



## روش‌های تکثیر سلول‌های بنیادی خونساز در شرایط آزمایشگاهی

آزاده انبارلو<sup>۱</sup>، امیر آتشی<sup>۱\*</sup>، مسعود سلیمانی<sup>۱</sup>، منصوره عجمی<sup>۱</sup>، منیره عجمی<sup>۲</sup>،  
غلامرضا خمیسی پور<sup>۳</sup>

<sup>۱</sup> گروه هماتولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

<sup>۲</sup> گروه هماتولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران

<sup>۳</sup> گروه هماتولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی بوشهر، بوشهر، ایران

(دریافت مقاله: ۹۳/۱/۳۱ - پذیرش مقاله: ۹۳/۱۱/۱۴)

### چکیده

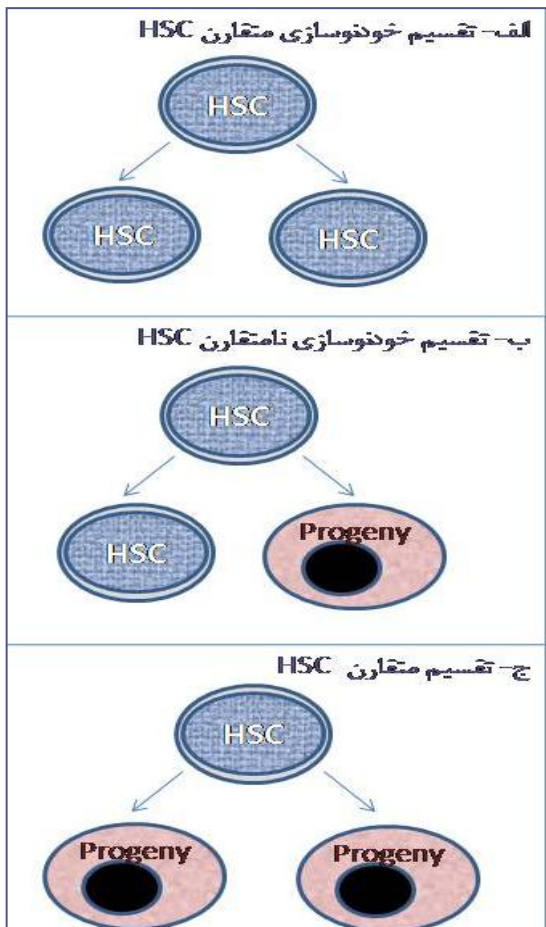
سلول‌های بنیادی خونساز، سلول‌های نادری هستند که دارای دو توانایی منحصر به فرد خود نوسازی و تمایز به همه سلول‌های رده‌های خونسازی هستند. از این سلول‌ها در درمان بسیاری از بیماری‌ها از جمله لوسمی، ناهنجاری‌های مادرزادی مرتبط با خون و سیستم ایمنی، آنمی آپلاستیک استفاده شده است. سلول‌های بنیادی مغز استخوان و سلول‌های بنیادی در جریان خون محیطی رایج‌ترین منابع برای پیوند هستند؛ اگرچه استفاده از آن‌ها به علت دسترسی پایین به اهدا کنندگان با آنتی ژن لکوسیت انسانی (HLA) سازگار، محدود شده است. یک روش جایگزین برای این مشکل استفاده از خون بند ناف است که تا حدودی عدم تطابق اهدا کنندگان را می‌پذیرد، با این حال تعداد سلول‌های موجود در هر واحد خون بند ناف برای پیوند به یک فرد بزرگسال کافی نیست. در حال حاضر روش‌های مختلفی برای گسترش سلول‌های بنیادی خونساز در شرایط *ex vivo* به کار گرفته می‌شود. این روش‌ها شامل استفاده از کوکتل‌های سایتوکاینی، شلاتورهای مس، حمایت استرومایی و انتقال ژن می‌باشد که تاکنون انتقال ژن مؤثرترین و امیدبخش‌ترین روش بوده است. از جمله ژن‌های به کار رفته جهت افزایش گسترش سلول‌های بنیادی خونساز با استفاده از وکتورهای لنتی ویروسی و پروتئین‌های نوترکیب عبارتند از *HOXB4*، *WNT*، *Notch*، *BMP4*، *BMI-1* و *SALL4* و به تازگی نشان داده شده که *microRNA*های *miR-17*، *miR-125a/b* و *miR-29a* نیز می‌توانند گسترش سلول‌های بنیادی خونساز را در شرایط *ex vivo* افزایش دهند.

واژگان کلیدی: تکثیر، سلول‌های بنیادی خونساز، انتقال ژن، فاکتورهای رونویسی، *microRNA*

\* تهران، گروه هماتولوژی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

## مقدمه

نوع اول در طول تکامل سیستم خونسازی در کبد جنین و همچنین پس از پیوند مغز استخوان روی می‌دهد اما دستیابی به آن در شرایط *ex vivo* بسیار سخت است، نوع ۲ در خونسازی دوران بزرگسالی و همچنین در محیط‌های گسترش HSC در شرایط *ex vivo* روی می‌دهد. نوع ۳ در شرایط پاتولوژیک و همچنین در طی کشت HSC در *ex vivo* اتفاق می‌افتد (۳).



شکل ۱) تقسیمات سلول‌های بنیادی خونساز. الف) تولید ۲ سلول دختری شبیه با سلول مادری. ب) تولید یک سلول دختری شبیه با سلول مادری و یک سلول تمایز یافته. ج) تولید دو سلول تمایز یافته

با توجه به محدودیت‌های ذکر شده برای استفاده از HSCs دانشمندان به فکر گسترش این سلول‌ها در شرایط *ex vivo* افتادند. در حالی که پیوند مغز

سلول‌های بنیادی خونساز یا (HSCs) hematopoietic stem cells سلول‌های نادری هستند که دارای دو توانایی منحصر به فرد خود نوسازی (Self-renewality) و تمایز به همه سلول‌های رده‌های خونسازی هستند (۱ و ۲).

این سلول‌ها در مغز استخوان و کبد جنین، خون بند ناف، مغز استخوان بالغ (adult) و خون محیطی یافت می‌شوند، از HSCs در درمان بسیاری از بیماری‌ها از جمله لوسمی، ناهنجاری‌های مادرزادی مرتبط با خون و سیستم ایمنی، آنمی آپلاستیک و هموگلوبینوپاتی‌ها استفاده می‌شود (۲). سلول‌های بنیادی مغز استخوان و سلول‌های بنیادی mobilize شده خون محیطی رایج‌ترین منابع برای پیوند هستند؛ اگرچه استفاده از آن‌ها به علت دسترسی پایین به اهدا کنندگان با human leukocyte antigen (HLA) سازگار محدود شده است. یک روش جایگزین برای این مشکل استفاده از خون بند ناف (یک منبع غنی از HSCs) است که تا حدودی عدم تطابق اهدا کنندگان را می‌پذیرد، با این حال تعداد سلول‌های موجود در هر واحد خون بند ناف برای پیوند به یک فرد بزرگسال کافی نیست (۳). سلول‌های بنیادی خونساز قادر به انجام ۳ نوع تقسیم می‌باشند (شکل ۱).

الف) Symmetrical HSC self-renewal division  
تولید دو سلول دختری با ویژگی‌های یکسان با سلول مادری

ب) Asymmetrical HSC self-renewal division  
تولید یک سلول دختری با ویژگی‌های مشابه مادری و یک سلول تمایز یافته

ج) Symmetrical HSC division  
تولید دو سلول تمایز یافته

ex vivo شامل فاکتور سلول بنیادی (SCF)،  
 ترومبوپوئیتین (TPO)، Fms-related tyrosine  
 kinase 3 ligand (Flt3L)، ایتروکین-۳ (IL-3)،  
 ایتروکین-۶ (IL-6)، فاکتور تحریک کننده کلونی  
 گرانولوسیتی (G-CSF)، فاکتور تحریک کننده کلونی  
 گرانولوسیتی- مونوسیتی (GM-CSF) و  
 ایتروپوئیتین می‌باشد. شایع‌ترین ترکیبی از  
 سایتوکاین‌ها که مورد استفاده قرار می‌گیرد مخلوطی از  
 SCF، TPO و Flt3L است (۴).  
 مطالعات بالینی صورت گرفته با استفاده از HSCs  
 مشتق از مغز استخوان یا خون بندناف که با کوکتل‌های  
 سایتوکاینی متنوعی (ترکیبی از SCF، TPO،  
 Flt3-L، IL-3 و IL-6) کشت داده شده‌اند نتایج  
 رضایت بخشی را به همراه نداشت، در نتیجه به  
 فاکتورها و شرایط جدیدی برای تکثیر HSCs نیاز  
 است (۲ و ۳).

#### تکثیر سلول‌های بنیادی با استفاده از Chelators

کوشش‌های بیشتری به منظور بهینه‌سازی شرایط کشت  
 مانند به کارگیری محیط‌های فاقد سرم صورت گرفت  
 (۵). علاوه بر این، یون‌هایی مثل منیزیم، کلسیم یا مس  
 نقش مهمی در عملکرد سلولی ایفا می‌کنند زیرا  
 اختلال در هموستاز این یون‌ها با علائم بالینی همراه  
 است (۳). سوء تغذیه مس منجر به توقف در بلوغ  
 سلول‌های خونی می‌شود، در حالی که بر تکامل  
 سلول‌های پروژنیاتور اثر نمی‌گذارد که نشان دهنده این  
 است که تنظیم تعادل مس ممکن است در تکثیر و  
 تمایز سلول‌های بنیادی/ پروژنیاتوری  
 hematopoietic خونساز  
 (HS/PCs) stem/progenitor cells نقش داشته  
 باشد. مطالعات بر روی محتوای مس سلولی در شرایط

استخوان بیش از سه دهه است که در بالین مورد  
 استفاده قرار می‌گیرد اما استفاده از HSCs به علت  
 عدم توانایی در گسترش این سلول‌ها در ex vivo به  
 صورت محدود باقی مانده است.  
 در حال حاضر روش‌های مختلفی برای گسترش  
 سلول‌های بنیادی خونساز در شرایط ex vivo به کار  
 گرفته می‌شود که در زیر توضیح داده می‌شوند. با  
 توجه به مشکلات پیرامون گسترش HSCs در شرایط  
 ex vivo پژوهشگران در نشریه‌ای در سال ۲۰۱۰  
 شرایطی که برای تکثیر HSCs در شرایط  
 in vitro باید مدنظر قرار گرفته شود را شرح نمودند: (الف)  
 HSCs باید قادر به تکثیر در مقیاس‌های بزرگ بدون  
 به خطر افتادن توانایی خودنوسازی خود باشند؛ (ب)  
 تکثیر HSCs باید بی‌خطر و قابل پیوند و روش مورد  
 استفاده عاری از سلول‌های تغذیه کننده  
 (feeder cells)، پروتئین‌های سرم و یا عوامل  
 میکروبی باشد (۴).

#### بحث

تکثیر سلول‌های بنیادی خونساز با استفاده از  
 سایتوکاین‌ها  
 سلول‌های خون بند ناف (CD133+ یا CD34+)  
 معمولاً در محیطی حاوی ترکیبی از سایتوکاین‌ها،  
 فاکتورهای رشد و دیگر مواد افزودنی کشت داده  
 می‌شوند. سایتوکاین‌ها به دلیل نقشی که در تنظیم  
 سرنوشت سلول‌های بنیادی/ پروژنیاتوری خونساز  
 دارند به صورت گسترده در کشت ex vivo این  
 سلول‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرند. اگرچه ترکیب  
 بهینه سایتوکاین‌ها هنوز دقیقاً مشخص نشده است.  
 سایتوکاین‌های رایج مورد استفاده در گسترش  
 سلول‌های بنیادی/ پروژنیاتوری خونساز در شرایط

MSCs عدم نیاز به جداسازی سلول‌های CD34+ یا CD133+ جهت گسترش HSC اولیه می‌باشد (۶).

**تکثیر سلول‌های بنیادی خونساز با استفاده از انتقال ژن**  
به منظور تعیین شرایط بهینه برای تکثیر HSCs در *in vitro*، محققان پارامترهای مختلفی را به امید افزایش تعداد سلول‌های بنیادی قابل پیوند تحت بررسی قرار دادند. سلول‌های بنیادی خونساز در یک حالت تمایز نیافته و نامیرا به مدت طولانی در نیچ یا کنام سلولی باقی مانده و آن را ترک نمی‌کنند. بنابراین مسیرهای تبادل پیام موجود در ریزمحیط مربوط به سلول‌های بنیادی در مغز استخوان، نیازمند درک و بررسی بیشتر هستند. در این راستا پژوهشگران با دستکاری در برخی از ژن‌های مسیرهای پیام‌رسانی نتایج مثبتی را به دست آوردند (۴).

محققان از ژن‌های مؤثر بر تکثیر HSCs در شرایط *ex vivo* مانند فاکتور رونویسی (HoxB4) **homeobox B4**، گیرنده‌های خانواده Notch و همچنین پروتئین‌های مسیر پیام‌رسانی Wnt و چند ژن دیگر استفاده نمودند که در ادامه به آن‌ها پرداخته می‌شود. ژن‌های خانواده HOX در چهار دسته A، B، C و D طبقه‌بندی می‌شوند و هر یک از این دسته‌ها حاوی ۱۳ پارالوگ می‌باشند. چندین عضو از این خانواده در سلول‌های بنیادی خونساز بیان می‌شوند. ژن‌های مهم مرتبط با فعالیت خودنوسازی، بیشتر در سلول‌های بنیادی اولیه CD34+ و CD38- بیان می‌شوند و به تدریج در سلول‌های بالغ‌تر بیان آن‌ها کاهش می‌یابد. از آنجایی که الگوی بیان ژن‌های Hox، مشابه این ژن‌ها می‌باشد به نظر می‌رسد که ژن‌های خانواده HOX ممکن است در فرایندهای خودنوسازی ایفا نقش کنند (۹).

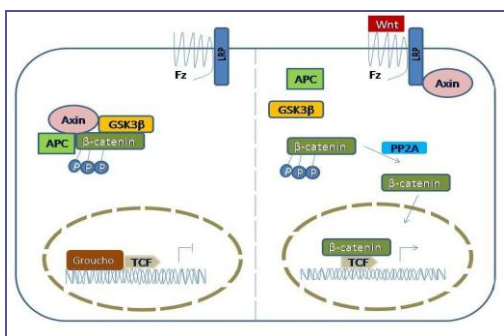
کشت *ex vivo* ثابت کرد که افزایش سطوح مس، بلوغ سلولی را افزایش داده در حالی که کاهش سطوح مس آزاد به وسیله Tetraethylenepentamine (TEPA) (یک شلاته‌کننده مس) و استرس اکسیداتیو پایین‌تر منجر به کاهش تمایز HS/PCs انسانی و در نتیجه افزایش تکثیر سلول‌های پروژنیوتوری اولیه در *ex vivo* می‌گردد (۳، ۶ و ۷).

### تکثیر سلول‌های بنیادی با استفاده از Co-culture

ریز محیط (microenvironment) خونسازی شامل سلول‌های بنیادی خونساز و همچنین سلول‌های غیرهماتوپوئیتیک بوده که این سلول‌ها برخی از سیگنال‌های مولکولی ضروری برای خودنوسازی، تکثیر و همچنین تنظیم تمایز HSCs را فراهم می‌کنند (۷). هم‌کشتی (Co-culture) HS/PCs با سلول‌های استرومایی در حضور فاکتورهای رشد *ex vivo* به عنوان یک استراتژی کشت به منظور شبیه‌سازی برهمکنش بین سلول‌های نیچ یا کنام سلولی با HS/PCs محسوب می‌شود. فرض بر این است که سلول‌های استرومایی اثرات مثبتی بر روی HS/PCs فراهم می‌کنند این عمل نه تنها از طریق حمایت فیزیکی و انتقال سیگنال‌های حاصل از برهمکنش‌های بین سلولی، بلکه از طریق ترشح فاکتورهای تنظیمی محلول انجام می‌شود.

در میان سلول‌های موجود در ریز محیط مغز استخوان، سلول‌های بنیادی مزانشیمی (MSCs)؛ قادر به تمایز به استئوبلاست‌ها، کندروسیت‌ها و سلول‌های چربی می‌باشند. هنگامی که این سلول‌ها همراه با سلول‌های CD34+ خون بندناف تزریق شوند، منجر به بهبود پیوندپذیری و کاهش بیماری پیوند علیه میزبان **Graft versus host diseases (GVHD)** می‌گردند (۵ و ۸). یکی از فواید هم‌کشتی HSCs با

گلیکوپروتئین ترشح شده و برای فرایندهای اساسی تکامل مثل تکثیر سلول‌های پروژنیوتوری، خصوصیات سرنوشت سلولی و کنترل تقسیمات asymmetric در بافت‌های مختلف ضروری هستند (۴). مسیر پیام‌رسانی Wnt تمایز سلول‌های بنیادی رویانی (ESCs) را تنظیم نموده و منجر به حفظ قابلیت‌های ESCs می‌شود. یعنی کمک می‌کند که آن‌ها در موقعیت پلوری پوتنسی باقی بمانند. در چندین مطالعه نقش خانواده Wnt در تنظیم بنیادینگی (stemness) و ظرفیت خودنوسازی HSCs نشان داده شده است. مسیر پیام‌رسانی Wnt1/ $\beta$ -catenin به واسطه BMP4 باعث القا خودنوسازی در ESCs موشی می‌گردد (۱۱). اتصال لیگاند Wnt به گیرنده خود Frizzled باعث فعال شدن  $\beta$ -catenin و انتقال آن به هسته و در نهایت منجر به فعال شدن رونویسی از ژن‌های هدف Wnt می‌شود (شکل ۲). بیان نابجا از فرم فعال  $\beta$ -catenin منجر به تکثیر HSCs موش در *ex vivo* می‌گردد (۳ و ۷).



شکل ۲) مسیر متعارف Wnt. اتصال لیگاند Wnt به گیرنده خود Frizzled باعث فعال شدن  $\beta$ -catenin و انتقال آن به هسته و در نهایت منجر به فعال شدن رونویسی از ژن‌های هدف Wnt می‌شود.

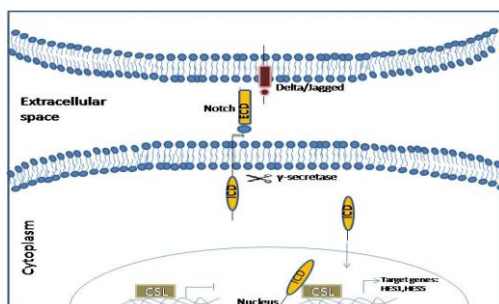
نیکولوا (Nikolova) و همکاران نشان دادند که محیط‌های حاوی Wnt1 و Wnt3a قادر به افزایش تکثیر و حفظ حالت نابالغ سلول‌های CD133+

HOXB4 که عضوی از خانواده HOX می‌باشد و بر روی کروموزوم 17q21.32 قرار گرفته است بیشترین توجه را در زمینه تکثیر سلول‌های بنیادی خونساز به خود جلب کرده است (۹ و ۱۰). افزایش بیان HOXB4 در سلول‌های بنیادی رویانی (ESCs) منجر به افزایش تمایز به سمت خونسازی می‌گردد. همچنین HOXB4 در خودنوسازی HSCs نقش داشته و به این علت در حال حاضر بیشتر تحقیقات بر روی این فاکتور رونویسی صورت می‌گیرد (۱۰). افزایش بیان HoxB4 در موش و هم در انسان منجر به تکثیر گسترده HSCs در *ex vivo* شده است (۵ و ۷).

بیان نابجای HOXB4 در سطوح بالا در سلول‌های CD34+ خون بندناف افزایش قابل توجهی در تکثیر HSCs نشان داده است اما منجر به اختلال در تمایز میلواریتروئیدی و همچنین کاهش قابل توجهی در تولید سلول‌های B می‌شود (۵). برای جلوگیری از تغییرات ژنتیکی HSCs، سلول‌های CD34+ خون بندناف همراه با یک لایه سلول استرومایی بیان‌کننده پروتئین HOXB4 کشت داده شدند، سلول‌های CD34+ پروتئین HOXB4 را به صورت غیرفعالانه جذب نمودند که در نهایت منجر به افزایش ۲/۵ برابری در جمعیت سلول‌های بازجمعیت‌سازی بلند مدت (long-term) (repopulating cells) در مقایسه با نمونه کنترل گردید (۳، ۵ و ۷). از آنجایی که پروتئین HoxB4 نوترکیب نیمه عمری کوتاه‌تر از یک ساعت دارد و در محیط کشت بسیار ناپایدار است این محدودیت تکنولوژیکی باید قبل از کاربرد بالینی حل شود (۸).

پروتئین‌های Wnt نیز نقش کلیدی در طول تکامل اولیه جنین و همچنین در هموستاز بافتی بالغین بازی می‌کنند (۱۱). این پروتئین‌ها از ماکروفازها به صورت

(ECD) به لیگاند بیان شده بر سطح سلول‌های مجاور منجر به فعال شدن سیگنالینگ Notch می‌گردد (۷). (شکل ۳).



شکل ۳) مسیر پیام‌رسانی Notch. برهمکنش Notch با لیگاند موجب شکست پروتئولیتیک در Notch شده که این امر به نوبه خود منجر به آزاد شدن و انتقال دومین داخل سلولی (ICD) Notch به هسته شده که در آنجا با فاکتور رونویسی CSL (CBF1/RBPJ) به‌طور مستقیم متصل شده و این فاکتور از یک حالت مهارکننده رونویسی به یک فعال‌کننده رونویسی تبدیل می‌شود، که در نهایت منجر به بیان گروه گسترده‌ای از ژن‌های هدف می‌گردد.

نقش مسیر پیام‌رسانی Notch-1 در تنظیم HSCs از طریق مطالعه بر روی نیچ‌های HSCs مشخص شد. موش‌های فاقد گیرنده BMP یا گیرنده هورمون پاراتیروئید افزایشی در تعداد HSCs نشان دادند، که مرتبط با افزایش تعداد استئوبلاست‌ها بود. تشریح Jagged-1 از استئوبلاست‌ها افزایش یافته و منجر به افزایش فعال شدن سیگنال‌های Notch در HSCs شده بود. افزایش بیان مداوم Notch-1 فعال منجر به نامیرا شدن سلول‌های رده خون‌ساز با خاصیت خودنوسازی در داخل بدن می‌شود (۸).

استئوبلاست‌ها قادر به تنظیم HSCs از طریق مسیر پیام‌رسانی Notch می‌باشند. فعال شدن گیرنده‌های هورمون پاراتیروئید (PTH یا PTHrP) استئوبلاست‌ها منجر به افزایش لیگاند Notch (Jagged1) در استئوبلاست‌ها و متعاقب آن افزایش فعال شدن Notch1 در HSCs می‌گردد. مهار شکست پروتئولیتیک (جلوگیری از رهاسازی دومین

خون‌بندناف هستند، در حالی‌که Wnt4، Wnt5a و Wnt11-CM تمایز غیرخونسازی را بهبود می‌بخشند (۳ و ۱۱). اخیراً سلول‌های بنیادی مزانشیمی (MSCs) فعال شده با Wnt/β-catenin، یک نیچ فعالی فراهم نموده که باعث بهبود خودنوسازی HSCs در حدود ۴/۵ برابر در مغز استخوان اشعه دیده موش‌ها شده است (۱۱).

شکل ۲) مسیر متعارف Wnt. اتصال لیگاند Wnt به گیرنده خود Frizzled باعث فعال شدن β-catenin و انتقال آن به هسته و در نهایت منجر به فعال شدن رونویسی از ژن‌های هدف Wnt می‌شود.

مولکول‌های کوچکی که به طور اختصاصی مسیرهای سیگنالینگ را مورد هدف قرار می‌دهند یک نقش مهمی در خودنوسازی و حفظ HSCs دارند و در بهبود تکثیر در *ex vivo* موثر می‌باشند. ترکیب سنتتیک (6-bromoindirubin-3'-oxime) (BIO) می‌تواند فعالیت سیگنالینگ Wnt از طریق هدف قرار دادن GSK3α و β (یک تنظیم‌کننده منفی در مسیر پیام‌رسانی Wnt) تنظیم نماید (۳). هنگامی که BIO به محیط کشت سلول‌های CD34+ خون بندناف اضافه شد تکثیر در *ex vivo* افزایش نیافت اما بعد از پیوند این سلول‌ها به موش پذیرش پیوند افزایش یافت. با این حال نقش مسیر Wnt در خودنوسازی سلول‌های بنیادی همچنان مورد بحث باقی مانده است (۷).

در میان فاکتورهای پروتئینی که برای تکثیر HSPCs در *ex vivo* به کار می‌رود، لیگاندهای Notch اهمیت ویژه‌ای دارند (۵). در پستانداران ۴ گیرنده (Notch1-4) و ۵ لیگاند (Delta، ۱ و ۲، Delta، ۱، ۳ و ۴) تاکنون شناسایی شده است (۴ و ۷). اتصال دومین خارج سلولی گیرنده

کارآزمایی بالینی فاز ۱، بیماران تحت درمان Myeloablative دو واحد خون بند ناف دریافت می‌کنند که واحد اولی بدون دستکاری و دومی به واسطه Notch در *ex vivo* تکثیر یافته است. نتایج اولیه در این کارآزمایی بهبود سریع در نوتروپنی، افزایش در پیوندپذیری رده میلوئیدی و عدم وجود علامتی از GVHD متعاقب پیوند سلول‌های خون بند ناف انسانی تکثیر شده با Delta1 را نشان داد اگرچه پیوند طولانی مدت هنوز حاصل نشده است (۳، ۴ و ۶).

محیط‌های کشت حاوی سایتوکاین را می‌توان با اضافه کردن دیگر عوامل تکاملی مثل پروتئین Sonic hedgehog به منظور گسترش HSCs بهبود بخشید (۳). ژن‌های خانواده Hedgehog در تنظیم تمایز خونسازی، تکامل تیموس و تکامل اولیه هماتو-واسکولار دخیل هستند. اگرچه نبود سیگنالینگ Hedgehog هیچ تأثیری بر روی حفظ حالت بنیادی در HSCs در موش‌ها ندارد، اما مشخص شده که یک ژن Hedgehog، گیرنده مرتبط با آن و همچنین فاکتورهای رونویسی پایین دست آن هم در سلول‌های پیش‌ساز خونی انسان و هم در سلول‌های استرومای مشتق از مغزاستخوان بیان می‌شوند. علاوه بر این، دستکاری در مسیر پیام رسانی Hedgehog با آنتی‌بادی‌های خنثی کننده یا اضافه نمودن پروتئین نوترکیب، خودنوسازی و تکثیر وابسته به سایتوکاین در HS/PCs انسانی تخلیص شده را تغییر می‌دهد.

آنالیزهای بعدی نشان داد که اثر sonic hedgehog بر روی HS/PCs انسانی ممکن است به واسطه مسیر پیام رسانی Bone morphogenic protein-4 (BMP4) باشد (۳، ۷ و ۸). زیرا مهار BMP4 گسترش ناشی از Shh را از بین می‌برد. از آنجایی که HSCs انسانی

داخل سلولی) Notch با استفاده از مهارکننده  $\gamma$ secretase منجر به کاهش اثرات حمایتی تا حد پایه می‌گردد، که نشان‌دهنده این است که استئوبلاست‌ها می‌توانند تکثیر HSCs از طریق مسیر پیام رسانی Notch در *in vivo* تنظیم کنند (۱۲).

دلانی (Delaney) و همکاران برای جلوگیری از نگرانی‌های حاصل از انتقال رتروویروسی، اقدام به طراحی نوعی لیگاند Notch کرده که حاوی دومین خارج سلولی Jagged-1 و Delta-1 بودند. در داخل بدن لیگاندهای Notch گیرنده‌های خود را از طریق حرکت بر روی EDC گیرنده فعال می‌کنند؛ بنابراین عدم تحرک لیگاند برای فعال کردن مسیر پیام رسانی Notch در *in vitro* ضروری است. با استفاده از فرم بی‌حرکت از لیگاند Notch (Delta1)، آن‌ها قادر به فعال کردن گیرنده‌ها و القا تکثیر در سلول‌های بنیادی/پیش‌ساز موشی شدند که این سلول‌ها قادر به بازسازی در داخل بدن مشابه با آزمایشات حاصل از افزایش بیان Notch به واسطه انتقال رتروویروسی بودند (۷-۵). در حقیقت کشت سلول‌های پیش‌ساز خونی موش با لیگاند بی‌حرکت Delta1 و سایتوکاین‌ها (Flt-3L، IL-11، IL-6، SCF) منجر به افزایش چندین برابری در سلول‌های پیش‌ساز با توانایی بازجمعیت سازی (توانایی تشکیل مجدد انواع سلول‌های خونی بعد از تزریق سلول‌های بنیادی خونساز) کوتاه مدت لنفوئیدی و میلوئیدی گردید (۳ و ۷). مشابه با نتایج حاصل از تکثیر با پروتئین‌های Wnt، تکثیر به واسطه Notch نیز ممکن است وابسته به دوز باشد چرا که تکثیر HS/PCs تنها در غلظت‌های پایینی از Delta1 مشاهده می‌شود.

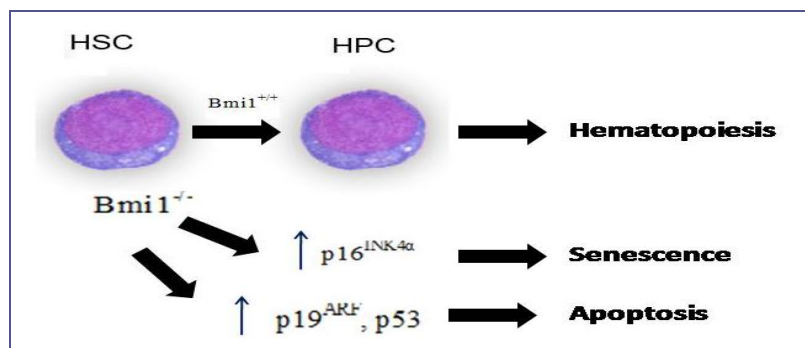
لیگاند Notch طراحی شده برای تکثیر در *ex vivo* در حال حاضر تحت مطالعات بالینی قرار دارد. در یک



مطالعات اخیر نشان داده که تنظیم اپی ژنتیکی HSCs برای خودنوسازی و محدودیت ردهای HSCs مهم است. در میان تنظیم کننده‌های اپی ژنتیکی، نقش پروتئین‌های گروه Polycomb در حفظ HSCs به خوبی مشخص شده‌اند (۵). عملکرد پروتئین‌های گروه Polycomb در دو کمپلکس اصلی در مهره‌داران به صورت PCR1 و PCR2 شناخته شده است (۴ و ۱۴). BMI1 عضوی از PCR1 بوده و عامل کلیدی در خودنوسازی سلولی می‌باشد. BMI1 در HSCs بیان شده و در سلول‌های لنفوئیدی حفظ می‌شود اما بیانش پس از تمایز به سمت رده‌های میلوئیدی و اریتروئیدی کاهش می‌یابد (۴). پارک (Park) و همکاران با استفاده از RT-PCR و آنالیزهای بیان ژن پی بردند که Bmi-1 در HSCs انسانی و موشی بیان بسیار بالایی دارد. علاوه بر این، بیان ژن‌های مرتبط با خودنوسازی، بقا، فاکتورهای رونویسی و تکثیر در سلول‌های بنیادی مثل p16INK4 $\alpha$  و p19ARF در سلول‌های کبد جنینی در موش‌های Bmi-1<sup>-/-</sup> کاملاً تغییر یافته بود. BMI1، p16INK4 $\alpha$  را به منظور اجازة تکثیر به HSCs و p19ARF را به منظور جلوگیری از آپوپتوز از طریق p53 مورد هدف قرار می‌دهد (شکل ۴). این نتایج نشان دهنده این است که Bmi-1 برای تولید و تمایز سلول‌های HSC با توانایی خودنوسازی ضروری است (۱۴ و ۱۵).

گیرنده‌های BMP را بیان می‌کنند، اضافه کردن BMP4 محلول می‌تواند تکثیر و حفظ HS/PCs انسانی پس از کشت در محیط *in vitro* را بهبود ببخشد (۳). BMP4 یکی از اعضای خانواده بزرگ TGF- $\beta$  است. در این خانواده سایتوکاین‌های مختلفی از قبیل TGF- $\beta$ s، inhibins، activins و bone morphogenetic proteins (BMPs) قرار دارند. این خانواده در طیف گسترده‌ای از پاسخ‌های بیولوژیک مثل رشد سلول، آپوپتوز و تمایز در انواع مختلفی از سلول‌ها نقش دارند (۱۳). اضافه کردن BMP4 به کوکتل سایتوکاینی می‌تواند مدت کشت HS/PCs مشتق از خون بند ناف را بدون از دست دادن توانایی بازجمعیت‌سازی آن‌ها در داخل بدن گسترش دهد که نشان دهنده نقش بالقوه BMP4 در بقا HS/PCs در *ex vivo* می‌باشد (۷ و ۸).

از دیگر ژن‌های مرتبط با تکثیر سلول‌های بنیادی، B-cell-specific Moloney murine leukemia virus integration site 1 (BMI-1) است که متعلق به خانواده ژن‌های Polycomb است (۱۴). پروتئین‌های گروه Polycomb (PcG) و گروه Trithorax (TrxG) به عنوان تنظیم کننده‌های اپی ژنتیک مطرح شده‌اند. این گروه‌ها به صورت آنتاگونیستی جهت افزایش یا مهار رونویسی از طریق تنظیم تغییرات آمینواسیدی خاص در هیستون‌ها عمل می‌کنند (۴).

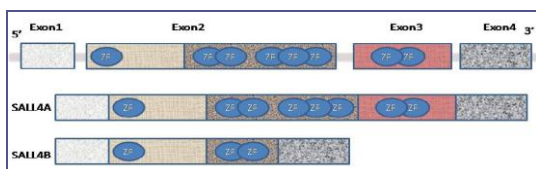


شکل ۴) مدل پیشنهادی برای نقش Bmi-1 در حفظ حالت بنیادی در HSC. سلول‌های بنیادی خون‌ساز در نبود Bmi-1 به واسطه افزایش p16INK4 $\alpha$  به سمت پیری و به واسطه p19ARF از طریق p53 به سمت آپوپتوز می‌روند.



خودنوسازی و تمایز HSCs نقش دارد، BMI-1 یکی از ژن‌های پایین دستی در مسیر Hedgehog است و دستکاری در مسیر Hedgehog که وابسته با خودنوسازی و تمایز سلول‌های بنیادی پستانداران بوده ممکن است به واسطه BMI1 صورت گرفته باشد (۱۴) (شکل ۵).

فاکتور رونویسی SALL4 دارای دومین Zinc finger می‌باشد (شکل ۶) و ژن آن بر روی کروموزوم q 20 قرار دارد و به طور طبیعی بیان آن تنها محدود به سلول‌های بنیادی هماتوپوئیتیک CD34+ است (۱۷). SALL4 از طریق برهمکنش با فاکتورهای رونویسی Oct4 و Nanog در حفظ ویژگی‌های سلول‌های بنیادی رویانی (ESCs) نقش دارد (۱، ۲ و ۱۶). SALL4 هم به‌عنوان فعال کننده و هم مهارکننده رونویسی ژن عمل می‌کند، ژن‌های دخیل در تمایز را مهار و ژن‌های کلیدی در Pluripotency را فعال می‌کند (۱).

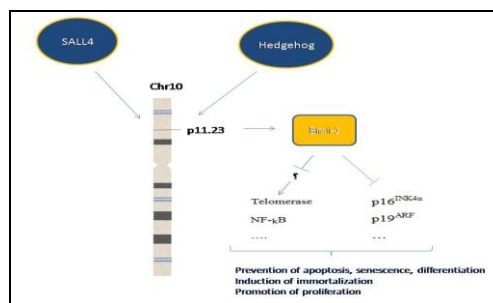


شکل ۶) نمای شماتیک از ایزوفرم‌های SALL4. ایزوفرم‌های SALL4 دارای تعداد متفاوتی از دومین‌های Zinc finger هستند.

آنالیز جایگاه‌های اتصال SALL4 بر روی ژن‌ها نشان داد که این فاکتور در فرایندهایی نظیر مرگ سلولی، سرطان، همانندسازی/ترمیم DNA و چرخه سلولی دخیل است. این ژن‌ها شامل ۳۸ تا از مهم‌ترین ژن‌های القا کننده آپوپتوز (CARD11, CYCS, LTA, CARD9, TP53, PTEN, TNF) و ژن‌های مهارکننده آپوپتوز (TEGT, DAD1, XIAP, BCL2, Bmi1) هستند (۱۶). فاکتور رونویسی

افزایش بیان اعضای خانواده Polycomb خصوصاً ژن Ezh2 یا Bmi1 قادر به تنظیم فعالیت HSCs از طریق جلوگیری از خستگی سلول بنیادی (stem cell exhaustion) یا افزایش خودنوسازی می‌باشد (۳). مطالعات نشان داد که افزایش بیان BMI1 در سلول‌های CD34+ خون بند ناف منجر به حفظ حالت بنیادی در HSCs می‌شود. در نهایت بعد از یک دوره کشت ۱۰ روزه این سلول‌ها، بهبودی در پیوندپذیری در موش‌های NOD-SCID نشان دادند (۴).

افزایش بیان ژن‌های PcG مثل Bmi-1 و Ezh2 ظرفیت خودنوسازی HSCs موشی را تقویت می‌کند. مطالعات اخیر همچنین نتیجه مشابهی از افزایش بیان BMI-1 در سلول‌های CD34+ خون بند ناف انسانی نشان داد (۵).



شکل ۵) نقش‌های مهمی در تنظیم سلول‌های بنیادی از طریق فعال کردن مسیرهای مختلف ایفا می‌کند. ژن Bmi-1 که بر روی بازوی کوتاه کروموزوم ۱۰ قرار گرفته بیان آن تحت کنترل دیگر ژن‌های دخیل در گسترش سلول‌های بنیادی خونساز می‌باشد.

ژن BMI-1 که بر روی کروموزوم 10p11.23 انسانی قرار گرفته است، پروتئینی با وزن مولکولی ۳۶/۹ کیلودالتون را کد نموده (۱۴) این ژن توسط فاکتور رونویسی دیگری به نام SALL4 که در بالادست آن واقع شده است، تنظیم می‌شود (۱۶). همان‌طور که در بالا توضیح داده شد مسیر Hedgehog در تنظیم

مغز استخوان انسانی با این پروتئین نو ترکیب جمعیت سلول‌های تک هسته‌ای ۱۰ برابر و سلول‌های CD34+ ۸ برابر افزایش یافته بودند (۱۷).

مطالعات اخیر نشان دادند که عملکرد SALL4 با مکانیسم‌های اپی ژنتیکی مرتبط است. SALL4 ممکن است اهداف خاصی برای آنزیم‌های هیستون داستیلاز و DNA متیل ترانسفرازها فراهم نماید که منجر به تولید داستیلاسیون هیستون‌های خاص یا الگوهای متیلاسیون DNA وابسته با تکثیر HS/PCs می‌شود (۴).

### microRNAs

microRNAs (miRNAs) دسته‌ای از RNAهای کوچک غیر کد کننده با طول ۲۳-۲۱ نوکلئوتید می‌باشند که بیان mRNAs در مرحله بعد از رونویسی را تنظیم می‌کنند. MicroRNAs در درون یک شبکه پیچیده‌ای فعالیت می‌کنند به نحوی که هر miRNA دارای پتانسیلی جهت هدف قرار دادن 3' untranslated region (3'UTR) mRNAs می‌باشد و برعکس هر mRNA می‌تواند توسط چندین miRNAs مورد هدف قرار بگیرد (۲۲-۱۸). تخمین زده شده که ۳ درصد از ژن‌های انسان miRNAs را کد می‌کنند (۱۸ و ۲۱) و حدود ۶۰ درصد از فرایند رونویسی در پستانداران تحت کنترل miRNAs قرار دارد (۲۰).

مطالعات اخیر نشان داده که miRNAs نقش‌های مهمی را در تنظیم ژن‌های هدف دخیل در فرآیند تکثیر، کنترل چرخه سلولی، آپوپتوز، مهاجرت، متابولیسم و تمایز سلولی برعهده دارند (۱۸ و ۱۹). علاوه بر نقش‌های ذکر شده، microRNAs در خود نوسازی نیز نقش دارند (۲۱).

SALL4 دارای دو ایزوفرم (SALL4A, SALL4B) است که این ایزوفرم‌ها دارای عملکردهای مستقل و مشترکی می‌باشند (۱).

آگویلا (Aguila) و همکاران ثابت کردند که SALL4 یک محرک قوی برای تکثیر HSCs انسانی است و همچنین ثابت کردند که افزایش بیان ایزوفرم‌های SALL4 در ex vivo در حضور سایتوکاین‌ها (SCF, TPO, Flt3-L) منجر به افزایش ۱۰۰۰۰ برابری در HSCs انسانی می‌شود. مهم‌تر از آن، HSCs تکثیر شده با افزایش ظرفیت بازجمعیت سازی سلول‌های بنیادی در in vivo همراه بودند (۱۷). در حالی که در تکنیک‌های موجود مثل لیگاندهای Notch تنها افزایش ۱۶۰ برابری در جمعیت CD34+ مشاهده شد. علاوه بر این شواهد حاصل از مطالعات پیوند برای بار دوم و بار سوم با استفاده از HSCs تکثیر شده با روش SALL4 نشان داد که تکثیر Long-term HSCs (بلند مدت) قابل پیوند با این روش دست یافتنی است در صورتی که در دو روش اصلی موجود برای تکثیر (HSCsHOXB4 و لیگاندهای Notch) این امر محقق نشده است (۲ و ۱۷).

اگرچه افزایش بیان SALL4 با استفاده از وکتورهای لنتی ویروسی بسیار مؤثر بود اما به علت مشکلات در کنترل سطح و مدت زمان بیان ترانس ژن در in vivo و همچنین پتانسیل سرطان‌زایی این روش کاربرد بالینی زیادی ندارد برای غلبه بر مشکلات حاصل از وکتورهای لنتی ویروسی از روش انتقال پروتئین با استفاده از پپتیدهای نفوذپذیر به سلول استفاده کردند. بدین‌منظور آن‌ها یک پروتئین نو ترکیب TAT-SALL4B را در E coli تولید نمودند (۲ و ۱۷). بعد از گذشت ۳ روز از تیمار سلول‌های CD34+

گوا (Guo) و همکاران همچنین متوجه شدند که miR-125a بیان بالایی در HS/PCs دارد. افزایش بیان miR-125a نیز HSCs را از طریق یک مکانیسم آنتی‌آپوپتوتیک گسترش داد، که احتمالاً از طریق هدف قرار دادن پروتئین پروآپوپتوتیک Bak1 عمل می‌کند (۲۴). این افزایش در تعداد سلول‌های بنیادی خونساز در داخل بدن بیش از ۸ برابر بود (۲۳).

miR-17 یک عضو مهمی از کلاستر miR-17-92 است و به صورت فراوان در پروژنیوتورهای خونی بیان می‌شود. در راستای این داده‌ها، بیان miR-17 در سلول‌های CD34+ انسانی نیز شناسایی شده و نشان داده شده که به‌طور قابل توجهی در طول تمایز به سمت مونوسیت‌ها و مگاکاریوسیت‌های بالغ دچار تنظیم کاهشی می‌شود (۲۶).

تنظیم سلول‌های بنیادی خونساز به میزان قابل ملاحظه‌ای با برهمکنش با سلول‌های موجود در ریزمحیط مغز استخوان مرتبط است که در میان آن‌ها سلول‌های استئوژنیک دارای نقشی حیاتی در تنظیم عملکرد HSCs می‌باشند.

یانگ (Yang) و همکاران نشان دادند که miR-17 در سلول‌های FBMOb-hTERT (یک سل لاین با ویژگی‌های استوبلاست‌ها و بدون خاصیت تومورزایی) نسبت به سایر سلول‌های استرومای مغزاستخوان بیان قابل توجهی دارد این سل لاین می‌تواند به صورت فعالانه ظرفیت خودنوسازی و چندقوه‌ای HSCs و HPCs را حفظ کند که احتمالاً مرتبط به علت این miRNA می‌باشد. miR-17 استوبلاستی تا حدودی قادر به تکثیر سلول‌های CD34+ خون بند ناف است هر چند شواهد نشان‌دهنده یک نقش حیاتی برای miR-17 در تنظیم HSCs و HPCs می‌باشد، اما شواهد بیشتری برای تأیید نقش این microRNA مورد

می‌توان از این خاصیت آن‌ها به عنوان یکی از روش‌های نوین در تکثیر سلول‌های بنیادی خونساز استفاده نمود (۱۹). به نظر می‌رسد تقریباً هر مرحله از هماتوپوئز توسط miRNAs خاصی تنظیم می‌شود برای مثال غیرفعال کردن miR-155. تمایز سلول‌های T، پاسخ‌های سلول B در مراکز زیا و پاسخ به عفونت‌های باکتریایی و ویروسی را تحت تأثیر قرار می‌دهد (۲۰).

اغلب مطالعاتی که تاکنون بر روی بیان miRNAs در HS/PCs انجام شده بر روی تمایز به سمت رده‌های خونی بوده است. اما اطلاعات ما درباره نقش miRNAs در مراحل اولیه تمایز HS/PCs مثل نقش miRNAs در خودنوسازی و باز جمعیت‌سازی بلندمدت و کوتاه مدت HSCs بسیار کم است (۲۰).

اخیراً گزارش شده است که چندین microRNAs در تکثیر HSCs مؤثرند این microRNAs شامل خانواده miR-125، miR-29a و miR-17 می‌باشند (۳، ۲۷-۲۳).

لیزا اوئی (Lisa Ooi) و همکاران نشان دادند که miR-125b بیان بالایی در HSCs دارد و بیانش در پروژنیوتورها کاهش می‌یابد. افزایش بیان miR-125b در HSCs با استفاده از وکتورهای لنتی ویروسی پیوندپذیری HSCs را افزایش داد. علاوه بر این، miR-125b باعث القا تکثیر در HSCs از طریق مهار بیان حداقل دو ژن هدف آنتی آپوپتوتیک Krueppel-like و Bmf(Bcl2) modifying factor 13 (KLF13) factor می‌شود. تکثیر HSCs همراه با یک تورش به سمت تمایز لنفوئیدی در خون محیطی بود. در بخش کوچکی از موش‌های پیوند شده بیماری لنفوپرولیفراتیو مشاهده شد (۲۴).

## نتیجه‌گیری

با توجه به محدودیت‌های ذکر شده برای استفاده از HSCs، دانشمندان اقدام به یافتن راهی برای گسترش این سلول‌ها در شرایط *ex vivo* نمودند. در حال حاضر روش‌های مختلفی برای گسترش سلول‌های بنیادی خونساز در شرایط *ex vivo* به کار گرفته می‌شود. این روش‌ها شامل استفاده از کوکتل‌های سایتوکاینی، شلاتورهای مس، حمایت استرومایی و انتقال ژن می‌باشد. بسیاری از محققان بر این باورند که گسترش HSCs با استفاده از وکتورهای لنتی ویروسی از نوید بخش‌ترین ابزارها برای ژن درمانی HSCs می‌باشد. با این حال، باید در این مطالعات به ارزیابی خطرات ناشی از جهش‌زایی قبل از اینکه کارآزمایی‌های بالینی شروع شود، پرداخته شود. در حالی که کارآزمایی‌های بالینی متعدد و روش‌های سنجش اثربخشی و ایمنی برای تعدادی از مولکول‌ها که قادر به گسترش HSCs بوده صورت گرفته است ولی عاملی ایده‌آل که بتواند تعداد HSCs را در شرایط *in vitro* بدون محدود کردن توانایی بازسازی آن‌ها در داخل بدن افزایش دهد تاکنون یافت نشده است و مطالعات برای یافتن عاملی ایده‌آل همچنان ادامه دارد.

نیاز است. همچنین بیان نابجا miR-17 می‌تواند منجر به گسترش در رده اریترئوئیدی از طریق افزایش HIF-1 $\alpha$  در استئوبلاست‌ها شود (۲۶). خانواده miR-29 متشکل از ۳ عضو miR-29a، miR-29b و miR-29c می‌باشد (۲۵ و ۲۷). چی‌هان (Chi Han) و همکاران نشان دادند که miR-29a دارای یک الگوی بیان خاصی است و بیان بسیار بالایی در HSCs نرمال و همچنین در AML اولیه انسانی دارد در حالی که دچار کاهش تنظیمی در سلول‌های پیش‌ساز می‌شود (۲۷). بیان نابجا miR-29a در سلول‌های خونساز موشی نابالغ عملکردهای miR-29a در پیش‌سازهای خونی نرمال را مشخص نمود. miR-29a نه تنها قادر به بهبود تمایز میلوئیدی و تکثیر در سطح MPP می‌باشد، بلکه خودنوسازی را نیز تنظیم می‌کند که احتمالاً از طریق هدف قرار دادن HMG-Box Transcription Factor 1 (HBP1) می‌باشد. miR-29a دارای خصوصیات انکوژن است و افزایش بیان miR-29a منجر به توسعه بیماری میلوپرولیفراتیو شده که به سمت AML پیشرفت می‌کند در صورتی که افزایش بیان miR-29b و miR-29c چنین فنوتیپی را نشان ندادند (۲۷).

## References:

1. Yang J, Aguila JR, Alipio Z, et al. Enhanced self-renewal of hematopoietic stem/progenitor cells mediated by the stem cell gene Sall4. *J Hematol Oncol* 2011; 4: 1-14.
2. Aguila JR, Mynarcik DC, Yupo Ma. SALL4: finally an answer to the problem of expansion of hematopoietic stem cells?. *Expert rev. Hematol* 2011; 4: 479-481.
3. Walasek MA, van Os R, de Haan G. Hematopoietic stem cell expansion: challenges and opportunities. *Annals New York Academy Sci* 2012; 1266: 138-150.
4. Schuster JA, Stupnikov MR, Ma G, et al. Expansion of hematopoietic stem cells for transplantation: current perspectives. *Exp Hematol Oncol* 2012; 1: 1-6.
5. Nishino T, Osawa M, Iwama A. New approaches to expand hematopoietic stem and progenitor cells. *Expert Opinion Biological Therapy* 2012; 12: 743-756.
6. Watts KL, Adair J, Kiem H-P. Hematopoietic stem cell expansion and gene therapy. *Cytotherapy* 2011; 13: 1164-1171.

7. Dahlberg A, Delaney C, Bernstein ID. Ex vivo expansion of human hematopoietic stem and progenitor cells. *Blood* 2011; 117: 6083-6090.
8. Takizawa H, Schanz U, Manz MG. Ex vivo expansion of hematopoietic stem cells: mission accomplished? *Swiss Med Wkly* 2011; 141: w13316.
9. Allahbakhshian FM, Forouzandeh MM, Amirizadeh N, et al. HOXB4 overexpression increases cord blood CD34+ hematopoietic stem cells population during ex vivo expansion. *Sci J Iran Blood Transfus Organ* 2012; 9: 239-250. (Persian)
10. Jackson M, Axton RA, Taylor AH, et al. HOXB4 can enhance the differentiation of embryonic stem cells by modulating the hematopoietic niche. *Stem Cells* 2012; 30: 150-160.
11. Chotinantakul K, Prasajak P, Leeanansaksiri W. Wnt1 Accelerates an Ex Vivo Expansion of Human Cord Blood CD34. *Stem Cells Int* 2013; 2013.
12. Aggarwal R, Lu J, Pompili V. Hematopoietic stem cells: transcriptional regulation, ex vivo expansion and clinical application. *Curr Mol Med* 2012; 12: 34.
13. Bhatia M, Bonnet D, Wu D, et al. Bone morphogenetic proteins regulate the developmental program of human hematopoietic stem cells. *J Exp Me* 1999; 189: 1139-1148.
14. Jiang L, Li J, Song L. Bmi-1, stem cells and cancer. *Acta Biochim Biophys Sin* 2009; 41: 527-534.
15. Park I-k, Qian D, Kiel M, et al. Bmi-1 is required for maintenance of adult self-renewing haematopoietic stem cells. *Nature* 2003; 423: 302-5.
16. Yang J, Chai L, Gao C, et al. SALL4 is a key regulator of survival and apoptosis in human leukemic cells. *Blood* 2008; 112: 805-13.
17. Aguila JR, Liao W, Yang J, et al. SALL4 is a robust stimulator for the expansion of hematopoietic stem cells. *Blood* 2011; 118: 576-585.
18. Zimmerman AL, Wu S. MicroRNAs, cancer and cancer stem cells. *Cancer Letters* 2011; 300: 10-9.
19. Jansson MD, Lund AH. MicroRNA and cancer. *Molecular Oncology* 2012; 6: 590-610.
20. Bissels U, Bosio A, Wagner W. MicroRNAs are shaping the hematopoietic landscape. *Haematologica* 2012; 97: 160-167.
21. Guo L, Zhao RC, Wu Y. The role of microRNAs in self-renewal and differentiation of mesenchymal stem cells. *Experimental Hematol* 2011; 39: 608-616.
22. Gangaraju VK, Lin H. MicroRNAs: key regulators of stem cells. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2009; 10: 116-125.
23. Guo S, Lu J, Schlanger R, et al. MicroRNA miR-125a controls hematopoietic stem cell number. *Proc Natl Acad Sci* 2010; 107: 14229-14234.
24. Ooi AL, Sahoo D, Adorno M, et al. MicroRNA-125b expands hematopoietic stem cells and enriches for the lymphoid-balanced and lymphoid-biased subsets. *Proc Natl Acad Sci* 2010; 107: 21505-21510.
25. Pekarsky Y, Croce CM. Is miR-29 an oncogene or tumor suppressor in CLL? *Oncotarget* 2010; 1: 224-227.
26. Yang Y, Ma W, Wu D, et al. MiR-17 Partly Promotes Hematopoietic Cell Expansion through Augmenting HIF-1 $\alpha$  in Osteoblasts. *PloS One* 2013; 8: e70232.
27. Han Y-C, Park CY, Bhagat G, et al. microRNA-29a induces aberrant self-renewal capacity in hematopoietic progenitors, biased myeloid development, and acute myeloid leukemia. *J Exp Med* 2010; 207: 475-489.

*Review Article*

# Methods of Hematopoietic Stem Cells Expansion in In Vitro

*A. Anbarlou*<sup>1</sup>, *A. Atashi*<sup>1\*</sup>, *M. Soleimani*<sup>1</sup>, *M. Ajami*<sup>2</sup>,  
*M. Ajami*<sup>2</sup>, *Gh. khamisipour*<sup>3</sup>

<sup>1</sup> *Department of Hematology, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran*

<sup>2</sup> *Department of Hematology, Faculty of Medicine, Mashhad University of Medical Science, Mashhad, Iran*

<sup>3</sup> *Department of Hematology, Faculty of Medical Sciences, Bushehr University of Medical Science, Bushehr, Iran*

(Received 20 Apr, 2014    Accepted 3 Feb, 2015)

### *Abstract*

Hematopoietic stem cells are rare cells that have two unique specificity; self renewal and differentiation to all blood lineages. Hematopoietic stem cells are used in treatments of many diseases such as leukemia, congenital abnormalities related to blood and immune system, aplastic anemia. Bone marrow stem cells and mobilized stem cells are most common sources for transplantation; however using them because of the low availability to Human leukocyte antigen-compatible donors is limited. An alternative method for solving this problem is use of umbilical cord blood that can tolerate low incompatible donors. However the number of cells present in each unit of umbilical cord blood is not enough for transplantation for an adult. Now, many methods are utilized for Hematopoietic stem cells expansion in ex vivo like using cytokine cocktails, copper chelators, stromal support and gene transfer methods. Among them, the gene transfer approach was the most effective method. The genes used to increase the hematopoietic stem cells expansion by lentiviral vectors and recombinant proteins include HOXB4, WNT, Notch, BMP4, BMI-1 and SALL4 and recently has been shown that the microRNAs such as miR-125a/b, miR-17 and miR-29a are able to increase the ex vivo expansion of hematopoietic stem cells.

**Key words:** Expansion, Hematopoietic stem cell, Gene transfer, Transcription factors, microRNA

\*Address for correspondence: Department of Hematology, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran, E.mail: atashia@modares.ac.ir