Original Article

Differentiation of Murine Embryonic Stem Cells into Endothelial Cells

F. Fathi, Ph.D.[1] , A. Jafari Kermani, M.Sc.[2], SJ. Mowla, Ph.D.[2], A. Poladi, M.D.[1]

1. Anatomy Department, Cellular and Molecular Research Center, Kurdistan University of Medical Sciences

2. Genetic Department, Tarbiat Modaress University

: *Corresponding Address: P.O.Box: 66177-13446, Anatomy Department, Cellular and Molecular Research Center, Kurdistan University of Medical Sciences, Sanandaj, Iran*

Email: farfath@yahoo.com

Abstract

Received: 1/Aug/2007, Accepted: 27/Nov/2007

Objective: In this investigation Murine Embryonic Stem (ES) cells were differentiated into endothelial cells.

Materials and Methods: Murine ES cells (CCE cell line) exposed to Alpha-MEM medium containing 10% FBS for 4 days. Then obtained Flk-1 (Flk-1: Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 2) Positive cells were cultuted in Endothelial Growth Medium-2 (EGM-2) until the last day of experiment. Differentiated cells were evaluated by immunocytochemistry, RT-PCR and Tube Formation Assays.

Results: When the ES cells cultured in collagen coated dishes containing Alpha-MEM & FBS, Flk-1 positive cells were obtained. After transfering Flk-1 positive cells into fibronectin coated dishes containing EGM2, the cells were assumed a relatively uniform endothelial cell morphology and could be propagated and expanded. Immunocytochemical and RT-PCR analysis of differentiated cells showed that they take up acetylated low-density lipoprotein (LDL), express Flk-1, CD31 and bind the BS-I lectin. When placed in Matrigel, these Murine ES cell–derived endothelial cells formed capillary-like structures characteristic of endothelial cells

Conclusion: ES cell–derived endothelial cells provide a novel means to examine the mechanisms of endothelial cell development, and may open up new therapeutic strategies.

Keywords: Embryonic Stem Cells, Endothelial Cells, EGM-2, Differentiation

Yakhteh Medical Journal, Vol 9, No 4, Winter 2008, Pages: 262-267

تمایز سلول‌های بنیادی رویانی موش به سلول‌های اندوتلیال در محیط آزمایشگاهی

فردین فتحی .Ph.D[1]، عباس جعفری کرمانی .M.Sc[2]، سیدجواد مولا .Ph.D[2]، آرش پولادی .M.D[1]

۱. دانشگاه علوم پزشکی کردستان، دانشکده پزشکی، گروه علوم تشریح، KDRC، آزمایشگاه تحقیقات سلولی و مولکولی
۲. دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم پایه، گروه ژنتیک

: آدرس مکاتبه: سنندج، صندوق پستی: ۶۶۱۷۷-۱۳۴۴۶، دانشگاه علوم پزشکی کردستان، دانشکده پزشکی، گروه علوم تشریح، KDRC، آزمایشگاه تحقیقات سلولی و مولکولی
پست الکترونیک: Email:farfath@yahoo.com

چکیده

دریافت مقاله: ۸۶/۱۰/۲۵، پذیرش مقاله: ۸۶/۹/۶

* **هدف:** تمایز سلول‌های بنیادی رویانی موش به سلول‌های اندوتلیال

* **مواد و روش‌ها:** سلول‌های بنیادی رویانی CCE به مدت ۴ روز در دیش‌های آغشته به کلاژن، در معرض محیط کشت Alpha-MEM محتوی ۱۰درصد سرم جنینی گاوی کشت داده شدند تا سلول‌های Flk-1 مثبت (Flk-1: Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 2) حاصل شوند. جهت تمایز سلول های به دست آمده به سلول‌های پیش‌ساز اندوتلیال از محیط کشت مخصوص رشد سلول‌های اندوتلیال (EGM-2: Endothelial Growth Medium-2) استفاده شد. به طوری که سلول‌های Flk-1 مثبت تا پایان آزمایش در محیط کشت مذکور کشت داده شدند. جهت تایید سلول‌های تمایز یافته از ارزیابی‌های ایمونوسیتوشیمی، PCR-RT و تشکیل ساختارهای شبه مویرگی (Assay Formation Tube) استفاده شد.

* **یافته‌ها:** با کشت سلول‌ها در دیش‌های آغشته به کلاژن و محیط کشت Alpha-MEM محتوی ۱۰درصد سرم جنینی گاوی، سلول‌های Flk-1 مثبت حاصل شدند. بعد از انتقال سلول‌های مذکور به محیط کشت مخصوص رشد سلول‌های اندوتلیال، به تدریج مورفولوژی سلول‌های اندوتلیال را کسب کرده و تکثیر شدند. نتایج ارزیابی‌های ایمونوسیتوشیمی و RT-PCR نشان داد سلول‌های تمایز یافته قادر به جذب لیپوپروتئین با چگالی پایین و بیان ژن‌های CD31 و Flk-1 هستند و نیز به لکتین (BS-1: Bandeiraea Simplicifolia Lectin) متصل می‌شوند. زمانی که سلول‌های تمایز یافته به ماتریکس خارج سلولی یا ماتری ژل منتقل شدند ساختارهای شبه مویرگی که از مشخصه‌های سلول‌های اندوتلیال است را تشکیل دادند.

* **نتیجه گیری:** سلول‌های اندوتلیال تمایز یافته از سلول‌های بنیادی رویانی موش که در محیط آزمایشگاه نیز قادر به تکثیرند مدل مناسبی جهت بررسی مکانیسم‌های تکاملی سلول‌های اندوتلیال فراهم می‌کنند و ممکن است منجر به ابداع روش‌های درمانی نوین شوند.

گل‌واژگان: سلول‌های بنیادی رویانی، سلول‌های اندوتلیال، محیط کشت رشد سلول‌های اندوتلیال، تمایز سلولی

فصلنامه پزشکی یاخته، سال نهم، شماره ٤، زمستان ۸۶، صفحات: ۲۶۷-۲۶۲

مقدمه

فرآیند خالص‌سازی سلول‌های تمایز یافته از سلول‌های بنیادی رویانی و یا به عبارت دیگر افزایش کارآیی تمایز سلول های بنیادی رویانی (Embryonic Sem Cells: ES) به سلول‌های مختلف سازنده بدن از جمله سلول‌های پیش‌ساز اندوتلیال، یکی از موضوعاتی است که ذهن محققان را به خود مشغول کرده و بررسی و آزمایش فرضیات مختلف در این زمینه همواره در حال انجام است. در ارتباط با تمایز سلول‌های بنیادی رویانی به سلول‌های اندوتلیال مروری بر مطالعات انجام شده تاکنون نشان می‌دهد که در سال ۱۹۹۶ دنیل ویتت و همکارانش بیان یک مجموعه از مارکرهای اختصاصی اندوتلیال را در اجسام رویانی مشتق شده از سلول‌های ES نشان دادند (۱). نیشیکاوا و همکارانش نیز روش جدیدی را برای تمایز سلول‌های خون‌ساز و اندوتلیال، نه از طریق تشکیل اجسام رویانی، بلکه با استفاده از کشت سلول‌ها به صورت تک لایه‌ای ابداع کردند. با استفاده از این روش پس از گذشت چهار روز از انتقال سلول‌های ES به ظرف‌های آغشته به کلاژن نوع IV و کشت آنها در محیط Alpha-MEM، سلول‌های Flk-1 مثبت حاصل شد (۲). اوگاوا و همکارانش بیان Integrin-4α در سلول‌های پیش‌ساز خون و اندوتلیال که از ES مشتق شده بودند را مورد مطالعه قرار دادند و این مارکر را به عنوان یک مارکر سطح سلولی برای شروع انشعاب یا جدایی رده‌های سلولی اندوتلیال و خون‌ساز از همدیگر معرفی کردند (۳). جیووانی بالکونی و همکارانش با تهیه اجسام رویانی از سلول‌های ES موش و اضافه کردن (Vascular Endothelial Growth Factor: VEGF)، اریتروپویتین نوترکیب انسانی، bFGF و اینترکولین به محیط کشت آنها، سلول‌های بنیادی رویانی را به سلول های اندوتلیال تمایز دادند (۴). هیرای و همکارانش نشان دادند سلول‌های اندوتلیال عروقی کادهرین مثبت (Vascular Endothelial Cadherin: VE-cadherin) به دست آمده از جنین موش قادرند به سلول‌های خون‌ساز تبدیل شوند (۵).

کافمن و همکارانش از سلول‌های ES میمون رزوس جهت آنالیز تکامل سلول‌های اندوتلیال استفاده کردند و توانستند سلول‌های بنیادی رویانی ES میمون را به سلول‌های پیش‌ساز اندوتلیال تمایز دهند. آنها از محیط EGM-2 جهت

القای تمایز سلول‌ها استفاده کردند؛ به طوری که سلول‌های حاصله قادر بودند بسیاری از ژن‌ها و آنتی‌ژن‌های اختصاصی سلول‌های اندوتلیال از جمله CD34 و فاکتور ون ویلبراند (VWF: Von Willebrand Factor) را بیان کنند. کافمن و همکارانش در توجیه یافته‌های خود این فرضیه را پیشنهاد کردند که احتمالا چون سلول‌های ES تمایز نیافته میمون Flk-1 مثبت هستند قادرند در محیط کشت مذکور به سلول‌های اندوتلیال تمایز یابند (۶). هدف از مطالعه حاضر بررسی فرضیه ارائه شده توسط کافمن و همکارانش در مورد سلول‌های بنیادی رویانی موش است. بدین منظور در ابتدا با استفاده از روش نیشیکاوا و همکاران، از سلول‌های ES موش، سلول‌های Flk-1 مثبت تهیه شد (۲) و پس از آن از روش کافمن و همکاران جهت تمایز سلول‌های Flk-1 مثبت به سلول‌های پیش‌ساز اندوتلیال استفاده شد (۶).

مواد و روش‌ها

کشت سلول‌های بنیادی رویانی

در این پژوهش پاساژ بیستم دودمان سلولی CCE (هدیه از دانشگاه شفیلد) مورد استفاده قرار گرفت. جهت کشت این سلول‌ها از محیط کشت (Dulbecco's Modified Eagle's Medium: DMEM)، سرم جنین گاوی (Gibco, FBS) به میزان ۱۵درصد، ۱۰۰ واحد بین‌المللی پنی‌سیلین در هر میلی‌لیتر، ۵۰ واحد بین‌المللی استرپتومایسین در هر میلی‌لیتر (Gibco)، ۲ مرکاپتواتانول 5×10^{-5} مولار (2-Mercaptoethanol: 2ME, Sigma) و فاکتور مهارکننده لوکمی (Leukemia inhibitory factor, Sigma: LIF) با غلظت۱۰ نانوگرم در هر میلی‌لیتر استفاده شد. سلول‌ها در دیش‌های ۶۰ میلی‌متری که کف آنها به وسیله ژلاتین (Sigma) پوشانده شده بود، کشت داده شدند. دمای انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد و میزان CO_2 آن ۵ درصد بود. جهت تهیه دیش‌های ژلاتینی، ژلاتین ۰/۱ درصد حل شده در بافرفسفات (Phosphate Buffer Saline: PBS) به اندازه‌ای که کف ظرف‌ها را بپوشاند به داخل ظرف‌ها ریخته شده و به مدت۳۰ دقیقه در دمای اتاق نگهداری شدند. سپس مایع موجود در دیش‌ها دور ریخته شد و حدود ۳۰ دقیقه دیگر در دمای اتاق نگهداری شدند تا خشک شوند .تمامی مراحل مذکور در زیر هود لامینار انجام شد.

نحوه تمایز سلول‌های بنیادی رویانی CCE به سلول‌های پیش‌ساز رگ

سلول‌های بنیادی رویانی در دو مرحله به سلول‌های پیش‌ساز اندوتلیال تمایز داده شدند. ابتدا سلول‌های مذکور مطابق روش نیشیکاوا و همکاران (۲) به سلول‌های Flk-1 مثبت تمایز داده شدند، به این منظور سلول‌ها با تراکم 2×10^{4} سلول به دیش‌های کشت پوشانده شده با کلاژن نوع IV منتقل شده و در محیط کشت Alpha-MEM حاوی ۱۰درصد سرم FBS و مرکاپتواتانول با غلظت 5×10^{-5} مولار به مدت چهار روز کشت داده شدند. پس از پایان این مرحله با استفاده از ارزیابی RT-PCR بیان ژن Flk-1 در سلول‌ها تایید شد. در مرحله دوم آزمایش جهت بررسی توانایی محیط کشت EGM-2 در تمایز سلول‌های Flk-1 مثبت حاصله به سلول‌های پیش‌ساز اندوتلیال، سلول‌های Flk-1 مثبت با غلظت $2/5\times10^{3}$ سلول به هر چاهک از دیش های کشت ۲۴ چاهکی پوشانده شده با فیبرونکتین منتقل شده و تا پایان آزمایش کشت داده شدند. محیط کشت EGM-2 مورد استفاده حاوی فاکتور رشد اندوتلیال عروق (Factor Growth Endothelial Vascular: VEGF)، فاکتور رشد فیبروبلاستی بازی (Basic Fibroblast Growth Facor: bFGF) فاکتور رشد شبه انسولین (like-Insulin Growth Factor: IGF) و فاکتور رشد اپیدرمال (Epidermal Growth Factor: EGF) و ۲ درصد سرم جنین گاوی (Fetal Bovine Serum: FBS) بود. جهت تهیه دیش‌های پوشانده شده با فیبرونکتین و کلاژن، حلال PBS حاوی مواد مذکور به اندازه‌ای که یک لایه نازک از مایع کف ظرف‌ها را بپوشاند به داخل ظرف‌ها ریخته شده و به مدت ۳۰ الی ۴۵ دقیقه در دمای اتاق نگهداری شدند تا خشک شوند. تمامی مراحل مذکور در زیر هود لامینار انجام شد. دیش‌های آماده شده تا زمان استفاده در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

ارزیابی‌های مورفولوژیک و توانایی تشکیل ساختارهای شبه مویرگی (Tube Formation) در سلول‌های تمایز یافته

در طول آزمایش، سلول‌ها تحت ارزیابی مورفولوژیک قرار گرفتند. همچنین جهت ارزیابی توانایی عملکردی سلول‌ها به صورت *In vitro* از Tube Formation Assay استفاده شد، به این منظور سلول‌های تمایز یافته، ۲۸ روز بعد از کشت سلول‌ها در محیط EGM-2 به دیش‌های (۲۴ چاهکی) حاوی ماتری ژل (Matrigel, Sigma اهدایی از پژوهشکده رویان) منتقل شدند و مجددا در محیط کشت EGM-2 کشت داده شدند. بعد از گذشت ۲۴ الی ۴۸ ساعت بر روی ساختارهای شبه مویرگی تشکیل شده ارزیابی ایمونوسیتوشیمی برای لکتین صورت گرفت و از میکروسکوپ معکوس فلورسنت (NIKON, TE-300) جهت مطالعه و عکسبرداری سلول‌ها استفاده شد.

ارزیابی ایمونوسیتوشیمی

یکی از روش‌های مورد استفاده جهت تشخیص سلول‌هایی با ویژگی اندوتلیالی، ارزیابی توانایی سلول‌ها در جذب لیپوپروتئین اشباع شده کم چگال (lipoprotein density-low Acetylated: LDL-Ac-Dil) است (۶). ماده مذکور با ماده فلورسنت Dil کونژوگه شده است و اختصاصا به وسیله رده‌های سلولی با ماهیت اندوتلیالی جذب می‌شود. در این مطالعه به منظور بررسی توانایی سلول‌ها در جذب لیپوپروتئین کم چگال، در روز هیجدهم بعد از انتقال سلول‌ها به دیش‌های آغشته به فیبرونکتین از Dil-Ac-LDL (Biomedical Thechnologi Inc.) با غلظت ۱۰ میکروگرم در هر میلی‌لیتر استفاده شد. همچنین در این روز جهت ارزیابی ایمونوسیتوشیمی، سلول‌ها به مدت ۲۰ دقیقه در دمای اتاق با استفاده از پارافرمالدئید ۴ درصد فیکس شدند. آنتی‌بادی اولیه (Santacruz,Goat antimouse) CD31، با غلظت ۱ به ۱۰۰ به مدت ۲ ساعت در دمای ۳۷ درجه به سلول‌ها اعمال شد. آنتی‌بادی‌های ثانویه متصل به (Santacruz, Donkey antigoat) Texaz-Red جهت اتصال به آنتی‌بادی برعلیه CD31 با غلظت ۱ به ۱۰۰ به مدت یک ساعت در دمای اتاق به سلول‌ها اعمال شد. همچنین در روز ۲۸ BS-1 lectin به عنوان یک نشانگر اختصاصی سلول‌های اندوتلیال موش (BS-1 lectin,Vector laboratori) با غلظت ۵ میکروگرم در هر میلی‌لیتر مورد استفاده قرار گرفت. پس از شستشوی سلول‌ها با بافر فسفات، از (Vector hard set, Vector Laboratories) که همراه آن رنگ DAPI هم موجود بود جهت ماونت کردن استفاده شد و نهایتا سلول‌ها به کمک میکروسکوپ فلورسنت (Nikon TE-300)

مطالعه و عکسبرداری شدند.

ارزیابی RT-PCR

از RT-PCR جهت تایید بیان ژن‌های مورد مطالعه (جدول ۱) استفاده شد. برای این منظور، ابتدا با استفاده از محلول استخراج RNA (RNX Plus, Sinagen)ی کل از سلول‌ها استخراج شد و پس از اطمینان یافتن ازکیفیت RNAی استخراج شده با انجام الکتروفورز ژل آگارز و اسپکتروفومتری، جهت تهیه cDNA از پرایمر (oligo dT, MWG-Biotech AG) و کیت RT (Bioneer) استفاده شد. واکنش RT در حجم نهایی ۵۰ میکرولیتر انجام گرفت. پس از تهیه cDNA، واکنش PCR جهت تکثیر قطعه مورد نظر انجام گرفت. واکنش PCR در حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر انجام شد و جهت تهیه حجم مذکور علاوه بر DNA الگو (محصول واکنش RT) از کیت PCR (Bioneer)، آب مقطر استریل و پرایمرهای بالا دست (Forward) و پایین دست (Reverse)، با مشخصات مورد اشاره در جدول یک استفاده شد. پس از آماده ساختن حجم مورد نظر جهت انجام واکنش، واکنش PCR با شرایط Denaturation ۴۵ ثانیه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد، Annealing ۴۵ ثانیه در دمای ۶۴-۶۰ درجه سانتی‌گراد (بر اساس نوع پرایمر) و Extention ۱ دقیقه در دمای ۷۲ درجه انجام گرفت. تعداد ۳۵ سیکل و یک سیکل extention نهایی به مدت پنج دقیقه در ۷۲ درجه سانتی‌گراد در نظر گرفته شد. جهت انجام هر دو واکنش RT و PCR از دستگاه ماسترسایکلر (Eppendorf) استفاده شد. ژن GAPDH به عنوان کنترل داخلی مورد استفاده قرار گرفت.

بعد از اتمام واکنش ۸ میکرولیتر از محصول واکنش PCR توسط الکتروفورز ژل آگارز ۱ درصد بررسی شد.

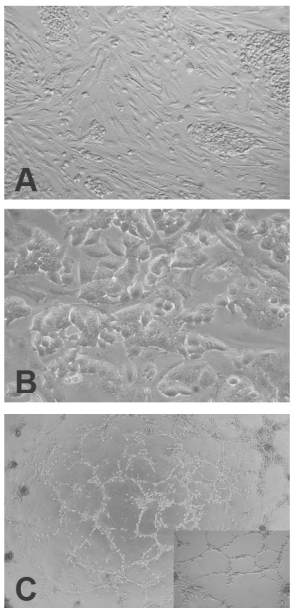
پرایمرهای مورد استفاده در این مطالعه با کمک نرم افزار Gene runner طراحی شدند.

جدول ۱: اسامی ژن‌ها و توالی مربوط به پرایمرهای بالا دست (F) و پایین دستی (R)

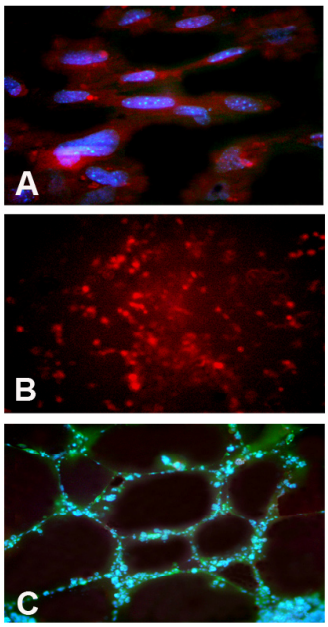
نام ژن	اندازه (bp)		توالی پرایمر
GAPDH	۳۰۸	F	GCCCATCACCATCTTCCAFG
		R	TGAGCCCTTCCACAATGCC
CD31	۲۶۱	F	GTCATGGCCATGGTCGAGTA
		R	CTCCTCGGCATCTTGCTGAA
Flk-1	۵۳۰	F	AAGGTGCCCAGGAAAAGAC
		R	CTTGCCCCGTAAGTAAGTTG
VE-Cadherin	۴۵۷	F	GGCTTTCTGACTGTTGTGGAC
		R	TTATAGATGTTTCCCTGCTTGG

یافته‌ها

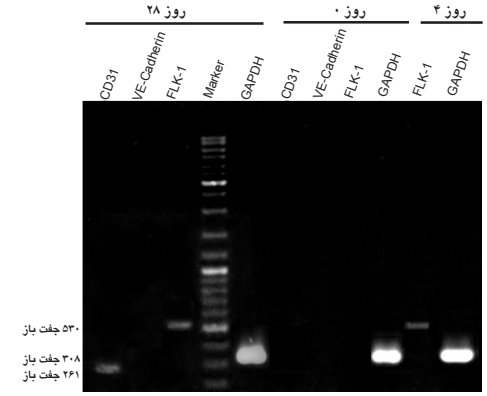
نتایج به دست آمده از این پژوهش نشان داد با کشت سلول‌های بنیادی رویانی CCE در دیش‌های کشت پوشانده شده با کلاژن نوع IV و محیط کشت Alpha-MEM حاوی ۱۰درصد FBS، بعد از گذشت چهار روز سلول‌های Flk-1 مثبت حاصل می‌شوند. همچنین پس از کشت سلول‌های Flk-1 مثبت در دیش‌های کشت پوشانده شده با فیبرونکتین و محیط کشت EGM-2، سلول‌ها به تدریج به سلول‌های پیش‌ساز اندوتلیال تمایز می‌یابند و مورفولوژی دوکی شکل و سنگفرشی که مختص سلول های اندوتلیال است را کسب می‌کنند (شکل ۱). سلول‌های مذکور هر ۳ الی ۵ روز یک‌بار پاساژ داده شدند و تا دهمین پاساژ تکثیر شدند. همچنین سلول‌های تمایز یافته به تدریج توانایی تشکیل ساختارهای شبه مویرگی (Tube Formation) را کسب کرده به طوری که در روز ۲۸ سلول‌ها در تشکیل ساختارهای مذکور شرکت کردند (شکل ۱).



شکل ۱: A) سلول های اندوتلیال تمایز یافته از سلول های Flk-1 مثبت که پس از گذشت ۴۱ روز از انتقال این سلول ها به دیش های کشت پوشانده شده با فیبرونکتین و محیط کشت EGM2 عکسبرداری شده اند. همان طور که مشاهده می شود، سلول ها دارای مورفولوژی دوکی شکل می باشند. B) از روز ۲۸ به بعد، سلول ها عمدتا مورفولوژی سنگفرشی پیدا کردند که ۴۸ ساعت پس از انتقال این سلول ها بر روی ماتری ژل، توانستند ساختارهای شبه مویرگی (Tube Formation) را تشکیل دهند (C).



شکل ۲: تصاویر مربوط به سلول های پیش ساز اندوتلیال حاصل از تمایز سلول های بنیادی رویانی CCE در روز هیجدهم (B&A) و سی و دوم (C) بعد از انتقال سلول های Flk-1 مثبت به دیش های کشت آغشته به فیبرونکتین در محیط EGM2 (بزرگنمایی x ۲۰۰). A: واکنش مثبت سلول های تمایز یافته به آنتی بادی بر علیه CD31 را نشان می دهد. B: سلول های تمایز یافته را نشان می دهد که لیپوپروتئین کم چگال کونژوگه به DiI که یک رنگ فلورسنت قرمز است را جذب کرده اند. C: سلول های تمایز یافته را نشان می دهد که بعد از انتقال به ماتری ژل ساختارهای شبه مویرگی ایجاد کرده و سلول ها قادر به اتصال به لکتین نیز بودند. هسته سلول ها در تصاویر A و C با DAPI رنگ شده اند.



شکل ۳: بررسی بیان ژن‌های Flk-1، CD31 و VE-cadherin با استفاده از تکنیک RT-PCR: همانطور که مشاهده می‌شود، کشت دادن سلول‌های بنیادی رویانی CCE در دیش‌های پوشانده شده با کلاژن نوع IV و در محیط کشت Alpha-MEM حاوی ۱۰درصد FBS باعث می‌شود که این سلول‌ها بعد از گذشت چهار روز به سلول‌های Flk-1 مثبت تمایز یابند. از طرفی، انتقال سلول‌های Flk-1 به دیش‌های کشت پوشانده شده با فیبرونکتین و محیط کشت EGM2 باعث پیشرفت تمایز این سلول‌ها به سمت سلول‌های اندوتلیال می‌شود. به طوری که بعد از گذشت ۲۸ روز از زمان انتقال (روز ۳۲ آزمایش)، سلول‌ها علاوه بر ژن Flk-1، ژن CD31 که یکی از مارکرهای اختصاصی سلول‌های اندوتلیال است را نیز بیان می‌کنند. بیان ژن VE-cadherin در این سلول‌ها مشاهده نشد.

به منظور تایید فنوتیپ اندوتلیالی و ارزیابی ایمونوسیتوشیمی سلول‌های جداسازی شده از ماده Dil-Ac-LDL و نیز از آنتی‌بادی‌های BS-1 Lectin و آنتی‌بادی CD31 استفاده شد. سلول‌های تمایز یافته‌ای که جهت ارزیابی استفاده شدند دارای توانایی جذب Dil-Ac-LDL و بیان آنتی‌ژن CD31 بودند. همچنین پس از اینکه سلول‌ها قادر به تشکیل ساختارهای شبه مویرگی در داخل ماتری ژل شدند، بر روی آنها ارزیابی ایمونوسیتوشیمی به منظور تایید توانایی آنها در اتصال به لکتین BS-1 Lectin صورت گرفت که این سلول‌ها به ارزیابی مذکور پاسخ مثبت نشان دادند (شکل۲). به طوری که سلول‌هایی که BS-1 Lectin به آنها متصل شده بود. این آنتی‌بادی کونژوگه به رنگ فلورسنت سبز بود لذا با فیلتر FITC به رنگ سبز قابل مشاهده بودند (شکل ۲).

بحث

نتایج این پژوهش از نقطه نظر یافتن روشی جدید به منظور القای تمایز سلول‌های بنیادی رویانی موش به سلول‌های پیش‌ساز اندوتلیال حایز اهمیت است. به ویژه اینکه سلول‌های تمایز یافته به صورت یک رده سلولی، قادر به تکثیرند. فنوتیپ و ژنوتیپ این سلول‌ها با انجام ارزیابی‌های ایمونوسیتوشیمی و RT-PCR تایید شد و همچنین در ارزیابی عملکردی مشخص شد سلول‌های تمایز یافته، توانایی تشکیل ساختارهای شبه مویرگی (Formation Tube Assay) را دارا هستند. سلول‌های بنیادی رویانی ES دودمان سلولی پراستعدادی هستند که برای اولین بار از بلاستوسیست موش کوچک آزمایشگاهی جداسازی شدند (۷). از آن پس محققان در کشورهای مختلف از جمله ایران موفق شدند دودمان‌های دیگری از سایر گونه‌های حیوانات آزمایشگاهی و همچنین انسان تهیه کنند (۸، ۹). تکثیر نامحدود سلول‌های ES در محیط کشت، منبع عظیمی از سلول‌های تمایز نیافته را فراهم می‌کند که کاربردهای بالقوه درمانی بسیاری دارند (۱۰). با تولید مقادیر زیادی از جمعیت‌های سلولی خالص، مانند سلول‌های عضله قلبی، سلول‌های خونی، سلول‌های اندوتلیال و عصبی می‌توان از این سلول‌ها در روش‌های سلول درمانی استفاده کرد. تا قبل از سال ۱۹۹۷، زمانی که برای اولین بار آساهارا و همکارانش توانستند سلول‌های پیش‌ساز اندوتلیال را از خون محیطی انسان جداسازی کنند (۱۱)، باور بر این بود که پس از تولد، تولید سلول‌های اندوتلیال جدید فقط از طریق تکثیر، مهاجرت و تغییر شکل (Remodeling) سلول‌های اندوتلیال عروق خونی از پیش موجود امکان‌پذیر است فرآیندی که اصطلاحا آنژیوژنزیس نامیده می‌شود، در حالی که محققان مذکور نشان دادند که فرآیند واسکولوژنزیس بعد از تولد هم اتفاق می‌افتد. در طی این فرآیند که بیشتر در طی تکامل جنین رخ می‌دهد عروق خونی جنین از سلول‌های پیش‌ساز اندوتلیال یا آنژیوبلاست‌ها حاصل می‌شوند (۱۱). از نظر بیان ژنی، آنژیوبلاست‌ها و سلول‌های هماتوپویتیک (Hematopoietic Stem Cells: HSCs)، هردو آنتی‌ژن‌های مشابهی را بیان می‌کنند که از جمله آنها می‌توان به آنتی‌ژن‌های CD34 و Flk-1 اشاره کرد. لذا به راحتی می‌توان حدس زد که این سلول‌ها از یک منشاء مشترک برخوردار هستند (۱۱، ۱۲). Flk-1 گیرنده‌ای برای فاکتور رشد VEGF است که در هردو دسته سلول‌های هماتوپویتیک اولیه و سلول‌های اندوتلیال بیان می‌شود، اما بیان آن در سلول‌های هماتوپویتیک تمایز یافته از دست می‌رود. Flk-1 همچنین در موش با نام VEGFR-2 شناخته شده و همولوگ انسانی آن KDR است (۱۱). آساهارا و همکارانش با تکیه بر این واقعیت و در جهت اثبات این فرضیه که خون محیطی حاوی سلول‌هایی است که می‌توانند به سلول‌های اندوتلیال تمایز پیدا کنند اقدام به جداسازی سلول‌های $CD34^+$ از خون محیطی انسان و Flk-1 مثبت از خون محیطی موش کردند و پس از کشت آنها در شرایط خاص آزمایشگاهی توانستند آنها را به سلول‌های اندوتلیال تمایز دهند.آنها برای تایید فنوتیپ سلول‌های شبه اندوتلیال حاصل از سلول‌های تک هسته‌ای، علاوه بر ارزیابی توانایی سلول‌ها در جذب Acl-Dil و اتصال به لکتین، بیان ژن‌های Flk-1/KDR و CD31 را بررسی و بیان این ژن‌ها را در سلول‌های مذکور مشاهده کردند. آنها همچنین از طریق پیوند سلول‌های پیش‌ساز اندوتلیال به مدل‌های ایسکمیک حیوانات آزمایشگاهی، ماهیت عملکردی سلول‌های تمایز یافته را تایید کردند (۱۱).

کافمن و همکارانش توانستند از طریق کشت سلول‌های ES میمون در محیط کشت پایه سلول‌های اندوتلیال که حاوی فاکتورهای رشد VEGF، bFGF، IGF و EGF بود، این سلول‌ها را به سلول‌های پیش‌ساز اندوتلیال تمایز دهند. به گونه‌ای که سلول‌های حاصل شده به لحاظ مورفولوژی یکنواخت و قادر به تکثیر بودند. این سلول‌ها قادر به بیان اکثر مارکرهای اختصاصی سلول‌های اندوتلیال از جمله Flk-1 بودند. همچنین در محیط *In Vitro* قادر به تشکیل ساختارهای شبه مویرگی پس از پیوند هم‌زمان آنها با رده سلول‌های تومورال C755 به زیر پوست توانستند در ساختار عروق تشکیل شده در تومور وارد شوند. البته بیان ژن‌های CD31 و VE-cadherin در سلول‌های به دست آمده مشاهده نشد. این محققان یکی از دلایل احتمالی توانایی سلول‌های ES میمون در تمایز به سلول‌های اندوتلیال با استفاده از محیط کشت EGM-2 را بیان غیرقابل انتظار ژن Flk-1 در سلول های ES تمایز نیافته میمون ذکر کردند (۶). لذا نظر به اینکه آساهارا و همکارانش (۱۱) و نیز کافمن و همکارانش (۶) در طی انجام دو مطالعه متفاوت توانستند به ترتیب سلول‌های تک هسته‌ای و Flk-1 مثبت موجود در خون محیطی و سلول‌های ES و Flk-1 مثبت میمون را از طریق کشت در محیط کشت EGM-2 به سلول‌های پیش‌ساز اندوتلیال تمایز دهند. در این مطالعه ابتدا با استفاده از روش نیشیکاوا و همکاران (۲) سلول‌های Flk-1 مثبت تهیه شد. سپس با استفاده از کشت سلول‌های Flk-1 مثبت حاصله در محیط

کشت EGM2، سلول‌های بنیادی رویانی موش به سلول‌های پیش ساز اندوتلیال تمایز یافتند. البته در این مطالعه همانند مطالعه آساهارا و همکاران هم‌زمان با محیط کشت EGM-2 از دیش‌های کشت پوشش داده شده با فیبرونکتین جهت القای تمایز سلول‌ها استفاده شد. در حالی که در مطالعه کافمن و همکاران فقط از دیش‌های مخصوص کشت سلول و فاقد هر گونه پوشش بیولوژیک استفاده شد (۱۱).

نتایج مطالعات قبلی که در زمینه نئوواسکولاریزاسیون جنینی انجام شده‌اند پیشنهاد می‌کند بیان هم‌زمان ژن‌های Flk-1 و VE-cadherin نقطه جدایی سلول‌های اندوتلیال از سلول‌های رده‌های سلولی خون‌ساز محسوب می‌شود (۱۳). علاوه بر این، ترکیبی از آنتی‌بادی‌های مونوکلونال که واکنش آنها بر علیه Flk-1، VE-cadherin، CD31 مثبت است، بیانگر مراحل حدواسط تمایز سلول‌های اندوتلیال از سلول‌های بنیادی رویانی است و توانایی سلول‌ها در جذب Acl-Dil و اتصال به لکتین باعث شناسایی بیشتر سلول‌های اندوتلیال می‌شود (۱، ۲، ۱۴). در این مطالعه همانند مطالعه کافمن و همکاران بیان ژن VE-cadherin در سلول‌های تمایز یافته مشاهده نشد. در این ارتباط مطالعاتی وجود دارد که عدم بیان ژن مذکور را در بعضی از رده‌های سلولی اندوتلیال گزارش کرده‌اند (۴، ۱۵). آنچه از این مطالعه و نیز مطالعات قبلی می‌توان نتیجه گرفت این است که بیان ژن Flk-1 برای تمایز سلول‌های بنیادی و به ویژه سلول‌های ES ضروری است و محیط کشت EGM-2 محیط کشت مناسبی جهت القای تمایز سلول‌های Flk-1 مثبت به سلول‌های پیش‌ساز اندوتلیال است. همچنین نظر به اینکه هر دو رده سلول‌های پیش‌ساز اندوتلیال تمایز یافته از میمون و موش قادر به تکثیرند و بدین‌ترتیب یک منبع غنی از سلول‌های پیش‌ساز اندوتلیال برای انجام مطالعات مختلف فراهم می‌شود، می‌توان گفت که سلول‌های ES، منشاء مناسبی جهت مطالعه تکوین سلول‌های اندوتلیال و مطالعات سلول درمانی مبتنی بر به کارگیری سلول‌های اندوتلیال محسوب می‌شوند.

تقدیر و تشکر

این پژوهش با هزینه و مساعدت واحد معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی کردستان انجام شد که بدینوسیله قدردانی می‌شود. همچنین نویسندگان مقاله مراتب تقدیر و تشکر خود را از حسن همکاری پژوهشکده رویان ابراز می‌دارند.

References

1. Vittet D, Prandini MH, Berthier R, Schweitzer A, Martin Sisterno H, Uzan G, Dejana E. Embryonic stem cells differentiate in vitro to Endothelial cells through successive maturation steps. Blood. 1996; 88(9): 3424-3431

2. Nishikawa SI, Nishikawa S, Hirashima M, Matsuyoshi N, Kodama H. progressive lineage analysis by cell sorting and culture identifies FLK+VE-cadherin+ cells at a diverging point of endothelial and hemapoietic lineages. Development. 1998; 125: 1747

3. Ogawa M, kizumoto M, Nishikawa S, Fujimoto T, kodama H, Nishikawa SI. Expression of α4–Integrin defines the earliest Precursor of hematopoietic cell lineage diverged from endothelial cells. Blood. 1999; 93(4): 1168-1177

4. Balconi G, Spagnuolo R, Dejana E. Development of endothelial cell line from embryonic stem cells. Arterioscler Thromb vasc Biol. 2000; 20: 1443 -1451

5. Hirai H, Ogawa M, Suzuki N, Yamamoto M, Breier G, Mazda O, Imanishi J, Nishikawa S. Hemogenic and nonhemogenic endothelium can be distinguished by the activity of fetal liver kinase (FLK)-1 promoter/enhancer during mouse embryogenesis. Blood. 2003; 101(3): 886-893

6. Kaufman DS, Lewis RL, Hanson ET, Auerbach R, Plendl J, Thomson JA. Functional endothelial cells derived from rhesus monkey embryonic stem cells. Blood 2004; 103 (4): 1325-1332

7. Martin GR. Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1981, 78(12): 7634-7638

8. Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS, Jones JM. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. Science. 1998; 282: 1145-1147

9. Baharvand H, Ashtiani SK, Valojerdi MR, Shahverdi A, Taee A, Sabour D. Establishment and in vitro differentiation of a new embryonic stem cell line from human blastocyst. Differentiation. 2004; 72(5): 224-229

10. D'Amour K, Gage FH. New tools for human developmental biology. Nature Biotechnology. 2000; 18: 381-382

11. Asahara T, Murohara T, Sullivan A, Silver M, van der Zee R, Li T, Witzenbichler B, Schatteman G, Isner JM. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis.Science. 1997; 275: 964-966

12. Flamme I, Risau W. Induction of vasculogenesis and hematopoiesis in vitro. Development. 1992; 116(2): 435-439

13. Choi K, Kennedy M, Kazarov A, Papadimitriou JC, Keller G. A common precursor for hematopoietic and endothelial cells. Develop. 1998; 125: 725-732

14. 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 (Cambridge, U.K.).1993; 118: 489-498

15. Cines DB, Pollak ES, Buck CA, Loscalzo J, Zimmerman GA, McEver RP, Pober JS, Wick TM, Konkle BA, Schwartz BS, Barnathan ES, McCrae KR, Hug BA, Schmidt AM, Stern DM. Endothelial cells in physiology and in the pathophysiol of vascular disorders. Blood. 1998; 91(10): 3527-3561