

تمایز سلول‌های بنیادی رویانی موش به سلول‌های شبه عصبی

Mouse Embryonic Stem Cells Differentiation to Neuron-like Cells

Hajar Estiri¹, Ali Fallah², Mansoure Movahedin³هاجر استیری^۱، علی فالاح^۲، منصوره موحدین^۳

1. Department of Molecular Medicine, School of Advanced Technologies in Medicine, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

2. Systems and Synthetic Biology Group, Mede Bioeconomy, Tehran, Iran

3. Department of Anatomy, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

۱. گروه پزشکی مولکولی، دانشکده فناوری‌های نوین پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران.

۲. گروه سیستم و سینتتیک بیولوژی، شرکت زیست اقتصاد ماده، تهران، ایران.

۳. گروه علوم تشریح، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران.

چکیده

تاریخ دریافت: ۲۰ شهریور ۱۳۹۲

تاریخ پذیرش: ۴ مهر ۱۳۹۲

مقدمه ویژگی‌های منحصر به فرد سلول‌های بنیادی رویانی نظیر تکثیر نامتناهی و تمایز به انواع سلول‌ها آن را به ابزار مناسبی برای تحقیقات زیست پزشکی در زمینه‌هایی مانند کاربرد درمانی برای بیماری‌های تحلیل برنده عصبی نظیر پارکینسون و آلزایمر تبدیل نموده است. در سال‌های اخیر، روش‌های آزمایشگاهی زیادی توسعه یافته‌اند که اجازه تولید نورو از سلول‌های پرتوان را در کشت فراهم می‌کند. این سلول‌ها اگر بر روی لایه تغذیه کننده یا در حضور فاکتور مهارکننده لوسمی LIF تکثیر یابند حالت تمایز نیافته خود را حفظ می‌نمایند. اسیدرتینوئیک یکی از مهم‌ترین مورفوژن‌ها است و توزیع آن در مرحله جنینی با تمایز نوروها و ویژگی مکانی آن‌ها در سیستم عصبی مرکزی در حال تکوین مرتبط می‌باشد. **مواد و روش‌ها** برای تمایز آزمایشگاهی در این پژوهش، دودمان سلولی CCE پس از تکثیر بر روی لایه تغذیه کننده فیبروبلاست جنینی موش و در حضور LIF، برای تولید تجمعات سلولی (اجسام شبه جنینی) کشت داده شد. سپس این اجسام شبه جنینی طبق پروتکل ۴/۴۰ (چهار روز در حضور و عدم حضور رتینوئیک اسید) در معرض اسید رتینوئیک با غلظت ۱۰^{-۶} مولار قرار گرفت. سپس بررسی‌های مورفولوژیک، ایمنوسیتوشیمی و مولکولی برای ارزیابی فاکتورهای عصبی صورت پذیرفت. **یافته‌ها** در این پروتکل القایی درصد بالایی از سلول‌ها (۸۰٪) به سلول‌های شبه عصبی تمایز پیدا کردند. این سلول‌ها، نشانگر سلول‌های نوروابی تلایالی یعنی نستین را بیان نمودند. همچنین نتایج نشان داد که اسید رتینوئیک می‌تواند بیان ژن فاکتور رشد عصب NGF را در سلول‌های بنیادی رویانی القا کند. **نتیجه‌گیری** این یافته‌ها نشان می‌دهد که اسید رتینوئیک به شدت تشکیل و ویژگی نوروها را در طول تمایز سلول‌های بنیادی جنینی موش تنظیم می‌کند و می‌تواند یکی از فاکتورهای موثر جهت تمایز این سلول‌ها به سلول‌های عصبی باشد.

کلید واژه:

سلول‌های بنیادی جنینی، اجسام شبه جنینی، نستین، نورو.

Received: 11 Sept. 2013

Accepted: 26 Sept. 2013

A B S T R A C T

Introduction Unique features of embryonic stem cells (ESCs) such as unlimited proliferation and differentiation into other types of cells make them a favorable tool for biomedical researches as well as a potential source for therapeutic application for neurodegenerative diseases, such as Parkinson's and Alzheimer's diseases. In recent years, in vitro methods have been developed which permit the growth of neurons from pluripotent cells in culture. These cells can be maintained as stable, proliferative and undifferentiated cell lines if cultured on feeder layer or in presence of leukemia inhibitory factor. Since ESCs can be proliferated and differentiated, it is possible to generate large numbers of donor cells for neural transplantation. Retinoic acid (RA) is one of the most important morphogenesis, and its embryonic distribution correlates with neural differentiation and positional specification in the developing central nervous system. **Materials & Methods** After proliferation on the mouse embryonic fibroblast feeder cells in the presence of LIF, for the study of CCE cell line differentiation these cells were cultured to producing cell aggregates (embryoid bodies). The embryoid bodies were under the protocol 4- / 4+ (four days in the presence or absence of retinoic acid) at concentration of 10⁻⁶ μM retinoic acid for differentiation. Then morphological, molecular and immunocytochemistry examination were used to assess neurological factors. **Results** In this induction protocol, highly proportion (%80) of ESCs could be induced to differentiation into neuron-like cells. The cells expressed neuroepithelial cell marker nestin. In addition, the results indicated that RA could induce nerve growth factor gene expression in the ESCs. **Conclusion** These findings suggest that RA strictly regulates the neuralization and specification during differentiation of mouse ESCs, especially for the differentiation into nerve cells.

Key words:

Embryonic Stem Cells, Embryoid Bodies, Nestin, Neurons.

* Corresponding Author:

Mansoure Movahedin

E-mail: Movahed.m@modares.ac.ir

• نویسنده مسئول:

منصوره موحدین

Movahed.m@modares.ac.ir; آدرس الکترونیکی:

مقدمه

به دست آمده‌اند می‌تواند راه مناسبی برای درمان این بیماری‌ها باشد. سلول‌های ESCs در محیط کشت در حضور LIF^۵ و یا در صورت کشت بر روی لایه تغذیه کننده قادرند بدون این که دچار تمایز شوند تا چندین نسل تکثیر شده، دودمان سلولی ESCs را تولید نمایند (۱۱). وجود LIF در محیط کشت این سلول‌ها برای حفظ دو ویژگی منحصر به فرد آنها ضروری است. در واقع ماده اصلی مهار کننده تمایز که موجب حفظ فنوتیپ این سلول‌ها می‌شود LIF است. اگر سلولی قادر به ترشح این فاکتور باشد احتمالاً می‌توان از آن به عنوان لایه تغذیه کننده در کشت سلول‌های ESCs استفاده نمود. با استفاده از روش‌های مختلف، تولید و ترشح سایتوکاین LIF توسط فیبروبلاست جنین موش^۶ نشان داده شده است. با توجه به این نکته، در پژوهش حاضر از این سلول‌ها جهت کشت سلول‌های بنیادی رویانی علاوه بر LIF استفاده شد.

برای شناسایی سلول‌های ESCs معیارهای متفاوتی وجود دارد که عبارتند از: بررسی مورفولوژی سلول‌های ESCs و کلونی‌های حاصل از آنها، وجود نشانگرهای سلولی ویژه مثل آنزیم آلکالین فسفاتاز، تلومراز، فاکتورهای کپی برداری، آنتی‌ژن‌های ویژه مانند انواع TRA^۷، SSEA^۸ بررسی قدرت تمایز این سلول‌ها در محیط کشت (که به سه روش امکان پذیر است: کشت معلق^۹، حذف LIF و افزودن ماده القا کننده به محیط کشت) و بالاخره قابلیت تمایز سلول‌های ESCs در بدن موجود زنده که از طریق توانایی تومورزایی و هم چنین تولید موجود کایمرا مورد بررسی قرار می‌گیرد.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه از سلول‌های بنیادی جنینی رده‌ی CCE اهدائی از دانشگاه شفیلد^{۱۰} استفاده شد. این سلول‌ها ابتدا بر روی فیبروبلاست جنینی موش غیر فعال شده با میتوماپسین در حضور LIF کشت داده شدند.

برای تهیه فیبروبلاست جنینی موش از جنین‌های ۱۴-۱۲ روزه استفاده شد. پس از خارج نمودن جنین‌ها از رحم موش مادر و شستشوی آن با بافر نمکی فسفات (Phosphate-buffer saline) کیسه آمینون، جفت، سر، اندام و تمامی امعاء و احشاء جنین‌ها خارج شد و باقی مانده جنین‌ها ابتدا با اسکالپل و پنس استریل خرد شد و سپس با اضافه کردن آنزیم تریپسین هضم آنزیمی صورت گرفت. پس از هضم آنزیمی اضافه کردن

سلول‌های بنیادی رویانی (ESC)^۱ دودمان سلولی تمام استعدادی^۲ هستند که از جنین در مرحله پیش لانه گزینی^۳ در مرحله بلاستوسیست (۲، ۱) و یا بر طبق گزارش‌های معدودی در مرحله دو سلولی (۳)، هشت سلولی (۴)، مورولا (۵، ۶) و اپی بلاست اولیه (۷) به دست می‌آیند. دودمان‌های اولیه از بلاستوسیست موش کوچک آزمایشگاهی جدا شدند (۲، ۱) و از آن پس محققین موفق شده‌اند دودمان‌های دیگری از سایر گونه‌های حیوانات آزمایشگاهی تهیه نمایند. سلول‌های مذکور دارای دو ویژگی منحصر به فرد هستند (۸). نخست، چنانچه گفته شد تمام استعدادی بوده، قادرند به تمامی انواع سلول‌ها تمایز یابند و دوم، بدون هیچ گونه محدودیتی و بدون از دست دادن توانایی رشد و نمو، به طور نامتناهی تقسیم شوند. به عبارت دقیق تر دارای قدرت تجدید خود به خودی^۴ هستند (۸). بر طبق گزارشی، این سلول‌ها حتی پس از ۲۵۰ بار همانند سازی بدون اینکه متمایز شوند همچنان به تکثیر خود ادامه داده‌اند. وجود این دو ویژگی سبب شده است که سلول‌های ESCs ابزاری مناسب برای انجام تحقیقات وسیع در زمینه علوم پایه‌ای چون بیولوژی تکوینی و مولکولی و همچنین تولید موجودات ترانس ژنیک و انجام دستکاری‌های ژنتیکی فراهم آورد (۹).

به عنوان مثال، سلول‌های بنیادی موجود در سیستم عصبی مرکزی پس از تمایز، انواع سلول‌های عصبی و گلیا را به طور مستقیم و یا از طریق تولید پیش سازهای سلولی حد واسط به وجود می‌آورند (۱۰).

تکوین پیچیده این سیستم درمانی در دوران جنینی و زندگی اولیه پس از تولد به وسیله فاکتورهای مختلف کنترل می‌شود ولی به دلیل مشکلاتی که در مطالعه جنین زنده وجود دارد تاکنون این سیگنال‌ها و مراحل تکوینی سیستم مذکور به خوبی شناسایی نشده است. جداسازی و کشت سلول‌های بنیادی و مطالعه این سلول‌ها در محیط آزمایشگاه به دانش ما در تعیین مسیر تکوینی سیستم عصبی کمک شایانی کرده است. از طرف دیگر، تکثیر نا محدود سلول‌های ESCs در محیط کشت، منبع عظیمی از سلول‌های تمایز نیافته فراهم می‌کند که کاربردهای بالقوه درمانی بسیاری دارند. با تولید مقادیر زیادی جمعیت سلولی خالص مانند سلول عضله قلبی، سلول خونی و عصبی می‌توان از این سلول‌ها در پیوند درمانی استفاده نمود. به عنوان مثال در بیماری‌هایی از قبیل پارکینسون و آلزایمر که در نتیجه مرگ و یا ناکارآمد شدن تنها یک یا چند نوع سلول حاصل می‌شوند جایگزینی سلول‌های تخریب شده با سلول‌های عصبی که در محیط کشت

۵. Leukemia inhibitory factor

۶. Mouse embryonic fibroblast

۷. Tumor Rejection Antigen

۸. Stage-specific embryonic antigen

۹. Suspension Culture

۱۰. Sheffield University

۱. Embryonic stem cells

۲. Totipotent cell line

۳. Preimplantation embryo

۴. Self-renewing

بررسی مولکولی

برای بررسی بیان یا عدم بیان یک ژن، می‌توان از مطالعه‌ی حضور و یا عدم حضور mRNA مربوط به آن ژن استفاده کرد. حضور mRNA را می‌توان با استفاده از روش RT-PCR^{۱۳} اثبات نمود. جهت استخراج RNA، از محلول RNX plus استفاده شد. در مرحله RT^{۱۴} یا ترجمه‌ی معکوس، از cDNA با استفاده از کیت شرکت Thermo سنتز شد. واکنش PCR جهت تکثیر قطعه‌ی DNA الگو (محصول واکنش RT) در ۳۵ سیکل شامل واسرشت سازی^{۱۵} در دمای ۹۵ درجه‌ی سانتی گراد به مدت ۳۰ ثانیه، الحاق^{۱۶} در دمای ۵۸ درجه‌ی سانتی گراد به مدت ۳۰ ثانیه، و گسترش^{۱۷} در دمای ۷۲ درجه‌ی سانتی گراد به مدت ۵۰ ثانیه، انجام شد. پرایمرهای استفاده شده در این مطالعه که با استفاده از نرم‌افزار Oligo6 طراحی شد، شامل (NGF و NES) و ژن کنترل داخلی^{۱۸} ($\beta 2-m$) بود که در جدول ۱ توالی آنها آورده شده است.

جدول ۱. توالی پرایمرهای استفاده شده در این مطالعه

نام پرایمر	توالی پرایمر	وزن محصول PCR (جفت باز)
$\beta 2m$	F: 5' TGACCGGCTTGATGCTATC 3' R: 5' CACATGCTCCGATCCAGTAC 3'	۳۱۶
Nestin	F: 5'-CAA GAA CCA CTG GGG TCT GT-3' R: 5'-ACA TCC TCC CAC CTC TGT TG-3'	۳۳۷
NGF	F: 5'- CAACAGGACTCACCGGAGCA-3' R: 5'-ACA TCC TCC CAC CTC TGT TG-3'	۳۴۲

شما

یافته‌ها

توانایی تشکیل اجسام شبه جنینی (EB) و بررسی قدرت تمایزی سلول‌های ESCs

یکی از ویژگی‌های سلول‌های چند استعدادی، توانایی تشکیل تجمعات سلولی در کشت معلق است. سلول‌های ESCs در کشت معلق در ابتدا تجمعات ساده سلولی را به وجود می‌آورند (تصویر ۱ الف و ب). این تجمعات ساده پس از مدتی بزرگتر شده، در آنها یک توده سلولی تمایز نیافته از اطراف به وسیله یک لایه آندودرمی مفروش شدند. بدین ترتیب اجسام شبه جنینی ساده^{۱۹} بوجود آمد. (تصویر ۲ قسمت الف و ب) با تشکیل حفره‌ای در

محیط DMEM^{۱۱} حاوی سرم ده درصد جهت خنثی نمودن اثر تریپسین صورت گرفت. سوسپانسیون سلولی حاصله به فلاسک کشت (هر سه جنین به یک فلاسک ۷۵) منتقل شد.

پس از تکثیر ESCs بر روی سلول‌های فیبروبلاست جنینی این سلول‌ها جدا سازی شده و اجسام شبه جنینی به روش قطره‌های آویزان تشکیل شدند. سپس اجسام شبه جنینی^{۱۲} (EBs) به مدت چهار روز در عدم حضور LIF و در محیط DMEM کشت داده شدند. در مرحله بعد EBs چهار روزه در دو گروه RA+ (مواجهه یافته با رتینوئیک اسید) با غلظت ۱۰^{-۶} مولار و RA- (مواجهه نیافته با رتینوئیک اسید) برای چهار روز دیگر کشت داده شدند (روش ۴/۴⁺). در روز هشتم اجسام شبه جنینی به پلت چسبنده منتقل شده تا اجازه مهاجرت به سلول‌ها داده شود. در ادامه بررسی‌های ایمونوسیتوشیمی و مولکولی بر روی سلول‌ها صورت گرفت. در این پژوهش برای شناسایی سلول‌های عصبی که در *in vitro* متمایز شده‌اند از سه روش بررسی مورفولوژی، ایمونوسیتوشیمی و RT-PCR استفاده شد. به منظور بررسی مورفولوژی از میکروسکوپ فاز کنتراست و میکروسکوپ invert استفاده شد. در بخش ایمونوسیتوشیمی نشانگر سلولی نستین که نشانگر سلول‌های نوروابی تلیالی است مورد بررسی قرار گرفت. در روش RT-PCR بیان ژن‌های نستین و NGF (یکی از اعضای خانواده نوروتروفین‌ها) مورد بررسی قرار گرفت.

بررسی نشانگر عصبی به روش ایمونوسیتوشیمی

پس از القای فوتوتیپ عصبی به روش ۴/۴⁺ کشت چسبنده EBs بر روی لامل استریل پوشیده شده از ژلاتین صورت گرفت. در مرحله بعد فیکس نمودن سلول‌ها با استفاده از محلول چهار درصد پارافمالدئید به مدت نیم ساعت در درجه حرارت اتاق صورت گرفت. پس از شست و شو با سه تعویض PBS هر بار به مدت پنج دقیقه محلول بلاک کننده (مخلوط ده درصد سرم نرمال بز و ۰/۳ درصد تریتون X-100 با PBS) به مدت یک ساعت در دمای اتاق اضافه شد. سپس آنتی بادی اولیه رقیق شده در PBS که شامل آنتی بادی منوکلونال ضد نستین (mouse monoclonal anti-nestin antibody, chemicon) با غلظت یک صدم بود به مدت یک ساعت در دمای اتاق انکوبه گردید. پس از شست و شو با PBS آنتی بادی ثانویه (FITC goat anti mouse antibody, Jackson Immuno Research Labs, Westgrove, PA) با غلظت یک پنجاهم به مدت ۱ ساعت در دمای اتاق انکوبه شد. پس از شست و شو با PBS و اضافه کردن بافر گلیسرول، لام اضافه شد و مشاهده سلول‌ها با میکروسکوپ فلورسانت صورت گرفت.

۱۳. Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction

۱۴. Reverse Transcription

۱۵. Denaturation

۱۶. Annealing

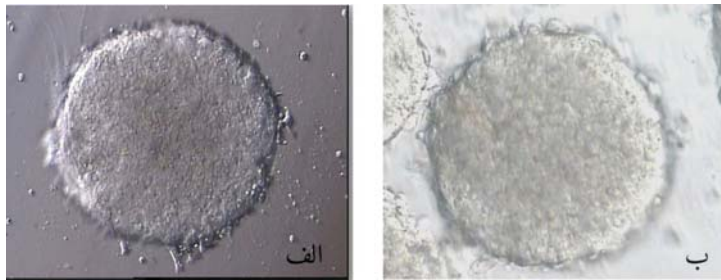
۱۷. Extension

۱۸. House keeping

۱۹. Simple embryoid body

۱۱. Dulbecco's modified Eagle's medium

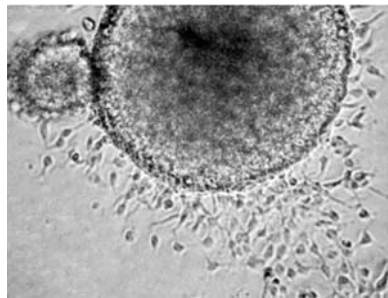
۱۲. Embryoid bodies



تصویر ۱. تصویر مربوط به تشکیل اجسام شبه جنینی (Embryoid bodies) با بزرگنمایی $100 \times$ (الف) به روش قطره های آویزان. (ب) استفاده از پلیت های باکتریولوژی.



تصویر ۲. تصویر مربوط به اجسام شبه جنینی. (الف) اجسام شبه جنینی یک روزه با بزرگنمایی $40 \times$. (ب) اجسام شبه جنینی دو روزه با بزرگنمایی $40 \times$. (ج) اجسام شبه جنینی چهار روزه با بزرگنمایی $100 \times$.



تصویر ۳. تصاویر مربوط به کشت چسبنده اجسام شبه جنینی و گسترش و مهاجرت سلول ها به صورت شعاعی به اطراف و مشاهده مورفولوژی شبه عصبی آن ها.

فوتوتیپ عصبی با استفاده از میکروسکوپ فاز کنتراست (تصویر ۴ الف) و فاز اینورت (تصویر ۴ ب) نشان داده شده است. در این شکل جسم سلولی، زواید سلولی و محل احتمالی یک سیناپس عصبی قابل تشخیص است.

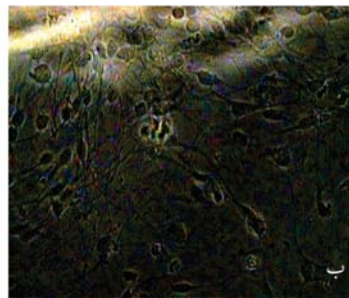
بدین ترتیب در اطراف هر EB شبکه بسیار وسیعی از سلول های شبه عصبی تشکیل شد. این سلول ها دارای جسم سلولی دو قطبی تا چند قطبی، زواید سیتوپلاسمی گسترده، هسته یوکروماتین بزرگ محتوی یک هستک و سیتوپلاسم دانه دار بودند. در انتها و در طول برخی از زواید سلولی نواحی برجسته ای با ساختار دگمه مانند^{۲۱} دیده شد (تصویر ۴ ب).

۲۱. Button-like structure

مرکز، این EB ها تبدیل به EB حفره دار یا سیستیک^{۲۰} شدند. EBs سیستیک سرانجام توسط دو لایه سلولی اندودرمی (در خارج) و اکتودرمی (در داخل) مفروش شدند (تصویر ۲ قسمت ج).

پس از کشت چسبنده EBs در ظروف کشتی که کف آنها ژلاتینه شده بود، سلول هایی از اطراف آنها به طور شعاعی شروع به تکثیر نمودند. این سلول ها همین طور که به سمت محیط پیش رفتند دچار تمایز شدند (تصویر ۳). حاصل این تمایز خود به خودی، تولید انواعی از سلول های بافت های مختلف بود. در میان سلول های تمایز یافته درصد کمی از این سلول ها، سلول های شبه عصبی بودند. با استفاده از اسید رتینوئیک درصد تمایز به سلول های شبه عصبی افزایش یافت (تصویر ۴). تعدادی سلول با

۲۰. Cystic embryoid body



شما نتخ

تصویر ۴. تصاویر مربوط به میکروسکوپ فاز کنتراست (الف) و اینورت (ب) سلول‌های شبه عصبی مشاهده شده دو روز پس از کشت چسبنده اجسام شبه جنینی.



شما نتخ

تصویر ۶. تصویر مربوط به یک کلونی تمایز نیافته حاصل از کشت سلول‌های بنیادی رویانی CCE می باشد که در محیط کشت دارای LIF با بزرگنمایی 100x تهیه گردیده است.



شما نتخ

تصویر ۵. تصویری از کشت سلول‌های بنیادی رویانی موش در محیط کشت غیر تمایزی (در حضور LIF) با بزرگنمایی 40x تهیه شده است.

بر روی بستری از سلول‌های با فنوتیپ غیر عصبی قرار داشتند. سلول‌های بستر به آنتی بادی ضد نستین هیچ گونه پاسخی نشان ندادند.

ارزیابی بیان ژن فاکتور نروتروفیک NGF و نستین

در ابتدا RNA کل استخراج شده از نظر سالم بودن مورد بررسی قرار گرفت. در بررسی دو باند مربوط به 28s RNA و 18s RNA به وضوح مشاهده شد که نشان دهنده عدم تجزیه RNA بود. بیان ژن‌های NGF و نستین در سلول‌های CCE تیمار نشده و تیمار شده با غلظت 10^{-6} مولار رتینوئیک اسید، به روش RT-PCR مورد ارزیابی قرار گرفت. محصول RT-PCR ژن‌های نستین و NGF مربوط به سلول‌های ESCs تیمار شده با رتینوئیک اسید (RA+) و سلول‌های ESCs تیمار نشده با رتینوئیک اسید (RA-) و هم چنین محصول ژن کنترل داخلی بتا-2 میکروگلوبولین این دو گروه بر روی ژل آگارز برده شد. اندازه باند مربوط به $2m\beta$ ، نستین و NGF به ترتیب ۳۱۶، ۳۲۷ و ۳۴۲ جفت باز بود (تصویر ۱۱). باندهای مربوط به هر فاکتور با اندازه مورد انتظار بر روی ژل نمایان شد. نتایج حاصله نشانگر القای بیان این فاکتورها در سلول‌های شبه عصبی حاصل از اثر RA بود.

تأیید هویت سلول‌های عصبی به روش ایمونوسیتوشیمی

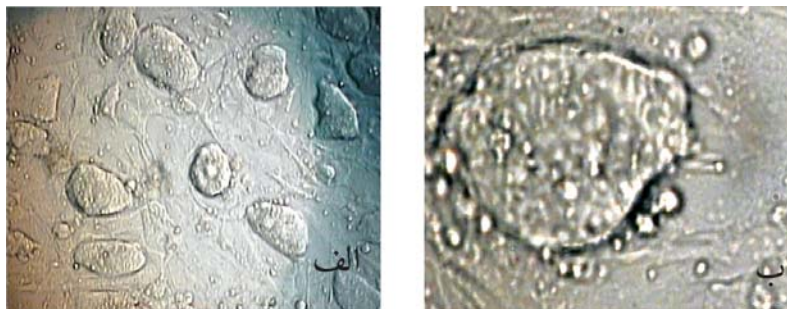
برای جلوگیری از تمایز خود به خودی، ESCs در حضور LIF و بر روی سلول‌های فیبروبلاست جنینی موش غیر فعال شده با میتومایسین (غلظت $10\mu g/ml$) کشت داده شدند. کلونی سلول‌های ESCs و مورفولوژی سلول‌های فیبروبلاست جنینی موش در تصویر های ۵-۸ به تصویر کشیده شده است.

برای تمایز سلول‌های ESCs پس از جداسازی این سلول‌ها از بستر به کمک آنزیم تریپسین (تصویر ۹) اجسام شبه جنینی به روش قطره‌های آویزان تشکیل شدند. در مرحله بعد این اجسام شبه جنینی تحت پروتکل $4^+/4^-$ ، جهت کشت چسبنده به پلیت منتقل شدند.

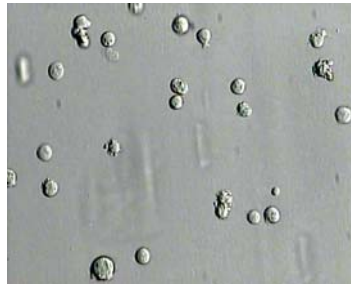
سلول‌های شبه عصبی چند روز (۳-۵ روز) پس از کشت چسبنده EB‌های تیمار شده با غلظت 10^{-6} مولار اسید رتینوئیک طبق پروتکل $4^+/4^-$ ، از نظر نشانگر عصبی نستین مورد بررسی قرار گرفتند. چنانچه در تصویر ۱۰ نشان داده شده است تحت تأثیر غلظت 10^{-6} مولار رتینوئیک اسید تعداد بسیار زیادی سلول‌های نستین مثبت (بیش از ۸۰ درصد از سلول‌ها) که همان سلول‌های نوروآپی تلیالی هستند، به وجود آمد. سلول‌های نوروآپی تلیالی



شفاخته تصویر ۷. کشت سلول های فیبروبلاست جنینی موش. الف) تصویر با دانسیته بالا با بزرگنمایی 100x. ب) تصویر با دانسیته پائین با بزرگنمایی 40x.



شفاخته تصویر ۸. تصویر مربوط به کشت سلول های بنیادی رویانی موش (دودمان CCE) بر روی لایه تغذیه کننده فیبروبلاست جنینی موشی غیر فعال شده با مایتومايسين. الف) تصویر با بزرگنمایی 40x. ب) تصویر با بزرگنمایی 100x.



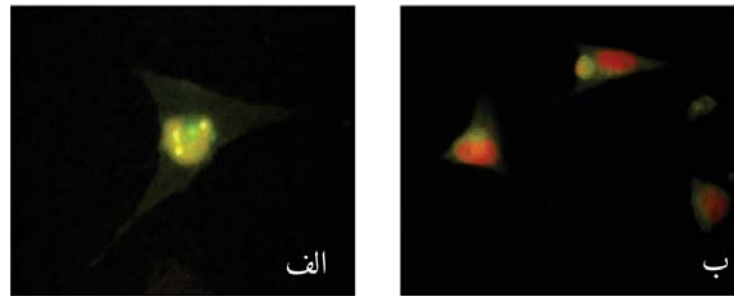
شفاخته تصویر ۹. تصویر مربوط به تریپسینه کردن سلول های بنیادی جنینی موش بعد از گذشت پنج دقیقه و مشاهده مورفولوژی گرد و تا حدودی چند وجهی، سیتوپلاسم درخشان، هسته بزرگ، وجود یک یا چندین هستک و غشای سیتوپلاسمی نازک (بزرگنمایی 100x).

کشت به روش چسبنده، به بستر کشت چسبیدند و سلول های تولید شده در اطراف آنها مورفولوژی های متفاوت از خود بروز دادند. یکی از معیارهای تشخیصی سلول های تمایز نیافته ESCs توانایی تشکیل EBs و تمایز خود به خودی این اجسام است (۱۲). در واقع مفید ترین و مهمترین ویژگی این سلول ها توانایی آنها در تمایز به مشتقات اکتودرمی، اندودرمی و مزودرمی در محیط کشت است. مراحل تکوین EBs ظاهراً مانند مراحل تکوین جنین اولیه بوده، در آن میان کنش های سلول - سلول

بحث و نتیجه گیری

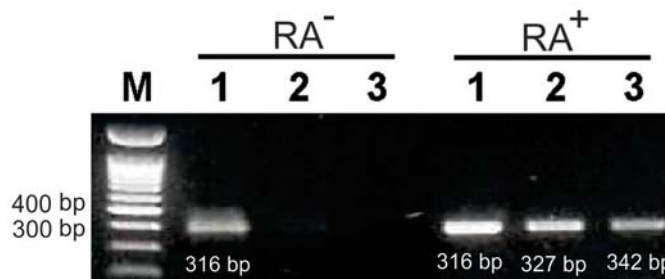
تشکیل اجسام شبه جنینی و تمایز خود به خودی

سلول های ESCs در صورت کشت معلق و در غیاب لایه تغذیه کننده و یا LIF قادر به تشکیل دستجات سلولی و تولید اجسام شبه جنینی (EBs) هستند. این اجسام پس از مدتی دارای دو لایه سلولی آندودرمی و اکتودرمی شده، با تشکیل حفره داخلی اجسام شبه جنینی تبدیل به سیستمیک شدند. EBs ها پس از



شما

تصویر ۱۰. تصویر مربوط به ایمونوسیتوشیمی نشانگر نستین در سلول های شبه عصبی که با میکروسکوپ فلورسانت با بزرگنمایی 100x گرفته شده است. الف) نشاندار کردن سلول های شبه عصبی با نشانگر نستین بدون رنگ آمیزی هسته (ب) نشاندار کردن سلول های شبه عصبی با نشانگر نستین همراه با رنگ آمیزی هسته ها با اتیدیوم بروماید.



شما

تصویر ۱۱. تصویر مربوط به الکتروفورز محصول RT-PCR ژنهای β_2m , Nestin و NGF در سلول های بنیادی جنینی. RA^- : باندهای مربوط به سلول های بنیادی تیمار نشده با رتینوئیک اسید. RA^+ : باندهای مربوط به سلول های بنیادی تیمار شده با رتینوئیک اسید. M = molecular Ladder و 3= NGF، 2= NES، 1= β_2m

خود گرفته، مراحل پایه ای تمایز عصبی در آنها آغاز می شود؛ ولی تغییرات پیچیده و بسیار منظم و واکنش های متقابل سلولی - که در جنین طبیعی وجود دارد- در EBs رخ نمی دهد (۱۴). سلول های مذکور دارای زواید سلولی بسیار بوده، مورفولوژی سلول های مغزی را در محیط کشت تداعی می کنند (۱۴). احتمالاً مسیر تمایز ESCs به نورون در *in vitro* از طریق تنظیم افزایشی β_2m ژن های فنوتیپ عصبی به وسیله RA است (۱۵). البته مکانیسمی که به وسیله آن RA اثر القایی خود را اعمال می کند هنوز به طور دقیق مشخص نشده و موضوع بسیاری از تحقیقات است (۱۴). تاکنون دوسری گیرنده سلولی (RARs) و RXRs (۲۴) برای اسید رتینوئیک شناسایی شده است (۱۸، ۱۴). بیان برخی از این گیرنده ها تحت اثر القایی RA تحریک می شود (۱۴). mRNA کد کننده RARs در سلول ESCs وجود دارد. گزارش های متعددی حاکی از آن است که سلول های حاصل از تمایز ESCs که دارای فنوتیپ عصبی هستند در واقع پیش ساز

برای پدیده تمایز رخ می دهد. در کشت معلق، EBs در ابتدا ساده و دارای لایه خارجی سلول های اندودرمی و لایه داخلی سلول های تمایز نیافته است. سپس ساختمان آن پیچیده تر شده، لایه ای از سلول های استوانه ای اکتودرم در آن ظاهر می شود. پس از گذشت چند روز برخی از آنها حفره دار شده، EB سیستیک به وجود می آورند. حفره مذکور معادل کیسه زده جنینی است (۱۳). از آنجایی که EBs دارای هر سه لایه زایای جنینی است می توان نتیجه گرفت که سلول های ESCs سلول هایی چند استعدادی هستند که قادرند تمامی انواع سلول ها را ایجاد نمایند.

ارزیابی تمایز به فنوتیپ عصبی تحت اثر القایی اسید رتینوئیک

اثر القایی اسید رتینوئیک (RA) بر سلول های ESCs در شرایط *in vitro* موجب تولید سلول هایی با فنوتیپ شبه عصبی شد. در غیاب RA، درصد کمی از سلول های حاصل از تمایز خود به خودی EBs فنوتیپ سلول عصبی را نشان می دهند؛ در حالی که تعداد چنین سلول هایی تحت اثر القایی RA به طور قابل توجهی افزایش می یابد (۱۷-۱۴). این سلول ها ساختار شبه عصبی به

۲۲. Upregulation.

۲۳. Retinoic acid receptors.

۲۴. Retinoid x receptors.

استفاده از روش RT-PCR نشان داد که سلول‌های تولید شده در این تمایز، Nestin و NGF را بیان می‌کنند. دو اتفاق عمده اخیر در زمینه تحقیقات سلول بنیادی مبنی بر تولید سلول‌های بنیادی درمانی به وسیله انتقال هسته در انسان و هم چنین تولید سلول‌های بنیادی پرتوان القا شده (iPSCs)^{۲۵}، نشان می‌دهد که بر سر راه اجماع جهانی در به کار گیری سلول‌های بنیادی مشکلی نیست که قابل حل نباشد. از این رو می‌توان در اطمینان کامل به تحقیقات و کاربرد این سلول‌ها در درمان بیماری‌های انسان امیدوار بود.

نورون یا نوروایی تلیالی هستند. بنابراین بهتر است که چنین سلول‌هایی را شبه عصب بنامیم نه سلول عصبی (۱۴). در این پژوهش تأثیر اسید رتینوئیک بر القای فنوتیپ عصبی در دودمان سلولی CCE (نوعی سلول بنیادی رویانی موشی) مورد بررسی قرار گرفت. نتایج حاصل نشان داد که غلظت 10^{-6} مولار RA تأثیر به سزایی بر تمایز این سلول‌ها به سمت سلول‌های عصبی داشته، شبکه وسیعی از سلول با مورفولوژی شبه عصبی در اطراف EBs به وجود می‌آورد. بررسی ایمنوسیتو شیمی سلول‌های مذکور نشانگر وجود سلول‌های نوروایی تلیالی نستین مثبت بود.

منابع

- Evans MJ, Kaufman MH. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature*. 1981; 292(5819): 154-6.
- 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.
- Ishiwata I, Tokeida Y, Iguchi M, Ishiwata C, Kiguchi K, Yasumoto S, et al. New approach for the establishment of mouse embryonic stem cells and induction of their differentiation. *Hum Cell*. 2001; 14(4): 283-91.
- Delhaise F, Bralion V, Schuurbiens N, Dessy F. Establishment of an embryonic stem cell line from 8-cell stage mouse embryos. *Eur J Morphol*. 1996; 34(4): 237-43.
- Eistetter HR. Pluripotent embryonal stem cell lines can be established from disaggregated mouse morulae. *Dev Growth Differ*. 1998; 31(3): 275-282.
- Ledermann B, Burki K. Establishment of a germ-line competent C57BL/6 embryonic stem cell line. *Exp Cell Res*. 1991; 197(2): 254-8.
- Evans MJ, Hunter S. Source and nature of embryonic stem cells. *C R Biol*. 2002; 325(10): 1003-7.
- Brustle O. Building brains: Neural chimeras in the study of nervous system development and repair. *Brain Pathol*. 1999; 9(3): 527-45.
- D,Amour k, Gage FH. New tools for human developmental biology. *Nat Biotechnol*. 2000; 18(4): 381-2.
- Mujtaba T, Mayer - Proschel M, Rao MS. A common neural progenitor for the CNS and PNS. *Dev Biol*. 1998; 200(1): 1-15.
- Abbondanzo SJ, Gadi I, Stewart CL. Derivation of embryonic stem cell lines. *Methods Enzymol*. 1993; 225: 803-23.
- Doetschman TC, Eistetter H, Katz M, Schmidt W, Kemler R. The in vitro development of blastocyst-derived embryonic stem cell lines: formation of visceral yolk sac, blood islands and myocardium. *J Embryol Exp Morphol*. 1985; 87: 27-45.
- Doetschman T, Williams P, Maeda N. Establishment of hamster blastocyst-derived embryonic stem (ES) cells. *Dev Biol*. 1988; 127: 224-227.
- Bain G, Kitchens D, Yao M, Heuttner JE, Jottlieb DL. Embryonic stem cells express neuronal properties in vitro. *Dev Biol*. 1995; 168(2): 342-57.
- Bain G, Ray WG, Yao M, Gottlieb DI. Retinoic acid promotes neural and represses mesodermal gene expression in mouse embryonic stem cells in culture. *Biochem Biophys Res Commun*. 1996; 223(3): 691-4.
- Deacon T, dinsmore J, Costantini LC, Ratliff J, Isacson O. Blastula-stage stem cells can differentiate into dopaminergic and serotonergic neurons after transplantation. *Exp Neurol*. 1998; 149(1): 28-41.
- Fraichard A, Chassande O, Bilbaut G, Dehay C, Savatier P, Camarut J. In vitro differentiation of embryonic stem cells into glial cells and functional neurons. *J Cell Sci*. 1995; 108 (Pt 10): 3181-8.
- Cheung WM, Chu PW, Lung CH, Ip NY. Expression of retinoid receptors during the retinoic acid -induced neuronal differentiation of human embryonal carcinoma cells. *J Neurochem*. 2000; 75(1): 34-40.