

پتانسیل تمایز شبه عصبی حرکتی سلول های بنیادی خون ساز $CD133^+$ و $CD34^+$ مشتق از خون بند ناف انسان؛ در شرایط آزمایشگاه

سپیده علوی مقدم^۱، فائزه فقیهی^۲، نسیم حیاتی رودباری^۳

^۱ کارشناس ارشد سلولی و مولکولی، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات تهران، تهران، ایران
^۲ استادیار، مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی دانشگاه علوم پزشکی ایران، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران
^۳ دانشیار، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات تهران، تهران، ایران

چکیده

سابقه و هدف: در این مطالعه، تمایز سلول های بنیادی خون ساز $CD133^+$ و $CD34^+$ مشتق از خون بند ناف انسان، به سلول های شبه عصبی حرکتی، بررسی شد.

روش بررسی: سلول های بنیادی خون ساز از خون بند ناف انسان جدا شده و سپس، سلول های $CD133^+$ و $CD34^+$ براساس مارکر، توسط تکنیک جداسازی مغناطیسی MACS تفکیک شدند. بررسی فلوسایتومتری، برای تعیین درصد خلوص سلول های جدا شده، انجام گرفت. پس از آن، سلول ها در محیط کشت دارای سرم و حاوی فاکتورهای *BDNF Shh RA* و *B27* کشت داده شدند و در انتها بیان پروتئین های عصبی حرکتی *Nestin* و *NF-H*، *ISL-1* و *AChE* توسط ایمونوسیتوشیمی و فلوسایتومتری بررسی شد.

یافته ها: آنالیز فلوسایتومتری مارکر های سطحی نشان دهنده ۹۸ درصد سلول های $CD133^+$ و ۹۵/۷ درصد سلول های $CD34^+$ جدا شده بود. تغییر شکل سلول ها، به صورت ایجاد زوائد آکسون مانند، پس از دوره تمایزی و بیان پروتئین های عصبی حرکتی با ایمونوسیتوشیمی مشاهده شد و نتایج حاصل از فلوسایتومتری پس از دوره تمایزی بیان *ISL-1* (۶۶/۴٪)، *AChE* (۵۸/۳٪)، *NF-H* (۸۰/۱۶٪)، *Nestin* (۸۴/۹٪) را در سلول های $CD133^+$ و همچنین بیان *ISL-1* (۶۳/۲٪)، *AChE* (۵۲/۳٪)، *NF-H* (۷۸/۶٪) و *Nestin* (۸۰/۱۸٪) را در سلول های $CD34^+$ تایید کرد.

نتیجه گیری: نتایج نشان داد که سلول های بنیادی خون ساز $CD133^+$ و $CD34^+$ خون بند ناف انسان قابلیت تمایز به سلول های شبه عصبی حرکتی را در شرایط آزمایشگاه دارند و البته مطالعات بیشتر جهت بررسی عملکرد سلول های شبه عصبی حرکتی حاصل از این تمایز در بدن موجود زنده پیشنهاد می شود.

واژگان کلیدی: خون بند ناف، سلول بنیادی خون ساز، سلول عصبی حرکتی، تمایز.

مقدمه

ترمیم ضایعات سیستم اعصاب مرکزی، به خصوص آسیب های طناب نخاعی، پیچیده تر است (۳) و درمان های بالینی، کمتر مفید واقع می شوند و اغلب فقط برای پیشگیری از آسیب های احتمالی بعدی هستند (۴،۵). از جمله سلول هایی که در جریان آسیب های نخاعی، به شدت از بین می روند، نورون های حرکتی هستند، که به عنوان گروه خاصی از نورون ها، سلول های اصلی حرکات بدن بوده و تخریب آنها، اختلالات و بیماری های نورودژنراتیو ناتوان کننده زیادی را ایجاد می کند (۶).

سالانه بسیاری از افراد در سراسر دنیا، بر اثر بیماری و یا ترومای شدید به آسیب های تخریب گر سیستم عصبی مرکزی مبتلا می شوند. طبق مطالعات، سیستم عصبی مرکزی و محیطی به طور یکسان به آسیب های وارده پاسخ نمی دهند (۱،۲).

آدرس نویسنده مسئول: تهران، مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی دانشگاه علوم پزشکی ایران، دانشگاه علوم پزشکی ایران، فائزه فقیهی (email: faezefaghihi@yahoo.com)
تاریخ دریافت مقاله: ۹۶/۷/۱۱
تاریخ پذیرش مقاله: ۹۶/۱۰/۵

داده‌اند که سلول‌های CD133⁺ نسبت به CD34⁺ ها ابتدایی‌تر بوده و در واقع مارکر CD133 بنیادی‌تر است، به عبارتی سلول‌های بنیادی CD133⁺ قدرت تکثیر بیشتری نیز دارند (۲۷). مارکر CD133 علاوه بر سلول‌های بنیادی خون ساز، بر روی سلول‌های اندوتلیال (۲۸)، گلیوبلاستوما (۲۹)، نورون‌ها و سلول‌های بنیادی گلیال (۳۰) نیز بیان دارد.

تاکنون تعدادی از پژوهشگران، قدرت تمایز عصبی سلول‌های بنیادی CD133⁺ و CD34⁺ را اثبات کرده‌اند (۳۱)؛ لذا هدف مطالعه پیش رو نیز بررسی تمایز سلول‌های بنیادی خون ساز CD133⁺ و CD34⁺ مشتق از خون بند ناف انسان به سلول‌های شبه عصبی حرکتی بود تا بتوان در راستای انجام تحقیقات لازم جهت یافتن راه‌های مناسب برای بهبود اختلالات عصبی حرکتی اقدام کرد.

مواد و روشها

جمع‌آوری نمونه و جداسازی سلول‌های بنیادی خون

ساز CD133⁺ و CD34⁺ از خون بند ناف انسان

واحدهای خون بند ناف، براساس روش‌های کمیته اخلاق پزشکی دانشگاه علوم پزشکی ایران جمع‌آوری شدند. در مرحله اول، خون بند ناف به دست آمده، در فالكون‌های ۵۰ ml (SPL Life Sciences, Korea) با هیدروکسی اتیل استارچ (HES; Fresenius, Germany)، جهت رسوب گلبول‌های قرمز خون، مخلوط شد و به مدت ۲ ساعت در دمای اتاق، نگهداری شد. پس از اتمام انکوباسیون، دو بخش ایجاد شد، در قسمت پایین، توده تقریباً متراکم گلبول‌های قرمز و در قسمت بالایی، پلاسما همراه با سلول‌های تک هسته‌ای خون بند ناف و مقدار کمی، گلبول قرمز قرار داشت.

در این مرحله، برای جدا کردن لایه سلول‌های تک هسته‌ای از سایر سلول‌ها، محیط رویی سانتریفیوژ شد و رسوب حاصل از آن، به روی فایکول (Inno- train, Germany) 1:3 (ratio) منتقل شد و دوباره سانتریفیوژ شد.

بعد از سانتریفیوژ، لایه سلول‌های تک هسته‌ای در بالای فایکول مشاهده شد. این لایه با دقت جداسازی شد و برای جدا کردن سلول‌های بنیادی خون ساز CD133⁺ و CD34⁺ با آنتی‌بادی‌های نشان دار شده با ذرات مغناطیسی (Miltenyi Biotec, Germany) مجاور شد و سپس، با استفاده از ستون‌های جداسازی (Miltenyi Biotec, Germany)، سلول‌ها جدا شدند.

تلاش‌های بی‌شماری، برای ترمیم این ضایعات و آسیب‌ها، انجام شده است، اما ترمیم کامل و بازگشت به وضعیت سلامت، بسیار دشوار است (۶). امروزه، راه‌کار جدیدی که در فاز تحقیقاتی بررسی شده است، سلول درمانی و به ویژه استفاده از سلول‌های بنیادی است (۷).

سلول‌های بنیادی، سلول‌هایی با قابلیت منحصر به فرد تکثیر و بازسازی جمعیت‌های سلولی دیگر هستند (۸). این سلول‌ها را می‌توان از منابع متفاوت جنینی و بالغ استخراج نمود و از جمله منابع سلول‌های بنیادی بالغ، سلول‌های بنیادی گرفته شده از خون بند ناف هستند.

سلول‌های بنیادی خون بند ناف، بسیار توانمند و نامیرا بوده و دسترسی به آنها به دلیل تولد روزانه تعداد زیادی نوزاد، آسان است (۹). بر اساس بررسی‌های محققان، از این سلول‌ها برای درمان بیماری‌های متفاوتی مانند بیماری‌های نورولوژیکی و صدمات نخاعی، استفاده شده است (۱۰، ۱۱).

سلول‌های بنیادی خون ساز، دسته‌ای از سلول‌های بنیادی موجود در خون بندناف هستند که منشأ تمامی سلول‌های خونی محسوب می‌شوند (۱۲). آنها فاقد مارکر سطحی سلول‌های تمایز یافته و یا سلول‌های خونی بالغ بوده و بر طبق پژوهش‌ها، مارکرهای مربوط به این سلول‌ها، شامل CD133، CD34، CD45، C-kit، Thy-1 و CD109 هستند (۱۳، ۱۴).

سلول‌های مذکور، دارای دو توانایی مهم سلول‌های بنیادی، یعنی خودنوزایی و تمایز هستند (۱۵). در طی سال‌های گذشته، استفاده از سلول‌های بنیادی خون ساز، نقش مهمی در درمان بیماری‌های مختلف، به خصوص بدخیمی‌های خونی داشته است (۱۶).

گرچه سال‌ها، مغز استخوان و خون محیطی، به عنوان منابع اصلی این نوع از سلول‌های بنیادی مطرح بوده‌اند، اما محدودیت‌های این دو منبع، سبب شده که خون بند ناف به عنوان منبعی مناسب‌تر برای این سلول‌ها مد نظر قرار گیرد (۱۶).

آنتی ژن CD34، نشانگر معمول برای شناسایی سلول‌های بنیادی خون ساز است (۱۷-۱۹). با این حال، این آنتی ژن، بر روی همگی سلول‌های بنیادی خون ساز قابلیت بیان ندارد (۲۰-۲۲). CD34 بر روی سلول‌های ابتدایی، بیان شده و بیان آن به دنبال تمایز به سلول بالغ، کاهش می‌یابد (۲۳). این مارکر، در خارج از سیستم خون سازی، بر روی سلول‌های اندوتلیال عروق و برخی فیبروبلاست‌ها نیز بیان می‌شود (۲۴). در سال ۱۹۹۷، آنتی ژن CD133 نیز برای شناسایی سلول‌های بنیادی خون ساز مطرح شد (۲۵، ۲۶). تحقیقات نشان

مراحل کشت تمایزی، سلول ها در انکوباتور (37 °C، 5% CO₂) نگه داری شدند.

بررسی بیان پروتئین های سلول های شبه عصبی حرکتی با استفاده از تکنیک ایمونوسیتوشیمی

جهت ارزیابی ایمونوسیتوشیمی، سلول ها در روز چهاردهم پس از تمایز به مدت ۲۰ دقیقه، در دمای اتاق با استفاده از پارافرم آلدئید ۴٪ تثبیت شدند. برای نفوذ پذیر کردن سلول ها از محلول Triton X-100 (۰/۲٪، Merk, Germany) رقیق شده با PBS استفاده شد و از محلول Goat serum (۵٪) Cell Signaling Technology, UK) رقیق شده با PBS، جهت جلوگیری از اتصال آنتی بادی های غیر اختصاصی استفاده شد. سلول ها یک شبانه روز با استفاده از آنتی بادی های اولیه مونوکلونال Nestin antibody (anti-human Nestin antibody, Santacruz AChE, BioLegend, cat. no: 656802) و NF-H (EMD NF-H, biotechnology, cat. no: sc 373901) و Isl-1 (anti-human Isl-1, Millipore, cat. no: NE1023) (antibody, Santacruz biotechnology cat. no: sc30200) با غلظت ۱:۱۰۰ انکوبه شدند. برای شستشوی سلول ها از محلول Tween20 (۰/۱٪، Sigma, USA) رقیق شده در PBS استفاده شد. آنتی بادی ثانویه متصل به PE (Donkey polyclonal secondary antibody to mouse IgG-H & L, Abcam Cat: no: ab 7003) بر علیه آنتی بادی های اولیه Nestin، AChE و NF-H و آنتی بادی ثانویه متصل به Alexa Fluor® 488 (Goat polyclonal secondary antibody to rabbit IgG - H&L, Abcam, cat. no: ab-150077) بر علیه آنتی بادی اولیه Isl-1 هر دو با غلظت ۱:۲۰۰ به مدت یک ساعت در دمای اتاق استفاده شد. پس از شستشوی سلول ها با PBS، هسته سلول ها با استفاده از رنگ DAPI (Sigma, USA)، رنگ آمیزی شده و در نهایت به کمک میکروسکوپ فلورسنت (IX71 Olympus) سلول ها بررسی و عکس برداری شدند.

بررسی درصد بیان پروتئین های سلول های شبه عصبی حرکتی با استفاده از تکنیک فلوسایتومتری

جهت ارزیابی درصد بیان پروتئین های تمایزی توسط فلوسایتومتری، در روز چهاردهم پس از تمایز تعداد ۱×۱۰^۵ سلول بنیادی خون ساز CD34⁺ و CD133⁺ تیمار شده با محیط تمایزی به سلول های شبه عصبی حرکتی، به کمک Cell Scaper (جداسازی مکانیکی) (SPL: Korea) از کف چاهک پلیت ۲۴ خانه جدا و در محلول Tween20 0.05% (Sigma, USA) رقیق شده در PBS درون یک میکروتیوب

تعیین درصد خلوص سلول های بنیادی خون ساز جدا شده با استفاده از تکنیک فلوسایتومتری

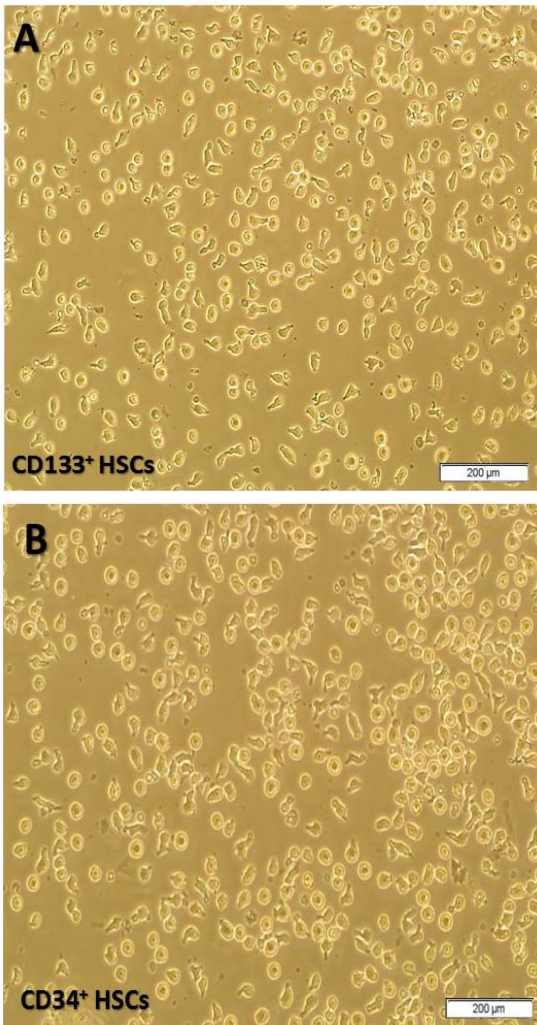
برای بررسی خلوص سلول های جدا شده، آنها را در دو لوله فالكون ریخته، به هر کدام ۱۰۰ μl سرم بلوکه کننده آنتی بادی غیر اختصاصی افزوده شد و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی گراد نگه داری شدند. پس از آن، سلول ها با ۵۰ μl بافر PBS (Caisson Labs, USA) حاوی سرم FBS (Thermo Fisher Scientific, USA)، شستشو داده شده و بعد از سانتریفیوژ (۴۰۰g به مدت ۱۰ دقیقه)، آنها ۳۰ دقیقه بر روی یخ و در یخچال با آنتی بادی های اولیه CD133 کونژوگه شده با ماده فلورسنت PE (BD Bioscience, USA, Cat. no: 566594) و CD34 کونژوگه شده با ماده فلورسنت FITC (BD Bioscience, USA, Cat. no: 555821) انکوبه شدند. برای کنترل منفی، سلول ها به ترتیب از آنتی بادی های IgG1-PE (BD Bioscience, USA, Cat. no: 556650) و IgG1-FITC (BD Bioscience, USA, Cat. no: 554679) استفاده شد.

در مرحله بعدی، سلول ها پس از شستشو به مدت ۱۰ دقیقه با دور ۴۰۰g سانتریفیوژ شدند. سپس به سلول ها محلول فیکس کننده پارافرم آلدئید ۴٪ (Sigma, USA) اضافه شد و با دستگاه فلوسایتومتری (FACSCalibur, BD Biosciences, USA) و نرم افزار Flowmax تحلیل شدند.

کشت تمایزی سلول های بنیادی خون ساز CD133⁺ و CD34⁺ جدا شده از خون بند ناف انسان به سلول های شبه عصبی حرکتی

برای این کار از پلیت ۲۴ خانه (SPL Life Sciences, Korea) استفاده شد. به این صورت که تعداد ۵×۱۰^۵ سلول در هر خانه از این پلیت، به مدت یک هفته با استفاده از محیط القایی شامل DMEM/ F12 (Caisson Labs, USA) حاوی ۱۵٪ سرم FBS، ۲٪ B27 (Thermo Fisher Scientific, USA)، ۱٪ متیسل (Sigma, USA) P/S، ۱۰ ng/ml (Sigma, USA) RA و ۱۰۰ ng/ml (PeproTech, USA) Shh (۱۰۰) کشت شد و هر دو روز یک بار، تعویض محیط انجام شد.

پس از یک هفته، محیط کشت عوض شد و از محیط DMEM/ F12 حاوی ۱۰٪ FBS، ۲٪ B27، ۱٪ P/S، ۱٪ متیسل سلولز و ۱۰۰ ng/ml BDNF (PeproTech, USA) استفاده شد و یک هفته دیگر سلول ها در این محیط کشت شدند و دوز یک بار تعویض محیط انجام شد. در تمامی



شکل ۱. ظاهر سلول‌های بنیادی خون ساز جدا شده از خون بند ناف انسان. (A) سلول‌های بنیادی خون ساز $CD133^+$ جدا شده از خون بند ناف انسان؛ (B) سلول‌های بنیادی خون ساز $CD34^+$ جدا شده از خون بند ناف انسان.

کشت تمایزی سلول‌های بنیادی خون ساز $CD133^+$ و

$CD34^+$ جدا شده به سلول‌های شبه عصبی حرکتی

جهت تمایز سلول‌های بنیادی خون ساز $CD133^+$ و $CD34^+$ مشتق از خون بند ناف انسان به سلول‌های شبه عصبی حرکتی، آنها طی یک هفته تحت اثر محیط القایی حاوی مورفوزن‌های RA و Shh در پلیت ۲۴ خانه کشت شدند و تغییر شکل ظاهری سلول‌ها به صورت ایجاد، استتاله‌های عصبی حرکتی مشاهده شد (به ترتیب شکل ۳A و ۳B). پس از القای سلول‌ها، برای تمایز بیشتر، آنها یک هفته دیگر در معرض محیط کشت حاوی BDNF قرار گرفته و در پایان روز چهاردهم، تمایز سلول‌های بنیادی جدا شده به سلول‌های

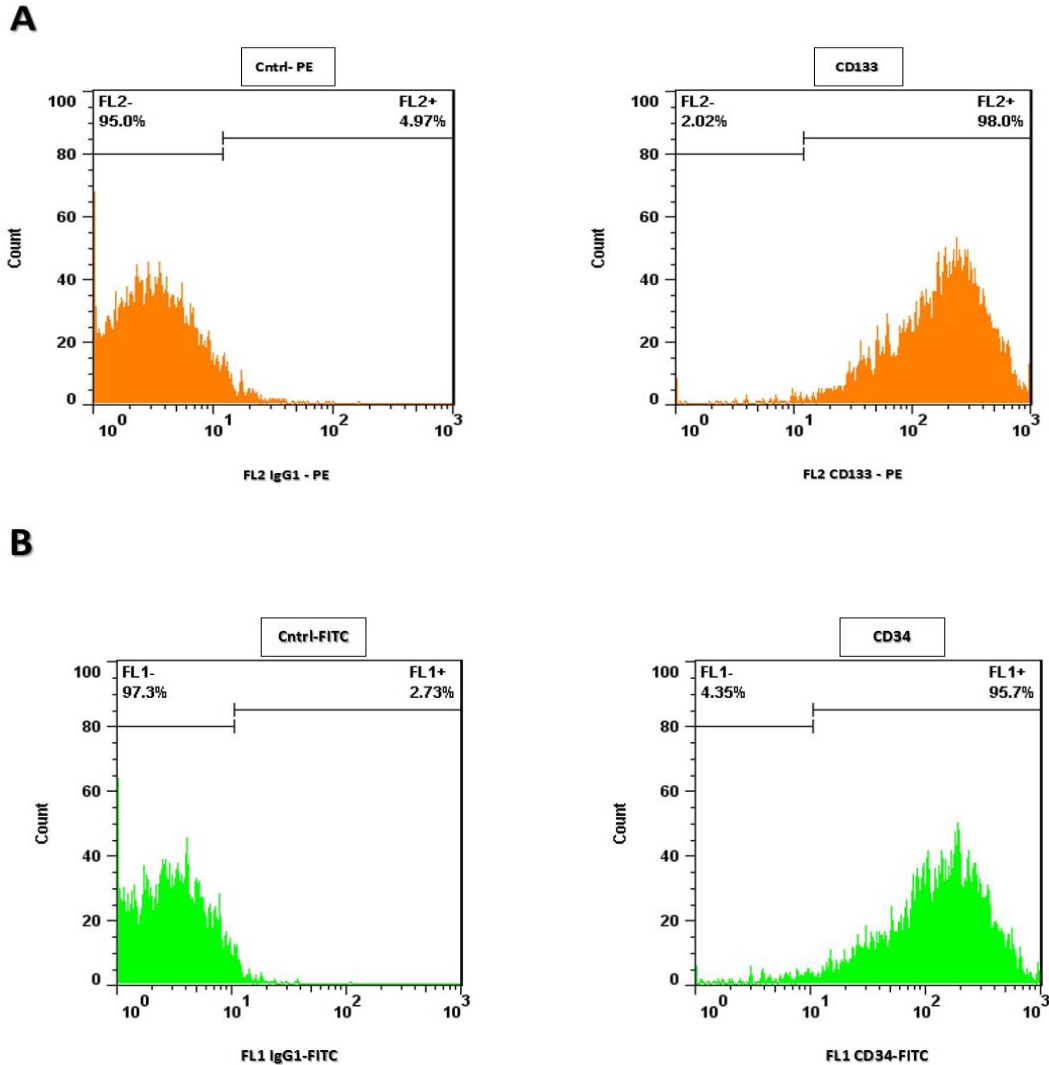
سوسپانس شده و به مدت ۲۰ دقیقه، در دمای اتاق با استفاده از پارافرم آلدئید ۴٪ تثبیت شدند. برای نفوذ پذیر کردن سلول‌ها برای نفوذ پذیر کردن سلول‌ها از محلول (- Triton X) استفاده گردید و از محلول Cell Signaling (Merk, Germany) 5% Goat serum استفاده گردید و از محلول Technology, UK) رقیق شده با PBS، جهت جلوگیری از اتصال آنتی بادی‌های غیراختصاصی استفاده شد. برای شستشوی سلول‌ها هر بار از محلول PBS/Tween20 0.05% استفاده شد و سلول‌ها با دور ۴۰۰g به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوز شدند. پس از آن سلول‌ها به دو گروه تست و کنترل ایزوتایپ تقسیم شده سلول‌های گروه تست یک شبانه روز با استفاده از آنتی بادی‌های اولیه Nestin (anti human Nestin antibody BioLegend, Cat.no:656802)، AChE (Nestin antibody BioLegend, Cat.no:656802)، NF- (Santacruz biotechnology, Cat.no:Sc 373901)، Isl-1 (anti- H(EMD Millipore, Cat.no: NE 1023) human Isl-1 antibody, Santacruz biotechnology, Cat.no:Sc30200) با غلظت ۱:۱۰۰ انکوبه شدند. آنتی بادی ثانویه متصل به PE (Donkey polyclonal secondary antibody to mouse IgG-H &L.Abcam Cat.no:ab 7003) بر علیه آنتی بادی‌های اولیه Nestin، AChE و NF-H و آنتی بادی ثانویه متصل به Alexa Fluor® 488 (Goat polyclonal secondary antibody to rabbit IgG - H&L, Abcam, cat, no: ab-150077) بر علیه آنتی بادی اولیه ISL-1 هردو با غلظت ۱:۲۰۰ به مدت یک ساعت برای هر دو گروه تست و کنترل ایزوتایپ در دمای اتاق استفاده گردید. در نهایت سلول‌ها با PBS سوسپانس شده و درصد سلول‌های تمایز یافته با دستگاه فلوسایتومتری (BD FACS Calibur: USA) و نرم افزار Flowjo بررسی شد.

یافته‌ها

جداسازی و تعیین درصد خلوص سلول‌های بنیادی

$CD133^+$ و $CD34^+$ جدا شده از خون بند ناف انسان

سلول‌های بنیادی $CD133^+$ و $CD34^+$ خون بند ناف انسان، با استفاده از تکنیک جداسازی مغناطیسی MACS جدا شدند و دارای ظاهری مدور بودند (به ترتیب شکل ۱A و ۱B). براساس داده‌های فلوسایتومتری، ۹۸ درصد سلول‌های $CD133^+$ و ۹۵ درصد سلول‌های $CD34^+$ از نمونه‌های جداگانه جدا شدند (به ترتیب شکل ۲A و ۲B).



شکل ۲. نمودار فلوسایتومتری تعیین درصد خلوص سلول های بنیادی خون ساز جدا شده از خون بند ناف انسان براساس مارکر های CD133 و CD34. (A) نمودار فلو سیتومتری درصد خلوص سلول های بنیادی خون ساز CD133+ جدا شده از خون بند ناف انسان. (B) نمودار فلوسایتومتری درصد خلوص سلول های بنیادی خون ساز CD34+ جدا شده از خون بند ناف انسان.

بررسی درصد بیان پروتئین های سلول های شبه عصبی

حرکتی، با استفاده از تکنیک فلوسایتومتری

نتایج حاصل از فلوسایتومتری پس از دوره تمایزی بیان تقریبی ISL-1 (۶۶/۴٪)، AChE (۵۸/۳٪)، NF-H (۸۰/۶٪) Nestin (۸۴/۹٪) را در سلول های CD133+ و همچنین بیان ISL-1 (۶۳/۲٪)، AChE (۵۲/۳٪)، NF-H (۷۸/۶٪) و Nestin (۸۰/۱٪) را در سلول های CD34+ تایید کردند (به ترتیب شکل ۶A و ۶B).

شبه عصبی حرکتی دارای زوائد بلند و آکسون مانند، مشاهده شد (به ترتیب شکل A و B).

بررسی بیان پروتئین ها در سلول شبه عصبی حرکتی

حاصل از تمایز با استفاده از تکنیک ایمونوسیتوشیمی براساس نتایج مشاهده شده از رنگ آمیزی ایمونوسیتوشیمی سلول های حاصل از کشت تمایزی، بیان قابل توجه ISL-1 و AChE و تا حدودی بیان پروتئین های Nestin و NF-H در سلول های حاصل از تمایز سلول های بنیادی CD133+ و CD34+ پس از دوره چهارده روز تمایز مشاهده شد (به ترتیب شکل ۵A و ۵B). همچنین به طور کلی بیان پروتئین ها در سلول های حاصل از تمایز CD133+ بارزتر از CD34+ها بود.

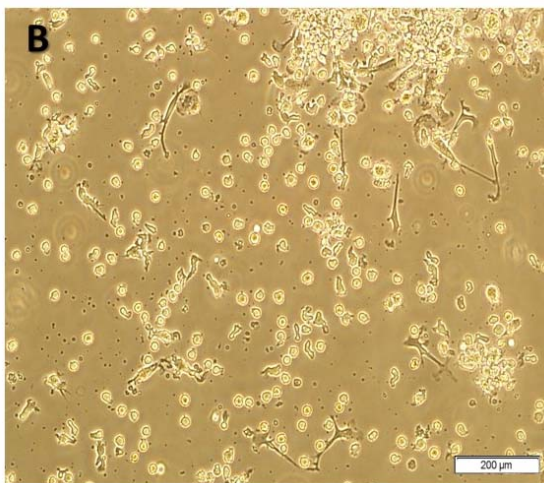
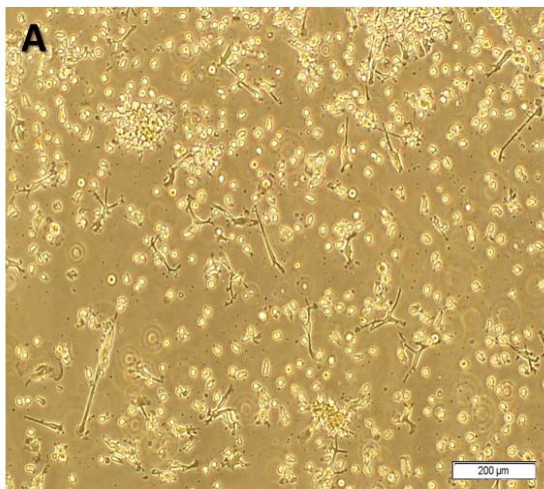
Cntrl PE: % ۴/۸ ± ۰/۰۷, Cntrl Alexa Fluor® 488: % ۴/۶ ± ۰/۰۸

میانگین درصد بیان مارکرهای عصبی حرکتی در سلول‌های CD34⁺ پس از تمایز:

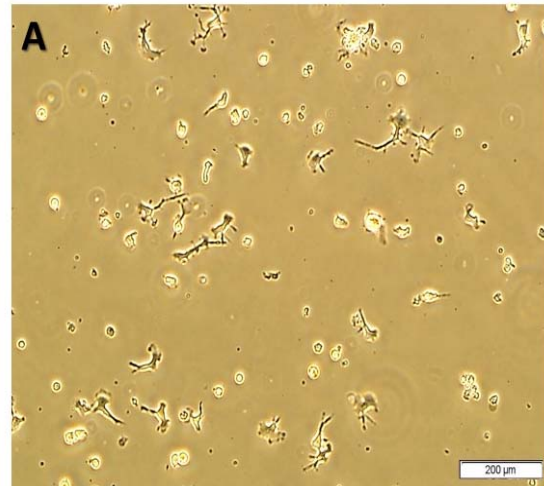
ISL-1: % ۶۱/۲۳ ± ۰/۹۹, AChE: % ۵۰/۹ ± ۰/۷۰, NF-H: % ۷۶/۶ ± ۱/۱, Nestin: % ۷۹/۵۶ ± ۰/۳۱

Cntrl PE: % ۴/۹ ± ۰/۰۵, Cntrl Alexa Fluor® 488: % ۴/۹ ± ۰/۰۱

بیان معنی‌دار مارکرهای ISL-1, AChE, NF-H و Nestin نسبت به کنترل‌های مربوطه در هر دونوع سلول CD 133⁺ و CD34⁺ مشاهده شد.



شکل ۴. سلول‌های حاصل از تمایز ۱۴ روزه سلول‌های بنیادی خون ساز خون بند ناف انسان به سلول‌های شبه عصبی حرکتی. (A) سلول‌های حاصل از تمایز ۱۴ روزه سلول‌های بنیادی خون ساز CD133⁺ خون بند ناف انسان به سلول‌های شبه عصبی حرکتی. (B) سلول‌های حاصل از تمایز ۱۴ روزه سلول‌های بنیادی خون ساز CD34⁺ خون بند ناف انسان به سلول‌های شبه عصبی حرکتی.



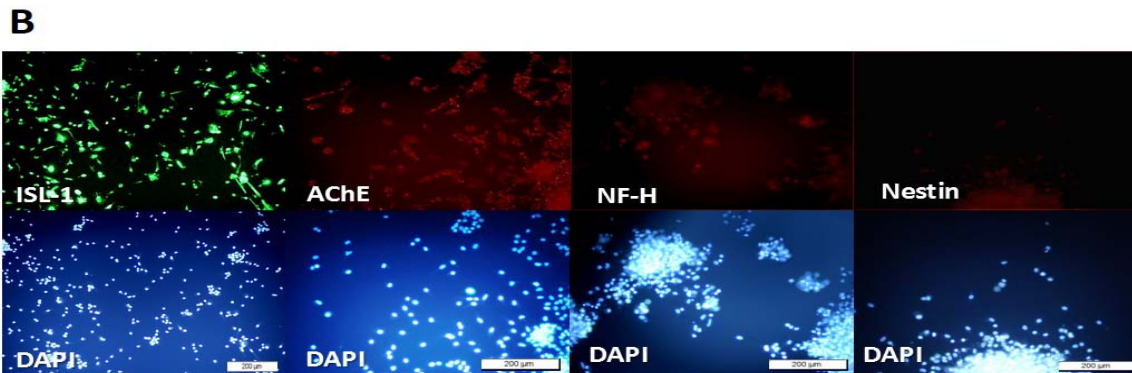
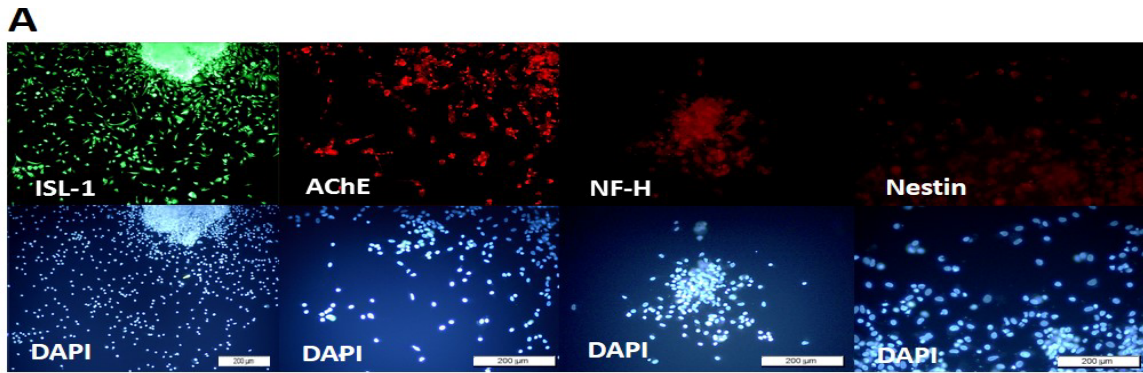
شکل ۳. تغییر شکل سلول‌های بنیادی خون ساز خون بند ناف انسان، پس از یک هفته قرارگیری در معرض محیط کشت القایی تمایز شبه عصبی حرکتی. (A) سلول‌های حاصل از یک هفته القای تمایز شبه عصبی حرکتی در سلول‌های بنیادی خون ساز CD133⁺ خون بند ناف انسان. (B) سلول‌های حاصل از یک هفته القای تمایز شبه عصبی حرکتی در سلول‌های بنیادی خون ساز CD34⁺ خون بند ناف انسان.

تحلیل آماری

میانگین (و خطای معیار) درصد بیان مارکرهای عصبی حرکتی توسط سلول‌های بنیادی خون ساز CD133⁺ و CD34⁺ خون بند ناف انسان پس از کشت تمایزی، بررسی شده توسط تکنیک فلوسائتومتری به ترتیب زیر بدست آمد و $P < ۰/۰۵$ معنی‌دار در نظر گرفته شد.

میانگین درصد بیان مارکرهای عصبی حرکتی در سلول‌های CD133⁺ پس از تمایز:

ISL-1: % ۶۴/۹ ± ۰/۹۳, AChE: % ۵۶/۶ ± ۰/۸۵, NF-H: % ۷۹/۱ ± ۰/۹۷, Nestin: % ۸۵/۴ ± ۰/۱۰



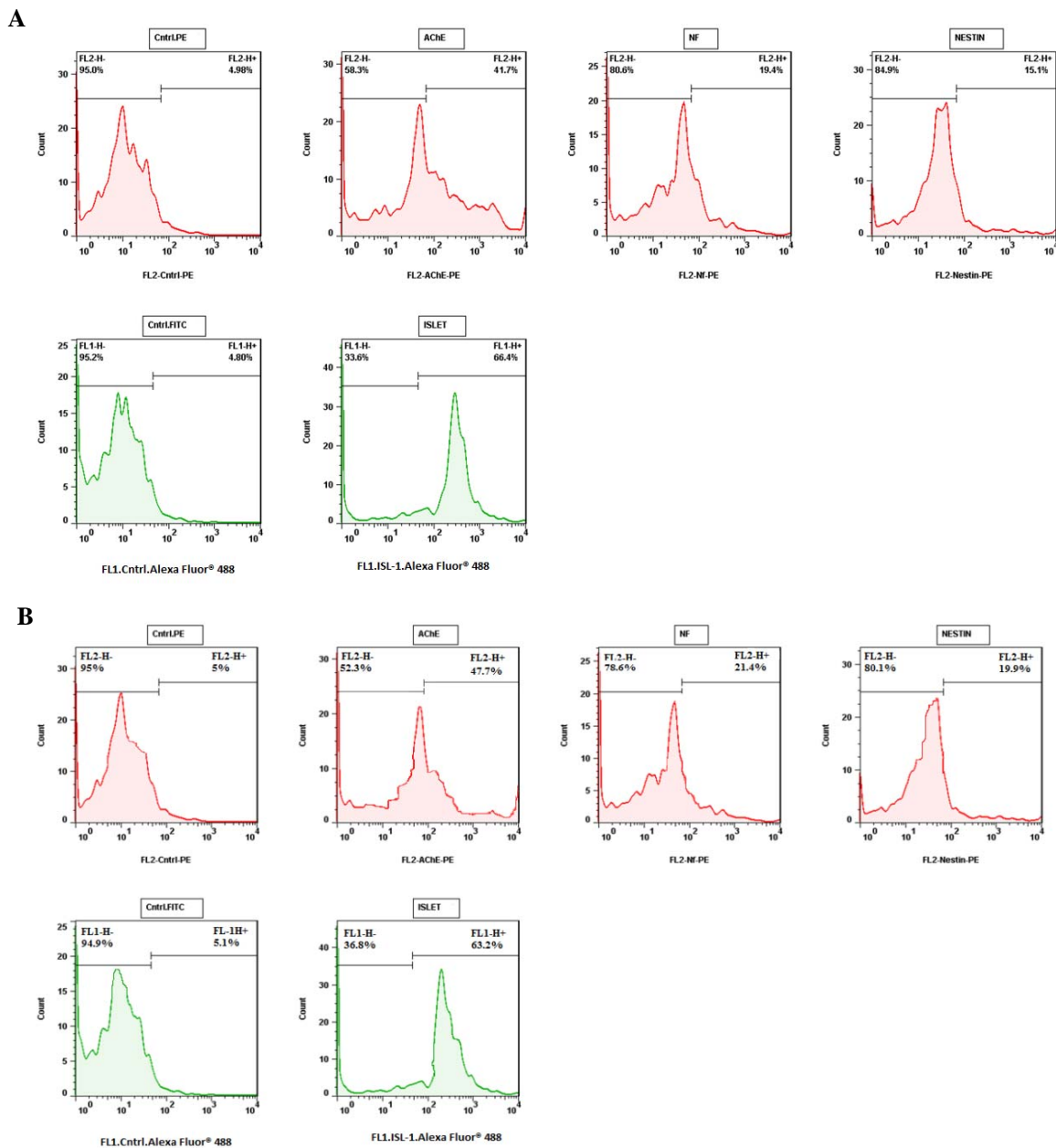
شکل ۵. بررسی بیان مارکرهای عصبی حرکتی در سلول های شبه عصبی حرکتی حاصل از تمایز توسط ایمونوسیتوشیمی. (A) بیان قابل توجه مارکر های ISL-1, AChE, و تاحدودی بیان مارکر های NF-H و Nestin در سلول های شبه عصبی حرکتی حاصل از تمایز ۱۴ روزه سلول-های بنیادی خون ساز CD133+ خون بند ناف انسان. (B) بیان قابل توجه مارکر های ISL-1, AChE, و تاحدودی بیان مارکر های NF-H و Nestin در سلول های شبه عصبی حرکتی حاصل از تمایز ۱۴ روزه سلول های بنیادی خون ساز CD34+ خون بند ناف انسان.

قابلیت زنده ماندن در شرایط داخلی بدن را دارند، در فرد واکنش ایمنی ایجاد نمی کنند و به آسانی در دسترس هستند (۳۴،۳۵)؛ همچنین، تعدادی از مطالعات، توانایی این سلول ها را در تمایز به سلول های عصبی به اثبات رسانده اند (۳۶،۳۷). یکی از انواع سلول های بنیادی موجود در خون بند ناف، سلول های بنیادی خون ساز هستند که بررسی های بسیاری، قدرت تمایز آنها را به سلول های گوناگون، به ویژه نورون ها نشان داده اند (۳۸،۳۷)؛ لذا مطالعه حاضر نیز، در ارتباط با این نوع از سلول ها انجام گرفت.

خون بند ناف، نسبت به منابع دیگر سلول های بنیادی خون ساز، دارای مزایایی نیز هستند، که از این مزایا می توان به عدم محدودیت اهداکننده (۳۹)، بلوغ کمتر سلول ها نسبت به سلول های فرد بالغ و کاهش پس زدگی پیوند (۴۰) اشاره کرد. از سوی دیگر، می توان خون بند ناف افراد را ذخیره کرد و در موارد نیاز برای خود فرد استفاده کرد (۴۱).

بحث

دستگاه عصبی، مهم ترین دستگاه ارتباطی بدن است که بر اعمال دیگر اعضای بدن، نظارت دارد، از این رو آسیب های مربوط به آن، افراد را دچار محدودیت های وسیع می کند. از جمله این آسیب ها، آسیب های طناب نخاعی هستند که معمولاً غیر قابل بازگشت هستند و می توانند سبب مرگ سلول های عصبی حرکتی شوند (۳۲). مطالعات آزمایشگاهی کنونی، در جهت درمان این آسیب ها، بر روی پیوند سلول هایی انجام می گیرد که قادر به ترمیم بافت ها، بهبود عملکرد و نشانه های بیماری هستند (۳۳). امروزه استفاده از سلول های بنیادی بالغ، جهت پیوند برای درمان اختلالات سیستم عصبی مد نظر قرار گرفته است، زیرا بهره مندی از این سلول ها، مشکلاتی از قبیل مشکلات اخلاقی و احتمال ایجاد تومور را ندارد (۳۳). بنابراین، استفاده از سلول های بنیادی بالغ مشتق از خون بند ناف نیز می تواند مفید باشد، زیرا این سلول ها،



شکل ۶. بررسی درصد بیان پروتئین‌های سلول‌های شبه عصبی حرکتی با استفاده از تکنیک فلوسایتومتری. (A) نمودارهای مربوط به بررسی درصد بیان پروتئین‌های تمایزی در سلول‌های بنیادی خونساز $CD133^+$ توسط تکنیک فلوسایتومتری به ترتیب از چپ به راست شامل: کنترل PE (با درصد تقریبی $0.4/98$)، AChE (با درصد تقریبی $0.58/41.7$)، NF-H (با درصد تقریبی $0.80/19.4$)، Nestin (با درصد تقریبی $0.84/15.1$)، کنترل Alexa Fluor® 488 (با درصد تقریبی $0.95/4.8$) و ISLET (با درصد تقریبی $0.33/66.4$) است. (B) نمودارهای مربوط به بررسی درصد بیان پروتئین‌های تمایزی در سلول‌های بنیادی خونساز $CD34^+$ توسط تکنیک فلوسایتومتری به ترتیب از چپ به راست شامل: کنترل PE (با درصد تقریبی $0.8/19.9$)، AChE (با درصد تقریبی $0.52/47.7$)، NF-H (با درصد تقریبی $0.78/21.4$)، Nestin (با درصد تقریبی $0.80/19.9$)، کنترل Alexa Fluor® 488 (با درصد تقریبی $0.94/5.1$) و ISLET (با درصد تقریبی $0.36/63.2$) است.

مارکر $CD133$ بروی هر دو نوع سلول، بنیادی خون ساز و عصبی (۳۰) و همچنین، وجود شواهدی از قبیل قدرت تمایز سلول‌های بنیادی خون ساز $CD133^+$ و $CD34^+$ به سلول‌های

از میان انواع سلول‌های بنیادی خون ساز این بافت، سلول‌های دارای آنتی ژن سطحی $CD133$ و $CD34$ مورد مطالعه تحقیق پیش رو بودند. نکته قابل توجه در این مورد، قابلیت بیان

تمایز سلول های بنیادی خون ساز به سلول های پیش ساز عصبی را داشت (۴۷).

Shh نقش مهمی در بیان ژن های دخیل در تمایز عصبی دارد (۴۸) و در بخش شکمی نخاع، سبب تمایز صفحه عصبی به نورن حرکتی می شود (۴۹). بررسی های گوناگونی نشان داده اند که ترکیبی از RA و Shh سبب تحریک بیان فاکتورهای رونویسی ای می شوند که اهمیت زیادی در تمایز عصبی ایفا می کنند (۵۰، ۵۱). Liqing و همکارانش نیز بیان کردند که در شرایط آزمایشگاهی، فرآیند پیچیده ایجاد نورن های حرکتی نخاع، در حضور RA و Shh امکان پذیر است (۵۲). گروهی از پژوهشگران کشورمان نیز، به اثر هم افزایی این دو فاکتور اشاره کرده اند (۵۳).

BDNF از اعضای خانواده نوروتروفین ها است که طبق بررسی ها، منجر به توسعه سیستم عصبی مرکزی و رشد آکسونی در نواحی آسیب دیده نخاع می شود (۵۴).

B27 نیز امکان رشد سلولی و زنده ماندن نورن ها را در شرایط آزمایشگاهی فراهم می آورد (۵۵).

با استفاده از فاکتورهای مطرح شده، بیان پروتئین های دخیل در تمایز عصبی حرکتی در این تحقیق شامل AChE، ISL-1، Nestin و NF-H مشاهده شد.

AChE یا استیل کولین استراز، آنزیمی است که در شکاف سیناپسی نورون حرکتی با ماهیچه قرار دارد و استیل کولین را تجزیه می کند (۵۶). فعالیت آنزیم مذکور در نورون ها و فیبرهای حرکتی بیشتر از حسی است (۵۷).

براساس مطالعات، استیل کولین استراز در توسعه سیستم عصبی مرکزی پستانداران دارای اهمیت است و به همین علت به عنوان مارکری مناسب، جهت بررسی تمایز عصبی استفاده می شود (۵۸)؛ لذا در این مطالعه نیز بیان این مارکر بررسی شد، در حالی که این بیان در تحقیقات مشابه بررسی نشده است.

ISL-1 در مراحل ابتدایی تمایز عصبی حرکتی بیان می شود و در رنگ آمیزی ایمونوسیتوشیمی، در قسمت هسته سلول رنگ می پذیرد (۵۹).

NF یا نروفیلانمنت، پروتئین فیلامنتی غیر فسفریله حدواسطی است که در سلول های عصبی و به خصوص عصبی حرکتی بیان می شود (۶۰) و RA می تواند سبب القای بیان ژن مربوط به این مارکر در سلول های پیش ساز عصبی شود (۶۱).

عصبی است (۴۲)؛ این در حالی است که تمایز سلول های بنیادی استفاده شده در بررسی حاضر تاکنون به نورون های عصبی حرکتی بررسی نشده است. از این رو، هدف از انجام این پژوهش، بررسی تمایز سلول های بنیادی خون ساز $CD133^+$ و $CD34^+$ خون بند ناف انسان به سلول های شبه عصبی حرکتی بود و برای این کار، سلول های بنیادی مورد نظر، توسط تکنیک MACS جدا شده و در محیط تمایز به سلول های شبه عصبی حرکتی، حاوی سرم کشت داده شدند. برای تایید بیان مارکرهای $CD133$ و $CD34$ بر روی سلول های جدا شده نیز از تکنیک فلوسایتومتری استفاده شد که بیان این مارکرها را به صورت ۹۸٪ برای سلول های $CD133^+$ و ۹۵/۷٪ برای سلول های $CD34^+$ تایید کرد.

سلول های جدا شده، ابتدا ظاهری دایره ای شکل داشتند و قابلیت چسبیدن به پلیت را نداشتند؛ بنابراین برای چسبیدن سلول ها به پلیت، از متیل سلولز استفاده شد. پس از آن، هنگامی که در معرض محیط تمایزی دارای سرم و حاوی فاکتور های RA، Shh، BDNF و B27 قرار گرفتند، تغییر شکل سلول های اولیه به صورت ایجاد زوائد بلند عصبی حرکتی مشاهده شد. بیان پروتئین های عصبی حرکتی شامل AChE، ISL-1، NF-H و Nestin نیز در پایان روز چهاردهم باروش ایمونوسیتوشیمی نشان داده شد و همچنین توسط تکنیک فلوسایتومتری به طور کمی تایید شد، که بیان این مارکرها در سلول های حاصل از تمایز $CD133^+$ ها بیشتر قابل توجه بود.

از آنجا که استفاده از عوامل رشد، نقش بسیار مهمی را در تسریع تکثیر و تمایز سلول ها به عهده دارد (۴۳)، در این بررسی نیز از عواملی در تمایز سلول های بنیادی خون ساز به سلول های شبه عصبی حرکتی استفاده شد که شامل RA، Shh، BDNF و B27 بودند.

RA به عنوان یک مولکول پیام رسان، از عوامل القاگر تمایز عصبی است (۴۴) و در بخش های خلفی لوله عصبی، سبب ایجاد واکنش های بین سلولی لازم، برای تمایز و تکوین می شود (۴۵) و حضور آن، در مراحل ابتدایی تکامل عصبی و رشد آکسونی، دارای اهمیت است (۴۴). برخی از تحقیقات، نیز تایید کننده توانایی تمایز عصبی، سلول های تک هسته ای خون بند ناف در حضور مواد القا کننده ای نظیر RA در همراهی با مواد دیگر است (۴۶).

طبق مطالعه Jang و همکارانش در سال ۲۰۰۴، رتینوئیک اسید نقش به سزایی در حفظ توانایی خودنوسازی و ترویج

بررسی شده در تحقیق فعلی، به عنوان منابع مناسبی جهت سلول درمانی در زمینه بهبود ضایعات نخاعی استفاده شوند.

تشکر و قدردانی

از کلیه عزیزانی که ما را در راستای انجام این پژوهش یاری کردند، به ویژه اساتید و کارشناسان مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی دانشگاه علوم پزشکی ایران، کمال تشکر و قدردانی را داریم.

Nestin پروتئین نورواکتودرمی سلول بنیادی است (۶۲) و بیان آن بیشتر در سلول‌های بنیادی و پیش ساز عصبی مشاهده شده و پس از بلوغ به تدریج کاهش می‌یابد (۶۳). به طور کلی با نتایج و مشاهدات به دست آمده از بررسی‌های انجام گرفته در این مطالعه، می‌توان نتیجه گرفت که سلول‌های بنیادی خون ساز $CD133^+$ و $CD34^+$ خون بند ناف انسان، پتانسیل بیان مارکرهای عصبی حرکتی را در حضور BDNF, Shh, RA و B27 دارند و همچنین، می‌توان امید داشت که با انجام تحقیقات بیشتر، سلول‌های حاصل از تمایز

REFERENCES

- Anderson L, Burnstein RM, He X, Luce R, Furlong R, Foltynie T, et al. Gene expression changes in long term expanded human neural progenitor cells passaged by chopping lead to loss of neurogenic potential in vivo. *Exp Neurol* 2007;204:512-24.
- Akiyama Y, Radtke C, Honmou O, Kocsis JD. Remyelination of the spinal cord following intravenous delivery of bone marrow cells. *Glia* 2002;39:229-36.
- Reynolds BA, Weiss S. Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system. *Science* 1992;255:1707-10.
- Arien-Zakay H, Lecht Sh, Nagler A, Lazarovici Ph. Human Umbilical Cord Blood Stem Cells: Rational for Use as a Neuroprotectant in Ischemic Brain Disease. *Int J Mol Sci* 2010;10:3513-28.
- Raedt R, Boon P. Cell therapy for neurological disorders: A comprehensive review. *Acta Neurol Belg* 2005;105:158-70.
- Lee H, Shamy G, Elkabets Y, Schofield CM, Harrison NL, Panagiotakos G, et al. Directed Differentiation and Transplantation of Human Embryonic Stem Cell-Derived Motoneurons. *Stem Cells* 2007;25:1931-9.
- Barati P, Darvishi M, Tiraihi T, Doroudi T. Neurogenic Differentiation of Rat Bone Marrow Stromal Cells by the Non Toxic Factors of Bioactive Substance as an Inducer. *Shafaye khatam* 2014;2:47-55.
- Fuchs E, Segre JA. Stem cells: a new lease on life. *Cell* 2000;100:143-55.
- Butler MG, Menitove JE. Umbilical cord blood banking: an update. *J Assist Reprod Genet* 2011;28:669-76.
- Stanevsky A, Goldstein G, Nagler A. Umbilical cord blood transplantation: Pros, cons and beyond. *Blood Rev* 2009;23:199-204.
- Van de Ven C, Collins D, Bradley MB. The potential of umbilical cord blood multipotent stem cells for nonhematopoietic tissue and cell regeneration. *Exp Hematol* 2007;35:1753-65.
- Margaret A. Goodell, Katja B, Glenn P. Isolation and Functional Properties of Murine Hematopoietic Stem Cells that are Replicating In Vivo. *J Exp Med* 1996;183:1797-806.
- Okada S, Nakauchi H, Nagayoshi K. In vivo and in vitro stem cell function of c-kit-and Sca-1-positive murine hematopoietic cells. *Blood* 1992;80:3044-50.
- Spangrude GJ, Heimfeld S, Weissman IL. Purification and characterization of mouse hematopoietic stem cells. *Science* 1988;241:58-62.
- Quesenberry PJ. Stromal cells in long-term bone marrow cultures. In: Tavassoli M, editor. *Handbook of the Hematopoietic Microenvironment*. Clifton, NJ. Humana Press 1989;80:253-85.
- Pelosi E, Castelli G, Testa U. Human umbilical cord is a unique and safe source of various types of stem cells suitable for treatment of hematological diseases and for regenerative medicine. *Blood Cells Mol Dis* 2012;49:20-8.
- Civin CI, Strauss LC, Brovall C. Antigenic analysis of hematopoiesis. III. A hematopoietic progenitor cell surface antigen defined by a monoclonal antibody raised against KG-1a cells. *J Immunol* 1984;133:157-65.
- Bhatia M, Wang JC, Kapp U. Purification of primitive human hematopoietic cells capable of repopulating immune-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997;94:5320-5.
- Krause DS, Fackler MJ, Civin CI. CD34: structure, biology, and clinical utility. *Blood* 1996;87:1-13.

20. Goodell MA, Rosenzweig M, Kim H. Dye efflux studies suggest that hematopoietic stem cells expressing low or undetectable levels of CD34 antigen exist in multiple species. *Nat Med* 1997;3:1337-45.
21. Zanjani ED, Meida-Porada G, Livingston AG. Human bone marrow CD34⁻ cells engraft in vivo and undergo multilineage expression that includes giving rise to CD34⁺ cells. *Exp Hematol* 1998;26:353-60.
22. Bhatia M, Bonnet D, Murdoch B. A newly discovered class of human hematopoietic cells with SCID-repopulating activity. *Nat Med* 1998;4:1038-45.
23. Simmons DL, Satterthwaite AB, Tenen DG. Molecular cloning of a cDNA encoding CD34, a sialomucin of human hematopoietic stem cells. *J Immunol* 1992;148:267-71.
24. Nielsen JS, McNagny KM. Novel functions of the CD34 family. *J Cell Sci* 2008;121:3683-92.
25. Yin AH, Miraglia S, Zanjani ED, Almeida-Porada G, Ogawa M, Leary AG, et al. AC133, a novel marker for human hematopoietic stem and progenitor cells. *Blood* 1997;90:5002-12.
26. Miraglia S, Godfrey W, Yin AH, Atkins K, Warnke R, Holden JT, et al. novel five-transmembrane hematopoietic stem cell antigen: isolation, characterization, and molecular cloning. *Blood* 1997;90:5013-21.
27. Bauer N, Fonseca AV, Florek M, Freund D, J?szai J, Bornh?user M, et al. New insights into the cell biology of hematopoietic progenitors by studying prominin-1(CD133). *Cells Tissues Organs* 2008;188:127-38.
28. Yao J, Zhang T, Ren J, Yu M, Wu G. Effect of CD133/prominin-1 antisense oligodeoxynucleotide on in vitro growth characteristics of Huh-7 human hepatocarcinoma cells and U251 human glioma cells. *Oncol Rep* 2009;22:781-7.
29. Yasuda H, Tanaka K, Saigusa S, Toiyama Y, Koike Y, Okugawa Y, et al. Elevated CD133, but not VEGF or EGFR, as a predictive marker of distant recurrence after preoperative chemoradiotherapy in rectal cancer. *Oncol Rep* 2009;22:709-17.
30. Yoshikawa S, Zen Y, Fujii T, Sato Y, Ohta T, Aoyagi Y, et al. Characterization of CD133⁺ parenchymal cells in the liver: Histology and culture. *World J Gastroenterol* 2009;15:4896-906.
31. Zangiacomì V, Balon N, Maddens S, Lapierre V, Tiberghien P, Schlichter R, et al. Cord Blood-Derived Neurons Are Originated from CD133⁺/CD34⁺ Stem/Progenitor Cells in a Cell-to-Cell Contact Dependent Manner. *Stem Cells Dev* 2008;17:1005-16.
32. Kashiwara Y, Kuno M, Miyata Y. Cell death of axotomized motoneurons in neonatal rats and its prevention by peripheral reinnervation. *J Physiol* 1987;135-48.
33. Rishi S, Tewarie N, Hurtado A. Stem Cell-Based Therapies for Spinal Cord Injury. *J Spinal Cord Med* 2009;32:105-14.
34. Harris DT. Non-haematological uses of cord blood stem cells. *Br J Haematol* 2009;147:177-84.
35. Ichim TE, Solano F, Lara F, Paris E, Ugalde F, Paz Rodriguez J, et al. Feasibility of combination allogeneic stem cell therapy for spinal cord injury: a case report. *Int Arch Med* 2010;3:30-7.
36. Kang K, Kim S, Oh Y, Kim KY, Park HK, Song CH, et al. A 37-year-old spinal cord-injured female patient transplanted of multipotent stem cells from human UC blood, with improved sensory perception and mobility, both functionally and morphologically: a case study. *Cytotherapy* 2005;7:368-73.
37. Sanberg PR, Willing AE, Garbuzova-Davis S, Saporta S, Liu G, Sanberg CD, et al. Umbilical cord blood-derived stem cells and brain repair. *Ann N Y Acad Sci* 2005;1049:67-83.
38. Chen SH, Chang FM, Tsai YC. Infusion of human umbilical cord blood cells protect against cerebral ischemia and damage during heatstroke in the rat. *Exp Neurol* 2006;199:67-76.
39. Zhou G, Chen J, Lee S, Clarc T, Rowley JD, Wang SM. The pattern of gene expression in human CD34⁺ stem/progenitor cells. *Proc Natl Acad Sci* 2001;98:13966-71.
40. Kurtzberg J, Laughlin M, Graham ML, Smith C, Olson JF, Halperin EC, et al. Placental blood as a source of hematopoietic stem cell for transplantation into unrelated recipients. *N Engl J Med* 1996;335:157-68.
41. Gluckman E, Broxmeyer HE, Auerbach AD, Friedman HS, Douglas GW, Devergie A, et al. Hematopoietic reconstitution in a patient with Fanconi's anemia by means of umbilical cord blood from an HLA-identical sibling. *New Engl J Med* 1989;321:1174-8.
42. Hafizi M, Atashi A, Bakhshandeh B, Kabiri M, Nadri S, Hosseini RH, et al. MicroRNAs as Markers for Neurally Committed CD133⁺/CD34⁺ Stem Cells Derived from Human Umbilical Cord Blood. *Biochem Genet* 2012;51:175-88.

43. Zahir T, Chen YF, MacDonald JF, Leipzig N, Tator CH, Shoichet MS. Neural Stem/Progenitor Cells Differentiate In Vitro to Neurons by the Combined Action of Dibutyryl cAMP and Interferon-?. *Stem Cells Dev* 2009;18:10.
44. Maden M. Retinoic acid in the development, regeneration and maintenance of the nervous system. *Nat Rev Neurosci* 2007;8:755-65.
45. 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* 2002;10;99:16273-8.
46. Sanchez-Ramos JR, Song S, Kamath SG, Zigova T, Willing A, Cardozo-Pelaez F, et al. Expression of neural markers in human umbilical cord blood. *Exp Neurol* 2001;171:109-15.
47. Jang YK, Park JJ, Lee MC, Yoon BH, Yang YS, Yang SE, et al. Retinoic acid-mediated induction of neurons and glial cells from human umbilical cord blood-derived hematopoietic stem cells. *J Neur Res* 2004;75:573-84.
48. Chojnacki A, Weiss S. Isolation of a novel platelet-derived growth factor-responsive precursor from the embryonic ventral forebrain. *J Neurosci* 2004;24:1088-9.
49. Simerman AA, Dumesic DA, Chazenbalk GD. Pluripotent muse cells derived from human adipose tissue: a new perspective on regenerative medicine and cell therapy. *Clin Transl Med* 2014;3:12.
50. Diez del Corral R, Olivera-Martinez I, Goriely A, Gale E, Maden M, Storey K. Opposing FGF and retinoid pathways control ventral neural pattern, neuronal differentiation, and segmentation during body axis extension. *Neuron* 2003;40:65-79.
51. Maden M. Retinoid signaling in the development of the central nervous system. *Nat Rev Neurosci* 2002;3:843-53.
52. Liqing Y, Jia G, Jiqing C, Ran G, Fei C, Jie K, et al. Directed differentiation of motor neuron cell-like cells from human adipose-derived stem cells in vitro. *Neuroreport* 2011;22:370-3.
53. Faghihi F, Mirzaei E, Sarveazad A, Ai J, Ebrahimi Barough S, Lotfi A, et al. Differentiation Potential of Human Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells into Motorneuron-like Cells on Electrospun Gelatin Membrane. *J Mol Neurosci* 2014;55:845-53.
54. Jin Y, Fischer I, Tessler A, Houle JD. Transplants of fibroblasts genetically modified to express BDNF promote axonal regeneration from supraspinal neurons following chronic spinal cord injury. *Exp Neurol* 2002;177:265-75.
55. Lee SK, Paff SL. Synchronization of neurogenesis and motor neuron specification by direct coupling of bHLH and homeodomain transcription factors. *Neuron* 2003;38:731-45.
56. Jiang JX, Choi RC, Siow NL, Lee HH, Wan DC, Tsim KW. Muscle induces neuronal expression of acetylcholinesterase in neuron-muscle co-culture: transcriptional regulation mediated by cAMP-dependent signaling. *J Biol Chem* 2003;278:35-44.
57. Bartels CF, Zelinski T, Lockridge O. Mutation at codon 322 in the human acetylcholinesterase (ACHE) gene accounts for YT blood group polymorphism. *Am J Hum Genet* 1993;52:928-36.
58. Massoulié J, Perrier N, Noureddine H, Liang D, Bon S. Old and new questions about cholinesterases. *Chem Biol Interact* 2008;175:30-44.
59. Ericson J, Thor S, Edlund T, Jessell TM, Yamada T. Early stages of motor neuron differentiation revealed by expression of homeobox gene *Islet-1*. *Science* 1992;256:1555-60.
60. Eyer J, Leterrier JF. Influence of the phosphorylation state of neurofilament proteins on the interactions between purified filaments in vitro. *Biochem J* 1998;252:655-60.
61. Novitsch BG, Chen AI, Jessell TM. Coordinate regulation of motor neuron subtype identity and pan-neuronal properties by the bHLH repressor *Olig2*. *Neuron* 2001;31:773-89.
62. Guérette D, Khan PA, Savard PE, Vincent M. Molecular evolution of type VI intermediate filament proteins. *BMC Evol Biol* 2007;7:164.
63. Michalczyk K, Ziman M. Nestin structure and predicted function in cellular cytoskeletal organization. *Histol Histopathol* 2005;20:665-71.