10- Schiedlmeier B, Santos AC, Ribeiro A, Moncaut N, Lesinski D, Auer H. HOXB4's road map to stem cell expansion. Proc Natl Acad Sci U S A 2007; 104(43): 16952-7.
11- Piacibello W, Bruno S, Sanavio F, Droetto S, Gunetti M, Ailles L, *et al*. Lentiviral gene transfer and *ex vivo* expansion of human primitive stem cells capable of primary, secondary, and tertiary multilineage repopulation in NOD/SCID mice. Nonobese diabetic/severe combined immunodeficient. Blood 2002; 100(13): 4391-400.
12- Antonchuk J, Sauvageau G, Humphries RK. HOXB4-induced expansion of adult hematopoietic stem cells *ex vivo*. Cell 2002; 109(1): 39-45.
13- Thorsteinsdottir U, Sauvageau G, Humphries RK. Enhanced *in vivo* regenerative potential of HOXB4-transduced hematopoietic stem cells with regulation of their pool size. Blood 1999; 94(8): 2605-12.
14- Zielske SP, Gerson SL. Cytokines, including stem cell factor lone, enhance lentiviral transduction in nondividing human LTCIC and NOD/SCID repopulating cells. Mol Ther 2003; 7(3): 325-33.
15- Park F, Ohashi K, Chiu W, Naldini L, Kay MA. Efficient lentiviral transduction of liver requires cell cycling *in vivo*. Nat Genet 2000; 24(1): 49-52.
16- Sauvageau G, Thorsteinsdottir U, Eaves CJ, Lawrence HJ, Largman C, Lansdorp PM. Overexpression of HOXB4 in hematopoietic cells causes the selecuve expansion of more primitive populations *in vitro* and *in vivo*. Genes Dev 1995; 9(14): 1753-65.
17- Schiedlmeier B, Klump H, Will E, Arman-Kalcek G, Li Z, Wang Z, *et al*. High-level ectopic HOXB4 expression confers a profound *in vivo* competitive growth advantage on human cord blood CD34 cells, but impairs lymphomyeloid differentiation. Blood 2003; 101(5): 1759-68.
18- Antonchuk J, Sauvageau G, Humphries RK. HOXB4-induced expansion of adult hematopoietic stem cells *ex vivo*. Cell 2002; 109(1): 39-45.
19- Schmittwolf C, Porsch M, Greiner A, Avots A, Müller AM. HOXB4 confers a constant rate of *in vitro* proliferation to transduced bone marrow cells. Oncogene 2005; 24(4): 561-72.
20- Brun AC, Fan X, Bjornsson JM, Humphries RK, Karlsson S. Enforced adenoviral vector-mediated expression of HOXB4 in human umbilical cord blood CD34 cells promotes myeloid differentiation but not proliferation. Mol Ther 2003; 8(4): 618-28.
21- Ohno Y, Yasunaga S, Ohtsubo M, Mori S, Tsumura M, Okada S, *et al.* Hoxb4 transduction down-regulates Geminin protein, providing hematopoietic stem and progenitor cells with proliferation potential. Proc Natl Acad Sci U S A 2010; 107(50): 21529-34.
22- Klump H, Schiedlmeier B, Vogt B, Ryan M, Ostertag W, Baum C. Retroviral vector-mediated expression of HoxB4 in hematopoietic cells using a novel coexpression strategy. Gene Ther 2001; 8(10): 811-7.

Sci J Iran Blood Transfus Organ 2012; Stem Cell Suppl. 9(3): 239-250

Original Article

HOXB4 overexpression increases cord blood CD34^{+} hematopoietic stem cells population during *ex vivo* expansion

Allahbakhshian Farsani M.[1], Forouzandeh Moghadam M.[1], Amirizadeh N.[2], Soleimani M.[1], Pourfatholah A.[1]

[1]Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran
[2]Blood Transfusion Research Center, High Institute for Research and Education in Transfusion Medicine, Tehran, Iran

Abstract

Background and Objectives

Nowadays, cord blood hematopoietic stem cells (HSCs) are well known as a very valuable source of cells for cell therapy purposes. But unfortunately, the insufficient number of them is a limiting factor for their employment in adult bone marrow transplantation. Cord blood HSCs expansion is an approach for alleviating this problem. It has been shown by several studies during *in vivo* investigations in mouse models that HOXB4 is one of the most effective tools for inducing HSCs self-renewal and thus HSCs expansion. In this study, we tried to enhance self-renewal of cord blood HSCs by HOXB4 overexpression during *ex vivo* expansion period.

Materials and Methods

In this fundamental-applied research, HSCs were transducted by lentiviral vectors containing HOXB4. HSCs were then cultured in IMDM medium containing 10% FBS and early acting cytokines (Flt3L, SCF, Tpo) for 8 days. Thereafter, we evaluated HOXB4 expression by RT-PCR. The CD34+ subpopulation were also examined by flow cytometry.

Results

We detected a high level of HOXB4 gene expression in HOXB4 transducted HSCs relative to the control. We observed that HOXB4 over-expression dramatically increases CD34+ subpopulation of HSCs. The increase in the number of CD34+ HSCs is an indicator of HSCs self-renewal during *ex vivo* expansion period.

Conclusions

All in all, in this survey we observed that HOXB4 overexpression markedly increases CD34+ HSCs during *ex vivo* expansion period. This approach can be very effective for overcoming the limited number of cord blood HSCs for cell therapy purposes.

Key words: Hematopoietic Stem Cells, HOXB4 protein، human, Lentivirus

Received: 13 Jun 2011
Accepted: 6 July 2011

Correspondence: Forouzandeh M., PhD of Clinical Biochemistry. Associate Professor of Tarbiat Modares University.
P.O.Box: 14115-331, Tehran, Iran. Tel: (+9821)82883861; Fax: (+9821) 82883861
E-mail: *foroz@modares.ac.ir*