مقاله پژوهشی

مجله سلول و بافت (علمی - پژوهشی)
جلد ۷، شماره ٤، زمستان ۱۳۹۵

بیان ژن سیناپتوفیزین در سلول‌های عصبی حاصل از تمایز سلول‌های بنیادی کارسینومای جنینی تحت تأثیر عصاره مغز نوزاد رت

حمیدرضا جلیل .M.Sc ، فائزه عزیزی .M.Sc ، سیدجمال مشتاقیان .Ph.D ، فریبا اسماعیلی .Ph.D*

- دانشگاه اصفهان، دانشکده علوم، گروه زیست‌شناسی، اصفهان، ایران
* پست الکترونیک نویسنده مسئول: f.esmaeili@sci.ui.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۵/۲۴ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۵/۸/۲۵

چکیده

هدف: در این مطالعه قابلیت عصاره مغز نوزاد رت برای القای تمایز عصبی در سلول‌های بنیادی کارسینومای جنینی P19 مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها: عصاره مغز نوزاد رت تحت شرایط استریل جمع‌آوری و غلظت پروتئین کل موجود در آن تعیین شد. سپس میزان زنده-مانی سلول‌ها پس از تیمار با عصاره مغز به دست آمد. جهت تمایز، اجسام شبه‌جنینی حاصل از کشت معلق سلول‌ها به مدت هفت تا چهارده روز در معرض محیط کشت حاوی سه درصد سرم به همراه عصاره قرار گرفتند. برای ارزیابی تمایز عصبی از دو روش رنگ‌آمیزی اختصاصی و real-time PCR استفاده شد.

نتایج: رنگ‌آمیزی کرزیل‌ویوله مورفولوژی عصبی سلول‌های تمایز یافته را محرز ساخت. بیان ژن‌های اختصاصی عصبی به وسیله real-time PCR تأیید شد. عصاره مغز در حال تکوین که سرشار از عوامل نوروتروفیک است، توانست بیان ژن‌های سیناپتوفیزین (پروتئین غشای پیش‌سیناپسی) و نستین (فیلامنت حدواسط سلول‌های پیش‌ساز عصبی) را در این سلول‌ها القا نماید. همچنین بیان فاکتور رونویسی Nanog که از عوامل بسیار مهم در تنظیم میزان پرتوانی سلول‌های بنیادی و مرتبط با خودنوزایی این سلول‌هاست، تحت تأثیر عامل القایی عصاره مغز کاهش یافت.

نتیجه‌گیری: نتایج این پژوهش نشان داد که عصاره مغز نوزاد رت می‌تواند باعث بروز فنوتیپ عصبی در سلول‌های بنیادی P19 شده و بیان ژن‌های اختصاصی عصبی را در این سلول‌ها القا نماید. این مطالعه پتانسیل استفاده از ترکیب عصاره مغز نوزاد رت و درمان با سلول بنیادی را برای بهبود نقایص بیماری‌های تخریب‌کننده عصبی پیشنهاد می‌کند.

واژگان کلیدی: تمایز عصبی، سلول‌های کارسینومای جنینی، عصاره مغز، نشانگرهای اختصاصی سلول عصبی

Archive of SID
www.SID.ir

مقدمه

آسیب‌های سیستم عصبی از علل عمده مرگ و میر در جهان محسوب می‌شوند. تاکنون روش‌های مختلفی برای درمان چنین بیماری‌هایی کشف شده است. برخی از این روش‌ها عبارت است ازکاهش سطح پروتئین‌های تجمع-یافته با استفاده از روش‌های محدودسازی نفوذپذیری سد خونی-مغزی، استفاده از فاکتورهای رشد به‌منظور حمایت از نورون‌های آسیب‌دیده و همچنین دارودرمانی (۱-۳). از جمله روش‌های درمانی دیگر استفاده از سلول‌های بنیادی است که امیدهای تازه‌ای را برای ترمیم بافت‌های عصبی مرکزی آسیب‌دیده فراهم آورده است. تمایز سلول‌های بنیادی به سلول‌های عصبی نیاز به تحقیق و پژوهش فراوان دارد. در سال‌های اخیر استفاده از روش های *in vitro* برای تولید سلول‌های عصبی از سلول‌های چندتوان در محیط آزمایشگاه توجه محققین را به خود جلب کرده است (۴). دودمان‌های سلول بنیادی که پایدار، نامیرا و پرتوان هستند کاربردهای درمانی گسترده‌ای داشته و منبع نامحدودی از سلول برای استفاده در پیوند و ترمیم بافت فراهم می‌کنند (۵). P19 رده سلولی سرطانی جنینی موش است (EC: embryonal carcinoma cells) که به‌عنوان مدلی برای مطالعه مراحل ابتدایی تمایز و تکوین مورد استفاده قرار گرفته است. این سلول‌ها مشابه سلول‌های توده داخلی بلاستوسیست هستند و بسته به شرایط کشت می‌توانند به سلول‌های سه لایه جنینی تمایز یابند. تیمار تجمعات سلولی P19 با رتینوئیک‌اسید باعث تمایز آن‌ها به سلول‌های عصبی و گلیا می‌شود (۶). در این پژوهش عصاره مغز نوزاد رت به‌عنوان عامل القاگر جهت تمایز عصبی در این سلول‌ها استفاده شد. قابلیت تمایز سلول‌های بنیادی P19 به دودمان‌های اکتودرمی یا مزودرمی به کمک القاکننده‌های تمایز، مانند رتینوئیک-اسید و دی‌متیل‌سولفوکساید به اثبات رسیده است (۷). هنگامی‌که سلول‌های P19 با رتینوئیک‌اسید تیمار شوند به نورواکتودرم و در نهایت به نورون، آستروگلیا، میکروگلیا و اولیگودندروسیت تمایز می‌یابند (۸). به‌نظر می‌رسد رتینوئیک‌اسید زنجیره‌ای از وقایع تکوینی را شروع می‌کند که مشابه وقایع تکوینی در جنین است. به‌عنوان مثال، مانند تکوین بافتی نورواکتودرم، سلول‌های P19 تیمار شده با رتینوئیک‌اسید دستخوش تغییرات سریع در تعداد زیادی از پروتوانکوژن‌ها مانند Myc، Wnt-1، Rb-1، C-src می‌شوند (۹). نستین نوعی پروتئین رشته‌ای حدواسط و یکی دیگر از شاخص‌های نورون‌های جنینی است. در حالی‌که این پروتئین در برخی از سلول‌هایP19 تمایز نیافته وجود دارد، در حین تمایز این سلول‌ها به نورون دستخوش افزایشی گذرا در بیان می‌شود (۱۰). این نشانگر به‌طور معمول برای شناسایی سلول‌های زاینده عصبی در دستگاه عصبی مرکزی مورد استفاده قرار می‌گیرد. نستین در مراحل ابتدایی تکوین دستگاه عصبی بیان می‌شود (۱۱). تشکیل سیناپس بین نورون‌های مشتق از P19 با استفاده از روش‌های مختلف اثبات شده است. کشت‌های نورونی P19 برای ردیابی سیناپتوفیزین با واکنش ایمنی بررسی شدند (۱۲). بیان این پروتئین با شکل‌گیری سیناپس مرتبط است. سیناپتوفیزین پروتئین درون‌غشایی وزیکول‌های پیش‌سیناپسی بوده و محل فعالیت آن در سلول عصبی به‌صورت نقاطی قابل تشخیص است (۱۳). بیان سیناپتوفیزین در این سلول‌ها نشانگر وجود سیناپس-های کارآمد و همچنین توانایی تولید پتانسیل عمل است (۱۴). در واقع، سیناپتوفیزین از نشانگرهای معتبر مراحل نهایی تمایز عصبی است (۱۵). در مطالعه‌ای وجود سلول-های بیان‌کننده سیناپتوفیزین تحت اثر القایی رتینوئیک-اسید در حدود ده تا دوازده روز پس از کشت اجسام جنینی حاصل از سلول‌های بنیادی جنینی گزارش شده است (۱۶). بر اساس گزارش‌های دیگر نورون‌های مشتق از سلول‌های P19 در شرایط آزمایشگاهی سیناپس‌هایی تشکیل دادند که نسبت به سیناپتوفیزین واکنش ایمنی نشان دادند (۱۷). از عوامل بسیار مهم در تنظیم میزان پرتوانی سلول‌های بنیادی می‌توان به دو عامل Oct3/4 و Nanog اشاره کرد. نانوگ رمزگذار نوعی عامل رونویسی است و نقش مهمی در حفظ خودنوزایی و پرتوانی سلول-های بنیادی جنینی دارد (۱۸). نانوگ در سلول‌های بنیادی جنینی و سلول‌های کارسینومای جنینی بیان می-شود. بیان این مولکول در مراحل اولیه تمایز سلول‌های بنیادی جنینی کاهش می‌یابد (۱۹). هدف این پژوهش بررسی القای فنوتیپ عصبی در سلول‌های بنیادی P19 تحت تاثیر عصاره مغز نوزاد رت بود. نگه‌داری وضعیت تمایزی و تکثیری سلول‌های بنیادی به ریزمحیطی که

Archive of SID
www.SID.ir

سلول‌های بنیادی در آن قرار دارند بستگی دارد. فراهم کردن محیط مناسبی جهت رشد و تمایز سلول‌های بنیادی با استفاده از فاکتورهای رشد، پروتئین‌های ماتریکس و عصاره‌های بافتی از اهمیت به‌سزایی برخوردار است. پانکراس در حال تکوین، فاکتورهای محلولی تولید می‌کند که می‌توانند تمایز سلول‌های بنیادی جنینی به سلول‌های انسولین‌ساز را در شرایط *in vitro* القا کنند (۲۰-۲۲). تیمار سلول‌های استرومایی مغز استخوان با استفاده از عصاره مغز طبیعی یا مغز آسیب‌دیده سبب افزایش میانجی‌های حمایت‌کننده نورونی و رگ‌زا از قبیل فاکتور نوروتروفیکی مشتق از مغز، فاکتور رشد عصبی و فاکتور رشد اندوتلیال رگی می‌شود (۲۳). در پژوهش حاضر از عصاره تهیه شده از مغز در حال تکوین نوزاد رت برای القای تمایز سلول‌های بنیادی به سلول‌های عصبی استفاده شد. سپس سلول‌های مذکور از نظر تمایزی بررسی شده و از جنبه‌های مختلف از جمله مورفولوژی ظاهری و توانایی بیان ژن‌های اختصاصی عصبی مورد ارزیابی قرار گرفتند.

مواد و روش‌ها

کشت و نگه‌داری سلول‌های بنیادی P19: رده سلولی P19 (بانک سلولی، انستیتو پاستور، تهران، ایران) در محیط کشت α-MEM (α-modified 11900-073 Eagle's medium: Gibco,) و غلظت ده درصد سرم FBS (fetal bovine serum: Sigma, 10270-106) و مخلوط آنتی‌بیوتیکی پنی‌سیلین/استرپتومایسین کشت و در شرایط دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و پنج درصد CO_2 انکوبه شد. سلول‌ها پس از رسیدن به تلاقی مناسب واکشت و یا منجمد شدند. به‌منظور القای فنوتیپ عصبی از سلول‌هایی استفاده شده که فقط یک یا دو واکشت متوالی داشتند.

تولید اجسام شبه‌جنینی: به‌منظور تولید اجسام شبه-جنینی از سلول‌های P19، تعداد $۲/۵\times۱۰^{۴}$ سلول در یک میلی‌لیتر در پتری‌دیش‌هایی با قابلیت چسبندگی پایین در محیط α-MEM همراه با ده درصد سرم کشت داده شد. از آنجایی‌که در این پتری‌دیش‌ها سلول به بستر کشت نمی‌چسبد، تمایل دارند به یکدیگر چسبیده و تجمعات سلولی یا اجسام شبه‌جنینی (embryoid bodies) تشکیل دهند.

حیوان آزمایشگاهی و اخلاق پژوهشی: در این پژوهش از نوزاد یک تا دو هفته‌ای رت استفاده شد. برای این منظور از لانه حیوانات دانشکده علوم پزشکی دانشگاه اصفهان بیست نوزاد رت یک تا دو هفته‌ای نژاد ویستار (Wistar) تهیه و تحت شرایط استاندارد لانه حیوانات نگه‌داری شد. تمامی مراحل پژوهش بر اساس دستورالعمل اخلاقی ویژه ملی پژوهش‌های زیست‌پزشکی وزارت بهداشت و آموزش پزشکی انجام گرفت.

تهیه عصاره مغز نوزاد رت و تعیین غلظت پروتئین به‌روش بردفورد: به‌منظور تهیه عصاره مغز نوزاد رت برای القای عصبی در سلول‌های P19، مغز بیست نوزاد رت در شرایط استریل استخراج و سپس عصاره‌گیری شد. ابتدا بافت مغز در حضور ممانعت‌کننده پروتئاز (protease inhibitor, PMSF: Roche, 10 837 091 001) توسط هموژنایزر خرد و همگن شد. محلول به‌دست آمده به‌مدت ده دقیقه در دور rpm۳۰۰۰ و بیست دقیقه در دور rpm۱۲۰۰۰ در دمای چهار درجه سانتی‌گراد سانتریفوژ شد. مایع رویی که محتوی مجموع پروتئین-هاست از چندین عصاره‌گیری جمع‌آوری و مخلوط شد. سرانجام غلظت پروتئینی عصاره با استفاده از تکنیک بردفورد (Bradford reagent: Sigma, B6916) تعیین و عصاره تا زمان استفاده در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شد.

تمایز عصبی سلول‌های P19 با استفاده از عصاره مغز نوزاد رت: جهت القای تمایز عصبی در سلول‌های کارسینومای جنینی رده P19، سلول‌های حاصل از کشت چسبنده اجسام شبه‌جنینی با غلظت‌های مختلف عصاره مغز تیمار و روی لامل‌های ژلاتینه در میکروپلیت‌های ۱۲ خانه‌ای کشت شدند. یک گروه به‌عنوان کنترل منفی در نظر گرفته شد؛ به‌طوری‌که هیچ‌گونه ماده القاکننده‌ای به سلول‌ها افزوده نشد. برای هر گروه در هر میکروپلیت حداقل سه تکرار در نظر گرفته شد. سلول‌ها به‌مدت هفت تا چهارده روز در محیط القا قرار گرفتند. محیط‌های القا شامل : ۱) محیط القای محتوی غلظت ۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر عصاره مغز، ۲) محیط القای محتوی غلظت ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر عصاره مغز، ۳) محیط القای محتوی غلظت ۲۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر عصاره مغز، ۴) محیط القای محتوی غلظت ۳۰۰ میکروگرم بر میلی-

Archive of SID
www.SID.ir

لیتر عصاره مغز و ۵) محیط القای محتوی غلظت ۴۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر عصاره مغز. در طی زمان القای عصبی از غلظت سه درصد FBS استفاده شد.

تعیین میزان زنده‌مانی سلولی به روش تریپان‌بلو: جهت بررسی میزان زنده‌مانی سلولی از روش تریپان‌بلو استفاده شد. در ابتدا شمارش سلولی به‌کمک لام نئوبار انجام و تعداد ۱۰۰۰ سلول در هر چاهک ظرف ۲۴ چاهکی کشت داده شد. رنگ‌آمیزی سلول با حجم مساوی رنگ تریپان‌بلو (بیست میکرولیتر سوسپانسیون سلولی+ بیست میکرولیتر رنگ تریپان‌بلو) انجام شد. سپس با استفاده از لام نئوبار و در زیر میکروسکوپ نوری سلول-های رنگ نشده (سلول‌های زنده) و رنگ شده (سلول‌های مرده) شمارش شدند. در این روش سلول‌های مرده به‌رنگ آبی در آمده و سلول‌های زنده بدون رنگ باقی می‌مانند.

رنگ‌آمیزی کرزیل‌ویوله: به‌منظور بررسی شکل ظاهری سلول‌های عصبی در محیط کشت از رنگ‌آمیزی اختصاصی کرزیل‌ویوله که اجسام نیسل را رنگ‌آمیزی می‌کند استفاده شد. سلول‌ها با PBS شستشو و با استفاده از اتانول ۷۰ درصد به‌مدت ده دقیقه در دمای اتاق تثبیت شدند. آنگاه در ترکیبی از اتانول و اسید استیک ۵ درصد به‌مدت بیست دقیقه در ۲۰- درجه سانتی‌گراد آبگیری و پس از شستشو به‌مدت سه تا ده دقیقه در محلول محتوی رنگ کرزیل‌ویوله (کرزیل‌ویوله ۰/۲۵ درصد، اسیداستیک گلاسیال۰/۸ درصد، استات سدیم۰/۶ میلی مولار، آب مقطر۱۰۰ سانتی‌مترمکعب) انکوبه شدند. سلول‌های رنگ‌شده با استفاده از میکروسکوپ نوری در پنج میدان دید که به‌طور تصادفی انتخاب شدند، مشاهده و شمارش شدند.

تعیین دوز مناسب عصاره مغز به‌منظور القای فنوتیپ عصبی در سلول‌های P19: در این پژوهش پس از تجزیه و تحلیل نتایج حاصل از آزمایش‌های مختلف (تریپان‌بلو و رنگ‌آمیزی اختصاصی کرزیل‌ویوله) بهترین غلظت عصاره مغز نوزاد رت جهت القای تمایز عصبی در سلول‌های P19 تعیین و برای ادامه کار مورد استفاده قرار گرفت.

Real-time PCR

طراحی پرایمر: پرایمرها با استفاده از نرم‌افزار geneious طراحی و در Primer-BLAST سایت NCBI مورد بررسی و آنالیز قرار گرفتند. پرایمرهای مورد استفاده در این پروژه برای ژن‌های Nanog، نستین و سیناپتوفیزین و همچنین ژن خانگی بتامیکروگلوبین (β2-microglobin) طراحی شد. اطلاعات مربوط به پرایمرها در جدول ۱ ارائه شده است.

استخراج RNA و تکثیر cDNA هدف کلی از این مرحله استخراج RNA کل سلول به‌صورت خالص و دست نخورده است. RNA حاصله سپس خود به‌عنوان سوبسترایی برای اهداف بعدی تحقیق به‌کار برده می‌شود. پس از استخراج RNA، مراحل کار برای تبدیل RNA به cDNA با استفاده از کیت سنتز cDNA (PrimeScript™ RT reagent Kit: RR037A) انجام شد. به‌منظور تکثیر cDNA حاصل و تعیین میزان بیان ژن از دستگاه StepOnePlus™ ویژه real-time PCR استفاده شد.

آزمون‌های آماری

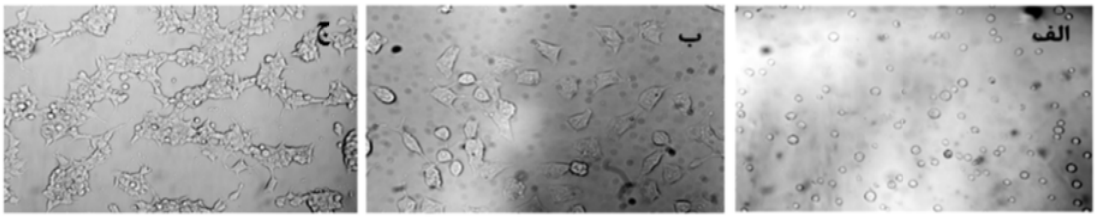
آزمایش‌ها در قالب طرح کامل تصادفی (CRD) انجام و داده-ها براساس آزمون دانکن Duncan's MultipleRange Test (DMRT) با حداقل سه تکرار و هر تکرار خود شامل سه نمونه مقایسه شد. تجزیه و تحلیل آماری به‌کمک نرم-افزار SAS (ver.8.02) و MSTATC در سطح $p<۰/۰۵$ صورت گرفت. نمودارها با نرم افزار اکسل رسم شد.

نتایج

کشت و تکثیر سلول‌های بنیادی P19

شکل ۱ الف سلول‌های P19 را در حالت معلق نشان می-دهد. این سلول‌ها در ظروف کشت چسبنده ساختار چندوجهی به‌خود گرفته (شکل ۱ ب) و در فاصله زمانی دوازده تا چهارده ساعت به سرعت تکثیر نمودند. در حدود ۲۴ ساعت بعد از ذوب یا واکشت در ظرف کشت حاوی α- MEM همراه با ده درصد سرم تشکیل کلونی‌های سلولی را آغاز کردند (شکل۱ ج). وقتی این کلونی‌ها به نقطه تلاقی با هم رسیدند واکشت شدند.

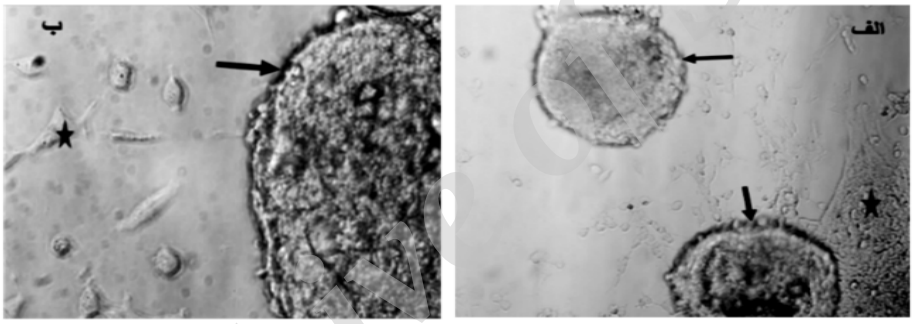
Archive of SID
www.SID.ir



شکل ۱: تصویر میکروسکوپ نوری از کشت و تکثیر سلول‌های بنیادی P19 در محیط کشت α-MEM محتوی ده درصد سرم در حالت معلق (الف) و چسبیده به بستر کشت (ب و ج). الف و ج (100X)، ب (400X)

تولید اجسام شبه‌جنینی

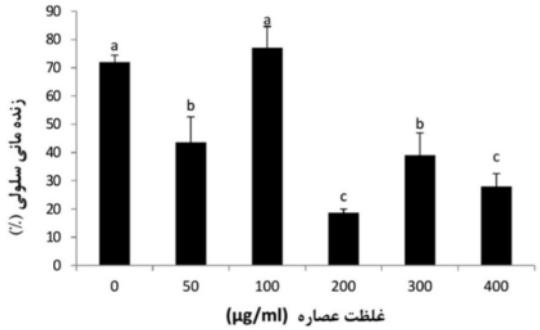
ویژگی مهم سلول‌های چنداستعدادی P19 که باعث شده از آن‌ها به‌عنوان مدل مناسبی در تحقیقات آزمایشگاهی استفاده شود، توانایی تشکیل اجسام شبه‌جنینی در کشت معلق است. سلول‌های P19 در کشت معلق در ابتدا تجمعات ساده سلولی را به‌وجود می‌آورند. این تجمعات ساده بعد از مدتی بزرگ‌تر شده و سلول‌های تمایزنیافته به‌وسیله لایه آندودرمی مفروش می‌شوند بدین ترتیب اجسام شبه‌جنینی ساده به‌وجود می‌آیند. کشت سلول‌های سرطانی جنینی P19 در پتری‌دیش‌های باکتریولوژی منجر به تشکیل اجسام شبه‌جنینی می‌شود. سلول‌های P19 در محیط کشت α-MEM همراه با ده درصد سرم اجسام شبه‌جنینی تشکیل دادند (شکل ۲).



شکل ۲: تصویر میکروسکوپ نوری از تجمعات سلولی یا اجسام شبه‌جنینی تشکیل شده از سلول‌های P19 در بزرگنمایی‌های مختلف. فلش نشان‌دهنده اجسام جنینی و ستاره نشان‌دهنده سلول‌هایی که در اطراف جسم جنینی قرار دارد. الف (40X) و ب (400X)

تعیین میزان زنده‌مانی سلولی به روش تریپان بلو

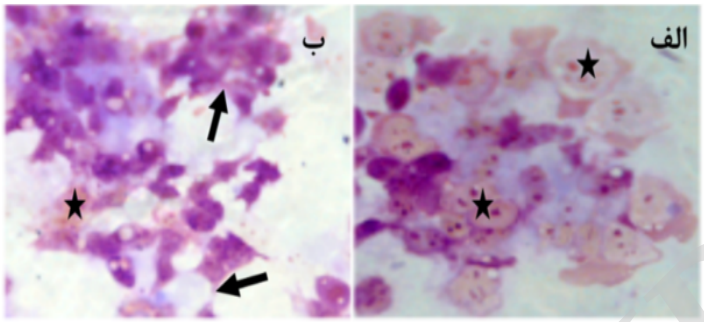
در این پژوهش جهت بررسی میزان زنده‌مانی سلولی از روش تریپان‌بلو استفاده شد. سلول‌های مرده در این روش به رنگ آبی و سلول‌های زنده بدون رنگ هستند. پس از تجزیه و تحلیل آماری داده‌های حاصل از شمارش سلولی مشخص شد که تیمار سلول‌های P19 با غلظت ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر عصاره مغز نوزاد رت از نظر میزان زنده‌مانی سلولی اختلاف معنی‌داری با گروه کنترل منفی (بدون عامل القاگر) نشان نمی‌دهد.



شکل۳: بررسی میزان زنده‌مانی سلول‌های کشت شده در غلظت‌های مختلف عصاره با استفاده از روش رنگ‌آمیزی تریپان‌بلو (n=۳ و p<۰/۰۵). اختلاف در حروف الفبا نشان دهنده اختلاف معنی‌دار میان گروه‌ها است.

www.SID.ir

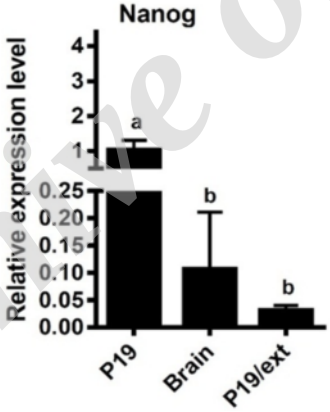
بررسی شکل ظاهری سلول‌های عصبی با استفاده از رنگ‌آمیزی اختصاصی کرزیل‌ویوله: جهت شناسایی سلول‌های عصبی حاصل از تمایز از روش‌های مختلف استفاده می‌شود، از جمله این روش‌ها رنگ‌آمیزی اختصاصی کرزیل‌ویوله است که اجسام نیسل موجود در سلول‌های عصبی را رنگ‌آمیزی می‌کند (شکل ۴). جسم سلولی سلول‌های عصبی به‌دلیل وجود اجسام نیسل در این روش به‌رنگ بنفش در می‌آیند.



شکل ۴: تصویر میکروسکوپ نوری از رنگ‌آمیزی کرزیل‌ویوله، سلول‌های شبه‌عصبی با این رنگ‌آمیزی رنگ بنفش به‌خود گرفتند. ستاره نشان‌دهنده سلول‌های تمایز نیافته و پیکان نشان‌دهنده زوائد سلولی است. الف: گروه کنترل منفی ب: گروه تیمار شده با عصاره مغز. بزرگنمایی (400X)

مقادیر بیان نسبی فاکتور رونویسی Nanog در سلول‌های عصبی حاصل از تمایز سلول‌های P19 تحت اثر القایی عصاره مغز نوزاد رت

بررسی بیان نسبی فاکتور رونویسی Nanog نشان داد که بیان این ژن در سلول‌های P19 تیمار شده با گروه کنترل منفی تفاوت معنی‌داری نشان می‌دهد. در صورتی‌که این تفاوت با گروه کنترل مثبت معنی‌داری نیست (شکل ۵).

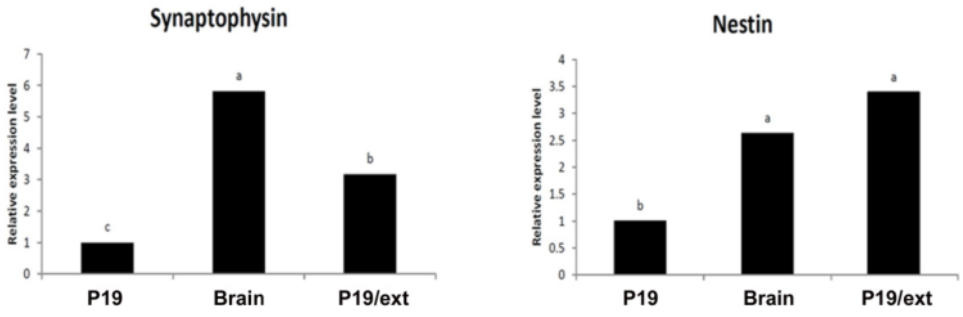


شکل ۵: ارزیابی بیان ژن Nanog در سلول‌های عصبی مشتق از سلول‌های بنیادی تحت اثر القایی عصاره مغز نوزاد رت کاهش این ژن را در گروه تیمار نشان می‌دهد. P19: سلول‌های P19 تیمار نشده (کنترل منفی)، Brain: بافت مغز (کنترل مثبت)

مقادیر نسبی بیان ژن‌های نستین و سیناپتوفیزین در سلول‌های عصبی حاصل از تمایز سلول‌های P19 تحت اثر القایی عصاره مغز نوزاد رت

بررسی کمی بیان ژن نستین در سلول‌های P19 در ابتدا نشان داد که بیان این ژن در این سلول‌ها القا شده و در ثانی میزان بیان آن در سلول‌های تیمار شده بیشتر از گروه‌های کنترل است (شکل ۶ الف). به‌عبارت دیگر بیان نستین در گروه تیمار شده با عصاره مغز نوزاد رت نسبت به گروه کنترل منفی و گروه کنترل مثبت (بافت مغز) افزایش معنی‌داری را نشان داد. به‌علاوه، بررسی کمی بیان ژن اختصاصی سیناپتوفیزین در سلول‌های P19 تیمار شده با عصاره مغز نوزاد رت نشان داد که میزان بیان ژن در این سلول‌ها نسبت به گروه کنترل منفی تفاوت معنی‌داری دارد (شکل۶ ب).

Archive of SID
www.SID.ir



(ب) (الف)

شکل ۶: الف: ارزیابی بیان ژن نستین در سلول‌های عصبی مشتق از سلول‌های بنیادی تحت اثر القایی عصاره مغز نوزاد رت، سلول‌های P19 تیمار نشده (کنترل منفی) و بافت مغز (کنترل مثبت). ب: ارزیابی بیان ژن سیناپتوفیزین در سلول‌های عصبی مشتق از سلول‌های بنیادی تحت اثر القایی عصاره مغز نوزاد رت، سلول‌های P19 تیمار نشده به عنوان کنترل منفی و بافت مغز به‌عنوان کنترل مثبت.

بحث

پدیده تمایز و تکوین سیستم عصبی در گرو عوامل متعددی است که هر کدام می‌تواند در روند شکل‌گیری این سیستم نقشی کلیدی از خود نشان دهد. در این رابطه علاوه بر عوامل مختلف، از جمله مسایل وراثتی و میانکنش‌های سلولی و امثال آن که به شکل‌گیری این سیستم کمک می‌کند، نقش عوامل تروفیک نیز انکارناپذیر است. این عوامل که از آن‌ها با نام عمومی نروتروفین نیز یاد می‌شود دارای حوزه عملکردی وسیعی هستند. تا آنجاکه بعضی از آن‌ها از جمله عامل رشد عصب (Nerve growth factor)، نوتروفین (Neurotrophin)، عامل نوروتروفیک سیلیاری (Ciliary neurotrophic factor: CNTF) و عامل نوروتروفیک تمایز مغز (Brain-derived neurotrophic factor) نه تنها به تمایز و تکوین سیستم عصبی نابالغ کمک می‌کنند؛ بلکه وجودشان برای حفظ و بقای نورون‌های ضایعه‌دیده ضروری به‌نظر می‌رسد. مطالعات به‌عمل آمده در این زمینه نشان می‌دهد که وجود این‌گونه عوامل در بافت عصبی الزامی است؛ زیرا نوروتروفین‌ها علاوه بر آن که می‌توانند بر سلول‌های عصبی و گلیال اثرات تمایزی داشته باشند، برای حفظ و بقای جمعیت‌های نورونی بالغ نیز حیاتی هستند (۲۴). بنابراین با علم به این‌که در هنگام بروز ضایعات عصبی سنتز این گونه عوامل در این سیستم افزایش نشان می‌دهد، می‌توان اذعان داشت که نقش آن‌ها در حفظ و بقای نورون‌های ضایعه دیده و در جلوگیری از مرگ نورونی واقعیتی انکارناپذیر است (۲۵). بهره‌گیری از مواد تروفیک در ارتباط با ترمیم ضایعات عصبی موضوعی است که در دهه‌های اخیر بیشتر از هر چیزی توجه محققین را به‌خود جلب کرده است. بر اساس یک نظریه رایج، چنانچه عوامل تروفیک مغز نابالغ، جایگزین آن دسته از نوروتروفین‌هایی شود که نورون‌های ضایعه دیده به‌علت قطع عصب از آن محروم مانده‌اند، زمینه حفظ و بقای این گونه نورون‌های از دست رفته در آنان فراهم می‌شود (۲۶). فاکتورهای نوروتروفیک علاوه بر دخالت در تکوین عصبی در بهبود آسیب‌ها و درمان ضایعات عصبی نیز نقش دارند. نقش این فاکتورها در نورون‌زایی، تمایز عصبی، رشد آکسون و دندریت به اثبات رسیده است (۲۷). از سوی دیگر شواهد موجود نشان می‌دهد که این عوامل علاوه بر این‌که به مقدار قابل توجهی در سیستم عصبی نابالغ وجود دارند، برخی از آن‌ها در مناطقی از سیستم بالغ مثل سلول‌های شوان یا اندام هدف پایانه‌های اعصاب محیطی نیز همواره در حال ساخته شدن هستند (۲۸). از آنجاکه دستگاه عصبی نوزاد رت در حال تکوین است و عصاره گرفته شده از این بافت حاوی فاکتورها و پروتئین‌های فراوان جهت تمایز سلول‌های بنیادی به سلول‌های عصبی است، در این پژوهش تحت حمایت عوامل تروفیک موجود در عصاره مغز نوزاد رت، سلول‌های P19 از این عوامل بهره جسته و به سلول‌های شبه‌عصبی تمایز یافتند. در این مطالعه برای اولین بار القای تمایز عصبی در سلول‌های بنیادی تراتوکارسینومای جنینی P19 تحت تأثیر عامل القاگر عصاره مغز نوزاد رت انجام شد. نتایج نشان داد که عصاره مغز نوزاد رت توانست به‌طور مؤثری باعث القای تمایز سلول‌های بنیادی به سلول‌های عصبی شود. استخراج عصاره مغز نوزاد رت در شرایط آزمایشگاهی انجام شد سپس این عصاره به‌عنوان عامل القاکننده برای تمایز

Archive of SID
www.SID.ir

سلول‌های P19 به سلول‌های عصبی به‌کار گرفته شد. برای شروع کار ابتدا لازم بود میزان زنده‌مانی سلول‌ها پس از تاثیر عصاره مغز به‌دست آید. نتایج نشان داد که در غلظت ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر عصاره درصد بیشتری از سلول‌ها زنده ماندند. در مرحله بعد جهت بررسی القای فنوتیپ عصبی، سلول‌های P19 به‌مدت ۲۴ ساعت در معرض محیط کشت القا قرار داده شدند. سپس رنگ-آمیزی کرزیل‌ویوله و شمارش سلول‌های عصبی صورت گرفت. سلول‌های تمایزیافته تحت اثر القایی عصاره مغز فنوتیپ سلوهای عصبی را نشان دادند. مورفولوژی توصیف شده در سلول‌های شبه‌عصبی حاصل از این پژوهش پیش از این توسط محققین دیگر گزارش شده است (۲۹). برای تعیین دوز مناسب عصاره برای القای فنوتیپ عصبی نتایج تریپان‌بلو و کرزیل‌ویوله مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که بهترین غلظت برای تیمار سلول‌های بنیادی P19، غلظت ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر عصاره است. سرانجام به‌منظور تأیید هویت سلول‌های عصبی بیان نشانگرهای عصبی نستین و سیناپتوفیزین و فاکتور رونویسی نانوگ با روش real-time PCR مورد ارزیابی قرار گرفت. بررسی میزان بیان نسبی فاکتور رونویسی نانوگ در سلول‌های بنیادی P19 تمایزیافته تحت اثر القایی عصاره مغز نوزاد رت نشان داد که بیان این فاکتور در این سلول‌ها تحت تأثیر عامل القاکننده کاهش می‌یابد. هم‌سو با این پژوهش در مطالعه‌ای نشان داده شده است که ژن نانوگ به‌طور خاصی در سلول‌های بنیادی جنینی و کارسینومای جنینی بیان می‌شود؛ اما در سلول‌های بنیادی هماتوپوئیتیک بافت‌های بالغین و سلول‌های تمایز یافته بیان نمی‌شود. نانوگ رمزگذار نوعی عامل رونویسی است و نقش مهمی در حفظ خودنوزایی و پرتوانی سلول-های بنیادی جنینی دارد (۱۸). بیان این مولکول در مراحل اولیه تمایز سلول‌های بنیادی جنینی کاهش می-یابد (۱۹). سلول‌های بنیادی که در معرض عامل القاگر طبیعی عصاره پانکراس قرار گرفتند در مسیر تمایزی خود به سلول‌های انسولین‌ساز، کاهش بیان این ژن را نشان دادند (۲۰-۲۲). بررسی میزان بیان mRNA نستین در دو گروه کنترل و تیمار در این پژوهش نشان داد که میزان بیان این ژن در این دو گروه تفاوت معنی‌داری دارد. ارزیابی بیان نستین گزینه مناسبی برای پیش‌بینی تمایز دودمان سلولی P19 به‌سمت سلول‌های عصبی است. این پروتئین در برخی از سلول‌های P19 تمایز نیافته وجود دارد و در حین تمایز این سلول‌ها به نورون دستخوش افزایشی گذرا در بیان می‌شود (۱۰). این پژوهش هم‌راستا با سایر پژوهش‌های انجام شده نشان داد که سلول‌های بنیادی P19 در حین تمایز به‌سمت دودمان عصبی بیان ژن نستین را افزایش دادند. نستین فیلامنت حدواسط سلول‌های نورواپیتلیال و پیش‌ساز عصبی است که در مراحل ابتدایی تکوین دستگاه عصبی بیان می‌شود (۱۱). بنابراین در پژوهش حاضر بیان بالای ژن نستین در این سلول‌ها نشانگر تمایز این سلول‌ها به‌سمت رده سلول‌های پیش‌ساز عصبی است. به علاوه، نتایج این مطالعه نشان داد که عصاره مغز نوزاد رت می‌تواند پروتئین‌های نشانگر عصبی مانند سیناپتوفیزین را در سلول‌های تمایز یافته بیان کند. بر اساس گزارش‌های قبلی نورون‌های مشتق شده از سلول‌های کارسینومای جنینی در شرایط آزمایشگاهی تشکیل سیناپس داده و نسبت به سیناپتوفیزین واکنش ایمنی نشان می‌دهند (۳۰). پروتئین سیناپتوفیزین نشانگر مولکولی برای غشای وزیکول سیناپسی و اگزوسیتوز (۳۱) بوده و همچنین در تنظیم رهاسازی نوروترنسمیترها و شکل‌پذیری سیناپسی نقش دارد (۳۲). مطالعات پیشین نشان داد کاهش فعالیت سیناپسی اثرات مخربی روی سیناپس‌ها و حافظه دارد. روش درمانی که در آن ارتباطات سیناپسی بین نورون‌ها بازیابی شود می‌تواند کاربرد بالقوه مناسبی در درمان بیماری آلزایمر داشته باشد (۳۳). در پژوهش حاضر افزایش میزان بیان نسبی سه برابری سیناپتوفیزین نسبت به گروه کنترل منفی خود حاکی از این امر است که سلول‌های تمایز یافته نورون‌هایی بالغ بوده و قادر به تشکیل سیناپس با یکدیگر هستند. این پروتئین یکی از مهم‌ترین پروتئین‌های سیناپسی است که مطالعات فراوانی در مورد آن انجام شده است. سیناپتوفیزین از نشان‌گرهای معتبر مراحل نهایی تمایز عصبی است (۱۵). در مطالعه‌ای وجود سلول‌های بیان کننده سیناپتوفیزین تحت اثر القایی رتینوئیک‌اسید در حدود ده یا دوازده روز پس از کشت اجسام جنینی حاصل از سلول‌های بنیادی جنینی گزارش

Archive of SID
www.SID.ir

شده است (۱۶). براساس گزارش‌های دیگر نورون‌های مشتق از سلول‌های P19 در شرایط آزمایشگاهی سیناپس‌هایی تشکیل و نسبت به سیناپتوفیزین واکنش ایمنی نشان دادند (۳۴).

نتیجه گیری

نتایج این مطالعه نشان داد که سلول‌های P19 تحت شرایط القایی با عصاره مغز نوزاد رت قابلیت تمایز به سلول‌های شبه‌عصبی دارند. ارزیابی بیان ژن نستین به‌کمک ریل‌تایم نشان داد که سلول‌های تیمار شده در ابتدا دارای فنوتیپ سلول‌های بنیادی عصبی هستند. همچنین بیان نشانگر سیناپتوفیزین قابلیت تمایز به نورون‌های کارآمد و عملکردی را در این سلول‌ها تأیید نمود. مزیت استفاده از این روش، ساده و کم هزینه بودن آن است؛ به‌طوری‌که سلول‌های P19 بدون افزودن فاکتورهای رشد گران‌قیمت به سمت سلول‌های عصبی متمایز شدند.

تشکر و قدردانی

این پژوهش در دانشکده علوم دانشگاه اصفهان انجام شده است. بدین‌وسیله از تمام کسانی که ما را در انجام این طرح یاری نمودند به‌ویژه سرکار خانم قربانی کارشناس محترم آزمایشگاه قدردانی می‌شود.

منابع:

1. Vickers JC, King AE, Woodhouse A, Kirkcaldie MT, et al. Axonopathy and cytoskeletal disruption in degenerative diseases of the central nervous system. Brain Res Bull. 2009; 80(4): 217-23.

2. Brandt R. Cytoskeletal mechanisms of neuronal degeneration. Cell Tissue Res. 2001; 305(2): 255-65.

3. Skovronsky DM, Lee VMY, Trojanowski JQ. Neurodegenerative diseases: new concepts of pathogenesis and their therapeutic implications. Annu Rev Pathol Mech Dis. 2006; 1:151-70.

4. Mansergh FC, Wride MA, Rancourt DE. Neurons from stem cells: Implications for understanding nervous system development and repair, . Biochem Cell Biol, 2000; 78: 613-28.

5. D'Amour K, Gage FH. New tools for human developmental biology. Nature Biotechnol. 2000; 18: 381-82.

6. Rudnicki MA. Cell culture methods and induction of differentiation of embryonal carcinoma cell lines. Teratocarcinomas and embryonic stem cells: A practical approach. 1987; 19-49.

7. Choi SC CJ, Shim WJ, et al. P19 embryonal carcinoma cells: a new model for the study of endothelial cell differentiation. Biotechnol Lett. 2008; 30(7): 1169-75.

8. Aizawa T, Seiichi H, Kazuaki Y. Neural differentiation-associated generation of microglia-like phagocytes in murine embryonal carcinoma cell line. Dev Brain Res. 1991; 59(1): 89-97.

9. Slack RS, Hamel PA, Bladon, TS, Gill, RM, et al. Regulated expression of the retinoblastoma gene in differentiating embryonal carcinoma cells. Oncogene. 1993; 8(6): 1585-91.

10. Lendahl U, Zimmerman LB, McKay RD. CNS stem cells express a new class of intermediate filament protein. Cell. 1990; 60(4): 585-95

11. Radtke C SB, Spies M, Kocsis JD, Vogt PM. Peripheral glial cell differentiation from neurospheres derived from adipose mesenchymal stem cells. Int J Dev Neurosci. 2009; 27(8): 817–23.

12. McBurney M, Reuhl KR, Ally AI, Nasipuri S, et al. Differentiation and maturation of embryonal carcinoma-derived neurons in cell culture. J Neurosci. 1988; 8(3): 1063-73.

13. McBurney M. Clonal lines of teratocarcinoma cells in vitro: differentiation and cytogenetic characteristics. J Cell Physiol. 1976; 89(3): 441-55.

Archive of SID
www.SID.ir

14. Vannucchi MG F-PM. Synapse formation during neuron differentiation:an in situ study of the myenteric plexus during murine embryonic life. J Comp Neurol. 2000; 425(3): 369-81.

15. Sortwell CE ea. Pattern of synaptophysin immunoreactivity within mesencephalic grafts following transplantation in a parkinsonian primate model. Brain Res. 1998; 791(1): 117-24.

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

17. MacPherson PA, Jones S, Pawson PA, Marshall KC, et al. P19 cells differentiate into glutamatergic and glutamate-responsive neurons in vitro. Neuroscience. 1997; 80(2): 487-99.

18. Wang SH TM, Chiang MF, et al. A novel NK type homeobox gene, ENK early embryo specific NK, preferentially expressed in embryonic stem cells. Gene Expr Patterns 2003; 3: 99–103.

19. Boer B CJ, Claassen D, et al. Regulation of the Nanog gene by both positive and negative cis regulatory elements in embryonal carcinoma cells and embryonic stem cells. Mol Reprod Dev. 2009; 76(2): 173-82.

20. Ebrahimie M, Esmaeili F, Cheraghi S, Houshmand F, et al. Efficient and Simple Production of Insulin-Producing Cells from Embryonal Carcinoma Stem Cells Using Mouse Neonate Pancreas Extract, As a Natural Inducer. PloS one. 2014; 9(3): e90885, Doi:10.1371/journal.pone.0090885.

21. Mansouri A, Esmaeili F, Nejatpour A, Houshmand F, et al. Differentiation of P19 embryonal carcinoma stem cells into insulin-producing cells promoted by pancreas-conditioned medium. J Tissue Eng Regen Med. 2016; 8, DOI: 10.1002/term.1927: 600-12.

22. Mehrfarjam Z, Esmaeili F, Shabani L, Ebrahimie E. Induction of pancreatic β cell gene expression in mesenchymal stem cells. Cell Biol Int. 2015; 40: 486-500.

23. Chen X, Katakowski M, Li Y, Lu D, et al. Human bone marrow stromal cell cultures conditioned by traumatic brain tissue extracts: growth factor production. J Neurosci Res. 2002; 69(5): 687-91.

24. Maisonpierre PC, Belluscio L, Friedman B, Alderson RF, et al. NT-3, BDNF and NGF in the developing rat nervous system: parallel as well as resiprocal patterns of expression. Neuron. 1990; 5(4): 501-9.

25. Gouin AC, Bloch GE, Mettling C, Henderson CE. Growth and survival factors of spinal motoneurons. Sciences. 1993; 187: 47-61.

26. Cruoch MF HK, Garnaut SM, Milburn PJ, Hendry IA. Retrograde axonal transport of the alpha-subunit of the GTP-binding protein GZ in mouse sciatic nerve: a potential pathway for signal transduction in neurons. Neuroscience. 1994; 6: 626-31.

27. Tapp H, Patt JC, Gruber HE. Adipose-derived stem cells: characterization and current application in orthopaedic tissue repair. Biol Med (Maywood) 2009; 234(1): 1-9.

28. Rodreguez PAB, GonzalezM.RequejoF. Expression of neurotrophins and their receptors in sciatic nerve of exprimentally diabetic rat. Neurosci Lett. 1995; 200(1): 37-40.

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

30. Esmaeili F, Tiraihi T, Movahedin M, Mowla SJ. Selegiline induces neuronal phenotype and neurotrophins expression in embryonic stem cells. Rejuv Res. 2006; 9(4): 475-84.

31. Redecker P GD. Synaptophysin in the nervous system and endocrine cells. Acta Histochem Suppl 1992; 42: 33-8.

32. Shen YC TH, Ruan JW, Liao YC, Chen SF, et al. Genetic and functional analyses of the gene encoding synaptophysin in

Archive of SID
www.SID.ir

schizophrenia. Schizophr Res. 2012; 137(1): 14-9.

33. Tampellini D, Capetillo-Zarate E, Dumont M, Huang Z, et al. Effects of synaptic modulation on β-amyloid, synaptophysin, and memory performance in Alzheimer's disease transgenic mice. J Neurosci. 2010; 30(43): 14299-304.

34. MacPherson PA Jones S, Pawson PA, Marshall KC, McBurney MW. P19 cells differentiate into glutamatergic and glutamate-responsive neurons in vitro. Neuroscience. 1997; 80(2): 487-99.

Archive of SID

www.SID.ir

Journal of Cell & Tissue (JCT)
Winter 2017; 7(4)

Original Article

Synaptophysin gene expression in neural cells resulted from embryonal carcinoma stem cell differentiation influenced by rat neonate brain extract

Jalil HR. M.Sc., Azizi F., M.Sc., Moshtaghian J., Ph.D., Esmaeili F., Ph.D.,*

- Department of Biology, Faculty of Science, University of Isfahan, Isfahan, Iran

* Email corresponding author: f.esmaeili@sci.ui.ac.ir

Received: 14 Aug. 2016 Accepted: 15 Nov. 2016

Abstract

Aim: In this study, the effect of newborn rat brain extract to induce neuronal differentiation in P19 embryonal carcinoma (EC) stem cells was investigated.

Material and Methods: Newborn rat brain extract was collected in sterile condition and the concentration of its total protein was determined. Then, the amount of cell viability was determined after treatment with brain extract. In order to differentiation, the embryoid bodies resulted from cells suspension culture were exposed to culture medium containing 3% serum that supplemented by the extract, for 7-14 days. Specific staining and real-time PCR methods were applied to evaluate neural differentiation.

Results: Cresyl violet staining confirmed neuronal morphology of the differentiated cells. The gene expression of neural specific was confirmed by real–time PCR. Developing brain extract, which contains numerous neorotrophic factors, could induce expression of synaptophysin (presynaptic membrane protein) and nestin (intermediate filament of stem cells in the neural tube) genes. In addition, the expression of transcription factor Nanog, an important factor for pluripotency and self-renewal of stem cells, decreased under the influence of newborn rat brain extract.

Conclusion: The results of the present study indicated that newborn rat brain extract can induce neuronal phenotype as well as neuronal specific gene expression in P19 stem cells. This study suggests the potential use of combined newborn rat brain extract and stem cell therapy to improvement of deficits in neurodegenerative diseases.

Keywords: Neuronal differentiation; Embryonal carcinoma cells; Brain extract; Neuron specific markers

Archive of SID

www.SID.ir