تهیه کشت خالص آستروسیت نوع I, II از کورتکس موش صحرایی نوزاد بدون استفاده ازآنزیم و فاکتورهای رشد وچسبندگی

معصومه فیروزی[۱] ، فرزانه صابونی[۲]،پوریا مشیدی[۱]، لیلا زنجانی[۱]،محمد حسین نبیان[۱]

[۱]دانشگاه تهران، مرکز تحقیقات بیوشیمی بیوفیزیک، آزمایشگاه ترمیم بافت

[۲]تهران ، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک وزیست فناوری

تاریخ دریافت: ۸٤/۱۲/۱۹ تاریخ پذیرش: ۸۵/۰٤/۱۲

چکیده

بیشتر مطالعات in vitro در سیستم عصبی مرکزی روی کشت خالص آستروسیتها انجام می گیرد . در این مطالعه با استفاده از مغز موش صحرائی نوزاد کشت خالص سلولهای آستروسیت نوع I و II بر اساس روش پایه McCarthy & Vellis (1980) و با تغییراتی در جهت ساده شدن آن انجام شد. جداسازی سلولهای کورتکس مغز بصورت مکانیکی و بدون استفاده از آنزیم، انجام و سلولهای منفک شده در محیط کشت 10% FCS+DMEM بدون استفاده از فاکتورهای رشد وچسبندگی کشت داده شد. از کشت مخلوط کورتکس، آستروسیتهای نوع I و II با خلوص بالا بدست آمد. خلوص بالای آستروسیتها توسط آنتی بادی علیه GFAP مارکر اختصاصی محسوب شده برای آستروسیتها محسوب می شود ، تأیید گردید. از کشت خالص آستروسیتها می توان برای انجام آزمایشهای مختلف بیوشیمیایی، ژنتیک ملکولی، فیزیولوژی، فارماکولوژی و الکتروفیزیولوژی در سیستم عصبی مرکزی استفاده نمود.

واژه های کلیدی: کشت سلول، جدا سازی، خالص سازی، آستروسیت نوع I ، آستروسیت نوع O_2A، II ، کورتکس

مقدمه

آستروسیتها عمده ترین گروه سلولهای گلیال محسوب می شوند که بیش از ۵۰ درصد سلولهای سیستم عصبی مرکزی (CNS) را تشکیل می دهند. آستروسیتها نقش کلیدی در عملکرد وتکوین CNS دارند و با ترشح فاکتورهای مختلف رشد نقش تعیین کننده در فیزیولوژی طبیعی یا بیمارگونه نورونها در CNS بازی می کنند. این سلولها محیط یونی مناسبی در اطراف نورونها ایجاد کرده و با تنظیم یون پتاسیم و گلوتامات خارج نورونی سبب عملکرد صحیح آنها می شوند. آستروسیتها منشأ نورواپیتلیالی داشته و دارای انشعابات زیاد، ستاره ای شکل، برای ارتباط با سایر آستروسیتها، نورونها و همچنین سلولهای اندوتلیال رگهای خونی می باشند (۵، ۱۰ و۱۵).

آستروسیتها چه مستقیم و چه غیر مستقیم در پاتوفیزیولوژی بیماریهای مختلف ناشی از صدمات (trauma) و بیماریهای مختلف تحلیل رونده عصبی (neurodegenerative) نقش دارند. بهمین دلیل شناخت آنها در *in vitro* بعنوان سلولهای مؤثر در صدمات نورونی حائز اهمیت است.

تمایزسلولهای پیش ساز O_2A-: "oligodendrocyte-type II astrocyte که پیش ساز مشترک آستروسیت نوع II و الیگودندروسیت است، بستگی به محیط کشت دارد. میزان بالای سرم در محیط کشت باعث تمایزسلولهای O_2A به آستروسیت نوع II می شود. در حالیکه اگر محیط کشت دارای سرم کم ویا فاقد سرم باشد، سلولهای O_2A-

Archive of SID
www.SID.ir

به الیگودندروسیت تمایز می یابند (۱۶). در مغز اکثر سلولهای آستروسیت، آستروسیت نوع I هستند.

بررسی آستروسیت نوع II بدلیل تکثیر کم آن و در نتیجه برداشت کم مشکل می باشد. رنگ آمیزی آستروسیت نوع II با آنتی بادی علیه NSP-4 نشان می دهد که بیشتر این سلولها در محل گره رانویه با نورون ارتباط دارند. در حالیکه آستروسیتهای نوع I در محل گره رانویه وجود ندارند (۳). A_2B_5 و GFAP هر دو در آستروسیت نوع II بیان می شود، در حالیکه آستروسیت نوع I فقط GFAP را بیان می کند (۱۰و۱٤). یانگ در سال ۲۰۰۳ نشان داد که ۹۵ درصد از سلولهای آستروسیت، $GFAP^+$ هستند (۱۹).

بیان GFAP در صدمات مختلف مغز افزایش می یابد. در بیماری Alexander نشان داده شده است که در سیتوپلاسم آستروسیتها ، انکلوزیونهای غیر طبیعی ازGFAP بصورت مجتمع دیده می شود، با بررسی این پروتئین اختصاصی در آستروسیتها می توان بوجود شرائط غیرطبیعی در مغز پی برد (۲). اخیراً برای آستروسیتها نقش پروژنیتوری وهمچنین عملکرد سلولهای پایه را نیز قائل شده اند (۹). محققین برای جداسازی سلولها از دو روش آنزیمی و یا مکانیکی استفاده می کنند. روش مکانیکی نیز ممکن است به دو صورت انجام گیرد، یاجداسازی مکانیکی برحسب اندازه سلولی با استفاده ازغشاء های نافذ صورت می گیرد. و یا جداسازی بر حسب خاصیت چسبندگی متفاوت سلولها انجام می پذیرد (۸ و۱۱) و یا از تلفیق دو روش برای جداسازی سلولی استفاده می شود (۱۳).

در این تحقیق جهت تهیه کشت خالص آستروسیتها از نوزاد موش صحرایی استفاده، و جداسازی سلولها از طریق مکانیکی و در ظروف کشت بدون کف چسبنده انجام شد.

مواد و روشها

جهت تهیه کشت خالص آستروسیت از کورتکس موش صحرایی، با تلفیق چند روش که مبنای آن روش McCarthy & Vellis است (۱۳) استفاده شد. نوزاد موش صحرایی یک تا دو روزه با اتر بیهوش و سپس با الکل ضدعفونی گردید؛ و در زیر هود استریل، مغز به داخل پتری حاوی بافر هنکس منتقل گردید. مخچه، هیپوکامپ و سایر بخشهای مغزاز کورتکس جدا شد ودر نهایت با استفاده از استرئومیکروسکوپ پرده مننژ بدقت از کورتکس جدا گردید. بافت کورتکس بطور مکانیکی توسط سر سمپلر زرد رنگ (حداکثر درصد ۱۰۰ میکرولیتر) و عمل پیپتاژ در پلیت حاوی محیط کشت DMEM و بدون استفاده از آنزیم بصورت تک سلول درآمد .

محیط کشت حاوی سلول به فلاسک منتقل شد و در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی گراد ، ۹۵ درصد هوا، ۵ درصد CO_2 و رطوبت ۹۰ درصد قرار گرفت. پس از یک روز محیط کشت را خارج کرده و به آن محیط جدید اضافه گردید و هر سه روز یک بار، ۳/۲ محیط آن (بعلت این که حذف کامل محیط باعث آسیب به سلولها می شود) با محیط جدید تعویض شد.

پس ازگذشت یک الی دو هفته کشت مخلوط کورتکس بدست می آمد. با تکان دادن فلاسک حاوی کشت مخلوط در ۲٤۰-۱۸۰ دور در دقیقه بمدت ۲ ساعت سلولهای میکروگلیا و در ادامه پس از۲٤ ساعت تکان دادن سلولهای $O\text{-}_2A$ جدا شد. در این مرحله سلولهای آستروسیت نوع I که با اتصال قوی تری به کف فلاسک چسبیده اند باقی مانده و بدین ترتیب آستروسیتهای پروتوپلاسمیک با خلوص بالا تهیه گردید.

تهیه کشت خالص آستروسیت نوع II "Fibrous A": سلولهای پیش ساز $O\text{-}_2A$ جدا شده از کشت مخلوط به فلاسک حاوی محیط کشت دارای۲۰-۱۰ درصد سرم جنینی گوساله (FCS) منتقل شد. اضافه نمودن سرم با غلظت بالا به محیط کشت باعث می شود که سلولهای پیش ساز $O\text{-}_2A$ به جای تمایز به الیگودندروسیت، به آستروسیت نوع II تمایز یابند. هر چه $O\text{-}_2A$ خالص تر

Archive of SID
www.SID.ir

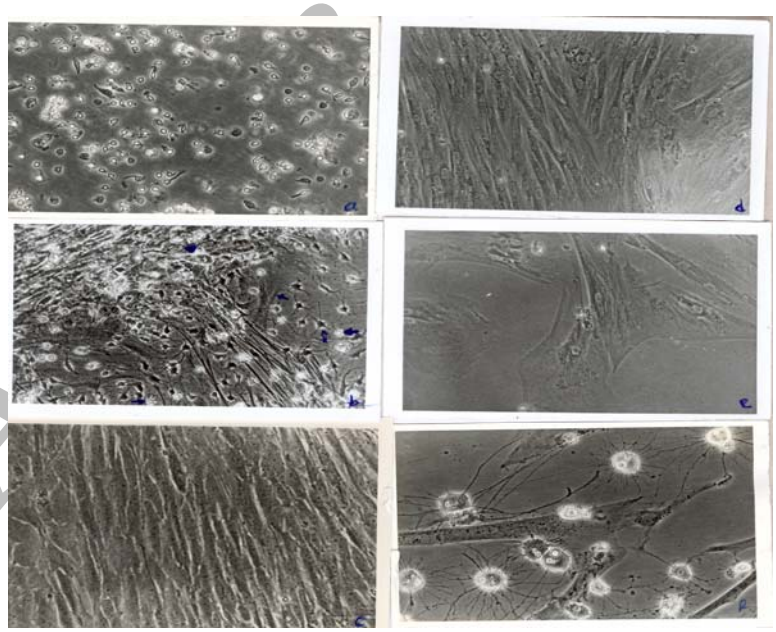
باشد، کشت آستروسیت نوع II خالص تر خواهد بود. در نهایت کشت آستروسیت نوع II با خلوص بالا تهیه شد.

رنگ آمیزی اختصاصی سلولهای آستروسیت: جهت رنگ آمیزی آستروسیتها از مارکر اختصاصی آنها یعنی Glial Fibrillary Acidic Protein (GFAP) استفاده و تمام مراحل کار در دمای اتاق انجام شد. ابتدا سلولها در پارافورمالدیید ٤ **درصد** بمدت ۱۰ دقیقه قرار گرفت و پس از دو بار شستشو با PBS در مرحله دوم به آن تریتون x-100 یک درصد اضافه گردید و دوباره شستشو با PBS انجام شد. در مرحله سوم به سلولها سرم آلبومین گاوی ۳ **درصد** اضافه و پس از ۳ ساعت، دو بار شستشو با PBS انجام شد.از آنتی بادی اولیه GFAP خرگوشی با رقت ۱:۱۰۰ استفاده و بعد از ۱ ساعت ۳ بار شستشوی با PBS صورت گرفت. و در مرحله آخر از آنتی بادی ثانویه FITC با رقت۱:۲۰۰ استفاده و پس از ۱ ساعت سلولها ۳ بار با PBS شسته شدند(۱۹).

استفاده از رنگ Hoechst 33342 باعث رنگ پذیری هسته تمامی سلولها بطور غیر اختصاصی می گردد. مقایسه سلولهای رنگ شده با Hoechst 33342 وسلولهای رنگ شده با GFAP میزان خلوص آستروسیتها را نشان می دهد.

نتایج

در این تحقیق سلولهای آستروسیت از کشت مخلوط کورتکس موش صحرایی نوزاد بر پایه روش McCarthy & vellis و با تغییراتی در آن انجام شد. با توجه به خاصیت چسبندگی بالای آستروسیتهای پروتوپلاسمیک به کف ظرف کشت نسبت به سلولهای میکروگلیا و$O\text{-}_2A$ ، این سلولها را به روش مکانیکی جدا کرده و بدین ترتیب سلولهای آستروسیت نوع I، چسبیده شده به کف ظرف کشت، با خلوص بالا تهیه شد (اشکال 1d_1c_1b_1a).

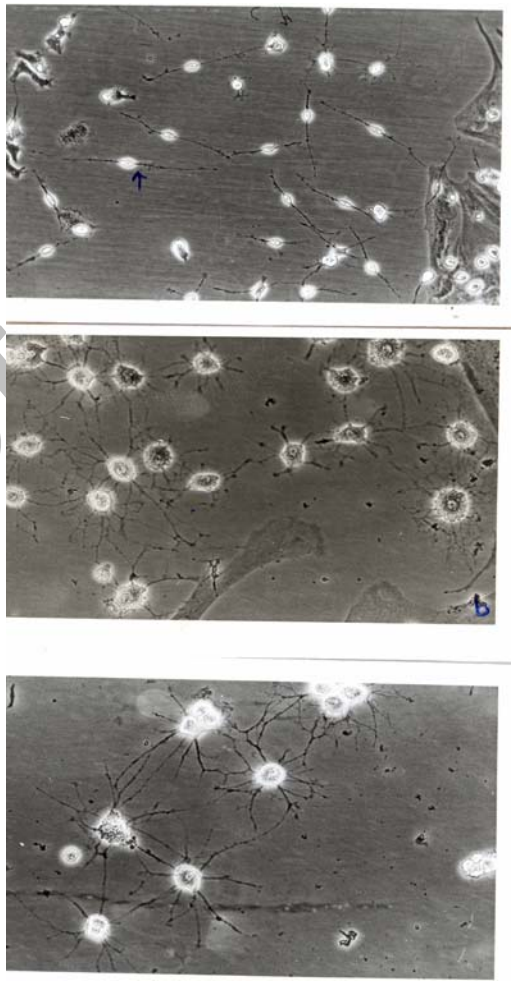


شکل ۱:اشکال فازکنتراست از کشت اولیه سلولهای کورتکس موش صحرایی نوزاد

(a : سلولهای منفرد شده به روش مکانیکی روز صفر کشت b :کشت مخلوط از سلولهای کورتکس (شامل آستروسیت نوع I ↑ و آستروسیت نوع II ⇑ ونورون والیگودندروسیت↓ ومیکروگلیا► ۱٤ روز پس از کشت c : کشت خالص سلولهای آستروسیت نوع 1 (protoplasmic) d: کشت خالص آستروسیت نوع I دو ماه پس از کشت e : کشت خالص آستروسیت نوع 1 بیش ا ز دو ماه کشت که سلولها بصورت غول پیکر در آمده اند f: سلولهای آستروسیت نوع II (Fibrous) در مجاورت سلولهای آستروسیت نوع I چهار هفته پس از کشت.

www.SID.ir

در مرحله دوم و پس از جدا کردن سلولهای پیش ساز O-$_2$A که پیش ساز یا آغازگر و اجدادی (پروژنیتور) مشترک الیگودندروسیت وآستروسیت نوع II هستند با افزایش سرم بیشتر به محیط کشت DMEM بمیزان ۲۰-۱۰ در صد تمایز سلولهای O_2A به سمت ایجاد آستروسیت نوع II (Fibrous) سوق داده شد وکشت خالصی از آنها تهیه گردید (اشکال ۲a _۲b_ ۲c) .



شکل ۲:تمایزسلولهای پیش ساز O-$_2$A به سلولهای آستروسیت نوع II (Fibrous) a : سلولهای O-$_2$A b : سلولهای آستروسیت نوع II c :کشت خالص سلولهای آستروسیت نوع II

آستروسیتها را می توان برای مدت طولانی با افزودن هفته ای یک بار محیط کشت جدید بمدت طولانی (بیش از سه تا چهار ماه) نگهداری کرد (شکل ۱ e).

می توان از کشت آستروسیت پاساژ های مکرر تهیه نمود؛ بدین ترتیب که با استفاده از پاروی استریل، آستروسیتها را از کف فلاسک بلند کرده و پس از انتقال به فلاسک جدید، به آن محیط کشت اضافه نمود. هسته تمامی سلولها توسط رنگ Hoechst 33342 رنگ شد (۳c و۳a).

جهت شناسایی آستروسیتها از سایر سلولها، از آنتی بادی علیه فیلامنتهای حد واسط GFAP که مختص آستروسیتها است استفاده گردید(شکل ۳dو۳b). مقایسه اشکال (۳dو۳c) نشان دهنده خلوص بالای کشت سلولهای آستروسیت به روش ارائه شده در مقاله می باشد.

بحث

در این مقاله برای تهیه کشت خالص آستروسیت ازکورتکس مغز نوزاد Rat استفاده شده است (۱۷). آستروسیتها را می توان از بافتهای مختلف مغز از جمله کورتکس، پیاز بویایی، مخچه، نخاع و عصب بینایی جدا کرد (۱۸،۱۷،٤ و ۱۹) . اخیراً آستروسیتها را از تمایز سلولهای Stem cell پوست انسان نیز بدست آورده اند (۱).

آستروسیتهای Fibrous و Protoplasmic از کشت مخلوط کورتکس موش صحرایی تازه متولد شده به روش مکانیکی (بدون استفاده از آنزیم) تهیه گردید. روش پایه در این تحقیق روش McCarthy& Vellis است (۱۳) که با تلفیق با سایر روشها در جهت ساده تر شدن انجام شد. برای منفرد کردن سلولها از آنزیم استفاده نگردید و به روش مکانیکی سلولها از هم جدا شدند. فاکتورهای رشد وچسبندگی در کشت مورد استفاده قرار نگرفت.

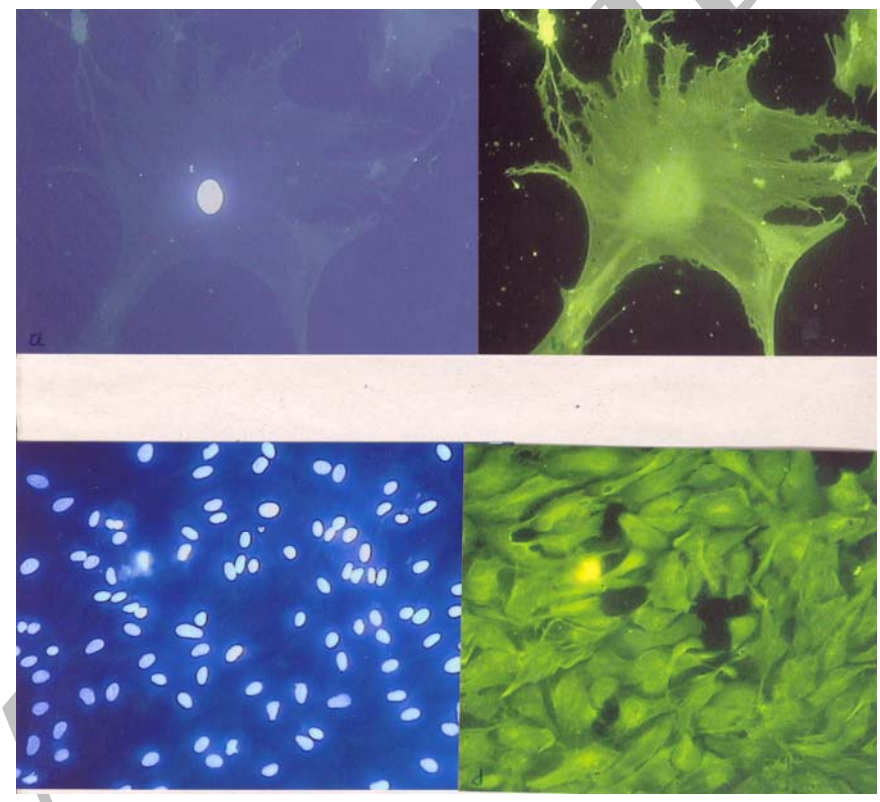
برای جداسازی آستروسیتهای نوع II، پس از جداسازی پیش سازهای O-$_2$A از کشت، با استفاده از غلظت بالای سرم جهت تمایز آنها بسمت آستروسیت نوع II سوق داده شد (۱٦). معمولاً برای جدا سازی سلولها از آنزیمهای مختلف از جمله تریپسین وDNase وغیره استفاده می شود

Archive of

www.SID.ir

(۱۲). در این تحقیق مجزا کردن سلولهای بافت کورتکس مغز جهت تهیه سوسپانسیون سلولهای منفرد انتخاب گردید.

معمولاً از ظروف کشت که توسط مواد چسبنده سطحی مثل poly L Lysine، فیبرونکتین وغیره استفاده می شود (۱۲). ظروف کشت مورد استفاده در این تحقیق بدون افزایش کف چسبنده است. در تهیه کشت خالص آستروسیتها معمولاً از محیطهای کشت اختصاصی مانند G-5 (شامل انسولین، ترانسفرین، سلنیم، بیوتین، هیدروکورتیزون، FGF ، و EGF استفاده می‌شود (٦) ولی بدلیل گران بودن محیط کشتهای اختصاصی، ما فقط از محیط کشت DMEM و FCS استفاده نمودیم. در تهیه کشت خاالص آستروسیت که اخیراً توسط Hamby وهمکارانش درسال ۲۰۰۵ صورت گرفته است از-l Leucine Methyl Ester (LME) که یک ممانعت کننده میتوز است، جهت حذف میکروگلیا استفاده شده است (۷).



شکل۳: رنگ آمیزی ایمنوفلورسانس آستروسیتهای پروتوپلاسمیک

a: رنگ آمیزی اختصاصی هسته سلول آستروسیت توسط رنگ Hoechst 33342 b: رنگ آمیزی اختصاصی آستروسیت با GFAP c:رنگ آمیزی اختصاصی هسته آستروسیتها در کشت خالص توسط رنگ Hoechst 33342 d:رنگ آمیزی اختصاصی کشت خالص آستروسیت با GFAP

بعضی ازمحققین برای از بین بردن الیگودندروسیتها ازis Complem ent Mediated Cytolys و Anti-Gal-C استفاده کرده اند (۱۲). در این مقاله با افزایش میزان سرم مسیر تمایزی O-2A به سمت آستروسیت نوع II هدایت شد (۱٦). می توان مستقیماً O-2A را از روی تک لایه آستروگلیا جدا کرده و کشت ثانویه داد (۱۳).

www.SID.ir

در این روش بدلیل عدم استفاده از آنزیم غشاء آستروسیتها دست نخورده باقی مانده و سلامت و طول عمر سلول تضمین شده است. در آستروسیتها فیلامنتهای حد واسط GFAP بطور مستمر بیان می شود که بعنوان مارکر اختصاصی برای تشخیص آستروسیتها بکار می رود.

بطور کلی روش غیر آنزیماتیک ارائه شده در این مقاله کشت با خلوص بالای آستروسیتهای نوعI و II را فراهم می آورد که توسط آنتی بادی مو نوکلونال برعلیه GFAP تأیید گردد.

تشکر وقدردانی: از حوزه معاونت پژوهشی دانشگاه تهران جهت تأمین اعتبار طرح پژوهشی قدردانی می شود.

منابع

1. Belicchi M., Pisati F., Lopa R., Porretti L., Fortunato F., Sironi M., Scalamogna M., Parati E A., Bresolin N., Torrente Y (2004) Human skin – Drived Stem Cells Migrate Throughout Forebrain and Differentiation Into Astrocyte After Injection Into Adult Mouse Brain. J of Neurosci Res 77: 475-486
2. Brenner M,Johnson A.B, Boesphlug - Tanguy O, Rodringuez D, Goldman J.E, Messing A (2001) Mutations in GFAP, Encoding Glial Fibrillary Acidic Protein,are associated with Alexander disease .Nature 27 (1): 117-120
3. Brown D. R (1998) A method for long term culture of murine type 2 astrocyte. Journal of neuroscience methods 79: 161-167
4. Cholewinski A.J., Reid J.C., McDermott A.M., Wilkin G.P (1989) Purification of astroglial cell cultures from rat spinal cord: the use of D – valin to inhibit fibroblast growt . Neurochem. Int 15: 365-369
5. Cohen J and Wilkin G P (1995) Neural Cell Culture IRL press Oxford New York, pp 85-95
6. Gilad G.M., Shanker G., Dahl D., Gilad V.H (1990) Dibutyryl cyclic-AMP induced changesin neuron - astroglia interactions. Brain Res 508: 215-224
7. Hamby M.E.,Uliasz T.F.,Hewett S.j.,Hewett J.A (2005) Characterization of an improved procedure for the removal of microglia from confluent monolayers of primary astrocytes.J Neurosci Methods, 2006 Jan 15; 150(1): 128-137.
8. Hertz L, Juurlink BHJ, Hertz E, Fosmark H, Schousboe A. preparation of primary cultures of mouse (rat) astrocytes In: Shaher A, De Vellis, A dissection and tissue culture manual of the nervous system, Alan R. Liss, Inc. New york, pp. 92-104
9. Horner P.J, Palmer T.D (2003) New roles for astrocytes: The nightlife of an astrocyte. La Vida Loca . TREND in neuroscience 26 (11): 597-603
10. Lee S. C., Brosnan C. F. (1997) Molecular biology of Glia: Astrocytes molecular biology of multiple sclerosis. Edited by W. C. Russell, Gohn Wieley & sons, Ltd. pp. 70-96
11. Lim R., Miller J F (1989) Isolation of rat astrocytes. Alan R. Liss, Inc. New york, pp. 92-104
12. Marriott D.R.,Wilkin G.P(1993) Substance P receptor cells and type-2 astrocytes in vitro J. Neurochem 61: 826
13. McCarthy K.D & J D Vellis (1980) Preparation of Separate Astroglial and Oligodandroglial Cell Cultures From Rat Cerebral Tissue. J. Cell Biology 85: 890-902
14. Raff M.C., Abney E.R., Cohen J., Lindsay R., Noble. (1983a) Two types of astrocytes in cultures of developing rat white matter: differences in morphology, surfaces gangliosides and growth characteristics. J. Neurosci. 3: 1289-1300
15. Rajadhyaksha M.S. & Manghani D. (2002) Glial cells: The other cells of the Nervous system 2. Astrocytes-star performs in the Neural Tissue An introduction to glial cell. Resonance 7(1): 4-10.
16. Sasaki A ., Levison S W., Ting J P (1989) Comparison and quantification of la antigen expression on cultured macroglia and microglia and amoeboid microglia from Lewis rat cerebral cortex :analyses and implications. J. Neuroimmunol. 25: 63-74
17. Schwartze J. P &Wilson D.J (1992) Preparation and characterization of type I astrocyte culture from adult rat cortex, cerebellum and striatum. Glia 5, 75-80
18. Shahar A., Vellis J., Vernadakis A., Haber B. (1986) A dissectionand tissue culture Manual of the Nervous system. New York: Alan R . Liss, inc. (1989), ISBN: 0471-56237-8.
19. Young P., Hernandez M. R. (2003) Purification of astrocytes from adult human optic nerve heads by immunopanning . Brain Research Protocols 12: 67-76

Archive of SID
www.SID.ir

paration and purification of astrocyte (type I, II) culture of neonatal rat brain cortex without enzyme,growth and adhesion factors.

Firouzi M.[1] , Sabouni F.[2] , Moshaedi P.[1], Zanjani L.[1], Nabian M.H.

[1]Tissue Repair Lab., Institute of Biochemistry and Biophysics, Tehran University, Tehran, Iran.

[2]National Research Institute of Genetic Engineering and Biotechnology, Tehran, Iran.

ABSTRACT

Most in vitro studies in the CNS require pure culture of astrocyte.In this article preparation of purified types I and II astrocytes culture from neonatal rat brain cortex were described.The base of this methods is K.D. McCarthy and J.P. Vellis methods (1980)and modified for simplicity of the technique. Separation of the cells from cortex were done mechanical without any enzymes.Single cells were cultured in DMEM+ 10% FCS without enzymes, growth and adhesion factors usage.Astrocyte cultures were characterized as being greater than 99% pure by counting GFAP positive cells over the total number of cells stained by Hoechts #33342. Pure culture of astrocytes can wildly use for different biochemical, molecular genetics, physiology, pharmacology and electrophysiology studies in central nervous system.

Keyword: CNS, astrocyte type I, astrocyte type II, preparation, purification, cortex.

Archive of SID

www.SID.ir