

تمایز سلول‌های خون بند ناف به سلول‌های پیش‌ساز اریتروئیدی در محیط نیمه جامد و در حضور اینترلوکین ۳، اینترلوکین ۶، فاکتور سلول بنیادی و اریتروپوئیتین

امیر آتشی^۱، سعید کاویانی^{۲*}، مسعود سلیمانی^{۳*}، مهرداد نوروزی نیا^۴، یوسف مرتضوی^۵، مریم حفیظی^۵

- ۱- دانشجوی دکتری تخصصی، گروه خون‌شناسی آزمایشگاهی و بانک خون، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
- ۲- استادیار، گروه خون‌شناسی آزمایشگاهی و بانک خون، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
- ۳- استادیار، گروه ژنتیک پزشکی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
- ۴- دانشیار، گروه پاتولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی زنجان، زنجان، ایران
- ۵- کارشناس ارشد، گروه بیولوژی سلول‌های بنیادی، مرکز تحقیقات فناوری بن‌یاخته، تهران، ایران

پذیرش مقاله: ۹۰/۰۲/۱۱

دریافت مقاله: ۸۹/۱۰/۰۶

چکیده

هدف: مطالعه اریتروپوئیز نیاز به توسعه روش‌های کشت سلول‌های پیش‌ساز اریتروئیدی با استفاده از توان سلول‌های بنیادی، برای تمایز به رده‌های مختلف سلول‌های خونی دارد. در این مطالعه، تمایز سلول‌های بنیادی خون بند ناف به سلول‌های پیش‌ساز اریتروئیدی در یک محیط کشت نیمه جامد انجام شد.

مواد و روش‌ها: سلول‌های تک هسته‌ای از خون بند ناف استخراج شده و در محیط کشت مایع حاوی فاکتورهای تمایز دهنده اریتروئیدی کشت شدند (مرحله اول کشت). سلول‌های غیر چسبنده در محیط نیمه جامد حاوی فاکتورهای رشد سلول بنیادی، اینترلوکین ۳، اینترلوکین ۶، اریتروپوئیتین کشت شدند (مرحله دوم کشت). پس از گذشت یک هفته، کلونی‌های اریتروئیدی ظاهر شده از محیط کشت نیمه جامد برداشته شدند. برای تعیین هویت سلول‌های تمایز یافته، تجزیه و تحلیل فلوسیتومتری برای سنجش CD235a و CD36، ارزیابی سیتولوژی توسط رنگ‌آمیزی گیمسا و بررسی بیان ژن‌های EKLK، GATA-1 و آلفا-گلوبین توسط RT-PCR انجام گرفت.

نتایج: تجزیه و تحلیل فلوسیتومتری نشان داد که تمایز یافته، شاخص‌های سلولی ویژه اریتروئیدی CD36 و CD235a را به ترتیب در حد ۹۴/۳ درصد و ۹۵/۵ درصد دارا هستند. ریخت‌شناسی این سلول‌ها در گستره‌های رنگ‌آمیزی شده با رنگ گیمسا، طیف سلول‌های پیش‌ساز اریتروئیدی از پرواریتروبلاست تا ارتوکروماتیک اریتروبلاست را اثبات نمود. نتایج RT-PCR تأیید نمود که سلول‌های تمایز یافته پیش‌سازهای رده اریتروئیدی هستند و ژن‌های EKLK، GATA-1 و آلفا گلوبین را بیان می‌کنند.

نتیجه‌گیری: سلول‌های بنیادی خون بند ناف قابلیت بالایی برای تمایز به سلول‌های پیش‌سازهای اریتروئیدی با روش شرح داده شده دارند که می‌توان از آن برای مطالعات آزمایشگاهی بهره گرفت.

کلیدواژگان: سلول‌های پیش‌ساز اریتروئیدی، سلول‌های بنیادی خون بند ناف، اریتروپوئیز

Email:kavianis@modares.ac.ir

*نشانی مکاتبه: تهران، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم پزشکی، گروه خون‌شناسی، کدپستی: ۱۴۱۱۷۱۳۱۱۶

Email:soleim_m@modares.ac.ir

*نشانی مکاتبه: تهران، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم پزشکی، گروه خون‌شناسی، کدپستی: ۱۴۱۱۷۱۳۱۱۶

۱- مقدمه

در انسان بالغ به‌طور متوسط روزانه حدود 2×10^8 سلول اریتروسیت تولید می‌شود [۱]. مکانیسم‌های اصلی تکثیر و تمایز سلول‌های بنیادی خون‌ساز (Hematopoietic Stem Cells: HSC) که فرایند اریتروپوئیز (Erythropoiesis) را در بدن انجام می‌دهند به‌خوبی شناسایی شده است. مطالعات آزمایشگاهی مرتبط با این موضوع اغلب روی سلول‌های پیش‌ساز به دست آمده از مغز استخوان و کبد جنین انجام شده است [۱-۶]. فاکتورهای رشد خون‌ساز، رشد سلول‌های پیش‌ساز را در همه بافت‌های مذکور تحت تأثیر قرار می‌دهد [۴]. فاکتورهای رشد مختلفی به‌منظور القای اریتروپوئیز اولیه معرفی شده‌اند که از جمله آن‌ها می‌توان به فاکتور سلول‌های بنیادی (Stem Cells Factor: SCF)، اریتروپوئیتین (Erythropoietin: EPO) [۷-۹]، و ایلترکین-۶ (Interleukin-6: IL-6) [۱۰] اشاره کرد. فاکتور رشد IL-3 یک فاکتور رشد مشترک برای تکثیر و حفظ سلول‌های پیش‌ساز اریتروئیدی و میلوئیدی به‌شمار می‌رود [۸، ۱۱]. سلول‌های پیش‌ساز اریتروئیدی در حین تکثیر و تمایز خود ویژگی‌های مختلفی را به‌دست آورده و از دست می‌دهند. آنتی‌ژن‌های سطحی مانند CD34، CD41 و HLA-DR در فرایند اریتروپوئیز کاهش می‌یابد. در حالی که آنتی‌ژن‌های دیگری نظیر CD36، CD71 و گلیکوفورین A (Glycophorin A: Gly A) ظاهر می‌شود [۱۲]؛ همچنین تولید هموگلوبین به موازات بلوغ سلول‌های اریتروئیدی از سلول‌های پیش‌ساز آغاز شده و قابلیت عملکردی به سلول‌های اریتروئیدی می‌دهد [۱۲، ۱۳]. Gly A یک گلیکوپروتئین اختصاصی سلول‌های اریتروئیدی است که اولین بار بر سطح سلول‌های پرواریتروبلست (Proerythroblast) ظاهر می‌شود [۱۴] در حالی که اولین شواهد هموگلوبین‌سازی در سلول‌های بازوفیلیک اریتروبلست مشاهده می‌شود [۱۵]. با شناسایی فاکتورهای رشد القا کننده تولید رده اریتروئیدی، روش‌های مختلفی برای تقلید اریتروپوئیز در محیط آزمایشگاهی پیشنهاد شده است. اساس بیشتر این روش‌ها بر پایه جداسازی

HSCهای $CD34^+$ از مغز استخوان، خون بند ناف، خون محیطی جریان یافته با G-CSF (Granulocyte Colony-Stimulating Factor) یا کبد جنین است که با ترکیبی از فاکتورهای رشد SCF، IL-6، EPO و IL-3 منجر به تولید سلول‌های پیش‌ساز خون‌ساز می‌شود و در مرحله بعد به‌منظور بالابردن خلوص سلول‌های پیش‌ساز اریتروئیدی، یک مرحله جداسازی (Sorting) مجدد سلول‌های پیش‌ساز اریتروئیدی بر پایه یکی از آنتی‌ژن‌های سطحی شناخته شده این سلول‌ها مانند CD36 انجام می‌شود [۲، ۴، ۶، ۱۶-۲۳]. با توجه به آن‌که تولید سلول‌های پیش‌ساز اریتروئیدی براساس روش‌های فوق مستلزم انجام دو مرحله انتخاب سلولی بر پایه روش‌های ایمونولوژیک و استفاده از آنتی‌بادی است، روش‌هایی هزینه‌بر و وابسته به تجهیزات محسوب می‌شود. در مطالعه حاضر برای رفع مشکلات ذکر شده فوق، سلول‌های پیش‌ساز اریتروئیدی از سلول‌های بنیادی خون بند ناف طی دو مرحله کشت در محیط کشت حاوی فاکتورهای رشد SCF، IL-3، IL-6 و EPO تمایز یافته و برای دستیابی به سلول‌های پیش‌ساز اریتروئیدی با خلوص بالا از روش برداشت فیزیکی کلونی‌های اریتروئیدی از محیط کشت نیمه جامد با استفاده از میکرومنیپولاتور (Micromanipulator) یا میکروپیت استفاده شد.

۲- مواد و روش‌ها

۲-۱- جداسازی سلول‌های تک هسته‌ای از

خون بند ناف

مطالعه انجام شده از نوع تجربی بود. پیش از شروع طرح، مجوز کار روی نمونه انسانی خون بند ناف توسط کمیته اخلاق پزشکی دانشکده پزشکی دانشگاه تربیت مدرس با شرط رضایت کتبی از والدین نوزاد به تصویب رسید. خون بند ناف بلافاصله پس از زایمان توسط متخصص زنان و زایمان بیمارستان مهدیه تهران، از ورید بند ناف جمع‌آوری شده و در کیسه‌های خون مخصوص خون بند ناف حاوی ضد انعقاد CPDA1

(Citrate-Pphosphate-Dextrose-Adenine) نگهداری شد. نمونه بلافاصله به آزمایشگاه انتقال داده شد و تحت جداسازی سلول‌های تک هسته‌ای قرار گرفت. بدین منظور از محلول فایکول با چگالی $1/077$ (Amersham، امریکا) استفاده شد. سلول‌های تک هسته‌ای جداسازی شده ۲ بار با استفاده از بافر PBS (Phosphate Buffered Saline) حاوی ۲ میلی‌مولار EDTA (Ethylene Diamine Tetra acetic Acid) (Gibco، امریکا) شستشو و در دور $300g$ سانتریفوژ شدند. برای حذف گلبول‌های قرمز باقیمانده در بین سلول‌های تک هسته‌ای از بافر لیز کننده گلبول‌های قرمز (Sigma، امریکا) طبق دستورالعمل شرکت سازنده استفاده شد.

۲-۲- تمایز به رده سلول‌های اریترویدی

تمایز به رده اریترویدی در دو مرحله انجام گرفت. در مرحله اول، سلول‌های تک هسته‌ای خالص جداسازی شده با غلظت 10^4 سلول در میلی‌لیتر محیط کشت IMDM (Isocove's Modified Dulbecco's Media) (Gibco) حاوی ۱۰ درصد سرم جنین گاو (Fetal Bovine Serum: FBS) (Gibco) به همراه فاکتورهای رشد IL-3 (۵ نانوگرم در میلی‌لیتر)، IL-6 (۱۰ نانوگرم در میلی‌لیتر)، SCF (۵۰ نانوگرم در میلی‌لیتر) (کلیه فاکتورهای رشد فوق محصول شرکت Peprotech، امریکا بودند)، ال-گلوتامین (۲ میلی‌مولار) و آنتی‌بیوتیک‌های پنی‌سیلین (Penicillin) (۱۰۰ واحد در میلی‌لیتر)، استرپتومایسین (Streptomycin) (۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر) (Gibco) برای مدت ۳ روز بدون تعویض محیط در دمای 37°C درجه سانتی‌گراد و دی اکسید کربن ۵ درصد انکوبه شدند. در مرحله دوم، سلول‌های غیر چسبنده حاصل از مرحله اول جمع‌آوری شده و با غلظت 5×10^3 سلول در سانتی‌متر مربع در محیط کشت نیمه جامد متیل سلولز حاوی محیط کشت IMDM غنی شده با ۱ درصد آلبومین گاوی، انسولین پانکراس گاو (۱۰ میکروگرم در هر میلی‌لیتر)، ترانسفرین انسانی، ۲-مرکاپتواتانول ($0/1$ میلی‌مولار)

(Sigma)، و فاکتورهای رشد ذکر شده فوق به‌علاوه EPO (۲ واحد در هر میلی‌لیتر) (Peprotech) برای مدت ۱۰ روز در انکوباتور با درصد رطوبت حداقل ۹۰ درصد، دمای 37°C درجه سانتی‌گراد و دی اکسید کربن ۵ درصد و بدون تعویض محیط کشت قرار گرفتند. پس از تشخیص ریخت‌شناسی کلونی‌های اریترویدی، این کلونی‌ها با کمک دستگاه میکرومنیپولاتور (Nikon، امریکا) یا توسط میکروپیت از محیط کشت نیمه جامد برداشته شده و در ۶ میلی‌لیتر بافر PBS سرد حاوی ۲ میلی‌مولار EDTA برای به‌دست آوردن سوسپانسیون تک سلولی دو بار شستشو شدند. بدین ترتیب محیط نیمه جامد متیل سلولز طی دو بار شستشو حذف می‌شود. سپس سلول‌های حاصل از تمایز برای انجام آزمایش‌های فلوسیتومتری، تجزیه و تحلیل بیان ژن و بررسی‌های سیتولوژی استفاده شدند. طی مراحل کشت، شمارش سلولی با استفاده از هموسیتومتر و بررسی درصد سلول‌های زنده با استفاده از رنگ‌آمیزی حیاتی تریپان بلو (Trypan Blue) انجام گرفت.

۲-۳- رنگ‌آمیزی بنزیدین

این شیوه رنگ‌آمیزی روی کلون‌های تشکیل شده در محیط کشت نیمه جامد متیل سلولز، به‌منظور بررسی وجود هموگلوبین در کلونی‌های اریترویدی انجام گرفت. $3/7$ میلی‌گرم پودر بنزیدین دی هیدروکلراید (Sigma، امریکا) را در یک میلی‌لیتر اسید استیک حل کرده و ۲۰ میکرولیتر پراکسید هیدروژن به یک میلی‌لیتر محلول بنزیدین افزوده و بلافاصله ۲۰۰ میکرولیتر از محلول حاصل بر روی کلونی‌ها ریخته شد. پلیت‌ها با استفاده از استریومیکروسکوپ (Stereomicroscope) از نظر وجود کلونی‌های آبی تیره بررسی و عکس‌برداری شد.

۲-۴- ارزیابی‌های سیتولوژی

سلول‌های تمایز یافته پیش‌ساز اریترویدی دو بار با بافر PBS شستشو داده شدند. از سوسپانسیون سلولی حاصل برای

مدت ۱۰ دقیقه در ۶۰۰ دور در دقیقه توسط سیتواسپین (Cytospin) گستره تهیه شد. گستره‌های تهیه شده پس از تثبیت با متانول مطلق توسط رنگ گیمسا رنگ‌آمیزی شده و با میکروسکوپ نوری مشاهده و عکس‌برداری شد.

۲-۵- فلوسیتومتری

تعداد ۱۰^۵ سلول برای مدت ۲۰ دقیقه با گاما گلوبولین انسانی (Miltenyi Biotec، آلمان) بلوکه شدند. سپس سلول‌ها در بافر PBS حاوی ۰/۱ درصد آلبومین سرم گاو (Sigma، امریکا) حاوی آنتی‌بادی‌های مونوکلونال (Monoclonal) علیه آنتی‌ژن‌های CD15، CD14، CD36، CD235a و CD15 کوئزوگه شده با فلورسنت (Phycoerythrin) PE و FITC (Fluorescein-5-isothiocyanate) (Santa Cruz و Abcam، امریکا) برای ۴۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد رنگ‌آمیزی شدند. قسمت‌های دیگری از سلول‌ها با آنتی‌بادی‌های همسان از لحاظ ایزوتایپ رنگ‌آمیزی شدند. سپس سلول‌ها در پارافرمالدهید ۱ درصد تثبیت شده و بلافاصله توسط دستگاه فلوسیتومتر BD FACSCalibur تجزیه و تحلیل شدند.

۲-۶- RT-PCR

استخراج RNA از سلول‌های تمایز یافته پیش‌ساز

اریتروئیدی توسط کیت RNeasy plus mini (Qiagen، امریکا) طبق دستورالعمل کیت انجام گرفت. بلافاصله از RNA استخراج شده، cDNA تهیه شد (Fermentas، لیتوانی). بدین منظور در تمامی گروه‌ها از ۲ میکروگرم RNA و با استفاده از آنزیم ترانسکریپتاز معکوس (Reverse Transcriptase) طبق برنامه کیت cDNA تهیه شد. به‌طور خلاصه، واکنش از ۵ دقیقه در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد آغاز شد و برای یک ساعت در دمای ۴۲ درجه سانتی‌گراد ادامه یافت. واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR) توسط دستگاه Palm-Cycler (Corbett، امریکا) انجام گرفت. برنامه PCR بدین شرح بود: واسرشتگی اولیه (Initial Denaturation) در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳ دقیقه، ۳۵ چرخه شامل واسرشتگی مشابه اولیه به مدت ۳۰ ثانیه، دمای اتصال آغازگر (Primer) مطابق جدول ۱ به مدت ۳۰ ثانیه و مرحله طویل شدن DNA در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۰ ثانیه؛ طویل شدن انتهایی در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه. از آغازگر HPRT1 به‌منظور کنترل داخلی PCR استفاده شد. محصولات PCR در ژل آگارز ۲ درصد الکتروفریز و توسط دستگاه ژل داک عکس‌برداری شد. لیست ژن‌های مورد بررسی و توالی آغازگرهای مورد استفاده به همراه طول قطعات تکثیر شده و دمای اتصال آغازگر در جدول ۱ آمده است.

جدول ۱ مشخصات و توالی آغازگرهای مورد استفاده برای انجام RT-PCR

ژن	دمای اتصال (درجه سانتی‌گراد)	طول قطعه تکثیر شده (جفت‌باز)	توالی آغازگر
GATA-1	۵۸	۱۴۸	AGA CGA CCA CCA CGA CAC CCA GAT GCC TTG CGG TTT C
EKLF	۶۱	۱۸۵	CGC CTT GCC CTC CAT CAG CCC TCT CAT CGT CCT CTT CC
آلفا گلوبین	۵۹	۴۰۷	TGA CCT CCA AAT ACC GTT AAG C CCG CCC ACT CAG ACT TTA TTC
*HPRT1	۵۷	۱۲۵	CCT GGC GTC GTG ATT AGT G TCA GTC CTG TCC ATA ATT AGT CC

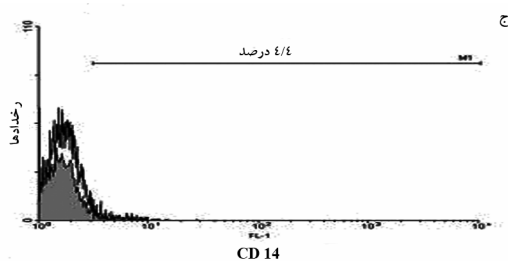
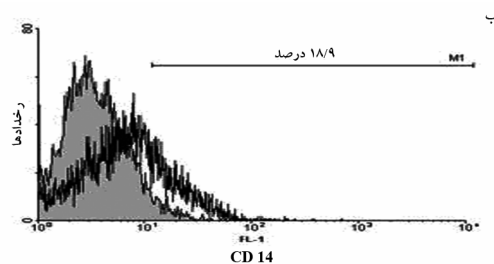
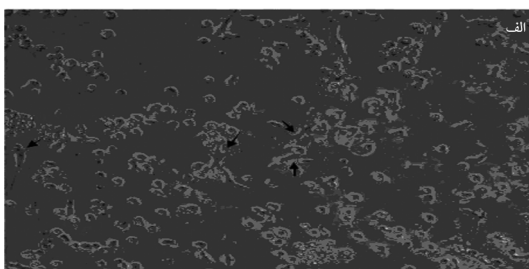
* HPRT 1: Hypoxanthine Phosphoribosyltransferase 1

۳- نتایج

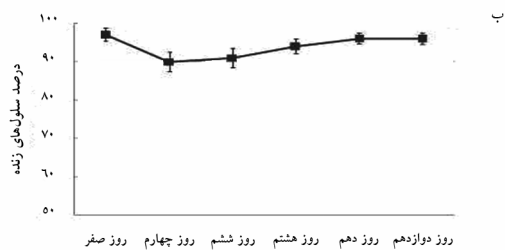
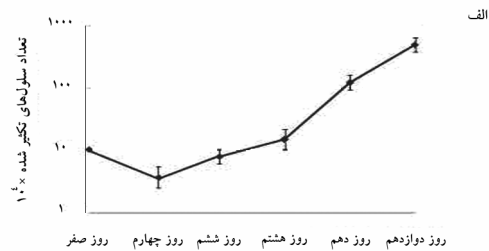
۳-۱- کشت سلول

حجم خون بند ناف جمع‌آوری شده 80 ± 15 میلی‌لیتر بود. تعداد سلول‌های تک هسته‌ای به‌دست آمده به ازای یک واحد خون بند ناف به‌طور میانگین $8/5 \times 10^4 \pm 1/1 \times 10^4$ سلول بود. تعداد 10^6 سلول تک هسته‌ای در محیط کشت IMDM حاوی فاکتورهای رشد IL-6، IL-3 و SCF به‌مدت ۳ روز به‌منظور شروع تمایز اولیه HSC ها و حذف سلول‌های مونوسیتی کشت داده شدند. همان‌طور که در شکل ۱-الف مشاهده می‌شود، سلول‌های مونوسیتی طی ۳ روز از شروع تمایز به کف فلاسک کشت می‌چسبند و پس از آن مرحله دوم کشت با سلول‌های غیرچسبنده حاصل از مرحله اول آغاز می‌شود. تعداد سلول‌ها در پایان مرحله اول کشت $7/1 \times 10^4$ سلول بود (شکل ۳). همچنان که نتایج فلوسیتومتری نشان می‌دهد، درصد سلول‌های $CD14^+$ در انتهای مرحله اول به شدت کاهش یافته و از $18/9$ درصد در روز صفر به حدود ۴ درصد رسیده است (شکل ۱-ب و ج). سلول‌های غیر چسبنده در محیط کشت نیمه جامد حاوی فاکتورهای رشد فوق به‌علاوه EPO کشت شدند. حدود یک هفته پس از کشت ثانویه کلونی‌های سلول‌های خونی به‌طور مشخص قابل مشاهده هستند (شکل ۲-الف و ب). کلونی‌های تشکیل شده اغلب (Burst- BFU-E Forming Unit)، CFU-E (Colony Forming Unit)، CFU-G (Colony Forming Unit-Granulocyte/Macrophage) هستند که در تصویر ۲-الف، منظره یک کلونی CFU-G در تصویر ۲-ب یک کلونی CFU-E مشاهده می‌شود. نتایج حاصل از رنگ‌آمیزی با بنزیدین کلونی‌های آبی تیره‌ای را نشان می‌دهند که همان کلونی‌های اریترویدی هستند (شکل ۲-ج). همچنین نتایج بیانگر تکثیر وسیع سلول‌های پیش‌ساز اریترویدی با حفظ زنده ماندن (Viability) سلول‌های تمایز یافته است. تعداد سلول‌ها طی مرحله اول کشت با کاهش مختصری نشان می‌دهد که اغلب به دلیل حذف جمعیت

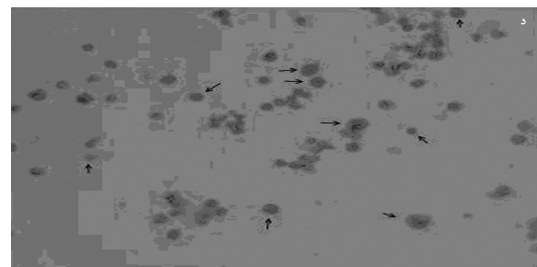
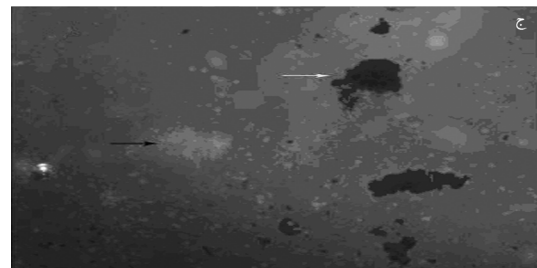
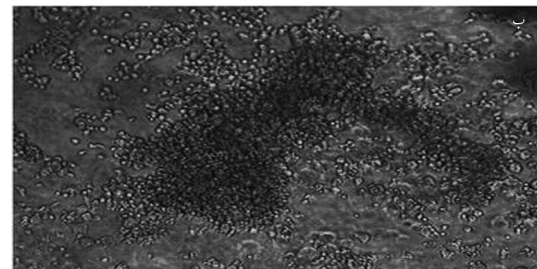
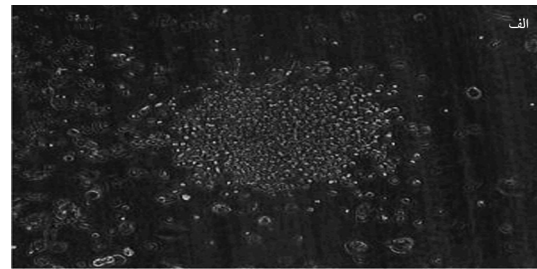
سلول‌های مونوسیتی خون بند ناف است ولی با شروع تکثیر همراه با تمایز سلول‌های اریترویدی، تعداد کل سلول‌ها در پایان روز دوازدهم حدود هشتاد برابر سلول‌های اولیه است (نمودار ۱ الف). همچنین بیش از ۹۰ درصد سلول‌ها در زمان کشت در مراحل اول و دوم طبق نتایج آزمون بررسی، سلول‌های زنده هستند که نشان از مطلوب بودن شرایط رشد سلول‌هاست (نمودار ۱ ب).



شکل ۱ سلول‌های تک هسته‌ای جداسازی شده از خون بند ناف در مرحله اول کشت (الف). فلش‌های سیاه رنگ نمایانگر سلول‌های چسبنده مونوسیتی هستند (بزرگنمایی $100\times$). تجزیه و تحلیل فلوسیتومتری برای بررسی بیان آنتی‌ژن ویژه سلول‌های مونوسیتی ($CD14$) در سلول‌های تک هسته‌ای جداسازی شده (ب) و سلول‌های غیر چسبنده حاصل از مرحله اول کشت (ج). نمودار خاکستری رنگ نشان دهنده کنترل ایزوتایپ و نمودار سفید نمونه مورد آزمایش است.



نمودار ۱ میزان تکثیر و درصد سلول‌های زنده پیش‌ساز اریتروئیدی؛ سلول‌های طی روزهای صفر (سلول‌های تک هسته‌ای جداسازی شده) تا دوازده تمایز با استفاده از هموسیتمتر شمارش شده (نمودار الف) و درصد سلول‌های زنده (نمودار ب) توسط رنگ‌آمیزی حیاتی تریپان بلو محاسبه شدند. نتایج فوق حاصل میانگین سه بار تکرار آزمایش‌ها و انحراف معیار آن‌هاست.



۳-۲- سیتولوژی سلول‌های تمایز یافته

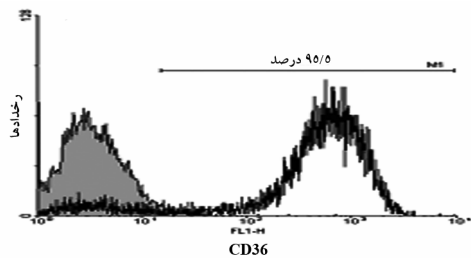
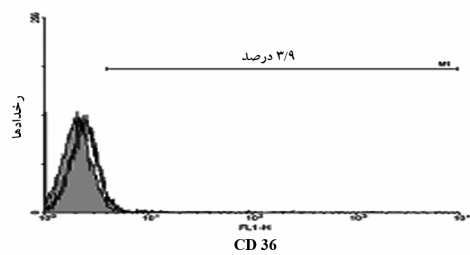
نتایج سیتولوژی کلونی‌های اریتروئیدی حاصل با ریخت‌شناسی CFU-E و BFU-E که پس از تک سلول کردن کلونی‌ها مورد رنگ‌آمیزی با رنگ گیمسا قرار گرفتند، نشان می‌دهد که سلول‌های تمایز یافته، پیش‌سازهای رده اریتروئیدی هستند. این سلول‌ها با ریخت‌شناسی واضح پرواریتروبلاست، بازوفیلیک اریتروبلاست (Polychromatic Erythrocytes)، پلی کروماتیک اریتروبلاست (Orthochromatic Erythroblast) و ارتوکروماتیک اریتروبلاست (Orthochromatic Erythroblast) قابل تشخیص هستند (شکل ۲-ت).

۳-۳- بررسی نشانگرهای سطحی سلول‌های

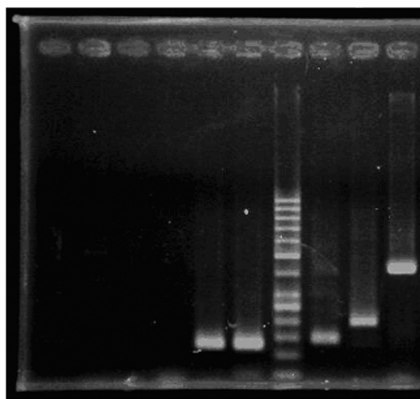
تمایز یافته

بررسی بیان آنتی‌ژن‌های سطحی سلول‌های تمایز یافته حاصل از مرحله دوم کشت، توسط آزمون فلوسیتومتری انجام

شکل ۲ تصاویر میکروسکوپی از کلونی‌های تشکیل شده در محیط کشت نیمه جامد در مرحله دوم کشت تمایزی، رنگ‌آمیزی بنزیدین و گستره سلول‌های تمایز یافته. کلونی‌های میلوئیدی (الف)؛ کلونی‌های اریتروئیدی (ب) که اغلب CFU-E و به صورت کلونی‌های حاوی یک یا دو خوشه هستند که در هر خوشه بیش از صد سلول هموگلوبین‌دار وجود دارد و به همین دلیل به رنگ قرمز دیده می‌شوند (بزرگنمایی $\times 100$). شکل ج تصویر کلونی‌های تشکیل شده در محیط نیمه جامد در مرحله دوم کشت تمایزی را نشان می‌دهد که با بنزیدین رنگ‌آمیزی شده‌اند. کلونی‌های اریتروئیدی به دلیل وجود هموگلوبین و واکنش شیمیایی آن با بنزیدین هیدروکلراید به رنگ آبی تیره مشاهده می‌شوند. کلونی‌های اریتروئیدی (فلش سفید رنگ)؛ کلونی‌های میلوئیدی (فلش سیاه) (بزرگنمایی $\times 200$). شکل د حاصل گستره سلول‌های پیش‌ساز اریتروئیدی که با رنگ گیمسا رنگ‌آمیزی شده‌اند. فلش‌های سیاه رنگ، انواع سلول‌های اریتروبلستی را در طیف پرواریتروبلاست تا ارتوکروماتیک اریتروبلاست نشان می‌دهد. (بزرگنمایی $\times 1000$)

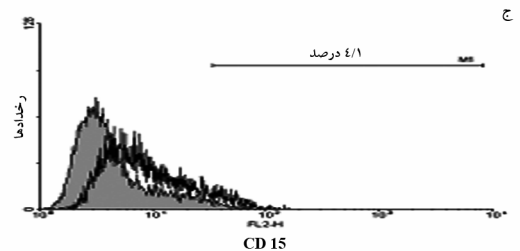
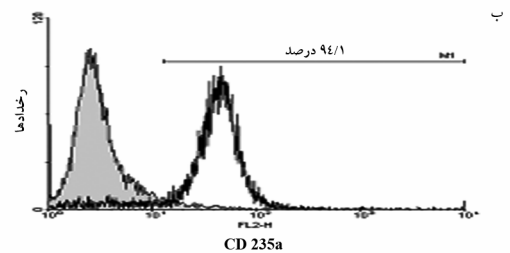
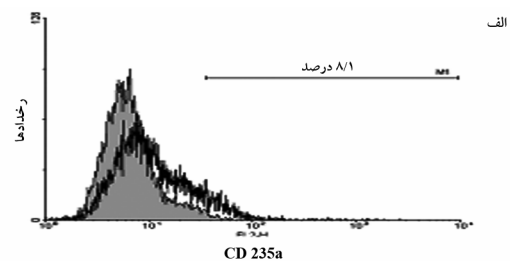


۱ ۲ ۳ ۴ ۵ ۶ ۷ ۸ ۹ ۱۰



شکل ۳ بررسی نشانگرهای سطحی و بیان ژن‌های مختص رده اریتروئیدی در سلول‌های تمایز یافته پیش‌ساز اریتروئیدی توسط فلوسیتومتری و RT-PCR؛ بیان آنتی‌ژن CD235a (Gly A) قبل (روز صفر) و بعد از تمایز (روز دوازدهم) (به‌ترتیب پانل الف و ب)؛ بیان آنتی‌ژن CD36 قبل و بعد از تمایز (به‌ترتیب پانل ج و د) و بیان نشانگر اختصاصی رده میلوئیدی CD15 بعد از تمایز (پانل ه) را نشان می‌دهد که ماهیت سلول‌های تمایز یافته سلول‌های پیش‌ساز اریتروئیدی است و با توجه به پایین بودن سلول‌های CD15⁺ سلول‌های تمایز یافته از خلوص بالایی برخوردارند. نمودار خاکستری رنگ نشان دهنده کنترل ایزوتایپ و نمودار سفید، نمونه مورد آزمایش است. بررسی بیان ژن‌های اختصاصی سلول‌های پیش‌ساز اریتروئیدی توسط روش RT-PCR (ی)، ردیف ۱ شکل مربوط به نمونه RT منفی است. ردیف ۲ تا ۵ به‌ترتیب بیان ژن‌های EKLf, GATA-1, HPRT1 و آلفا گلوبین را در نمونه‌های قبل از تمایز (روز صفر) نشان می‌دهد در حالی‌که ردیف‌های ۶ تا ۱۰ به‌ترتیب بیان ژن‌های EKLf, GATA-1, HPRT1 و آلفا گلوبین در سلول‌های تمایز یافته و ردیف شماره ۷ نشانگر اندازه ۵۰ جفت‌بازی ladder (Fermentas) است.

گرفت. نتایج نشان داد که درصد بالایی از سلول‌های تمایز یافته نشانگرهای سلول‌های پیش‌ساز اریتروئیدی CD235a (شکل ۳-الف و ب) و CD36 (شکل ۳-ج و د) را از خود نشان می‌دهند به‌طوری که ۹۴ درصد سلول‌های مورد تجزیه و تحلیل CD235a⁺ و ۹۵ درصد از نظر آنتی‌ژن CD36 مثبت بودند. این در حالی است که درصد جزئی (به‌ترتیب ۸ درصد و ۴ درصد) از سلول‌های تک هسته‌ای پیش از شروع تمایز این نشانگرها را از خود بروز داده‌اند. نتایج فلوسیتومتری نشان می‌دهد که درصد سلول‌های میلوئیدی (CD15⁺) در جمعیت سلول‌های اریتروئیدی جداسازی شده در حدود ۴ درصد است که نشانگر خلوص بالای سلول‌های متمایز جداسازی شده است (شکل ۳-ه).



۳-۴- بررسی بیان ژن

به‌منظور بررسی بیان ژن‌های اختصاصی رده اریتروئیدی، بیان ژن‌های GATA-1 و EKLK به‌عنوان دو فاکتور رونویسی ویژه سلول‌های پیش‌ساز اریتروئیدی و آلفا گلوبین توسط روش RT-PCR ارزیابی شد. نتایج حاصل از RT-PCR نشان داد که بیان ژن‌های مذکور در سلول‌های تمایز یافته اریتروئیدی وجود دارد در حالی که در سلول‌های تک هسته‌ای اولیه وجود ندارد (شکل ۳-ج). همان‌طور که ملاحظه می‌شود نتایج حاصل از بررسی بیان ژن نیز نتایج حاصل از فلوسیتومتری را تأیید می‌کند. فرایند جداسازی سلول‌های تک هسته‌ای و تمایز به سلول‌های پیش‌ساز اریتروئیدی روی سه نمونه خون بند ناف انجام شد. آزمون‌های فلوسیتومتری و بررسی بیان ژن هر کدام سه بار روی نمونه‌های زیستی تکرار داشته‌اند.

۴- بحث

برای انجام فرایند اریتروپوئز در محیط آزمایشگاهی رویکردهای متفاوتی در نظر گرفته شده است که از جمله آن‌ها می‌توان به استفاده از سلول‌های بنیادی پرتوان از منابع مختلفی شامل مغز استخوان، خون بند ناف و خون محیطی جریان یافته با G-CSF اشاره کرد [۲-۶، ۱۷، ۲۴]. در این مطالعه از سلول‌های تک هسته‌ای خون بند ناف بدون جداسازی اولیه HSC های $CD34^+$ به‌عنوان منبع سلولی استفاده شد. جمعیت سلول‌های تک هسته‌ای خون بند ناف حاوی ۲-۵ درصد سلول‌های بنیادی خون‌ساز است [۲۵-۲۷]. در این مطالعه یک روند القای دو مرحله‌ای انجام گرفت. در مرحله اول با افزودن فاکتورهای القا کننده تکثیر و همچنین تمایز اولیه شامل SCF، IL-3 و IL-6، سلول‌های بنیادی خون‌ساز موجود در سلول‌های تک هسته‌ای، تمایز ابتدایی خود را شروع نموده و در همین مرحله سلول‌های مونوسیتی به دلیل توانایی چسبندگی به سطح فلاسک اتصال می‌یابند [۲۵]؛ بنابراین در مرحله دوم کشت که از انتهای روز سوم آغاز می‌شود به علت

این‌که از سلول‌های غیر چسبنده استفاده می‌شود، خودبه‌خود سلول‌های مونوسیتی که جمعیتی بالغ بر ۱۸ درصد از مجموع سلول‌های تک هسته‌ای خون بند ناف را داشته‌اند حذف می‌شوند. بنابراین مرحله اول کشت به‌منظور شروع القای تکثیر و تمایز HSC ها و حذف مونوسیت‌ها است. در مرحله دوم کشت که در محیط کشت نیمه جامد و در حضور فاکتور القا کننده رده اریتروئیدی یعنی EPO انجام می‌شود؛ سلول‌های بنیادی به تکثیر و تمایز اریتروئیدی خود ادامه داده و به دلیل ماهیت نیمه جامد بودن محیط کشت، تولید کلونی می‌نمایند. در این شرایط، عمده کلونی‌های تشکیل شده، کلونی سلول‌های اریتروئیدی هستند؛ هر چند کلونی‌های میلوئیدی نیز به دلیل وجود فاکتور رشد IL-3 که برای تکثیر هر دو رده اریتروئیدی- میلوئیدی لازم است، ایجاد می‌شوند. به دلیل ماهیت نیمه جامد محیط کشت متیل سلولز که در مطالعات قبل مناسب بودن کاربرد آن به‌منظور تولید کلونی‌های سلول‌های خونی به اثبات رسیده است، به راحتی می‌توان یک نحوه انتخاب در برداشت کلونی‌های مورد نظر اعمال کرد. برای جداسازی کلونی‌های حاوی سلول‌های پیش‌ساز اریتروئیدی که از حدود روز هفتم کشت مرحله دوم ظاهر می‌شوند، از روش برداشت فیزیکی استفاده شد. نتایج فلوسیتومتری آنتی‌ژن CD15 که در سطح سلول‌های میلوئیدی وجود دارد، نشان داد که سلول‌های برداشت شده از محیط نیمه جامد، اغلب CD15 منفی هستند و بنابراین جداسازی فیزیکی کلونی‌های اریتروئیدی با میکرومنیپولاتور یا به‌صورت دستی به‌وسیله میکروپیپت، می‌تواند سلول‌های پیش‌ساز اریتروئیدی با خلوص بسیار بالا را فراهم آورد.

در اغلب مطالعات پیشین سلول‌های بنیادی خون‌ساز $CD34^+$ حاصل از مغز استخوان، خون بند ناف یا خون محیطی جریان یافته استفاده شده است [۱، ۱۹، ۲۲، ۲۳]. روش معمول برای جداسازی سلول‌های $CD34^+$ بر پایه استفاده از آنتی‌بادی علیه این آنتی‌ژن است که با یکی از روش‌های FACS (Flourescent Activated Cell Sorting) یا MACS

(Magnetic Activated Cell Sorting) انجام می‌گیرد. همچنین جداسازی نهایی سلول‌های پیش‌ساز اریترویدی از میان انبوه سلول‌های تمایز یافته در محیط کشت مایع، توسط آنتی‌بادی علیه یکی از آنتی‌ژن‌های CD36 یا CD71 انجام می‌شود. استفاده از این روش جداسازی، پرهزینه و نیازمند تجهیزات خاص است که ممکن است بسیاری از آزمایشگاه‌ها از آن بی‌بهره باشند. همچنین نقیصه ذاتی این روش‌های جداسازی آنست که هیچ گاه بازده صد در صد ندارند و گاهی اوقات خلوص نمونه تا حد ۷۰ درصد پایین می‌آید. مشکل دیگر به‌کارگیری این شیوه آنست که در برخی از مطالعات از CD36 به‌عنوان نشانگر مناسب برای جداسازی سلول‌های پیش‌ساز اریترویدی استفاده شده است، در حالی که CD36 در سطح سایر سلول‌های خونی از جمله تمامی پیش‌سازهای رده میلویدی ظاهر می‌شود [۲۶-۲۹]. وونگ (Wong) و همکاران با استفاده از سلول‌های CD34⁺ به‌دست آمده از خون محیطی جریان یافته با G-CSF، برنامه تمایزی را برای تولید سلول‌های پیش‌ساز اریترویدی در محیط مایع استفاده کردند که در آن در پایان روز دهم کشت، ۹۷/۶ درصد سلول‌ها CD36⁺ هستند؛ ولی ثابت نموده‌اند که این سلول‌های CD36⁺ ماهیت سلول‌های پیش‌ساز اریترویدی دارند نه میلویدی [۲۳]. یکی از مزیت‌های مطالعه حاضر آنست که برای جداسازی سلول‌های پیش‌ساز اریترویدی، به‌جای در نظر گرفتن نشانگرهای سطحی از فنوتیپ این سلول‌ها مانند وجود هموگلوبین و ریخت‌شناسی ویژه کلونی‌های اریترویدی استفاده می‌نماید. صحت انتخاب کلونی‌های اریترویدی با توجه به ریخت‌شناسی متفاوت آن‌ها از کلونی‌های میلویدی و نیز توسط رنگ‌آمیزی بنزیدین به اثبات رسید. به همین دلیل است که سلول‌های پیش‌ساز اریترویدی حاصل از این روش در تجزیه و تحلیل سیتولوژی، ریخت‌شناسی واضح اریتروبلاستی و منظره‌ای همگن از سلول‌های اریترویدی را از خود نشان داده است و سلول‌های میلویدی در گستره‌های تهیه شده مشاهده نمی‌شود، همچنان که نتایج فلوسیتومتری برای آنتی‌ژن CD15 آن را تأیید می‌کند. از دیگر نتایج این مطالعه که

قابل تطبیق با مقالات قبل است، درصد بالای سلول‌های تمایز یافته اریترویدی است که با نشانگرهای CD36 و CD235a مشخص می‌شوند [۱۳، ۲۲، ۲۳، ۳۰]. بالا بودن درصد سلول‌های مثبت از لحاظ این دو نشانگر در کنار سایر نتایج نشان می‌دهد که حداقل بیش از ۹۵ درصد سلول‌های تمایز یافته و جداسازی شده با این شیوه، پیش‌سازهای رده اریتروید هستند. تأیید نتایج فوق، وجود بیان ژن‌های فاکتورهای رونویسی ویژه رده اریترویدی نظیر GATA-1 [۳۱، ۳۲] و EKLf (Erythroid Kruppel-like Factor) [۳۳، ۳۴] و نیز بیان زنجیره آلفا گلوبین است. یکی دیگر از نکات قابل توجه در این تحقیق بالا بودن درصد سلول‌های زنده در دوره کشت است که نشانگر مناسب بودن شرایط و محیط کشت مورد نیاز سلول‌ها برای تکثیر و تمایز آن‌هاست. همان‌طور که در بخش نتایج مشاهده شد، بازده تکثیر سلول‌های پیش‌ساز اریترویدی با در نظر گرفتن نتایج حاصل از فلوسیتومتری سلول‌ها قبل و بعد از تمایز، معادل ۱۵۰ برابر افزایش تعداد سلول‌های پیش‌ساز اریترویدی CD36⁺ است که قابل مقایسه با نتیجه به‌دست آمده از سایر مقالات مشابه است [۱۳، ۲۲، ۲۳، ۳۰]. هرچند این مطالعه تمایز سلول‌های بنیادی خون بند ناف انسان به سلول‌های پیش‌ساز اریترویدی را اثبات نمود ولی امکان تعمیم نتایج آن به مغز استخوان وجود ندارد، چرا که سلول‌های بنیادی مغز استخوان فرد بالغ در تمایز به سلول‌های اریترویدی الگوی متفاوتی از مراحل تمایز را پشت سر می‌گذارد. بنابراین پیشنهاد می‌شود که مطالعات دیگری روی این موضوع با استفاده از سلول‌های بنیادی مغز استخوان فرد بالغ صورت گیرد که می‌تواند گام مناسبی برای کاربردی کردن استفاده از سلول‌های بنیادی مغز استخوان در درمان بیماری‌های خونی به‌شمار آید.

۵- تشکر و قدردانی

این تحقیق مستخرج از رساله دکتری رشته هماتولوژی دانشکده علوم پزشکی دانشگاه تربیت مدرس است. درضمن

بدین‌وسیله نویسندگان مقاله از حمایت‌های مالی مرکز

تحقیقات فناوری بن‌یاخته تشکر و قدردانی می‌نمایند.

۶- منابع

- [1] Freyssinier JM, Lecoq-Lafon C, Amsellem S, Picard F, Ducrocq R, Mayeux P, Lacombe C, Fichelson S. Purification, amplification and characterization of a population of human erythroid progenitors. *Br J Haematol* 1999; 106(4): 912-22.
- [2] Tsiftoglou AS, Vizirianakis IS, Strouboulis J. Erythropoiesis: model systems, molecular regulators, and developmental programs. *IUBMB Life* 2009; 61(8): 800-30.
- [3] de Wolf JT, Muller EW, Hendriks DH, Halie RM, Vellenga E. Mast cell growth factor modulates CD36 antigen expression on erythroid progenitors from human bone marrow and peripheral blood associated with ongoing differentiation. *Blood* 1994; 84(1): 59-64.
- [4] Lodish H, Flygare J, Chou S. From stem cell to erythroblast: regulation of red cell production at multiple levels by multiple hormones. *IUBMB Life* 2010; 62(7): 492-6.
- [5] Sarma NJ, Takeda A, Yaseen NR. Colony forming cell (CFC) assay for human hematopoietic cells. *J Vis Exp* 2010; (46).
- [6] Miller JL, Njoroge JM, Gubin AN, Rodgers GP. Prospective identification of erythroid elements in cultured peripheral blood. *Exp Hematol* 1999; 27(4): 624-9.
- [7] Wang W, Horner DN, Chen WL, Zandstra PW, Audet J. Synergy between erythropoietin and stem cell factor during erythropoiesis can be quantitatively described without co-signaling effects. *Biotechnol Bioeng*. 2008; 99(5): 1261-72.
- [8] Papayannopoulou T, Brice M, Blau CA. Kit ligand in synergy with interleukin-3 amplifies the erythropoietin-independent, globin-synthesizing progeny of normal human burst-forming units-erythroid in suspension cultures: physiologic implications. *Blood* 1993; 81(2): 299-310.
- [9] Wang J, Tang ZY, Ka W, Sun D, Yao W, Wen Z, Chien S. Synergistic effect of cytokines EPO, IL-3 and SCF on the proliferation, differentiation and apoptosis of erythroid progenitor cells. *Clin Hemorheol Microcirc* 2007; 37(4): 291-9.
- [10] Yu Z, Liu W, Liu D, Fan L. The regulatory role of Hyper-IL-6 in the differentiation of myeloid and erythroid progenitors derived from human cord blood. *Cell Immunol* 2006; 241(1): 32-7.
- [11] Brugger W, Möcklin W, Heimfeld S, Berenson RJ, Mertelsmann R, Kanz L. Ex vivo expansion of enriched peripheral blood CD34+ progenitor cells by stem cell factor, interleukin-1 beta (IL-1 beta), IL-6, IL-3, interferon-gamma, and erythropoietin. *Blood* 1993; 81(10): 2579-84.
- [12] Scicchitano MS, McFarland DC, Tierney LA, Narayanan PK, Schwartz LW. In vitro expansion of human cord blood CD36+ erythroid progenitors: temporal changes in gene and protein expression. *Exp Hematol* 2003; 31(9): 760-9.
- [13] Sakatoku H, Inoue S. In vitro proliferation and

- differentiation of erythroid progenitors of cord blood. *Stem Cells* 1997; 15(4): 268-74.
- [14] Mirabelli P, Di Noto R, Lo Pardo C, Morabito P, Abate G, Gorrese M, Raia M, Pascariello C, Scalia G, Gemei M, Mariotti E, Del Vecchio L. Extended flow cytometry characterization of normal bone marrow progenitor cells by simultaneous detection of aldehyde dehydrogenase and early hematopoietic antigens: implication for erythroid differentiation studies. *BMC Physiol* 2008; 8: 13.
- [15] Palis J. Ontogeny of erythropoiesis. *Curr Opin Hematol* 2008; 15(3): 155-61.
- [16] Sato N, Sawada K, Koizumi K, Tarumi T, Ieko M, Yasukouchi T, Yamaguchi M, Takahashi TA, Sekiguchi S, Koike T. In vitro expansion of human peripheral blood CD34+ cells. *Blood* 1993; 82(12): 3600-9.
- [17] Migliaccio G, Di Pietro R, di Giacomo V, Di Baldassarre A, Migliaccio AR, Maccioni L, Galanello R, Papayannopoulou T. In vitro mass production of human erythroid cells from the blood of normal donors and of thalassemic patients. *Blood Cells Mol Dis* 2002; 28(2): 169-80.
- [18] Liu XL, Yuan JY, Zhang JW, Zhang XH, Wang RX. Differential gene expression in human hematopoietic stem cells specified toward erythroid, megakaryocytic, and granulocytic lineage. *J Leukoc Biol* 2007; 82(4): 986-1002.
- [19] Giarratana MC, Kobari L, Lapillonne H, Chalmers D, Kiger L, Cynober T, Marden MC, Wajcman H, Douay L. Ex vivo generation of fully mature human red blood cells from hematopoietic stem cells. *Nat Biotechnol* 2005; 23(1): 69-74.
- [20] Bony V, Gane P, Bailly P, Cartron JP. Time-course expression of polypeptides carrying blood group antigens during human erythroid differentiation. *Br J Haematol* 1999; 107(2): 263-74.
- [21] Douay L, Giarratana MC. Ex vivo generation of human red blood cells: a new advance in stem cell engineering. *Methods Mol Biol* 2009; 482: 127-40.
- [22] Filippone C, Franssila R, Kumar A, Saikko L, Kovanen PE, Söderlund-Venermo M, Hedman K. Erythroid progenitor cells expanded from peripheral blood without mobilization or preselection: molecular characteristics and functional competence. *PLoS One* 2010; 5(3): e9496.
- [23] Wong S, Zhi N, Filippone C, Keyvanfar K, Kajigaya S, Brown KE, Young NS. Ex vivo-generated CD36+ erythroid progenitors are highly permissive to human parvovirus B19 replication. *J Virol* 2008; 82(5): 2470-6.
- [24] Guo M, Miller WM, Papoutsakis ET, Patel S, James C, Goolsby C, Winter JN. Ex-vivo expansion of CFU-GM and BFU-E in unselected PBMC cultures with Flt3L is enhanced by autologous plasma. *Cytotherapy* 1999; 1(3): 183-94.
- [25] de Almeida MC, Silva AC, Barral A, Barral Netto M. A simple method for human peripheral blood monocyte isolation. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2000; 95(2): 221-3.
- [26] Alessio M, Greco NJ, Primo L, Ghigo D, Bosia A, Tandon NN, Ockenhouse CF, Jamieson GA,

- Malavasi F. Platelet activation and inhibition of malarial cytoadherence by the anti-CD36 IgM monoclonal antibody NL07. *Blood* 1993; 82(12): 3637-47.
- [27] Haylock DN, Nilsson SK. Expansion of umbilical cord blood for clinical transplantation. *Curr Stem Cell Res Ther* 2007; 2(4): 324-35.
- [28] Corcoran L, Vremec D, Febbraio M, Baldwin T, Handman E. Differential regulation of CD36 expression in antigen-presenting cells: Oct-2 dependence in B lymphocytes but not dendritic cells or macrophages. *Int Immunol* 2002; 14(10): 1099-104.
- [29] Yesner LM, Huh HY, Pearce SF, Silverstein RL. Regulation of monocyte CD36 and thrombospondin-1 expression by soluble mediators. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1996; 16(8): 1019-25.
- [30] van den Akker E, Satchwell TJ, Pellegrin S, Daniels G, Toye AM. The majority of the in vitro erythroid expansion potential resides in CD34 (-) cells, outweighing the contribution of CD34(+) cells and significantly increasing the erythroblast yield from peripheral blood samples. *Haematologica* 2010; 95(9): 1594-8.
- [31] Ferreira R, Ohneda K, Yamamoto M, Philipsen S. GATA1 function, a paradigm for transcription factors in hematopoiesis. *Mol Cell Biol* 2005; 25(4): 1215-27.
- [32] Cao A, Moi P. Regulation of the globin genes. *Pediatr Res* 2002; 51(4): 415-21.
- [33] Pilon AM, Arcasoy MO, Dressman HK, Vayda SE, Maksimova YD, Sangerman JI, Gallagher PG, Bodine DM. Failure of terminal erythroid differentiation in EKLF-deficient mice is associated with cell cycle perturbation and reduced expression of E2F2. *Mol Cell Biol* 2008; 28(24): 7394-401.
- [34] Cantor AB, Orkin SH. Transcriptional regulation of erythropoiesis: an affair involving multiple partners. *Oncogene* 2002; 21(21): 3368-76.