خون
فصلنامه پژوهشی
دوره ۳ شماره ۴ زمستان ۸۵(۳۴۲-۳۳۳)

مقایسه تاثیر دوزهای مختلف Bone Morphogenetic Protein 4(BMP4) و اریتروپویتین(EPO) بر تمایز سلول‌های بنیادی جنینی موش به کلنی‌های اریتروئیدی

ماندانا بیگی بروجنی[۱]، دکتر مژده صالح‌نیا[۲]، دکتر مجتبی رضازاده ولوجردی[۳]، دکتر مهدی فروزنده[۴]، دکتر سید جواد مولی[۵]، دکتر ابراهیم حاجی‌زاده[۶]

چکیده

سابقه و هدف

تمایز سلول‌های بنیادی جنینی در شرایط کشت، سیستم آزمایشی را برای بررسی اثرات فرضی فاکتورهای رشد فراهم می‌کند. امروزه پیدا کردن فاکتورهای رشد و عوامل محیطی مورد نیاز برای خون‌سازی اهمیت دارد. هدف از این مطالعه مشخص کردن اثر دوزهای مختلف EPO و BMP4 بر تمایز سلول‌های بنیادی جنینی و ارزیابی تعداد و اندازه کل کلنی‌ها و تعداد کلنی‌های اریتروئیدی بود.

مواد وروش‌ها

مطالعه انجام شده از نوع تجربی بود. در این مطالعه از سلول‌های اجسام شبه جنینی ۴ روزه با منشا سلول‌های بنیادی جنینی رده CCE استفاده شد. سلول‌ها به وسیله EDTA-Trypsin از هم جدا شدند و در دو گروه آزمایشی حاوی دوزهای مختلف(۸۰، ۴۰، ۲۰، ۱۰، ۵، ۰ ng/ml) BMP4 و (۱۶۰، ۸۰، ۴۰، ۲۰، ۱۰، ۰ ng/ml) EPO در محیط نیمه جامد حاوی متیل سلولز کشت داده شدند. پس از گذشت ۱۰ روز، دو گروه از لحاظ اندازه کلنی‌ها، تعداد و درصد کلنی‌های بنزیدین مثبت مورد ارزیابی قرار گرفتند.

یافته‌ها

پس از جمع آوری اطلاعات، مشخص شد تمام دوزهای BMP4 و EPO از لحاظ آماری به طور معنی‌داری باعث افزایش اندازه کلنی‌ها شده بودند. مقایسه دوزهای مختلف BMP4 نشان داد که با افزایش دوز، تعداد کل کلنی کاهش می‌یابد و با گروه کنترل اختلاف معنی‌داری دارد($p< ۰/۰۵$). گرچه دوز ۲۰ng/ml از BMP4، کلنی‌های اریتروئیدی بیشتری داشت، اما از نظر درصد و تعداد کلنی‌های بنزیدین مثبت در مقایسه با گروه کنترل تفاوتی نداشت. هم‌چنین مقایسه دوزهای مختلف EPO نشان داد که تعداد و درصد کلنی‌های بنزیدین مثبت در مقایسه با گروه کنترل افزایش داشت و از میان دوزهای به کار گرفته شده، دوز ۲۰ng/ml نسبت به بقیه دوزها، تعداد کلنی بنزیدین مثبت بیشتری داشت($p< ۰/۰۵$).

نتیجه گیری

در مجموع به نظر می‌رسد که از بین دو فاکتور بررسی شده، EPO در تحریک سلول‌های بنیادی جنینی و تمایز آن‌ها به سمت کلنی‌های اریتروئیدی مناسب‌تر است و دوز ۲۰ng/ml EPO نسبت به بقیه دوزها بهترین تاثیر را دارد.

کلمات کلیدی: سلول‌های بنیادی جنینی، Bone Morphogenetic Protein 4، اریتروپویتین

تاریخ دریافت: ۸۵/۵/۳
تاریخ پذیرش: ۸۵/۱۰/۹

۱- دانشجوی PhD آناتومی، دانشگاه تربیت مدرس
۲- مؤلف مسؤول: PhD بافت شناسی و جنین شناسی ـ دانشیار دانشگاه تربیت مدرس ـ صندوق پستی ۱۱۱-۱۴۱۱۵
۳- PhD آناتومی ـ استاد دانشگاه تربیت مدرس
۴- PhD بیوشیمی ـ دانشیار دانشگاه تربیت مدرس
۵- PhD سلولی و مولکولی ـ استادیار دانشگاه تربیت مدرس
۶- PhD آمار حیاتی ـ دانشیار دانشگاه تربیت مدرس

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2025-05-30]

مقدمه

سلول‌های بنیادی جنین موش، سلول‌های نامیرایی هستند که از توده داخلی جنین قبل از لانه‌گزینی به دست می‌آیند و قدرت تمایز به انواع سلول‌ها را دارند(۳-۱). اگر چه ظرفیت تمایز *in vitro* همانند *in vivo* نیست اما سلول‌های خونی را به راحتی می‌توان از سلول‌های بنیادی جنینی به روش‌های مختلف به دست آورد(۴). تمایز سلول‌های بنیادی جنینی در شرایط کشت سیستم آزمایشی را برای بررسی اثرات فرضی فاکتورهای رشد فراهم می‌کند(۵). امروزه پیدا کردن فاکتورهای رشد و عوامل محیطی مناسب برای خون‌سازی اهمیت دارد و این فاکتورها حتی در ترکیب FCS (Fetal Calf Serum) نیز وجود دارند(۷، ۶).

بعضی از پروتئین‌های خاص مثل BMP4 (Bone Morphogenetic Protein4) که عضوی از خانواده TGFβ (Transforming Growth Factorβ) است، نقش محوری در شکل‌گیری مزودرم شکمی و پیش‌سازهای سلول‌های خونی و اندوتلیالی دارد(۷). بررسی‌های انجام شده نشان می‌دهند که BMP4 قسمتی از کمپلمان تنظیمی تکوین پیش‌سازهای خونی است و برای تولید رده اریتروئیدی، میلوئیدی و لنفوئیدی ضروری است. نیز نقش ویژه‌ای در کنترل اریتروپوئز قطعی همانند اریتروپوئز جنینی دارد و باعث القای سلول‌های بنیادی جنینی به سمت بیان ژن گلوبین شده و فعالیت هماتوپوئزی را در اجسام شبه جنینی مشتق از سلول‌های بنیادی جنینی موشی القا می‌نماید. هم چنین تکثیر و تمایز سلول‌های بنیادی خون‌ساز (Hematopoietic Stem Cells) را در محیط کشت تنظیم می‌کند(۱۰-۸). نتایج به دست آمده از تحقیقات پیشنهاد می‌کند که BMP4 ممکن است به عنوان ماشه اولیه تکوین سلول‌های خونی عمل کند و باعث تحریک گروهی از ژن‌ها شود که در ارتباط با خون‌سازی هستند(۱۱).

یکی دیگر از فاکتورها که نقش مهمی را در اریتروپوئز ایفا می‌کند، هورمون گلیکوپروتئینی اریتروپویتین(EPO) با وزن مولکولی ۴۰-۳۴ کیلو دالتون است که مهم‌ترین سیتوکین تنظیم کننده اریتروپوئز می‌باشد و باعث تثبیت مناسب سلول‌های خونی می‌شود(۱۴-۱۲، ۸-۶). غیاب آن در محیط *in vitro* باعث اختلال در تکثیر و تمایز سلول‌های پیش‌ساز اریتروئیدی می‌شود. EPO باعث افزایش رونویسی mRNA گلوبین شده و اثرات بیولوژیکی متفاوتی روی سلول‌های خونی دارد که هنوز ناشناخته‌اند(۱۵). نشان داده شده که در موش‌هایی که ژن اریتروپویتین و گیرنده اریتروپویتین آن‌ها دچار جهش شده بود، به تعداد طبیعی اریتروسیت اولیه تکوین یافته اما جنین‌ها در روز ۱۳-۱۲ به علت قطع سیگنال EPO می‌میرند و دیده شده که در صورت حذف EPO پس از گذشت ۱۸ ساعت تعداد اریتروسیت‌های اولیه به یک سوم و میزان مرگ به دو برابر می‌رسد. این در حالی است که در حضور EPO، درصد مرگ سلولی خیلی پایین است و میزان ساخت هموگلوبین افزایش می‌یابد(۱۶).

مطالعات انجام شده نشان داده‌اند که EPO و BMP4 در روند اریتروپوئز مؤثرند، اما در زمینه اثر دوزهای مختلف این فاکتورها در محیط کشت ساده بر تمایز سلول‌های بنیادی جنینی به کلنی‌های اریتروئیدی و مقایسه آن‌ها تحقیقی صورت نگرفته است. از آن‌جایی که پیدا کردن فاکتورهای رشد و عوامل محیطی که برای خون‌سازی مورد نیازند اهمیت دارد، هدف ما از این مطالعه مشخص کردن اثر دوزهای مختلف EPO و BMP4 بر تعداد کل کلنی‌ها، تعداد کلنی‌های اریتروئیدی و اندازه کلنی‌های حاصل از تمایز سلول‌های بنیادی بود.

مواد و روش ها

کشت سلول و تشکیل اجسام شبه جنینی:

در این مطالعه از سلول‌های بنیادی جنینی رده CCE اهدایی از دانشگاه شفیلد انگلستان استفاده شد. سلول بنیادی جنینی رده CCE در محیط کشت DMEM(Duldecco's Modified Eagle's Medium) دارای ۲۰ درصد FBS و ۱۰۰۰ واحد LIF در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد با ۹۵٪ رطوبت و دارای ۵٪ CO_2 کشت شد. ۲ روز قبل از تشکیل اجسام شبه جنینی، محیط تغییر یافت و از محیط IMDM فاقد LIF دارای ۱۵ درصد FBS، $1/5\times10^{-4}$ mmol/ml مونوتیو گلیسرول (MTG)، ۲میلی‌مول L گلوتامین و ۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر اسید

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2025-05-30]

اسکوربیک استفاده شد و سپس در همان محیط ۵۰۰۰ سلول در هر میلی لیتر جهت تشکیل اجسام شبه جنینی کشت داده و بعد از گذشت ۴ روز از آن‌ها در مطالعات بعدی استفاده گردید.

کشت در محیط نیمه جامد و دوزیمتری:

سلول‌های اجسام شبه جنینی ۴ روزه به وسیله ۰/۰۴ تریپسین- ۰/۲۵ EDTA از هم جدا شدند و در محیط نیمه جامد حاوی ۱٪ متیل سلولز به تعداد ۳×۱۰^{۴} در دو گروه کشت داده شدند. محیط پایه هر دو گروه IMDM و دارای ۳۰ درصد FBS، $۴/۵\times۱۰^{-۴}$ مونوتیوگلیسرول (MTG)، ۲میلی‌مول L گلوتامین و ۱۲/۵ میکروگرم در میلی‌لیتر اسید اسکوربیک بود. گروه اول حاوی مقادیر متفاوت BMP4(۸۰ ng/ml، ۴۰، ۲۰، ۱۰، ۵، ۰) و گروه دوم حاوی مقادیر متفاوت EPO(۱۶۰ ng/ml، ۸۰، ۴۰، ۲۰، ۱۰، ۰) بود.

ارزیابی کلنی:

در محیط‌های حاوی دوزهای مختلف EPO و BMP4 در روز ۱۰، اندازه کلنی‌ها(مجموعه بیش از ۵۰ سلول) با اکولر مدرج کالیبره شده اندازه‌گیری شد، هم‌چنین تعداد کلنی‌ها شمارش شدند و کلنی‌های اریتروئیدی با رنگ‌آمیزی بنزیدین مشخص و شمارش شدند.

آزمایش سمیت:

برای تعیین تعداد سلول‌های زنده پس از ۴۸ ساعت کشت، سلول‌های حاصل از اجسام شبه جنینی ۴ روزه در محیط حاوی مقادیر متفاوت BMP4(۸۰ ng/ml، ۴۰، ۲۰، ۱۰، ۵، ۰) کشت داده شدند. سپس ۱۰ میکرولیتر از سوسپانسیون سلولی برداشته شد و درون یک میکروفیوژ ریخته سپس هم حجم آن تریپان بلو اضافه شد و پس از گذشت چند دقیقه با استفاده از لام نئوبار، سلول‌های زنده شمارش و درصد سلول‌های زنده در دوزهای مختلف محاسبه شدند.

رنگ‌آمیزی بنزیدین:

۱۰ میکرولیتر H_2O_2 ۳۰٪، بلافاصله قبل از رنگ‌آمیزی به ۱ میلی‌لیتر از محلول بنزیدین(۰/۰۶٪) افزوده و سپس این محلول به پلیت‌های کشت به مدت ۱۰ دقیقه اضافه شد و نمونه‌ها مورد مطالعه قرار گرفتند. کلنی‌های اریتروئیدی به دلیل واکنش هموگلوبین با بنزیدین و آب اکسیژنه آبی تیره شده و کلنی‌های غیر اریتروئیدی به علت عدم واکنش زرد رنگ بودند(۱۷).

رنگ‌آمیزی روی لام:

پس از برداشت کلنی‌ها، از محیط نیمه جامد با استفاده از دستگاه سیتو اسپین به مدت ۷ دقیقه با دور ۷۰۰rpm لام‌های سلولی تهیه گردید. نمونه‌ها با متانول فیکس و به مدت ۱۰ دقیقه با گیمسا رنگ‌آمیزی شدند و پس از شستشو لام‌ها مورد مطالعه قرار گرفتند.

آنالیز آماری:

هر آزمایش ۵ بار تکرار شد و پس از جمع‌آوری اطلاعات با برنامه SPSS۱۳ بررسی آماری صورت گرفت و از آزمون‌های غیر پارامتری استفاده شد. جهت بررسی اندازه کلنی از آزمون کروسکال با سطح معنی‌داری $p<۰/۰۵$ استفاده شد. برای مقایسه تعداد کلنی‌ها و کلنی‌های بنزیدین مثبت و درصد کلنی‌های بنزیدین مثبت از آزمون من ویتنی با سطح معنی‌داری کمتر از $p<۰/۰۵$ استفاده شد.

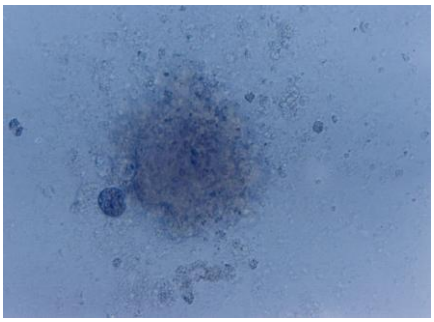
یافته ها

کلنی‌های سلول‌های بنیادی جنینی رده CCE پس از کشت، حاشیه نامنظم داشته و تک لایه بودند. سلول‌های کلنی‌ها به وسیله تریپسین ـ EDTA از هم جدا و کشت داده شد و بعد از ۲۴ ساعت اجسام شبه جنینی تشکیل شد که اجسام مدور، تیره رنگ با حاشیه کاملاً مشخص بودند(شکل ۱).

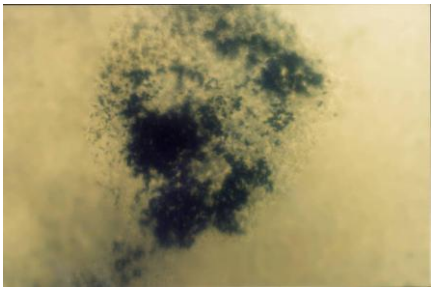
شکل ۱: اجسام شبه جنینی ٤ روزه(بزرگ‌نمایی٤٠×)

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2025-05-30]

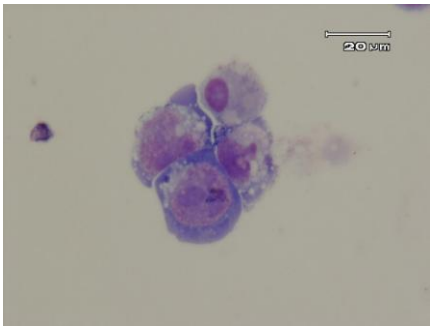
سلول‌های اجسام شبه جنینی توسط تریپسین – EDTA از هم جدا و جهت ارزیابی کلنی در محیط نیمه جامد با دوزهای مختلف EPO یا BMP4 کشت شدند. کلنی‌های تشکیل شده بعد از ۱۰ روز با بنزیدین رنگ‌آمیزی و به رنگ آبی تیره دیده شدند. رده‌های مختلف پیش‌سازهای اریتروئیدی مشاهده شد(شکل‌های ۲ تا ۴).



شکل ۲: کلنی اری‌تروئی‌دی در محی‌ط نی‌مه جامد متی‌ل سلولز(بزرگ‌نمای‌ی ۱۰۰×)



شکل ۳: کلنی بنزی‌دی‌ن مثبت(بزرگ‌نمای‌ی ٤٠×)



شکل ٤: پی‌ش‌سازهای خونی با رنگ‌آمی‌زی گی‌مسا

بررسی اندازه کلنی‌های حاصل از دوزهای مختلف EPO و BMP4:

اندازه کلنی‌ها بعد از گذشت ۱۰ روز از کشت در محیط نیمه جامد متیل سلولز در ۵ بار تکرار اندازه‌گیری شد. تمام دوزهای BMP4 و EPO از لحاظ آماری به طور معنی‌داری باعث افزایش اندازه کلنی‌ها شدند($p< ۰/۰۵$). دوزهای مختلف BMP4(۸۰ng/ml، ۴۰، ۲۰، ۱۰، ۵، ۰) در مقایسه با گروه کنترل افزایش اندازه کلنی داشت($p<۰/۰۵$) و به ترتیب(۳۳/۸۳ ± ۱۴۲/۶۹ ، ۴۳/۵۸ ± ۱۴۹/۳۵ ، ۴۶/۷۸ ± ۱۵۵/۹ ، ۴۶/۲۵ ± ۱۷۲/۸ ، ۴۷/۷۳ ± ۱۴۰/۷۳و ۱۸/۵۲ ± ۹۸/۶) میکرومتر بود. اما در بین دوزهای مختلف، اندازه کلنی‌های تشکیل شده در دوز ۱۰ng/ml، ۴۶/۲۵ ± ۱۷۲/۸ میکرومتر بود که از لحاظ آماری اختلاف معنی‌داری را نسبت به سایر دوزها و گروه کنترل نشان داد($p< ۰/۰۵$). اندازه کلنی‌ها در دوزهای مختلف EPO (۱۶۰ ng/ml، ۸۰، ۴۰، ۲۰، ۱۰، ۰) در مقایسه با گروه کنترل افزایش داشت و به ترتیب (۳۰/۵ ± ۱۱۹/۸ ، ۲۴/۴ ± ۱۲۳/۱ ، ۲۵/۹ ± ۱۲۱/۶ ، ۲۲/۴ ± ۱۲۶/۷ ، ۲۵/۴ ± ۱۱۹/۷ ، ۱۸/۵± ۹۸/۲) میکرومتر بود ($p< ۰/۰۵$).

بررسی تعداد کل کلنی‌های حاصل از دوزهای مختلف BMP4:

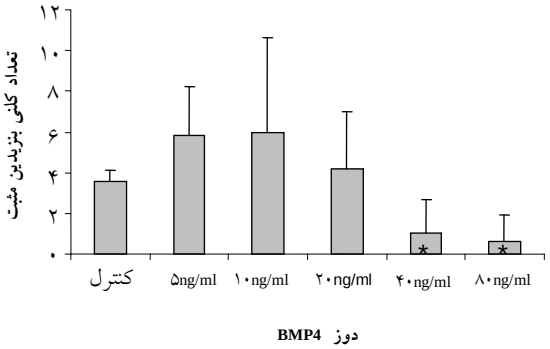
میانگین تعداد کل کلنی‌های تشکیل شده در دوزهای مختلف BMP4 به ترتیب (۵/۱ ± ۲۳ ، ۷/۱ ± ۲۳/۴ ، ۲/۸ ± ۳۰/۴ ، ۴/۶ ± ۴۸/۴ و ۹/۴۴ ± ۵۶/۸) بود که در مقایسه با گروه کنترل(۸/۵۳ ± ۷۱/۶)، اختلاف معنی‌داری داشت. با افزایش دوز BMP4، میانگین تعداد کل کلنی‌ها کاهش یافت.

با توجه به این کاهش، آزمایش سمیت برای دوزهای مختلف(۸۰ ng/ml، ۴۰، ۲۰، ۱۰، ۵، ۰) انجام شد و به ترتیب در دوزهای مختلف درصد زنده ماندن سلول‌ها(۷۱، ۷۱، ۷۳، ۷۳، ۷۰، ۶۸) بود. در نتیجه نشان داده شد که اگر چه تعداد کل کلنی‌ها با افزایش دوز کاهش می‌یابد اما دوزهای مختلف BMP4 از لحاظ درصد زنده ماندن سلول‌ها با گروه کنترل اختلافی ندارد.

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2025-05-30]

بررسی تعداد و درصد کلنی‌های بنزیدین مثبت حاصل از دوزهای مختلف BMP4:

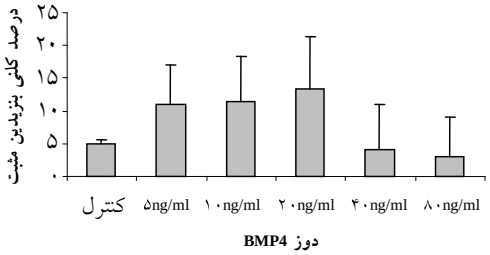
کلنی‌های بنزیدین بعد از گذشت ۱۰ روز با رنگ‌آمیزی بنزیدین در تمام دوزها مشخص و در ۵ بار تکرار شمارش شدند. به ترتیب در دوزهای مختلف BMP4(۸۰ ng/ml، ۴۰، ۲۰، ۱۰، ۵، ۰)، درصد کلنی‌های بنزیدین مثبت (۰/۶ ± ۱/۳ ، ۱ ± ۱/۷ ، ۲/۸ ± ۴/۲ ، ۴/۶ ± ۶ ، ۲/۴۶ ± ۵/۸ ، ۰/۵۴ ± ۳/۶) و (۶ ± ۳ ، ۷ ± ۴ ، ۸ ± ۱۳/۴، ۷ ± ۱۱/۴ ، ۶ ± ۱۱ ، ۰/۵ ± ۵) بود. نتایج نشان داد دو دوز ۸۰ng/ml و ۴۰ng/ml از BMP4 باعث کاهش درصد کلنی‌های بنزیدین مثبت نسبت به دوز ۵ ng/ml می‌شوند اما هیچ یک از دوزها با $p< ۰/۰۵$ نسبت به گروه کنترل تفاوتی را نشان نمی‌دهند(نمودارهای ۱ و ۲).



نمودار ۱: تعداد کلنی‌های بنزیدین مثبت در محیط نیمه جامد حاوی دوزهای مختلف BMP4

جهت تشکیل کلنی‌ها از سلول‌های اجسام شبه جنینی ۴ روزه(۳۰۰۰۰ در هر میلی‌لیتر) استفاده شد و پس از ۱۰ روز کشت مطالعه شدند.

* : اختلاف معنی‌دار با گروه ۵ng ($p< ۰/۰۵$)



نمودار ۲: درصد کلنی‌های بنزیدین مثبت تشکیل شده در محیط نیمه جامد حاوی دوزهای مختلف BMP4

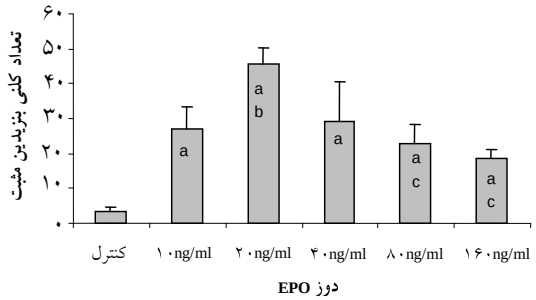
جهت تشکیل کلنی‌ها از سلول‌های اجسام شبه جنینی ۴ روزه(۳۰۰۰۰ در هر میلی‌لیتر) استفاده شد و پس از ۱۰ روز کشت مطالعه شدند.

بررسی تعداد کل کلنی‌های حاصل از دوزهای مختلف EPO:

تعداد کل کلنی‌های تشکیل شده در دوزهای مختلف EPO و گروه کنترل به ترتیب(۱۳/۹ ± ۵۴/۸ ، ۱۸/۲ ± ۵۴، ۱۱/۷ ± ۵۰ ، ۴/۸ ± ۸۲/۸ ، ۱۷/۱ ± ۹۷/۶ ، ۸/۱ ± ۷۷) بود، در دوز ۱۰ng/ml اختلاف معنی‌دار با گروه کنترل داشت و بیشترین میانگین را در میان سایر دوزها به خود اختصاص داد. تعداد کل کلنی‌های تشکیل شده در دوزهای ۲۰ng/ml و ۱۰ ng/ml با سایر دوزها اختلاف معنی‌داری را نشان داد($p< ۰/۰۵$).

بررسی تعداد و درصد کلنی‌های بنزیدین مثبت حاصل از دوزهای مختلف EPO:

در دوزهای مختلف EPO(۱۶۰ng/ml، ۸۰، ۴۰، ۲۰، ۱۰، ۰) تعداد و درصد کلنی‌های بنزیدین مثبت به ترتیب (۲/۶ ± ۱۸/۶ ، ۵/۷ ± ۲۲/۸ ، ۱۱/۷ ± ۲۹ ، ۴/۷۷ ± ۴۵/۶ ، ۶/۱ ± ۲۷/۲ ، ۱/۱ ± ۳/۴) و (۱/۲ ± ۳۲ ، ۳/۷ ± ۴۲ ، ۴/۱ ± ۵۷ ، ۳/۹ ± ۵۵ ، ۳ ± ۲۷/۲ و ۰/۰۱۳ ± ۴/۳) بود. تمام دوزهای EPO از لحاظ آماری اختلاف معنی‌داری با گروه کنترل داشت و باعث افزایش معنی‌دار این دو کمیت شد. تعداد و نیز درصد کلنی‌های بنزیدین مثبت در دوزهای ۴۰ng/ml و ۲۰ng/ml با سایر دوزها اختلاف معنی‌داری را نشان داد ($p< ۰/۵$)(نمودارهای ۳ و ۴).



نمودار ۳: تعداد کلنی‌های بنزیدین مثبت تشکیل شده در محیط نیمه جامد حاوی دوزهای مختلف EPO

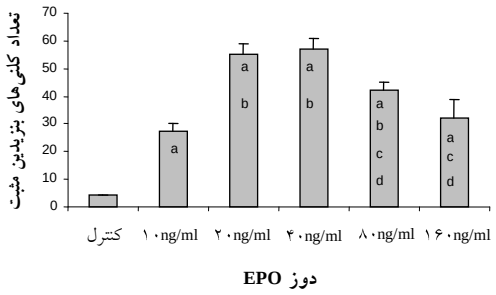
جهت تشکیل کلنی‌ها از سلول‌های اجسام شبه جنینی ۴ روزه(۳۰۰۰۰ در هر میلی‌لیتر) استفاده شد و پس از ۱۰ روز کشت مطالعه شدند.

a) اختلاف معنی‌دار با گروه کنترل $p< ۰/۰۵$

b) اختلاف معنی‌دار با گروه ۱۰ng، $p< ۰/۰۵$

c) اختلاف معنی‌دار با گروه ۲۰ng، $p< ۰/۰۵$

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2025-05-30]

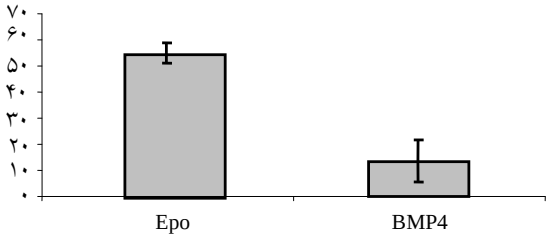


نمودار ۴: درصد کلنی‌های بنزیدین مثبت تشکیل شده در محیط نیمه جامد حاوی دوزهای مختلف EPO

a) اختلاف معنی‌دار با گروه کنترل، p< ۰/۰۵
b) اختلاف معنی‌دار با گروه ۱۰ ng، p< ۰/۰۵
c) اختلاف معنی‌دار با گروه ۲۰ng، p< ۰/۰۵
d) اختلاف معنی‌دار با گروه ۴۰ng، p< ۰/۰۵

مقایسه درصد کلنی‌های بنزیدین مثبت در محیط حاوی BMP4 و EPO:

تجزیه آماری مقایسه درصد کلنی‌های بنزیدین مثبت در محیط حاوی BMP4 و EPO نشان داد که دوز ۲۰ng/ml از بین دو گروه، مناسب‌ترین دوز در بین دوزهای مورد ارزیابی هستند و مقایسه آن‌ها نشان داد که دوز ۲۰ng/ml EPO اختلاف معنی‌دار با دوز ۲۰ng/ml، BMP4 دارد(p< ۰/۰۵)(نمودار ۵).



نمودار ۵: مقایسه درصد کلنی‌های بنزیدین مثبت در دوز ۲۰ng/ml از EPO و BMP4 پس از تمایز ۳۰۰۰۰ سلول حاصل از EBs با منشا سلول‌های بنیادی جنینی CCE در محیط نیمه جامد متیل سلولز پس از ۱۰ روز کشت

بحث

نتایج تحقیق حاضر نشان داد که افزودن دوزهای مختلف(۵ ،۱۰ ،۲۰ ،۴۰ ،۸۰ ng/ml) BMP4، باعث افزایش اندازه کلنی‌ها نسبت به گروه کنترل می‌شود. از آن جایی که BMP4 یک فاکتور رشد است، افزودن آن به محیط کشت باعث افزایش اندازه کلنی‌ها شده که این خود ممکن است ناشی از کاهش مرگ سلولی و افزایش اندازه سلول‌ها باشد. اما با افزایش میزان دوز BMP4، تعداد کل کلنی‌های حاصل نسبت به گروه کنترل کاهش یافت که این نشان می‌دهد احتمالاً با افزایش میزان دوز BMP4 ، برنامه ژنتیکی به سمتی هدایت شده است که سلول‌های بنیادی جنینی به رده‌های مزودرمی متمایز شده، توانایی تکثیر و ایجاد کلنی در محیط نیمه جامد را نداشته و تکثیر آن‌ها محدود شده است. هم‌چنین علی‌رغم افزودن BMP4 به محیط کشت، اختلاف معنی‌داری از نظر تعداد کلنی‌های بنزیدین مثبت نسبت به گروه شاهد نداشته است. این نشان می‌دهد که احتمالاً استفاده از BMP4 در محیط کشت باعث القای تمایز سلول‌های بنیادی جنینی به سایر رده‌های هماتوپویتیکی از جمله رده میلوئیدی شده است و باعث اختلاف معنی‌داری در تمایز به سمت کلنی‌های اریتروئیدی نشده است. تحقیقات انجام شده در خصوص کاربرد BMP4 در تمایز رده اریتروئیدی تاکنون نتایج ضد و نقیضی را گزارش کرده است به عنوان مثال ملیندا و همکاران نشان دادند که جلوگیری از فعالیت BMP باعث القای مرگ سلولی در پیشگامان اریتروئیدی و فعالیت آن باعث افزایش تمایز پروژنیتورهای خونی به رده میلوئیدی و هم زمان باعث کاهش اریتروسیت‌ها می‌شود که این ناشی از آپوپتوز نمی‌باشد(۱۰). نتایج این محققین نشان داد که سیگنال‌های داخل سلولی BMP، باعث تبدیل سلول‌های غیر هماتوپویتیکی و پیش‌برد آن‌ها به سمت اریتروسیت‌های بالغ می‌شود اما افزایش سیگنال‌های BMP4 در همان سلول‌ها باعث افزایش تمایز رده میلوئیدی و کاهش اریتروپوئز می‌گردد. تفسیر این نتایج نشان داد که افزایش سیگنال BMP باعث افزایش تمایز HSCs(Hematopoietic Stem Cells) به سمت رده میلوئیدی و هم زمان باعث کاهش تمایز به رده اریتروئیدی می‌شود و BMP4 ممکن است تاثیر مثبت در تمایز به سمت رده میلوئیدی و تاثیر منفی در تمایز به سمت رده اریتروئیدی داشته باشد(۱۰).

نتایج تحقیقات کری نشان داد که افزودن BMP به

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2025-05-30]

تنهایی باعث افزایش ۱۵ تا ۲۰ درصد فاکتور GATA1 (Globin Transcription Factor 1) در محیط سرم‌دار می‌شود و در صورت افزودن آن همراه با SDF (Serum Endothelial Growth Factor)، VEGF (Vascular Derived Growth Factor)، T_3 (Triiodothyronine hormone) و EPO (Erythropoietin) باعث افزایش ۵۰٪ اریتروپوئز می‌شود(۱۸).

ویلز و جانسون نیز نشان دادند که افزودن BMP4 در محیط فاقد سرم برای تمایز سلول‌های بنیادی به سلول‌های اریتروئیدی مورد نیاز است و باعث افزایش تمایز به سمت رده اریتروئیدی می‌شود(۱۹).

چادویک نیز اعلام کرد که افزودن BMP4 در محیط فاقد سرم تفاوت معنی‌داری در تمایز سلول‌های بنیادی جنینی به رده‌های هماتوپویتیکی ایجاد نمی‌کند اما قادر است به طور معنی‌داری باعث افزایش خود تکثیری پروژنیتورهای خونی بدون وابستگی به ستیوکین‌ها شود(۷). بنابراین به نظر می‌رسد شرایطی که BMP4 در محیط کشت به کار گرفته می‌شود نیز در نتایج تاثیر گذار باشد و احتمالاً بعضی از فاکتورهای موجود در محیط کشت می‌توانند اثر BMP4 را در القای تمایز به رده اریتروئیدی، افزایش و یا کاهش دهند.

لی و ناکایاما طی تحقیقاتی که انجام دادند اعلام کردند که علی‌رغم اثبات نقش القای BMP4 در تمایز سلول‌های هماتوپویتیکی در دوران جنینی و تولید سلول‌های هماتوپوئتیکی از سلول‌های بنیادی جنینی موشی و پریمات‌ها، BMP4 به تنهایی یا در ترکیب با دیگر سیتوکین‌ها اثر نسبتاً کمی بر روی فرکانس یا تعداد کل پروژنیتورهای خونی مشتق از سلول‌های اجسام شبه جنینی انسانی تحت شرایط آزمایش دارد، اگر چه تیمار با BMP4، تولید پروژنیتورهای هماتوپویتیکی را نسبت به گروه کنترل افزایش می‌دهد(۱۶).

نتایج ما نشان داد افزودن BMP4 به عنوان یک فاکتور رشد باعث افزایش اندازه کلنی‌ها می‌شود. احتمالاً با افزایش میزان دوز BMP4، برنامه ژنتیکی به سمتی هدایت شده است که سلول‌های بنیادی جنینی به سایر رده‌های مزودرمی که توانایی تکثیر و ایجاد کلنی در محیط نیمه جامد را نداشتند متمایز شوند و تعداد کل کلنی‌ها در دوزهای بالا کاهش چشمگیری یابد. اگر چه افزودن BMP4 به تنهایی باعث افزایش مختصری در تمایز به رده اریتروئیدی شده اما نتوانسته از لحاظ آماری تفاوت معنی‌داری با گروه کنترل ایجاد کند. در مجموع به نظر می‌رسد BMP4 در محیط کشت ساده حاوی سرم نتوانسته نقش مؤثری در تمایز سلول‌های بنیادی جنینی به رده اریتروئیدی ایفا کند.

در بخش دیگری از نتایج تحقیق حاضر نشان داده شد که افزودن دوزهای (۱۰، ۲۰، ۴۰، ۱۶۰، ۸۰ ng/ml) EPO از لحاظ آماری باعث افزایش معنی‌دار اندازه کلنی‌ها نسبت به گروه کنترل شده و دوز ۲۰ ng/ml، دارای بیشترین میانگین اندازه کلنی نسبت به سایر دوزها است. احتمالاً EPO باعث افزایش تکثیر و کاهش آپوپتوز شده است. دوز ۱۰ ng/ml از لحاظ آماری باعث افزایش تعداد کل کلنی‌ها نسبت به گروه کنترل شده است. دوزهای ۸۰، ۱۶۰ ng/ml، ۴۰ نیز باعث کاهش تعداد کل کلنی نسبت به دوز ۱۰ng/ml و ۲۰ ng/ml شده و اختلاف معنی‌داری را با این دو دوز نشان می‌دهد. در مجموع به نظر می‌رسد دو دوز ۲۰ ng/ml و ۱۰ ng/ml تعداد کلنی بیشتری را در محیط نیمه جامد تولید کرده‌اند که نشان‌دهنده تاثیر مثبت این دو دوز بر روی خود تکثیری سلول‌ها و ایجاد کلنی در محیط نیمه جامد است.

هم چنین دوز ۲۰ ng/ml نسبت به سایر دوزها از لحاظ افزایش اندازه، تعداد کل کلنی و تعداد کلنی بنزیدین مثبت از سایر دوزها مناسب‌تر بوده و افزودن EPO در تمام دوزها باعث افزایش معنی‌دار تعداد کلنی‌های اریتروئیدی شده است. افزایش تعداد کلنی‌های اریتروئیدی از دو جنبه می‌تواند مدنظر قرار گیرد: ۱- افزایش از نظر تکثیر و تعداد سلول‌های هموگلوبین ساز ۲- از نظر میزان سنتز هموگلوبین درون یک سلول

به هر حال در مجموع از هر وجه باعث افزایش سنتز هموگلوبین شده‌اند که در تحقیقات قبلی نتایج مشابهی ارایه شده است به عنوان مثال بوزلیوز و همکاران نشان دادند که EPO باعث افزایش رونویسی mRNA گلوبین شده است(۱۵).

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2025-05-30]

از سوی دیگر EPO می‌تواند به عنوان یک فاکتور ضد آپوپتوزی نیز عمل کند و باعث افزایش قدرت حیاتی سلول‌ها شود. نتایج تحقیق حاضر نیز به نوعی مؤید این مطلب است هم چنین دایترلن با تحقیقی که انجام داد به این نتیجه رسید که ۱۸ ساعت پس از حذف EPO، تعداد اریتروسیت اولیه به یک سوم و میزان مرگ و میر به دو برابر می‌رسید اما در حضور EPO درصد مرگ سلولی کاهش و میزان سنتز هموگلوبین افزایش یافت(۱۶).

نتایج تحقیقات کلر و همکاران نیز نشان داد که درصد سلول‌های مرده در غیاب EPO، ۶۰٪ افزایش یافت اما در حضور EPO درصد آپوپتوز سلول‌های اریتروسیت اولیه و قطعی کمتر بود(۲۰). وو نیز اعلام کرد که EPO و EPOR(رسپتور اریتروپویتین) برای متعهد شدن، تکثیر و تمایز پروژنیتورهای خونی لازمند(۲۱).

نتیجه‌گیری

در مجموع به نظر می‌رسد که از بین دو فاکتور بررسی شده، EPO در تحریک سلول‌های بنیادی جنینی و تمایز آن‌ها به سمت کلنی‌های اریتروئیدی تاثیر بیشتری داشته است و مناسب‌ترین دوز آن ng/ml ۲۰ است.

تقدیر و تشکر

لازم است از همکاری صمیمانه آقای دکتر بهرامی و خانم دکتر متین برای در اختیار قراردادن سلول‌های بنیادی تقدیر شود. هم‌چنین از آقای دکتر مسعود سلیمانی به خاطر راهنمایی‌هایی علمی و آقای پور بیرانوند به واسطه کمک‌های تکنیکی تقدیر می‌شود. هزینه‌های تحقیق حاضر از طریق طرح تحقیقاتی مصوب شبکه پزشکی ملکولی کشور و دانشگاه تربیت مدرس تامین شده است.

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2025-05-30]

References :

1- Sainteny F. Production of hematopoietic cells from Es cells. J Soc Biol 2001; 195: 13-18.
2- Lu Sj, Quan C, Li F, Vida L, Honig GR. Hematopoietic progenitor cells derived from embryonic stem cells: analysis of gene expression. Stem Cells 2002; 20: 428-37.
3- Perkins C. Enrichment of blood from embryonic stem in vitro. Repord Fertil Dev 1998; 10: 563-572.
4- Nakano T. *In-vitro* development of hematopoiesis. Int J Hematol 1996; 65: 1-8.
5- Mitchell J, Weiss MD. Embryonic stem cells and hematopoietic stem cell biology. Aplastic Anemia and Stem Cell Biology 1997; 11: 1185-1197.
6- Helgason CD, Fox T. In vitro hematopoietic differentiation of embryonic stem (Es) cells. Mol Cell Biol 1993; 13: 473-477.
7- Chadwick K, Wang L, Li L, Menendez P, Murdouch B, Roulean A, *et al*. Cytokines and BMP-4 promote hematopoietic differentiation of human embryonic stem cell. Blood 2003; 102: 906-15.
8- Detmer K, Walker AN. Bone morphogenetic proteins act synergistically with hematopoietic cytokines in the differentiation of haematopoietic progenitors. Cytokine 2002; 17: 36-42.
9- Nakayama N, Lee J, Chiu L. Vascular endothelial growth factor synergistically enhances bone morphogenetikc protein-4 dependent lymphohematopoietic cell generation from embryonic stem cell in vitro. Blood 2000; 95: 2275-2283.
10- Melinda J, Walter S, Wangman GA, Notis G, Soderling TR, Christian JL. Calmodulin-dependent Protein Kinase IV mediated antagonism of BMP signaling regulates linaeage and survival of hematopoietic progenitors. Development 2002; 129: 1455-1466.
11- Li F, Lu S, Vida L, Thomson JA, Honig GR. Bone morphogenetic protein 4 induces efficient hematopoietic differentiation of rhesus monkey embryonic stem cells in vitro. Blood 2001; 98: 335-342.
12- Lappin TR, Maxwell PG, Johnston PG. Epo's Alter Ego: erythropoietin has multiple actions. Stem cell 2002; 20: 485-492.
13- Benjamin L, Ebert H, B unn F. Regulation of the erythropoietin gene. Blood 1999; 94: 1864-1877.
14- Mc Gann JK, Silver L, Liesveld J, Palis J. Erythyopoietin-receptor expression and function during the initations of murine yolk sac erythropoiesis. Exp Hematol 1997; 25: 1149-1157.
15- Bousslios T, Bertles JF, Engene G. EPO receptor characteristics during the ontogeny of hamster yolk sac erythroid cells. J Biol Chem 1989; 264(27):16017-16021.
16- Dieterlen LF. On the origin of the hematopoietic stem cells in embryo: An experimental approach. J Embryol Exp Morph 1975; 33: 607.
17- Palis J, Mc Grath K, Kingsleg PD. Initation of hemetopoiesis and vasculogenesis in murine yolk sac explants. Blood 1995; 88: 156-163.
18- Carrie A, Subrata C, Bieker J. The BMP/BMPR/smad pathway directs expression of the erythroid-specific EKLF and GATA1 transcription factors during embryoid body differentiation in serum free media. Development 2002; 129: 539-549.
19- Johansson BM, Willes MV. Evidence for involvement of activin A and BMP4 in mamelian mesoderm and hematopoietic development. Mol Cell Biol 1995; 15: 141-151.
20- Keller G, Lacuad G, Robertson S. Development of the hematopoietic system in the mouse. EXP Hematol 1999; 27: 771-787.
21- Wu H, Liu X, Jaenisch R, Lodish HF. Generation of committed erythroid BFu-E progenitors dose not require. Cell 1995; 83: 59-67.

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2025-05-30]

Comparison between different doses of Bone Morphogenetic Protein4 (BMP4) and Erythropoietin (EPO) on differentiation of mouse embryonic stem cells to erythroid colonies

Beigi Boroujeni M.[1](MS), Salehnia M.[1](PhD), Rezazadeh Valojerdi M.[1](PhD), Mowla S.J.[1](PhD), Forouzandeh M.[1](PhD), Hajizadeh E.[1](PhD)

[1]Tarbiat Modarres University

Abstract

Background and Objectives

In-vitro differentiation of embryonic stem cells to different cell types provides a valuable tool to study the interaction between these cells and growth factor. Recent investigation showed that recognition of the factors and their influence on the hematopoiesis is important. The aim of this research was to study the effect of different dose of EPO and BMP4 on the differentiation of embryonic stem cells; the number and size of total colonies and benzidine positive colonies were also evaluated.

Materials and Methods

4-day-old EBs were trypsinized and dissociated to single cells. These cells were cultured on the semisolid medium in two groups with different doses of EPO (10, 20, 40, 80, 160 ng/ml) and BMP4 (5, 10, 20, 40, 80, 160 ng/ml). The colonies were evaluated after 10 days and stained with benzidine and giemsa.

Results

The size of colonies in all concentrations of EPO and BMP4 faced an increase showing a significant difference with the control group ($P \leq 0.05$). Total number of colonies had a negative correlation with the dose of BMP4 but there was not any significant difference between benzidine positive colonies with the control group. The number and percentage of benzidine positive colonies had significant difference with the control group in all doses of EPO. 20ng/ml of EPO contrary to other concentrations of EPO caused increase in benzidine positive colonies.

Conclusions

Our results showed that EPO had better effect on ES cells erythroid colony differentiation than BMP4. It also indicated that 20 ng/ml of EPO was the best concentration.

Key words: Embryonic stem cell, Bone Morphogenetic Protein4, Erythropoietin
SJIBTO 2007; 3(4): 333-342

Received: 25 Jul 2006
Accepted: 30 Dec 2006

*Correspondence:*Salehnia M. PhD. Embryologist and Histologist.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 2025-05-30]