Archive of SID

فیزیولوژی و فارماکولوژی
جلد ۱۰، شماره ۱، بهار ۱۳۸۵

بررسی تأثیر افزایش آدنوزین مونوفسفات حلقوی درون سلولی در القاء نورون‌زایی بن‌یاخته‌های جنینی انسان

حسین بهاروند*، مریم حاتمی و محمد معصومی
پژوهشکده رویان، گروه سلولهای بنیادی

دریافت: خرداد ۱۳۸۴ بازبینی: بهمن ۱۳۸۴ پذیرش: تیر ۱۳۸۵

چکیده

هدف: مطالعه اثر افزایش آدنوزین مونوفسفات حلقوی (cAMP) ایجاد شده توسط دو فاکتور القائی ۳ ایزوبوتیل-۱- متیل گزانتین (IBMX) و دی بوتیریل آدنوزین مونوفسفات حلقوی (db-cAMP) بر تمایز بن یاخته‌های جنینی انسان به سلولهای عصبی.

مواد و روشها: در این مطالعه از کلونی‌های سلولهای بنیادی جنینی انسان (رویان H1) برای تولید سلولهای عصبی استفاده شد. به این منظور اجسام شبه جنینی(Embryoid body) با به کارگیری قطعاتی از کلونیهای جنینی انسان ساخته و به مدت ۶ روز تحت تیمار با استفاده از (۱) (۵×۱۰^{-۴} مولار) IBMX و ($۱۰^{-۹}$ مولار) db-cAMP یا (۲) ($۱۰^{-۶}$ مولار) رتینوئیک اسید (RA) و (۳) تیمار همزمان (IBMX+db-cAMP+RA) و(۴) کنترل قرارگرفتند. سپس اجسام شبه جنینی تیمار شده به صورت منفرد درمحیط کشت Neuro basal کشت شدند.

به منظور بررسی بازده عصب زایی تیمارهای انجام شده، علاوه بر بررسی‌های مورفولوژیکی از روش ایمونوسیتوشیمی بابکار گیری آنتی بادی های ویژه سلولهای عصبی بالغ مانند سیناپتوفیزین ، نوروفیلامنت پروتئین-سنگین ، بتا توبولین - III ، MAP-2 (Microtubule Associated Protein) و GFAP (Glial Fibrilary Acidic Protein) استفاده شد. همچنین برای بررسی کمی بیان ژن‌های درگیر در فرآیندعصب زایی واکنش نیمه کمی RT-PCR انجام شد.

یافته‌ها: در بررسی‌های مورفولوژیکی، آغاز مهاجرت ساختارهای استطاله‌های عصبی در روز (۴+۶+۴) مشاهده شد. مطالعات ایمونوسیتوشیمی با استفاده از آنتی‌بادی‌های مذکور آنتی‌ژنهای شاخص عصبی نشان داد که سلولهای تمایز یافته شامل سلولهای‌عصبی بالغ همچون نورون و آستروسیت می‌باشند.

ارزیابی بیان پروفایل ژن‌های درگیر در نورون‌زایی نشان داد ژن‌های سیناپتوفیزین ،Hash1 ، گیرنده β آدرنرژیک و گیرنده استیل کولین که در گروه اجسام شبه جنینی خاموش بوده‌اند پس از تیمار بیان آنها مشاهده شد. بررسی کمی بیان ژن‌های شاخص نورون‌های بالغ افزایش معنی‌دار گیرنده رتینوئیک اسید و سیناپتوفیزین و نوروفیلامنت پروتئین –متوسط و گیرنده β- آدرنرژیک را در طول زمان تمایز از روز (۴+۴) تا (۱۶+۶+۴) با استفاده از تیمار نشان داد که این افزایش بیان، در گروههای القاء شده با cAMP نسبت به دیگر گروهها (RA و کنترل) بیشتر بوده است(حداقل $p<۰/۰۵$).

نتیجه‌گیری: مشاهدات مورفولوژیکی و نتایج ایمونوسیتوشیمی و RT- PCR نیمه کمی نشان داد که cAMP می تواند به عنوان یک القاء کننده عصبی در بن یاخته‌های جنینی انسانی باشد.

واژه های کلیدی: بن یاخته‌های جنینی انسان ،cAMP، عصب‌زایی.

مقدمه

بن یاخته‌های جنینی انسان hESC (Human Embryonic Stem Cells) ، سلولهایی پرتوان هستند که از توده سلولی داخلی بلاستوسیست (Inner Cell Mass) منشاء گرفته و توانایی خود نوزایی (self –renewal) دارند [۱۹،۲۷].

این سلولها با قدرت تکثیر بالا در محیط آزمایشگاهی، قابلیت تمایز به انواع سلولهارا دارا هستند.پیشرفت‌های اخیر در زمینه فناوری سلولهای بنیادی جنینی نشان داده است پیش‌سازهای عصبی برگرفته از این سلولها ازتوان بالقوه بسیار بالایی در درمان برخوردار بوده و منبع سلولی نامحدودی در طب پیوند را ایجاد کرده اند، به‌طوری‌که در حال حاضر مطالعات فراوانی در زمینه استفاده از بن یاخته‌های جنینی و سلولهای پیش ساز برگرفته از آنها در درمان بیماریهای تحلیل رونده عصبی همچون پارکینسون و Amyotrophic Latral Sclerosis (ALS)

* پست الکترونیک نویسنده مسئول مکاتبات:
baharvand50@yahoo.com

www.SID.ir

Archive of SID

در حال انجام می‌باشد [برای مثال ر.ش ۱۳].

در ایـن راسـتا در ابتدا سـلولهای بن یاخته‌هـای جنینی به سـمت سـلولهای پیش‌سـاز نورواپی‌تلیالـی تمایـز داده می شـوند. برای ایـن منظـور از مـواد القاء کننده ای همچـون رتینوئیک اسـید (RA) [۳] ، اسـید آسـکوربیک[۴] ،۱۷ـ بتااسـترادیول[۱۷]، استورسـپورین [۲۵] و Bone Morphogenic Protein(BMP) [۳۰] اسـتفاده شده است که موجب راه‌اندازی آبشـارهای مولکولی متفـاوت درتمایز بن یاخته‌های جنینـی به گروههـای خاصی از جمعیت‌های سـلولی عصبی می‌شـوند. در طی این مسـیرهافاکتورهای نروتروپیک و سـایتوکاین‌های گوناگون همچـون Glial - Derived Neurotrohic Factor (GDNF) ، Neuroturin (NTN) و Nerve Growth Factor (NGF) در بقاء و تمایز سلولهای عصبی نقش مهمی را بازی می‌کنند[۶،۲۱،۱۱].

cAMP (cyclic Adenosine Mono Phosphate) یکـی دیگر ازالقاءگرهای پیشـنهادی در مسیر عصب زایی است [۱۰]. این ماده پیامبر ثانویه و مولکول سـیگنال دهنده وسیع طیفی است که توسط آنزیم آدنیلات سیکلازساخته و توسـط آنزیم فسفودی استراز متابولیزه می‌شود [۶]. نقـش اولیه این ماده فعال کردن مجموعه‌ای از پروتئین‌کینازها و در نهایت القاء بیان گروهی از ژن‌ها می‌باشد. چنانچه نشان داده است افزایش سطح cAMP درون سلولی موجب فعال شدن پروتئین کینازA (PKA) و آبشارهای کینازی وابسته به آن شده و در نهایت بافسفریلاسیون گروهی از پروتئینها موجب القاءبیان ژن‌های درگیر در فرآیند عصب‌زایی می‌شوند [۱۶].

در ایـن مطالعـه از دو ترکیـب db-cAMP (دی‌بوتیریـل آدنوزین مونوفسـفات حلقـوی) که از لحاظ سـاختاری آنالوگ cAMP اسـت و IBMX (۳ـ ایزوبوتیل ـ ۱ـ متیل گزانتین) که مهارکننده فسفودی‌استراز است برای افزایش سـطح cAMP درون سلولی استفاده شد. با توجه به پتانسیل نورون‌زایی cAMP در سایر سلولها، این مطالعه به منظور بررسی اثر القائی این ماده بر بن یاخته های جنینی انسانی و ارزیابی پروفایل بیانی ژن‌های درگیر در این مسیر انجام شد.

مواد و روشها

در ایـن مطالعه از بن یاخته های جنینی انسـان رویان H1 اسـتفاده شـد[۱]. این سـلولها بر فیبروبلاسـتهای جنین موش ۵/۱۳ـ۵/۱۲ روزه NMRI که قبـلاً با مایتومایسـین (Sigma; M0503 10 µg/ml) رونـد تقسـیم سـلولی شـان متوقف شـده اسـت و در ظروف کشـت (Falcon; 3037) پوشـیده شـده بـا ژلاتیـن ۰/۱ درصـد (Sigma; G2500) و محیط hESC کشت می شوند. محیط hESC حاوی مواد ذیل می باشد.

• Knockout Dulbecco's modified Eagels medium (Gibco; 10829- 018), 2mM glutamine (Gibco; 25030-024), 1% nonessential amino acid (Gibco; 10439-024),

• 20% ES- Qualified fetal calf serum (Gibco; 11140 - 035),

• 0.1 mM β-mercaptoethanal (Sigma; M 7522),

• Insulin transferrin- selenium (Gibco; 41400 - 045),

• Penicillin, 100 µg/ml, Streptomycin 100 unit/ml (Gibco; 15070-063)

سـلولها تحت شرایط نگهداری ۵ درصد CO_2 و رطوبت ۹۵ درصد و دمای ۳۷ درجه سانتی گراد ودر شرایط اتمسفر (اکسیژن حدود ۲۰ درصد) در طی ۷ روز رشد و تکثیر یافتند و با استفاده از میکروسکوپ فاز کنتراست معکوس (Olympus (CKX 41 مورد بررسی و ارزیابی قرار گرفتند.

القاء تمایز

به منظور القاء تمایز در ابتدا کلنی های بن یاخته های جنینی انسانی رویان H1 با استفاده از روش مکانیکی و میکروسکوپ استریوفازکنتراست برش زده شد و قطعات ۲۰۰ تا ۵۰۰ سـلولی حاصل که شامل نواحی سـلولی تمایز نیافته بن یاخته های جنینی انسـان بودند به منظور تشکیل اجسـام شـبه جنینی در محیط hESC به صورت قطرات آویـزان (hanging drop) به مدت دو روز کشـت شـدند. سـپس اجسام شبه جنینـی به ظـروف باکتریایـی (Greiner; Germany – 628102) انتقـال یافتـه و در محیـط hESC بـرای دو روز دیگر بصـورت معلق کشـت داده شـدند. بعـد از گذشـت دو روز , اجسـام شـبه جنینـی در ظـروف باکتریایـی به ۴ گروه تقسـیم شـدند و همه گروههـا به محیط (Dulbecco modified Eagel 's medium: Ham's F-12) (DMEM/F12) (Gibco; 21331-020) واجـد L-glutamine (Gibco; 2503024) Insulin transferrin-selenium (Gibco; 41400 - 045), منتقـل شـده و تحـت تیمار در ۴ گروه با غلظت های مشـخص قرار گرفتند. گروه های مورد مطالعه عبارت بودند از:

الـف) دی بوتیریـل آدنوزیـن مونوفسـفات db- cAMP (Sigma; D0627 : 10^{-9} مـولار) و ۳ـ ایزوبوتیـل ـ۱ـ متیل گزانتین (IBMX) (Sigma; 15879 : 5×10^{-4} مولار)

ب) اسید رتینوئیک(RA) (Sigma; R- 2625 : 10^{-6} مولار)

ج) RA (10^{-6} مـولار) و db-cAMP (10^{-9} مـولار) و IBMX (5×10^{-4} مولار)

د) کنترل (بدون تیمار)

تیمار اجسـام شـبه جنینی هر ۲ روز یکبار همراه با تعویض محیط به مدت ۶ روز ادامه یافت. در روز(۶ + ۴) اجسام شبه جنینی تیمار شده در هر سـه گروه و گروه کنترل به صورت منفرد به درون ظروف کشـت ۲۴ خانه (Tpp : Switzerland) پوشیده شده با ژلاتین ۰/۱درصد دارای محیط کشـت Neurobasal medium (Gibco; 21103- 046)

www.SID.ir

Archive of SID

واجـــد ۲ درصد B27 (Gibco; 17504 - 044) و ۱۰ درصد سـرم جنینـی گاوی (Gibco; 1027 106) (fetal calf serum) منتقل و هر ۴ روز یکبار نیمی از محیط تعویض گردید. ارزیابی سلولها با استفاده از میکروسکوپ فازکنتراست معکوس انجام گرفت.

ایمونوسیتوشیمی

۱۲روز بعد از کشـت اجسام شـبه جنینی تیمار یافته در درون ظروف کشـت سـلولهای موردنظر توسـط پارافرمالدئید ۴ درصد تثبیت شدند و سـپس با سرم ۱۰ درصد بز به مدت ۳۰ دقیقه تیمار شده و جهت بررسی آنتی‌ژن‌های اختصاصی سلولهای‌عصبی از آنتی‌بادیهای Microtubule Associated Protein [2(a+b)] (MAP-2) (1:200) (Sigma: M-1406) Neurofilament Protein-Heavy chain (NF-H) (1:50) (Sigma; N-0142), Synaptophysin (1:250)(Sigma; S-5768) β-Tubulin III (Sigma; T-8660) (1:250) در طی ۴ بار تکرار استفاده گردید.

بعـد از یک سـاعت تیمار و انکوباسـیون بـا آنتی‌بادیهای اولیـه در دمای ۳۷ درجه سـانتی‌گراد و رطوبت اشـباع سـلولها دوبار با استفاده از PBS+Tween 20 (۰/۰۵ درصـد) شستشـو شـده و برای شناسـایی از آنتی‌بـادی ثانویـه(Sigma; F-9006) و anti mouse IgG (FITC-Conjugated1:200) به مدت یکسـاعت در دمای ۳۷درجه و رطوبـت اشـباع قـرار گرفت . سـپس نمونـه توسـط (۰/۰۵ درصد) PBS/Tween 20 درصد شستشـو شده، سـلولها توسط میکروسکوپ فلورسـنت Nicon eclips TE 2004 مـورد بررسـی وارزیابـی قرار گرفـت. البته برای رنـگ آمیزی سـلولهای گلیال بعد از تثبیت سـلولها بـا اسـتفاده از متانـل/ اسـتون بـه نسـبت ۱:۳ از کیت آزمایشـگاهی Glial fibrilary acidic protein (GFAP) Sigma:IMMH-6 در ۴ بار استفاده شد.

آنالیـز نیمـه کمی نسـخه بـرداری معکـوس ـ واکنـش زنجیروار پلیمرازی(RT-PCR)

بـرای ارزیابی کمی بیـان ژن‌های درگیر در عصب‌زایـی از تکنیک نیمه کمی RT-PCR اسـتفاده شـد لیسـت ژن‌هایی که در این مطالعه اسـتفاده قرار گرفـت به همـراه پرایمرهای آنها، طـول قطعـات تکثیر شـده و دمای بـاز سرشـتی(annealing) ایـن پرایمرهـا در جدول (۱) خلاصه شـده اسـت. در ابتدا RNA اجسام شـبه جنینی (EBs) و سـلولهای تمایز یافته در روزهای (۴+۴)و(۱۶+۶+۴) با اسـتفاده از کیت Nucleospin RNAII (74055;mN) اسـتخراج شـد. برای حذف آلودگـی RNA هـای اسـتخراج شـده از DNA ژنومیک، نمونه‌هـای اسـتخراج شـده تحـت تیماربـا آنزیـم(DNase I(EN0521; Fermentas قرار گرفتند غلظت RNAهای استخراج شده توسط روش اسپکتروفتومتری تعیین گردید. ۲میکروگرم از RNA با به کار بردن پرایمر

جدول ۱- توالی پرایمرهای ژنهای شاخص عصبی به همراه طول قطعهٔ تکثیر شده ودمای باز سرشتی

نام ژن	توالی پرایمر ´3-´5	دمای بازسرشتی	اندازه قطعه	Gene Bank Code
Synaptophysin	Forward: 5` GGT CAG TTC CGG GTG GTC A3` Reverse: 5` GGT ACT TGT TCT GCA GGA AGA3`	۵۸	۲۳۶	BC -06550
RAR-α (Retinoic Acid Receptor-α)	Forward: 5` CCA GCT TCC AGT CAG TGG TTA 3` Reverse: 5` GGC AGT ACT GGC AGC GGT T 3`	۶۰	۳۳۲	AC-09042
NFM (Neuro filament Protein Medium chain)	Forward: 5` GGC ACA AAG TGG GAA ATG G3` Reverse: 5` CCT TCA TGG AAG CGG CCA A3`	۵۸	۳۴۳	XM -54323
Nestin	Forward: 5` CTC TGA CCT GTC AGA AGA AT3` Reverse: 5` CCC ACT TTC TTC CTC ATCTG3`	۵۸	۱۷۲	X-65964
OTX2	Forward: 5` GGC TTC AGG TTA TAG TCA AG 3` Reverse: 5` AGG AGG CAG TTT GGT CCT TA 3`	۶۰	۲۵۳	NM-17233
Pax 6	Forward: 5` CAG CTC GGT GGT GTC TTT G 3` Reverse: 5` AGT CGC TAC TCT CGG TTT A 3`	۶۰	۲۵۵	NM-001604
Wnt1	Forward: 5` CCT CCA CGA ACC TGC TTA CA3` Reverse: 5` TCG GGT GAC GAT CTT GCC GAA 3`	۶۲	۲۳۳	NM-00543
Hash-1 (Human achaete-scute complex homologue)	Forward: 5` CCA ACT ACT CCA ACG ACT 3` Reverse: 5` TGC GAT CAC CCT GCT TCC AA3`	۶۰	۱۸۴	NM-004316
Beta adrenergic 1 Receptor (β - 1AR)	Forward: 5` CTG CCT CCC GCC AGC GAA A 3` Reverse: 5` GTC CAC AGC TCG CAG AAG AA3`	۶۴	۲۷۷	NM-00684
AchR (Acetyl Cholin Receptor)	Forward: 5` AGG CAG ATA TCA GTG GCT ATA 3` Reverse: 5` AGC CAC GAG CAG CAT GAA GA3`	۶۰	۲۸۹	BC -030757
Oct - 4	Forward:5`CTT GCT GCA GAA GTG GGT GGA GGA A3` Reverse: 5` CTG CAG TGT GGG TTT CGG GCA 3`	۶۷	۱۸۷	NM-000842
β-actin	Forward: 5` CGC ACC ACT GGC ATT GTC AT 3` Reverse: TTC TCC TTG ATG ATG TCA CGC AC3`	۶۲	۲۰۰	NM-00271

www.SID.ir

Archive of SID

Random Hexamer و کیت Revert Adi^{TM} First Strand cDNA Synthesis (K1622; Fermentas) مطابق دستور العمل به Complementary DNA (cDNA) تبدیل شد. سپس روی cDNAهای تولیدی واکنش PCR صورت گرفت. به منظور انجام PCR موارد زیر در یک لوله PCR مخلوط شدند: ۲/۵µl ۱۰ X PCR buffer، ۲µl DNA (۵۰ng/µl)، ۰/۷۵ µl $MgCl_2$، ۰/۵ µl dNTP Mix (۱۰Mm) از هر پرایمر (۱۰ µM) ۱ µl، (سیناژن، G ۱۰۹ TAX) (۵Unit/ µl) SmarTaq ۰/۵ µl در نهایت با استفاده از آب دوبار تقطیر فاقد یون به حجم ۲۵ µl رسانده شد PCR در داخل‌دستگاه Master cycler gradiant machine (Eppendrof, Germany) انجام شد. شرایط PCR به‌صورت زیر بود:

۱) واسرشتگی(denaturation) اولیه: ۵ دقیقه، ۹۳ درجه سانتی‌گراد

۲) واسرشتگی هر سیکل: ۴۵ ثانیه، ۹۳ درجه سانتی‌گراد

۳) دمای باز سرشتی هر سیکل: ۴۵ ثانیه در دمای باز سرشتی مربوط به هر جفت پرایمر که در جدول ۱ ذکر شده است .

۴) طویل شدن (extension) هر سیکل: ۴۵ ثانیه، ۷۲ درجه سانتی‌گراد

۵) طویل شدن نهایی: ۱۰ دقیقه ۷۲ درجه سانتی گراد

تعداد سیکل‌ها برای تمام ژن‌ها به استثنای β-actin که به عنوان استاندارد داخلی استفاده شد ۳۰ سیکل بود که تقریباً در ناحیه لگاریتمی PCR هر ژن بود PCR با استفاده از پرایمرهای β -actin در ۲۰ سیکل (ناحیه لگاریتمی PCR برای ژن β- actin) انجام شد. سپس محصولات PCR روی ژل آگارز ۱/۵ درصدالکتروفورز شدند. ژلها توسط اتیدیوم بروماید (۱۰ µg/ml) رنگ‌آمیزی شده و توسط دستگاه UV transeluminator (UVIdoc, UK) از آن عکسبرداری صورت گرفت. تصاویر به دست آمده، توسط برنامه UVI bandmap (UVItec, Cambridge) آنالیز شدند. نتایج کمی RT-PCR برای هر ژن حاصل‌نسبت سیگنال به دست آمده از آن ژن به سیگنال به دست آمده از ژن β-actin بود. آزمایش نیمه کمی RT-PCR برای هر گروه چهار بار تکرار شد.

روش آماری

مطالعه حاضر به صورت Parallel experimental design طراحی و در آن بن یاخته‌های جنینی انسان به‌صورت تصادفی به چهار گروه کنترل, RA, cAMP و cAMP+RA تقسیم و مورد مطالعه قرار گرفت. در پایان روزهای (۴+۶+۴) و (۸+۶+۴) و (۱۲+۶+۴) تعداد اجسام شبه جنینی که به سمت عصب تمایز یافته و واجد بیش از ده درصد از تراکم سلولی دارای مورفولوژی عصبی بودند درهر گروه جداگانه شمارش شده و نسبت به تعداد کل اجسام شبه جنینی در همان گروه و به شکل درصد گزارش شد. آزمایش چهار بار تکرار شده و در نهایت نتایج به صورت(انحراف معیار ± میانگین) گزارش شد. برای ارزیابی معنی‌دار بودن اختلاف عصب زایی بین گروهها در روزهای مورد مطالعه از تست آماری GLM(Gernal Linear Model) استفاده شد در مورد نتایج به دست آمده از آنالیز نیمه کمی RT-PCR نیز از تست آماریGLM برای ارزیابی معنی‌دار بودن اختلاف بیان یک ژن در گروهها و روزهای مورد مطالعه استفاده شد.

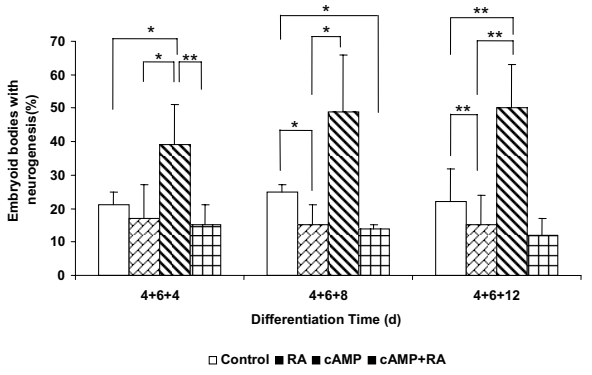
نتایج

مشاهدات مورفولوژیک

همانطور که در شکل ۱ مشاهده می‌شود درصد عصب‌زایی در بن‌یاخته‌های جنینی انسانی، رویان H1 که تحت تیمار در (۱۲+۶+۴) روز پس از تیمار و کشت با مشاهده مستقیم توسط میکروسکوپ معکوس تعیین و با یکدیگر و با گروه کنترل (گروهی که تحت تیمار هیچ‌گونه القاءکننده‌ای نبوده است و نشاندهنده تمایز خودبه‌خودی بن‌یاخته‌های جنینی انسان به سمت عصب می‌باشد) مقایسه شد. در اینجا معیار تمایزبه سمت عصب در بن‌یاخته‌های جنینی انسانی وجود استطاله‌های آکسونی و دندریت‌ها در این سلولها بود و EBهای دارای بیش از ۱۰٪ عصب به عنوانEB عصب دار در نظر گرفته شد . درصد اجسام سلولی دارای سلول عصبی در گروه cAMP بیش از گروههای دیگر بود واین موضوع باگذشت زمان حفظ شد(حداقل $P< 0.05$) بطوریکه حدود ٪۴۰-۵۰ اجسام سلولی در گروه تیمار شده با cAMP دارای سلولهای عصبی بودند این در حالی بود که با تیمار RA و یا مجموع cAMP +RA اجسام سلولی تمایز چندانی به عصب نداشتند و نسبت به گروه کنترل تفاوتی نمی کردند (شکل ۱).

تجلی ژنهای عصبی در سلولهای تمایزیافته

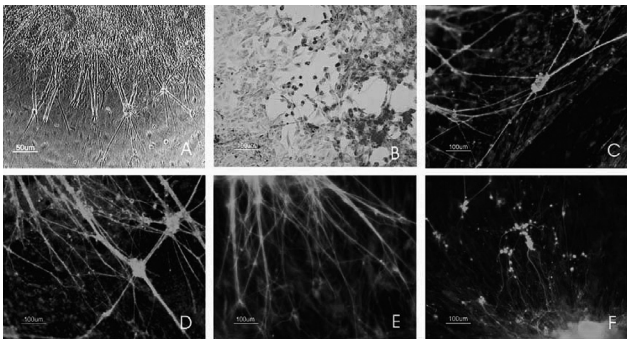
برای بررسی اینکه این ساختارهای القاء شده، ساختارهای عصبی می‌باشند و استطاله‌های مشاهده شده در زیرمیکروسکوپ فاز کنتراست معکوس همان اکسونهای سلولهای عصبی است با استفاده از آنتی‌بادیهای



شکل ۱- مقایسه درصد نورون زایی در اجسام شبه جنینی در روزهای (۴+۶+۴) و (۸+۶+۴) و(۱۲+۶+۴) در گروههای تحت تیمار وکنترل $p<0.05$:** , $p<0.01$:*

www.SID.ir

Archive of SID

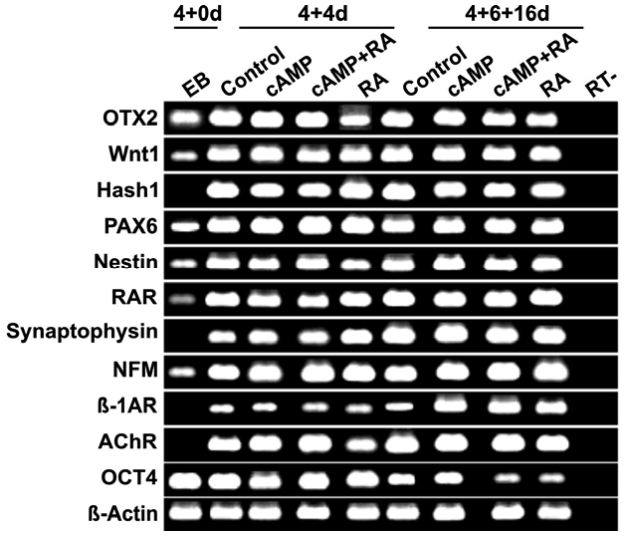


شکل ۲ – سلولهای عصبی تمایز یافته از بن یاختـه های جنینی . (A) میکروسکوپ فاز کنتراست ،و ایمونوسیتوشیمی با استفاده از آنتی بادی علیه (B) GFAP، (C) بتا-توبولین III، (D) سیناپتوفیزین، (E) MAP-۲، (F) نوروفیلامنت پروتئین – زنجیره سنگین.

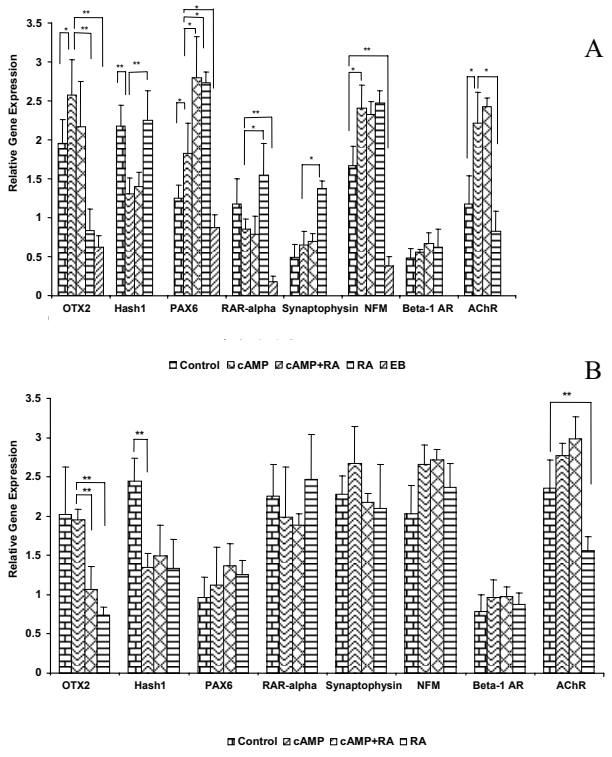
اختصاصی سلولهای عصبی ایمونوسیتوشیمی انجام شد. سلولهای القاء شده نسبت به آنتی‌بادیهای اختصاصی عصبی بر علیه سیناپتوفیزین،نوروفیلامنت پروتئین –سنگین، بتا توبولین- III ، MAP-2, GFAP و مثبت بوده و نشـان دهنده تشکیل سلولهای عصبی بالغ و بیان شـاخص های بالغ عصبی در سلولهای تمایز یافته می باشد(شکل ۲).

همانطوری‌که در شـکل های (ب،الف–۴) و ۳ مشـاهده می‌شود به منظور ارزیابی پروفایل بیانی ژنهای درگیر در میسـر عصب‌زائی، واکنش نیمه کمی RT-PCR در روزهای (۴+۴) و (۱۶+۶+۴) رویRNA های اسـتخراج شده از سـلولهای تیمارشده به وسـیله,cAMP+RA, RA cAMP و کنتـرل و همچنین اجسـام شـبه جنینی انجام شـد. ژنهای سیناپتوفیزین ,Hash1 , گیرنده بتا آدرنرژیک و گیرنده استیل کولین که در گروه اجسام شبه جنینی خاموش بوده‌اند پس ازتیمار، در گروههای القاء شده بیان شدند (شکل۳).

ارزیابـی نیمه کمی بیان ژن PAX6 به‌عنوان یکی از شـاخص های آنتـی ژنـی مراحل اولیه القـاء نورون‌زایی، بیان بالای ایـن ژن را در روز



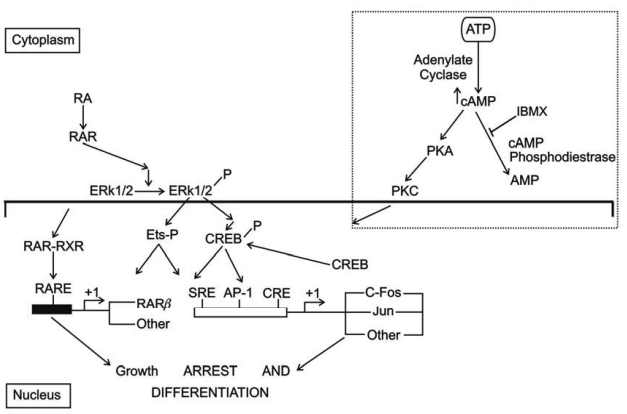
شکل ۳– نتایج RT-PCR نیمه کمی ژنهای در در عصب زائی



شکل ۴– بررسـی نیمه کمی بیان ژنهای در گیر در عصب زائی در روزهای ۴+۴ (A)و ۱۶+۶+۴ (B) سیگنال بدست آمده از بیان هر یک ژنهای فوق نسبت به سیگنال بدست آمده از بیان ژن β-actin سـنجیده شده است .نمودارها حاصل چهار بار تکرار بوده و به صورت میانگین ± انحراف نشان داده شده است. (**p<0.01), (*p<0.05)

(۴+۴) در تمام گروههای تیمار شـده نسـبت‌به گروه کنترل نشـان داد ($p<0.05$). بیـان ایـن ژن در روز(۱۶+۶+۴) بـا کاهـش معنـی‌داری ($p<0.01$) در تمام گروهها مواجه شد.

در گروههـای cAMP و cAMP+RA بـه ترتیب کاهش در بیان ژن OTX2 که از جمله دیگر شاخص های آنتی ژنی مراحل اولیه نورون زایی شناخته شده اسـت در روز (۱۶+۶+۴) نسبت به روز (۴+۴) مشاهده شـد. در مورد بیان ژن Wnt 1 و Nestin (شـاخصهای پیش سـازهای عصبی) تغییر معنی‌داری‌در طول زمان مشـاهده نشـد. بررسی نیمه کمّی



شکل ۵– مکانیسـم مولکولی القاء نورونزایی تحت تاثیر اسـید رتینوئیک و افزایش سطح cAMP به واسطه فسفوریله شدن CREB در طی مسیر ERK/1-2 و PKA [۲۵]. با کمی تغییر (کادر نقطه چین)

www.SID.ir

Archive of SID

بیان ژنهای شـاخص نورونهای بالغ افزایش معنـی‌داری رادر بیان ژنهای سـیناپتوفیزین، نوروفیلامنت پروتئین –متوسـط وگیرنـده β آدرنرژیک درطـول زمان تمایـز از(۴+۴)تا(۱۶+۶+۴) با اسـتفاده از تیمار نشـان داد، که این افزایش بیان در گروههای القاء شـده با cAMP نسـبت به دیگر گروهها بیشـتر بوده اسـت. پروفایل بیانی ژن گیرنده استیل کولین در گروههای مختلف نشـان داد که این ژن در گروههای تیمار شـده با cAMP[(cAMP+RA) و (cAMP)] نسبت به دیگر گروهها در هر دوروز (۴+۴) و(۱۶+۶+۴) از بیان بالاتری برخوردار است. همچنین گروه تیماری RA افزایش چشمگیر سطح mRNA گیرنده α رتینوئیک اسید را در روز (۴+۴) و در ادامه افزایش زمان کشت در همین گروه نسبت به سایر گروه ها نشان داد (شکلA,B– ۴،شکل ۳).

بحث

بن یاخته های جنینی تحت تاثیر مواد القاء کننده به سلولهای عصبی تمایزپیدا می کنند.این مواد سـبب راه اندازی مکانسیم های بیوشیمیایی و آبشـارهای مولکولی القاءگر ژنهای ویـژه عصب زایی در طی دو مرحله پاسـخ فوری وتاخیری و بروز مورفولوژی عصبی در این سـلولها می شود [۲۴،۹] .

دراین مطالعه به بررسی فعالیت نورون‌زایی cAMP بر بن‌یاخته‌های جنینی انسـانی پرداخته شـد. مطالعات قبلی‌نشـان داده اسـت که تنظیم فعالیت cAMP درون سلولی در روند عمومی تمایز عصبی همچون Neuronal synaptic plasticity, Neuronal Transmission, Axonal projection, Axonal guidance از اهمیت بسزائی برخوردار است [۱۵،۱۸،۸].

نشـان داده‌شـده اسـت که cAMP بر دودمانهای سـلولی مختلف اثـرات القائـی گوناگـون را در جهـت نورون‌زایـی اعمـال می‌کنـد. القـاء دودمـان سلولی‌نوروبلاسـتومای (SH-SY5Y) بـا cAMP نورون‌هایـی را بوجود می‌آورد که بیشـتر صفات اختصاصـی نورون‌های CNS (Central Nervous System) را بیـان می‌کند. در حالی که نشان داده شده بود که القاءدودمان سـلولی PC12 (فئوکروموسایتومای رت) بـا cAMP منجـر بـه تولیـد نورون‌هایـی بـا خصوصیـات PNS(Peripheral Nervous System) می‌شود[۲۲,۲۱].

از طرفی القاء سلولهای استرومای مغز استخوان انسان با cAMP منجر به ظهور مورفولوژی شبه نورونی (Neuron Like Cells) کاهش تکثیر سـلولی و افزایش سـطح بیان بعضی از مارکرهای‌اولیه عصبی همچون (NSE) (Neuron Specific Enolose) و Viementin می‌گـردد بیان ژن‌های مرحلـه بلوغ عصبی مثل نوروفیلامنت پروتئین –متوسـط MBP, GFAP, MAP-2, (Myelin Basic Protein) را مشاهده نشده است[۲۳].

در این مطالعه مشاهده شـد تیمار cAMP بر بن یاخته های جنینی انسـانی موجب القاء سـاختارهای عصبی در ۵۰ درصداجسام شبه جنینی تحـت تیمار می شـود. این میزان نسـبت به گروههای تیمـاری RA و cAMP+RA و کنترل بیشتر بود.همچنین نتایج نشان داد تیمار RA در طـی ۶ روز بـه منظور القـاء عصب زایی و راه اندازی مکانیسـم های مولکولی وابسته به آن در بن یاخته های جنینی انسان کافی نمی باشد.

نتایج ایمونوسیتوشیمی ، شاخصهای بالغ عصبی همچون سیناپتوفیزین نوروفیلامنت پروتئین –زنجیره سنگین، بتا توبولین- III ، MAP-2 و GFAP در گروههـای تیمـار و کنترل، نشـانگر بلوغ سلولهای عصبی تولیده شده می‌باشد . القاء و بیان ژن‌های بالغ عصبی در گروههای‌کنترل بدلیل پرتوانی بن یاخته های جنینی قابل پیش‌بینی بود. وجود آنتی ژن GFAP (شـاخص آستروسیتی) نشـان دهندهٔ وجود این دسته از سلولهای گلیال در بین سلولهای تمایز یافته است.

کم شدن معنی‌دار بیان ژن های PAX6 و OTX2 (ژن‌های مراحل اولیه تمایز عصبی که دربالا دسـت آبشار مولکولی منتهی به عصب زایی قرار دارند) در گروههای تیمار شده با RA و cAMP و cAMP+RA در طی زمان کشـت بیانگر این مطلب اسـت که افزایش زمان کشت باعث شده است که درصد بیشتری از سلولها از حالت نورواکتودرم اولیه خارج و به سمت سلولهای بالغ عصبی بروند.

درحالی که عدم وجود اختلاف معنی‌دار دربیان ژن های Nestin و Wnt-1 که از جمله دیگر ژن‌های مراحل اولیه تمایز عصبی هستند، در گروههای تیمار شـده با RA و cAMP و cAMP+RA در طی زمان کشت نشـان داد که گروههای تیماری فوق وشـرایط کشت بکار گرفته ،برای القاء همه ژنهای پیش سـاز عصبی مناسـب نبوده اسـت و چنانچه شرایط بطوری تغییر داده شود که بیان این گروه از ژنهای پیش ساز های عصبی نیز تحت تاثیر قرار گیرد، بازده القاء عصب زایی نیزافزایش یابد.

بررسـی نیمه کمـی بیان ژن‌هـای شـاخص نورون‌هـای بالـغ از قبیل‌سیناپتوفیزین ,نوروفیلامنت پروتئین –متوسط و گیرنده- β آدرنرژیک در طول زمان کشـت نشان دهنده افزایش معنی‌داری بیان این ژن‌ها در طول زمان اسـت. این افزایش‌در گروههای القاء شـده با cAMP تقریبا دوبرابر افزایش بیان همین ژن‌هـا در گروه کنترل (تمایز خودبه‌خودی) و تیمار RA بوده اسـت.همچنین نتایج نشان می دهد انجام تیمار cAMP برای تولید سلولهای عصبی حساس به استیل کولین نسبت به تیمار RA و کنتـرل ، از بازده مناسـب تری برخوردار می باشـد.افزایش چشـمگیر بیـان این ژن‌ها می‌تواند به دلیل وجود توالی‌های محافظت شـده CRE (cAMP Response Element) در فرادسـت پروموتـور این ژن‌ها باشـد[۲۴]. برای راه‌انداختن این مسـیر مولکولـی ابتـدا پروتئین‌کیناز A (PKA) به مولکولهای cAMP درون سـلولی متصل شـده و فعال می‌گردد. سـپس این آنزیم فعال شده به طورمستقیم باعث فسفریله شدن پروتئین‌های CREB (cAMP Response Element Binding) متصل شـده به ناحیه CRE ژن‌ها می‌شـود. ایـن CREB فسـفریله شـده به پروتئین CBP (cAMP Binding Protein) متصل‌شـده و ایـن کمپلکس می‌تواند به فاکتورهای نسـخه‌برداری متصل بـه ناحیه TATA متصل شـود و باعث فعال شدن‌نسخه‌برداری‌گردد[۱۶]. بنابراین

www.SID.ir

Archive of SID

وجود CRE در فرادست ژن‌های NF-M ,سیناپتوفیزین و گیرنده β ـ آدرنرژیک وتیمار بن‌یاخته‌های جنینی توسط cAMP باعث افزایش دوبرابری نسخه‌برداری این ژن‌ها گردیده است.

نشان داده شده است که RA می‌تواند به طور مستقیم و طی یک مسیر انتقال سیگنال پیچیده ERK1/2 (Extracellular Signal Regulated Kinase 1/2) که تمام اجزاء شرکت کننده در آن به خوبی‌شناخته نشده است موجب فسفریلاسیون CREB شود (شکل ۵) [۲۵]. ولی نتایج ما در مورد بیان ژن‌های بالغ عصبی NF-M سیناپتوفیزین و گیرنده β- آدرنرژیک نشان داد که میزان بیان این ژن‌ها در سلولهای تحت تیمار RA نصف بیان این ژن‌ها در سلولهای تیمار شده با cAMP و RA+cAMP است. این موضوع را می‌توان به دلیل شرایط متفاوت کشت ویا مناسب نبودن مدت زمان تیمار RA بر بن یاخته ها جنینی به منظور راه اندازی مسیرهای سیگنالینگ مولکولی (ERK1/2) ویا PKA در القاء عصب زایی دانست [۱۴،۲،۲۹،۲۳].

بیان ژن‌های اولیه و بالغ عصبی و Oct-4 (به عنوان شاخص سلولهای تمایز نیافته) در تمام گروههای تحت تیمار وکنترل در روزهای مورد مطالعه نشان دهنده هتروژنیسیته (ناهمگنی) جمعیت سلولی می‌باشد و نشان می‌دهد که در این‌جمعیت طیفی از سلولهای تمایز نیافته تا سلولهای بالغ عصبی وجود دارد. در این مطالعه که از cAMP به طور مستقیم برای فعال کردن مسیر القاء عصب‌زایی استفاده شد اثر سینرژیسمی و افزایشی بین cAMP و RA مشاهده نشد. مطالعات قبلی نیز نشان داده است که بکارگیری NGF و RA به منظور القاء عصب زایی بر سلولهای PC12 موجب افزایش فسفریلاسیون CREB و القاء میزان نورون زایی نشده واثر سینرژیسمی ندارند [۵].

همچنین بررسی تاثیر استوروسپورین و RA در القاء بن یاخته های جنینی موشی نشان داد این دو نسبت به یکدیگر اثر آنتاگونیستی داشته و استوروسپورین در طی مسیر MAP کیناز همچون NGF همراه با مهار پروتئین کیناز C (PKC) موجب القاء عصب زایی می شود [۲۵] با توجه به اینکه پروتئین CREB مولکول مشترک مسیرهای سیگنالینگ مختلفPKA و NGF و RA بوده و درطی هر سه مسیر فسفریله شدن این پروتئین منجر به القاء عصب زایی می‌گردد. بنابراین باید یک مکانیسم دقیق در کنترل فسفریلاسیون CREB و القاء تمایز عصبی در زمان فعال شدن هر سه مسیر، دخیل باشد. لذا اینگونه به نظر می‌رسد زمانی که‌مولکولهای CREB توسط یک مسیر فعال می‌شوند، فسفریلاسیون توسط مسیر دیگر را مهار می‌کنند. بنابراین، این نظریه که فعال شدن CREB تحت کنترل یک مکانیسم باز خوردی منفی است را تقویت‌می‌کند.

با توجه به این مطالعه از مولکول cAMP می‌توان به عنوان یک عامل القاء کننده عصب زایی در بن یاخته‌های جنینی‌به منظور مطالعه مسیرهای مولکولی درگیر در تکامل سیستم عصبی و مقاصد کلینیکی در طب پیوند بهره جست.

تشکر و قدردانی

بدینوسیله نویسندگان مقاله مراتب سپاس وقدر دانی خود را از همکاری صمیمانه خانم ها عادله طائی، نرگس زارع مهرجردی، اکرم تیموری و آقای احمد رضا باغستانی که ما را در انجام این مطالعه یاری نمودند مبذول می دارند. این مطالعه با حمایت پژوهشکده رویان انجام شد.

منابع

[1] Baharvand H, Ashtiani SK, Valojerdi MR, Shahverdi A, Taee A, Sabour D, Establishment and in vitro differentiation of a new embryonic stem cell line from human blastocyst. ***Differentiation*** 72 (2004) 224-9.

[2] Bain G, Kitchens D, Yao M, Huettner JE, Gottlieb DI, Embryonic stem cells express neuronal properties in vitro. ***Dev Biol*** 168(1995) 342-57.

[3] Bain G, Ray WJ, Yao M, Gottlieb DI, Retinoic acid promotes neural and represses mesodermal gene expression in mouse embryonic stem cells in culture. ***Biochem Biophys Res Commun*** 223(1996) 691-4.

[4] Barberi T, Klivenyi P, Calingasan NY, Lee H, Kawamata H, Loonam K, Perrier AL, Bruses J, Rubio ME, Topf N, Tabar V, Harrison NL, Beal MF, Moore MA, Studer L, Neural subtype specification of fertilization and nuclear transfer embryonic stem cells and application in parkinsonian mice.Nat Biotechnol (2003)1200-7.

[5] Canon E, Cosgaya JM, Scsucova S, Aranda A, Rapid effects of retinoic acid on CREB and and ERK phosphorylation in neuronal cells**.** ***Mol Biol Cell*** 5583 (2004)15-92.

[6] Cosgaya JM, Aranda A, Nerve growth factor activates the RARbeta2 promoter by a Ras-dependent mechanism ***Neurochem*** 76(2001) 661-71.

[7] Deng W, Obrocka M, Fischer I, Prockop DJ, In vitro differentiation of human marrow stromal cells into early progenitors of neural cells by conditions that increase intracellular cyclic AMP. ***Biochem Biophys Res Commun*** 282 (2001) 148-52.

[8] Dohovics R, Janaky R, Varga V, Hermann A, Saransaari P, Oja SS, Regulation of glutamatergic

www.SID.ir

Archive of SID

neurotransmission in the striatum by presynaptic adenylyl cyclase-dependent processes. ***Neurochem Int*** 42 (2003) 1-7.

[9] Ginty DD, Bonni A, Greenberg ME, Nerve growth factor activates a Ras-dependent protein kinase that stimulates c-fos transcription via phosphorylation of CREB.***Cell*** 77 (1994) 713-25.

[10] Gunning PW, Letourneau PC, Landreth GE, Shooter EM, The action of nerve growth factor and dibutyryl adenosine cyclic 3':5'-monophosphate on rat pheochromocytoma reveals distinct stages in the mechanisms underlying neurite outgrowth. ***J Neurosci*** 10 (1981) 1085-95.

[11] Horger BA, Nishimura MC, Armanini MP, Wang LC, Poulsen KT, Rosenblad C, Kirik D, Moffat B, Simmons L, Johnson E Jr, Milbrandt J, Rosenthal A, Bjorklund A, Vandlen RA, Hynes MA, Phillips HS, Neurturin exerts potent actions on survival and function of midbrain dopaminergic neurons.***J Neurosci*** 18 (1998)4929-37.

[12] Li M, Pevny L, Lovell-Badge R, Smith A,Generation of purified neural precursors from embryonic stem cells by lineage selection.***Curr Biol*** 8(1998) 971-4.

[13] Lonze BE, Ginty DD, Function and regulation of CREB family transcription factors in the nervous system.***Neuron***35(2002) 605-23 Review.

[14] Maden M, Role and distribution of retinoic acid during CNS development.***Int Rev Cytol*** 209 (2001) 1-77 Review.

[15] Ming GL, Song HJ, Berninger B, Holt CE, Tessier-Lavigne, M, Poo MM, cAMP-dependent growth cone guidance by netrin-1.***Neuron*** 19 (1997) 1225-35.

[16] Montmayeur JP, Borrelli E,Transcription mediated by a cAMP-responsive promoter element is reduced upon activation of dopamine D2 receptors. ***Proc Natl Acad Sci U S A***88 (1991) 3135-9 .

[17] Murashov AK, Pak ES, Hendricks WA, Tatko LM,17beta-Estradiol enhances neuronal differentiation of mouse embryonic stem cells. ***FEBS Lett*** 569 (2004)165-8.

[18] Ravary A, Muzerelle A, Herve D, Pascoli V, Ba-Charvet KN, Girault JA, Welker E, Gaspar P, Adenylate cyclase 1 as a key actor in the refinement of retinal projection maps. ***J Neurosci*** 23 (2003) 2228-38 .

[19] Reubinoff BE, Pera MF, Fong CY, Trounson A, Bongso A, Embryonic stem cell lines from human blastocysts: somatic differentiation in vitro. ***Nat Biotechnol*** 18 (2000) 399-404.

[20] Sanchez S, Jimenez C, Carrera AC, Diaz-Nido J, Avila J, Wandosell F, A cAMP-activated pathway, including PKA and PI3K, regulates neuronal differentiation. ***Neurochem Int*** 44(2004) 231-42.

[21] Sariola H, Saarma M, GDNF and its receptors in the regulation of the ureteric branching. ***Int J Dev Biol*** 43 (1999) 413-8 Review.

[22] Sayas CL, Moreno-Flores MT, Avila J, Wandosell F, The neurite retraction induced by lysophosphatidic acid increases Alzheimer's disease-like Tau phosphorylation. ***J Biol Chem*** 274(1999) 37046-52.

[23] Scheibe RJ, Ginty DD, Wagner JA, Retinoic acid stimulates the differentiation of PC12 cells that are deficient in cAMP-dependent protein kinase. ***J Cell Biol*** 113(1991) 1173-82 .

[24] Schuldiner M, Eiges R, Eden A, Yanuka O, Itskovitz-Eldor J, Goldstein RS, Benvenisty N, Induced neuronal differentiation of human embryonic stem cells. ***Brain Res*** 913(2001) 201-5.

[25] Schumacher A, Arnhold S, Addicks K, Doerfler W, Staurosporine is a potent activator of neuronal, glial, and "CNS stem cell-like" neurosphere differentiation in murine embryonic stem cells. ***Mol Cell Neurosci*** 23 (2003)669-80.

[26] Schumacher A, Arnhold S, Addicks K, Doerfler W. Staurosporine is a potent activator of neuronal, glial, and "CNS stem cell-like" neurosphere differentiation in murine embryonic stem cells.***Mol Cell Neurosci*** 23 (2003) 669-80.

[27] Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS, Jones JM,Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. ***Science*** 282(1998) 1145-7.

[28] Tokuda M, Hatase O, Regulation of neuronal plasticity in the central nervous system by phosphorylation and dephosphorylation. ***Mol Neurobiol*** 17 (1998) 137-56

www.SID.ir

Archive of SID

Review.

[29] Van Buskirk R, Corcoran T, Wagner JA, Clonal variants of PC12 pheochromocytoma cells with defects in cAMP-dependent protein kinases induce ornithine decarboxylase in response to nerve growth factor but not to adenosine agonists.***Mol Cell Biol*** 5 (1985) 1984-92.

[30] Yung SY, Gokhan S, Jurcsak J, Molero AE, Abrajano JJ, Mehler MF,Differential modulation of BMP signaling promotes the elaboration of cerebral cortical GABAergic neurons or oligodendrocytes from a common sonic hedgehog-responsive ventral forebrain progenitor species.***Proc Natl Acad Sci U S A*** 99 (2002) 16273-8 .

[31] Zhang, SC., Embryonic stem cells for neural replacement therapy: prospects and challenges, J Hematother ***Stem Cell Res*** 12)2003(625-34 Review.

متن کامل این مقاله از طریق وب سایت مجله قابل دسترسی است www.phypha.ir/ppj

www.SID.ir