مجله دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، دوره ۶۸ ، شماره ۹، آذر ۱۳۸۹، ۵۱۵-۵۰۸

جداسازی سلول‌های پیش‌ساز مشتق از فور اسکین انسانی و تمایز آن‌ها به نورون و سلول گلیال

میترا بختیاری[۱]، کامران منصوری[۲]
علی مصطفایی[۳*]، یوسف صادقی[۱]
هادی مظفری[۴]، رستم قربانی[۵]
مصطفی رضایی طاویرانی[۶]

۱- گروه آناتومی و بیولوژی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران.
۲- کارشناس ارشد هماتولوژی
۳- گروه ایمونولوژی
۴- کارشناس ارشد بیوشیمی
مرکز تحقیقات بیولوژی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه، کرمانشاه، ایران.
۵- گروه آناتومی و بیولوژی، دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه، کرمانشاه، ایران.
۶- مرکز تحقیقات پروتئومیکس، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران.
* نویسنده مسئول: کرمانشاه، مرکز تحقیقات بیولوژی پزشکی، سرخه لیژه، کد پستی: ۶۷۱۴۸۶۹۹۱۴
تلفن: ۴۲۷۶۴۷۳-۰۸۳۱
email: amostafaie@kums.ac.ir

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۸۹/۰۶/۱۴ تاریخ پذیرش: ۱۳۸۹/۰۸/۰۱

چکیده

زمینه و هدف: سلول‌های پیش‌ساز مشتق از پوست نوعی سلول پیش‌ساز هستند که از کشت درم پستانداران به‌دست آمده و در محیط کشت دو ردهٔ نورونی و مزودرمی را تولید می‌کنند. دستیابی به این سلول‌ها به‌عنوان یک منبع اتولوگ و در دسترس سلول‌های پیش‌ساز عصبی، گزینه‌مناسبی در درمان بیماری‌های‌مختلف سیستم عصبی می‌باشد. این مطالعه به‌منظور راه‌اندازی نحوه جداسازی، کشت، تکثیر و تمایز سلول‌های پیش‌ساز مشتق از پوست انسانی در کشور انجام شده است. ***روش بررسی:*** ابتدا نمونه‌های پوست فور اسکین انسانی به قطعات کوچک تقسیم و پس از هضم آنزیمی در محیط تکثیری کشت داده شدند. پس از پاساژ پنجم با کشت سلول‌های حاصله در شرایط تمایزی عصبی، تمایز انجام شد. برای شناسایی هویت سلول‌ها از تکنیک‌های ایمونوسیتوشیمی و RT-PCR استفاده شد. توانایی تمایز به نورون و سلول گلیال پس از رنگ‌آمیزی با آنتی‌بادی‌های اختصاصی در سه تکرار بیولوژیک بررسی شد. ***یافته‌ها:*** پس از تمایز، سلول‌های β- III توبولین مثبت و نوروفیلامنت- M مثبت مشاهده شدند که مارکرهای اختصاصی سلول عصبی هستند. همچنین سلول‌های Glial fibrillary acid protein (GFAP) مثبت و S100 مثبت دیده شدند که این مارکرها به‌طور اختصاصی در سلول‌های گلیال بیان می‌شوند. خصوصیات مورفولوژیک نیز ماهیت سلول‌های تمایز یافته را به‌عنوان نورون و سلول گلیال تایید نمود. ***نتیجه‌گیری:*** سلول‌های به‌دست آمده از پوست فور اسکین انسانی در محیط کشت، بسته به شرایط القایی محیط توانایی تمایز به نورون و سلول گلیال را دارند.

کلمات کلیدی: پیش‌ساز مشتق از پوست انسانی، ردهٔ عصبی، نورون، سلول گلیال، تمایز عصبی.

مقدمه

با توجه به شیوع نسبتاً بالای آسیب‌های سیستم عصبی، پیدا کردن یک منبع بافتی مناسب با قابلیت دسترسی آسان که حاوی یک سلول پیش‌ساز (Precursor) مولد سلول‌های عصبی باشد، می‌تواند به‌عنوان راهکاری مناسب در درمان بیماری‌های سیستم عصبی مطرح باشد.[۱] رایج‌ترین منبع بافتی جهت تهیهٔ سلول‌های بنیادی عصبی، بافت جنینی است که استفاده از آن علاوه بر محدودیت‌های اخلاقی مشکلات پیوند هترولوگ را به‌دنبال دارد.[۲] دانستن این‌که سلول مرکل (نوعی گیرندهٔ حسی با خصوصیات سلول عصبی)، در پوست بزرگسال تولید می‌شود، احتمال وجود یک نوع سلول پیش‌ساز در پوست را که قادر به تولید انواع سلول‌های عصبی باشد مطرح نمود.[۳] این فرضیه که پوست می‌تواند به عنوان یک منبع اتولوگ بالقوه و در دسترس جهت دستیابی به سلول‌های پیش‌ساز عصبی مطرح باشد، بررسی شده و منجر به شناسایی سلول‌های پیش‌ساز مشتق از پوست Skin derived Precursors (SKP) گردید.[۴-۶] این سلول‌ها نوعی سلول پیش‌ساز چند ظرفیتی درون‌زا هستند که از انواع دیگر پیش‌سازهای شناخته شده در پوست قابل افتراق می‌باشند. سلول‌های SKP به‌دنبال کشت درم از پوست پستانداران نوزاد و بزرگسال به‌دست آمدند و با پتانسیل تمایزی چند دودمانی، در محیط کشت دو ردهٔ نورونی و مزودرمی را تولید کردند.[۷-۱۰] سلول‌های پیش‌ساز مشتق از پوست انسانی، توانایی تمایز به نورون (سلول‌هایی با فنوتیپ نورون‌های محیطی)، سلول‌های گلیال (سلول شوان)، سلول‌های عضلهٔ صاف و سلول چربی را دارا می‌باشند، اخیراً گزارشاتی در خصوص گسترش محدودهٔ پتانسیل تمایزی آن‌ها وجود دارد.[۱۱و۱۲] از موارد کاربرد این سلول‌ها می‌توان به امکان پیوند سلول اتولوگ در بیماری‌های مختلف سیستم عصبی از جمله استفاده از سلول‌های شوان تمایز یافته از

Archive of SID
www.SID.ir

SKPها در ترمیم ضایعات نخاعی و بیماری مولتیپل اسکلروزیس اشاره نمود.[۱۳و۱۴] از آنجایی که امکان تمایز این سلول‌ها به نورون‌هایی با خصوصیات دوپامینرژیک گزارش شده، لذا استفاده از نورون‌های تمایز یافته در درمان پارکینسون مطرح شده است.[۱۵] از سوی دیگر در مطالعات پایه بر روی سلول‌های عصبی و گلیال می‌توان از مشتقات تمایز یافته این سلول‌ها به‌عنوان یک مدل تحقیقاتی در محیط کشت بهره‌مند گردید.[۶] SKPهای انسانی در تمام طول عمر حضور دارند ولی تعداد و پتانسیل تمایزی آن‌ها در افراد بزرگسال به‌طور واضحی نسبت به نوزادان کمتر است.[۵] بدین لحاظ مراحل جداسازی، کشت و تمایز آن‌ها در افراد مسن مشکل است. نگهداری SKPهای انسانی به‌صورت بانک‌های سلولی در مراحل اولیهٔ زندگی به‌منظور کاربرد کلینیکی آن‌ها در مراحل بعدی می‌تواند بسیار سودمند باشد.[۱۶و۱۷] این سلول‌ها به‌عنوان یک منبع مناسب در دسترس و اتولوگ جهت حصول به پیش‌سازهای عصبی با توان تمایزی بالا در درمان بیماری‌های سیستم عصبی از جمله ترمیم ضایعات نخاعی، مولتیپل اسکلروزیس و پارکینسون، اهمیت بسیار دارند.

در مطالعه حاضر برای اولین‌بار در کشور جداسازی سلول‌های SKP از فور اسکین Foreskin انسانی و تمایز آن‌ها به ردهٔ عصبی شامل نورون و سلول‌های گلیال انجام گرفته است.

روش بررسی

مطالعه حاضر از نوع تجربی بوده و در آزمایشگاه کشت سلول‌های بنیادی، مرکز تحقیقات بیولوژی پزشکی کرمانشاه طی سال‌های ۸۹-۱۳۸۸ انجام گردید. نمونه پوست انسانی مورد استفاده در این تحقیق از پوست ناحیه فور اسکین به‌دنبال عمل جراحی ختنه (Circumcision) تهیه گردید. مواد مورد استفاده عبارت بودند از: آنزیم ترمولایزین، محلول Hank's Buffered Salt Solution (HBSS)، کلاژناز نوع IV، DNase، LIF، آمفوتریسین، poly-D-lysine، پارافرمالدهاید، تریتون X100 و هوخست 33258 (سیگما آمریکا)، محیط‌های کشت DMEM/F12، پنی‌سیلین و جنتامایسین، سرم جنین گاو (FCS)، سرم بز و آلبومین سرم گاوی (BSA) (گیبکو هلند)، محیط B27 بدون ویتامین A و B27 بدون سرم (اینویتروژن امریکا)، فاکتورهای رشد bFGF، EGF و NGF و آنتی‌بادی ضد بتا-III توبولین (آکسورا آلمان)، آنتی‌بادی‌های ضد نستین، فیبرونکتین، نوروفیلامنت M، پروتیین اسید رشته‌ای گلیال (R&D آمریکا)، آنتی‌بادی ثانویه ضد IgG موشی کونژوگه با FITC (تهیه شده در مرکز تحقیقات بیولوژی پزشکی کرمانشاه)، آنتی‌بادی‌های ضد ویمنتین، اکتین عضله صاف و S100 (داکو دانمارک)، کیت RNaxPlus جهت استخراج RNA (سیناژن ایران)، کیت سنتز cDNA (کیاژن آلمان) و پرایمرهای ژن‌های Snail, Slug, P75NTR Pax3 (ندای فن ایران).

تهیه نمونه‌های پوستی: در این مطالعه تعداد ۱۰ نمونه پوست فور اسکین انسانی، اطفال مذکر در محدوده سنی ۱۲-۱ ماهه حاصل از اعمال جراحی داوطلبانه ختنه که به‌عنوان دورریز جراحی می‌باشد، مورد استفاده قرار گرفت. به والدین بیماران اطلاعات کافی داده و رضایت‌نامه گرفته شد. مطالعه تحت شرایط رعایت کامل نکات اخلاقی و با تایید کمیته اخلاقی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه انجام شد. هزینه‌های انجام این مطالعه از طریق معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه تامین گردید. قطعات پوست فور اسکین انسانی در لوله‌های فالکن حاوی HBSS با pH ۷/۴ در شرایط استریل و با حفظ زنجیره سرد (حمل لوله‌ها قبل و بعد از انتقال فور اسکین روی یخ) از اتاق عمل بیمارستان حضرت معصومه (س) کرمانشاه به آزمایشگاه کشت سلول منتقل گردید.

کشت سلول: نمونه‌های پوستی به‌دست آمده به قطعات کوچک مستطیل شکل به ابعاد ۳mm ×۲ بریده شدند و یک شب در محلول ترمولایزین (۲۵۰µg/ml در بافر HBSS) در دمای ۴ °C قرار داده شدند. روز بعد، با استفاده از یک فورسپس ریز اپیدرم با دقت از درم جدا شد. قطعات درم جدا شده پس از ریز شدن به قطعات کوچک‌تر در آنزیم کلاژناز IV، در غلظت ۱mg/ml به‌مدت ۴۵ دقیقه تحت هم زدن در دمای ۳۷ °C قرار داده شدند. سپس آنزیم DNase با غلظت نهایی ۰/۱٪ به سوسپانسیون سلولی فوق اضافه شده و پنج دقیقه دیگر انکوبه گردید. مخلوط به‌دست آمده از هضم بافت درم، فیلتر و در ۷۰۰g به‌مدت پنج دقیقه سانتریفیوژ شد. رسوب سلولی در محیط تکثیری DMEM/F12 حاوی B27 بدون ویتامین A (۲٪)، bFGF (۴۰ng/ml)، EGF (۲۰ng/ml)، LIF (۱۰ng/ml)، پنی‌سیلین (۱۰۰u/ml)، جنتامایسین (۲۵µg/ml) و آمفوتریسین (۱µg/ml) شناور شدند. در این مرحله سلول‌ها را با تراکم زیاد (۱۰^{۶}× ۱/۲-۰/۸ سلول در هر cm^{۲}) در فلاسک‌های ۲۵cm^{۲} کشت داده شدند. در هر هفته سه بار محیط تکثیری به فلاسک‌های کشت اضافه شد.

Archive of SID
www.SID.ir

پاساژ سلول‌ها: در روز هفتم پس از کشت، مجموعه‌های سلولی که به‌صورت کروی (Sphere) شناور بودند، پاساژ داده شدند. به این ترتیب که محتوای فلاسک‌ها در ۷۰۰g به‌مدت پنج دقیقه سانتریفیوژ شدند. دوسوم مایع رویی دور ریخته و اسفیرها در ثلث باقیماندهٔ آن شناور شدند. با پیپت کردن، سلول‌های تشکیل دهندهٔ اسفیرها به‌صورت منفرد از هم جدا شدند. کشت مجدد سلول‌های پاساژ داده شده در وضعیت تراکم زیاد در محیط تکثیری تازه در فلاسک‌های کشت انجام گردید. مراحل پاساژ هر هفت روز یک بار تکرار شد.

تمایز سلول عصبی و گلیال: برای ایجاد تمایز، هر بار اسفیرهای حاصل از پاساژ پنجم انتخاب گردید. اسفیرها پس از پنج دقیقه سانتریفیوژ در ۷۰۰g به‌صورت مکانیکی با تکرار عمل پیپت کردن در محیط تمایزی از یکدیگر، به‌صورت سلول‌های منفرد شناور شدند. محیط تمایزی شامل DMEM/F12 با نسبت سه به یک حاوی FCS (۱٪)، B27 بدون سرم (دو درصد)، NGF (۱۰ng/ml)، پنی‌سیلین (۱۰۰u/ml)، جنتامایسین (۲۵µg/ml) و آمفوتریسین (۱µg/ml) بود. سپس سلول‌ها با غلظت ۵×۱۰^{۵} سلول در هر $cm^{۲}$ در ظروف کشت پوشش داده شده با poly-D-lysine کشت داده شدند و هر هفته سه بار، نصف محیط کشت با محیط تمایزی تازه تعویض گردید.[۴]

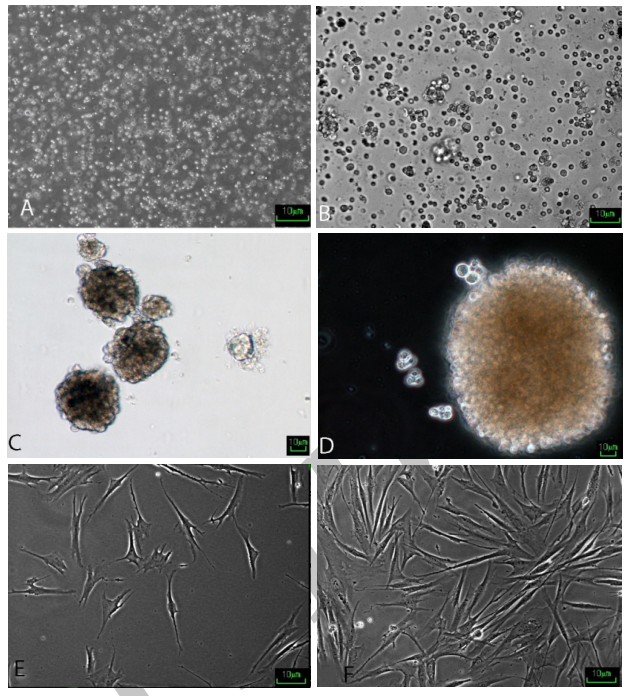
ایمونوسیتوشیمی (Immuno Cytochemistry (ICC: سلول‌های مورد نظر جهت رنگ‌آمیزی ICC در پلیت‌های ۹۶ خانه کشت داده شدند و هر بار در روزهای مورد نظر با پارافرمالدیید ۴٪ به‌مدت ۲۰ دقیقه در دمای اتاق فیکس شدند. نفوذپذیری با استفاده از تریتون X-100 ۰/۱ درصد در دمای اتاق به‌مدت ۱۵ دقیقه انجام شد. برای جلوگیری از اتصالات غیراختصاصی، نمونه‌ها به‌مدت یک ساعت در دمای اتاق با سرم بز شش درصد و BSA ۰/۱ درصد بلوکه شدند. سپس نمونه‌ها با افزودن آنتی‌بادی اولیه در $۴\ ^{\circ}C$ شبانه آنکوبه شدند. آنتی‌بادی‌های اولیه مورد استفاده عبارت بودند از: آنتی نستین، آنتی ویمنتین، آنتی فیبرونکتین، آنتی نوروفیلامنت M، آنتی پروتیین اسید رشته‌ای گلیال، آنتی بتا–III توبولین، آنتی S100 و آنتی اکتین عضله صاف. آنتی‌بادی ثانویه مناسب کونژوگه با FITC به‌مدت یک ساعت در دمای اتاق به چاهک‌ها اضافه شد. کنترل منفی با حذف آنتی‌بادی اولیه انجام شد. جهت رنگ‌آمیزی هسته تمام سلول‌ها از معرف هوخست ۳۳۲۵۸ استفاده شد. هر آزمون حداقل سه بار تکرار گردید. آنتی‌ژن‌های سطح سلول با استفاده از نرم‌افزار SPSS ویراست ۱۳، انجام شد.

واکنش زنجیره پلیمراز معکوس: RNA سلولی با کیت RNaxPlus از نمونه‌ها تهیه گردید و cDNA با روش نسخه‌برداری معکوس (RT) تولید شد. واکنش زنجیرهٔ پلیمراز PCR به این ترتیب انجام شد: دو دقیقه در $۹۲\ ^{\circ}C$، ۳۰ الی ۳۵ سیکل $۹۴\ ^{\circ}C$ به‌مدت ۶۰ ثانیه (ذوب) و $۷۲\ ^{\circ}C$ به‌مدت ۶۰ ثانیه (انیلینگ).[۴] پرایمرها جهت PCR به‌ترتیب زیر انتخاب شدند: برای ژن P75NTR پرایمرهای tgggcccagaaggttgcgatgaa و aaaggggccccagaaccaaacaca، ژن Pax3 پرایمرهای catccggccctgcgtcatctc و tggccttcttctcgctttcctctg، ژن Snail پرایمرهای tggcctgtctgcgtgggtttttgt و -cctgggctcggggca tctca و ژن Slug پرایمرهای catctttggggcgagtgagtcc و -cccccgtgtg agtttctaatgtgtc انتخاب شدند.

یافته‌ها

جداسازی، کشت و تعیین ماهیت پیش‌سازهای عصبی مشتق از پوست: پس از جداسازی درم و هضم بافت آن، سلول‌های جدا شده در تراکم زیاد کشت داده شدند (شکل ۱.A). سه روز پس از کشت اولیه، سلول‌های منفرد شناور شروع به تشکیل اسفیرهای معلق کردند (شکل ۱.B). در روز هفتم اسفیرها کاملاً بزرگ شدند (شکل ۱.C) و برخی از اسفیرها نیز به یکدیگر متصل شدند. بلافاصله در روز اول پس از هر پاساژ، اسفیرهای جدید تشکیل شدند و با سرعت بیشتری شروع به رشد کردند. با تکرار پاساژها هر بار اندازه اسفیرها نسبت به پاساژهای قبلی بزرگتر شد به طوری‌که از پاساژ پنجم (شکل ۱.D) به بعد اسفیرها به‌دلیل بزرگی و سنگینی تمایل به چسبیدن به کف ظرف کشت را نشان دادند. در این مطالعه ما موفق شدیم اسفیرها را به مدت حدود چهار ماه (تقریباً معادل ۱۰ پاساژ متوالی) در محیط کشت گسترش دهیم. بررسی ICC اسفیرها نشان داد که SKPهای انسانی به‌دست آمده نستین (مارکری که در سلول‌های بنیادی عصبی بیان می‌شود) (شکل ۲.A) ویمنتین (شکل ۲.B) و فیبرونکتین (شکل ۲.C) مثبت هستند. بیان همزمان این سه مارکر به‌عنوان وجه تمایز SKPها از سایر سلول‌های بنیادی موجود در پوست محسوب می‌شود. در این مطالعه چند فاکتور رونویسی شناخته شده که بیان آن‌ها در SKPها گزارش شده بود، انتخاب گردیدند. این فاکتورهای رونویسی همراه با سلول‌های بنیادی ستیغ عصبی جنینی بوده و در برخی از مشتقات جنینی در حال تکامل آن‌ها دیده می‌شوند. نتایج RT-PCR نشان داد که

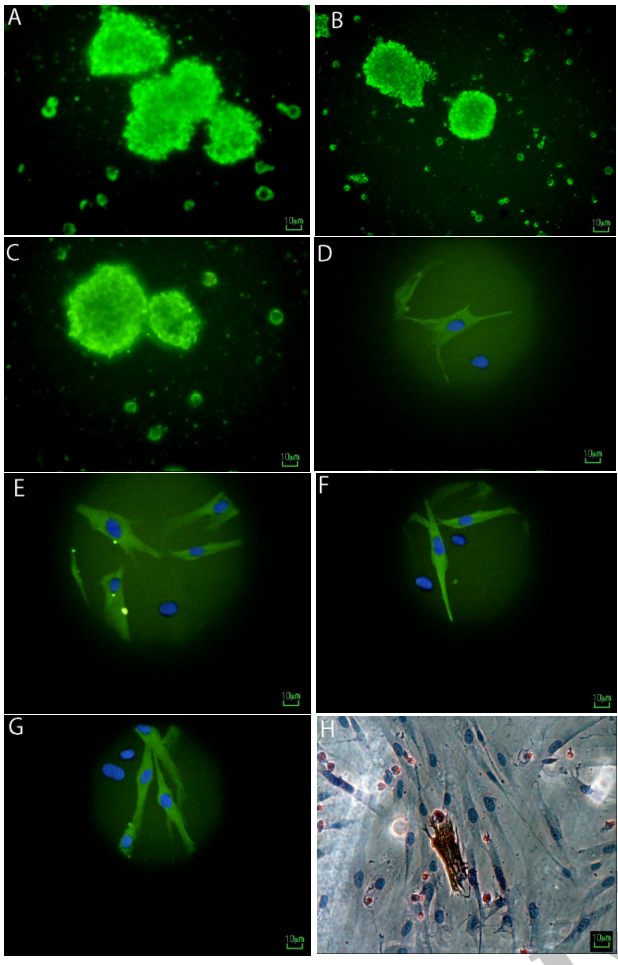
Archive of SID
www.SID.ir



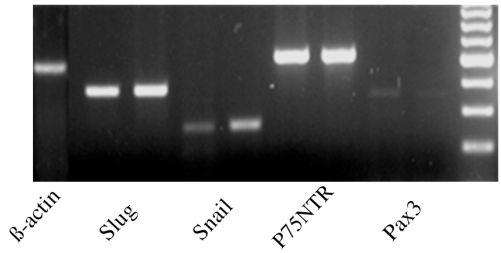
شکل-۱: مراحل کشت اولیه و تمایز SKPها: A- سوسپانسیون سلولی کشت داده شده، بلافاصله پس از هضم بافت درم، B- سه روز پس از کشت اولیه، ظاهر شدن اسفیرهای کوچک، C- روز هفتم پس از کشت اولیه، اسفیرها بزرگ‌تر شده و بعضی از اسفیرهای کوچک به یکدیگر چسبیده‌اند. پاساژ سلولی در این مرحله انجام شد. D- روز هفتم پس از پاساژ پنجم، اسفیرها بزرگ‌تر و سنگین شده و تمایل به چسبیدن به کف ظرف دارند. E- روز هفتم پس از تمایز و F- روز چهاردهم پس از تمایز. تعداد زیادی از سلول‌های تمایزیافته زواید سیتوپلاسمی کشیده سلول‌های عصبی را دارا می‌باشند. (دوربین Nikon ELWD، میکروسکوپ Nikon TS100، بزرگنمایی عکس‌های A,B,E و F، ۲۰×، C و D بزرگنمایی ۴۰×).

در سلول‌های SKP به‌دست آمده از فور اسکین انسانی هر چهار فاکتور رونویسی مورد مطالعه مربوط به ژن‌های Snail, Pax3, Slug, P75NTR بیان شدند (شکل ۳).

بررسی ICC سلول‌های تمایز یافته: جهت بررسی ICC سلول‌های تمایز یافته، ابتدا سلول‌های منفرد حاصل از هم‌گسیختگی اسفیرها در محیط تمایزی اختصاصی کشت داده شدند. سپس در مقاطع زمانی متفاوت، سلول‌ها فیکس شده و مراحل ICC انجام گردید. تا چهار روز پس از تمایز، سلول‌های منفرد همگی دارای مارکر نستین بودند. از روز چهارم برخی از سلول‌های بتا-III توبولین مثبت (مارکر مخصوص سلول عصبی نوزاد) نیز دیده شدند. در روز هفتم تمایز، اکثر سلول‌ها بتا-III توبولین مثبت بودند و تعداد سلول‌های نستین



شکل-۲: بررسی SKPها با ICC و سلول‌های تمایز یافته. A- بیان مارکر نستین در اسفیرها. B- بیان مارکر ویمنتین در اسفیرها. C- بیان مارکر فیبرونکتین در اسفیرها. D- سلول بتا-III توبولین مثبت ۱۴ روز پس از تمایز E- بیان آنتی‌بادی نوروفیلامنت M در نورون تمایز یافته در روز ۱۴ پس از تمایز F- سلول GFAP مثبت تمایز یافته رنگ‌آمیزی. G- بیان آنتی‌بادی S100 در سلول‌های گلیال تمایز یافته. H- بیان آنتی‌بادی SMA در سلول عضله صاف تمایز یافته با روش آنزیم پراکسیداز و دی آمینوبنزیدین، رنگ‌آمیزی هسته‌های سلولی: هماتوکسیلین. (دوربین Nikon ELWD، میکروسکوپ Nikon TS100، ۴۰×).



شکل-۳: بیان ژن‌ها با روش RT-PCR سلول‌های SKP انسانی

Archive of SID
www.SID.ir

مثبت کاهش یافتند. این روند تا روز ۱۴ تمایز سلول‌های عصبی ادامه داشت به طوری‌که در روز ۱۴ فقط سلول‌های بتا-III توبولین مثبت دیده شدند (شکل ۲.D). بیان مارکر نوروفیلامنت- M از روز هفتم تمایز شروع شد و تا روز ۱۴ افزایش یافت (شکل ۲.E). در واقع از روز هفتم تا ۱۴ پس از تمایز هر دو مارکر بتا-III توبولین و نوروفیلامنت- M که مارکرهای مربوط به سلول‌های عصبی هستند، در سلول‌های تمایز یافته به‌میزان زیادی بیان شدند. ضمن این‌که این سلول‌ها مورفولوژی کمپلکس مربوط به نورون‌ها را نیز داشتند. به‌منظور تخمین درصد سلول‌هایی که به نورون تمایز یافته‌اند در هر نمونه بیولوژیک در روز ۱۴ پس از تمایز محدوده‌هایی به‌طور تصادفی (در هر نمونه سه تکرار) انتخاب شد. سپس تعداد سلول‌هایی که بتا-III توبولین مثبت یا نوروفیلامنت- M مثبت بودند به تعداد کل سلول‌های موجود (از طریق شمارش هسته‌های رنگ شده با هوخست) محاسبه گردید. میانگین به‌دست آمده ۱۷/۷±۰/۶٪ نشان دهندهٔ درصد تمایز نورون‌ها بود. تحت همین شرایط تمایزی بیان مارکرهای پروتیین اسید رشته‌ای گلیال و S100 نیز که در سلول‌های گلیال بیان می‌شوند، بررسی شد. تعدادی از سلول‌های تمایز یافته با مورفولوژی سلول‌های دوقطبی، واجد مارکرهای پروتیین اسید رشته‌ای گلیال (مربوط به سلول شوان و آستروسیت) (شکل ۲.F) و S100 (در سلول‌های گلیال میلین ساز شامل الیگودندروسیت و سلول شوان) (شکل ۲.G) بودند. برای تخمین درصد سلول‌های تمایز یافته به سلول گلیال همانند مورد قبل، تعداد سلول‌های S100 مثبت یا GFAP مثبت نسبت به تعداد کل سلول‌ها محاسبه شد و میانگین ۲۳±۰/۳ درصد تمایز به سلول‌های گلیال به‌دست آمد. با توجه به توانایی تمایز سلول‌های SKP به ردهٔ مزودرمی از جمله سلول عضلهٔ صاف، بیان آنتی‌ژن اکتین عضلهٔ صاف نیز بررسی و جمعیت کوچکی از سلول‌های تمایز یافته با مورفولوژی میوفیبروبلاست دیده شد که SMA مثبت بودند (شکل ۲.H). درصد تمایز به سلول عضلهٔ صاف با توجه به نسبت سلول‌های SMA مثبت به تعداد کل سلول‌ها (تعداد هسته‌های رنگ‌آمیزی شده با هماتوکسیلین) ۴/۳±۰/۵٪ بود.

بحث

با توجه به این‌که در مطالعات قبلی بیشتر بودن تعداد SKPهای به‌دست آمده از پوست جوندگان نوزاد نسبت به بزرگسالان و همچنین کاهش وابسته به سن SKPهای انسانی گزارش شده بود، لذا ما در این مطالعه از بافت فور اسکین انسانی حاصل از جراحی داوطلبانه ختنه در محدودهٔ سنی ۱۲-۱ ماهه استفاده نمودیم. این مطالعه نشان داد که SKPها را می‌توان به‌صورت روتین از قطعات کوچک فور اسکین انسانی جدا نموده و در محیط آزمایشگاه برای مدت چندین ماه کشت داد. همچنین SKPهای انسانی به‌دست آمده توانایی تمایز به دو ردهٔ عصبی و مزودرمی را دارند. این موضوع موید منشا ستیغ عصبی این سلول‌ها می‌باشد. Toma جداسازی سلول‌های SKP را از پوست جوندگان نوجوان و بزرگسال و از پوست اسکالپ انسان بزرگسال گزارش کرد. این سلول‌ها از درم استخراج شدند و به‌صورت سلول‌های مجزایی که توانایی تکثیر و تمایز را در محیط کشت داشتند کلون شدند و پس از تمایز توانستند نورون، سلول گلیال، سلول عضلهٔ صاف و سلول چربی را ایجاد نمایند. همچنین در این تحقیق سه بخش از پوست که احتمال می‌رفت حاوی SKP باشند شامل درم، اپی درم و انتهای عصب بررسی شد. پس از انجام کشت تحت همان شرایطی که برای SKP ذکر شد، فقط درم اسفیر تولید کرد، از اپی درم سلول زنده به‌دست نیامد و عصب سیاتیک یک جمعیت هتروژن کوچک از سلول‌هایی که تکثیر نداشتند ایجاد نمود.[۱] در این مطالعه نتایج مشابه به‌دست آمد به این ترتیب که پس از هضم آنزیمی درم، سلول‌های شناور اسفیرها را تشکیل دادند که بعد از پاساژ اول به‌طور فعال تکثیر پیدا کردند. با افزایش تعداد پاساژها، اندازهٔ اسفیرها افزایش یافت ضمن این‌که سرعت تکثیر کاهش پیدا کرد. به‌نظر می‌رسد دلیل این کاهش، کم شدن رشد سلولی در مرکز اسفیرها به‌دنبال کاهش انتشار اکسیژن و مواد غذایی باشد. در این مطالعه زمانی‌که سلول‌های پیش‌ساز عصبی در شرایط تمایزی قرار داده شدند، الگوی بیان ترتیبی پروتیین‌ها نشان دهندهٔ مراحل تکاملی تمایز سلول عصبی بود.[۱۸] در طی دو هفته ابتدا فقط نستین سپس نستین و بتا-III توبولین و در مرحلهٔ آخر فقط بتا-III توبولین بیان شدند. این الگوی ترتیبی بیان پروتیین‌ها به‌خوبی مراحل اولیهٔ تمایز سلول‌های پیش‌ساز عصبی را به سمت نورون رسیده نشان می‌دهد.[۱۹] در واقع نستین اولین پروتیین رشته‌ای حدواسط است که در جریان تکامل سلول‌های عصبی در سلول‌های نورواکتودرم به‌میزان زیادی بیان می‌شود.[۲۰] ضمن کاهش بیان نستین و افزایش بیان بتا-III توبولین بیان مثبت پروتیین نوروفیلامنت- M دیده شد که این الگوی بیان

Archive of SID
www.SID.ir

پروتیینی، کاملاً با الگوی تکاملی نورون‌ها هماهنگ است.[۴و۲۱] نتایج این مطالعه و مطالعات مشابه موید این نکته است که SKPها از انواع دیگر پیش‌سازهای شناخته شده در پوست قابل افتراق می‌باشند و تفاوت‌های قابل توجهی با سلول‌های بنیادی عصبی دارند.[۲و۱] سلول‌های بنیادی عصبی بزرگسال تمایل زیادی دارند که به سمت سلول عصبی تمایز یابند. این سلول‌ها فیبرونکتین را بیان نمی‌کنند و هرگز دیده نشده که به سلول ردهٔ مزودرمی تمایز یابند.[۲۲و۱] در مقایسه با سلول‌های بنیادی ستیغ عصبی، SKPها مارکرهای P75 و PSA-NCAM را تولید نمی‌کنند و به نورون‌های تیروزین هیدروکسیلاز مثبت تمایز نمی‌یابند که وجه تمایز این سلول‌ها از سلول‌های بنیادی ستیغ عصبی (NCSCs) می‌باشد.[۲و۱] همچنین SKPها به‌طور واضحی از سلول‌های بنیادی مزانشیمی چسبندهٔ مغز استخوان متفاوت هستند. از جمله تفاوت در نوع فاکتورهای رشد مورد نیاز، مورفولوژی سلول‌ها و توانایی رشد به‌صورت شناور. علاوه بر این، سلول‌های بنیادی مزانشیمی قویا تمایل دارند که سلول‌هایی از منشا مزودرمال ایجاد کنند و به آسانی جهت تولید پروتیین‌های نورونی القا نمی‌شوند.[۳۳و۱] پتانسیل نورال و مزودرمال SKPها این احتمال را مطرح می‌کند که این سلول‌ها در اهداف درمانی متعدد قابل استفاده باشند. SKPها یک منبع در دسترس از پیش‌سازهای عصبی بزرگسال هستند که می‌توانند برای پیوند سلولی در درمان آسیب‌های سیستم عصبی به‌کار روند. در گزارش Mckenzie و Biernaskie، سلول‌های شوان تمایز یافته از SKPهای جوندگان توانسته‌اند آکسون‌ها را در محیط کشت و در بدن موجود زنده میلینه نمایند.[۱۴و۱۳] Toma شواهدی به‌دست آورد که SKPهای انسانی نیز می‌توانند سلول شوان تولید نمایند. همان‌طور که می‌دانیم تنها روش تهیهٔ سلول شوان انسانی از طریق بیوپسی عصبی است و این سلول‌ها به‌سختی در محیط کشت گسترش می‌یابند.[۲۵و۲۴] بنابراین SKPها یک منبع جایگزین اتولوگ زندهٔ بالقوه را برای تهیهٔ سلول شوان فراهم نموده‌اند.[۱۴و۱۳و۷] مطالعه ما درصد قابل توجهی تمایز سلول‌های گلیال ۲۳±۰/۳ را نشان داد که با بررسی‌های ICC و بیان مثبت مارکر سلول شوان (GFAP) می‌تواند به‌عنوان یک منبع در دسترس این سلول‌ها در درمان بیماری‌هایی نظیر آسیب‌های طناب نخاعی و مولتیپل اسکلروزیس مورد توجه قرار گیرد. کاربرد بالقوهٔ دیگر SKPهای جوندگان تمایز به نورون‌های کاتکول آمینرژیک می‌باشد که خصوصیات نورون‌های دوپامینرژیک را دارند و در درمان پارکینسون جوندگان به‌کار می‌روند. به‌نظر می‌رسد SKPهای انسانی یک منبع سلولی مناسب و در دسترس درمان پارکینسون باشند.[۱۵و۷و۴] در تحقیق حاضر حدود ۱۸ درصد از سلول‌ها به نورون تمایز یافته‌اند. بنابراین SKPهای انسانی منبع مناسب نورون‌های دوپامینرژیک در درمان پارکینسون می‌باشند. اهمیت کاربردی دیگر سلول‌های SKP، به‌عنوان یک منبع سلول‌های انسانی در غربالگری یا تحقیقات اکتشافی است. همان‌طور که می‌دانیم به‌دست آوردن سلول عصبی در مراحل تقسیمات میتوزی از یک فرد زنده غیر ممکن است ولی SKPهای انسانی آمادهٔ تولید سلول عصبی هستند. می‌توان از SKPها به‌عنوان یک منبع زنده و قابل گسترش نورون‌های اولیه انسانی استفاده کرد. در افراد با زمینهٔ ژنتیک بیماری عصبی مثل آلزایمر و شیزوفرنی، می‌توان SKPهای سلول‌های عصبی بیمار را جداسازی و کشت داده و مورد بررسی قرار داد.[۷-۴و۲] آخرین کاربرد درمانی SKPها در رابطه با پتانسیل تمایز دوگانهٔ این سلول‌ها به دو ردهٔ مزودرمی و عصبی می‌باشد. با توجه به این‌که برخی تومورهای پوستی حاوی هر دو جز عصبی و مزودرمی می‌باشند و حتی گاهی دیده شده که در پوست تومورهای عصبی ایجاد می‌شوند از جمله نوروبلاستوما که در پوست اطفال بروز می‌کند. بنابراین به‌نظر می‌رسد که یک سلول شبه SKP درون‌زا می‌تواند در برخی از این تومورها به‌عنوان سلول بنیان‌گذار عمل کند. گواه ما بر این ادعا نتایج منتشرشده‌ای است که همگی بر این نکته دلالت دارند که سلول بنیادی می‌تواند سلول بنیان‌گذار برای کانسرهای خون[۲۷و۲۶] عصبی[۲۹و۲۸] و پستان[۳۰] باشند.[۲] نظر به این‌که نتایج مطالعات انجام شده به پتانسیل کاربردی فراوان SKPهای انسانی در درمان بیماری‌های سیستم عصبی و امتیازات استفاده از آن‌ها به‌عنوان یک منبع اتولوگ با قابلیت دسترسی آسان دلالت دارند.[۷-۴و۲] همچنین با توجه به کاهش تعداد و پتانسیل تمایزی SKPهای انسانی با افزایش سن و اهمیت نگهداری آن‌ها به‌صورت بانک‌های سلولی در مراحل اولیهٔ زندگی،[۱۷و۱۶] این مطالعه برای اولین بار در کشور در جهت جداسازی، کشت و تمایز SKPها از فور اسکین انسانی انجام شد. نتایج به‌دست آمده نشان داد که فور اسکین انسانی یک منبع مناسب برای سلول‌های پیش‌ساز عصبی است که می‌توانند به نورون و سلول گلیال تمایز یابند. با توجه به موارد ذکر شده لزوم مطالعه در زمینهٔ بهبود تکنیک تمایزی SKPهای انسانی در جهت افزایش درصد تمایز آن‌ها ضروری به‌نظر می‌رسد. همچنین انجام بررسی‌های بیشتر در

Archive of SID
www.SID.ir

شناسایی هویت واقعی سلول‌های SKP آشنایی با الگوی بیان پروتیین در آن‌ها و شناخت مناسبی از چگونگی دخالت فاکتورهای موثر در ایجاد تمایز SKPها به دودمان‌های خاص حائز اهمیت است. در این مطالعه مراحل جداسازی کشت، تکثیر و تمایز SKPها برای اولین‌بار در ایران، با موفقیت انجام شد و به‌عنوان اولین گام در استفاده از این سلول‌ها به‌عنوان یک منبع اتولوگ با دسترسی آسان جهت دستیابی به پیش‌سازهای عصبی به منظور کاربرد در زمینه اهداف مختلف درمانی و تحقیقاتی، می‌تواند راه‌گشای سایر علاقمندان باشد.

سپاسگزاری: با تشکر از معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه، که با حمایت مالی مناسب امکان انجام این مطالعه را فراهم نمود. از مساعدت بی‌دریغ دکتر ایزدی در جهت اجرای این تحقیق کمال امتنان را داریم. نویسندگان مراتب سپاس خود را از مساعدت خانم‌ها: کیانی، کشاورز، سهرابی، حصاری، شیاسی و مهنام و آقایان: میر آقایی، محمدی مطلق، پروانه و یاری اعلام می‌نمایند.

References

1. Toma JG, Akhavan M, Fernandes KJ, Barnabé-Heider F, Sadikot A, Kaplan DR, et al. Isolation of multipotent adult stem cells from the dermis of mammalian skin. *Nat Cell Biol* 2001;3(9):778-84.
2. Fernandes KJ, Toma JG, Miller FD. Multipotent skin-derived precursors: adult neural crest-related precursors with therapeutic potential. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2008;363(1489):185-98.
3. Nurse CA, Macintyre L, Diamond J. Reinnervation of the rat touch dome restores the Merkel cell population reduced after denervation. *Neuroscience* 1984;13(2):563-71.
4. Gingras M, Champigny MF, Berthod F. Differentiation of human adult skin-derived neuronal precursors into mature neurons. *J Cell Physiol* 2007;210(2):498-506.
5. Fernandes KJ, McKenzie IA, Mill P, Smith KM, Akhavan M, Barnabé-Heider F, et al. A dermal niche for multipotent adult skin-derived precursor cells. *Nat Cell Biol* 2004;6(11):1082-93. Erratum in: *Nat Cell Biol* 2005;7(5):531.
6. Fernandes KJ, Kobayashi NR, Gallagher CJ, Barnabé-Heider F, Aumont A, Kaplan DR, et al. Analysis of the neurogenic potential of multipotent skin-derived precursors. *Exp Neurol* 2006;201(1):32-48.
7. Toma JG, McKenzie IA, Bagli D, Miller FD. Isolation and characterization of multipotent skin-derived precursors from human skin. *Stem Cells* 2005;23(6):727-37.
8. Lavoie JF, Biernaskie JA, Chen Y, Bagli D, Alman B, Kaplan DR, et al. Skin-derived precursors differentiate into skeletogenic cell types and contribute to bone repair. *Stem Cells Dev* 2009;18(6):893-906.
9. Kawase Y, Yanagi Y, Takato T, Fujimoto M, Okochi H. Characterization of multipotent adult stem cells from the skin: transforming growth factor-beta (TGF-beta) facilitates cell growth. *Exp Cell Res* 2004;295(1):194-203.
10. Wong CE, Paratore C, Dours-Zimmermann MT, Rochat A, Pietri T, Suter U, et al. Neural crest-derived cells with stem cell features can be traced back to multiple lineages in the adult skin. *J Cell Biol* 2006;175(6):1005-15.
11. Linher K, Dyce P, Li J. Primordial germ cell-like cells differentiated in vitro from skin-derived stem cells. *PLoS One* 2009;4(12):e8263.
12. Guo W, Miao C, Liu S, Qiu Z, Li J, Duan E. Efficient differentiation of insulin-producing cells from skin-derived stem cells. *Cell Prolif* 2009;42(1):49-62.
13. Biernaskie J, Sparling JS, Liu J, Shannon CP, Plemel JR, Xie Y, et al. Skin-derived precursors generate myelinating Schwann cells that promote remyelination and functional recovery after contusion spinal cord injury. *J Neurosci* 2007;27(36):9545-59.
14. McKenzie IA, Biernaskie J, Toma JG, Midha R, Miller FD. Skin-derived precursors generate myelinating Schwann cells for the injured and dysmyelinated nervous system. *J Neurosci* 2006;26(24):6651-60.
15. Kubo A, Yoshida T, Kobayashi N, Yokoyama T, Mimura T, Nishiguchi T, et al. Efficient generation of dopamine neuron-like cells from skin-derived precursors with a synthetic peptide derived from von Hippel-Lindau protein. *Stem Cells Dev* 2009;18(10):1523-32.
16. Gago N, Pérez-López V, Sanz-Jaka JP, Cormenzana P, Eizaguirre I, Bernad A, et al. Age-dependent depletion of human skin-derived progenitor cells. *Stem Cells* 2009;27(5):1164-72.
17. Zouboulis CC, Adjaye J, Akamatsu H, Moe-Behrens G, Niemann C. Human skin stem cells and the ageing process. *Exp Gerontol* 2008;43(11):986-97.
18. Hoffman PN, Cleveland DW. Neurofilament and tubulin expression recapitulates the developmental program during axonal regeneration: induction of a specific beta-tubulin isotype. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1988;85(12):4530-3.
19. Lee MK, Cleveland DW. Neuronal intermediate filaments. *Annu Rev Neurosci* 1996;19:187-217.
20. Lendahl U, Zimmerman LB, McKay RD. CNS stem cells express a new class of intermediate filament protein. *Cell* 1990;60(4):585-95.
21. Chuckowree JA, Vickers JC. Cytoskeletal and morphological alterations underlying axonal sprouting after localized transection of cortical neuron axons in vitro. *J Neurosci* 2003;23(9):3715-25.
22. Gage FH. Mammalian neural stem cells. *Science* 2000;287(5457):1433-8.
23. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 1999;284(5411):143-7.
24. Casella GT, Bunge RP, Wood PM. Improved method for harvesting human Schwann cells from mature peripheral nerve and expansion in vitro. *Glia* 1996;17(4):327-38.
25. Rutkowski JL, Kirk CJ, Lerner MA, Tennekoon GI. Purification and expansion of human Schwann cells in vitro. *Nat Med* 1995;1(1):80-3.
26. Al-Hajj M, Becker MW, Wicha M, Weissman I, Clarke MF. Therapeutic implications of cancer stem cells. *Curr Opin Genet Dev* 2004;14(1):43-7.
27. Bonnet D, Dick JE. Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nat Med* 1997;3(7):730-7.
28. Singh SK, Clarke ID, Terasaki M, Bonn VE, Hawkins C, Squire J, et al. Identification of a cancer stem cell in human brain tumors. *Cancer Res* 2003;63(18):5821-8.
29. Singh SK, Hawkins C, Clarke ID, Squire JA, Bayani J, Hide T, et al. Identification of human brain tumour initiating cells. *Nature* 2004;432(7015):396-401.
30. Al-Hajj M, Wicha MS, Benito-Hernandez A, Morrison SJ, Clarke MF. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;100(7):3983-8. Epub 2003 Mar 10. Erratum in: *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;100(11):6890.

Archive of SID
www.SID.ir

Tehran University Medical Journal; Vol. 68, No. 9, Dec 2010: 508-515

Isolation of skin-derived precursors from human foreskin and their differentiation into neurons and glial cells

Mitra Bakhtiari PhD.[1]
Kamran Mansouri MSc.[2]
Ali Mostafaie PhD.[3*]
Yousef Sadeghi MD. PhD.[1]
Hadi Mozafari MSc.[4]
Rostam Ghorbani PhD.[5]
Mostafa Rezaei Tavirani PhD.[6]

1- Department of Anatomical Sciences & Biology, Shaheed Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran.
2- MSc. of Hematology, Medical Biology Research Center, Kermanshah University of Medical Sciences, Kermanshah, Iran.
3- Department of Immunology, Medical Biology Research Center, Kermanshah University of Medical Sciences, Kermanshah, Iran.
4- MSc. of Biochemistry, Medical Biology Research Center, Kermanshah University of Medical Sciences, Kermanshah, Iran.
5- Department of Anatomical Sciences & Biology, Kermanshah University of Medical Sciences, Kermanshah, Iran.
6- Proteomics Research Center, Shaheed Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

[*] Corresponding author: Medical Biology Research Center, Kermanshah University of Medical Sciences, Sorkheh Lizheh, Kermanshah, Iran, PO. Box: 6714869914
Tel: +98-831-4276473
email: amostafaie@kums.ac.ir

Received: September 05, 2010 Accepted: October 23, 2010

Abstract

Background: Skin-derived precursors (SKPs) are a type of progenitor cells extracted from mammalian dermal tissue and can be differentiate to neural and mesodermal lineage *in vitro*. These cells can introduce an accessible autologos source of neural precursor cells for treatment of different neurodegenerative diseases. This research was done in order to set up isolation, culture, proliferation and differentiation of human skin derived precursors (hSKPs).
Methods: Human foreskin samples were cut into smaller pieces and cultured in proliferation medium after enzymatic digestion. To induce neural differentiation, cells were cultured in neural differentiation medium after fifth passage. We used immunocytochemistry and RT-PCR for characterization of the cells. Neuron and glial cell differentiation potential was assessed by immunofloresence using specific antibodies. The experiments were carried out in triplicate.
Results: After differentiation, βIII- tubulin and neurofilament-M positive cells were observed that are specific markers for neurons. Moreover, glial fibrillary acid protein (GFAP) and S100 positive cells were identified that are markers specifically express in glial cells. Detected neurons and glials were also confirmed by their morphologic characterizations.
Conclusion: Our results demonstrated that skin-derived precursors obtained from human foreskin can exhibit neuronal and glial differentiation potential *in vitro*, depending on the protocols of induction.

Keywords: Skin-derived precursor, neural lineage, neuron, glial cell, differentiation.

Archive of SID

www.SID.ir