Archive of SID

# جدا سازی سلولهای بنیادی رویانی موش با استفاده از دودمان سلولی Vero– به عنوان لایه تغذیه کننده و القای تمایز آن به سلولهای شبه عصبی در محیط کشت

فریبا اسماعیلی[1]، منصوره موحدین[2]، سید جواد مولی[3]، تقی طریحی*[4]

۱- دانشجوی دکتری گروه علوم تشریح، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس

۲- استادیار گروه علوم تشریح، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس

۳- استادیار گروه ژنتیک، دانشکده علوم پایه، دانشگاه تربیت مدرس

٤- استاد گروه علوم تشریح، دانشکده علوم پزشکی،دانشگاه تربیت مدرس

## چکیده

**هدف:** سلولهای بنیادی رویانی[1] سلولهایی چند استعدادی می باشند که به طور معمول از توده سلولی داخلی جنین در مرحله بلاستوسیت به دست می آیند. سلول ES در محیط کشی در حضور فاکتورمهاری لوسمی (LIF)[2] یا لایه تغذیه کننده سلولی ( دودمان STO فیبروبلاست یا فیبروبلاست حاصل از کشت اولیه) قادر است، دودمان سلولی پایدار، تمایز نیافته و با قدرت تزایدی بالا به وجود آورد. در واقع لایه تغذیه کننده از طریق ترشح LIF در محیط، از تمایز سلولی جلوگیری می کند. این ماده به وسیله سلول Vero تیمار شده با مایتومایسین C، نیز تولید و ترشح می شود. هدف اصلی در این پژوهش استفاده از دودمان مذکور برای جداسازی و کشت سلول ES موش بود. معیارهای ارزیابی سلولهای ES جداسازی شده در گزارش حاضر عبارتند از: مورفولوژی، توانایی تشکیل اجسام شبه جنینی و سنجش آنزیمی برای آنزیم آلکالین فسفاتاز. همچنین توانایی این سلولها در تمایز به سلولهای شبه عصبی نیز مورد بررسی قرار گرفت.

**مواد و روشها:** بلاستوسیستهای کاملاً گسترش یافته از موش ماده نژاد NMRI[3] پس از تحریک تخمک گذاری به دست آمد و بر روی تک لایه‌ای از سلول Vero غیر فعال شده با مایتومایسین-C، کشت داده شد. پس از گذشت چهار تا پنج روز توده سلولی داخلی به صورت مکانیکی برداشته و به وسیله محلول ۰/۲۵٪ تریپسین/ EDTA تریپسینه شد. سه تا چهار روز بعد کلونیهای متراکم ES قابل تشخیص بودند. تقریبا هر سه روز یک بار کلونیهای حاصل تریپسینه و بر روی تک لایه جدیدی از Vero- که به وسیله مایتومایسین C تیمار شده بود- منتقل شدند. وجود آنزیم آلکالین فسفاتاز در این سلولها با استفاده از آلفا نفتیل فسفات[4]- به عنوان سوبسترا- به اثبات رسید.

**نتایج:** از نظر مورفولوژی سلولهای ES کوچک و به هم فشرده و مرز بین آنها نامشخص بود. نسبت هسته

*نشانی مکاتبه: گروه علوم تشریح، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران.

1. Embryonic stem cells:ES cell
2. Leukema Inhibitory Factor
3. National Medical Research Institute
4. α- naphtyl phosphate

www.SID.ir

Archive of SID

به سیتوپلاسم بالا و هسته محتوی هستکهای کاملا مشخص و کلونیها شبیه کلونیهای ES موش بود. همچنین در این سلولها شاخص سلول ES یعنی آنزیم آلکالین فسفاتاز بیان شد. سلولهای ES حاصل در آزمایشگاه ما با استفاده از پروتکل +٤/-٤ تحت اثر القایی اسید رتینوییک قرار گرفتند. پس از گذشت چند روز سلولهایی با مورفولوژی شبه عصبی در محیط کشت ظاهر شد.

**نتیجه گیری:** نتایج این پژوهش نشان داد که دودمان سلولی Vero احتمالا لایه تغذیه کننده مناسبی برای جداسازی سلولهای ES است. اگرچه کاربرد دودمان مذکور بدین منظور هنوز مستلزم تحقیقات بسیاری است.

**کلید واژگان:** سلول بنیادی رویانی، دودمان سلولی Vero، لایه تغذیه کننده سلولی، رتینوییک اسید، تمایز عصبی.

## ۱- مقدمه

سه نوع دودمان سلولی چند استعدادی[1] که از سه منبع متفاوت به دست می آیند [۱] عبارتند از: سلولهای زایای جنینی[2] به دست آمده از سلولهای جنسی بدوی[3]، سلولهای کارسینومای جنینی مشتق شده از بافت تراتوکارسینوما و سرانجام سلولهای بنیادی رویانی[4]. این سلولها از نظر مورفولوژی، بیان شاخصهای سطحی و نیازمندیهای کشت، حتی در یک گونه نیز تا حدودی با یکدیگر متفاوتند. سلولهای بنیادین رویانی، دودمان سلولهای چند استعدادی می باشند که از جنین پیش لانه گزینی[5] در مرحله بلاستوسیت [۲-۵] یا بر طبق گزارشهای معدودی در مرحله مورولا[6] [٦]، هشت سلولی [٦-۸] یا دو سلولی [۹] به دست می‌آیند. این سلولها برای اولین بار در سال ۱۹۸۱ از بلاستوسیست موش جدا شدند[۳]. تا به امروز محققان موفق شده اند سلولهای ES را از بلاستوسیت بسیاری از گونه‌ها شامل موش، هامستر، مرغ، اسب ماهی، خوک، گوساله، پریماتها و اخیرا انسان جدا کنند [۱۰-۱۲]. سلولهای ES بسیار مشابه سلولهای اکتودرم اولیه در جنین پیش لانه گزینی بوده است [۱۳،۱٤]، دارای دو ویژگی منحصر به فرد می‌باشند: نخست، چنانچه گفته شد چند استعدادی بوده، پس از تمایز قادرند به تمام انواع سلولی از جمله دودمانهای سلولی خونساز، اندوتلیال، عضلانی و عصبی [۱٤] تبدیل شوند و دوم، بدون هیچگونه محدودیتی و بدون از دست دادن توانایی رشد و نمو، به طور نامتناهی تقسیم شوند. به عبارت دقیقتر این سلولها دارای قدرت تجدید خودبخودی می‌باشند[۱۰]. وجود این دو ویژگی سبب شده است که سلولهای مذکور به عنوان ابزاری مناسب در بسیاری از کارهای پژوهشی و درمانی محسوب شوند، مثلا مدل مناسبی برای بررسی مراحل تکوین به صورت *in vitro* و *in vivo* می‌باشند. در تولید موجودات ترانسژنیک مورد استفاده قرار می‌گیرند، اعمال تغییرات ژنتیکی در این سلولها به خوبی قابل انجام است و سرانجام سلولهای بنیادی رویانی، منبع نامحدودی برای استفاده در پیوند و ترمیم بافتها بوده و از این طریق کاربردهای درمانی بسیار گسترده‌ای دارند.

سلولهای بنیادی رویان انسان مدل بسیار مناسبی برای مطالعه مراحل ابتدایی دوران جنینی انسان، درک پدیده‌های تکوین طبیعی و غیر طبیعی، کشف ژنهای جدید در انسان و درک عمل این ژنها بوده، همچنین منبع سلولی عظیمی برای پیوند بافت و ژن درمانی فراهم می‌کنند [۸، ۱۵-۱۷]. امکان تولید سلولهای ES در حجم وسیع، تمایز آنها با فنوتیپ عصبی و استفاده از این سلولها در پیوند شاید جذابترین کاربرد تکنولوژی سلولهای ES باشد [۱۰]. در صورت حضور LIF[7] در محیط کشت، سلول ES قادر است بدون اینکه دچار تمایز شود تا چند نسل تکثیر شده، دودمان سلولی ES را تولید کند [۱۸-۲۰].

1. Pluripotent
2. Emboryonic germ cells= EG cells
3. Primordial germ cells
4. Emboryonic stem cells= ES cells
5. Preimplantation embryos
6. Self-renewing
7. Leukemia inhibitory factor


www.SID.ir

Archive of SID


LIF نوعی سایتوکاین بوده [۲۱] و تامین آن در محیط کشت ES به چند روش امکانپذیر است [۲۲،۹]: ۱- استفاده از لایه سلولی تغذیه کننده[1] تیمار شده با مایتومایسینC [۲۳] از سلولهایی که قادر به ترشح LIF می باشند. سلولی که تا کنون بدین منظور مورد استفاده قرار گرفته است سلول فیبروبلاست می‌باشد؛ این سلول به دو صورت دودمان سلولی فیبروبلاست (دودمان STO) یا فیبروبلاست اولیه جنینی[2] استفاده می شود. ۲- استفاده از لایه سلولی تغذیه کننده به اضافه محیط کشت ثانویه[3] محتوی LIF، ۳- استفاده از محیط کشت ثانویه محتوی LIF بدون لایه سلولی تغذیه کننده و سرانجام ٤- افزودن LIF نوترکیب[4] به محیط کشت.

در این پژوهش برای اولین بار دودمان سلولی Vero به عنوان لایه سلولی تغذیه کننده در جداسازی و کشت سلولهای ES مورد استفاده قرار گرفت. بر اساس گزارشهای موجود این سلول قادر به سنتز و ترشح LIF می باشد [۲۵،۲٤].

سلولهای ES که بدین ترتیب به دست آمد و در محیط کشت تکثیر و پایدار می شوند، دارای ویژگیهای منحصر به فردی هستند. در واقع این ویژگیها مبنای تشخیصی آنها را به وجود می آورند. روشهای متعددی برای ارزیابی دودمان سلولی ES وجود دارد که عبارتند از: ریخت شناسی[5]، شناسایی شاخصهای بیوشیمیایی از طریق ایمنوهیستوشیمی و سنجش انزیمی و همچنین بررسی قدرت تمایز به سلولها و بافتهای مختلف. در این پژوهش از معیارهای ریخت شناسی، توانایی تشکیل اجسام شبه جنینی، توانایی تمایز و سنجش آنزیمی برای آنزیم آلکالین فسفاتاز استفاده شد.

حذف عوامل مهار کننده تمایز از محیط کشت ( مانند LIF یا لایه تغذیه کننده سلولی ) به تمایز سلولهای بنیادی منجر می شود. این تمایز می تواند به صورت خود به خودی انجام شود یا با استفاده از ماده القا کننده به سوی فنوتیپ مورد دلخواه سوق داده شود. از جمله عوامل القا کننده اسید رتینوئیک[6] را می‌توان نام برد که یکی از مشتقات ویتامین A بوده، در رشد و نمو طبیعی موجود زنده از اهمیت ویژه ای برخوردار است [۲٦]. استفاده از این ماده با غلظت و روش مشخص در محیط کشت سلولهای بنیادی موجب می‌شود که این سلولها به سمت فنوتیپ سلول عصبی پیش بروند [۲۷،۱]. البته باید دانست که سلول بنیادی برای طی کردن بهتر و موفقتر مراحل تمایزی در اثر مواد القا کننده، ابتدا لازم است تا حدی مراحل تمایزی را به طور خود به خودی طی کند. بدین منظور سلولهای مذکور را روی بستری غیرچسبنده[7] کشت می‌دهند. در این صورت این سلولها دستجات معلق ایجاد می‌کنند که اجسام شبه جنینی[8] خوانده می‌شوند. این اجسام کروی شکل دارای هر سه لایه اولیه یعنی اکتودرم، مزودرم و آندودرم می‌باشند و شاخصهای ویژه هر سه لایه در آنها بیان می‌شود. در غیاب ماده القا کننده درصد کمی از سلولهای جسم شبه جنینی تبدیل به سلول عصبی می‌شوند. RA باعث بیان ژنهای عصبی و سرکوب ژنهای مزدور می‌شده، درصد تمایز سلولی به سمت سلول عصبی را افزایش می دهد [۱٤].

در این پژوهش ضمن جداسازی و کشت سلولهای بنیادی رویانی با استفاده از دودمان سلولی Vero به عنوان لایه تغذیه کننده، سلولهای ES حاصل یا استفاده از RA به سلولهایی با ریخت شناسی عصبی تمایز یافتند.

## ۲- مواد و روشها

### ۲-۱- جدا سازی و کشت سلولهای بنیادی

در این پژوهش از موش نژاد NMRI (انستیتو رازی تهران) استفاده شد. موشهای ماده شش تا هشت هفته‌ای تحریک تخمک‌گذاری[9] شده، ۹۳ تا ۹٦ ساعت پس از تزریق هورمون HCG کشته شدند. بلاستوسیستهای حاصل از فلاش شاخ رحمی بر روی تک لایه ای از سلول Vero (بانک سلولی انستیتو پاستور، تهران) کشت و در دمای ۳۷°C و فشار ۵٪ CO2 در انکوباتور قرار داده شدند. حدود ٤۸ ساعت بعد جنینها از زونا‌پلوسیدا خارج شدند. پس از گذشت چهار تا پنج روز سلولهای تروفواکتودرم به صورت لایه پهنی از سلولهای غول

1. Feeder cell layer
2. Primary embryonic fibroblast
3. Conditional (medium)
4. Recombinant LIF
5. Morphologic
6. Retinoic acid= RA
7. Nonadhesive
8. Emboryoid bodies= EBs
9. Superovulation

www.SID.ir

Archive of SID



پیکر به بستر کشت چسبیدند؛ در حالی که توده سلولی داخلی (ICM)[1] به صورت توده برجسته ای قابل تشخیص بود. این توده‌ها به روش مکانیکی جدا و پس از تریپسینه شدن به وسیله محلول ۰/۲۵٪ تریپسین/ EDTA به تک لایه جدید Vero منتقل شدند. پس از ۲٤ تا ٤۸ ساعت کلونیهای ES با مورفولوژی خاص خود قابل تشخیص بوده، از این پس به سرعت تکثیر شده و رشد کردند. این کلونیها تقریبا هر سه روز یک بار پاساژ داده شده و به تک لایه جدید Vero منتقل شدند. در تمام مراحل فوق، محیط کشت مورد استفاده۷ محیط ویژه سلول ES بود که عبارت است از: DMEM[2] (محتوی غلظت بالای گلوکز) + FBS[3] + ۰/۱mM بتامرکاپتواتانول + غلظت ۱٪ NEAA[4].

## ۲-۲- شناسایی نشانگرهای سلولی در سلولهای ES

برای تشخیص آنزیم آلکالین فسفاتاز در ابتدا سلولها با استفاده از اتانول مطلق فیکس شده، سپس به مدت نیم ساعت با آلفانفتیل فسفات- به عنوان سوبسترای آنزیم- اینکوبه شدند. واکنش آنزیم و سوبسترا به صورت نقاط قهوه‌ای تیره در زیر میکروسکوپ نوری قابل مشاهده بود.

## ۲-۳- تمایز در محیط کشت

برای اثبات قدرت تمایز در سلولهای بنیادی حاصل از دو روش استفاده شد: الف- حذف لایه تغذیه کننده و کشت معلق سلولهای ES کشت معلق با استفاده از روش قطره‌های آویزان انجام شد. بدین ترتیب سلولهای ES در ابتدا دستجات سلولی و سپس اجسام شبه جنینی را به وجود آوردند. ب- القای تمایز به وسیله اسید رتینوئیک. تشکیل EB مرحله مهمی در پروتکلهای استفاده از RA است زیرا این ماده موجب مرگ و میر گسترده‌ای در سلولهای ES تمایز نیافته می‌شود [۲۸]. EBها سپس با استفاده از پروتکل ٤۰/٤ [۲۷،۱] تحت اثر القایی RA قرار گرفتند. بدین ترتیب که چهار روز اول در محیط کشت فاقد RE و چهار روز بعد در محیط حاوی غلظت $۵ \times ۱۰^{-۷}$M (۰/۵μM) RA کشت داده شدند. پس از اتمام دوره القا به روش فوق، EBها در ظروف کشت پوشیده شده از محلول ۰/۱٪ ژلاتین قرار داده شدند. در این وضعیت اجسام شبه جنینی به کف ظرف کشت چسبیده، سلولهای در حال تزاید به صورت شعاعی از اطراف آنها بیرون زدند. پس از گذشت سه روز سلولهایی با ریخت شناسی عصبی مشاهده شد.

# ۳- نتایج

## ۳-۱- جداسازی سلولهای بنیادی رویانی

حدود چهار روز پس از کشت بلاستوسیت (شکل ۱- الف) و خروج آن از زونا‌پلوسیدا (شکل ۱-ب) ICMهای حاصل به روش مکانیکی جدا و تریپسینه شدند. یک تا دو روز پس از تریپسینه کردن ICMهای دارای کیفیت مناسب (شکل ۱-ج ، ۱-د) و انتقال آنها بر روی تک لایه جدید Vero، چند نوع کلونی در محیط کشت مشاهده شد. از جمله: کلونی تخت[5] سلولهای تروفواکتودرم متشکل از سلولهای غول پیکر چند وجهی و تا حدودی کشیده (شکل ۱-و). در این سلولها هسته، درشت و مشخص و سیتوپلاسم دانه دار است. انواع دیگر کلونی، کلونی سلولهای اپی تلیالی مشتمل بر سلولهای چند وجهی کوچکتر از سلولهای تروفواکتودرم، کلونی سلولهای اندودرمی و سرانجام کلونی مورد نظر ما یعنی کلونی سلولهای ES با ریخت شناسی ویژه خود بود. البته باید دقت کرد که تنها دستجات چند سلولی حاصل از تجزیه ICM قادر به تولید کلونی بودند نه سلولهای منفرد. پس از گذشت چند روز کلونیهای ES شناسایی، به صورت مکانیکی جدا و پس از تریپسینه شدن بر روی تک لایه جدید Vero منتقل شدند. سلولهای مذکور طی هفت پاساژ در حضور سلول Vero، به عنوان لایه تغذیه کننده، و بدون وجود LIF در محیط کشت به صورت تمایز نیافته باقی مانده، ویژگیهای سلول بنیادی رویانی را حفظ نموده، پایدار شدند. برای اثبات این که سلولهای به دست آمده به روش فوق دارای ویژگیهای سلول بنیادی رویانی می باشند، چندین معیار به شرح زیر در نظر گرفته شد:

1. Inner cell mass
2. Dulbecco's modified Minimal Essential Medium (DMEM: Gibco/BRL) cat No: 52100-013
3. Fetal bovine serum
4. Nonessential amino acid 100X stock from Gibco/BRL
5. Flat



www.SID.ir

Archive of SID

ریخت شناسی: کلونی سلولهای ES کلونی گرد یا بیضی شکل برجسته (شکل ۱- ه) ، متشکل از سلولهای کوچک که به هم فشرده با محدوده سلولی نامشخص بود. در این سلولها که دارای قدرت تکثیر بالایی می‌باشند، نسبت هسته به سیتوپلاسم بالا و هسته محتوی هستکهای مشخص بود. اندازه هر کلونی به طور تقریبی در مدت ۲٤ ساعت دو برابر می‌شد.

## ۳-۲- توانایی تشکیل اجسام شبه جنینی و قابلیت تمایز خود به‌خودی

سلولهای مذکو در کشت معلق، دستجات سلولی یا اجسام شبه جنینی تشکیل دادند( شکل ۲- الف). EBها دارای هر سه لایه زاینده جنینی بودند. پس از چسبیدن به سطح محیط کشت و تزاید، سلولهایی با اشکال متفاوت از اطراف آنها بیرون زد. در برخی موارد مجراهایی شبیه مویرگهای خونی- که به وسیله لایه نازکی از سلولهای پهن، شبیه سلولهای اندوتلیالی، مفروش بود- به جریم می‌خورد (شکل ۲- ب). همچنین سلولهای با ریخت شناسی فیبروبلاست و سلول عصبی (به تعداد بسیار کم) مشاهده شد.

## ۳-۳- سنجش آنزیمی

فعالیت آلکالین فسفاتازی که ویژگی سلولهای تمایز نیافته است، در سلولهای ES حاصل بشدت مشاهده شد (شکل ۳). سلولهای تمایز یافته و همچنین سلولهای لایه تغذیه کننده هیچگونه فعالیت الکالین فسفاتازی از خود نشان ندادند.

## ۳-٤- تمایز سلولهای ES به سلول عصبی

سلولهای ES تمایز نیافته در کشت معلق، تجمعات سلولی شناوری ایجاد کردند که در ابتدا کوچک و دارای محدوده نامنظمی بود. این تجمعات پس از گذشت چهار روز بزرگتر و کرویتر شده، EBهای تیپیک ایجاد کردند. در این پژوهش به منظور القای فنوتیپ عصبی در محیط کشت از روش $^{+}$٤/$^{-}$٤ استفاده شد. در این روش- که تاکنون موفقیت‌آمیز ترین طریقه القای فنوتیپ عصبی در سلول تمایز نیافته است- از غلظت M $^{-۷}$ ۱۰× ۵ اسید رتینوئیک استفاده می شود. در مقابل گروه آزمایش، گروه شاهد $^{+}$٤/$^{-}$٤ نیز در نظر گرفته شد. پس از دوره القای هشت روزه، EBهای هر دو گروه- که از نظر شکل ظاهری یکسان به نظر می رسیدند- به روش کشت چسبنده، کشت داده شدند. در مدت ۲٤ ساعت اغلب EBها به سطح ظرف کشت چسبیده، به وسیله حلقه نازکی از سلولهای چند وجهی احاطه شدند. طی روزهای بعد در اثر تزاید، این حلقه سلولی وسیعتر شد. در روز سوم تفاوت قابل توجهی بین دو گروه آزمایش و شاهد دیده شد. در گروه $^{+}$٤/$^{-}$٤ سلولهای بسیاری با فنوتیپ عصبی همراه با زواید عصبی وجود داشت (شکل۳- ج)؛ در حالی که در گروه $^{+}$٤/$^{-}$٤ تعداد چنین سلولهایی بسیار کم بود.

## ٤- بحث

تولید دودمانهای سلولی پایدار[1]، نامیرا[2] و تمایز نیافته[3] در محیط کشت برای اجرای تحقیقات پایه و نیز کاربردهای بالینی از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. از جمله این سلولها، سلولهای بنیادی رویانی را می‌توان نام برد. در این پژوهش برای اولین بار، جداسازی و کشت سلولهای ES بر روی تک لایه تغذیه کننده Vero و بدون حضور LIF نوترکیب انجام شد. سلولهای تولید شده دارای ویژگیهای خاص سلولهای ES بوده، طی چندین پاساژ خاصیت تمایز نیافتگی خود را حفظ کردند. به طور کلی برای جداسازی چنین سلولهایی به چند روش می‌توان عمل کرد. بهترین این روشها استفاده از تک لایه تغذیه‌کننده سلولی می‌باشد. لایه تغذیه کننده که تا کنون در اغلب پژوهشها برای جداسازی و کشت سلولهای ES مورد استفاده قرار گرفته سلول فیبروبلاست موش (فیبروبلاست اولیه جنینی)[4] یا دودمان فیبروبلاست[5] است.

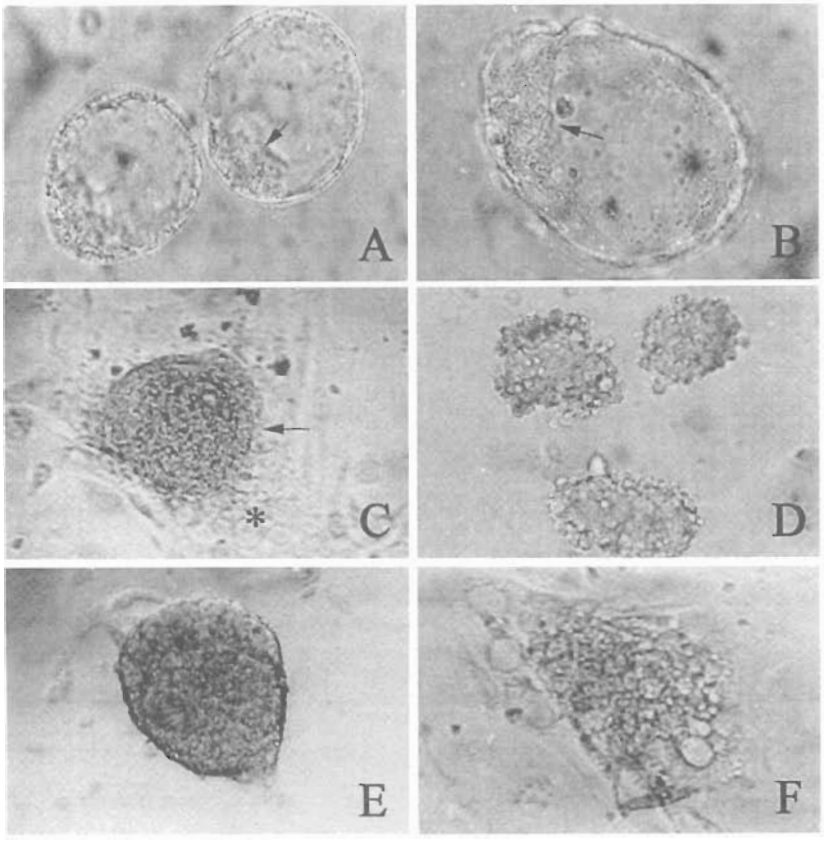
اولین دودمانهای سلولی ES از جنین پیش لانه گزینی موش بر روی تک لایه فیبروبلاست جنین موش (غیر فعال شده با مایتومایسین) به دست آمد [۳]. تامسون[6] و همکاران توانسته‌اند دودمانهایی از جنین پیش لانه گزینی پریماتهای غیر انسانی [۲۹]

1. Established
2. Immortal
3. Undiffrentiated
4. Primary embryonic fibrpblast
5. STO fibroblast
6. Thomson


www.SID.ir

Archive of SID






شکل ۲- مراحل جداسازی سلول بنیادین جنینی(ES cells). A: دو عدد بلاستوسیست با حفره بلاستوسل بسیار گسترده (fully-expanded) blastocysts بر روی تک لایه‌ای از سلول Vero. (پیکان) توده سلولی داخلی (ICM)، (نوک پیکان) تروفواکتودرم (TE). بزرگنمایی ×۲۰۰. B: بلاستوسیست در حال خروج از زونا پلوسیدا ۲۴ تا ۴۸ ساعت پس از کشت. بزرگنمایی ×۲۰۰. C: توده سلولی داخلی پنج روز پس از کشت (پیکان)، سلولهای غول پیکر تروفواکتودرم (نوک پیکان). بزرگنمایی ×۲۰۰. D: چند توده سلولی داخلی که به روش مکانیکی از سطح کشت جدا شده‌اند. بزرگنمایی ×۱۰۰. E: کلنی ES بر روی لایه سلولی تغذیه کننده. بزرگنمایی ×۱۰۰. F: کلنی ناخواسته‌ای از سلولهای تروفواکتودرم. بزرگنمایی ×۱۰۰

و اخیراً جنین انسان [۱۲] به دست آورند. لایه تغذیه کننده در جداسازی این دودمانها نیز فیبروبلاست بوده است. بدون این لایه تغذیه کننده دودمانهای سلولی کاهش دچار تمایز شده، حضور یا عدم حضور LIF در محیط کشت مانع این تمایز نخواهد شد [۲۹،۱۲،۳۰].

برای اولین بار لدرمن[1] و همکارانش در سال ۱۹۹۱ از سلولهای کارسینومای شماره ۵۶۳۷[2] مثانه انسان به عنوان لایه تغذیه کننده در جداسازی سلولهای ES استفاده کردند [۲۲]. میزان موفقیت در نتیجه استفاده از این لایه سلولی نسبت به فیبروبلاست سه تا پنج برابر بود. همچنین به کارگیری فیبروبلاست اولیه جنین جوجه[3] و محیط کشت ثانویه حاصل از دودمان سلولی کبد جوجه[4] برای کشت ES موشی به وسیله یانگ[5] و همکارانش گزارش شد [۲۱] اما تا کنون گزارشی مبنی بر جداسازی و کشت سلول ES بر روی دودمان سلولی Vero ارائه نشده است.

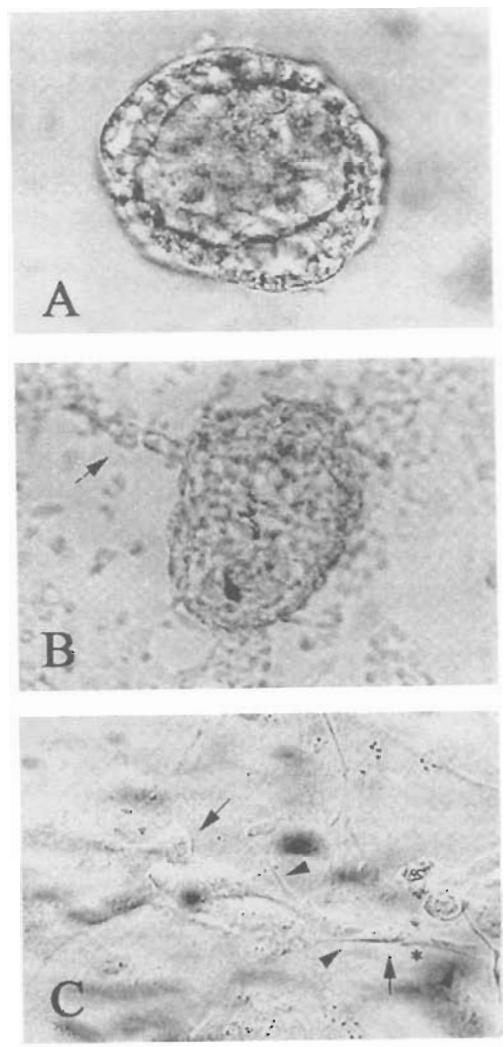
ما در این پژوهش نشان دادیم که سلول Vero قادر است سلولهای ES موشی را در وضعیت تمایز نیافته با قدرت تکثیر بالا و با ریخت شناسی معمول سلولهای ES حداقل تا هفت

1. Lederman
2. 5637 human bladder carcinoma cells
3. Primary chiken embryo fibroblast (CEF)
4. Chiken liver cell line
5. Yang



www.SID.ir

Archive of SID




شکل ۲- A: جسم شبه جنینی حفره‌دار (cystic embryonic body). بزرگنمایی ×۲۰۰. B: تمایز خودبه‌خودی جسم شبه جنینی بدون حضور ماده القا کننده، ساختمان لوله مانند (پیکان). بزرگنمایی × ۲۰۰. C: سلولهای شبه عصبی حاصل از اثر القایی رتینوئیک اسید بر جسم شبه جنین. بزرگنمایی ×۲۰۰. جسم سلولی (پیکان)،زواید سلولی (نوک پیکان)، حضور احتمالی یک سیناپس عصبی (ستاره).

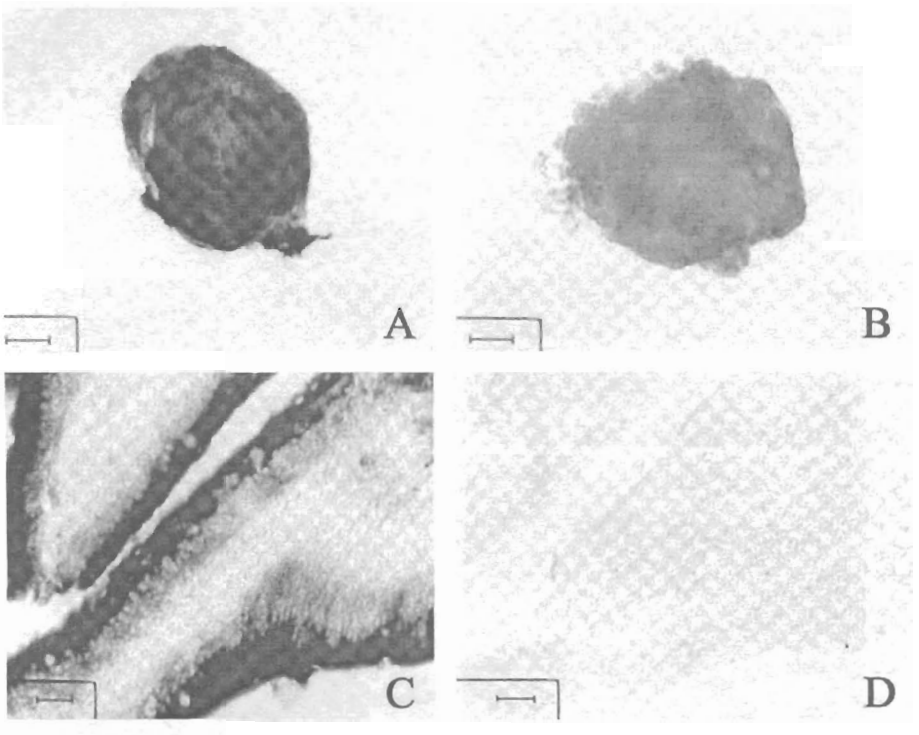
پاساژ در شرایط *in vitro* نگه دارد. مسأله مهم در کشت سلولهای ES تامین شرایط ویژه، برای حفظ وضعیت تمایز نیافته آنهاست [۳۱]. هرچند چگونگی حمایت لایه تغذیه کننده از این سلولهای هنوز به طور کامل شناخته نشده است اما تولید و ترشح LIF به وسیله فیبروبلاست در محیط کشت به اثبات رسیده است. این سایتوکاین، علاوه بر اینکه مانع تمایز سلولی می‌شود، نقش مهمی در لانه گزینی و بهبود تکوین جنین پیش لانه گزینی موش در شرایط *in vitro* ایفا می کند [۲۵]. با استفاده از روشهای سنجش مانند Northern analysis ، DA- la assay و ELISA مشخص شد که در هم کشتی جنین پیش لانه گزینی انسان [۳۲] و موش [۲۵] با سلول Vero، این سلول مقادیر قابل توجهی LIF و اینترکولین انسانی برای سلولهای DA ترشح می کند [۳۲،۲۵]. از طرف دیگر، سلول Vero تیمار شده با مایتومایسین نیز قادر به ترشح LIF است [۲٤]. دو فاکتور LIF و اینترلوکین انسانی برای سلولهای DA به وسیله سلولهای کبدی موش صحرایی و دودمان STO [۳۲،۲٤] نیز ترشح می شود. در واقع به همین علت، این دودمان در جداسازی و بقای دودمانهای سلولی جنینی مورد استفاده قرار می گیرند [۲٤]. بنابراین می توان ادعا کرد که سلول Vero نیز به دلیل توانایی سنتز و ترشح LIF در محیط کشت کاندید خوبی برای سلول تغذیه کننده در جداسازی وو کشت سلول ES موشی بوده، می تواند جایگزین فیبروبلاست شود. فاکتورهایی مانند CNTF و oncostatin M مانع تمایز سلولهای ES موشی شده، می‌توانند جایگزین خوبی برای LIF در محیط کشت باشند [۲۹]. شاید سلول Vero نیز قادر به ترشح چنین موادی بوده، از تمایز سلولی جلوگیری نماید.

همچنین احتمالاً استفاده از محیط کشت ثانویه حاصل از سلول Vero روش دیگری در کشت سلول ES خواهد بود. البته بر اساس گزارشی، محیط کشت ثانویه این سلول نتوانسته است از تکوین جنین موش در محیط کشت بخوبی حمایت کند [۳۲]. بنابراین استفاده از چنین محیطی برای جداسازی و کشت سلولهای ES هنوز جای بحث بسیاری دارد. اما به طور کلی استفاده از لایه تغذیه کننده در کشت طولانی مدت سلول ES مطلوبتر است. در روشی که از لایه سلولی تغذیه کننده استفاده نمی شود، حضور LIF فقط برای بقای کوتاه مدت سلول ES مفید است. در ضمن دودمانهایی که بر روی لایه تغذیه کننده جدا شده‌اند اغلب از نظر کاریوتایپ، طبیعی می‌باشند [۳۱].

ارزیابی سلولهای جدا شده در این تحقیق با استفاده از معیارهای شناسایی، ES بودن این سلولها را مورد تایید قرار داد. این سلولها از نظر ریخت شناسی تمام ویژگیهای سلول ES را دارا بودند. کلونیها اکثرا کروی و گاهی بیضی شکل، متشکل از


www.SID.ir

Archive of SID


شکل۳- بیان مارکر آلکالین فسفاتازی مثبت در کلنی ES. علامت بار معادل ۱۰۰μm. A: فعالیت آلکالین فسفاتازی مثبت در کلنی ES. C: نمونه رنگ‌آمیزی شده روده کوچک به عنوان کنترل مثبت. B و D: دو نمونه کنترل منفی در کلنی ES و روده کوچک.

سلولهای کوچک و به هم فشرده با محدوده سلولی نامشخص و هسته سلولی بزرگ حاوی هستکهای مشخص بودند. یانگ[1] و همکارانش در گزارش خود برای کلونی ES موش سه حالت ریخت شناسی توصیف نموده اند. بدین ترتیب که سلولهای کشت شده بر روی CEF، تخم مرغی یا بیضی شکل بوده و محور طولی آنها موازی با محور طولی سلول زمینه است. کلونیهای کشت شده بر روی STO (سلولهای این دودمان در همه جهات گسترش می یابند) کروی و سرانجام در محیط کشت ثانویه کلونیها دارای شکل، نظم و فشردگی کمتری می باشند [۲۱]. علاوه بر ریخت شناسی خاص ES، این سلولها دارای قدرت تزایدی بسیار بالایی بوده، در مدت ۲٤ ساعت اندازه هر کلونی حدود دو تا سه برابر می‌شد.

ردیابی آنزیم آلکالین فسفاتاز نشان داد که سلولهای جدا شده بر روی دودمانهای سلولی Vero نیز مانند دیگر دودمانهای ES دارای فعالیت آلکالین فسفاتازی شدیدی می‌باشند. میزان بالای فعالیت این انزیم از مشخصات سلولهای تمایز نیافته مانند سلولهای کارسینومای جنین، سلولهای جنسی جنینی و سلولهای ES می‌باشند و در صورت تمایز، این خاصیت از دست می‌رود [۲۱،۲].

نایج به دست آمده در این تحقیق نشان داد که سلولهای ES جدا شده بر روی سلول Vero در صورت کشت معلق قادر به تشکیل دستجات سلولی و تولید EB می‌باشند. یکی از معیارهای تشخیصی سلولهای تمایز نیافته ES موش توانایی تشکیل EB به وسیله آنهاست [۳۳،۹]. در کشت معلق، EB در ابتدا ساده و دارای لایه خارجی سلولهای اندودرمی و لایه داخلی سلولهای

1. Yang

www.SID.ir

Archive of SID

تمایز نیافته است. سپس ساختمان آن پیچیده‌تر شده، لایه‌ای از سلولهای استوانه‌ای اکتودرم در آن ظاهر می‌شود. پس از گذشت چند روز برخی از آنها حفره‌دار شده، EB سیستیک به وجود می‌آورند. حفره مذکور معادل کیسه زرده جنینی می‌باشد [۳۳]. به علت برخورداری EB از هر سه لایه زایای جنینی می‌توان نتیجه گرفت سلولهای ES سلولهایی چند استعدادی می‌باشند که پس از تمایز قادرند تمام انواع سلولها را ایجاد نمایند. EBهای حاصل در کشت چسبنده، به سطح ظرف کشت چسبیده، پس از تمایز و تزاید خودبه‌خودی سلولهایی با فنوتیپهای مختلف ایجاد کردند. در اطراف برخی EBها ساختارهای لوله مانندی- که به وسیله یک لایه سلولی پهن و نازک (شبیه اندوتلیوم عروقی) مفروش شده بودند- دیده شد. وجود چنین ساختارهایی به وسیله ایشی واتا[1] و همکارانش در سال ۲۰۰۱ نیز گزارش شده است [۹]. بدین ترتیب یکی دیگر از معیارهای شناسایی سلول ES که چند استعدادی بودن آن است- در مورد سلولهای ما نیز صدق می‌کند. در گروههای تیمار شده با RAدر حدود ۷۲ ساعت پس از چسبیدن EB به سطح ظرف کشت، سلولهایی کوچک و کشیده مشابه با سلولهای پیش‌ساز نوروایی‌تلیالی مشاهده شد. این سلولها سپس تغییر شکل داده دارای شکل سلول چند وجهی همراه با زواید سلولی فراوان شدند. اثر القایی RA بر این سلولها در شرایط محیط کشت موجب تولید سلولهایی با فنوتیپ عصبی شد. در غیاب RA درصد کمی از سلولهای حاصل از تمایز خودبه‌خودی EB ظاهر سلول عصبی را نشان می‌دهند؛ در حالی که تعداد چنین سلولهایی تحت اثر القایی RA به طور قابل توجهی افزایش می یابد [۳۴،۲۷،۱۸،۱] این سلولها ساختار شبه عصبی به خود گرفته، مراحل پایه‌ای تمایز عصبی در آنها آغاز می‌شود. اما تغییرات پیچیده و بسیار منظم و واکنشهای متقابل سلولی- که در جنین طبیعی وجود دارد- در EB رخ نمی دهد. سلولهای مذکور دارای زواید سلولی بسیاری بوده، ظاهر سلولهای مغزی را در محیط کشت تداعی می‌کنند [۱]. احتمالا مسیر تمایز ES به نورون در محیط کشت از طریق تنظیم افزایشی[2] ژنهای فنوتیپ عصبی به وسیله RA است [۲۷]. البته مکانیسمی که به وسیله آن RA اثر القایی خود را اعمال می‌کند هنوز به طور دقیق مشخص نشده و موضوع بسیاری از تحقیقات است [۱]. تا کنون دو سری گیرنده سلولی برای RA شناسایی شده است [۲۹،۱] که عبارتند از RARs و RXRs. MRNA کد کننده RARs در سلول ES وجود دارد. بیان برخی از این رسپتورها تحت اثر القایی RA تحریک می‌شود [۱]. بر اساس چند گزارش سلولهای حاصل از تمایز ES که دارای فنوتیپ عصبی می‌باشند در واقع پیش ساز نورون یا نوروایی تلیالند [۳۵]. بنابراین بهتر است چنین سلولهایی را شبه عصب نامید نه سلول عصبی [۱].

1. Ishiwata

2. Upregulation
3. Retinoic acid receptor
4. Retinoic X receptor

## ۵- منابع

[1] Bain G, Kitchens D, Yao M, Heuttner JE, Devid IG. Embryonic stem cells expressed neuronal properties in vitro. Developmentall Biology 1995; 168: 342-357.

[2] D'Amour KD, Gage FH. New tools for human developmental biology. Nature Biotechnology 2000; 18: 381-382.

[3] Evans MJ, Kaufman MH. Stablishment inn culture of pluripotential cells from mouse embryos. Nature 1981; 292: 154-156.

[4] Martin GR. Isolation of pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. Proc Natl Acad Sci USA 1981; 78(12): 7634-7638.

[5] Martin GR, Silver LM, Fox HS, Joyner AL. Establishment of embryonic stem cell lines


www.SID.ir

Archive of SID


from preimplantation mouse embryos homozygous for lethal mutation in the t-Complex. Development Biology 1987; 121: 20-28.

[6] Peas Sh, Barghetta P, Gearing D, Grail D, Williams L. Isolation of embryonic stem (ES) cells in media supplemented with recombinant leukemia inhibitory factor (LIF). Developmental Biology 1990; 59: 89-102.

[7] Delhise F, Bralion V, schuurbiers N, Dessy F. Establishment of an embryonic stem cell line from 8-cell stage mouse embryos. European Journal of Morphology 1996; 34(4): 237-243.

[8] Strubing C, Hilger GA, Shan J, Widenmann B, Heschler J, Wobus AM. Diffrentiation of pluripotent embryonic ste m cells into neuronal lineage in vitro gives rise to mature inhibitory and exhibitory and excitatory neurons. Mechanisms of Development 1995; 53: 275-287.

[9] Ishiwata I, Tokeida Y, Iguchi M, Ishiwada C, Kiguchi K, Yasumoto S, Sato K, Tachibana T, Hashimoto H, Ishikawa H. New approach for the establishment of mouse embryonic stem cells and induction of their diffrentiation. Cell 2001; 14(4): 283-91.

[10] Brustel O, Spiro C, Karram KH, Choulhary KH, Dkabe SH, McKay RDG. In Vitro- generated neural precursors in mammalian brain development. Proc Natl Acad Sci USA 1997; 94: 14809-14814.

[11] Cherny RA, Stokes TM, Merei J, Lom L, Brandon MR, Williams RL. Strategies for the isolation and characterization of bovine embryonic stem cells. Reprod Dev 1994; 6: 569-75.

[12] Thomson JA, Eldor IJ, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshol VS, Jones JM. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. Science 1998; 282: 1145-1147.

[13] Gottlieb DI, Ituettner JE. An in vitro pathway from embryonic stem cells to neurons and glia. Cells Tissues Organs 1999; 165: 165-172.

[14] Renoncourt T, Carroll P, Filippi P, Arce V, Alonso S. Neurons derived in vitro from ES cells express homeoproteins characteristic of motoneurons. Mechanisms of Development 1998; 79: 185-197.

[15] Hancock ChR, Wetherington JP, Lambert NA, Condie BG. Neuronal differentiation of cryopreserved neural progenitor cells derived from mouse embryonic sten cells. Biochemical and Biophysical Research Communication 2000; 271: 418-421.

[16] Meng GL, Shang KG, Ding MX. Current state of establishing and maintaining human embryonic stem cell lines and key problems in this studies. Sheng Wu Gong Cheng Xue Bao 2002; 18(2): 131-5.

[17] Wheeler MB. Development and validation of swine embryonic stem cells: a review; Reprod Fertil Dev 1994; 6: 563-8.

www.SID.ir

Archive of SID

[18] Deacon T, Dinsmor J, Gostantini LC, Isacson O, Blastula-stage stem cells can diffrentiate dopaminergic and serotonergic neurons after transplantation.Experimental Neurology 1998; 149: 28-41.

[19] Smith AG, Heath JK, Donaldson DD, Wong GG, Moreaus J, Stahl M, Rogers D. Inhibition of pluripotential embryonic stem cell diffrentiation by purified polipeptides. Nature 1988; 336: 688-690.

[20] Williams RL, Hilton DJ, Pease Sh, Willson TA, Stewart CL, Gearing DP, Wanger EF, Metcalf D,, Nicola NA, Gough NM. Myeloid leukemia inhibitory factor maintains the developmental potential of embryonic stem cells. Nature 1988; 336: 685-687.

[21] Yang Z, Petitte JN. Use of avian cytokines in mammalian embryonic stem cell culture. Poultry Science 1994; 73: 965-974.

[22] Lederman B, Burki K. Establishment of germ-line competent C57BL/6 embryonic stem cell line. Experimental Cell Research 1991; 197: 248-254.

[23] Butcher RN, McCullough KC, Jarry C, BryantJ. Mitomycin C-treated 3T3/B(3T3/A31) cell feeder layers in hybridoma technology. Journal of Immunological Methods 1988; 107: 245-251.

[24] Carnegie JA, Morgan JJ, McDiarmid N, Durnford R. Influence of protein supplement on the secretion of leukemia inhibitory factor by mitomycin-pretreated Vero cells: possible application to the in vitro production of bovine blastocysts with high cryotolerance. Journal of Reproduction and Fertility 199; 117: 41-48.

[25] Kauma SW, Matt DW. Coculture cells thet express leukemia inhibitory factor (LIF) enhance mouse blastocysts development in vitro. Journal of Assisted Reproduction and Genetics 1995; 12(2): 153-156.

[26] Cheung WMW. Chu PWK, Lung ChH, Ip NY. Expression of retinoic acid receptors during the retinoic acid- reduced neuronal differentiation of human embryonal carcinoma cells. Journal of Neurochemistry 2000; 75: 34-40.

[27] Bain G, Ray WJ, Yao M, Gottlieb DI. Ratinoic acid promoes neural and represses mesodermal gene expression in mouse embryonic stem cells in culture. Biochemical Research Communications 1996; 223: 691-694.

[28] Mansergh FC, Wride MA, Rancourt DE. Neurons from stem cells: Implication of understanding nervous system development and repair. Biochem Cell Biol 2000; 78: 613-628.

[29] Thomson JA, Kalishman J, Golos T, Durning M,Harris CHP, Becker RA, Hearn JP. Isolation of a primate embryonic stem cell line. Proc Natl Sci USA 1995; 92: 7844-7848.


www.SID.ir

Archive of SID

[30] Thomson JA, Marshall VS, Trojanowski JQ. Neural differentiation of rhesus embryonic stem cells. APMIS 1998; 106: 149-157.

[31] Hong Y, Winkler Ch, Schartl M. Pluripotency and differentiation of embryonic stem cell lines from the medakefish (Oryzias Latipes). Mechanisms of Development 1996; 60: 33-44.

[32] Roche AP, Taupins JL, Mayer G, Daniel JY, Moreau JF. Human interleukin for DA cells or leukemia inhibitory factor is released by Vero cells in human embryo coculture. Fertility and sterility 1994; 62(3): 648-650.

[33] Doetschman Th, Williams Ph, Maeda N. Establishment of hamster blastocyst-derived embryonic stem (ES) cells. Developmental Biology 1988; 127: 224-227.

[34] Fraichard A, Chassande O, Bilbaut G, Dehay C, Savatier P, Samarut J. In vitro differentiation of embryonic stem cells into gligl cells and functional neurons. Journal of Cell Science 1995; 108: 3181-3188.

[35] Okabe Sh, Nillson KF, Spiro AC, McKay RDG. Development of neuronal precursor cells and functional postmitoic neurons from embryonic stem cells in vitro. Mechanisms of Development 1996; 59: 89-102.

[36] Lee SH, Lumelsky N, Studer L, Auerbach JM, McKay RD. Efficient generation of midbrain and hindbrain neurons from mouse embryonic stem cells. Nature Biotechnology 2000; 18; 675-676.


www.SID.ir