قابلیت تمایز سلول‌های بنیادی جنین انسان (Royan H5) به سلول‌های همانژیوبلاست در شرایط آزمایشگاهی

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۸۹/۱۲/۰۸ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۰/۱۲/۱۵

فاطمه گنجی[۱و۲]
سعید آبرون[۳*]
حسین بهاروند[۱و۲]
مرضیه ابراهیمی[۱]
ناصر اقدمی[۴]

۱- گروه سلول‌های بنیادی، مرکز تحقیقات، پژوهشگاه رویان، تهران، ایران.
۲- دانشگاه علم و فرهنگ جهاد دانشگاهی، تهران، ایران.
۳- گروه خون‌شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران.
۴- مرکز سلول درمانی، پژوهشگاه رویان، تهران، ایران.

[*] نویسنده مسئول: تهران، خیابان جلال آل احمد، دانشگاه تربیت مدرس، صندوق پستی ۳۳۱-۱۴۱۱۵
تلفن: ۰۲۱-۲۷۶۳۵۰۰۰
E-mail: abroun@modares.ac.ir

چکیده

زمینه و هدف: قابلیت تمایز سلول‌های بنیادی جنین انسان به‌عنوان سلول‌های پرتوان، به انواع سلول‌های مختلف از جمله سلول‌های عصبی، قلبی و کبدی بررسی شده است. در این مطالعه با توجه به توانمندی سلول‌های بنیادی جنین انسان (Royan H5) که در پژوهشگاه رویان به‌صورت رده سلولی تهیه شده، بررسی قابلیت تمایز این سلول‌ها به سلول‌های خونی مورد توجه قرار گرفت. هدف مطالعه بررسی توانمندی سلول‌های بنیادی جنین انسان (Royan H5) در تمایز به سلول‌های همانژیوبلاست بود. ***روش بررسی:*** سلول‌های بنیادی جنین انسان به‌صورت سوسپانسیون در محیط کامل DMEM/F12 و در حضور (۱۰۰ngmL) bFGF کشت و تکثیر شدند و در روز هشت در حضور ترکیبات القاکننده به سلول‌های بلاست تمایز داده شدند. شاخص‌های سلول‌های بلاست KDR، CD31 و CD34 توسط فلوسیتومتری و بیان ژن‌های TAL-1، Runx-1 و CD34 توسط Quantitative Real Time-PCR نشان داده شد و توان کلونی‌زایی بلاست‌ها (Colony forming unit-assay) در محیط حاوی متیل سلولز ارزیابی شد. ***یافته‌ها:*** سلول‌های بنیادی جنین انسان در طی تمایز به پیش‌سازهای خونی، جمعیتی از سلول‌های (KDR^+ (۷۹±٪۱۲/۵)، ($CD31^+$-$CD34^+$ (۵/۶±٪۲/۸) و (KDR^+-$CD31^+$ (۶±٪۲/۱۲) را به‌وجود می‌آورند. افزایش معنی‌دار بیان ژن‌های TAL-1, RUNX-1, CD34 ($P\leq$۰/۰۱، $P\leq$۰/۰۵) در کلونی‌های چهارده روزه شاهدی بر تشکیل سلول‌های بلاست بود. هم‌چنین کلونی‌های شش روزه تولیدشده بر سطح ماتریژل و با ویژگی‌های شبه همانژیوبلاست در محیط حاوی متیل سلولز شبه کلونی‌های مختلط خونی و سلول‌های شبه اندوتلیال را ایجاد کردند. ***نتیجه‌گیری:*** سلول‌های بنیادی جنینی Royan H5 قادر به تولید سلول‌های پیش‌ساز خونی با توانمندی دوگانه در شرایط آزمایشگاهی می‌باشند که می‌توانند کلونی‌های شبیه به کلونی‌های مختلط خونی و سلول‌های شبه اندوتلیال را تولید کنند.

کلمات کلیدی: سلول‌های بنیادی جنینی انسانی، تمایز، کلونی همانژیوبلاست.

مقدمه

امروزه روش‌های متعددی برای درمان انواع کم‌خونی به‌کار می‌رود که شامل پیوند سلول‌های بنیادی خون‌ساز در مغز استخوان و یا تزریق یک یا چند واحد خون سازگار با سیستم ایمنی فرد بیمار می‌باشد. اما این روش در شرایطی که واحد خونی سازگار با فرد گیرنده وجود نداشته باشد، کارساز نخواهد بود و در برخی شرایط اهداکننده کافی وجود نخواهد داشت،[۱] از سوی دیگر با گسترش عفونت‌های ویروسی از جمله هپاتیت B و هپاتیت C و ویروس نقص سیستم ایمنی از فرد دهنده خون، انتظار می‌رود که در آینده دسترسی به خون سالم و قابل پیوند با دشواری همراه باشد.[۲] به این ترتیب تلاش‌های گسترده‌ای در راستای تولید سلول‌های خونی برای درمان انواع بیماری‌های خونی صورت گرفت. برای این منظور تولید سلول‌های خونی از سلول‌های بنیادی جنین انسان یا سلول‌های CD34 حاصل از مغز استخوان، خون محیطی و یا خون بند ناف بررسی شد.[۳و۴] سلول‌های بنیادی جنین انسان به‌دلیل سهولت دسترسی و

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2026-06-29]

تکثیر فراوان از اهمیت ویژه‌ای برای مطالعه و تمایز انواع مختلفی از سلول‌ها در شرایط آزمایشگاهی برخوردارند. مطالعات نشان دادند که سلول‌های بنیادی جنین انسان human Embryonic Stem Cells (hESCs) قادر می‌باشند به سلول‌های همانژیوبلاست و سلول‌های خون‌ساز ابتدایی تمایز یابند.[۵و۶] هم‌چنین توانایی تولید سلول‌های اریتروییدی و اندوتلیالی را دارا هستند.[۷و۸] خون‌سازی در جنین موش و سلول‌های بنیادی جنین موش با تشکیل جزایر خونی در کیسه زرده آغاز می‌شود که مجموعه‌ای از سلول‌های اریتروبلاست ابتدایی می‌باشد که به‌وسیله سلول‌های اندوتلیال احاطه می‌شوند.[۹] با توجه به نزدیکی تکوین سلول‌های خونی و سلول‌های اندوتلیال در جزایر خونی، به‌نظر می‌رسد که سلول‌های خونی و اندوتلیال از پیش‌ساز مشترکی مشتق شوند که امروزه به آن همانژیوبلاست گویند.[۱۰] این سلول‌ها بیان رسپتور تیروزین کیناز فاکتور رشد عروق- اندوتلیال KDR (VEGF-R2, FLK-1) و ژن‌های شاخص مزودرمی (Brachyury) را نشان دادند که بیان‌کننده حضور جمعیتی با ویژگی‌های مزودرمی است.[۱۱]

اولین‌بار Choi توانست سلول‌های بنیادی جنینی موش را به سلول‌های همانژیوبلاست تمایز دهد و در حضور سایتوکین‌هایی از جمله VEGF، رده‌های خونی و اندوتلیالی را از سلول‌های همانژیوبلاست به‌دست آورد.[۱۲] اخیراً با استفاده از شرایط کشت فاقد سرم و در حضور فاکتورهای القاکننده خون‌سازی شامل BMP4، VEGF و bFGF کلونی‌های نیمه‌چسبنده مزودرمی خونی- اندوتلیایی از اجسام شبه‌جنینی هفت تا ۱۰ روزه جدا کردند که توانایی تولید رده‌های خونی و اندوتلیایی را دارا بود.[۱۳و۱۴] Wang پیش‌سازهای مزودرمی را از اجسام شبه‌جنینی ۱۰ روزه جدا کرد که شاخص‌های PECAM-1، FLK-1 و VE-Cadherin را بیان می‌نمود، هر چند شاخص CD45 را بیان نمی‌کرد.[۱۵و۱۶] به این ترتیب به‌نظر می‌رسد با استفاده از سلول‌های بنیادی جنین انسان، دسترسی به تعداد فراوان سلول‌های خونی در زمانی کوتاه امکان‌پذیر گردد. هم‌چنین گسترش سلول‌های پرتوان القایی (Induced pluripotent stem cells) در کشور که خواصی مشابه سلول‌های بنیادی جنینی دارند، دسترسی به تکنولوژی تمایز سلول‌های بنیادی جنینی را به سلول‌های خونی فعال در کشور را ضروری می‌سازد. در این مطالعه بر آن شدیم توانایی تمایز سلول-های بنیـادی جنینی انسان Royan H5 به سلول‌های همانژیوبلاست را در شرایط آزمایشگاهی مورد بررسی قرار دهیم.

روش بررسی

مطالعه تجربی حاضر در پژوهشگاه رویان در سال ۱۳۸۸ آغاز شد. کشت سوسپانسیون سلول‌های بنیادی جنین انسان Royan H5: مطالعه با استفاده از سلول‌های بنیادی جنین انسان Royan H5 که در پژوهشگاه رویان به‌صورت رده سلولی تهیه شده است، آغاز گردید. این سلول‌ها بر روی ماتریژل و با استفاده از محیط کشت DMEM/F12 حاوی، ۲۰٪ KO-SR (knock out serum replacement)، (۲٪) L-glutamine، ۱۰۰µg/ml استرپتومایسین، ۱۰۰U/ml پنی‌سیلین و ۱۰۰ng/mL، فاکتور رشد فیبروبلاست (bFGF/ Royan institute) کشت و تکثیر داده شدند.[۱۷] در این شرایط سلول‌های بنیادی جنینی کلونی‌های چسبنده‌ای تشکیل می‌دهند. برای کشت سوسپانسیون سلول‌های Royan H5، ابتدا کلونی‌های Royan H5 با ۱۰µg/ml از Rock inhibitor به‌منظور کاهش مرگ برنامه‌ریزی‌شده سلول (آپوپتوزیس) و به‌مدت حداقل دو ساعت تیمار شدند و پس از شستشو با بافر فسفات نمکی، به‌مدت سه دقیقه در معرض تریپسین (Trypsin/ EDTA) قرار داده شدند. سلول‌ها توسط محلول تریپان‌بلو شمارش شدند و به تعداد ۱۵×۱۰^{۴} سلول در هر میلی‌لیتر به ظرف کشت غیر چسبنده شش خانه (Low-attachment 6-well, costar) و در محیط کامل، DMEM/F12 ۲۰٪ سرم (Knock out serum replacement, Gibco) و bFGF (۱۰۰ng/mL) به‌مدت هفت روز کشت و تکثیر شدند.[۱۸]

تمایز سلول‌های Royan H5 به سلول‌های همانژیوبلاست: مراحل تمایز به‌صورت شماتیک در شکل ۱ نشان داده شده است. پس از هفت روز کشت در ظرف کشت شش خانه‌ای غیر چسبنده، سلول‌های Royan H5 کلونی‌های شناوری را تشکیل دادند که به‌عنوان اجسام شبه‌جنینی در نظر گرفته می‌شوند.

به‌منظور انجام تمایز، اجسام شبه‌جنینی مدت ۲۴ ساعت در معرض محیط Stem pro-34 (Gibco Co., Germany)، ۲٪ L-Gutamine (Gibco Co., Germany)، استرپتومایسین ۱۰۰µg/ml، پنی‌سیلین ۱۰۰U/ml و ۱۰ng/ml پروتیین ریخت‌زایی استخوان (BMP4) قرار گرفتند. سپس فاکتور رشد فیبروبلاستی (bFGF/Royan) با غلظت

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2026-06-29]

۵ng/ml به محیط اضافه شد و کشت تا ۹۶ ساعت ادامه یافت. در انتها به محیط فاکتور رشد اندوتلیالی- عروقی (VEGF) با غلظت ۱۰ng/ml اضافه و کشت سه روز دیگر ادامه یافت.

در مرحله دوم تمایز، محیط تمایزی اجسام شبه‌جنینی به محیط تمایزی جدید IMDM، متیل سلولز ۱٪، اسید اسکوربیک ۲mM، ۴×۱۰^{-۴} مونوتیوگلیسرول، ۱۵۰µg/ml Transferrin، ۱۰۰ng/ml فاکتور سلول‌های بنیادی (hSCF)، ۱۰ng.ml فاکتور رشد اندوتلیال- عروقی (VEGF)، ۲۰ng/ml اینترلوکین-۶، ۲U/ml اریتروپویتین، ۲۵/ml فاکتور رشد شبه انسولینی-۱ (hIGF-1)، ۴۰ng/ml hIL-3 اینترلوکین-۳، ۱۰٪ سرم جنینی گاو تغییر و کشت به‌مدت شش روز دیگر ادامه یافت. کلونی‌های سوسپانس ۱۴ روزه به ظرف محیط کشت ۹۶ خانه که با ماتریژل پوشیده شدند، منتقل و در معرض محیط IMDM، مونوتیو- گلیسرول ۴×۱۰^{-۴}، ۱۵۰µg/ml Transferrin، ۱۰۰ng/ml hSCF، ۱۰ng.ml hVEGF، ۲۰ng/ml hIL-6، ۲U/ml hEPO، ۲۵ng/ml hIGF-1، ۱۵ng/ml bFGF و ۲۰٪ FBS به‌مدت شش روز قرار گرفتند که در روز ششم کلونی‌های بلاست خوشه انگوری تولید شدند. از میکروسکوپ نوری معکوس (Olympus Co., Japan) در طول مدت کشت و تمایز به‌منظور بررسی تغییرات مورفولوژی سلول‌های در حال تمایز استفاده گردید. سایتوکین‌ها از شرکت (R&D Co., USA) تهیه شد.

بررسی بیان شاخص CD31 توسط ایمونوسیتوشیمی: سلول‌های اندوتلیالی تولیدشده در محیط نیمه‌جامد متیل سلولز به‌منظور بررسی بیان شاخص CD31 یا (Platelet/endothelial cell adhesion molecule) توسط فرمالدیید ۴٪ به‌مدت ۱۵ دقیقه در دمای اتاق تثبیت شدند. پس از دو بار شستشو توسط PBS با سرم ۱۰ درصد موش به‌منظور کاهش اتصالات غیر اختصاصی تیمار شدند و آنتی‌بادی اولیه CD31 (BD pharmigen, USA) به‌نسبت یک به ۳۰۰ به آن‌ها اضافه شد و به‌مدت یک ساعت در دمای اتاق انکوبه شدند. پس از دو بار شستشو توسط PBS، سلول‌ها در معرض آنتی‌بادی ثانویه کونژوگه به فلوئورسیین ایزوتیوسیانات (FITC) Fluorescein Isothiocyanate به‌نسبت یک به ۲۵۰ به‌مدت ۴۵ دقیقه و در دمای اتاق قرار گرفتند. در انتها شستشو انجام گرفت و نتایج توسط میکروسکوپ فلورسنت (Olympus Co., Japan) بررسی گردید. هسته به‌وسیله DAPI رنگ‌آمیزی شد.

ارزیابی میزان بیان شاخص‌های تمایزیافتگی در روزهای صفر، هشت، ۱۴ با استفاده از روش فلوسیتومتری: در هر مرحله از تمایز سلول‌ها توسط تریپسین ۰/۰۵٪ منفرد شدند. برای تهیه سوسپانسیون سلولی از اجسام شبه‌جنینی ابتدا از Rock inhibitor استفاده گردید و بعد تریپسین به محیط اضافه شد. پس از تهیه سوسپانسیون سلولی، تعداد $۱۰^{۴}$ سلول به لوله‌های مخصوص فلوسیتومتری منتقل شد و با آنتی‌بادی‌های KDR، CD34 و CD31 تهیه‌شده از شرکت (BD pharmigen, USA) به‌مدت ۴۵ دقیقه در دمای ۴ °C انکوبه شدند. سپس نمونه‌ها با PBS بدون کلسیم و منیزیم شستشو داده شدند و نتایج توسط دستگاه فلوسیتومتری FACS Calibour شرکت (BectinDekenson, USA) بررسی گردید. داده‌ها با نرم‌افزار WinMDI 2.9 با تکرار n=۳ آنالیز و به‌صورت (Mean±SD) نشان داده شد.

بررسی بیان ژن همانژیوبلاست توسط روش نسخه‌برداری معکوس- واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز کمّی Quantitative Real Time PCR: به‌منظور بررسی بیان ژن‌های اختصاصی همانژیوبلاست که در جدول ۱ اشاره شده است از روش qRT-PCR استفاده گردید. ابتدا RNA توسط RNX-Plus (Fermentase) استخراج و در نهایت سنتز CDNA توسط کیت (Fermentase, USA) با استفاده از Random Hexamer انجام شد. به‌منظور بررسی کمّی افزایش تعداد نسخه‌های ژن مورد نظر qRT-PCR صورت گرفت. به این منظور یک میکرولیتر از هر پرایمر (جدول ۱)، شش میکرولیتر از SYBR Green Master Mix (محصول شرکت ABI/USA) و ۱۰ میکرولیتر آب اضافه شد و

جدول-۱: توالی پرایمرهای استفاده‌شده در نسخه‌برداری معکوس- واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز کمّی

ژن	توالی پرایمر	دمای واسرشتگی
GAPDH	F: 5CTCATTTCCTGGTATGACAACGA3 R:5CTTCCTCTTGTGTTGCT3	۶۰
RUNX1	F: 5' TCGGCTGAGCTGAGAAATG 3' R: 5' GATGTCTTCGAGGTTCTCGG 3'	۶۰
TAL1	F: 5' GAGGTAATTCCCAGCCATTGAC 3' R: 5' GAAGCCGAGGAAGAGGATGC 3'	۶۰
C-kit	F:5'ATTGTTCTGTGGACCAGGAG3' R:5'GGTTGTTGTGACATTTGCTG 3'	۶۰
CD34	F:5'CAACAACGGTACTGCTACCC3' R:5'AAACATTTCCAGGTGACAGG3'	۶۰

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2026-06-29]

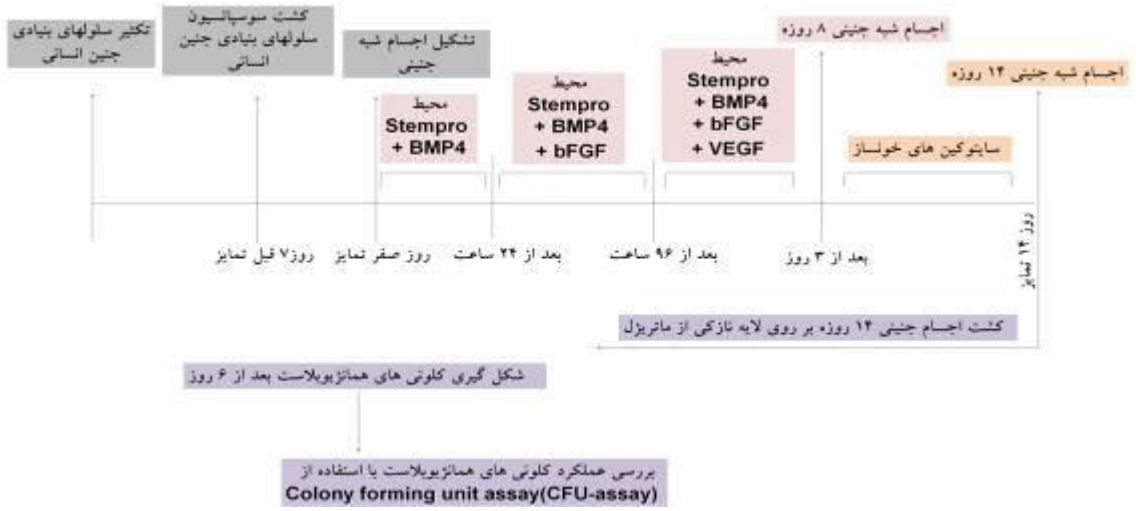
از نمونه cDNA نیز دو میکرولیتر به مجموعه فوق اضافه شد. واکنش Real Time PCR به‌کمک دستگاه ABI و برای هر نمونه به‌صورت Duplicate با تکرار n=۳ انجام شد و در نهایت آنالیز داده‌ها با استفاده از روش ΔΔCt صورت گرفت. از GAPDH به‌عنوان کنترل داخلی استفاده شد. کلیه داده‌ها بر اساس (Mean±SEM) ارایه شده‌اند.

نتایج به‌صورت Mean±SD و Mean±SEM نشان داده شدند. آنالیز نتایج توسط تست Repeated measure انجام گرفت و سطح معنی‌داری P≤۰/۰۱ و P≤۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

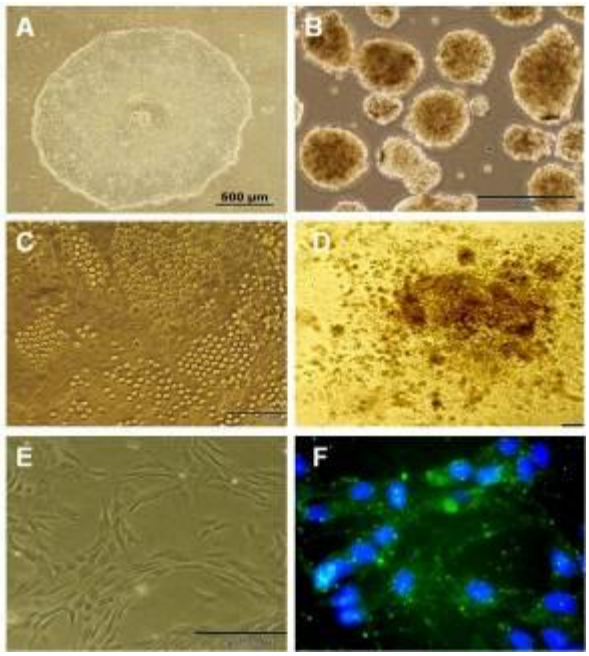
بررسی مورفولوژی و ریخت‌شناسی سلول‌های Royan H5 قبل و پس از تمایز: سلول‌های Royan H5 بر روی ماتریژل در محیط کشت کامل DMEM/F12 با ۲۰٪ سرم به‌صورت کلونی‌های به‌نسبت پهن و متراکمی و با هسته بزرگ و لایه‌ای نازک از سیتوپلاسم در اطرافشان ظاهر شدند (شکل ۲A). تشکیل سوسپانسیون سلولی از کلونی‌های تکثیری و انتقال آن‌ها به ظرف با چسبندگی پایین سبب تشکیل اجتماعات سلولی شد که پس از گذشت هفت روز اجسام شبه‌جنینی را تشکیل دادند (شکل ۲B). سلول‌های همانژیوبلاست با ظاهری خوشه‌انگوری پس از انتقال اجسام شبه‌جنینی به محیط کشت Stempro بر روی ماتریژل شکل گرفتند (شکل ۲C) که قادر بودند در محیط نیمه‌جامد متیل سلولز کلونی‌های شناور شبه مختلط (Mix like colony) (شکل ۲D) و سلول‌های چسبنده شبه‌اندوتلیال را که توانایی بیان CD31 را داشتند (شکل ۲F، ۲E) تشکیل دهند که نشان‌دهنده توانمندی دوگانه این سلول‌ها بود.

بررسی شاخص‌های تمایزیافتگی (KDR, CD31, CD34) در روز هشتم و چهاردهم تمایز در سلول‌های بنیادی Royan H5 با روش فلوسیتومتری: در تکوین سلول‌های خونی در جنین انسان قبل از تشکیل سلول‌های اریتروییدی اولیه سلول‌های پیش‌سازی به‌نام سلول‌های بلاست (همانژیوبلاست) شکل می‌گیرد که توانایی تولید تمام رده‌های خونی و سلول‌های اندوتلیال را دارا می‌باشد. برای شناسایی سلول‌های بلاست از شاخص‌های پیشنهادی آن KDR (fLK-1, VEGFR2), CD31 و CD34 استفاده شد. در این مطالعه بیان هم‌زمان CD31-CD34 و CD31-KDR در سه مقطع زمانی روز صفر، هشتم و چهاردهم با روش فلوسیتومتری بررسی شد. بر اساس نتایج حاصله از شکل ۳؛ در حدود ۱۲/۷۲±۵۰ درصد از سلول‌ها KDR، ۴/۵±۱۷ درصد از سلول‌ها CD31-KDR و ۲/۸±۱۰ درصد از سلول‌ها CD31-CD34 را در روز هشت تمایز، بیان کردند. با توجه



شکل-۱: شکل شماتیک از مراحل مختلف تمایز سلول‌های بنیادی Royan H5 به سلول‌های همانژیوبلاست

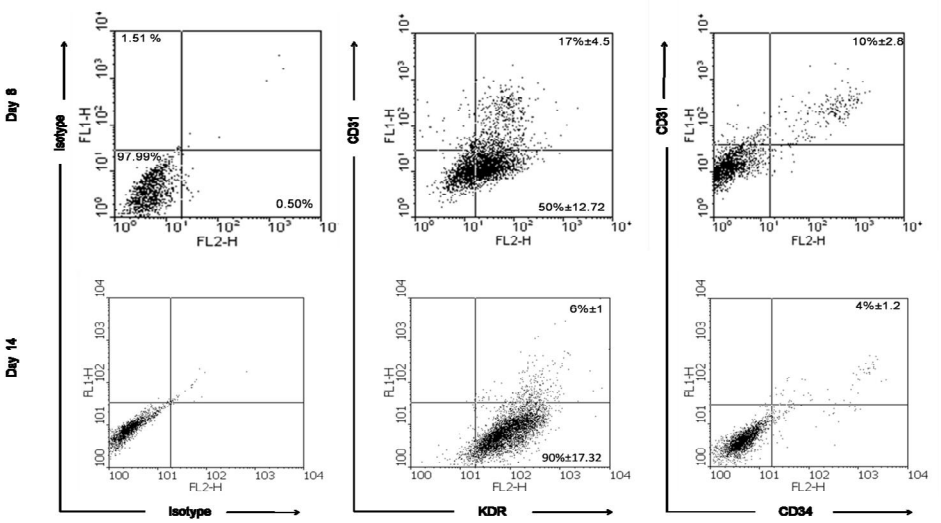
[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2026-06-29]



شکل-۲: A) کشت سلول‌های بنیادی جنینی روی ماتریژل B) کلونی‌های هفت روزه سلول‌های بنیادی (کشت به‌صورت سوسپانسیون) (بزرگ‌نمایی ۲۰۰× میکروسکوپ معکوس) **C) تشکیل کلونی‌های بلاست روی لایه نازکی از ماتریژل روز بیستم از آغاز تمایز D) کلونی‌های مختلط از سلول‌های همانژیوبلاست در محیط حاوی متیل سلولز** (**C** و **D**: ۱۰۰× میکروسکوپ معکوس) **E) سلول‌های اندوتلیال از کلونی‌های بلاست F) رنگ‌آمیزی ایمونوفلورسانس:** غشای سلول به آنتی‌بادی CD31 واکنش و سبز می‌شود. هسته‌ها با DAPI رنگ شدند (**E** و **F**: ۲۰۰× میکروسکوپ معکوس).

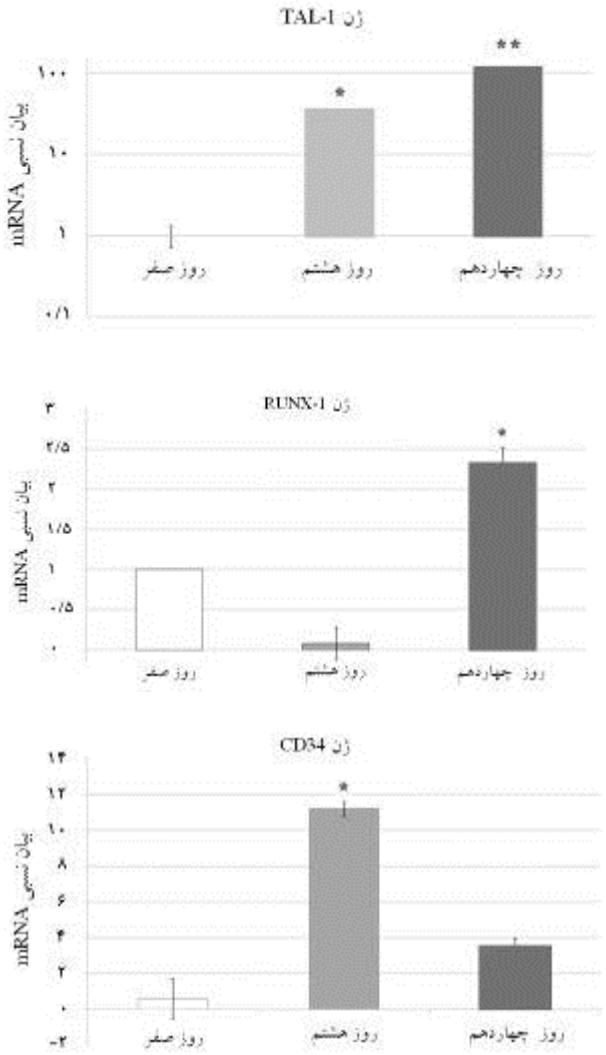
به این‌که در روز ۱۴ نیز بررسی شاخص‌ها انجام شد افزایش معنی‌داری نسبت به روز هشت در جمعیت‌های CD31-KDR و CD31-CD34 مشاهده نشد. در حدود ۱۷/۳۲±۹۰ درصد از سلول‌ها KDR را در روز ۱۴ بیان کردند به این ترتیب به‌نظر می‌رسد. سلول‌های Royan H5 قابلیت تمایز به سلول‌های همانژیوبلاست را دارند. با این وجود برای تأیید، بیان ژن‌های ویژه سلول‌های همانژیوبلاست توسط Quantitative Real Time PCR در اجسام جنینی هشت و ۱۴ روزه نسبت به روز صفر مورد بررسی قرار گرفت.

بررسی کمّی بیان ژن‌های TAL-1, RUNX-1 و CD34 توسط روش Quantitative Real Time PCR: به‌منظور بررسی کمّی بیان ژن‌های TAL-1، Runx-1، CD34 در مسیر تمایز سلول‌های Royan H5 به سلول‌های پیش‌ساز خونی در سه مقطع زمانی روز صفر، هشت و ۱۴ از روش QRT-PCR استفاده شد طبق نتایج حاصله که در شکل ۴ نشان داده شده است، بیان ژن‌های TAL-1 و Runx-1 در روز ۱۴ افزایش معنی‌داری را نسبت به روز صفر نشان دادند ($P\leq ۰/۰۱$، $P\leq ۰/۰۵$). بیان ژن CD34 افزایش معنی‌داری در روز هشت نسبت به روز صفر داشته است ($P<۰/۰۵$). کلیه داده‌ها بر اساس (Mean±SEM) ارایه شده‌اند. به این ترتیب می‌توان نتیجه گرفت سلول‌های Royan H5 به سلول‌های همانژیوبلاست تمایز یافته‌اند.



شکل-۳: سوسپانسیونی از کلونی‌های روز هشتم و چهاردهم تمایز تهیه شد الگوی بیان شاخص‌های سطحی KDR، CD31 و CD34 به‌وسیله فلوسیتومتری نسبت به روز صفر (کنترل منفی) **بررسی شد و به‌صورت dot blot نشان داده شد. داده‌ها آنالیز و به‌صورت** (Mean±SD) **نشان داده شد.**

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2026-06-29]



شکل-۴: کلونی‌های هشت روزه به محیط حاوی hbFGF (۱۰ng/mL)، **hVEGF** (۱۰ng/mL)، **hSCF** (۱۰۰ng/mL)، **hIL-3** (۴۰ng/mL)، **hEPO** (۲U/mL)، **hIL-6** (۲۰ng/mL) **و hIGF-1** (۲۵ng/mL) **کشت و تا روز ۱۴ ادامه یافت.** در روز ۱۴ mRNA استخراج و به‌روش Quantititative RT-PCR بیان ژن‌ها بررسی و آنالیز با روش $2^{-\Delta\Delta CT}$ انجام شد (**P≤۰/۰۱، *P≤۰/۰۵)

بحث

افزایش روز افزون عفونت‌های ویروسی در دنیا و شناسایی ویروس‌های ناشناخته از عواملی هستند که در آینده، اهدای خون و ذخیره‌سازی خون‌های سالم را با بحران مواجه خواهد ساخت. لذا دست‌یابی به تکنولوژی تمایز سلول‌های بنیادی جنینی انسان به سلول‌های خونی فعال با هدف ارتقای دانش زیست‌شناسی تکوینی و نیز فراهم آوردن منابع احتمالی برای مصارف آینده‌نگر در کشور از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. با توجه به فقدان گزارشی مبنی بر تولید سلول‌های پیش‌ساز خونی از سلول‌های بنیادی جنینی انسان در ایران، در این مطالعه قابلیت تمایز سلول‌های بنیادی جنین انسان به‌نام Royan H5 به‌سمت سلول‌های همانژیوبلاست مورد توجه و بررسی قرار گرفت. سلول‌های Royan H5 با کاریوتایپ 46+XX می‌باشند که ژن‌های oct-4، Nanog، sox2 و Nodal را بیان می‌کنند. این ژن‌ها از جمله عوامل تنظیم‌کننده خود نوزایی و پر توانی در این سلول‌ها می‌باشد.[۱۶]

به‌منظور القای تمایز سلول‌های Royan H5، این سلول‌ها پس از تشکیل اجسام شبه‌جنینی در معرض فاکتورهای رشد BMP4، VEGF و bFGF قرار گرفتند. هشت روز تغذیه با سایتوکین‌های ذکر شده، سلول‌های Royan H5 به سلول‌های همانژیوبلاست تمایز یافتند به‌طوری که ۵۰٪ از سلول‌ها +KDR، ۱۷٪ +CD31+KDR و ۱۰٪ +CD31+CD34 بودند. BMP4 از اعضای خانواده TGF-β می‌باشد که در غلظت‌های پایین باعث القای مزودرم خونی می‌شود و در شکل‌گیری سلول‌های خونی اولیه +CD34 و +CD31 نقش موثری را ایفا می‌کند.[۱۹] فاکتور رشد اندوتلیالی- عروقی (VEGF) با پروتیین BMP4 به‌صورت سینرژیست عمل می‌کند و اثر القایی BMP4 را افزایش می‌دهد.[۲۰] bFGF در تکثیر و بقای سلول‌های مزودرمی تمایزیافته توسط BMP4 دخالت دارد.[۲۱]

حضور سلول‌های +KDR (FLK-1, VEGFR2) در روز هشت نشان‌دهنده القای مزودرم خونی می‌باشد با توجه به مراحل تمایز مشاهده می‌شود اجسام شبه‌جنینی در طی هشت روز در معرض BMP4 قرار گرفته‌اند، به‌نظر می‌رسد تشکیل سلول‌های +KDR توسط اثر القایی BMP4 صورت گرفته باشد. اجسام جنینی هشت روزه تا انتهای روز چهارده در معرض فاکتورهای رشد خون‌ساز قرار گرفتند که منجر به افزایش +KDR در حدود ۹۰٪ گردید. با این وجود بیان هم‌زمان شاخص‌های +CD31+KDR و +CD31+CD34 افزایش قابل ملاحظه‌ای نیافت. به‌نظر می‌رسد حضور فاکتورهای رشد خون‌ساز منجر به افزایش تعداد سلول‌های تمایز یافته نمی‌شود بلکه تغییرات درونی در سلول‌ها و افزایش عملکرد سلول‌ها را باعث گردید.[۲۲] بررسی بیان ژنی در اجسام شبه‌جنینی هشت و چهارده روزه، بیان ژن‌های TAL-1، Runx-1 و CD34 را نشان دادند به‌طوری که بیان ژن

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2026-06-29]

TAL-1 (فاکتور بسیار مهم در آغاز تکوین سلول‌های خونی می‌باشد) در روز چهاردهم افزایش معنی‌داری (P≤۰/۰۱) یافت. بیان ژن‌های CD34 در روز هشت و ژن Runx-1 در روز چهاردهم افزایش معنی‌داری (P≤۰/۰۵) نشان داد. KDR یا (FLK-1 VEGFR2) رسپتور تیروزین کینازی می‌باشد که در مزودرم خارج جنینی بیان می‌شود و در تکوین بخش خون‌ساز و عروق را در جزایر خونی کیسه زرده نقش دارد.[۲۳] با توجه به مطالعات قبل، پیش‌سازهای مزودرمی که از اجسام شبه‌جنینی ۱۰ روزه جدا کردند، شاخص‌های PECAM-1، FLK-1 و VE-Cadherin را بیان می‌نمود، هر چند بیان شاخص CD45 را نشان ندادند.[۱۶] با توجه به اهمیت و ضرورت مسیر سیگنالی VEGF از طریق رسپتور خود KDR در بیان ژن TAL-1 و تکوین سلول‌های خونی،[۲۴] سلول‌هایی که بیان ژن TAL-1 را نشان داده‌اند همانند سلول‌های همانژیوبلاست قابلیت تولید سلول‌های خونی و سلول‌های اندوتلیال را دارا هستند. Runx-1 فاکتور رونویسی هترودایمری است که در تولید رده‌های خونی قطعی (Definitive hematopoietic cells) موثر می‌باشد و هم‌چنین به‌عنوان هدف غیر مستقیم BMP4 شناخته شده است.[۲۵] به‌طور خلاصه القای تمایز با ترکیبی از BMP4، VEGF و bFGF بسیار اثربخش‌تر می‌باشد. نتایج حاصل از بررسی عملکرد سلول‌های همانژیوبلاست نشان داد که آن‌ها قادر به تولید سلول‌های شناوری هستند که بسیار شبیه به کلونی‌های مختلط خونی بودند.[۲۶] به‌طوری که با ادامه کشت، تعداد سلول‌های بیان‌کننده هموگلوبین در این کلونی‌ها افزایش یافت و هم‌چنین سلول‌های همانژیوبلاست سلول‌های چسبنده‌ای را به‌وجود آوردند که CD31 را بیان می‌کنند که از جمله شاخص‌های اندوتلیایی است.

نتایج ما مطابق مطالعه Keller بود که کلونی‌های بلاست توانسته بودند کلونی‌های مختلط خونی را تولید نمایند.[۱۵] Liu تولید سه نوع کلونی خونی را در مطالعات خود نشان دادند که شامل کلونی‌های ماکروفاژی- گرانولوسیتی (CFU-GM)، کلونی‌های ماکروفاژی (CFU-M) و کلونی‌های اریتروییدی (CFU-E) بود. مطالعه حاضر تفاوت اساسی با سایر مطالعات به‌جهت نوع شرایط به‌کار گرفته شده در تمایز به‌سمت سلول‌های خونی دارا می‌باشد. به‌طوری که برای اولین‌بار از سلول‌های بنیادی کشت‌شده در شرایط سوسپانسیون برای تمایز به‌سمت سلول‌های خونی استفاده شده است. مطالعات نشان داده است Venus Endothelial Growth Factor (VEGF) در القای بیش‌تر به‌سمت کلونی‌های اریتروییدی ابتدایی، افزایش بیان هموگلوبین و بقا و خود تکثیری آن‌ها نقش اساسی ایفا می‌کند.[۱۰] با توجه به این‌که اجسام شبه‌جنینی مدت ۱۰ روز در معرض فاکتور VEGF قرار گرفتند به‌نظر می‌رسد حضور طولانی‌مدت VEGF در محیط کشت دلیل اساسی برای تمایز بیش‌تر کلونی‌ها به‌سمت کلونی‌های اریتروییدی باشد. پیشنهاد می‌شود در مطالعات بعدی برای سلول‌های مزودرمی تمایزیافته در روز هشت (KDR+) به‌روش Fluorescent Activating Cell Sorting (FACS) جداسازی انجام گیرد تا به تفسیر دقیق و بهتر یافته‌ها کمک شود. با توجه به نتایج به‌دست‌آمده در این مطالعه و سایر گزارشات موجود در زمینه تمایز سلول‌های بنیادی جنینی انسان به سلول‌های پیش‌ساز خونی، سلول‌های Royan H5 توانمندی لازم جهت تمایز به‌سمت همانژیوبلاست را دارا می‌باشند هر چند که مطالعات بیش‌تر ضروری به‌نظر می‌رسد. با توجه به نتایج حاصل‌شده از تمام تست‌های انجام گرفته، به‌نظر می‌رسد که سلول‌های بنیادی جنین انسان Royan H5 قابلیت تولید همانژیوبلاست در شرایط آزمایشگاهی را دارا می‌باشند. سلول‌های همانژیوبلاست واجد دو توانمندی می‌باشند و می‌توانند سلول‌های شناوری شبیه به سلول‌های خونی و سلول‌های شبه اندوتلیایی تولید نمایند. با این وجود بهتر است ویژگی عملکردی این سلول‌ها در شرایط In vivo بررسی و مطالعه شود.

سپاسگزاری: این مقاله حاصل بخشی از پایان‌نامه تحت عنوان "تولید سلول‌های اریتروییدی از سلول‌های پرتوان" در مقطع کارشناسی ارشد در سال ۱۳۸۹ و کد ۱۷۱ می‌باشد که با حمایت دانشگاه علم و فرهنگ و پژوهشگاه رویان اجرا شده است.

References

1. Badowska W. [History and today of the Hematology and Oncology Department at the Children State Hospital, Olsztyn, Poland]. *Med Wieku Rozwoj* 2006;10(3 Suppl 1):79-80.

2. Lin KI, Tam CS, Keating MJ, Wierda WG, O'Brien S, Lerner S, et al. Relevance of the immunoglobulin VH somatic mutation status in patients with chronic lymphocytic leukemia treated with

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2026-06-29]

fludarabine, cyclophosphamide, and rituximab (FCR) or related chemoimmunotherapy regimens. *Blood* 2009;113(14):3168-71.
3. Liu YX, Yue W, Ji L, Nan X, Pei XT. Production of erythriod cells from human embryonic stem cells by fetal liver cell extract treatment. *BMC Dev Biol* 2010;10:85.
4. Giarratana MC, Kobari L, Lapillonne H, Chalmers D, Kiger L, Cynober T, et al. Ex vivo generation of fully mature human red blood cells from hematopoietic stem cells. *Nat Biotechnol* 2005;23(1):69-74.
5. Qiu C, Hanson E, Olivier E, Inada M, Kaufman DS, Gupta S, et al. Differentiation of human embryonic stem cells into hematopoietic cells by coculture with human fetal liver cells recapitulates the globin switch that occurs early in development. *Exp Hematol* 2005;33(12):1450-8.
6. Olivier EN, Qiu C, Velho M, Hirsch RE, Bouhassira EE. Large-scale production of embryonic red blood cells from human embryonic stem cells. *Exp Hematol* 2006;34(12):1635-42.
7. Chang KH, Nelson AM, Cao H, Wang L, Nakamoto B, Ware CB, et al. Definitive-like erythroid cells derived from human embryonic stem cells coexpress high levels of embryonic and fetal globins with little or no adult globin. *Blood* 2006;108(5):1515-23.
8. Choi K, Kennedy M, Kazarov A, Papadimitriou JC, Keller G. A common precursor for hematopoietic and endothelial cells. *Development* 1998;125(4):725-32.
9. Lu SJ, Feng Q, Park JS, Vida L, Lee BS, Strausbauch M, et al. Biologic properties and enucleation of red blood cells from human embryonic stem cells. *Blood* 2008;112(12):4475-84.
10. Palis J, Robertson S, Kennedy M, Wall C, Keller G. Development of erythroid and myeloid progenitors in the yolk sac and embryo proper of the mouse. *Development* 1999;126(22):5073-84.
11. Shalaby F, Rossant J, Yamaguchi TP, Gertsenstein M, Wu XF, Breitman ML, et al. Failure of blood-island formation and vasculogenesis in Flk-1-deficient mice. *Nature* 1995;376(6535):62-6.
12. Park C, Afrikanova I, Chung YS, Zhang WJ, Arentson E, Fong Gh G, et al. A hierarchical order of factors in the generation of FLK1- and SCL-expressing hematopoietic and endothelial progenitors from embryonic stem cells. *Development* 2004;131(11):2749-62.
13. Cerdan C, Rouleau A, Bhatia M. VEGF-A165 augments erythropoietic development from human embryonic stem cells. *Blood* 2004;103(7):2504-12.
14. Zambidis ET, Peault B, Park TS, Bunz F, Civin CI. Hematopoietic differentiation of human embryonic stem cells progresses through sequential hematoendothelial, primitive, and definitive stages resembling human yolk sac development. *Blood* 2005;106(3):860-70.
15. Kennedy M, D'Souza SL, Lynch-Kattman M, Schwantz S, Keller G. Development of the hemangioblast defines the onset of hematopoiesis in human ES cell differentiation cultures. *Blood* 2007;109(7):2679-87.
16. Wang J, Zhao HP, Lin G, Xie CQ, Nie DS, Wang QR, et al. In vitro hematopoietic differentiation of human embryonic stem cells induced by co-culture with human bone marrow stromal cells and low dose cytokines. *Cell Biol Int* 2005;29(8):654-61.
17. Baharvand H, Ashtiani SK, Taee A, Massumi M, Valojerdi MR, Yazdi PE, et al. Generation of new human embryonic stem cell lines with diploid and triploid karyotypes. *Dev Growth Differ* 2006;48(2):117-28.
18. Larijani MR, Seifinejad A, Pournasr B, Hajihoseini V, Hassani SN, Totonchi M, et al. Long-term maintenance of undifferentiated human embryonic and induced pluripotent stem cells in suspension. *Stem Cells Dev* 2011;20(11):1911-23. 25.
19. Okuda S, Tamaki K, Ando T, Yanagida T, Fujishima M. TGF-beta behavior in the progressive process in the focal glomerulosclerosis rat model: the role of latent TGF-beta-binding protein. *Contrib Nephrol* 1996;118:78-85.
20. Nakayama N, Lee J, Chiu L. Vascular endothelial growth factor synergistically enhances bone morphogenetic protein-4-dependent lymphohematopoietic cell generation from embryonic stem cells in vitro. *Blood* 2000;95(7):2275-83.
21. Faloon P, Arentson E, Kazarov A, Deng CX, Porcher C, Orkin S, et al. Basic fibroblast growth factor positively regulates hematopoietic development. *Development* 2000;127(9):1931-41.
22. Chadwick K, Wang L, Li L, Menendez P, Murdoch B, Rouleau A, et al. Cytokines and BMP-4 promote hematopoietic differentiation of human embryonic stem cells. *Blood* 2003;102(3):906-15.
23. Tian X, Morris JK, Linehan JL, Kaufman DS. Cytokine requirements differ for stroma and embryoid body-mediated hematopoiesis from human embryonic stem cells. *Exp Hematol* 2004;32(10):1000-9.
24. Yamaguchi TP, Dumont DJ, Conlon RA, Breitman ML, Rossant J. flk-1, an flt-related receptor tyrosine kinase is an early marker for endothelial cell precursors. *Development* 1993;118(2):489-98.
25. Heidel F, Solem FK, Breitenbuecher F, Lipka DB, Kasper S, Thiede MH, et al. Clinical resistance to the kinase inhibitor PKC412 in acute myeloid leukemia by mutation of Asn-676 in the FLT3 tyrosine kinase domain. *Blood* 2006;107(1):293-300.
26. Zambidis ET, Park TS, Yu W, Tam A, Levine M, Yuan X, et al. Expression of angiotensin-converting enzyme (CD143) identifies and regulates primitive hemangioblasts derived from human pluripotent stem cells. *Blood* 2008;112(9):3601-14.

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2026-06-29]

Tehran University Medical Journal; Vol. 70, No. 3, June 2012: 141-149

In-vitro differentiation of human embryonic stem cells into hemangioblasts

Fatemeh Ganji M.Sc.[1,2]
Saeid Abruon Ph.D.[3*]
Hossein Baharvand Ph.D.[1,2]
Marzieh Ebrahimi Ph.D.[1]
Nasser Aghdami M.D.[4]

1- Department of Stem Cells and Developmental Biology, Cell Sciences Research Center, Royan Institute for Stem Cell Biology and Technology, ACECR, Tehran, Iran.
2- Department of Developmental Biology, University of Science and Culture, ACECR, Tehran, Iran.
3- Department of Hematology, School of Medicine, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran.
4- Department of Regenerative Medicine, Royan Institute for Stem Cell Biology and Technology, ACECR, Tehran, Iran.

[*] Corresponding author: Tarbiat Modares University, Jala Ale-Ahmad Ave., Tehran, Iran.
Tel: +98-21-27635000
E-mail: abroun@modares.ac.ir

Received: February 27, 2011 Accepted: March 05, 2012

Abstract

Background: Human embryonic stem cells (hESCs) are capable of self-renewal and large-scale expansion. They also have the capacity to differentiate into a variety of cell types including liver, cardiac and neuron cells. However, it is not yet clear whether hESCs can differentiate to hemangioblasts under in-vitro conditions. Hemangioblasts are bipotential progenitors that can generate hematopoietic lineages and endothelial cells. The aim of this study was to identify the potential of human Royan H5 embryonic stem cells in differentiating into hemangioblast cells.

Methods: HESCs were cultured at suspension system in DMEM/F12 supplemented with bFGF. 7-day old cells differentiated into blast cells under defined condition consisting of hematopoietic cytokines including BMP4, VEGF, etc. Blast cell markers kinase insert domain receptor (KDR), CD31, and CD34 were evaluated by flow cytometry and blast gene expressions (TAL-1, Runx-1 and CD34) were detected by qRT-PCR. Clonogenic assays were performed in semisolid medium by colony forming unit-assays.

Results: The hESCs (Royan H5) had the capacity of differentiating into hemangioblast cells. We could detect colonies that expressed 79%±12.5 KDR^+, 5.6%±2.8 $CD31^+$-$CD34^+$ and 6%±2.12 KDR^+-$CD31^+$ on day 8 in the hESCs. Up-regulation of TAL-1, Runx-1 and CD34 occurred during hemangioblast commitment ($P\leq0.05$ and $P\leq0.01$, respectively). Moreover, hemangioblast cells generated mixed-type and endothelial-like colonies in semi-solid media.

Conclusion: Our results showed that hESCs (Royan H5) were able to differentiate into hemangioblasts under in-vitro conditions. The hemangioblasts had the potential to generate two non-adherent (Mixed-type) and adherent (endothelial-like) cell populations.

Keywords: Colony, differentiation, hemangioblast, human embryonic stem cells.

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2026-06-29]