تمایز سلولهای کارسینومای جنینی P19 به سلولهای اریتروییدی و غیراریتروییدی در حضور اینترلوکین ۳ و ۶ و اریتروپویتین

مرتضی یافتیان .M.Sc☆، مژده صالح‌نیا .Ph.D★♦

☆ دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده پزشکی، گروه هماتولوژی

★ دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده پزشکی، گروه علوم تشریح

♦ آدرس مکاتبه: تهران، صندوق پستی: ۱۱۱-۱۴۱۱۵، دانشگاه تربیت مدرس، گروه علوم تشریح

پست الکترونیک: Email: mojdeh@dr.com

چکیده

دریافت مقاله: ۸۳/۷/۱۹، پذیرش مقاله: ۸۴/۲/۱۷

* **هدف:** ارزیابی تمایز سلولهای P19 به سلولهای هماتوپویتیک در حضور (IL-3: Inter Leukine 3)، (IL-6: Inter Leukine 6) و (EPO: Erythro Poietin) به عنوان یک مدل

* **مواد و روشها:** ابتدا سلولها در محیط نیمه‌جامد حاوی ۱۰درصد سرم جنین گاوی (FCS: Fetal Calf Serum) کشت شدند که پس از شکل‌گیری اجسام شبه جنینی سلولهای آن با تریپسین از هم جدا شدند. سلولهای ایزوله شده مذکور در دو گروه به طور مجزا کشت شدند. در یک گروه محیط نیمه جامد حاوی ۱۰ درصد FCS و ۱۰نانوگرم بر میلی‌لیتر IL-3 و IL-6 و ۲۰ واحد بر میلی‌لیتر EPO بود و در گروه دیگر با همین شرایط فقط EPO حذف شد. ظهور و رشد کلونیها به مدت دو هفته بررسی شد. پس از گذشت حداقل دو هفته کلونیهای مذکور با بنزیدین رنگ‌آمیزی و شمارش شدند.

* **یافته‌ها:** نتایج نشان داد که در حضور IL-3، IL-6 و EPO به طور متوسط ۵۴ درصد از کلونیها بنزیدین مثبت و ۴۶درصد بنزیدین منفی بودند. اما در غیاب EPO ۱۴درصد کلونیها بنزیدین مثبت و ۸۶ درصد از آنها بنزیدین منفی بودند. اختلاف معنی‌داری بین کلونیهای بنزیدین مثبت و منفی در دو گروه مذکور وجود داشت (p=۰/۰۰۱).

* **نتیجه گیری:** سلولهای P19 در حضور IL-3، IL-6 و EPO توانایی تمایز به سلولهای خون‌ساز را دارند و EPO باعث افزایش کلونیهای اریتروییدی شده بود.

گل واژگان: سلولهای کارسینومای جنینی، اینترلوکین، اریتروپویتین

نشریه پزشکی یاخته، سال هفتم، بهار ۸۴، شماره ۲۵، صفحات ۱۰-۷

مقدمه

در مطالعه تکوین و تمایز بافتها و سلولهای پستانداران پیچیدگیهایی وجود دارد که منجر به استفاده از سیستم کشت سلولی به منظور درک آسان و تجزیه و تحلیل سلسله وقایع دخیل در آن شده است. استفاده از سلولهای بنیادی، این اجازه را می‌دهد که به بررسی سلسله وقایع مرتبط با تمایز بخشهای مختلف جنین در مراحل اولیه پرداخته شود (۱).

Solter و همکاران برای اولین بار با پیوند جنین یا قسمتهایی از بدن آن در زیر کپسول کلیه موشی که از نظر ایمنی با بافت پیوندی سازگار باشد، در ظرف مدت ۶ تا ۱۰ هفته توانستند تراتوکارسینوما ایجاد کنند که بعد از جداسازی تومورها از بدن موش و همچنین جدا کردن سلولهای تشکیل دهنده تراتوکارسینوما از یکدیگر توسط روشهای فیزیکی و شیمیایی سلولهای منفرد کارسینومای جنینی (EC: Embryonic Carcinoma) را به دست آوردند (۲). سلولهای EC از نظر رشد مناسب در محیط کشت دارای طیف وسیعی هستند. بعضی از رده سلولهای مانند PSA-1، C145a12 و P10 فقط در شرایطی که بر روی لایه پشتیبان فیبروبلاستی که فعالیت میتوزی آنها توسط اشعه γ و یا میتومایسین C غیرفعال شده باشد، رشد می‌کنند. با این وجود اکثر رده‌های سلولی تهیه شده از سلولهای EC به‌طور مستقیم بر روی سطح پلاستیکی و یا شیشه‌ای پلیتهای کشت در شرایط غیرتمایز یافته چسبیده و تکثیر می‌شوند (۳، ۴). تمایز سلولهای EC حداقل شامل دو مرحله جدا از هم است: اول اینکه سلولها در عین اینکه قدرت تکثیر خودشان را حفظ می‌کنند توانایی ایجاد تومور را از دست می‌دهند و مرحله دوم تمایز که سلولها تحت تاثیر عوامل تحریک‌کننده به رده خاص سلول تمایز می‌یابند (۵). هر رده سلولی تهیه شده از منشا EC دارای یک ویژگی و استعداد درونی، در جهت تمایز به یک رده سلولی است و انتخاب رده سلولی خاص نیز برای آزمایشات مشخص به همین منظور صورت می‌گیرد (۱).داروها و مواد شیمیایی که جهت القای تمایز به کار می‌روند باید در غلظت غیرسمی استفاده شوند. رده‌های سلولی مختلف پاسخهای متفاوتی در مقابل یک داروی خاص از خود نشان می‌دهند و همچنین غلظتهای مختلف یک دارو هم می‌تواند تاثیر متفاوتی در تمایز یک رده سلولی خاص به رده‌های مختلف سلولی داشته باشد. بنابراین انتخاب داروی مناسب، رده سلولی مناسب جهت انجام تحقیق و همچنین استفاده از دوز مناسب دارو جهت بررسی دقیق رفتارهای تمایزی یک رده سلولی خاص ضروری است (۶، ۷). استفاده از سیتوکاینهای مختلف نظیر اینترلوکین ۳ (IL-3)، اینترلوکین ۶ (IL-6) و همچنین بعضی از هورمونها نظیر اریتروپویتین که تاثیرشان در تکثیر و تمایز سلولهای خون‌ساز در داخل بدن به اثبات رسیده است، می‌تواند تاثیر به سزایی در تکثیر و تمایز سلولهای رده هماتوپویتیک در محیط *In vitro* از سلولهای تمایز نیافته داشته باشد (۸، ۹، ۱۰).

اینترلوکین ۶ فاکتور رشدی با فعالیت گسترده است که عمل خود را به‌طور غیرمستقیم و از طریق همکاری با سایر فاکتورها خصوصا IL-3 اعمال می‌دارد (۱۱) و اینترلوکین ۳ یا فاکتور محرک کلونی دارای

توانایی متعددی است که فعالیتی مشابه با فاکتور تحریک‌کننده کلونی گرانولوسیت ماکروفاژی (GM-CSF) دارد اما بسیار سریع‌تر (۱۲، ۱۳).

با توجه به عدم دست‌یابی مستقیم به نحوه هماتوپویز در دوران جنینی داخل رحمی به نظر می‌آید طراحی یک سیستم مشابه در شرایط *In vitro* می‌تواند کمک بسیار مناسبی جهت شناخت مکانیسمهای دخیل در تمایز سلولهای تمایز نیافته به سلولهای رده هماتوپویتیک باشد.

درخصوص تمایز سلولهای P19 به رده هماتوپویتیک گزارشی اعلام نشده است اما در خصوص تمایز آن به رده‌های دیگر مثل عضله، سلولهای عصبی گزارشاتی وجود دارد (۳)، اما Nicolus و همکاران با استفاده از سلولهای PCC3 که یک رده سلولی امبریونیک کارسینومایی با منشا تراتوکارسینومایی است، توانستند در شرایط *In vtiro* و در محیط کشت ارگانی تمایز سلولهای PCC3 به رده اریتروییدی را باعث شوند، ولی به‌دلیل پایین بودن سطح اریتروپویز و همچنین داشتن کاریوتایپ غیرنرمال استفاده از این سیستم جهت تمایز سلولهای EC به رده هماتوپویتیک را محدود کرد (۱۴) و در زمینه تمایز سلولهای بنیادی جنین (ES: Embryonic stem cell) به رده هماتوپویتیک که مکانیسم تمایزی مشابهی بین این دو گروه سلولی وجود دارد گزارشاتی منتشر شده است (۱۵، ۱۶، ۱۷، ۱۸، ۱۹). Wiles و همکاران با استفاده از محیط نیمه‌جامد متیل سلولز توانستند سلولهای بنیادی جنینی (ES) را در محیط کشت به اجسام شبه جنین (EBs) تبدیل نمایند که این Ebsها حاوی پیش‌سازهای رده‌های خونی بودند که پس از تریپسینه کردن EBsها سلولهای حاصله در محیط کشت نیمه جامد و در حضور فاکتورهای خون‌ساز نظیر IL-3 و IL-6 و GM-CSF تشکیل کلونیهای خون‌ساز را دادند. این یافته نشان می‌دهد که سلولهای ES در محیط *In vitro* و در شرایط مناسب می‌توانند به پیش‌سازهای خونی متمایز شوند (۱۵). با توجه به مطالب ارایه شده هدف اصلی در این تحقیق پیشنهاد روشی مناسب برای تمایز سلولهای کارسینومای جنینی در محیط *In vitro* و ایجاد شرایط مناسب برای مطالعه عوامل موثر در خون‌سازی است؛ به خصوص که تاثیرپذیری سلولهای بنیادی در مراحل ابتدایی از سیتوکینهایی مثل IL-3، IL-6 و EPO به شکل یک سوال باقی است و هنوز پاسخ مناسبی به آن داده نشده است.

مواد و روشها

کشت و نگهداری سلولهای P19

بلافاصله پس از تهیه سلولهای P19 از انستیتوپاستور ایران به‌منظور جلوگیری از تمایز این سلولها در محیط کشت DMEM(Sigma) حاوی ۱۰درصد FCS و ۱میکروگرم بر میلی لیتر فاکتور مهارکننده لوسمی LIF(Sigma) که باعث عدم تمایز در سلولهای P19 می‌شود، کشت و نگهداری شدند و برای مطالعات بعدی از آنها استفاده شد.

کشت سلولهای P19 در محیط نیمه جامد

سلولهای P19 بعد از مرحله تریپسینه شدن (تریپسین ۰/۲۵درصد، EDTA ۰/۰۲درصد) به صورت منفرد یا مجزا در آمده و $۳-۴\times۱۰^{۳}$ سلول در محیط کشتی که از ۶۰درصد DMEM، ۲۰درصد FCS و ۳۰درصد آگار یک درصد تشکیل شده بود به مدت ۸ روز انکوبه شد.

در طول این مدت اجسام شبه جنینی (EBs) در داخل محیط نیمه جامد شکل می‌گرفت. EBs ها توسط پیپت پاستور و در زیر هود و با استفاده از میکروسکوپ معکوس از داخل محیط نیمه جامد جدا شدند و پس از تریپسینه شدن به مدت ۱۵ دقیقه، سلولها به صورت منفرد در آمده با افزودن FCS به محیط تریپسین خنثی شده و به آن ۵سی‌سی محیط DMEM نیز اضافه شده و با دور ۱۲۰۰rpm به مدت ۳ دقیقه سانتریفوژ کرده و محلول رویی آنها خارج شد و سپس به آن محیط کشت DMEM حاوی ۱۰درصد FCS اضافه شد تا به غلظت ۱×۱۰^{۵} سلول در میلی‌لیتر برسد.

کشت سلولهای P19 در محیط نیمه جامد دارای IL-3 و IL-6

سلولهای حاصل از تریپسینه شدن EBsهای به وجود آمده از رده سلولی P19 با غلظت ۵×۱۰^{۴} را در محیط کشت حاوی ۵۰درصد DMEM، ۳۰درصد آگار یک درصد و ۲۰درصد FCS و همچنین ۱۰نانوگرم بر میلی‌لیتر IL-3، ۱۰نانوگرم بر میلی‌لیتر IL-6 (قبل از اضافه شدن آگار یک درصد به محیط DMEM اضافه شد) و به مدت ۱۴ الی ۱۸ روز انکوبه و کشت شدند (۱۸).بعد از گذشت ۱۴ روز کلونیهای ایجاد شده در محیط نیمه جامد در زیر میکروسکوپ معکوس از نظر مورفولوژی و تعداد بررسی شدند. از رنگ‌آمیزی بنزیدین جهت تایید کلونیهای اریتروییدی و از رنگ‌آمیزی گیمسا جهت تشخیص مورفولوژی سلولهای تشکیل دهنده کلونیها استفاده شد. جهت رنگ‌آمیزی بنزیدین ۲سی‌سی از محلول ۰/۵درصد بنزیدین در اسید استیک گلاسیال به پلیتهای کشت اضافه شده و به مدت ۱۵ دقیقه در انکوباتور ۳۷درجه سانتی‌گراد قرار گرفت، سپس با پیپت پاستور محلول رنگی بنزیدین خارج و به محیط کشت، ۲سی‌سی آب اکسیژنه ۱درصد اضافه شد.در صورت وجود کلونیهای اریتروییدی در محیط کشت بلافاصله رنگ آنها به‌دلیل واکنش با بنزیدین و آب اکسیژنه آبی تیره شده که این امر به خاطر وجود هموگلوبین موجود در کلونیهای اریتروییدی است.

کشت سلولهای P19 در محیط نیمه جامد دارای IL-3 و IL-6 و اریتروپویتین

سلولهای حاصل از تریپسینه شدن EBSهای به دست آمده از رده سلولی P19، ۵×۱۰^{۴} به شکل سوسپانسیون سلولی متشکل از ۵۰درصد محیط کشت DMEM، ۳۰درصد آگار یک درصد و ۲۰درصد FCS، ۱۰نانوگرم بر میلی‌لیتر IL-3 و ۱۰نانوگرم بر میلی‌لیتر IL-6، ۲۰واحد بر میلی‌لیتر اریتروپویتین ریکامبینت (Recombinant) (۱۹) به مدت ۱۴ الی ۱۸ روز در انکوباتور ۳۷درجه سانتی‌گراد مرطوب دارای ۵درصد CO_2 انکوبه شد.

در طول این مدت کلونیهای شکل گرفته در داخل محیط نیمه‌جامد از نظر تعداد و مورفولوژی در زیر میکروسکوپ معکوس بررسی شد و مشابه گروه قبل از دو روش رنگ‌آمیزی بنزیدین و گیمسا استفاده شد. پس از جمع‌آوری اطلاعات با استفاده از تست مجذور کای ($\chi^{۲}$) درصد کلونیهای حاصله در گروههای مختلف مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفت.

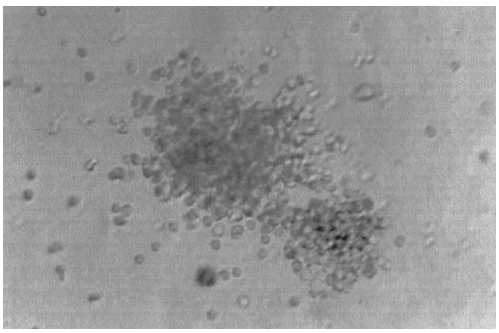
جدول ۱. Colony assay سلولهای P19 در محیط نیمه جامد در حضور فاکتورهای IL-6،IL-3 و یا EPO حداقل در سه بار تکرار

گروهها	تعداد سلول بر میلی‌لیتر	میانگین کلونی بنزیدین مثبت SD±(Range)	تعداد (درصد)	میانگین کلونی بنزیدین منفی SD±(Range)	تعداد (درصد)
کشت در حضور IL-6، IL-3 و EPO	۴×۱۰^{۴}	۲۱ ± ۲ (۲۳–۱۹)	۶۲ ۵۴درصد	۱۸ ± ۲/۵ (۲۰–۱۵)	۵۳ ۴۶درصد
کشت در حضور IL-6، IL-3	۴×۱۰^{۴}	۳ ± ۱/۵ (۵–۲)	۱۰ ۱۴درصد	۲۰ ± ۳ (۲۳–۱۷)	۶۱ ۸۶درصد

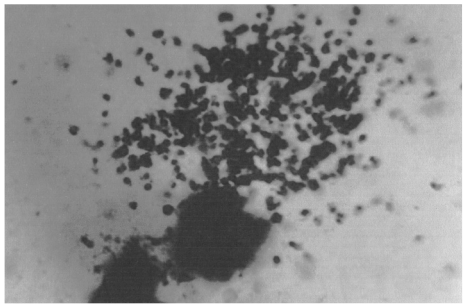
یافته‌ها

بعد از کشت سلولهای P19 در محیط نیمه‌جامد حاوی آگار و FCS و در غیاب LIF در مدت ۲ الی۳ روز کلونیهای کوچکی ایجاد شدند که بعد از کشت ۸ تا ۱۲ روز این کلونیها به اجسام شبه جنینی (EBs) تبدیل شدند، تقریباً به ازای هر ۴×۱۰^{۴} سلول P19 کشت شده، به‌طور متوسط ۲۰ تا ۳۰ EBs ایجاد شد. کشت سلولهای حاصل از تریپسینه شدن EBs به دست آمده از سلولهای P19 در محیط نیمه‌جامد حاوی FCS، IL-3 و IL-6 در مدت ۱۴ الی ۱۸ روز باعث ایجاد کلونیهایی شده است که از تعداد کل ۷۱ کلون شمارش شده در سه بار تکرار ۱۴درصد کلونیها بنزیدین مثبت و ۸۶درصد بنزیدین منفی و از نظرمورفولوژی اکثرا شبیه کلونی رده غیراریتروییدی بودند و تعداد کمتری هم کلونی اریتروییدی وجود داشت که شکل یک نمایی از این کلونیها را نشان می‌دهد و اطلاعات مربوطه به‌طور خلاصه در جدول یک نشان داده است. کشت سلولهای حاصل از مرحله تریپسینه شدن EBs در محیط نیمه‌جامد حاوی FCS، IL-3 و Il-6 و EPO در مدت ۱۴ الی ۱۸ روز باعث ایجاد کلونیهای در داخل محیط نیمه جامد شده که اطلاعات مربوطه به‌طور خلاصه در جدول یک نشان داده است.

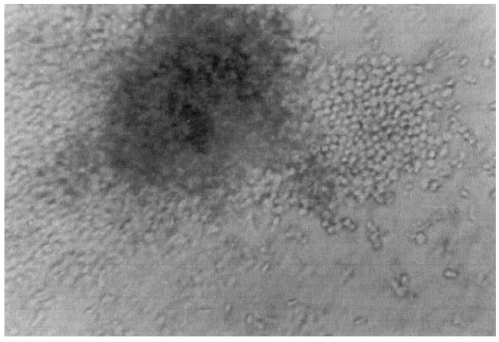
از تعداد کل ۱۱۵کلون شمارش شده میانگین کلونهای بنزیدین مثبت ۵۴ درصد و کلونهای بنزیدین منفی ۴۶درصد بود. در شکل دو نمایی دو نوع کلونیهای شکل گرفته در حضور فاکتورهای مذکور نشان داده شده است. کلونی تیره رنگ مربوط به رده اریتروییدی و کلونی روشن‌تر مربوط به رده غیراریتروییدی است. همچنین شکل سه نمونه‌ای ازکلون رنگ شده با بنزیدین را نشان می‌دهد. از نظر آماری با $P<۰/۰۰۱$ اختلاف معنی‌داری بین کلونیهای بنزیدین مثبت و یا بنزیدین منفی این گروه با گروه فاقد EPO مشاهده شد.



شکل ۱: نمایی از کلونیهای شکل گرفته در محیط نیمه‌جامد در حضور فاکتورهای IL-3 و IL-6 و با بزرگنمایی ×۴۰۰
(مشاهده تصویر رنگی در انتهای مقالات)



شکل ۲: نمایی از کلونیهای ایجاد شده در محیط نیمه جامد دارای فاکتورهای IL-3 و IL-6 و EPO و با بزرگنمایی ×۴۰۰ (کلونی اریتروییدی تیره رنگ و کلونی غیر اریتروییدی روشن دیده می‌شود.)
(مشاهده تصویر رنگی در انتهای مقالات)



شکل ۳: نمایی از کلونی اریتروییدی بنزیدین مثبت در محیط نیمه‌جامد دارای فاکتورهای IL-3 و IL-6 و EPO با بزرگنمایی ×۴۰۰
(مشاهده تصویر رنگی در انتهای مقالات)

بحث

در تحقیق حاضر به‌منظور بررسی تاثیر فاکتورهای اگزوژن در تمایز سلولهای P19 به سلولهای هماتوپویتیک در غیاب لایه پشتیبان در دو آزمایش جداگانه سلولهای حاصله از اجسام شبه جنینی در محیط نیمه جامد دارای فاکتورهای IL-3 و IL-6 و EPO و یا دارای فاکتورهایی IL-3 و IL-6 کشت شدند. پس از گذشت ۱۴ تا ۱۸ روز در محیطهایی که علاوه بر IL-3 و IL-6 از EPO نیز استفاده شده بود، درصد کلونیهای اریتروییدی و غیراریتروییدی ایجاد شده اختلاف چندانی با هم نداشتند. ولی در محیطی که فقط از فاکتورهای IL-3 و IL-6 استفاده شده بود اکثر کلونیهای ایجاد شده مربوط به کلونیهای غیراریتروییدی بودند (۸۴درصد). بنابراین وجود EPO باعث افزایش درصد کلونهای غیراریتروییدی شده بود و حضور اینترلوکین ۳ و ۶ به‌طور معنی‌داری باعث افزایش کلونهای غیراریتروییدی (که به احتمال زیاد میلوییدی بود) شده بود. البته این نتایج نشان داد که برای افزایش ظهور کلونیهای اریتروییدی وجود EPO الزامی است با این حال وجود

EPO در کنار فاکتورهای IL-6 و IL-3 باعث ظهور رده‌های غیراریتروییدی نیز شده بود، اما به تعداد بسیار کمتر. نقش EPO در اریتروپویز قطعی کاملاً مشخص شده و تحقیقات در این زمینه نشان داده است که این ترکیب یک عامل اصلی در تنظیم اریتروپویز قطعی است (۲۰، ۲۱)، اما درخصوص اریتروپویز اولیه نامشخص است. تحقیق حاضر نشان داد که EPO بر سلولهای بنیادی کارسینومای جنینی تاثیرگذار بوده و اریتروپویز را تا حدودی افزایش می‌دهد ولی سوال باقی مانده این است که الگوی اریتروپویز حاصله از کدام نوع است اولیه یا ثانویه، که نیاز به تحقیقات بیشتر در این زمینه با تکنیکهای تکمیلی و مناسب‌تر مثل بررسی نوع هموگلوبین سنتز شده وجود دارد.بنابراین با توجه به نتایج حاصله و بعضی از نتایج تحقیقات مشابه برای ظهور کلونیهای خاص حضور فاکتورهای اگزوژن الزامی است اما به عکس برای دیگر کلونیها الزامی به افزودن فاکتورهای اگزوژن وجود ندارد. پس بنابراین تمایز هر نوع رده هماتوپویتیک در محیط *In vitro* سیستم خاص خود را می‌طلبد. نتایج تحقیقات قبلی نشان داد که جهت تشکیل کلونیهای اریتروییدی میلوییدی و یا حتی لنفوییدی حضور فاکتورهای IL-3 و IL-6 و فاکتورهای اگزوژن ضروری است (۲۲) ولی برعکس Ohneda و همکاران در طی تحقیقی بیان داشتند که جهت تمایز سلولهای رده اریتروییدی از پیش‌سازهای سلولهای خونی جنینی الزامی به استفاده از هیچ فاکتور اگزوژنی نیست (۲۳). مکانیسم عمل تمایز توسط فاکتورها و سیستمهای هم‌کشتی مختلف با توجه به منبع سلول بنیادی و نوع آن تفاوتهایی را خواهد داشت اما تشابه‌هایی هم بین سلولهای بنیادی جنینی و سلولهای کارسینومایی جنینی نیز وجود دارد از جمله خاصیت نامیرایی و قدرت تمایز به رده‌های مختلف سلول مثل سلولهای عصبی، عضلانی و نوروگلیا (۲) و تاکنون رده‌های مختلف سلولی از این سیستمهای تمایزی ارایه شده‌اند. بنابراین مجموع نتایج تحقیق حاضر نشان می‌دهد که در حضور اینترلوکین ۳ و ۶ ظهور رده غیراریتروییدی افزایش می‌یابد و در حضور اریتروپویتین ظهور کلونیهای اریتروییدی افزایش می‌یابد.

References

1. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T: Molecular cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Press 1989; 50: 15-20
2. Solter SJ, Andrews PW, Przyborski SA, Thomson JA: Embryonal carcinoma cells as embryonic stem cells. In: Marshak DR, Gardner R, Gottlieb D, eds. Stem Cell Biology. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Press, Monograph 2001; 40: 231-266
3. Evans MJ, Kaufman MH: Tablishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. Nature 1981; 292: 154-156
4. Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS: Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. Science 1998; 282: 1145-1147
5. Wang R, Clark R, Bautch V: Embryonic stem cell-derived cystic embryoid bodies form vascular channels: an in vitro model of blood vessel development. Development 1992; 114: 303
6. Keller GM: In vitro differentiation of embryonic stem cells. Current Opinion in Cell Biology 1995; 7: 862
7. Weiss MJ, Orkin SH: In vitro differentiation of embryonic stem cells. New aproaches to old problems. J Clin Invest 1996; 97: 591
8. Duncan SA, Navas MA, Dufort D: Regulation of a transcription factor network required for differentiation and metabolism. Science 1998; 281: 692-695
9. Schuldiner M, Yanuka O, Itskovitz-Eldor J: Effects of eight growth factors on the differentiation of cells derived from human embryonic stem cells. Proc Natl Acad Sci USA 2000; 97: 11307-11312
10. Kimura T, Sonoda Y, Iwai N, Satoh M: Prolifreation and cell death of embryonic primitive erythrocytes. Exp Hematol 2000; 28: 635-641
11. Schmitt R, Bruyns M, Landorp S: Heamatopoietic development of embryonic stem cell in vitro cytokine. Gen Dev 1991; 5: 728-740
12. Johnsson B, Wilesin M: Evidence for involvement of interleukin-3 and Bone morphogenic protein 4 in mammalian mesoderm and heamatopoietic development. Mol Cell Biol 1995; 15: 141-151
13. Jhanson G, Metcalf B: Source and nature of granulocyte-macrophge colony stimulating factor in fetal mice. Expl Hematol 1978; 85: 3127-3133
14. Nicolus J, Andrews PW, Damjanov I, Simon D: Pluripotent human embryonal carcinoma clones dervied from the human teratocarcinoma cell line PCC3 differentiation in vivo and in vitro. Lab Inves 1977; 50: 147-162
15. Wiles MW: Differentiation of the mouse embryonic stem cell, II: Extrinsic origin of the haemopoietic cell line. Cell Differentiation 1991; 10: 243-252
16. Kyba M, Daley G: Hematopoiesis from embryonic stem cells: Lessons from and for ontogeny. Exp Hematol 2003; 31: 994-100
17. Li F, Lu S, Thomson JA, Honig GR: Bone morphogenetic protein 4 induces efficient hematopoietic differentiation of rhesus monkey embryonic stem cells in vitro. Blood 2001; 98: 335-342
18. Kaufman DS, Hanson ET, Lewis RL, Auerbach R, Thomson JA: Hematopoietic colony forming cells derived from human embryonic stem cells. Proc Natl Acad Sci USA 2001; 98: 10716-10721
19. Honig GR, Li F, Lu SJ, Vida L: Hematopoietic differentiation of rhesus monkey embryonic stem cells. Blood Cells Molecules and Diseases 2004; 32: 5-10
20. Barber DL, D'Andera AD: The erythropoietin receptor and the molecular basis of signal transduction. Semin Immunol 1995; 29: 293-304
21. Ihle JN, Quelle FW, Miura O: Signal transduction through the receptor for erythropoietin. Semin Immunol 1993; 5: 375-389
22. Palacious R, Eroc T, Ronald P: In vitro generation of hematopoietic stem cells. Blood 1995; 85: 7530-7534
23. Ohnoda O, Landreth KS, Dorshkind K: Differential expression of bone marrow stromal cell surface antigens on myeloid and lymphoid cells. Hybridoma 1990; 13: 175-181