

Gene Expression Profiling of NCAM, NCAM-L1, N-Cadherin, Ninjurin-1 and Ninjurin-2 during the Course of Differentiation of Murine Neural Stem Cells

Mohammadreza Golbar, M.Sc.¹, Fardin Fathi, Ph.D.^{2*}, Seyed Javad Mowla, Ph.D.¹, Fariborz Soheili, M.Sc.², Abbas Ahmadi, M.Sc.³, Esmail Izadpanah, M.Sc.³

1. Genetics Department, Faculty of Basic Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran
2. Center for Cellular and Molecular Research, Kurdistan University of Medical Sciences, Sanandaj, Iran
3. School of Medical Sciences, Kurdistan University of Medical Sciences, Sanandaj, Iran

* Corresponding Address: P.O.Box: 66135-756, Center for Cellular and Molecular Research, Kurdistan University of Medical Sciences, Sanandaj, Iran
Email: farfath@yahoo.com

Received: 1/Aug/2008, Accepted: 4/May/2009

Abstract

Objective: To evaluate and compare the gene expression profiles of Ninjurin-1 and Ninjurin-2 with the expressions of L1 family of cell adhesion molecules (NCAM-L1), neural cell adhesion molecules (NCAM), and N-cadherin during the course of neural differentiation of mouse neural stem cells (NSCs).

Materials and Methods: Briefly, for neural stem cell isolation, the frontal part of an adult mouse brain was minced in phosphate buffered saline (PBS) and digested by an enzyme solution which contained hyaluronidase and trypsin. Isolated cells were cultured in medium supplemented by epidermal growth factor (EGF) and basic fibroblast growth factor (bFGF). After seven days, primary neurospheres appeared in culture medium. After transfer to poly-L-ornithine coated dishes that contained culture medium supplemented with 1% fetal bovine serum (FBS), the primary neurospheres differentiated into neural-like and neuroglial-like cells. Differentiated cells were examined by morphological, immunocytochemical, and molecular evaluations.

Results: Our results showed that isolated cells from the pre-ventricular area of mouse adult brain proliferated in medium which contained EGF and bFGF, and expansion of the cells continued until passage 14 without losing morphological and neurogenesis capacity. Multiple passaging confirmed the stemness nature of the isolated cells. The isolated NSCs were able to differentiate into neural-like and neuroglial-like cells after transfer to poly-L-ornithine coated dishes that contained culture medium supplemented with 1% FBS. Molecular studies for NCAM, NCAM-L1, and N-Cadherin genes, as well as immunocytochemical analysis for NCAM-L1 and NCAM proved the differentiation. Our data also revealed, for the first time, gene expression profiling of Ninjurin-1 and Ninjurin-2, two novel cell adhesion molecules (CAMs), during the course of differentiation of neural stem cells.

Conclusion: The induction of neural differentiation in mouse NSCs initiates the expression of NCAM-L1, NCAM, and N-cadherin which can be the proof of complete neural differentiation. In addition, our results indicate that the expression of Ninjurin-1 increases after neural induction much like the expressions of NCAM-L1, NCAM, and N-cadherin. This data suggests the probable importance of Ninjurin-1 in both the morphology and function of neural cells. The data in this study also reveals that the expression of Ninjurin-2, in contrast with Ninjurin-1, initiates and continues until the differentiation termination point. This suggests that although Ninjurin-1 and Ninjurin-2 share conserved hydrophobic regions for their transmembrane domains, their roles in nerve cells are probably different.

Keywords: Differentiation, NCAM, N-cadherin, Ninjurin-1, Ninjurin-2

Yakhteh Medical Journal, Vol 11, No 4, Winter 2010, Pages: 390-399

بررسی پروفایل بیانی ژن‌های N-cadherin، NCAM، NCAM-L1، Ninjurin-1 و Ninjurin-2 در بن‌یاخته‌های عصبی مغز موش بالغ و سلول‌های حاصل از القای تمایز عصبی آنها

محمدرضا گلبار،^۱ M.Sc.، فردین فتحی،^{۲*} Ph.D.، سیدجواد مولی،^۱ Ph.D.، فریبرز سهیلی،^۱ M.Sc.، عباس احمدی،^۳ M.Sc.، اسماعیل ایزدپناه،^۳ M.Sc.

۱. دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم پایه، گروه ژنتیک، تهران، ایران
 ۲. دانشگاه علوم پزشکی کردستان، دانشکده پزشکی، گروه علوم تشریح، KDRC، سنندج، ایران
 ۳. دانشگاه علوم پزشکی کردستان، دانشکده پزشکی، سنندج، ایران

* آدرس نویسنده مسئول: ایران، سنندج، صندوق پستی: ۶۶۱۳۵-۷۵۶، دانشگاه علوم پزشکی کردستان، دانشکده پزشکی، گروه علوم تشریح، KDRC
 پست الکترونیک: Email: farfath@yahoo.com

دریافت مقاله: ۸۷/۵/۱۰، پذیرش مقاله: ۸۸/۲/۱۴

چکیده

* **هدف:** بررسی و مقایسه پروفایل بیانی ژن‌های Neural Cell Adhesion Molecule (NCAM)، Ninjurin-1 و Ninjurin-2 در بن‌یاخته‌های عصبی جداسازی شده از مغز موش و سلول‌های حاصل از القای تمایز عصبی آنها در طی روند تمایز در محیط کشت

* **مواد و روش‌ها:** ابتدا برای جداسازی بن‌یاخته‌های عصبی مغز موش، بخشی از لب پیشانی مغز موش‌های بالغ جداسازی و قطعه قطعه شد سپس از محلول‌های آنزیمی حاوی هیالورونیداز و تریپسین جهت هضم بافتی و خارج ساختن بن‌یاخته‌های عصبی استفاده و سلول‌های به دست آمده در محیط حاوی فاکتورهای رشد (Epidermal Growth Factor; EGF) و (Basic Fibroblast Growth Factor; bFGF) کشت داده شد. پس از حدود یک هفته، نوروسفرهای اولیه به صورت معلق در محیط کشت ظاهر شدند که پس از انتقال آنها به ظروف آغشته به پلی-ال-ارنیتین و کشت در محیط حاوی یک درصد سرم جنین گاوی به سلول‌های شبه‌عصبی تمایز پیدا کردند. سلول‌های تمایز یافته و نیافته تحت ارزیابی‌های مورفولوژیک، ایمونوسیتوشیمی و رونوئسی معکوس واکنش زنجیره‌ای پلیمرز قرار گرفتند.

* **یافته‌ها:** سلول‌های جداسازی شده از ناحیه دور بطنی شاخ قدامی مغز موش‌های بالغ در محیط کشت حاوی فاکتورهای رشد EGF و bFGF تکثیر و تا ۱۴ پاساژ سلولی کشت داده شدند. این سلول‌ها قادر بودند در ظروف آغشته به پلی-ال-ارنیتین و محیط کشت حاوی یک درصد سرم جنین گاوی به سلول‌های شبه‌عصبی تمایز پیدا کنند. بررسی‌های مولکولی ژن‌های NCAM، NCAM-L1 و N-cadherin صحت انجام این تمایز را نشان داد. بررسی‌های ایمونوسیتوشیمی برای ژن‌های NCAM-L1 و NCAM نیز تاییدی دیگر بر صحت انجام تمایز بود. بیان چهار ژن N-cadherin، NCAM، Ninjurin-1 و Ninjurin-2 با گذشت زمان بیشتر شد و در روز پنجم تا هفتم به حداکثر رسید. همچنین الگوی بیان ژن‌های Ninjurin-1 و Ninjurin-2 به عنوان دو عضو جدید از خانواده ملکول‌های چسبنده سلولی (Cell Adhesion Molecules; CAMs) در بن‌یاخته‌های عصبی و سلول‌های حاصل از القای تمایز عصبی آنها مشخص گردید.

* **نتیجه‌گیری:** القای تمایز بن‌یاخته‌های عصبی مغز موش باعث شروع بیان ژن‌های NCAM، NCAM-L1 و N-cadherin شده که می‌تواند دال بر تمایز عصبی و عملکردی سلول‌های مورد مطالعه باشد. همچنین نتایج این مطالعه نشان داد که بیان ژن Ninjurin-1 همانند سایر ژن‌های مورد مطالعه، با افزایش تمایز عصبی افزایش می‌یابد که این امر می‌تواند بیانگر اهمیت ژن مذکور در مورفولوژی و عملکرد سلول‌های عصبی باشد. این در صورتی است که ژن Ninjurin2 الگویی کاملاً متفاوت با ژن‌های قبلی داشته است. لذا هرچند ژن Ninjurin-2 به لحاظ ساختاری مشابه ژن Ninjurin-1 باشد تاثیر آن بر روی عملکرد سلول‌های عصبی با سایر ژن‌های مورد مطالعه متفاوت خواهد بود.

* **کلیدواژگان:** تمایز، مولکول‌های چسبنده سلولی عصبی، N-cadherin، Ninjurin-1، Ninjurin-2

فصلنامه پزشکی یاخته، سال یازدهم، شماره ۴، زمستان ۸۸، صفحات: ۳۹۹-۳۹۰

مقدمه

در حوزه کار بر روی بن‌یاخته‌های بالغ، یکی از مهم‌ترین نتایج به دست آمده شناسایی بن‌یاخته‌های عصبی در مغز موش بالغ بود (۲)، جداسازی و تعیین خصوصیات این سلول‌ها می‌تواند کاربردهای بالقوه‌ای در شناخت بهتر خصوصیات سلولی و ملکولی این بن‌یاخته‌ها و تکوین سیستم عصبی داشته باشد. علاوه بر این، بن‌یاخته‌های عصبی دارای ویژگی‌های برجسته و متمایزی نسبت به سایر بن‌یاخته‌های بالغ هستند که آنها را برای درمان سلولی و ملکولی بسیاری از بیماری‌های سیستم عصبی مرکزی توجه قرار داده است (۱۰-۴).

بن‌یاخته‌ها (Stem Cells) سلول‌هایی هستند که دارای دو ویژگی مهم توانایی تقسیم و خود بازسازی (Self-Renewal) می‌باشند. بن‌یاخته‌های بالغ (Adult Stem Cells) سلول‌های غیرتخصصی و غیرتمایزی هستند که در میان سلول‌های ویژه در بافت‌ها و ارگان‌های فرد بالغ یافت می‌شوند. به طور کامل در برخی از بافت‌های بالغ، مانند مغز استخوان و عضله مشخص شده است که بن‌یاخته‌ها مسؤول جایگزینی سلول‌های از دست رفته در هنگام بیماری، صدمه یا فرسودگی هستند (۱).

آنها با سه ژن NCAM، NCAM-L1 و N-cadherin در طی تمایز عصبی بن‌یاخته‌ها می‌تواند نشانگر میزان اهمیت آنها در مورفولوژی و عملکرد سلول‌های حاصل از تمایز باشد، بخشی از این مطالعه به بررسی و مقایسه پروفایل بیانی ژن‌های مذکور اختصاص یافت. به طور کلی هدف از انجام این مطالعه بهینه‌سازی شرایط لازم جهت جداسازی و کشت بن‌یاخته‌های عصبی از مغز موش بالغ، بررسی مورفولوژی و عملکرد عصبی سلول‌های حاصل از تمایز از نظر بیان مقایسه‌ای سه ژن NCAM، NCAM-L1 و N-cadherin در مقایسه با نمونه کنترل و نیز بررسی مقایسه‌ای پروفایل بیانی دو ژن Ninjurin-1 و Ninjurin-2 نسبت به سه ژن خانواده CAM در طی روند تمایز بن‌یاخته‌های عصبی بوده است.

مواد و روش‌ها

این طرح مصوبه کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی کردستان می‌باشد.

جداسازی بن‌یاخته‌های عصبی از مغز موش بالغ

ابتدا دیواره طرفی شاخ قدامی بطن‌های طرفی مغز موش C57 (موسسه پاستور ایران) به بافر Hank's Buffered Salt Solution (Sigma, USA) (HBSS) حاوی ۰/۷ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر هیالورونیک اسید (Sigma)، ۰/۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر کینورنیک اسید (Sigma)، ۱/۳۳ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر تریسین (Sigma) و گلوکز ۲ میلی‌مولار منتقل شده و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه انکوبه شد. سپس محصول هضم ایجاد شده به مدت ۵ دقیقه در ۲۰۰ برابر شتاب ثقل سانتریفیوژ شده و به HBSS حاوی سوکروز ۰/۹ مولار انتقال یافت. سپس سوسپانسیون سلولی به مدت ۱۰ دقیقه در ۷۵۰ برابر شتاب ثقل سانتریفیوژ شد. در مرحله بعد سلول‌ها در ۲ میلی‌لیتر محیط کشت حل شده و سپس به آرامی بر روی سطح ۱۰ میلی‌لیتر EBSS (Gibco, USA) حاوی BSA (Sigma) منتقل شدند. سلول‌ها در ۲۰۰ برابر شتاب ثقل به مدت ۷ دقیقه سانتریفیوژ و با استفاده از محیط کشت DMEM/F12 (Gibco) شستشو داده شدند. در نهایت سلول‌ها در محیط کشت مذکور که حاوی ۲۰ نانوگرم در میلی‌لیتر EGF (Sigma)، ۲۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر bFGF (Sigma)، B27 (Gibco) و ۲ میلی‌مولار گلوتامین (Sigma)، ۱۰۰ واحد بر میلی‌لیتر پنی‌سیلین (Gibco) و ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر استرپتومایسین (Gibco) بود، کشت داده شدند (۱۸، ۱۹). پس از یک هفته در اثر تکثیر بن‌یاخته‌ها، نوروسفرهای اولیه (بن‌یاخته‌های عصبی بعد از جداسازی در حضور فاکتورهای رشد EGF و bFGF به صورت توده‌های شناوری تکثیر می‌شوند که به آنها نوروسفر می‌گویند) در محیط کشت تشکیل شده که این نوروسفرها از طریق پاساژ متوالی تا پاساژ چهاردهم تکثیر یافتند.

القای تمایز بن‌یاخته‌های عصبی به سلول‌های عصبی و گلیال

به منظور القای تمایز بن‌یاخته‌های عصبی به سلول‌های عصبی و گلیال، از ظروف کشت سلولی پوشیده شده با پلی‌ال-ارنیتین (Sig-ma) و محیط کشت DMEM/F12 به همراه یک درصد سرم جنین گاوی استفاده شد (۱۰). ظروف کشت سلولی با پلی‌ال-ارنیتین به غلظت ۱۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر پوشانده و به مدت ۳ ساعت در زیر نور UV تیمار داده شد. نوروسفرهای تشکیل شده در پاساژ چهارم

سلول‌ها در بافت‌های مختلف بدن بدون تنظیم دقیق زمانی و مکانی بیان پروتئین‌های غشایی ویژه به نام مولکول‌های چسبنده سلولی (Cell Adhesion Molecules; CAMs) قادر به اتصال به یکدیگر نیستند. سه دسته مهم از CAMها یعنی

Neural Cell Adhesion Molecule (NCAM), Neural Cell Adhesion Molecule L1 (NCAM-L1)

و N-cadherin هم از جنبه مورفولوژیک و هم از نظر عملکردی در سلول‌های عصبی دارای اهمیت فراوانی می‌باشند. این سه پروتئین متداول‌ترین مولکول‌های اتصال سلول به سلول در مهره‌داران به شمار رفته و تا به حال نتایج مطالعات انجام شده نشان داده است که این سه ژن در انجام فرایندهای مهمی نظیر مهاجرت نورونی، خروج اکسون، میلینه شدن سلول‌های عصبی و همچنین تشکیل و بقای سیناپس در سیستم‌های عصبی محیطی و مرکزی نقش ویژه‌ای را ایفا می‌کنند (۱۵-۱۱). همچنین مشخص شده که آنتی‌بادی‌های مونوکلونال علیه NCAM و NCAM-L1 که به ناحیه هیپوکامپ موش صحرایی تزریق می‌گردند منجر به کاهش بازدهی مهارت‌های یادگیری در این موجودات می‌شوند (۱۴). از طرف دیگر موش‌های NCAM-L1 knockout نیز همین نقص‌ها را نشان می‌دهند (۱۲، ۱۳). در چندین مطالعه دیگر عدم تنظیم صحیح برخی از پروتئین‌های سیناپتیک به خصوص NCAM و ارتباط آنها با Schizophrenia نشان داده شده است (۱۱). همچنین گزارش شده است که فقدان عملکرد N-cadherin منجر به عدم حضور Filopodia-like برآمدگی‌های دندرتی می‌شود (۱۵). اضافه کردن آنتی‌بادی‌های مهار کننده عمل N-cadherin نیز منجر به ایجاد شکاف‌های سیناپتیک بسیار گسترده در قطعه Retinal-Tectal جوجه می‌شود (۱۵). نتایج این مطالعات بیانگر اهمیت ژن‌های مذکور در بروز عملکرد و مورفولوژی سلول‌های عصبی است. از این رو در این مطالعه جهت بررسی عملکرد و مورفولوژی سلول‌های حاصل از القای تمایز عصبی، میزان بیان این سه ژن در سلول‌های حاصل از تمایز در مقایسه با نمونه‌های کنترل مورد ارزیابی قرار گرفت.

در دو دهه اخیر دو پروتئین از خانواده CAMها به نام‌های Ninjurin-1 و Ninjurin-2 شناسایی شده است (۱۶، ۱۷). این دو پروتئین مشابه (Homolog) یکدیگر بوده و هر دو دارای خصوصیات اتصالال هوموفیلیک می‌باشند. قسمت آب‌گریز و عبور کننده از غشای (Transmembrane) این دو پروتئین مشابه بوده در حالی که در قسمت‌های متصل شونده، دارای شباهت نبوده و قدرت اتصال به یکدیگر را ندارند (۱۷). نشان داده شده است که Ninjurin-1 بعد از صدمه عصبی در نورون‌های Dorsal Root Ganglion (DRG) و سلول‌های شوان به صورت افزایشی بیان می‌شود (۱۶). همچنین نشان داده شده است که پروتئین Ninjurin-1 خروج اکسون از نورون‌های کشت داده شده DRG را تسریع می‌بخشد (۱۶). Ninjurin-2 در نورون‌های حسی بالغ به صورت مداوم و یکنواخت بیان می‌شود اما تا کنون بیان این ژن در نورون‌های گلیال گزارش نشده است. ژن Ninjurin-2 در سلول‌های شوان اطراف عصب صدمه دیده، افزایش بیان نشان می‌دهد. مشخص گردیده که این پروتئین نیز همچون Ninjurin-1 خروج اکسون از نورون‌های کشت داده شده DRG را تسریع می‌بخشد (۱۷). از آنجایی که تا به حال بیشتر مطالعات انجام شده بر روی این دو پروتئین، در زمینه ساختار سه بعدی آنها متمرکز گردیده و از طرف دیگر مقایسه بیان

به ظروف کشت سلولی پوشش داده شده با پلی-ال-ارنیتین به میزان حدود ۵۰ نورو سفیر در هر ظرف منتقل و در محیط کشت حاوی یک درصد سرم جنین گاوی به مدت ۱۰ روز کشت داده شدند.

ارزیابی‌های مورفولوژیک و ایمونوسیتوشیمی

در طول آزمایش از میکروسکوپ معکوس فلورسنت (Nikon-TE 300, Japan) جهت ارزیابی سلول‌ها استفاده شد. به منظور انجام ارزیابی‌های ایمونوسیتوشیمی، سلول‌های حاصل از تمایز در روز دهم، به مدت ۱۰ دقیقه در دمای اتاق با استفاده از متانول (Merck, Germany) ۲۰- درجه سانتی‌گراد یا پارافرمالدهید ۴ درصد ثابت شدند. از بافر مهارکننده (Phosphate Buffered Saline Tween-20; PBST) جهت نفوذپذیری سلول‌ها و مهار آنتی‌ژن‌های غیراختصاصی استفاده شد. بافر مذکور شامل بافر فسفات (Gibco) حاوی Triton X-100 ۰/۲ درصد و سرم یک درصد گونه‌ای از حیوان بوده که آنتی‌بادی ثانویه از آن تهیه شده بود. آنتی‌بادی‌های مونوکلونال اولیه NCAM-L1 (Santa Cruz [SC], USA; sc-31032) و NCAM (SC, sc-1507) هر کدام با رقت ۱/۱۰۰ در محلول PBST حاوی یک درصد سرم به مدت ۲ ساعت مورد استفاده قرار گرفتند. از آنتی‌بادی ثانویه donkey anti-goat IgG-FITC جهت اتصال به آنتی‌بادی‌های اولیه با رقت نهایی ۱/۵۰۰ به مدت یک ساعت در دمای اتاق استفاده شد (SC, sc-2024). پس از شست‌وشوی سلول‌ها با بافر فسفات، از محلول اتیدیوم برمایید با رقت نهایی ۰/۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر جهت رنگ آمیزی مخالف سلول‌ها استفاده شد (۲۰) و در نهایت سلول‌ها به کمک میکروسکوپ فلورسانت و فیلترهای FITC و Texaz Red مطالعه و عکس‌برداری شدند.

ارزیابی Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)

از RT-PCR جهت تایید بیان ژن‌های مورد مطالعه استفاده

شد. برای این منظور ابتدا با استفاده از محلول (Plus) RNase (RNase 1ml/10⁶ cells) کل از سلول‌ها استخراج شد و جهت اطمینان از عدم آلودگی با DNA ژنومیک، در معرض DNase I قرار گرفت. پس از اطمینان یافتن از کیفیت RNAهای استخراج شده با انجام الکتروفورز ژل آگارز و اسپکتروفوتومتری، جهت تهیه cdNA از پرایمر Oligo dT (MWG-Biotech, Germany) و واکنش RT (Bioneer, USA) استفاده شد. واکنش RT در حجم نهایی ۵۰ میکرولیتر انجام گرفت. پس از تهیه cdNA، واکنش PCR جهت تکثیر قطعه مورد نظر انجام شد. واکنش PCR در حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر انجام شد و جهت تهیه حجم مذکور علاوه بر DNA الگو (محصول واکنش RT) از کیت PCR، آب مقطر استریل و پرایمرهای بالا دست و پایین دست، طراحی شده توسط نرم افزار Genrunner (Version 3.02; Hastings Software Inc.) با مشخصات مورد اشاره در جدول ۱ استفاده شد. پس از آماده ساختن حجم مورد نظر جهت انجام واکنش، واکنش PCR با شرایط تقلیب (Denaturation) ۴۵ ثانیه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد، پیوند زنی (Annealing) ۴۵ ثانیه در دمای ۶۳-۵۹ درجه سانتی‌گراد (بر اساس نوع پرایمر) و توسعه (Extention) یک دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد انجام گرفت. تعداد ۳۵ دور و یک دور توسعه به مدت پنج دقیقه در ۷۲ درجه سانتی‌گراد برای تمامی PCRها به عنوان تمام واکنش در نظر گرفته شد. جهت انجام هر دو واکنش RT و PCR از دستگاه ماستر سایکلر (Eppendorf, Germany) استفاده شد. ژن β 2M Mouse Beta-2microglobulin (β2M) به عنوان یک ژن House Keeping، جهت کنترل داخلی مورد استفاده قرار گرفت.

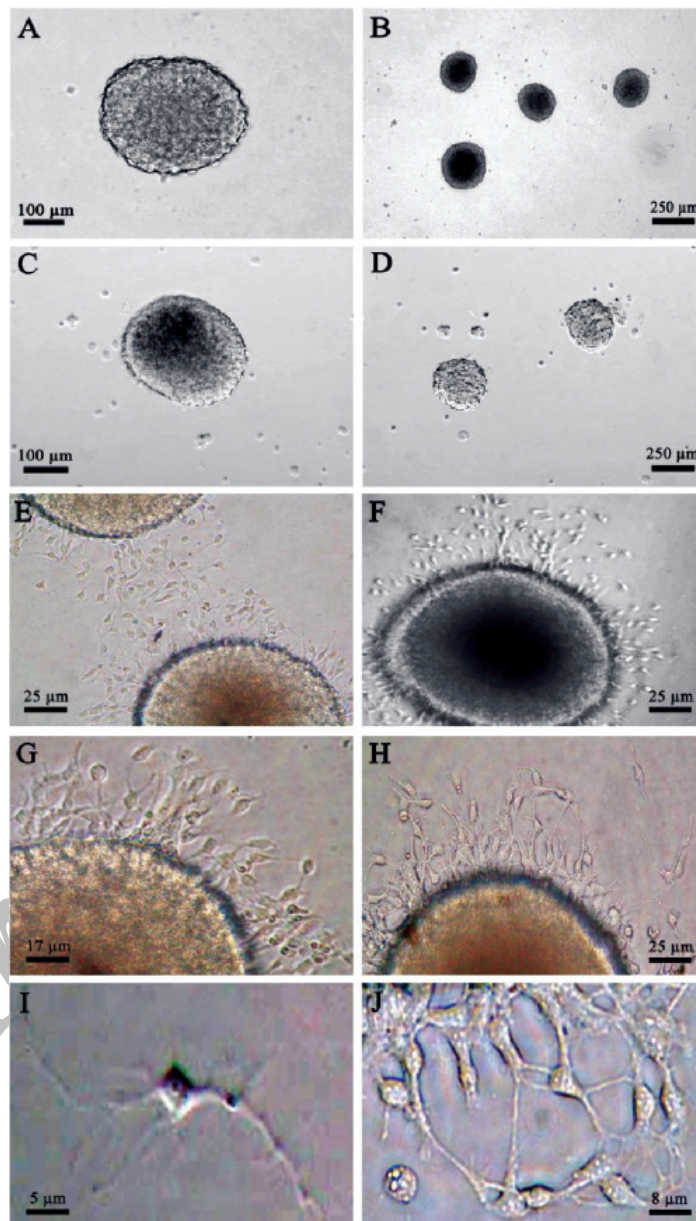
بعد از اتمام واکنش ۸ میکرولیتر از محصول واکنش PCR در حضور DNA مارکر نزدبانی توسط الکتروفورز ژل آگارز یک درصد جدا و با اتیدیوم پروماید قابل رویت شد و در نهایت با دستگاه ترانس لومیناتور UV (UviDoc, UK) مورد ارزیابی قرار گرفت.

جدول ۱: اسامی ژن‌ها و توالی‌های مربوط به پرایمرهای بالا دست (F) و پایین دست (R) مورد مطالعه در روش RT-PCR

نام ژن	کد بانک ژن (GenBank Code)	اندازه (bp)	دمای پیوندزنی (C°)	توالی پرایمر
NCAM-L1	NM-008478	۴۱۸	۵۹	F: 5'-TGTCATCACGGAACAGTCTC-3'
				R: 5'-CTTGCTGTTTCATCCAGTAGATC-3'
N-cadherin	NM-007664	۶۶۴	۶۱	F: 5'-TGTCCTTACTGTTGCTGCAG-3'
				R: 5'-GGGAACCTTCATAGATACCAGC-3'
NCAM	NM-010875	۶۷۹	۶۳	F: 5'-AACACAAAGGCCGAGATGTC-3'
				R: 5'-TACTGGATGCTCTTCAGGGTC-3'
Ninjurin-1	NM-013610	۶۵۶	۶۲	F: 5'-GAGAGCATGCTGGACATCG-3'
				R: 5'-TCCTTCTGGAATGTCTGAG-3'
Ninjurin-2	NM-016718	۶۵۳	۶۳	F: 5'-CAGACCGAGAAACCATCCAC-3'
				R: 5'-AGACCGAGTTACTGCTTGCTG-3'
Mouse β2M	NM-009735	۳۱۶	۶۳	F: 5'-TGACCGGCCTGTATGCTATC-3'
				R: 5'-CACATGTCTCGATCCCAGTAG-3'

باند‌های مربوط به هر یک از نمونه‌ها با استفاده از نرم‌افزار (V2.6, Kapelan, Germany) LabImage Software دانسیتمتری و آنالیز شد. مقدار به دست آمده برای هر ژن نسبت به ژن $\beta 2M$ به عنوان ژن House Keeping و با فرض بیان ثابت، جهت نرمالیزاسیون مقادیر به دست آمده محاسبه گردید و میانگین دوره‌های ۱۸، ۲۰ و ۲۲ گزارش شد.

جهت سنجش نیمه کمی بیان ژن‌های مورد نظر، از دوره‌های ۱۸، ۲۰ و ۲۲ در هر واکنش زنجیره‌ای پلیمراز میزان مشخصی از محصول جداسازی شده تا واکنش‌ها از لحاظ کینتیکی قبل از فاز اشباع و در فاز نمایی باشند. پس از اینکه باند‌های محصولات توسط سیستم عکس‌برداری UviDoc ارزیابی شدند و تصاویر به کامپیوتر منتقل گردید،



شکل ۱: مورفولوژی نوروسفرهای تولید شده از بن‌یاخته‌های جداسازی شده از مغز موش بالغ و سلول‌های حاصل از القای تمایز عصبی آنها. A-B. تصاویر میکروسکوپ نوری از مورفولوژی نوروسفرهای اولیه در شرایط آزمایشگاهی. این توده‌های سلولی بعد از گذشت ۷ روز در محیط کشت مخصوص بن‌یاخته‌های عصبی و فاکتورهای رشد EGF و bFGF شکل گرفتند. A. نوروسفر اولیه حاصل از تکثیر بن‌یاخته‌های جداسازی شده و کشت آنها به مدت ۷ روز. B. نمایی از نوروسفرهای اولیه تشکیل در محیط کشت. C-D. نمایی از نوروسفرهای ثانویه تشکیل شده. نوروسفرهای اولیه پس از تشکیل در معرض اولین پاساژ قرار گرفتند. با تقسیم نوروسفرهای اولیه به سلول‌های منفرد و کشت در مجاورت فاکتورهای رشد مشابه، بعد از حدود یک هفته نوروسفرهای ثانویه پدید آمدند. E-F. نوروسفرها دو روز بعد از القای تمایز عصبی. به سلول‌های شبه عصبی در حاشیه نوروسفرها توجه کنید. G-H. بعد از گذشت چهار روز از القای تمایز عصبی اجسام سلولی و زواید شبه اکسونی آنها کاملاً مشخص می‌شوند. I-J. روز هفتم بعد از القای تمایز عصبی. در تصویر I زواید شبه عصبی یک سلول تمایز یافته به وضوح مشخص است. در تصویر J به اتصالات سلولی توجه کنید. نوروسفرهای استفاده شده در تمایز همگی در مرحله پاساژ چهارم بودند.

از سه تکرار مستقل آزمایش‌های سلولی، نمونه‌ها ارزیابی شده و با بررسی آماری مقادیر بیان ژن‌ها برای نمونه‌های مختلف با هم مقایسه شدند.

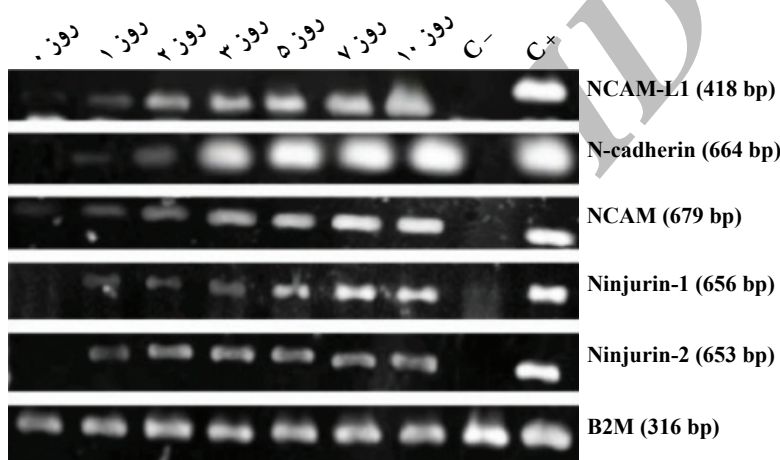
روش آماری

نتایج به دست آمده با نرم‌افزار SPSS 14 و استفاده از تست آماری آنالیز واریانس یک طرفه در سطح $p \leq 0.05$ به عنوان سطح معنی دار بررسی شد. همچنین داده‌های کمی به صورت میانگین \pm انحراف معیار گزارش گردید.

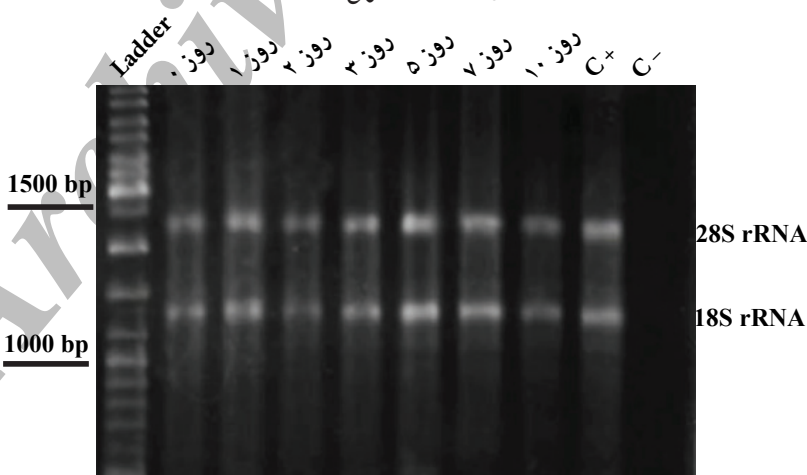
یافته‌ها

نتایج به دست آمده نشان داد که بن‌یاخته‌های جداسازی شده در محیط فاقد سرم و حاوی فاکتور رشد EGF و bFGF به صورت معلق رشد کرده و پس از گذشت حدود یک هفته، نوروسفرهای اولیه تشکیل می‌دهند (شکل A, B). بعد از پاساژ این سلول‌ها، نوروسفرهای ثانویه (شکل C, D) تشکیل شدند و این کار تا پاساژ ۱۴ ادامه پیدا کرد. ماهیت بنیادی بن‌یاخته‌های جداسازی شده از طریق بررسی بیان چند ژن خودبازسازی و نیز ژن نستین تایید گردید (۲۱).

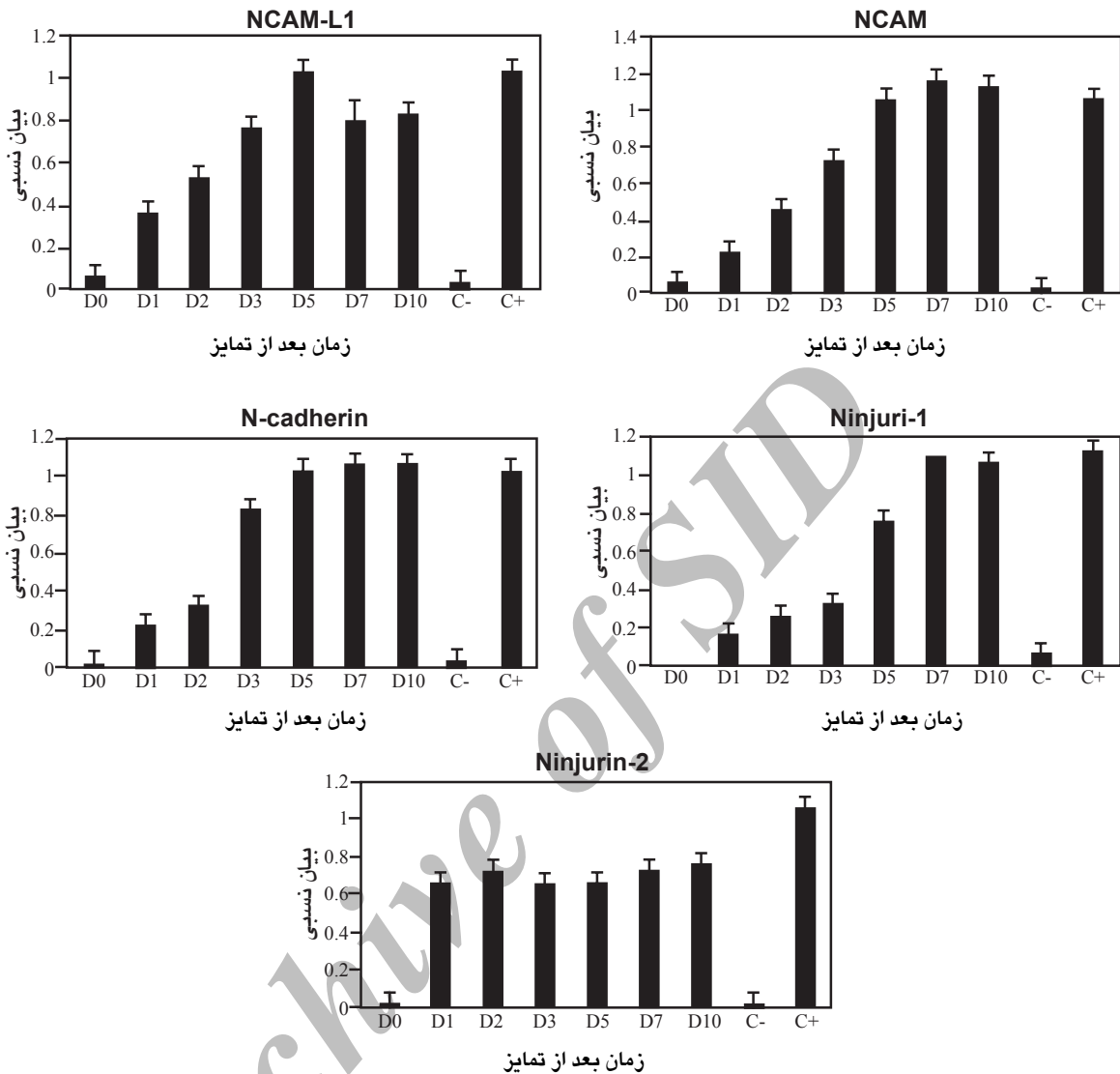
زمان‌های بعد از تمایز



کل RNA استخراج شده



شکل ۲: بررسی مقایسه‌ای الگوی بیان ژن‌های NCAM، NCAM-L1، N-cadherin، Ninjurin-1، Ninjurin-2 در بن‌یاخته‌های عصبی و سلول‌های حاصل از القای تمایز عصبی آنها. تصویر بالا مربوط به نتایج حاصل از واکنش پلیمران زنجیره‌ای است. RNA کل از بن‌یاخته‌های عصبی و سلول‌های حاصل از القای تمایز عصبی آنها در زمان‌های نشان داده شده بعد از القای تمایز عصبی در معرض واکنش رونویسی معکوس و پلیمران زنجیره‌ای قرار گرفتند. مدت زمان تمایز بن‌یاخته‌های عصبی ده روز در نظر گرفته شد. روز صفر مربوط به بن‌یاخته‌ها قبل از القای تمایز عصبی است. کنترل مثبت RNA استخراج شده از مغز موش بالغ و کنترل منفی نمونه حاوی RNA بن‌یاخته‌های جنینی تمایز نیافته CCE در نظر گرفته شد. تصویر پایین مربوط به بررسی نمونه‌های RNA استخراج شده بر روی ژل آگارز می‌باشد. همان طور که مشخص است باندهای 28S و 18S واضح بوده و نمونه‌ها از اسمیر کمی برخوردارند که نشان دهنده سالم بودن نمونه‌های RNA می‌باشد. کنترل مثبت مانند شکل بالا و کنترل منفی نمونه حاوی آب تیمار شده با DEPC است.

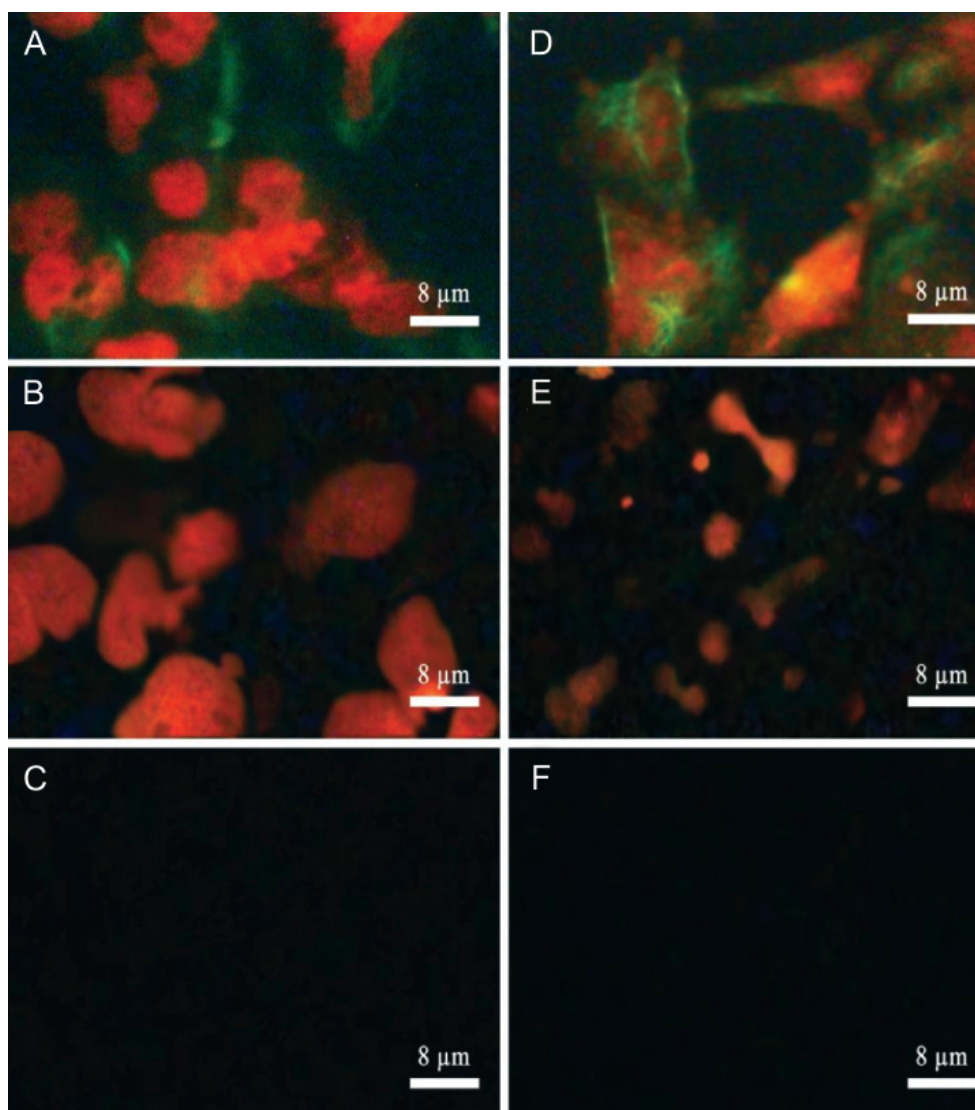


شکل ۳: هیستوگرام‌های مقایسه‌ای بیان ژن‌های NCAM-L1، NCAM، N-cadherin، Ninjurin-1 و Ninjurin-2 نسبت به ژن $\beta 2M$ در بن‌یاخته‌های عصبی و سلول‌های حاصل از القای تمایز عصبی آنها. هر آزمایش سه مرتبه تکرار گردید و کمیت شدت نور هر باند توسط نرم‌افزار LabImage اندازه‌گیری شد. میزان بیان هر ژن در هر یک از زمان‌های نشان داده شده به صورت نسبت بیان ژن مورد نظر به ژن $\beta 2M$ نرمال گردید. هر آزمایش نشان دهنده میانگین نسبت بیان ژن مورد نظر به ژن کنترل داخلی در دوره‌های ۱۸، ۲۰ و ۲۲ است. نتایج به صورت میانگین \pm انحراف معیار و $p < 0.05$ نشان داده شده است.

بیان هر پنج ژن پس از گذشت یک روز از القای تمایز عصبی به صورت معنی‌دار ($p < 0.05$) قابل تشخیص بود. بیان سه ژن NCAM، NCAM-L1 و N-cadherin با گذشت زمان بیشتر شد و در روز پنجم تا هفتم به حداکثر رسید. Ninjurin-1 همچون سه ژن NCAM، NCAM-L1 و N-cadherin با گذشت زمان افزایش بیان را نشان داد. Ninjurin-2 الگوی بیانی متفاوتی داشت و به صورت معنی‌دار ($p < 0.05$) نسبت به چهار ژن دیگر از روز اول به صورت ثابت بیان شد. از آنجا که تفاوت قابل درکی در بیان ژن‌ها بین روز ۷ و روز ۱۰ بعد از القای تمایز عصبی شناسایی نشد ($p < 0.05$)، روز ۷ پایانی تمایز انتخاب شد.

یک روز بعد از انتقال بن‌یاخته‌های عصبی به ظروف کشت آغشته به پلی-ال-ارنیتین، به منظور القای تمایز عصبی آنها، سلول‌ها شروع به چسبیدن به کف ظرف نموده و به تدریج به سلول‌های شبه عصبی تمایز پیدا کردند و تا پایان آزمایش بر تعداد و تراکم سلول‌های مذکور افزوده شد (شکل J-E ۱).

همچنین بررسی‌های RT-PCR نحوه بیان ژن‌های Ninjurin-1، N-cadherin، NCAM، NCAM-L1 و Ninjurin-2 را در حضور بیان ژن $\beta 2M$ به عنوان کنترل داخلی در بن‌یاخته‌های عصبی و سلول‌های شبه عصبی حاصل از تمایز آنها نشان داد (شکل‌های ۲، ۳).



شکل ۴: بررسی ایمونوسیتوشیمی ژن‌های NCAM-L1 و NCAM در سطح سلول‌های حاصل از القای تمایز عصبی در بن‌یاخته‌های مغز موش. در قسمت‌های A و D نور سبز به ترتیب نشان دهنده مثبت بودن نتیجه واکنش ایمونوفلورسینس در مورد آنتی‌ژن‌های NCAM-L1 و NCAM است. قسمت‌های B و E به عنوان کنترل منفی و فاقد آنتی‌بادی‌های اولیه بوده و تنها رنگ هسته سلول‌ها را که با اتیدیوم برمایید تیمار شده‌اند نشان می‌دهند. تصاویر F و C مربوط به نمونه‌های کنترل منفی فاقد آنتی‌بادی‌های اولیه و محلول اتیدیوم برمایید می‌باشند.

و اولیگودندروسیت‌ها) را دارا می‌باشند (۲۲، ۲۳). تعیین ویژگی‌های سلولی و مولکولی این سلول‌ها در هر دو حالت *In vivo* و *In vitro*، چه از نظر زیست‌شناسی بن‌یاخته‌ها و چه از نظر کاربردهای پزشکی دارای اهمیت زیادی است. رینولدز و همکارانش (۳) برای اولین بار احتمال حضور بن‌یاخته‌های عصبی را در بطن‌های طرفی مغز اعلام کردند. از آن به بعد گروه‌های زیادی در جهت تایید این موضوع اقدام کردند و نتایج مشابهی را گزارش کردند (۱۹). نتایج مطالعه ما نیز نشان داد که این ناحیه حاوی سلول‌هایی با توانایی ایجاد نوروسفر بوده است. لذا این موضوع که ناحیه دیواره طرفی شاخ‌های قدامی می‌تواند حاوی بن‌یاخته‌های عصبی باشد، مورد تایید قرار گرفت. نتایج حاصل از القای تمایز عصبی در بن‌یاخته‌های جدا شده از

در جهت تایید القای تمایز عصبی در بن‌یاخته‌های مغز، بیان ژن‌های NCAM-L1 و NCAM در سطح سلول‌های حاصل از تمایز توسط تکنیک ایمونوسیتوشیمی مورد ارزیابی قرار گرفت که نتایج ارزیابی انجام شده در مقایسه با نمونه کنترل، مثبت بوده است (شکل ۴).

بحث

بن‌یاخته‌های عصبی به عنوان سلول‌هایی تعریف می‌شوند که قادر به تقسیم متقارن و نامتقارن بوده و توانایی تبدیل به سه نوع سلول اصلی موجود در سیستم عصبی مرکزی (Central Nervous System; CNS) (نورون‌ها، آستروسیت‌ها

Ninjurin-2 نسبت به ژن Ninjurin-1 از جهت میزان تغییر بیان، الگوی بیانی متفاوتی از خود نشان داده است. این ژن در روز اول شروع به بیان کرد و بیان آن تا روز دهم ثابت باقی ماند. این نتیجه بیانگر آن است که این دو ژن ممکن است از نظر عملکردی متفاوت باشند، هرچند محصول پروتئینی آنها از نظر ساختار سه بعدی قسمت عبور کننده از غشای پلاسمایی (Transmembrane)، تا حد زیادی مشابه می‌باشد (۱۶، ۱۷). گزارشی مبنی بر نحوه بیان این دو ژن در طی روند تمایز بن‌یاخته‌های عصبی و حتی غیر عصبی یافت نشد. از آنجایی که این دو ژن بیشتر در بافت‌های عصبی محیطی مطالعه شده‌اند و بیشتر مطالعات بر روی ساختار پروتئین‌های حاصل از بیان آنها صورت گرفته است (۱۶، ۱۷)، نتایج حاصل از این پژوهش می‌تواند شروع مناسبی جهت مطالعه بر روی نقش این دو ژن نسبت به اعضای دیگر خانواده CAMها در چگونگی مورفولوژی و عملکرد سلول‌های عصبی باشد.

نتیجه‌گیری

دیواره طرفی شاخ قدامی بطن‌های طرفی مغز موش بالغ شامل نوعی بن‌یاخته است که در آزمایشگاه قابلیت تولید نوروسفر و سلول‌های شبه عصبی را دارد. سلول‌های شبه عصبی تمایز یافته از این بن‌یاخته‌ها قادر به بیان سه ژن NCAM، NCAM-L1 و N-cadherin به عنوان نشانه‌ای از صحت تشکیل سیناپس عصبی می‌باشند. ژن Ninjurin-1 ممکن است از نظر تاثیر آن در مورفولوژی و عملکرد سلول‌های عصبی مشابه سه ژن قبلی باشد اما ژن Ninjurin-2 هرچند به لحاظ ساختاری متشابه ژن Ninjurin-1 است اما به احتمال زیاد تاثیر آن بر روی عملکرد سلول‌های عصبی با سایر ژن‌های مورد مطالعه متفاوت است. تعیین خصوصیات بیشتر مورفولوژیکی و عملکردی سلول‌های حاصل از القای تمایز عصبی بن‌یاخته‌های جداسازی شده می‌تواند نوید بخش کاربردهای درمانی این بن‌یاخته‌ها در آینده باشد. همچنین تعیین سایر خصوصیات ژن‌های Ninjurin-1 و Ninjurin-2 می‌تواند به مشخص شدن نقش آنها در سیستم عصبی بیشتر کمک کند.

تقدیر و تشکر

هزینه انجام این مطالعه توسط دانشگاه علوم پزشکی کردستان و دانشگاه تربیت مدرس تامین شده است که بدین وسیله قدردانی می‌شود.

References

1. Clarke DL, Johansson CB, Wilbertz J, Veress B, Nilsson E, Karlström H, et al. Generalized potential of adult neural stem cells. *Science*. 2000; 288: 1660-1663.
2. Reynolds BA, Tetzlaff W, Weiss S. A multipotent EGF-responsive striatal embryonic progenitor cell produces neurons and astrocytes. *J Neurosci*. 1992; 12: 4565-4574.
3. Reynolds BA, Weiss S. Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system. *Science*. 1992; 255: 1707-1010.
4. Benedetti S, Pirola B, Pollo B, Magrassi L, Bruzzone MG, Rigamonti D, et al. Gene therapy of experimental brain tumors using neural progenitor cells. *Nat Med*. 2000; 6: 447-450.
5. Bjornson CR, Rietze RL, Reynolds BA, Magli MC, Vescovi AL. Turning brain into blood: a hematopoietic

بطن‌های طرفی مغز نشانه‌ای از خاصیت چند ظرفیتی این بن‌یاخته‌ها بود. هنگامی که این سلول‌ها در شرایط القای تمایز عصبی قرار گرفتند، با گذشت اولین روز، سلول‌های شبه نورونی و شبه گلیالی تولید کردند. این نتایج این موضوع را تایید کرد که بن‌یاخته‌های عصبی از بن‌یاخته‌های ویژه بافتی هستند که در شرایط ویژه سیستم عصبی سلول‌های این سیستم را ایجاد می‌کنند. مولکول‌های چسبنده سلولی نقش بسیاری در بقا و ترمیم سیستم عصبی مرکزی و محیطی ایفا می‌کنند (۱۳). مطالعه ما نشان داد که طی فرایند تمایز بن‌یاخته‌های عصبی، بیان سه ژن NCAM، NCAM-L1، N-cadherin از خانواده ملکول‌های چسبنده سلولی و موثر در مورفولوژی و عملکرد سلول‌های عصبی، در مقایسه با نمونه کنترل افزایش می‌یابد. در تکمیل نتایج به دست آمده از مطالعات قبلی، بیان این سه ژن در سلول‌های حاصل از القای تمایز عصبی می‌تواند حاکی از شکل‌گیری صحیح سیناپس سلولی باشد (۱۱-۱۵). مطالعات نشان می‌دهد که به منظور عملکرد کامل سیناپس، بیان Protocadherin، SynCAM، و Integrinها نیز لازم است که البته بیان آنها در این مطالعه بررسی نگردید (۱۱). بعد از القای تمایز عصبی، بیان دو ژن NCAM و NCAM-L1 افزایش قابل ملاحظه‌ای پیدا کرد به طوری که در روز هفتم به حداکثر مقدار خود رسید. بیان N-cadherin در روز اول به صورت ضعیف آغاز شد و در روز پنجم به حداکثر میزان خود رسید. با مروری بر مطالعات انجام شده تا کنون، گزارشی مبنی بر چگونگی تغییر بیان این سه ژن در طی روند تمایز بن‌یاخته‌های عصبی جهت مقایسه یافت نشد.

مطالعات گذشته نشان داده است که زمان لازم برای تمایز کامل عصبی بن‌یاخته‌های جداسازی شده از بطن‌های طرفی مغز بر اساس نوع فاکتورهای رشد مورد استفاده متغیر است (۲۴). نتایج ما نشان داد که بیان سه ژن مذکور بین روزهای ۷ تا ۱۰ بعد از القای تمایز عصبی، تغییر نمی‌کند. این نتیجه می‌تواند بیانگر پایان روند تمایز در روز هفتم باشد.

ژن Ninjurin1 از الگوی بیانی ژن‌های NCAM-L1، N-cadherin و NCAM تبعیت کرد به طوری که بیان آن در روز اول آغاز شد و در روز هفتم به حداکثر رسید، هرچند که بیان آن در روز سوم از سه ژن قبل کمتر بود. این یافته می‌تواند بیانگر اهمیت این ژن، همانند ژن‌های N-cadherin، NCAM-L1 و NCAM در مورفولوژی و عملکرد سلول‌های عصبی باشد. از طرف دیگر، در زمان‌های مورد بررسی ژن

fate adopted by adult neural stem cells in vivo. *Science*. 1999; 283: 534-537.

6. Lim DA, Flames N, Collado L, Herrera DG. Investigating the use of primary adult subventricular zone neural precursor cells for neuronal replacement therapies. *Brain Res Bull*. 2002; 57: 759-764.
7. Lois C, Alvarez-Buylla A. Long-distance neuronal migration in the adult mammalian brain. *Science*. 1994; 264: 1145-1148.
8. Pluchino S, Zanotti L, Deleidi M, Martino G. Neural stem cells and their use as therapeutic tool in neurological disorders. *Brain Res Brain Res Rev*. 2005; 48: 211-219.
9. Raff MC, Miller RH, Noble M. A glial progenitor cell that develops in vitro into an astrocyte or an oligodendrocyte depending on culture medium. *Nature*. 1983; 303: 390-396.
10. Sohur US, Emsley JG, Mitchell BD, Macklis JD.

- Adult neurogenesis and cellular brain repair with neural progenitors, precursors and stem cells. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2006; 361: 1477-1497.
11. Gerrow K, El-Husseini A. Cell adhesion molecules at the synapse. *Front Biosci.* 2006; 11:2400-2419.
 12. Kamiguchi H, Hlavin ML, Lemmon V. Role of L1 in neural development: what the knockouts tell us. *Mol Cell Neurosci.* 1998; 12: 48-55.
 13. Plappert CF, Schachner M, Pilz PKD. Neural cell adhesion molecule-null mice are not deficient in prepulse inhibition of the startle response. *Neuro Report.* 2005; 16:1009-1012.
 14. Arami S, Jucker M, Schachner M, Welzl H. The effect of continuous intraventricular infusion of L1 and NCAM antibodies on spatial learning in rats. *Behav Brain Res.* 1996; 81: 81-87.
 15. Togashi H, Abe K, Mizoguchi A, Takaoka K, Chisaka O, Takeichi M. Cadherin regulates dendritic spine morphogenesis. *Neuron.* 2002; 35: 77-89.
 16. Araki T, Zimonjic DB, Popescu NC, Milbrandt J. Mechanism of homophilic binding mediated by ninjurin, a novel widely expressed adhesion molecule. *J Biol Chem.* 1997; 272: 21373-21380.
 17. Araki T, Milbrandt J. Ninjurin2, a novel homophilic adhesion molecule, is expressed in mature sensory and enteric neurons and promotes neurite outgrowth. *J Neurosci.* 2000; 20:187-195.
 18. Gage FH, Ray J, Fisher LJ. Isolation, characterization, and use of stem cells from the CNS. *Annu Rev Neurosci.* 1995; 18: 159-192.
 19. Johansson CB, Momma S, Clarke DL, Risling M, Lendahl U, Frisén J. Identification of a neural stem cell in the adult mammalian central nervous system. *Cell.* 1999; 96: 25-34.
 20. Guda K, Natale L, Markowitz S D. An improved method for staining cell colonies in clonogenic assays, *Cytotechnology.* 2007; 54: 85-88.
 21. Fathi F, Jafari Kermani A, Golbar MR, Izadpanah E, Golmohammadi MGH, Mowla SJ, et al. Isolation, Induction of Neural and Glial Differentiation and Evaluating the Expression of Five Self Renewal Genes in Adult Mouse Neural Stem Cells. *Journal of Iranian Anatomical Sciences.* 2007; Vol. 5 (19): 81-92.
 22. Cai J, Limke TL, Ginis I, Rao MS. Identifying and tracking neural stem cells. *Blood Cells Mol Dis.* 2003; 31: 18-27.
 23. Laywell ED, Rakic P, Kukekov VG, Holland EC, Steindler DA. Identification of a multipotent astrocytic stem cell in the immature and adult mouse brain. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2000; 97: 13883-13888.
 24. Kageyama R, Ohtsuka T, Hatakeyama J, Ohsawa R. Roles of bHLH genes in neural stem cell differentiation. *Exp Cell Res.* 2005; 306: 343-348.