بررسی اثر فاکتور رشد NGF، RA، Shh بر تمایز سلول‌های بنیادی جنینی موش به سلول‌های عصبی و الیگوسیتی

هدیه جهان‌بخت (M.Sc.)[1]، کاظم پریور (Ph.D.)[1]، محمد مهدی آخوندی (Ph.D.)[2]، محمود جدی تهرانی (Ph.D.)[3]، محمد حسین مدرسی (M.D., PhD.)[4,5]، محمد رضا صادقی (Ph.D.)[3]، محمد کرامتی پور (Ph.D.)[5]، امیر حسن زرنانی (Ph.D., D.M.T.)[4]، شیدا صالح‌خو (B.Sc.)[2]

۱- گروه زیست‌شناسی جانوری، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.

۲- مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی تولید مثل، پژوهشکده فناوری‌های نوین علوم پزشکی جهاددانشگاهی- ابن‌سینا، تهران، ایران.

۳- مرکز تحقیقات آنتی بادی منوکلونال، پژوهشکده فناوری‌های نوین علوم پزشکی جهاددانشگاهی- ابن‌سینا، تهران، ایران.

٤- مرکز تحقیقات نانوتکنولوژی زیستی، پژوهشکده فناوری‌های نوین علوم پزشکی جهاددانشگاهی- ابن سینا، تهران، ایران.

٥- دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی- درمانی تهران، تهران، ایران.

چکیده

زمینه و هدف: سلول‌های بنیادی جنینی (ES) سلول‌های همه توانی هستند که توانایی تمایز به انواع سلول‌های تخصصی بالغ را دارا می‌باشند و در حال حاضر و آینده نزدیک امکان استفاده از این سلولها در درمان بسیاری از بیماریها با روش سلول درمانی وجود دارد. به نظر می‌رسد در آینده بتوان برخی بیماری‌های سیستم عصبی را با استفاده از فاکتورهای مؤثر بر تمایز سلول‌های بنیادی به سلول‌های عصبی و گلیالی درمان نمود، لذا در این تحقیق سلول‌های بنیادی جنینی موش به صورت همه توان و تمایز نیافته کشت و تکثیر داده شد و سپس تأثیرات فاکتورهای رشد NGF، Shh، RA به منظور القای تمایز این سلولها به سلول‌های عصبی و گلیالی مورد بررسی قرار گرفت.

روش بررسی: سلول‌های بنیادی جنینی (از موش نژاد 129 بنام CCB) را روی فیبروبلاست جنینی موش نژاد C57/BL6 کشت و تکثیر داده و با روش قطرات معلق از آنها اجسام جنینی (EBs) تهیه شد. بعد از انتقال و کشت کلونی‌های EBs بر روی پلیت کشت پوشانیده با فیبرونکتین، فاکتورهای القایی NGF وShh به ترتیب با غلظت‌های ۵۰*ng/ml* و ۱۰۰، ۳۰۰*ng/ml* و ۵۰۰ و RA با غلظت ۱*μM*و در گروه‌های دیگر bFGF با غلظت ۲۰*ng/ml* به محیط کشت اختصاصی سلول‌های پیش‌ساز عصبی اضافه شد تا سلولها به سمت تمایز عصبی هدایت شوند. به منظور بررسی تمایز به انواع سلول‌های عصبی و گلیالی با روش RT-PCR بیان ژن‌های اختصاصی سلول‌های عصبی شامل S100، Olig-2، Nurr-1، Nkx2.2 و Nestin ارزیابی شد و علاوه بر این از روش ایمونوسیتوشیمی برای تأیید حضور پروتئین MAP-2 استفاده شد.

نتایج: در این تحقیق، بررسی‌های مولکولی نشان داد که هر یک از این فاکتورهای رشد با تأثیر در بیان ژن‌های اختصاصی سلول‌های عصبی یک یا چند مسیر مولکولی را فعال می‌کنند که در تمایز سلول‌های مختلف سیستم عصبی نقش اساسی دارند. رنگ‌آمیزی اختصاصی این سلولها با آنتی‌بادی MAP-2 نشان داد که سلول‌های حاصل دارای زوائد دندریتی خاص سلول‌های عصبی یا نورون هستند.

نتیجه‌گیری: براساس یافته‌های این تحقیق سلول‌های بنیادی جنینی همه توان و تمایز نیافته در حضور فاکتورهای رشد RA، NGF، Shh به سلول‌های عصبی و اولیگودندروسیتی تمایز می‌یابند؛ به‌طوریکه هر یک از این عوامل در مسیر خاص تمایزی سلول‌های تخصصی سیستم عصبی مؤثر بوده و حتی میزان غلظت افزوده شده عوامل فوق نیز بر چگونگی تمایز یافتن این سلولها مؤثر می‌باشد.

کلید واژگان: سلول‌های بنیادی جنینی موشی، تمایز، نورون، رتینوئیک اسید، فاکتور رشد نورونی، Shh.

مسئول مکاتبه: دکتر محمدمهدی آخوندی، گروه غدد تولیدمثل و جنین شناسی، مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی تولیدمثل، پژوهشکده فناوری‌های نوین علوم پزشکی جهاددانشگاهی- ابن سینا، اوین، صندوق پستی: ۱۷۷-۱۹۸۳۵، تهران، ایران.

پست الکترونیک: akhondi@avesin.ac.ir

Downloaded from http://www.jri.ir

زمینه و هدف

سلول‌های بنیادی جنینی (ES)[1] اولین بار در دهه ۱۹۸۰ بوسیله گروه‌های تحقیقاتی مختلف جداسازی شدند. این سلولها از لایه سلولی اپی‌بلاستی توده سلولی داخلی در جنین مرحله بلاستوسیست جدا می‌شوند (۱). محققین مختلف ویژگی همه توانی سلول‌های ES و توانایی تمایز آنها به انواع مختلف سلول‌های سه لایه زایندهٔ اولیه را گزارش کرده‌اند (۲،۳). سلول‌های ES، سلول‌های همه توانی هستند که به دلیل ویژگی خود نوسازی[2] بدون هیچ محدودیتی تکثیر می‌یابند و توانایی تمایز به انواع سلولها را دارند. سلول‌های بنیادی همه توان در چند گروه مختلف تقسیم می‌شوند، آن دسته که در دوران اولیه جنینی تشکیل می‌شوند در گروه سلول‌های بنیادی جنینی قرار می‌گیرند (٤).

استفاده از سلول‌های ES در تمایز مستقیم به سلول‌های تخصص یافته با فنوتیپ خاص به منظور استفاده در درمان برخی از بیماری‌هایی که سلول‌های خاصی عملکرد صحیح خود را از دست داده است، یکی از اهدف مهمی است که محققین سال‌های بعد از دستیابی به سلول‌های بنیادی جنینی، برای رسیدن به آن تلاش می‌نمایند (٥).

سلول‌های ES در شرایط آزمایشگاهی نیز مراحل تکوین طبیعی جنینی را طی می‌کنند و اگر برای چند هفته در شرایط بدون حضور فاکتور سیتوکینی LIF کشت داده شوند توانایی تمایز خودبخود به سه لایه جنینی اکتودرم، مزودرم واندودرم را دارا می‌باشند (٦).

با توجه به نقش سیگنال‌های پاراکرینی در تکوین صحیح سیستم عصبی در طول مرحله گاسترولاسیون، هرگاه سلول‌های بنیادی جنینی موش را در شرایط کشت سلولی با استفاده از عوامل و مکمل‌های مختلف مؤثر کشت دهیم توانایی تمایز به سلول‌های عصبی را خواهند داشت. به طوریکه این سلول‌های تمایز یافته تمام خصوصیات یک نورون بالغ را از نظر مورفولوژی و فیزیولوژی دارا خواهند بود (۷). RA[3]، Shh[4] و NGF[5] از عوامل القایی و مورفوژنیکی می‌باشند که حضور آنها در مراحل اولیه القا عصبی و مراحل بعدی نورون‌زایی در طول صفحه عصبی و لوله عصبی نخاعی ــ مغزی نقش اساسی دارند.

Shh عامل مورفوژن مهمی است که از نوتوکورد ترشح شده و روی بیان این دسته ژنها اثر می‌گذارد (۸). این پروتئین مورفوژن در بخش شکمی نخاع باعث تمایز صفحه عصبی به نورون حرکتی و نورون‌های حد واسط شکمی می‌گردد و باعث تغییر در بیان ۷ نوع فاکتور نسخه‌برداری از ژن‌های همودمین کلاس HD شده و به دو گروه I و II تقسیم می‌شود. ژن‌های کلاس HD به موقعیت enhancer در DNA متصل می‌شوند و در کنترل اختصاصی یا عمومی نسخه‌برداری ژن‌هایی شرکت می‌کنند که در مراحل مختلف تخصص‌یابی نورونها، چه در نخاع و چه در سایر مناطق CNS، نقش دارند. این ۷ نوع ژن Olig-2, pax7, pax3, Dbx12 Nkx2.2, Nkx6.1 می‌باشند که توسط سلول‌های اولیه عصبی ناحیه شکمی بیان می‌شوند و بوسیله Shh کنترل می‌شوند (۸،۹،۲٦).

رتینوئیک اسید (RA) در بخش‌های خلفی لوله عصبی باعث واکنش‌های بین سلولی لازم برای تمایز و تکوین می‌شود (۱۰). مکانیسم اثر RA به این صورت است که این عامل بر روی رسپتورهای خود در سطح سلول‌های بنیادی متصل می‌شود. لازم به ذکر است mRNA کدکننده رسپتورهای RA (RAR)[6] در سلول‌های بنیادی نیز وجود دارند و بیان آنها با حضور RA القاء می‌شود؛ بطوریکه RA در القای ژن NF-L مؤثر است تا

1- Embryonic Stem Cells
2- Self renewal
3- Retinoic Acid
4- Sonic hedge hog factor
5- Nerve Growth Factor
6- Rapidly Adapting Receptors

Downloaded from http://www.jri.ir

سلول‌های اولیه عصبی تشکیل شود. در مراحل نوروژنز نیز مشخص شده برای بیان ژن‌های HD کلاس I ، حضور RA نیز لازم است. از این گروه ژنها می‌توان Pax6 و Dbx-1/2 را نام برد که در نواحی خلفی طناب عصبی در تمایز نورون‌های حرکتی مؤثرند (۱۱).

NGF فاکتور رونویسی است که در تکوین و ایجاد نورون‌های سیناپسی و حسی مؤثر است (۱۰). همچنین از خصوصیات شیمیایی آن افزایش رشد نوریتها است. این فاکتور با اتصال به گیرندهٔ غشائی خود با ویژگی تیروزین کینازی (TRK-A)[1]، تأثیرات خود را در سلول القاء می‌کند و با فعال شدن گیرنده ژن Tck-1 بیان می‌شود. این ژن مسیر مولکولی کینازی را فعال می‌نماید که باعث حفظ بقای سلول‌های عصبی و رشد نوریتها می‌گردد و در دو مسیر مختلف با فعال شدن IP3 و پروتئین کیناز MAP ژن‌های مؤثر در تمایز سلول‌های عصبی را روشن می‌نماید (۱۲).

bFGF[2] فاکتور رشد فیبروبلاستی است که هم به عنوان عاملی در تحریک تکثیر سلول‌های اجدادی نورواپیتلیالی سیستم عصبی مرکزی عمل نموده و هم در بالغین موجب نوروژنز در سلول‌های بنیادی عصبی گانگلیون‌های سیستم عصبی مرکزی می‌شود. تأثیر این فاکتور در تکثیر سلولی با القا سنتز کمپلکس سیکلین کیناز انجام می‌گیرد. این پروتئین‌های سیکلینی در شروع تقسیم سلولی نقش دارند و براساس تأثیر میتوژنیک bFGF، آنرا عامل مهمی در القای تمایز عصبی و تکثیر سلول‌های اجدادی عصبی می‌دانند. در شرایط in vivo این فاکتور در برقراری صحیح مراحل بیان ژن‌های HD رده I نقش داشته و به صورت فاکتورهای رونویسی در بیان ژن‌های خاص نورون‌های حرکتی مؤثر می‌باشد (۸).

با توجه به اینکه در حدود نیمی از حجم سیستم عصبی مرکزی را سلول‌های اولیگودندروسیت و آستروسیتها تشکیل می‌دهند و نقش حمایتی، تغذیه کنندگی و حفاظتی برای نورونها دارند (۱۶). این بررسی با هدف کشت و تکثیر سلول‌های بنیادی جنینی موش با حفظ خاصیت همه توانی و تمایز نیافتگی آنها و سپس بررسی تأثیر فاکتورهای رشد Shh، RA، NGF به منظور القای تمایز به سلول‌های عصبی انجام شد و همچنین القای تمایز به سلول‌های اولیگودندروسیتی و آستروسیتها نیز مورد نظر قرار گرفت.

روش بررسی

کشت سلول‌های بنیادی: سلول‌های ES از ردهٔ سلولی (CCB) (اهدایی از دانشگاه کمبریج) از موش نژاد 129 بعد از مراحل ذوب سلولی بر روی پلیت‌های پوشیده با فیبروبلاست غیرفعال شده با میتومایسین در محیط کشت ES شامل مواد زیر کشت داده شدند: محیط ۱۵٪ Knockout Serum؛ ۸۵٪ Knockout Medium، سدیم پیروات ۱*mM*، گلوتامین ۲۰۰ *mM*، N.E.A.A (100x) به میزان ۱٪ (تمامی مواد از شرکت Gibco آلمان)، بتامرکاپتو اتانل (1000x) ۰/۱٪ (Sigma, USA)، LIF به مقدار ۱۰۰۰ *U* (ESGRO,USA)، پنی‌سیلین و استرپتومایسین ۱٪.

سلول‌های ES بعد از چند ساعت روی فیبروبلاست‌های غیرفعال متصل و به رشد و تزاید خود ادامه دادند. طی این مدت روزانه محیط کشت سلولها تعویض و سلولها مورد ارزیابی قرار می‌گرفتند تا در صورتیکه به حد کافی رشد نموده بودند مجدداً آنها را جدا نماییم. کلونی‌های تمایز نیافتهٔ سلول‌های بنیادی، حاشیه‌ای صاف داشته و به شدت به هم چسبیده‌اند. پس از تشکیل کلونی سلولها برای القای تمایز سلولی آماده می‌باشند.

القای تمایز عصبی در سلولهای بنیادی: در این شرایط بخشی از سلول‌های تمایز نیافته را برای انجام مراحل القای تمایز عصبی به وسیله Trypsin/ EDTA

1- Tyrosine Kinase Receptor-A
2- Basic Fibroblast Growth Factor

Downloaded from http://www.jri.ir

(Invitrogen, Germany)؛ ۰/۲۵٪ از سطح سلول‌های فیبروبلاست غیرفعال (Feeder cells) جدا نموده و پس از شمارش سلولی آنها را برحسب قطرات ۲۵ میکرولیتری که دارای ٤۰۰ تا ٥۰۰ سلول باشند به مدت دو روز به روش کشت قطرات معلق نگه‌داشته تا اجسام جنینی (EBs) تشکیل شوند. سپس کلونیها را به پلیت‌های مخصوص کشت باکتری منتقل کرده به مدت ۲ الی ٤ روز در شرایط سوسپانسیون قرار داده تا تجمع سلولی تشکیل شده و افزایش یابد.

محیط کشت شامل DMEM/F12، ۲٪B27، BSA ۱*mg/ml*، پنی‌سیلین/ استرپتومایسین ۱٪، (سرم ۱۰٪ FBS)ـ N.E.A.A (100x) ۱٪ (تمامی موارد محصول شرکت Gibco آلمان بود) می‌باشد.

کلنی‌های سلولی در سوسپانسیون را جمع‌آوری و سلول‌های EB را به پلیت ۱۲ حفره‌ای پوشانده شده با فیبرونکتین منتقل نموده تا در هر حفره ۱۲-۱۰ کلنی قرار داده شود. در این مرحله از محیط کشت فوق، bFGF را حذف کرده و فاکتورهای رشد Shh و NGF و RA را در هشت گروه که بر حسب غلظت‌های مورد نظر در حفره‌های مجزا تعیین شده‌اند به محیط کشت سلول‌های نوروایپتیلیالی (شرح محیط کشت در بالا آمده است) اضافه می‌کنیم. این گروه‌ها شامل Shh غلظت‌های *ng/ml* ۳۰۰ و ٥۰۰، NGF غلظت‌های ٥۰*ng/ml* و ۱۰۰، RA ۱*μM* و در گروه دیگر که دو فاکتور همزمان استفاده شد ۳۰۰*ng/ml*+Shh ۲۰ *ng/ml* bFGF و گروه دیگر ٥۰*ng/ml* +NGF ۲۰ bFGF بود.

دو روز بعد از کشت سلولها (روز ۲+٤) در پلیت پوشیده با فیبرونکتین سلول‌های یک تا دو حفره، جهت بررسی بیان ژن نستین به روش RT-PCR جمع‌آوری شدند. در این مرحله باید در انتظار القای EB به سلول‌های عصبی بود. سلول‌های القا شده را بر روی پلیت ۱۲ حفره‌ای پوشیده با پلی لیزین منتقل نموده و در محیط کشت به منظور تکمیل تمایز سلول‌های نوروایپی تلیوم که در زیر شرح داده شده است تا زمان کشت ۱٤+٤ کشت داده می‌شوند: Neurobasal-A-medium حاوی BSA ۱*mg/ml*، B27 ۲٪، N.E.A.A 100x ۱٪، گلوتامین (L-glu.200*mm*) ۲*mM* (تمامی موارد محصول شرکت Gibco آلمان بود). فاکتورهای رشد Shh، R.A، NGF، bFGF برحسب گروه سلولی انتخابی و آنتی‌بیوتیک‌های پنی‌سیلین/ استرپتومایسین به میزان ۱٪ به محیط فوق اضافه گردید.

بررسی تمایز سلولی به روش RT-PCR: سلول‌های کشت شده، در روزهای۲+٤، ۹+٤، ۱۲+٤، ۱٤+٤، ۱٦+٤ برای بررسی بیان ژن‌های اختصاصی سلول‌های عصبی به ترتیب زمان‌های ذکر شده: Nestin، Nkx2.2، Nurr-1، S100 و Olig-2 انتخاب شدند. سپس سلولها را از سطح پلیت جدا کرده سریعاً RNA سلولی استخراج گردید و با روش RT-PCR، cDNA مربوطه تهیه و در دمای ۲۰- ℃ ذخیره گردید. انتخاب زمان‌های فوق براساس زمان بیان این ژنها در مسیر تکوین سیستم عصبی بود. همچنین ژن GAPDH به عنوان یک ژن House keeping و ژن oct-4 به عنوان مارکر سلول‌های بنیادی تمایز نیافته بررسی شد.

تمام گروه‌های سلولی تحت تیمار با فاکتورهای رشد در زمان‌های تعیین شده جدا شده و گروه‌های کنترلی نیز در نظر گرفته شدند. یک گروه کنترل منفی از سلول‌های تیمار نشده با فاکتورها برای تأیید عدم تمایز خودبخودی، گروه کنترل مثبت سلول‌های بالغ مغز موش، گروه gDNA برای تأیید عدم وجود سودوژن[1]، گروه W که بجای cDNA آب استفاده شد و گروه ESC از cDNA حاصل از سلول‌های بنیادی برای بررسی تمایز خودبخودی قبل از القا با فاکتورها استفاده شد. سپس پرایمر مناسب برای هر یک از این ژنها با توالی زیر طراحی گردید و به روش PCR بیان هر یک از ژنها

1- Pseudogene

Downloaded from http://www.jri.ir

در محتوی CD حاصل از سلولها بررسی گردید و پس از انجام واکنش PCR محصول به دست آمده را با روش الکتروفورز بررسی نموده و تصاویر تهیه شدهٔ آن در قسمت نتایج ارائه می‌شود.

mGAPDH: ۶۰ ℃، ۳۰ سیکل

F-5′-CAGGAGACGAGACCCCACTA-3′
R-3′-GGCATGGACTGTGGTCATGA-5′

Nestin (NM 016701): ۶۰ ℃، ۳۵سیکل (نشانگر اختصاصی سلول‌های اولیه نورواپی تلیالی)

F-5′- CTCGAGCAGGAAGTGGTAGG-3′
R-5′-TTGGGAACCAGGGACTGTTAG-3′

Nkx2.2 (NM 010919): ۵۲ ℃، ۴۰ سیکل (نشانگر اختصاصی سلول‌های اولیه سطح شکمی طناب عصبی)

F-5′-CTCTTCTCCAAAGCGCAGA-3′
R-5′-AACAACCGTGGTAAGGATCG-3′

Nurr-1 (NM 021279): ۵۸ ℃، ۳۵ سیکل (نشانگر سلول‌هایی که توانایی تبدیل به نورون‌های دوپامینرژیک را دارند)

F-5′-TGAAGAGAGCGGACAAGGTC-3′
R-5′-TCTGGAGTTAAGAAATCGGAGCTG-3′

S100 (GB AY 465109): ۳۹/۴۷ ℃، ۳۵ سیکل (نشانگر اختصاصی آستروسیتها)

F-5′-TGAAGGGTCCATCAGTCA-3′
R-5′-CTAGTAGAGGCTGTG-3′

Nested RCR Olig2 (NM 016967): ۵۸ ℃، ۳۵ سیکل

F-5'-TCAGAGCACAGGAGCAAGC-3'
R-5'-AGAATACCCCCTCCCAAAAA-3'

oct-4: ۶۵ ℃، ۳۵ سیکل

F-5'-GGCGTTCTCTTTGGAAAG GTGTTC-3'
R-5'-CTC GAA CCA CAT CCT TCT CT-3'

به این ترتیب میزان بیان هر ژن در سلولها با حضور هر فاکتور رشد با غلظت‌های متفاوت بررسی و مقایسه‌ای نیز بین فاکتورهای مختلف در بیان هر ژن با روش دنسیتومتری انجام گرفت.

بررسی تمایز سلولی به روش ایمونوسیتوشیمی: در روز ۹+۴ سلول‌هایی با مشخصات فوق را که بر روی لامل پوشیده با poly L-Lysin قرار داشتند برای رنگ‌آمیزی MAP-2 انتخاب گردید تا زوائد دندریتی نازک و جسم سلولی عصبی در آنها تأیید شود. مراحل انجام کار بدین ترتیب بود که: قبل از تثبیت سلول‌هایی که بر روی لامل کشت داده شده‌اند آنها را با PBS گرم شستشو داده وبا محلول پارافرم آلدئید ۴٪ به مدت ۱۵ دقیقه در دمای اتاق تثبیت نمودیم. سپس سه بار با PBS + ۰/۱٪ BSA شستشو داده و آنتی‌بادی اولیه MAP-2 با رقت ۲٪ به مدت یک ساعت بر روی سلولها در دمای اتاق قرار گرفت. پس از شستشو، آنتی‌بادی ثانویه کونژوگه با HRP با رقت ۱٪ به مدت یک ساعت انکوبه و مجددا شستشو و رنگ تکمیلی سوبسترای DAB و هماتوکسیلین (۱۵ دقیقه) اضافه شد، پس از شستشو و مونته کردن لام و با میکروسکوپ نوری دوربین‌دار لامها مشاهده و از نمونه‌های مورد نظر عکس تهیه گردید.

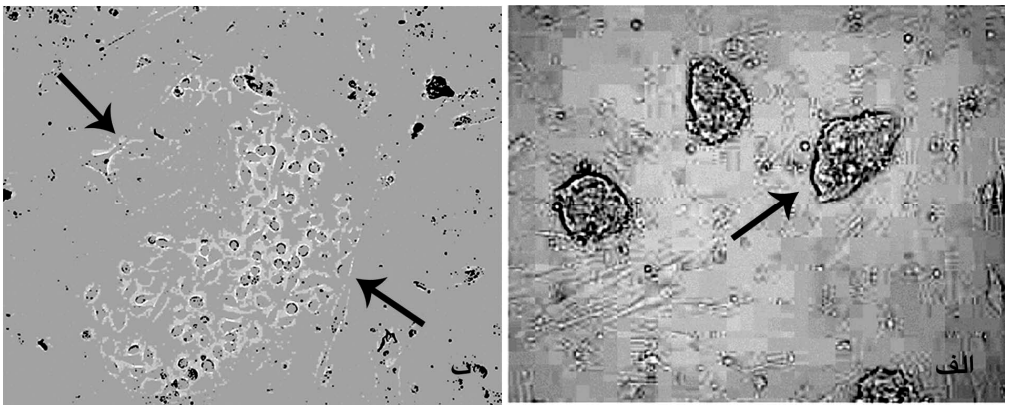
نتایج

کشت و تمایزسلول‌های ES: سلول‌های ردهٔ CCB که بر روی آن فیبروبلاست غیرفعال کشت داده شدند، تشکیل کلنی‌های شفاف و بهم چسبیده‌ای را دادند که قدرت تکثیر بالایی داشتند (شکل۱- الف). برای اطمینان از عدم تمایز آنها بیان ژن oct-4؛ با روش RT-PCR انجام شد. تشکیل باند تأیید می‌کند که این سلولها تمایز خود بخودی نیافته‌اند و به صورت همه توان می‌باشند.

در کشت ۴ مرحله‌ای برای تمایز سلول‌های ES در شرایط قطره، توده سلولی کروی شکل به هم فشرده‌ای تشکیل شد که سپس در محیط سوسپانسیون رشد نموده و بعد از انتقال بر روی پلیت پوشیده با فیبرونکتین، به طور کامل چسبیده و سلول‌های حاشیه کلنیها به اطراف پراکنده شده و تغییر شکل دادند که نشان دهنده شروع تمایز سلولی است (شکل ۱- الف).

نتایج RT-PCR از زمان ۲+۴ کشت EBs نشان داد که سلول‌های تحت تیمار با هر سه فاکتور رشد، القای عصبی را نشان می‌دهند و میزان بیان مارکرهای ژنی

Downloaded from http://www.jri.ir



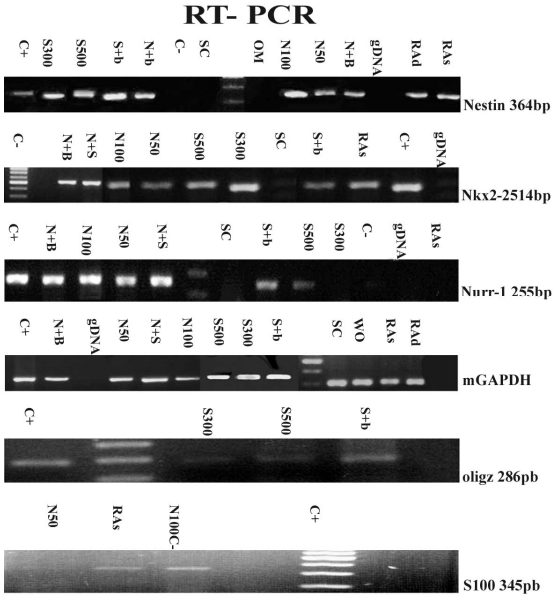
شکل ۱- الف: کلنی ES بر روی فیبروبلاست غیرفعال، ب: سلولهای ES درحال تمایز در شرایط کشت القای عصبی، بزرگنمایی× ٤٠٠

دیگر بسته به نوع و غلظت عامل القا کننده متفاوت است. نتایج PCR و باندهای تشکیل شده بعد از الکتروفورز آنها در (شکل۲) آمده است. عدم بیان این ژنها در گروه کنترل که بدون تیمار با فاکتور بوده است نشان دهنده اثر القایی دقیق این فاکتورها در تمایز سلول‌های بنیادی به سلول‌های عصبی می‌باشد. همچنین عدم بیان ژنها در گروه سلول‌های ES نیز تأییدکننده عدم تمایز خودبه‌خودی سلولی است. به منظور نتیجه‌گیری دقیقتر از میزان بیان ژنها تصاویر حاصل از الکتروفورز هر ژن به وسیله دنسیتومتری محاسبه شد.

انجام دنسیتومتری از الگوی باندها نشان داد که ژن نستین در تمام گروهها بیان شده و در گروهی که با Shh و bFGF تیمار شدند بیشترین میزان بیان را داشت اما در تیمار با NGF (٥٠*ng/ml*) ضعیف‌ترین باند را تشکیل داد. اما RA نسبت به Shh (٥٠٠ *ng/ml*) تأثیر کمتری در بیان ژن نستین داشت. البته اکثر سلول‌های تیمار شده با RA به علت تراتوژن بودن این فاکتور ۳-۲ روز بعد از تیمار از بین می‌رفتند. در عین حال بیان ژن Nkx2.2 در تمام گروه‌ها مشاهده شد که با تأثیر فاکتور Shh (۳۰۰*ng/ml*) بیشترین میزان بیان ژن را داشت؛ اما حضور bFGF بیان این ژن را کاهش داد.

Nurr-1 در گروه تیمار شده با RA بیان نشد اما بیشترین بیان را با فاکتورهای bFGF +NGF و کمترین بیان را با تأثیر Shh (۳۰۰*ng/ml*) نشان داد و گروه‌هایی که با NGF تیمار شده بودند نسبت به گروه‌های Shh به میزان بیشتری بیان شدند. ژن S100 در گروه‌های تیمار شده با NGF و RA بیان شد. ژن Olig2 فقط با حضور فاکتورهای Shh و bFGF +Shh بیان شد.

ایمونوسیتو شیمی: با رنگ‌آمیزی سلول‌های تحت تأثیر فاکتورهای رشد در تمامی گروه‌ها، بعد از روز ٩+٤ در تعدادی از سلولها حضور پروتئین MAP-2 در نواحی دندریتی و جسم سلولی مشاهده شد. سلول‌های نوراپی‌تلیالی در حال تقسیم با دو هسته نیز مشاهده شدند و نوریتها حضور پروتئین را نشان دادند که آنها



شکل ۲- نتایج انجام RT-PCR: تصویر باندهای تشکیل شده از بیان ژن‌های موردنظر بر روی ژل آگارز که براساس تعداد باز با مارکر PCR تأیید شده‌اند (RAs سلول‌های تیمار شده با RA با روش سوسپانسیون RAd سلول‌های تیمار شده با RA با روش قطره، S500,S300 تیمار با Shh *500nM* و *300nM*، N100,N50 تیمار با NGF *500nM* و 100 S+B تیمار با Shh+ bFGF. S+B تیمار با SC NGF+bFGF گروه سلول‌های بنیادی -C کنترل منفی بدون فاکتور).

Downloaded from http://www.jri.ir

را به عنوان سلول تحت میتوزی نوروایپیتلیالی می‌توان در نظر گرفت (شکل ۱- الف).

بحث

به دلیل توانایی تبدیل سلول‌های بنیادی به انواع سلول‌های تمایز یافته در شرایط آزمایشگاهی، در این تحقیق نیز با استفاده از سلول‌های بنیادی جنینی موشی رده CCB، آنها را در حضور فاکتورهای رشد القا کننده تمایز عصبی کشت داده و تعدادی از سلول‌های اولیه سیستم عصبی بدست آمد. اعتقاد براین است که با دستیابی به دانش فنی تولید سلول‌های بنیادی جنینی می‌توان از آنها به عنوان ذخیره‌ای سلولی که توانایی تمایز به انواعی از سلولها را دارند استفاده کرده و با فراهم آوردن امکان تمایزشان به سلول‌های مورد نظر از آنها در جهت بررسی روش‌های سلول درمانی و پیوند سلولی استفاده نمود.

نتایج این تحقیق نشان داد که سلول‌های ES، برای تمایز مستقیم و غیرخودبخودی به نورون و سلول‌های گلیالی در شرایط in vitro نیاز به افزودن عوامل سیتوکینی و هورمونی یا فاکتورهای رشد به محیط کشت دارند (۱۷). کشت و تمایز سلول‌های بنیادی در شرایط سوسپانسیون به نورون‌های اولیه نستین مثبت و گلیالها توسط Bain, Frichard در سال ۱۹۹۵ به صورت یک پروتکل ابتدایی ارائه شد (۱۸،۱۹).

Okabe و همکاران FGF را به عنوان عاملی میتوژن در تکثیر سلول‌های بنیادی تمایز یافته معرفی کردند (۲۰) و محققین دیگری نیز چون Li (۲۱)، Rao و Mojtaba با تغییراتی که در روش ساده Bain دادند، توانستند در شرایط in vitro تعداد بیشتری از سلول‌های تمایز یافته عصبی را بدست آورند. Rolletschek و همکاران با روش قطرات معلق، کلنی‌های سه بعدی EBs ۲۰۰ سلولی بدست آوردند و آنها را به شکل سوسپانسیون در محیط بدون سرم کشت داده و بعد از انتقال بر پلیت پوشیده با پلی‌لیزین ولامینین در حضور bFGF و EGF، سلول‌های اجدادی عصبی را تکثیر و نورون‌های دوپامینرژیک را تشکیل دادند (۲۳). در حالیکه در این تحقیق به منظور القای تمایز عصبی از ردهٔ سلولی بنیادی جنینی EBs ۵۰۰ سلولی تهیه شد و سپس در محیط سوسپانسیون سرم‌دار که در آن bFGF به عنوان عامل میتوژن حضور داشت، کشت داده شدند. بعد از انتقال، کلنیها بر پلیت پوشیده با فیبرونکتین منتقل شدند و به محیط کشت، فاکتورهای رشد RA, NGF, Shh افزوده شد. البته به علت خاصیت تراتوژنیک RA که در این تحقیق مشاهده شده سلول‌های ES مطابق روش Bain کشت داده شدند. در این مرحله حضور سلول‌های نستین مثبت که بیانگر القای عصبی توسط هر سه عامل القایی می‌باشد (۱۸) مشاهده شد. سپس برای تشکیل نورون‌های تخصص یافته سلول‌های نستین مثبت روی پلی لیزین در حضور محیط کشت اختصاصی نوروبازال با مکمل B27 و BSA و همان فاکتورهای القایی انتقال داده و رشد داده شدند. برای این منظور مکمل‌های B27 و BSA و کشت بر حفظ و رشد سلول‌های فوق تأثیر داشتند و با توجه به اینکه سلول‌های پیش‌ساز عصبی شکمی نخاع، ژن Nkx2.2 را بیان می‌نماید (۸)، در این مرحله نورون‌های اولیه حد واسط با بیان Nkx2.2 تأیید نمود که سلول‌های اجدادی عصبی سطح شکمی طناب نخاعی بدست آمده است. همچنین در این تحقیق برای اولین بار گزارش می‌شود که میزان بیان ژن Nurr1 تحت تأثیر NGF در سلول‌های بنیادی جنینی افزایش یافته و القای تمایز به سلول‌های اولیه دوپامینرژیک انجام گرفته و با حضور bFGF این اثر تقویت شده است. همچنین این فاکتور به تنهایی توانایی تمایز دادن سلول‌های بنیادی به سلول‌های آستروسیتی را داشته در حالیکه فاکتور Shh مسیر تشکیل آستروسیستها را مهار کرده و در مقابل با حضور این فاکتور اولیگوسیت‌های Olig-2 مثبت از

Downloaded from http://www.jri.ir

سلول‌های ES تمایز می‌یابند.

حضور MAP-2 که پروتئین اختصاصی متصل به میکروتوبول‌های اسکلت سلولی در دندریتها است (۲٤،۲۵) با رنگ آمیزی سلولی در سلول‌های تیمار شده با فاکتورهای القایی مورد نظر حضور این پروتئین تایید شد که نشان دهنده تمایز به نورون از سلول‌های ES می‌باشد. به این ترتیب در شرایط کشت پیشنهادی این تحقیق می‌توان با اطمینان بیشتری به سلول‌های عصبی حاصل از تمایز مستقیم سلول‌های بنیادی دست یافت. در نهایت از این تحقیق می‌توان نتیجه‌گیری نمود که بیشترین میزان تأثیر در القای تشکیل سلول‌های عصبی اولیه را فاکتور Shh با غلظت ۵۰۰nM در حضور bFGF داشته و سلول‌های دیگری مانند نورون‌های حد واسط V3 و نورون‌های حرکتی اولیه نیز به وسیله این فاکتور القا می‌شوند و تنها عاملی که توانایی القای تشکیل اولیگوسیتها را داشته فاکتور Shh است. در مقابل با تیمار NGF آستروسیستها تمایز یافته و این فاکتور رشد بیشترین اثر را در تشکیل نورون‌های اولیه دوپامینرژیک نشان می‌دهد که حضور فاکتور bFGF اثر سینرژیک بر آن داشته است. از مهمترین اهداف این تحقیق دست‌یابی به عوامل مؤثر در شرایط کشت سلولی بود تا اطمینان بیشتری به تشکیل سلول‌های سیستم عصبی مرکزی از سلول‌های بنیادی ایجاد گردد. با نتایج حاصل در آینده می‌توان از این روش در تولید سلول‌های تخصصی عصبی استفاده نمود و آن را در روش‌های سلول درمانی بیماری‌های نقص عملکردی نورون‌های سیستم عصبی مانند پارکینسون و یا جراحات نخاعی بکار بست.

نتیجه‌گیری

یافته‌های حاضر در این تحقیق نشان می‌دهد که حضور فاکتورهای RA، NGF و Shh با تأثیر در مسیرهای ژنتیکی در تمایز و تکوین سلول‌های بنیادی به برخی سلول‌های سیستم عصبی مؤثر بوده‌اند و حضور همزمان bFGF نیز به عنوان یک عامل تقویت کننده مشاهده شد. به نظر می‌رسد نتایج فوق را می‌توان در جهت تولید سلول‌های عصبی تمایز یافته و برای اهداف درمانی استفاده نمود. همچنین به علت محدودیت‌های وسایل و ابزار مناسب نتایج کمی حاصل نشده است؛ لذا پیشنهاد می‌شود در مطالعات آتی با استفاده از روش فلوسایتومتری این نیاز را مرتفع نمود.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله نویسندگان این مقاله از زحمات کلیه همکاران پژوهشکده فناوری‌های نوین علوم پزشکی جهاددانشگاهی ــ ابن‌سینا بویژه سرکار خانم عینی مسئول بخش حیوانات آزمایشگاهی و سرکار خانم قاسمی کارشناس بخش ژنتیک و جناب آقای بیات کمال تشکر و قدردانی می‌نمایند.

References

1- Gardner RL, Cockroft DL. Complete dissipation of coherent clonal growth occurs before gastrulation in mouse epiblast. Development. 1998;125(13):2397-402.

2- 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):7634-8.

3- Brook FA, Gardner RL. The origin and efficient derivation of embryonic stem cells in the mouse. Proc Natl Acad Sci USA. 1997;94(11):5709-12.

4- Evans MJ, Kaufman MH. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. Nature. 1981; 9;292(5819):154-6.

5- Wichterle H, Lieberam I, Porter JA, Jessell TM. Directed differentiation of embryonic stem cells into motor neurons. Cell. 2002;110(3):385-97.

6- Weissman IL, Anderson DJ, Gage F. Stem and progenitor cells: origins, phenotypes, lineage commitments, and transdifferentiations. Annu Rev Cell Dev Biol. 2001;17:387-403.

Downloaded from http://www.jri.ir

7- Bain G, Kitchens D, Yao M, Huettner JE, Gottlieb DI Embryonic stem cells express neuronal properties in vitro. Dev Biol. 1995;168(2):342-57.

8- Briscoe J, Pierani A, Jessell TM, Ericson J. A homeodomain protein code specifies progenitor cell identity and neuronal fate in the ventral neural tube. Cell. 2000; 101(4):435-45.

9- Yung SY, Gokhan S, Jurcsak J, Molero AE, Abrajano JJ, Mehler MF. Differential modulation of BMP signaling promotes the elaboration of cerebral cortical GABAergic neurons or oligodendrocytes from a common sonic hedgehog-responsive ventral forebrain progenitor species. Proc Natl Acad Sci U S A. 2002; 10;99(25):16273-8.

10- Gilbert Scott F. Developmental biology, sinuar U 6th Edition. 2000;pp:272-409.

11- Novitch BG, Chen AL, Jessell TM. Coordinate regulation of motor neuron subtype identity and pan-neuronal properties by the bHLH repressor Olig2. Neuron. 2001;31(5):773-89.

12- Burbach JP, Smits S, Smidt MP. Transcription factors in the development of midbrain dopamine neurons. Ann N Y Acad Sci. 2003;991:61-8. Review.

13- Marshak DR, Gardner RL, Gottlieb D. Stem Cell Biology. CSHL press. 2000;pp:250-1.

14- Martinat C, Bacci JJ, Leete T, Kim J, Vanti WB, Newman AH, Cha JH, Gether U, Wang H, Abeliovich A. Cooperative transcription activation by Nurr1 and Pitx3 induces embryonic stem cell maturation to the midbrain dopamine neuron phenotype. Proc Natl Acad Sci USA. 2006;103(8):2874-9.

15- Chang L, Jones Y, Ellisman MH, Goldstein LS, Karin M. JNK1 is required for maintenance of neuronal microtubules and controls phosphorylation of microtubule-associated proteins. Dev Cell. 2003;4(4):521-33.

۱۶- بربرستانی محمد، نوروآناتومی پایه وپزشکی، نشر نور دانش (۱۳۷۹)، صفحات: ۲۹-۲۰.

17- Almazan G, Honegger P, Du Pasquier P, Matthieu JM Dexamethasone stimulates the biochemical differentiation of fetal forebrain cells in reaggregating cultures. Dev Neuro Sci. 1986;8(1):14-23.

18- Bain G, Kitchens D, Yao M, Huettner JE, Gottlieb DI Embryonic stem cells express neuronal properties in vitro. Dev Biol. 1995;168(2):342-57.

19- Fraichard A, Chassande O, Bilbaut G, Dehay C, Savatier P, Samarut J. In vitro differentiation of embryonic stem cells into glial cells and functional neurons. J Cell Sci. 1995;108(Pt 10):3181-8.

20- Okabe S, Forsberg-Nilsson K, Spiro AC, Segal M, McKay RD. Development of neuronal precursor cells and functional postmitotic neurons from embryonic stem cells in vitro. Mech Dev. 1996;59(1):89-102.

21- Mujtaba T, Piper DR, Kalyani A, Groves AK, Lucero MT, Rao MS. Lineage-restricted neural precursors can be isolated from both the mouse neural tube and cultured ES cells. Dev Biol. 1999;214(1):113-27.

22- Li M, Pevny L, Lovell-Badge R, Smith A. Generation of purified neural precursors from embryonic stem cells by lineage selection. Curr Biol. 1998;(8):971-974.

23- Rolletschek A, Chang H, Guan K, Czyz J, Meyer M, Wobus AM. Differentiation of embryonic stem cell-derived dopaminergic neurons is enhanced by survival-promoting factors. Mech Dev. 2001;105(1-2):93-104.

24- Garner CC, Tucker RP, Matus A. Selective localization of messenger RNA for cytoskeletal protein MAP2 in dendrites. Nature. 1988;336(6200):674-7.

25- Binder LI, Frankfurter A, Rebhun LI. Differential localization of MAP-2 and tau in mammalian neurons in situ. Ann N Y Acad Sci. 1986;466:145-66.

26- Yung SY, Gokhan S, Jurcsak J, Molero AE, Abrajano JJ, Mehler MF. Differential modulation of BMP signaling promotes the elaboration of cerebral cortical GABAergic neurons or oligodendrocytes from a common sonic hedgehog-responsive ventral forebrain progenitor species. Proc Natl Acad Sci USA. 2002;99 (25):16273-8.

Downloaded from http://www.jri.ir