مقاله پژوهشی

مجله سلول و بافت (علمی - پژوهشی)
جلد۸، شماره ۱، بهار ۱۳۹۶

تمایز عصبی سلول‌های بنیادی کارسینومای جنینی کشت سه‌بعدی در دستگاه عصبی جنین مرغ

زهره نصیری .M.Sc، سید جمال 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: ۱۳۹۵/۱۱/۱۰ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۵/۱

چکیده

هدف: پژوهش حاضر به‌منظور بررسی اثر داربست کیتوسان/پلی‌وینیل‌الکل آمیخته با عصاره مغز نوزاد رت (NRBE) بر تمایز عصبی سلول‌های بنیادی کارسینومای جنینی P19 طراحی شد.

مواد و روش‌ها: به‌منظور القای فنوتیپ عصبی، سلول‌های بنیادی کارسینومای جنینی رده P19 روی داربست کیتوسان/پلی‌وینیل‌الکل آمیخته با عصاره‌ی مغز نوزاد موش صحرایی کشت شدند. برای ارزیابی توان بقا، مهاجرت و تمایز سلول‌های کشت سه‌بعدی، این سلول‌ها به دستگاه عصبی مرکزی در حال تکوین جنین جوجه پیوند شدند. سرانجام سلول‌های پیوندی با استفاده از روش‌های رنگ‌آمیزی اختصاصی و ایمنوفلورسانس ردیابی شدند.

نتایج: رنگ‌آمیزی اختصاصی کرزیل‌ویوله، فنوتیپ عصبی سلول‌های پیوندی را تایید نمود. همچنین بیان پروتئین اختصاصی عصبی، سیناپتوفیزین با استفاده از فرآیند ایمنوفلورسانس نشان داده شد.

نتیجه‌گیری: نتایج این مطالعه نشان داد که سلول‌های بنیادی کارسینومای جنینی P19 را می‌توان به‌عنوان منبع عظیمی از سلول‌های پرتوان در مطالعات پیوندی به منظور بررسی جنبه‌های سلولی و مولکولی تکوین و تمایز سلولی مورد استفاده قرار داد.

واژگان کلیدی: سلول‌های بنیادی کارسینومای جنینی، سلول P19، تمایز عصبی، پیوند سلول، جنین جوجه

Archive of SID

www.SID.ir

مقدمه

درمان بیماران مبتلا به ضایعه نخاعی و رفع ناتوانی این گروه از بیماران و یا بازگرداندن برخی از توانایی‌های آن‌ها بسیار با اهمیت و مورد توجه پژوهش‌گران بوده است. استفاده از سلول‌درمانی و جایگزینی سلول‌های مرده یا آسیب‌دیده با سلول‌های جدید یکی از راه‌کارهای نوین درمان برای این بیماران است. از آنجا که سلول‌های بنیادی توانایی خودنوزایی و تبدیل به سلول‌های دیگر را دارند، در درمان می‌توان از آن‌ها استفاده نمود. با توجه به اینکه کارآیی سلول‌های عصبی متمایزشده پس از پیوند کم است استفاده از روش‌های محرک رشد و بقای سلول-های پیوندی بایستی مورد بررسی بیشتری قرار گیرد تا سلول درمانی با موفقیت بیشتری انجام‌پذیر باشد. میزان بیماری‌های زوال دستگاه عصبی مانند آلزایمر، پارکینسون، هانتینگتون و اماس در بسیاری از کشورهای جهان رو به افزایش است (۱). این بیماری‌ها در اثر تخریب سلول‌های عصبی و ضعف یا از بین رفتن عملکرد آن‌ها و در نتیجه تجمع پروتئین‌های سمی در دستگاه عصبی مرکزی (Central Nervous System) (CNS) ایجاد می‌شوند. گرچه مطالعه و پژوهش در زمینه درمان این بیماری‌ها نظیر درمان با سلول بنیادی و محافظت از دستگاه عصبی از اهمیت بالایی برخوردار است. اما هنوز این مطالعات در مراحل ابتدایی خود هستند. در حال حاضر درمان‌هایی که برای این بیماری‌ها در دسترس است فاقد کارآیی کافی است و در اکثر موارد فقط می‌توان بخش کوچکی از علایم را به‌طور موقت کاهش داد. دانشمندان به‌طور جدی در حال انجام پژوهش هستند تا بتوانند درمان‌هایی برای انواع گوناگونی از بیماری‌ها به‌ویژه بیماری‌های زوال بافت دستگاه عصبی مانند اماس پیدا کنند. برخی از روش‌های درمان این بیماری‌ها عبارتند از کاهش سطح پروتئین‌های تجمع‌یافته با استفاده از روش‌های محدودسازی نفوذپذیری سد خونی- مغزی، استفاده از فاکتورهای رشد به‌منظور حمایت از سلول‌های عصبی آسیب دیده، دارو درمانی و سلول‌درمانی (۲ و ۳). استفاده از سلول‌های بنیادی امیدهای تازه‌ای را برای ترمیم بافت‌های عصبی آسیب دیده فراهم آورده است. مطالعات آزمایشگاهی نشان داده است که سلول‌های بنیادی می‌توانند به انواع بافت‌های دیگر تمایز یابند. سلول‌های تمایزیافته قادرند از طریق جریان خون به‌سمت مغز حرکت نموده و توسط قسمت‌های آسیب‌دیده جذب شوند. امروزه شاهد پیشرفت های چشم‌گیری در عرصه‌ی سلول‌های بنیادی هستیم که راه‌های نوینی را برای درمان تعدادی از بیماری‌ها از جمله بیماری‌های زوال عصبی پیش رو گذاشته است (۴ و ۵). سلول‌های حاصل از تمایز سلول‌های بنیادی مستقیما به‌درون CNS پیوند زده می‌شوند و یا به عروق خونی به صورت درون‌وریدی (Intravenous) یا درون‌شریانی (Intra-arterial) تزریق می‌شوند (۶). در سال‌های اخیر، روش‌های آزمایشگاهی زیادی توسعه یافته‌اند که امکان تولید سلول عصبی از سلول‌های پرتوان را در فرآیند کشت سلول فراهم می‌کنند (۷-۹). رده P19 نوعی سلول بنیادی کارسینومای جنینی پرتوان است که در صورت تیمار با اسیدرتینوئیک به انواع سلول‌های ناشی از نورواکتودرم متمایز می‌شود (۱۰). ترکیب سلول‌های بنیادی با داربست تهیه شده از مواد زیستی راه‌کار امیدوارکننده‌ای در درمان بیماری‌هاست. داربست زیست مواد می‌تواند جایگزین بافت‌های آسیب‌دیده شود که برای ترمیم، بقا و تمایز سلول‌های بنیادی لازم است (۱۱).

اولین بار ارسطو از جنین جوجه به‌عنوان مدل مناسبی برای مطالعات و پژوهش‌های جنین‌شناسی استفاده کرد. از آن زمان تاکنون جنین جوجه به‌عنوان ابزاری ایده‌آل برای مطالعات جنین‌شناسی، تکوین و ایمنی‌شناسی در نظر گرفته شده است . دست‌یابی آسان و سهولت دست-ورزی ، جنین جوجه را به مدلی ایده‌آل برای مطالعه در زمینه‌ی تکوین مهره‌داران تبدیل نموده است. این مدل در فرآیندهای پیوند بافت مورد دست‌ورزی پژوهشگران قرار گرفته و یافته‌های بسیار مهمی را در خصوص القای بافت-های مختلف، تعیین سرنوشت سلول، الگودهی، مسیریابی

Archive of SID

www.SID.ir

آکسونی و مهاجرت و تمایز سلول در دسترس قرار داده است (۱۲). در این پژوهش جهت تمایز عصبی از سلول‌های بنیادی پرتوان P19 استفاده شد. این سلول‌ها برروی داربست کیتوسان/پلی‌وینیل‌الکل رشد یافته و پس از القای تمایز به سلول‌های عصبی به محل تخریب شده دستگاه عصبی در حال تکوین جنین جوجه پیوند شدند.

مواد و روش‌ها

کشت، تکثیر و ذخیره سلول‌های بنیادی: کشت چسبنده سلول‌های بنیادی کارسینومای جنینی (رده P19، بانک سلولی انستیتو پاستور، تهران، ایران) در شرایط کاملا استریل، با استفاده از ظروف ویژه یکبار مصرف در محیط کشت α-MEM (α-modified Gibco, 11900- 073:Eagle's medium) همراه با ده درصد سرم FBS (Fetal bovine serum, Sigma, 10270-106)، پنی‌سیلین و استرپتومایسین انجام شد. به‌منظور تامین شرایط مناسب برای رشد و تکثیر سلول از انکوباتور مرطوب با میزان CO_2 ۵ درصد و دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد استفاده شد. در هنگام دستیابی به تراکم سلولی مناسب، سلول‌ها واکشت شدند. در ضمن، جهت تهیه ذخایر کافی، سلول‌ها با استفاده از محیط کشت حاوی سرم و DMSO (Dimethylsulfoxide) منجمد و در دمای ۷۰- درجه سانتی‌گراد و یا تانک ازت ذخیره شدند.

کشت سه بعدی سلول‌ها و تمایز عصبی آن‌ها: در این پژوهش به‌منظور تامین عوامل رشد مورد نیاز سلول‌های بنیادی کشت شده روی داربست و تمایز آن‌ها به سلول عصبی از عصاره مغز نوزاد موش صحرایی استفاده شد. بدین‌ترتیب سلول‌های بنیادی ضمن کشت سه‌بعدی، به‌طور همزمان در معرض نوعی عامل القاکننده‌ی طبیعی قرار گرفتند. سلول‌های مذکور پس از تمایز به محل تخریب شده‌ی دستگاه عصبی جنین جوجه در مرحله ۱۸ تا ۲۰ جنینی پیوند شدند(۱۳). داربست کیتوسان/ پلی‌وینیل‌الکل در گروه مهندسی مواد دانشکده فنی مهندسی دانشگاه شهرکرد تهیه شد. جهت استریل و آماده‌سازی برای کشت، داربست‌ها به‌مدت یک روز در الکل اتیلیک ۷۰ درصد و سپس در سه نوبت و هر نوبت به‌مدت ۳ تا ۴ ساعت در محلول PBS قرار داده شدند. در آخرین مرحله شستشو با PBS داربست‌ها به‌مدت ۱۵ تا ۲۰ دقیقه در معرض اشعه‌ی UV قرار گرفتند. کشت معلق سلول‌ها منجر به تشکیل دسته‌های سلولی به نام اجسام شبه جنینی (Embryoid bodies) می‌شود. اجسام شبه جنینی پس از تولید، روی داربست منتقل شده و هم‌زمان در معرض عصاره مغز نوزاد موش صحرایی قرار گرفتند. پس از گذشت یک هفته سلول‌های حاصل از کشت سه‌بعدی برای پیوند استفاده شدند.

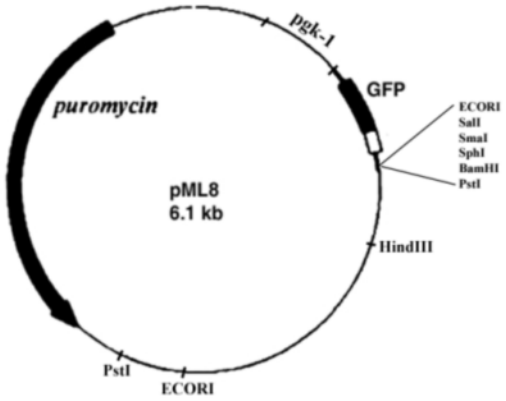
پیوند سلول‌های تمایزیافته در داربست به دستگاه عصبی در حال تکوین جنین جوجه: تخم‌مرغ‌های نطفه‌دار از مجتمع اصلاح و تکثیر مرغ بومی جهاد کشاورزی تهیه و در دمای ۳۸ درجه سانتی‌گراد و شرایط مرطوب انکوباتور تا مرحله ۱۸ تا ۲۰ هامبرگر-هامیلتون نگه‌داری شدند (۱۳). به‌منظور دسترسی به جنین جوجه با ایجاد پنجره‌ای در پوسته آهکی تخم‌مرغ و برداشتن بخشی از غشای ویتلین جنین نمایان شد. پس از تخریب بخشی از لوله عصبی در حال تکوین، بلافاصله بعد از مغز عقبی، سلول‌ها به این بخش پیوند شدند. لازم به ذکر است که در این مرحله از سلول‌های بیان‌کننده GFP (Green fluorescence protein) برای پیونداستفاده شد (مراجعه به بخش بعدی). بعد از پوشاندن پنجره با پارافیلم، تخم‌مرغ تا مراحل بعدی به انکوباتور بازگردانده شد تا جنین به رشد خود ادامه دهد. پس از گذشت یک تا سه روز جنین‌ها از تخم‌مرغ خارج و پس از شستشو با PBS در فرمالین ۱۰ درصد تثبیت شدند. سرانجام از نمونه‌های تثبیت‌شده مقاطع بافتی تهیه شد و ردیابی سلول‌های پیوندی در مقاطع بافتی با استفاده از روش‌های مختلف انجام گرفت.

تولید سلول‌های بیان‌کننده GFP: به‌منظور انتقال ژن GFPبه سلول‌ها از پلاسمید pML8 (شکل ۱) اهدایی از آزمایشگاه دکتر مک‌برنی، McBurney's laboratory,

Archive of SID

www.SID.ir

(Ottawa Regional Cancer Center, Ottawa, Canada که ژن GFPو ژن مقاوم به پیورومایسین را تحت کنترل پروموتور Pgk-1 موشی بیان می‌کند و از روش رسوب کلسیم فسفات ($CaPO_4$) استفاده شد (۱۰). برای ترانسفکت پایدار از محیط کشت انتخابی حاوی پیورومایسین استفاده شد و سلول ها بعد از هشت روز مورد بررسی قرار گرفتند. سلول‌های بیان‌کننده GFP در روز هشتم بعد از انتقال ژن با استفاده از میکروسکوپ فلورسنس بررسی شدند.



شکل ۱: طرح شماتیک پلاسمید PML8 که حاوی ژن پروتئین فلورسنت سبز (GFP) و ژن مقاوم به پیورومایسین است.

رنگ‌آمیزی اختصاصی کرزیل‌ویوله: مقاطع بافتی تهیه شده با استفاده از زایلل پارافین‌زدایی شده و پس از آب‌دهی و شستشو در معرض رنگ کرزیل‌ویوله شامل ترکیب اسیداستیک‌گلاسیال (۰/۸ درصد)، استات‌سدیم (۰/۶ میلی مولار)، پودر کرزیل‌ویوله (کرزیل‌ویوله ۰/۲۵ درصد) و آب مقطر قرار گرفتند. نمونه‌ها پس از آب‌گیری، شفاف‌سازی و چسباندن روی لام با استفاده از میکروسکوپ نوری بررسی شدند.

بررسی تمایز سلول‌های پیوندشده به دستگاه عصبی جنین جوجه با استفاده از روش ایمنوفلورسنس

پس از پیوند سلول و طی مرحله انکوباسیون، جنین‌ها از داخل تخم‌مرغ خارج و به‌سرعت در محلول فرمالین ده درصد تثبیت شدند. به‌منظور ردیابی سلول‌های پیوندی و بررسی تمایز آن‌ها در بدن موجود زنده مقاطع تهیه شده در معرض آنتی‌بادی‌های اولیه ضد GFP (Rabbit polyclonal antibody to GFP Abcam, ab290) و ضد سیناپتوفیزین (Mouse anti-synaptophysin monoclonal antibody, Abcam, ab8049) و آنتی‌بادی‌های ثانویه کونژوگه شده FITC(-FITC conjugated anti-mouse IgG, Sigma, F9137) (برای سیناپتوفیزین) و Cy5.29(Cy5.29-conjugated anti-rabbit IgG, Abcam, ab6564) (برای GFP) قرار گرفتند. سپس مقاطع رنگ‌آمیزی شده به‌وسیله میکروسکوپ فلورسنس بررسی شدند.

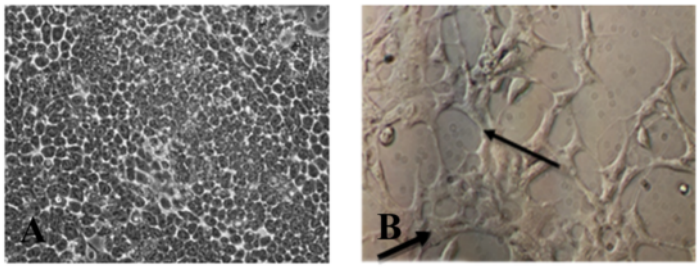
نتایج

کشت و تکثیر سلول‌های بنیادی P19

سلول‌های بنیادی کارسینومای جنینی P19 قادرند به‌طور مداوم در محیط کشت حاوی سرم رشد نموده و برای تمایز به هر دو دودمان مزودرمی و اکتودرمی القا شوند. این سلول‌ها بعد از این‌که وارد ظرف کشت شدند به کف آن چسبیده و به‌سرعت شروع به تکثیر نمودند (شکل۲ A) و پس از گذشت حدود ۲۴ ساعت بعد از ذوب یا واکشت در ظرف کشت تشکیل کلونی‌های سلولی را آغاز کردند (شکل۲ B). این سلول‌ها چندین بار در محیط کشت در ظروف مخصوصی کشت و در مواقع ضروری به‌طور مداوم حداکثر تا سه مرحله واکشت شدند.

Archive of SID

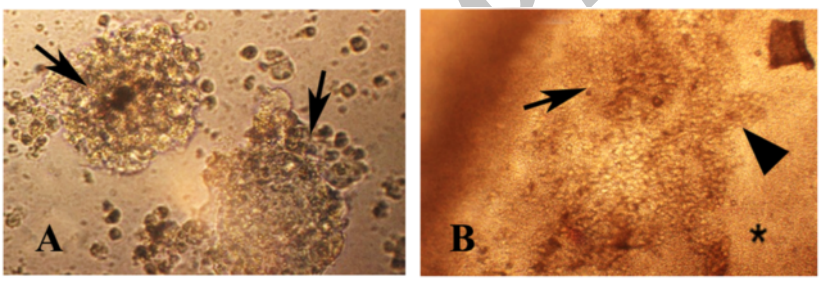
www.SID.ir



شکل ۲: تصویر میکروسکوپ نوری از کشت و تکثیر سلول‌های بنیادی کارسینومای جنینی P19 (پیکان) در محیط کشت α-MEM همراه با ده درصد سرم گاوی جنینی. (A: 40X, B: 400X)

تولید اجسام شبه جنینی و کشت سه بعدی سلول‌های بنیادی P19 در داربست کیتوسان/پلی‌وینیل‌الکل

کشت معلق سلول‌های کارسینومای جنینی P19 در پتری دیش‌های غیرچسبنده باکتریولوژی منجر به تشکیل اجسام شبه جنینی می‌شود. تصویر دو جسم شبه‌جنینی به‌عنوان نمونه ارایه شده است (شکل ۳ A). اجسام شبه جنینی روی داربست‌های استریلی که در میکروپلیت‌های ۱۲ خانه‌ای قرار داده شده بودند، با محیط کشت α-MEM محتوی سه درصد سرم و عصاره مغز نوزاد رت کشت شدند (شکل۳ B). محیط کشت تقریبا یک روز درمیان تعویض شد. چسبیده شدن اجسام شبه‌جنینی روی داربست و نفوذ سلول‌های بنیادی به‌داخل آن در شکل ۳ B به‌خوبی نشان داده شده است. نحوه‌ی قرارگیری سلول‌ها بر روی داربست، نشان از مناسب بودن بستر نانوالیاف کامپوزیتی برای سلول‌ها است. این نتایج نشان می‌دهد که داربست‌های تهیه شده محیط و بستری بسیار مطلوب را برای اتصال و رشد سلول‌ها فراهم کرده‌اند.



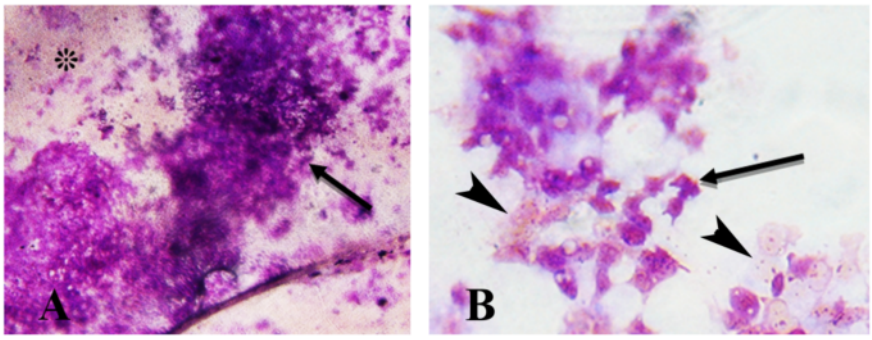
شکل ۳: تصویر میکروسکوپ نوری از اجسام شبه جنینی و کشت آن‌ها روی داربست کیتوسان/پلی‌وینیل‌الکل. A) اجسام شبه جنینی حاصل از کشت معلق سلول‌های P19 (پیکان). پیکان یک جسم شبه جنینی کشت شده روی داربست، سر پیکان سلول‌ها و ستاره داربست را نشان می‌دهد. B) شیوه قرارگیری سلول‌ها روی داربست نشان از مناسب بودن بستر نانوالیاف کامپوزیتی برای سلول‌ها است. (A: 100X, B: 40X)

بررسی ریخت‌شناسی سلول‌های تمایزیافته؛ رنگ‌آمیزی اختصاصی کرزیل‌ویوله

پس از کشت سه‌بعدی سلول‌ها و استفاده از عصاره مغز، به‌منظور بررسی اولیه‌ی فنوتیپ عصبی در سلول‌های حاصل از تمایز از رنگ‌آمیزی کرزیل‌ویوله استفاده شد. شکل ۴ سلول‌های P19 تمایزیافته به سلول‌های شبه‌عصبی را که توسط کرزیل‌ویوله به رنگ بنفش در آمده‌اند در دو سیستم کشت سه‌بعدی (شکل۴ A) و دوبعدی (شکل۴ B) نشان می‌دهد. سلول‌های شبه‌عصبی شبکه‌ای سلولی روی سطح لایه سلولی غیرعصبی تشکیل دادند (شکل۴ B، سر پیکان).

Archive of SID

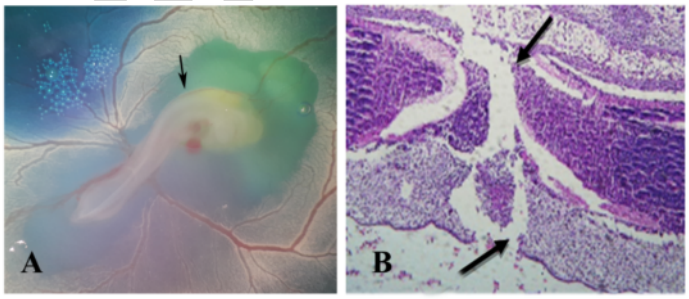
www.SID.ir



شکل ۴: بررسی ریخت‌شناسی سلول‌های تمایزیافته تحت تاثیر دو سیستم ترکیبی از کشت سه‌بعدی و عامل القایی عصاره مغز نوزاد موش صحرایی (A) و کشت دوبعدی همراه با عامل القایی عصاره مغز نوزاد موش صحرایی (B) با استفاده از رنگ‌آمیزی اختصاصی کرزیل‌ویوله. پیکان سلول‌های عصبی، سر پیکان سلول‌های غیرعصبی و ستاره داربست را نشان می‌دهد. A: 40X,) (B: 400X

پیوند سلول‌های P19 تمایزیافته حاصل از کشت سه‌بعدی به طناب عصبی جنین جوجه

پس از کشت اجسام شبه‌جنینی روی داربست و القا توسط عصاره مغز نوزاد موش صحرایی، سوسپانسیونی از سلول‌ها جهت پیوند به طناب عصبی تخریب‌شده جنین جوجه تهیه شد. از آن جایی‌که جنین جوجه مدل مناسبی برای مطالعه مهاجرت سلولی، تمایز و هدایت سیگنالی در طول تکوین است، در این پژوهش به‌منظور ردیابی سلول‌های بنیادی تمایزیافته پس از پیوند از این مدل استفاده شد. بدین منظور تخم مرغ‌های نطفه‌دار در انکوباتور با دمای ۳۸ درجه سانتی‌گراد و در شرایط مرطوب نگه‌داری شدند. پس از رسیدن به مرحله مورد نظر پنجره‌ای در پوسته آن‌ها باز شد تا جنین در دسترس قرار گیرد (شکل ۵ A). در ابتدا طناب عصبی در حال تکوین جنین جوجه در محلی بلافاصله بعد از مغز عقبی در مرحله ۱۸ تا ۲۰ جنینی تخریب و سلول‌های حاصل از تمایز به این ناحیه پیوند زده شدند . شکل۵ B محل تخریب لوله عصبی را در مقطع بافتی جنین جوجه در مرحله مورد نظر نشان می‌دهد.



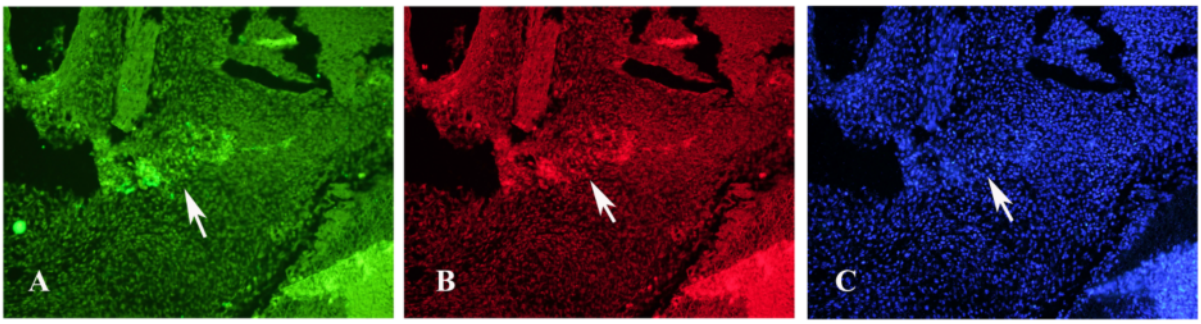
شکل ۵: محل تخریب لوله عصبی جنین جوجه در مرحله ۱۸ تا ۲۰ جنینی (پیکان). A) جنین جوجه زنده پس از باز کردن پنجره در پوسته تخم‌مرغ. پیکان محل تخریب طناب عصبی جنین جوجه را بلافاصله بعد از مغز عقبی نشان می‌دهد. B) تصویر میکروسکوپ نوری از مقطع بافتی رنگ‌آمیزی شده با هماتوکسیلین ـ ائوزین که محل تخریب لوله عصبی را بلافاصله بعد از مغز عقبی نشان می‌دهد (B: 40X).

ردیابی سلول‌های پیوندی به روش ایمنوفلورسنس

سلول‌های تزریق شده به محل تخریب لوله عصبی چند روز پس از پیوند از نظر بیان نشانگر ویژه سلول‌های عصبی بالغ، یعنی سیناپتوفیزین مورد بررسی قرار گرفتند. بررسی بیان این پروتئین به‌روش ایمنوفلورسنس نشان داد که سلول‌های پیوندی نسبت به سیناپتوفیزین پاسخ مثبت دادند (شکل ۶). بررسی‌ها نشان داد که این سلول‌ها پس از پیوند توانستند مهاجرت کرده و به‌خوبی با سلول‌های بافت میزبان ارتباط برقرار نمایند. همچنین هسته سلول‌های پیوندی نسبت به هسته سلول‌های میزبان بزرگتر بوده و هتروکروماتینی بیشتری نشان می‌دهد.

Archive of SID

www.SID.ir



شکل۶: شکل ایمنوفلورسنس از سلول‌های پیوند شده به دستگاه عصبی در حال تکوین جنین جوجه (پیکان) مهاجرت این سلول‌ها در بافت میزبان و ترکیب آن‌ها را با این بافت‌ها به‌خوبی نشان می‌دهد. A) نشانگر اختصاصی عصبی، سیناپتوفیزین، B) پروتئین فلورسنت سبز (GFP)، C) رنگ‌آمیزی هسته با استفاده از هوخست. (X ۱۰۰)

بحث

در این مطالعه القای تمایز عصبی سلول‌های تراتوکارسینومای جنینی رده P19 توسط ترکیبی از داربست کیتوسان/پلی‌وینیل‌الکل و عصاره مغز نوزاد موش صحرایی مورد بررسی قرار گرفت. تقریبا دو هفته بعد از القا زیر مجموعه‌ای از سلول‌ها شکل ظاهری سلول‌های عصبی را نشان دادند. بررسی شکل ظاهری با استفاده از رنگ‌آمیزی اختصاصی کرزیل‌ویولـه جهت تایید اولیه فنوتیپ عصبی انجام شد. در مرحله بعد سلول‌های تمایز یافته به محل تخریب شده طناب عصبی در حال تکوین جنین جوجه در مرحله ۱۸ تا ۲۰ جنینی پیوند زده شدند. بررسی مقاطع پارافینی نشان داد سلول‌های پیوندی به مناطق دیگر بافت عصبی مهاجرت کرده و با بافت میزبان ممزوج شدند. همچنین سلول‌های مذکور نشانگر ویژه سلول‌های عصبی بالغ، یعنی سیناپتوفیزین را بیان نمودند. فاکتورهای ویژه ریز محیط هر بافت نقش اساسی در تمایز اختصاصی آن بافت دارند (۱۴). مغز پستانداران در هنگام تولد از نظر آناتومی و فیزیولوژی بالغ نبوده و در طی دوران زندگی پس از تولد به‌تدریج تکوین می‌یابد (۱۵). بنابراین در طراحی این پروژه فرض بر آن بود که عصاره مغز در حال تکوین نوزاد رت حاوی فاکتورهای ضروری برای تمایز سلول‌های عصبی است. ترکیب چنین فاکتورهایی با داربست‌های مختلف به‌منظور القای فنوتیپ عصبی پیش از این نیز توسط محققین مورد توجه قرار گرفته است. کشت قطعه‌ای از بافت عصبی در داربست محتوی نوروتروفین۳ (NT-3) و فاکتور نوروتروفیک مشتق از مغز(BDNF) به‌طور معنی‌داری باعث رشد زواید عصبی شد (۱۶). بر اساس گزارش‌های موجود افزودن مواد مختلف مصنوعی و طبیعی به داربست کیتوسان/پلی-وینیل‌الکل منجر به القای این فنوتیپ در سلول‌های بنیادی شده است. سلول‌های بنیادی پالپ دندان انسان، کشت شده روی این داربست ضمن تمایز به سلول‌های عصبی، نشانگرهای ویژه بافت عصبی را بیان کردند (۱۷). بر اساس گزارش‌های متعدد مواد موجود در عصاره‌های بافتی یا سلولی می‌تواند باعث القای تمایز در سلول‌های بنیادی شود. استفاده از ریزوزیکول‌های مشتق از سلول-های بنیادی مزانشیمی تیمار شده با عصاره مغز موش صحرایی در درمان رت‌های مدل سکته مغزی باعث بهبود عملکرد در آن‌ها شد. بررسی‌های پروتئومیکس نشان داد که این ریزوزیکول‌ها سرشار از پروتئین هستند (۱۸). القای فنوتیپ سلول‌های انسولین‌ساز در سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان با استفاده از عصاره بافت پانکراس پیش از این به اثبات رسیده است (۱۹). در پژوهش حاضر با استفاده از روش ترکیبی کشت سه‌بعدی و به‌کارگیری نوعی القاگر طبیعی (عصاره مغز)، سلول‌های بنیادی کارسینومای جنینی به سمت فنوتیپ عصبی سوق داده شدند.

پیوند سلول‌های کشت سه‌بعدی به دستگاه عصبی در حال تکوین جنین جوجه

Archive of SID

www.SID.ir

در این پژوهش سلول‌های P19 تحت القای سیستم مرکبی از کشت سه‌بعدی و عصاره مغز نوزاد موش صحرایی به سلول‌های شبه عصبی تمایز پیدا کردند. بافت‌های مهندسی شده پتانسیل ترمیم و جایگزینی هر قسمت از بدن را دارند. هدف مهندسی بافت تولید داربست‌های زیست‌مواد مشابه با ماتریکس خارج سلولی و پیوند آن جهت درمان است. داربست می‌تواند موجب تحریک تمایز سلول‌های بنیادی به فنوتیپ مورد نظر مانند فنوتیپ عصبی شود (۲۰). در این پژوهش سلول‌های بنیادی P19 پس از کشت روی داربست و القای تمایز به طناب عصبی در حال تکوین جنین جوجه پیوند زده شدند. به این‌ترتیب جنین هیبریدی از سلول‌های موش و جوجه ایجاد شد. سلول‌های پیوندی با استفاده از روش ایمنوفلورسنس و نشانگر ویژه عصبی سیناپتوفیزین در سیستم بدن میزبان ردیابی شدند. سیناپتوفیزین در مقاطع بافتی مغز و نخاع انسان به‌وسیله آنتی‌بادی‌های منوکلونال ویژه قابل ردیابی است. این پروتئین در سلول‌های عصبی بالغ و کارآمد بیان می‌شود. همچنین واکنش ایمنی مثبت نسبت به این پروتئین مشخص‌کننده ناحیه فرضی ارتباط سیناپسی بین سلول‌های عصبی است (۲۱). سهولت دسترسی به جنین جوجه به‌مدت طولانی در فرآیندهای پیوندی آن را جهت ایجاد جنین هیبرید بسیار مفید ساخته است. این کار از طریق پیوند سلول‌های جنین جوجه نشاندارشده به جوجه میزبان انجام می‌شود (۱۲). بدین ترتیب جنین هیبریدی مانند جوجه مرغ و بلدرچین به‌وجود آمده است. جنین جوجه مدل مناسبی برای مطالعه مهاجرت سلول، تمایز و هدایت پیام در طول تکوین است. در مطالعه‌ای سلول‌های بنیادی خونساز از مغز استخوان انسان بالغ به محل آسیب‌دیده طناب نخاعی در حال تکوین جنین جوجه پیوند زده شدند. بررسی و ردیابی سلول‌های پیوندی نشان داد که این سلول‌ها ضمن بروز فنوتیپ عصبی، نشانگرهای عصبی NeuN و MAP2 را بیان کردند (۲۲). پیوند سلول‌های ملانومای متاستازی انسانی بیان‌کننده GFP به میزبان جنین جوجه نشان داد که این سلول‌ها نه تنها تومور ایجاد نکردند؛ بلکه با سلول‌های ستیغ عصبی در حال مهاجرت میزبان همراه شده و نشانگرهای اختصاصی را بیان کردند. نتایج این مطالعه روشن نمود که شرایط محیطی جنین جوجه بر سلول‌های پیوندی تاثیر گذاشته و باعث بازآرایی آن‌ها شده است (۲۳). بر اساس گزارش دیگری نشان داده شد که سلول‌های عصبی حرکتی مشتق از سلول‌های بنیادی جنینی بعد از پیوند به لوله عصبی میزبان و مهاجرت، Lhx3 را بیان کرده و آکسون‌های خود را به‌سمت نواحی مناسب فرستادند. بیان Lhx3 نشان‌دهنده ارتباطات عصبی ـ ماهیچه‌ای است (۲۴). نتایج به‌دست آمده از این مطالعات در پیشبرد روش‌هایی جهت سلول‌درمانی بسیار مورد توجه قرار گرفته است.

نتیجه‌گیری

نتایج حاصل از این پژوهش نشان داد که سلول‌های بیان‌کننده GFP پیوند شده به لوله عصبی جنین جوجه در بافت میزبان مهاجرت کرده و با سلول‌های بافت میزبان ممزوج شدند. این سلول‌ها تحت تاثیر شرایط محیطی میزبان قرارگرفته و ضمن بروز فنوتیپ عصبی نشانگر اختصاصی عصبی سیناپنوفیزین را بیان نمودند.

تشکرو قدردانی

این پژوهش در گروه زیست‌شناسی دانشکده علوم دانشگاه اصفهان انجام شده است. بدین‌وسیله از تمام کسانی که ما را در انجام این طرح یاری نمودند قدردانی می‌شود.

منابع

1. Elmann A, Telerman A, Mordechay S, Erlank H, et al., Antioxidant and astroprotective effects of a Pulicaria incisa infusion. Oxid Med Cell Longev. 2012; 2012: doi:10.1155/2012/157598.

2. Goldman SA, Windrem MS. Cell replacement therapy in neurological disease. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci. 2006; 361(1473): 1463-1475.

Archive of SID

www.SID.ir

3. Low CB, Liou YC, Tang BL. Neural differentiation and potential use of stem cells from the human umbilical cord for central nervous system transplantation therapy. J Neuroscience Res. 2008; 86(8): 1670-1679.

4. Heile AMB, Wallrapp C, Klinge PM, Samii A, et al. Cerebral transplantation of encapsulated mesenchymal stem cells improves cellular pathology after experimental traumatic brain injury. Neurosci Lett 2009; 463(3): 176-181.

5. Shi Kam NW, Jessop TC, Wender PA, Dai H. Nanotube molecular transporters: internalization of carbon nanotube-protein conjugates into mammalian cells. J Am Chem Soc 2004; 126(22): 6850-6851.

6. Hess DC, Borlongan CV. Stem cells and neurological diseases. Cell Prolif. 2008; 41(s1): 94-114.

7. Esmaeili F, Tiraihi T, Movahedin M, Mowla SJ. Selegiline induces neuronal phenotype and neurotrophins expression in embryonic stem cells. Rejuv Res. 2006; 9(4): 475-484.

8. Dohrmann U, Edgar D, Thoenen H. Distinct neurotrophic factors from skeletal muscle and the central nervous system interact synergistically to support the survival of cultured embryonic spinal motor neurons. Dev Biol. 1987; 124(1): 145-152.

9. Bakhshalizadeh S, Esmaeili F, Houshmand F, Shirzad H, et al. Effects of selegiline, a monoamine oxidase B inhibitor, on differentiation of P19 embryonal carcinoma stem cells, into neuron-like cells. In Vitro Cell Dev-An. 2011; 47(8): 550-557.

10. MacPherson PA, McBurney MW. P19 embryonal carcinoma cells: a source of cultured neurons amenable to genetic manipulation. Methods. 1995; 7(3): 238-252.

11. Zhou C, Kong J, Dai H. Electrical measurements of individual semiconducting single-walled carbon nanotubes of various diameters. Applied Physics Letters. 2000; 76(12): 1597-1599.

12. Stern CD. The chick: a great model system becomes even greater. Dev cell. 2005; 8(1): 9-17.

13. Hamburger V, Hamilton HL. A series of normal stages in the development of the chick embryo. J Morphol. 1951; 88(1):49-92.

14. Narayanan K, Lim VY, Shen J, Tan ZW, et al. Extracellular Matrix-Mediated Differentiation of Human Embryonic Stem Cells: Differentiation to Insulin-Secreting Beta Cells. Tissue Eng Part A. 2014; 20(1-2): 424-433.

15. Laeremans A, Van de Plas B, Clerens S, Van den Bergh G, et al. Protein expression dynamics during postnatal mouse brain development. J Exp Neurosci. 2013; 7: 61.

16. Thompson BC, Richardson RT, Moulton SE, Evans AJ, et al. Conducting polymers, dual neurotrophins and pulsed electrical stimulation-dramatic effects on neurite outgrowth. J Control Release. 2010; 141(2): 161-167.

17. Ghasemi Hamidabadi H, Rezvani Z, Nazm Bojnordi M, Shirinzadeh H, et al. Chitosan-Intercalated Montmorillonite/Poly (vinyl alcohol) Nanofibers as a Platform to Guide Neuronlike Differentiation of Human Dental Pulp Stem Cells. ACS Appl Mater Interfaces. 2017; 9(13): 11392-11404.

18. Lee JY, Kim E, Choi S-M, Kim D-W, et al. Microvesicles from brain-extract—treated mesenchymal stem cells improve neurological functions in a rat model of ischemic stroke. Sci Rep. 2016; 6:33038, DOI: 10.1038/srep33038.

19. Hatamnia Z, Esmaeili F, Houshmand F, Dehdehi L. Effect of pancreatic extract on insulin secreting cell differentiation from mouse bone marrow mesenchymal stem cells. J Shahrekord Univ Med Sci. 2014; 16(2): 52-

Archive of SID

www.SID.ir

62.

20. Kim D, Richardson-Burns S, Hendricks JL, Sequera C, et al. Effect of immobilized nerve growth factor on conductive polymers: electrical properties and cellular response. Adv Funct Mater 2007; 17(1): 79-86.

21. 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): 487-499.

22. Sigurjonsson OE, Perreault M-C, Egeland T, Glover JC. Adult human hematopoietic stem cells produce neurons efficiently in the regenerating chicken embryo spinal cord. Natl Acad Sci USA. 2005; 102(14): 5227-5232.

23. Kulesa PM, Kasemeier-Kulesa JC, Teddy JM, Margaryan NV, et al. Reprogramming metastatic melanoma cells to assume a neural crest cell-like phenotype in an embryonic microenvironment. Proc Natl Acad Sci USA. 2006; 103(10): 3752-3757.

24. Soundararajan P, Miles GB, Rubin LL, Brownstone RM, et al. Motoneurons derived from embryonic stem cells express transcription factors and develop phenotypes characteristic of medial motor column neurons. J Neurosci. 2006; 26(12): 3256-3268.

Archive of SID

www.SID.ir

Journal of Cell & Tissue (JCT)
Spring 2017; 8(1)

Original Article

Neural differentiation of three dimensional cultured embryonal carcinoma stem cells in chick embryo nervous system

Nasiri Z., M.Sc., Moshtaghian S.J., Ph.D., Esmaeili F., Ph.D.,*

Department of Biology, Faculty of Science, Esfahan University, Esfahan, Iran

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

Received: 29 Jan. 2017 Accepted: 23 Jul. 2017

Abstract

Aim: The present study was designed to investigate the effects of chitosan/poly vinyl alcohol scaffold incorporated by NRBE (neonatal rat brain extract) on neuronal differentiation of P19 EC (embryonal carcinoma) stem cells.

Material and Methods: In order to induce neuronal phenotype, P19-derived embryonic carcinoma stem cells were cultured on a rat chitosan/poly (vinyl alcohol) scaffold with newborn rat brain extracts. To evaluate the survival potential, migration and differentiation of the three-dimensional culture cells, these cells were grafted to the developing central nervous system of the chick embryo. Finally, the transplanted cells were detected using specific staining and immunofluorescence methods.

Results: Cresyl-Violet specific staining confirmed the neuronal phenotype of the transplantation cells. Also, the expression of specific neural protein, synaptophysin, was shown using the immunofluorescence process.

Conclusion: The results of this study showed that P19 embryonic carcinoma stem cells can be used as a source of pluripotent cells in transplantation studies in order to investigate cellular and molecular aspects of developmental and cellular differentiation.

Keywords: Embryonic carcinoma stem cell, P19 cells, neural differentiation, Cell transplantation, Chick embryo

Archive of SID

www.SID.ir