

بررسی القای فنوتیپ عصبی در سلول‌های بنیادی P19 تحت اثر عصاره مغز نوزاد رت و دپرنیل

نازیلا مومن دوست^{۱*}، سید جمال مشتاقیان^۲، فریبا اسماعیلی^۳

چکیده

زمینه و هدف: بیماری پارکینسون با از دست رفتن انتخابی گروهی از سلول‌های دوپامینرژیک در بخش متراکم جسم سیاه ایجاد می‌شود. یکی از روش‌های درمانی این بیماری، جایگزینی سلول‌های از دست رفته توسط سلول‌های بنیادی است. مطالعات نشان می‌دهد که سلول‌های کارسینومای جنینی P19 قدرت تکثیر بالایی در محیط کشت دارند. این سلول‌ها می‌تواند تحت تأثیر القاکننده‌های مختلف به انواع سلول‌های مشتق از سه لایه زایای جنینی تمایز پیدا کنند.

روش بررسی: در این مطالعه سلول‌های بنیادی P19 در شرایط معمولی کشت و سپس تکثیر شدند. این سلول‌ها در ظروف کشت با چسبندگی پایین جهت تولید اجسام شبه جنینی در محیط تمایزی حاوی سه درصد سرم به همراه عصاره مغز نوزاد رت، دپرنیل و ترکیب دپرنیل و عصاره مغز نوزاد رت به مدت ۱۴ روز کشت داده شدند. برای ردیابی پروتئین‌های ویژه سلول‌های عصبی مانند سیناپتوفیزین، بتاتوبولین ۳ و نستین در سلول‌های تمایز یافته از روش ایمنوفلورسنس استفاده شد. سپس بیان ژن‌های وابسته به تکوین و عملکرد عصبی در این سلول‌ها به وسیله Real-time PCR تأیید شد.

یافته‌ها: نتایج حاصل از این پژوهش نشان داد که سلول‌های بنیادی کارسینومای جنینی P19 تحت شرایط آزمایشگاهی با عوامل القاگر از قبیل عصاره مغز نوزاد رت و داروی دپرنیل و یا ترکیبی از آن‌ها به سلول‌های عصبی و به ویژه دوپامینرژیک تمایز می‌یابند. **نتیجه گیری:** نتایج این مطالعه نشان داد که سلول‌های بنیادی کارسینومای جنینی P19 تحت شرایط آزمایشگاهی و تحت تأثیر عوامل القاگر قابلیت تمایز به سلول‌های عصبی و به ویژه فنوتیپ دوپامینرژیک را دارند.

واژگان کلیدی: سلول‌های کارسینومای جنینی P19، دپرنیل، عصاره مغز، تمایز عصبی، تیروزین هیدروکسیلاز.

۱- کارشناس ارشد گروه زیست شناسی.

۲- دانشیار گروه زیست شناسی.

۳- استادیار گروه زیست شناسی.

۱ و ۲ و ۳- گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، اصفهان، اصفهان، ایران.

* نویسنده مسئول:

نازیلا مومن دوست؛ گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، اصفهان، اصفهان، ایران.

تلفن: ۰۰۹۸۹۱۴۹۴۶۵۳۹۱

Email: nazilamomendost@gmail.com

مقدمه

می‌شود. مصرف مداوم این دارو فعالیت نورون‌های دوپامینرژیک را تسهیل می‌کند. این دارو از طریق جلوگیری از تخریب دوپامین درون‌زاد، قابلیت دسترسی به این ماده و همچنین فعالیت آن را در جسم سیاه افزایش می‌دهد. این دارو می‌تواند تمایز سلول‌های بنیادی جنینی به سلول‌های عصبی را به طور وابسته به دوز القا نموده و منجر به بیان ژن‌های نوروتروفین در این سلول‌ها شود (۱۰، ۱۱).

از طرفی، مطالعه نوروترانسسمیترهای نورون‌های مشتق شده از سلول‌های P19 نشان داد که این نورون‌ها هر دو ویژگی آدرنرژیک و کولینرژیک را دارند (۱۲). در مطالعه‌ای دیگر القای فنوتیپ عصبی در سلول‌های P19 ترانسفکت شده با ژن پروتئین فلورسانت سبز با استفاده از داروی ضد پارکینسونی دپرنیل صورت گرفت (۱۳). در این مطالعه به بررسی القای فنوتیپ عصبی در سلول‌های بنیادی P19 تحت اثر ترکیبی از عصاره مغز نوزاد رت و دپرنیل پرداخته شد.

روش بررسی

کشت و نگهداری سلول‌های بنیادی P19

در این پژوهش از سلول‌های تراتوکارسینومایی رده P19 استفاده شد. این سلول‌ها به صورت کشت چسبنده از بانک سلولی (انستیتو پاستور تهران، ایران) تهیه شدند. جهت کشت سلول‌های P19، محیط کشت (Sigma, α -MEM (PBS 0/01 M, USA)، فاقد کلسیم/منیزیم و محلول (Sigma, USA) EDTA/ Trypsin) تهیه شد. سپس سلول‌ها به ظرف کشت افزوده به طور یکنواخت روی بستر کشت توزیع شدند. فلاسک‌ها به انکوباتور منتقل و اجازه داده شد تا سلول‌ها به کف ظرف بچسبند و رشد و تکثیر خود را شروع کنند. سپس به منظور ذخیره سازی بلند مدت، سلول‌ها به مدت 24 ساعت در دمای -70 درجه سانتیگراد نگهداری و سپس به تانک ازت انتقال

سلول‌های بنیادی کاربردهای بالینی وسیعی داشته و نویدی برای درمان بسیاری از بیماری‌های مزمن هستند (۱). این سلول‌ها دارای دو ویژگی اساسی تکثیر و خود تجدیدی (۲-۴) و توانایی تمایز به دودمانی از انواع سلول‌های تخصص‌یافته بافت‌های جنینی و بالغ هستند (۳). از انواع سلول‌های بنیادی می‌توان به سلول‌های کارسینومایی جنینی P19 اشاره نمود. سلول‌های P19 همانند سایر دودمان‌های سلولی تراتوکارسینومایی نامیرا و فناپذیر هستند (۵). این سلول‌ها به سرعت در محیط کشت تکثیر می‌شوند و می‌توانند تحت شرایط مناسب به تمام انواع سلول‌ها تمایز یابند. برای تمایز این سلول‌ها به سلول عصبی از روش‌های مختلفی از جمله به‌کارگیری القاکننده استفاده می‌کنند. تاکنون چندین عامل القاکننده فنوتیپ عصبی شناخته شده‌اند که از جمله آن‌ها می‌توان اسید رتینوئیک (RA)، دی-متیل سولفوکسید، فاکتور رشد فیبروبلاستی ۸ و اسید آسکوربیک را نام برد (۶). از القاگرهای دیگر می‌توان به عصاره بافت مغزی اشاره کرد. عصاره مغز نوزاد رت می‌تواند فنوتیپ عصبی را همراه با بیان ژن‌های اختصاصی عصبی القا نماید. داروی محافظ عصبی دپرنیل (سلجیلین) از عوامل دیگری است که جهت القای فنوتیپ عصبی در سلول‌های P19 استفاده می‌شود (۷). دپرنیل عامل اصلی افزایش دهنده فعالیت کتکول آمینرژیک (CLE) در مغز است (۸). این دارو به عنوان مهارکننده آنزیم منوآمینواکسیداز بوده که از چند طریق موجب بهبودی علائم بیماری‌های اختلالات عصبی از جمله پارکینسون و افسردگی می‌شود (۹). بیماری پارکینسون اختلال عصبی حرکتی است که به علت از بین رفتن نورون‌های تولیدکننده دوپامین در ناحیه جسم سیاه مغز ایجاد می‌شود. تعداد نورون‌های تحلیل رفته در این ناحیه با علائم بیماری ارتباط مستقیم دارند. دپرنیل از چند طریق موجب بهبودی بیماری پارکینسون می‌شود. به این معنا که دپرنیل عامل محافظت کننده عصبی است و باعث رها شدن مواد مغذی از اعصاب

آن‌ها اضافه شد. سلول‌ها به مدت دو هفته نگهداری و سپس برای انجام مراحل بعدی منجمد شدند.

القای تمایز عصبی با عصاره مغز نوزاد رت،

دپرینیل و ترکیبی از دپرینیل و عصاره مغز نوزاد رت

جهت بررسی القای تمایز سلول‌های کارسینومای جنینی رده P19، سلول‌های حاصل از کشت چسبنده اجسام شبه جنینی در پنج گروه مختلف تیمار شدند. گروه اول به عنوان کنترل منفی در نظر گرفته شد. به طوری که هیچ گونه ماده القاکننده‌ای به سلول‌ها افزوده نشد و سلول‌ها با محیط کشت α -MEM بدون سرم تیمار شد. گروه دوم به عنوان کنترل مثبت در نظر گرفته شد که در آن از محیط کشت α -MEM حاوی ۳ میکرولیتر اسید رتینوئیک با غلظت 5×10^{-7} برای تمایز عصبی سلول استفاده شد (۱۴). گروه‌های آزمایشی که شامل سه گروه القا شده با دپرینیل، عصاره مغز رت و ترکیب دپرینیل-عصاره مغز بود. جهت القای فنوتیپ عصبی در سلول‌های کارسینومای جنینی، ابتدا محیط‌های القا با مواد القاگر تهیه شد. محیط‌های القا شامل: ۱- محیط القای عصاره مغز نوزاد رت محتوی محیط کشت α -MEM و ۲۵ میکرولیتر عصاره مغز غلظت ۱۰۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر به ازای یک میلی‌لیتر محیط کشت. ۲- محیط القای دپرینیل محتوی محیط کشت α -MEM و ۱۰ میکرولیتر دپرینیل به ازای یک میلی‌لیتر محیط کشت، ۳- محیط القا شامل ترکیب دپرینیل و ۱۰۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر عصاره مغز. برای هر گروه در هر میکروپلیت حداقل سه تکرار در نظر گرفته شد. سلول‌ها به مدت ۲۴ ساعت در محیط القا قرار گرفتند. در طی زمان القای عصبی میزان FBS به سه درصد کاهش یافت.

در این پژوهش برای شناسایی سلول‌های عصبی که در شرایط آزمایشگاهی متمایز شدند. ارزیابی بیان پروتئین‌ها و ژن‌های اختصاصی عصبی انجام شد. برای بررسی بیان پروتئین‌های اختصاصی عصبی در سلول‌های تمایز یافته از روش ایمنوفلورسنس استفاده شد. سرانجام با استفاده از

داده شدند. پس از مرحله انجماد، برای انجام مرحله بعدی آزمایش و تولید اجسام شبه جنینی مرحله ذوب کردن سلول‌های P19 انجام شد.

استخراج عصاره مغز نوزاد رت

در این پژوهش از نوزاد یک هفته‌ای رت استفاده شد. برای این منظور از لانه حیوانات دانشکده علوم پزشکی دانشگاه اصفهان ده نوزاد رت یک هفته‌ای نژاد ویستار تحت شرایط استاندارد نگهداری به لانه حیوانات دانشگاه اصفهان منتقل شد. برای خارج کردن مغز نوزاد رت ابتدا حیوان بیهوش و سپس مغز خارج شد. مغز در PBS محتوی protease inhibitor سرد (۹۹۰ میکرو لیتر PBS + ده میکرو لیتر PMSF) درون هموژنایزر قرار داده و همگن شد. سانتریفیوژ در دو مرحله انجام و مایع رویی که محتوی پروتئین بود، جمع آوری شد. بلافاصله پس از استخراج، غلظت پروتئین تام عصاره با استفاده از روش بردفورد تعیین شد

تولید اجسام شبه جنینی

به منظور تولید اجسام شبه جنینی از سلول‌های P19، تعداد $2/5 \times 10^4$ سلول در یک میلی‌لیتر در پتری دیش‌های باکتریولوژی کشت داده شدند. سلول‌ها در محیط کشت (α -MEM همراه با ده درصد سرم) در پتری دیش‌ها به ظرف کشت نمی‌چسبند. بنابراین؛ تمایل دارند به یکدیگر چسبیده و تجمعات سلولی یا اجسام شبه جنینی تشکیل دهند. جهت کشت چسبنده این اجسام در ابتدا حداقل ۲۴ ساعت قبل از کشت، ظرف ژلاتینه آماده سازی شد و سلول‌ها روی لامل‌های ژلاتینه در میکروپلیت‌های ۱۲ خانه‌ای کشت شدند. محیط القایی به صورت ترکیبی از محیط کشت پایه بدون سرم، صد نانوگرم در میلی‌لیتر عصاره مغز نوزاد رت و غلظت 10^{-8} مولار دپرینیل تهیه شد. در مقابل گروه آزمایش، یک گروه کنترل منفی محتوی محیط کشت α -MEM فاقد محیط کشت القا در نظر گرفته شد. ۲۴ ساعت پس از القا سلول‌ها با محلول PBS شستشو و محیط کشت α -MEM حاوی ۳ درصد سرم FBS به

بررسی القای بیان ژن‌های اختصاصی عصبی با

استفاده از روش Real-time PCR

به منظور بررسی بیان ژن اختصاصی سلول‌های عصبی تمایز یافته از سلول‌های بنیادی از روش RT-PCR استفاده شد. در ابتدا RNA تام سلول استخراج و غلظت RNA استخراج شده با روش اسپکتروفتومتری تعیین شد. یک نانوگرم از RNA استخراج شده با استفاده از پرایمر *Oligo primer* (Fermentase) و کیت سنتز cDNA (Takara, RR037A) نسخه برداری معکوس شد. از cDNA تولیدشده به عنوان الگو برای انجام PCR و از ژن $\beta 2M$ به عنوان ژن خانه زاد استفاده شد. دناتوراسیون اولیه در دمای ۹۴ درجه سانتی گراد به مدت پنج دقیقه، دناتوراسیون ثانویه به مدت یک دقیقه و سی ثانیه در دمای ۹۴ درجه سانتی گراد، آنیلینگ به مدت ۳۰ ثانیه در دمای ۶۱ درجه سانتیگراد، طولیل شدن در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۴۵ ثانیه (این سه مرحله در ۴۵ سیکل) انجام گرفت. مرحله PCR با استفاده از دستگاه StepOnePlus™ انجام شد.

آزمون‌های آماری

آزمایش‌ها در قالب طرح کامل تصادفی (CRD) انجام و داده‌ها بر اساس آزمون دانکن Duncan's Multiple Range Test (DMRT) با حداقل سه تکرار و هر تکرار خود شامل سه نمونه مقایسه شد. تجزیه و تحلیل آماری به کمک نرم افزار SAS (ver.8.02) و MSTATC در سطح $p < 0.05$ صورت گرفت. نتایج به صورت میانگین \pm انحراف معیار گزارش شد.

روش Real-time PCR میزان نسبی بیان ژن‌های نستین، بتاتوبولین ۳ و سیناپتوفیزین اندازه‌گیری شد.

بررسی بیان پروتئین‌های اختصاصی عصبی در

سلول‌های تمایز یافته به روش ایمونوفلورسنس

جهت شناسایی سلول‌های عصبی در محیط کشت، از روش ایمونوفلورسنس استفاده شد. بدین منظور، سلول‌های کشت شده با استفاده از محلول چهار درصد پارافمالدئید در درجه حرارت اتاق تثبیت شدند. بعد از سه بار شستشو با محلول PBS از محلول بلاک‌کننده حاوی ۰/۳ درصد تریتون X-100 در PBS و ده درصد سرم نرمال بز (Sigma, G9023)، برای پوشاندن جایگاه‌های آنتی‌ژن-های غیراختصاصی استفاده شد. سلول‌ها با آنتی‌بادی‌های اولیه ضد سیناپتوفیزین (Abcam, San Francisco, CA, ab8049)، ضد بتاتوبولین III (Abcam, Cambridge, USA, ab7751) و ضد نستین (Abcam, San Francisco, CA, ab8045) به مدت دو ساعت در محیط مرطوب تیمار شدند. سپس با آنتی‌بادی‌های ثانویه کونژوگه شده با فلورسئین-ایزوتیوسیانات (FITC) ضد موش (Sigma, St. Louis, MO, F9137) و کونژوگه شده با cyanine (Cy5.29) ضد خرگوش (Abcam, Cambridge, USA, ab 6564) به مدت یک ساعت در محیط مرطوب و تاریکی انکوبه شدند. سلول‌ها بعد از چسباندن روی لام به وسیله میکروسکوپ فلورسنس بررسی و تصویر برداری شدند.

جدول ۱: توالی و مشخصات پرایمرها

نام ژن	توالی پرایمر	طول پرایمر	طول محصول	Tm	%GC
$\beta 2M$	Forward: 5'AGTCGTCAGCATGGCTCGCT3'	۲۰	۱۷۱	۵۸/۵۱	۶۰
	Riverse: 5'TGAGGCGGGTGGAACTGTGT3'			۵۷/۹۱	
Nestin	Forward: 5'TCCGGGCCCTGAAGTCGAG 3'	۲۰	۲۹۴	۵۹/۹۷	۷۰
	Riverse: 5'CCAGGGCTTCCACAGCCAGC 3'			۵۹/۹۷	
Synaptophysin	Forward: 5'CATTCATGCGCGCACCTCCA3'	۲۰	۲۰۳	۵۸/۳۳	۶۰
	Riverse: 5'TTGCTGCCCATAGTCGCCCT3'			۵۸/۱۲	

یافته ها

القای عصبی اجسام شبه جنینی

سلول‌های P19 که در محیط فاقد القاگر کشت شدند؛ به بستر کشت چسبیده و رشد کردند. سلول‌ها چندوجهی بوده و با فواصل نزدیک به هم و به طور تقریباً فشرده در کنار یکدیگر قرار گرفتند. سلول‌های این گروه‌ها به صورت تک‌لایه سلولی و به شکل کلنی‌هایی به بستر کشت می‌چسبند. در بین این سلول‌ها به ندرت سلول‌هایی با زواندی کوتاه دیده می‌شود که می‌تواند نشان دهنده تمایز خود به خودی آن‌ها باشد (شکل ۱ A). سلول‌های گروه کنترل مثبت که در محیط حاوی اسید رتینوئیک کشت شدند؛ مورفولوژی ظاهری سلول‌های عصبی را نشان می‌دهند. زواید سلولی و همچنین ارتباط زواید سلول‌های مجاور به خوبی قابل مشاهده است. تاثیر اسید رتینوئیک به عنوان ماده القاگر عصبی به اثبات رسیده است (شکل ۱ B). سلول‌های هر سه گروه آزمایشی یعنی دپرنیل، عصاره مغز و ترکیب دپرنیل باعصاره به وضوح مورفولوژی سلول‌های عصبی را نشان دادند. این سلول‌ها جسم سلولی دوقطبی

یا چندقطبی، زواید سیتوپلاسمی گسترده، هسته یوکروماتین و بزرگ محتوی یک هستک و سیتوپلاسم دانه دار دارند. سلول‌ها ظاهری کشیده پیدا کرده و حاوی زواید سلولی بلندی هستند که با سلول‌های مجاور از طریق این زواید ارتباط برقرار کرده‌اند؛ به گونه‌ای که به نظر می‌رسد این ارتباط می‌تواند نوعی تشکیل سیناپس بین سلول‌ها باشد. در مناطقی تجمع‌های سلولی دیده می‌شود که زواید قطور و بلندتری نسبت به زواید بین سلول‌ها از آن‌ها خارج شده است. این زواید با دیگر تجمع‌های سلولی اتصال برقرار کرده و ساختار شبکه مانندی را ایجاد کرده‌اند که با یکدیگر در ارتباط هستند. از طرف دیگر این دستجات با سلول‌های منفرد اطراف خود نیز ارتباط دارند (شکل C، D، 1 E).

بررسی بیان پروتئین‌های اختصاصی عصبی در سلول‌های تمایز یافته

در سلول‌های تمایز یافته با عصاره مغز نوزاد رت در سلول‌های کارسینومای جنینی رده P19 با استفاده از

روش Real-time PCR

بررسی بدست آمده در سلول‌های کارسینومای جنینی رده P19 که تحت اثر القایی عصاره مغز نوزاد رت قرار گرفتند. نشان داد که بیان ژن نستین در این گروه نیز در هفته دوم بیشتر بوده و در هفته‌های بعدی کاهش پیدا کرده است که این کاهش اختلاف معنی داری را نشان می‌دهد. بیان سیناپتوفیزین نیز در هفته دوم بالا بوده و سپس کاهش پیدا کرده است.

بیان نسبی فاکتورهای رونویسی نستین، سیناپتوفیزین در سلول‌های تمایز یافته با ترکیب دپرنیل و عصاره مغز نوزاد رت در سلول‌های کارسینومای جنینی رده P19 با

استفاده از روش Real-time PCR

بررسی کمی بیان ژن نستین در سلول‌های کارسینومای جنینی رده P19

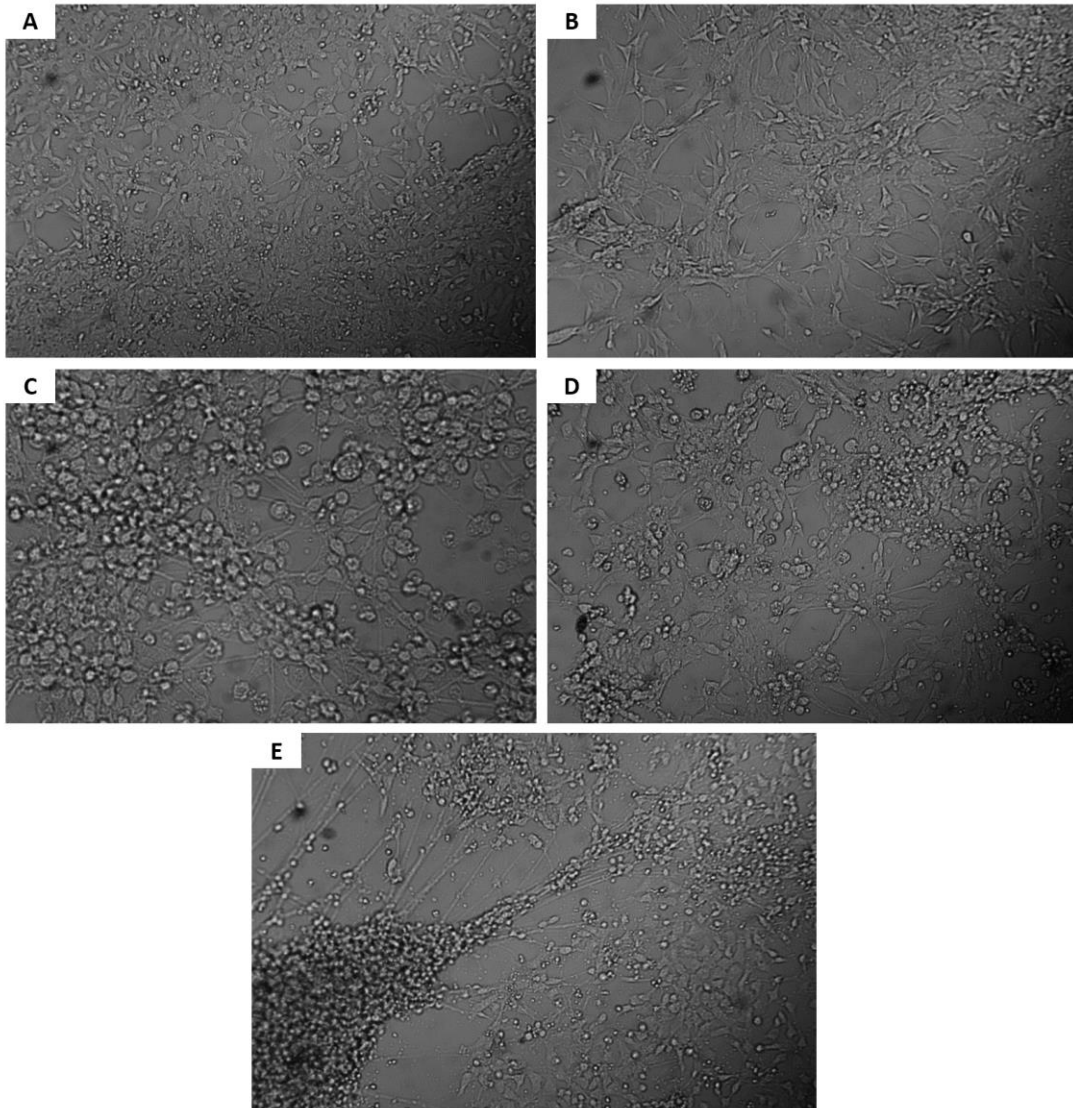
تحت اثر القایی ترکیب دپرنیل و عصاره مغز نوزاد رت نشان داد که این ژن نیز در هفته دوم بیان بالایی داشته و در هفته‌های بعدی کاهش پیدا کرده است که این کاهش اختلاف معنی داری را نشان می‌دهد. بیان سیناپتوفیزین نیز در هفته دوم بالا بوده و سپس کاهش پیدا کرده است.

ارزیابی ایمونوفلورسنس سلول‌های P19 تمایز یافته با هر سه گروه القاگر نشان داد که این سلول‌ها نسبت به آنتی-بادهای نستین، سیناپتوفیزین و بتاتوبولین 3 پاسخ مثبت دادند (شکل ۲)؛ بدین معنی که سلول‌های تمایز یافته توانستند پروتئین‌های اختصاصی عصبی شامل نستین، سیناپتوفیزین و بتاتوبولین 3 را بیان کنند.

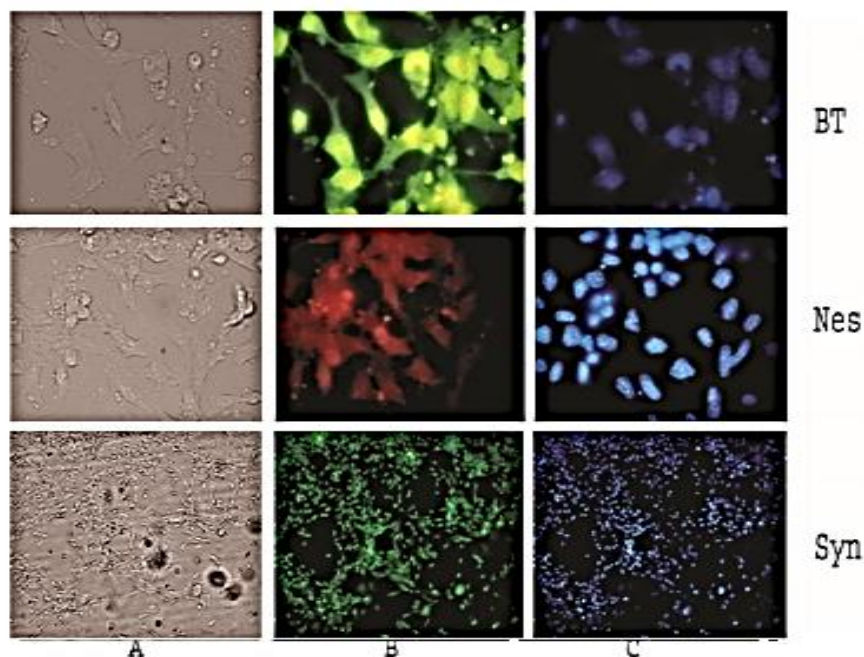
بررسی القای بیان ژن‌های اختصاصی عصبی در سلول‌های تمایز یافته تحت اثر القایی دپرنیل با استفاده از

روش Real-time PCR

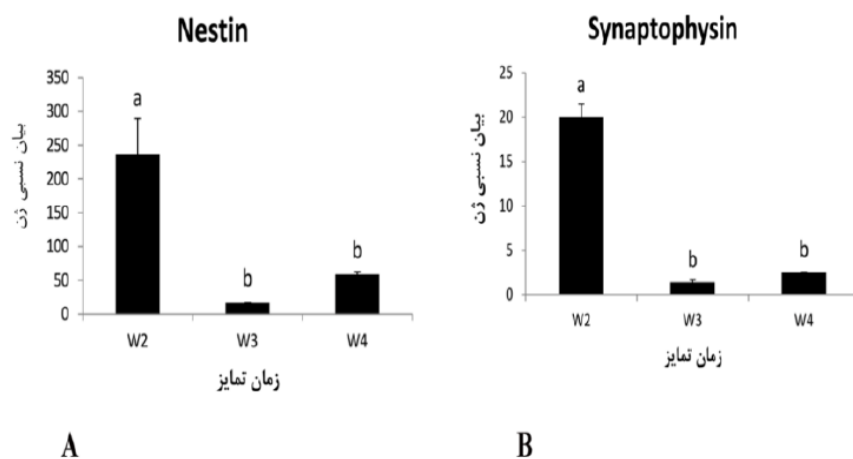
بررسی بیان نسبی تنها برای ژن‌های نستین و سیناپتوفیزین در سلول‌های تمایز یافته با استفاده از روش Real-time PCR انجام شد. نتایج بدست آمده در سلول‌های کارسینومای جنینی رده P19 که تحت اثر القایی دپرنیل قرار گرفتند نشان داد که بیان ژن نستین در هفته دوم بیشتر بوده و در هفته‌های بعدی کاهش پیدا کرده است (شکل ۳ A). این کاهش از نظر آماری اختلاف معنی داری را نشان می‌دهد. این اختلاف می‌تواند نشان دهنده پیشرفت روند تمایزی سلول‌های نورو اپی تلیالی به سمت سلول عصبی باشد. بیان ژن سیناپتوفیزین نیز در هفته دوم بالا بوده و سپس به طور معنی داری کاهش پیدا کرده است (شکل ۳ B). بیان نسبی فاکتورهای رونویسی نستین، سیناپتوفیزین



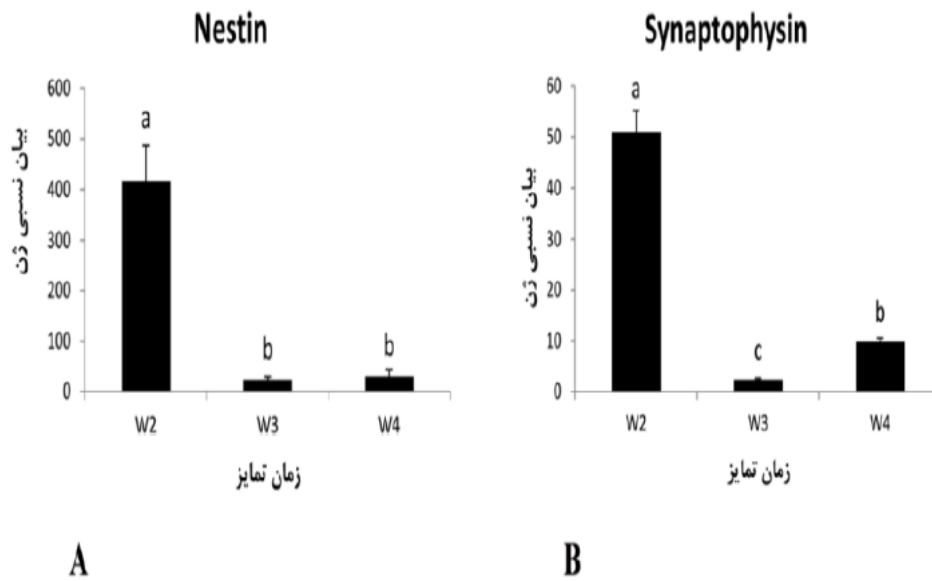
شکل ۱: تصویر میکروسکوپ نوری از تمایز عصبی سلول‌های P19 تحت اثر القاگرهای عصاره مغز نوزاد رت، دپرنیل و ترکیب دپرنیل و عصاره مغز. A. کنترل منفی: سلول‌ها چند وجهی بوده و با فواصل نزدیک به هم و به طور تقریباً فشرده در کنار یکدیگر قرار گرفتند. B: تیمار با اسید رتینوئیک زوائد سلولی و همچنین ارتباط زوائد سلول‌های مجاور به خوبی قابل مشاهده است. C: تیمار با دپرنیل. D: تیمار با عصاره مغز. E: تیمار با ترکیب دپرنیل و عصاره مغز. (400X).
 در C، D، E: سلول‌ها ظاهری کشیده پیدا کرده و حاوی زوائد سلولی بلندی هستند که با سلول‌های مجاور از طریق این زوائد ارتباط برقرار کرده‌اند که نشان دهنده مورفولوژی عصبی است.



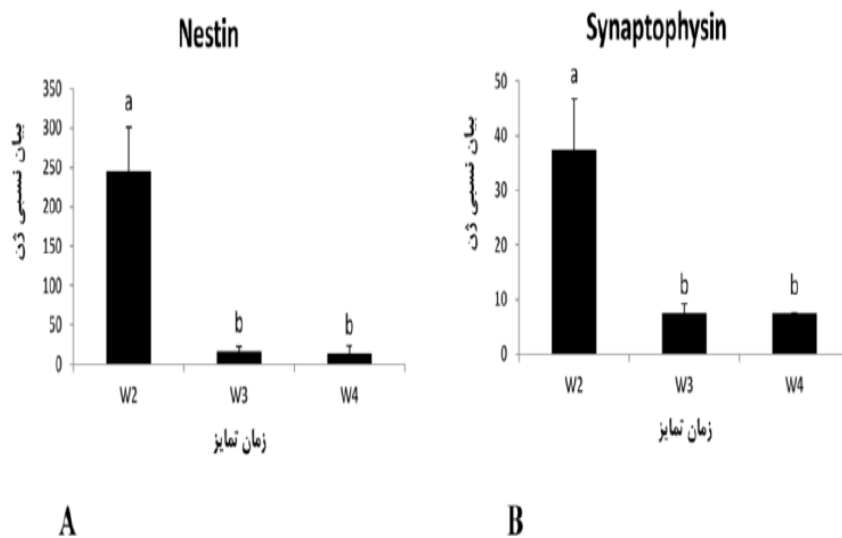
شکل ۲: تصویر میکروسکوپ فلورسنس از سلول‌های بنیادی کارسینومای جنینی رده P19. تیمار شده با دپرنیل (A). تیمار شده با عصاره مغز نوزاد رت (B). تیمار شده با ترکیب دپرنیل و عصاره مغز نوزاد رت (C). هسته با استفاده از رنگ آمیزی هوخست مشخص شده است. BT بتاتوبولین (1000X) ونستین (1000X) و سیناپتوفیزین (100X).



شکل ۳: بیان ژن‌های نستین و سیناپتوفیزین در سلول‌های عصبی حاصل از تمایز سلول‌های P19 تحت اثر القایی دپرنیل در هفته دوم، سوم و چهارم: بیان سیناپتوفیزین هر دو ژن در هفته دوم بیشتر بوده و در هفته‌های سوم و چهارم کاهش پیدا کرده است. (W2: هفته دوم، W3: هفته سوم، W4: هفته چهارم).



شکل ۴: ارزیابی بیان ژن‌های سیناپتوفیزین و نستین در سلول‌های عصبی حاصل از تمایز سلول‌های P19 تحت اثر القایی عصاره مغز نوزاد رت در هفته دوم، سوم و چهارم: بیان ژن نستین این گروه نیز در هفته دوم بیشتر بوده و در هفته‌های بعدی کاهش پیدا کرده است که این کاهش اختلاف معنی داری را نشان می‌دهد. بیان سیناپتوفیزین نیز در هفته دوم بالا بوده و سپس کاهش پیدا کرده است. (W2: هفته دوم، W3: هفته سوم، W4: هفته چهارم).



شکل ۵: ارزیابی بیان ژن‌های سیناپتوفیزین و نستین در سلول‌های عصبی حاصل از تمایز سلول‌های P19 تحت اثر القایی ترکیبی دپرنیل و عصاره مغز نوزاد رت در هفته دوم، سوم و چهارم: بیان نستین در هفته دوم بیان بالایی داشته و در هفته‌های بعدی کاهش پیدا کرده است که این کاهش اختلاف معنی داری را نشان می‌دهد. بیان سیناپتوفیزین نیز در هفته دوم بالا بوده و سپس کاهش پیدا کرده است. (W2: هفته دوم، W3: هفته سوم، W4: هفته چهارم)

بحث

time-PCR مورد بررسی قرار گرفت. نتایج مؤید این مطلب بود که سلول‌های P19 به سلول‌های عصبی تمایز یافتند. در پژوهش حاضر سلول‌های P19 پس از تمایز، شبکه گسترده‌ای از زوائد عصبی را ایجاد کردند، به گونه‌ای که سلول‌های عصبی ایجاد شده در میان سلول‌های غیرعصبی قابل تشخیص بودند. در مطالعه اسماعیلی و همکاران نشان داده شد که سلول‌های بنیادی رویانی وقتی در معرض غلظت 10^{-8} مولار دپرنیل قرار بگیرند. شکل ظاهری عصبی مشابهی را نشان می‌دهند؛ به این صورت که در اطراف اجسام شبه‌جنینی شبکه بسیار وسیعی از سلول‌های شبه عصبی تشکیل شد. این سلول‌ها دارای جسم سلولی دوقطبی تا چندقطبی، زواید سیتوپلاسمی گسترده، هسته یوکروماتین و بزرگ محتوی یک هستک و سیتوپلاسم دانه‌دار بودند (۱۵). همچنین؛ دپرنیل می‌تواند باعث تغییر بیان ژن و سنتز پروتئین شود. این دارو باعث بروز فنوتیپ عصبی و بیان ژن نروتروفین در سلول‌های (Embryonic stem ES)

در این پژوهش مغز نوزاد یک هفته‌ای رت به طور کامل جداسازی و عصاره آن تهیه شد. جهت القای تمایز عصبی در سلول‌های P19 از القاکننده‌هایی نظیر عصاره مغز نوزاد رت، داروی دپرنیل و ترکیبی از عصاره مغز و دپرنیل استفاده شد. در این سیستم کشت تقریباً دو هفته بعد از القا زیر مجموعه‌ای از سلول‌ها شکل ظاهری سلول‌های عصبی را نشان دادند. بررسی شکل ظاهری سلول‌ها توسط میکروسکوپ نوری جهت تأیید اولیه فنوتیپ عصبی انجام شد. نوروئیدهای ایجاد شده در محیط کشت ویژگی‌های ظاهری عصبی را نشان دادند. بیان پروتئین‌های اختصاصی عصبی در این سلول‌ها با استفاده از روش ایمونوفلورسنس مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج نشان داد که سلول‌های P19 تمایز یافته با روش القایی نسبت به آنتی‌بادی‌های نستین، سیناپتوفیزین و بتاتوبولین ۳ پاسخ مثبت دادند. سرانجام به منظور تأیید دقیق‌تر هویت سلول‌های عصبی بیان ژن‌های اختصاصی عصبی نستین و سیناپتوفیزین با روش Real

سلول‌های کارسینومای جنینی در شرایط آزمایشگاهی تشکیل سیناپس داده و نسبت به سیناپتوفیزین واکنش ایمنی نشان می‌دهند (۲۰). سیناپتوفیزین پروتئین غشایی وزیکول‌های پیش-سیناپسی است (۲۱). پروتئین سیناپتوفیزین در تشکیل وزیکول‌های سیناپسی و آگروستوز، همچنین تنظیم رهاسازی نوروترانسمیترها و شکل‌پذیری سیناپس نقش دارد. بیان سیناپتوفیزین در این سلول‌ها نشانگر اکتساب سیناپس‌های کارآمد و همچنین توانایی تولید پتانسیل عمل در آن‌ها است (۲۲). در پژوهش حاضر افزایش میزان بیان این ژن نسبت به گروه کنترل منفی خود حاکی از این امر است که سلول‌های تمایز یافته نورون‌هایی بالغ بوده و قادر به تشکیل سیناپس با یکدیگر هستند. این پروتئین یکی از مهم‌ترین پروتئین‌های سیناپسی است که مطالعات فراوانی در مورد آن انجام شده است. سیناپتوفیزین از نشانگرهای معتبر مراحل نهایی تمایز عصبی است (۲۳).

نتیجه‌گیری

نتایج این مطالعه نشان داد که سلول‌های بنیادی کارسینومای جنینی P19 تحت شرایط آزمایشگاهی با ترکیبی از عوامل القاگری مانند عصاره مغز نوزاد رت به عنوان القاکننده طبیعی و داروی دپرنیل به عنوان القاکننده سنتتیک قابلیت تمایز به سلول‌های عصبی را دارند. بررسی بیان فاکتورهای رونویسی نشان‌دهنده این مطلب است که سلول‌های تیمار شده در ابتدا دارای فنوتیپ سلول‌های بنیادی عصبی هستند. سپس به نورون‌هایی کارآمد تمایز یافته و توانستند به سلول‌های عصبی تمایز یابند.

cells می‌شود و اثر تغذیه کننده بر نورون‌های کشت شده دارد (۱۵).

ارزیابی ایمنوفلورسنس سلول‌های P19 تمایز یافته با القاگرهای دپرنیل، عصاره مغز نوزاد رت و ترکیب دپرنیل و عصاره مغز نوزاد رت نشان داد که این سلول‌ها نسبت به آنتی-بادی‌های نستین، سیناپتوفیزین و بتاتوبولین ۳ پاسخ مثبت دادند. پیش از این محققین بیان آنتی ژن‌های نستین (۱۶)، بتاتوبولین ۳ (۱۷) و سیناپتوفیزین (۱۸) در سلول‌های عصبی حاصل از تمایز سلول‌های P19 را گزارش دادند (۱۵). از طرفی بررسی میزان بیان mRNA نستین و سیناپتوفیزین در دو گروه کنترل مثبت و تیمار در این پژوهش نشان داد که میزان بیان این ژن‌ها در دو گروه تفاوت معنی‌داری داشته و افزایشی در میزان بیان هر دو ژن در سلول‌های تمایز یافته رخ داده است. ارزیابی بیان نستین گزینه مناسبی برای پیش‌بینی تمایز دودمان سلولی P19 به سمت سلول‌های پیش‌ساز عصبی است. افزایش بیان در هفته دوم می‌تواند نشان‌دهنده پیشرفت روند تمایزی سلول‌های بنیادی به سمت سلول‌های نوروآپتیلیالی باشد. نستین یکی دیگر از شاخص‌های پروتئینی فیلامنتی حدواسط نورون‌های جنینی است. این پروتئین به مقدار فراوانی در سلول‌های زاینده عصبی پستانداران حضور دارد و به عنوان نشانگر سلول‌های زاینده عصبی مورد استفاده قرار می‌گیرد (۱۹). این پژوهش در تأیید سایر پژوهش‌های انجام شده نشان داد که سلول‌های بنیادی P19 در حین تمایز به سمت دودمان عصبی بیان ژن نستین را افزایش می‌دهند. اگرچه بیان سیناپتوفیزین همانند بیان نستین در گروهی که تحت تیمار عوامل القاگر قرار گرفت در هفته دوم افزایش بیان داشته و در هفته‌های بعدی کاهش بیان پیدا کرد؛ اما بیان آن همواره در گروه تیمار به طور معنی‌داری بیشتر از گروه کنترل بود. بر اساس گزارش‌های قبلی نورون‌های مشتق شده از

منابع

- 1-D'Amour K, Gage FH. New tools for human developmental biology. *Nature biotechnology*. 2000;18(4):381.
- 2-Du Y, Funderburgh ML, Mann MM, SundarRaj N, Funderburgh JL. Multipotent stem cells in human corneal stroma. *Stem cells*. 2005;23(9):1266-75.
- 3-Tuch BE. Stem cells: a clinical update. *Australian family physician*. 2006;35(9):719.

- 4-Dantuma E, Merchant S, Sugaya K. Stem cells for the treatment of neurodegenerative diseases. *Stem cell research & therapy*. 2010;1(5):37.
- 5-Hsieh FF, Barnett LA, Green WF, Freedman K, Matushansky I, Skoultschi AI, et al. Cell cycle exit during terminal erythroid differentiation is associated with accumulation of p27Kip1 and inactivation of cdk2 kinase. *Blood*. 2000;96(8):2746-54.
- 6-Choi S-C, Choi J-H, Shim W-J, Lim D-S. P19 embryonal carcinoma cells: a new model for the study of endothelial cell differentiation. *Biotechnology letters*. 2008;30(7):1169-75.
- 7-Iwasaki Y, Ikeda K, Shiojima T, Kobayashi T, Tagaya N, Kinoshita M. Deprenyl enhances neurite outgrowth in cultured rat spinal ventral horn neurons. *Journal of the neurological sciences*. 1994;125(1):11-3.
- 8-Sweetman SC. *Martindale: the complete drug reference* 2005.
- 9-Brannan T, Yahr MD. Comparative study of selegiline plus l-dopa-carbidopa versus l-dopa-carbidopa alone in the treatment of parkinson's disease. *Annals of Neurology: Official Journal of the American Neurological Association and the Child Neurology Society*. 1995;37(1):95-8.
- 10-Tatton W, Wadia J, Ju W, Chalmers-Redman R, Tatton N. (-)-Deprenyl reduces neuronal apoptosis and facilitates neuronal outgrowth by altering protein synthesis without inhibiting monoamine oxidase. *Deprenyl—Past and Future: Springer*; 1996. p. 45-59.
- 11-Mayanil C, Baquer N. Comparison of the properties of semipurified mitochondrial and cytosolic monoamine oxidases from rat brain. *Journal of neurochemistry*. 1984;43(4):906-12.
- 12-Yoshikawa K, Aizawa T, Hayashi Y. Degeneration in vitro of post-mitotic neurons overexpressing the Alzheimer amyloid protein precursor. *Nature*. 1992;359(6390):64-67.
- 13-Bakhshalizadeh S, Esmaili F, Houshmand F, Shirzad H, Saedi M. Effects of selegiline, a monoamine oxidase B inhibitor, on differentiation of P19 embryonal carcinoma stem cells, into neuron-like cells. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Animal*. 2011;47(8):550.
- 14-McBurney MW, Jones-Villeneuve E, Edwards M, Anderson P. Control of muscle and neuronal differentiation in a cultured embryonal carcinoma cell line. *Nature*. 1982;299(5879):165.
- 15-Esmaili F, Tiraihi T, Movahedin M, Mowla SJ. Selegiline induces neuronal phenotype and neurotrophins expression in embryonic stem cells. *Rejuvenation research*. 2006;9(4):475-84.
- 16-Lendahl U, Zimmerman LB, McKay RD. CNS stem cells express a new class of intermediate filament protein. *Cell*. 1990;60(4):58-65.
- 17-Falconer MM, Echeverri CJ, Brown DL. Differential sorting of beta tubulin isoforms into colchicine-stable microtubules during neuronal and muscle differentiation of embryonal carcinoma cells. *Cell motility and the cytoskeleton*. 1992;21(4):313-25.
- 18-McBurney MW, Reuhl K, Ally A, Nasipuri S, Bell J, Craig J. Differentiation and maturation of embryonal carcinoma-derived neurons in cell culture. *The Journal of neuroscience*. 1988;8(3):1063-73.
- 19-Wiese C, Rolletschek A, Kania G, Blyszczuk P, Tarasov K, V., Tara-sova, Y., Wersto, R. P., Boheler, K. R., and Wobus, A. M. *Cell MolLife Sci*. 2004;61, 2510–22.
- 20-Esmaili F, Tiraihi, T, Movahedin, M, Mowla SJ. Selegiline induces neuronal phenotype and neurotrophins expression in embryonic stem cells. *Rejuvenation Res*. 2006; 9(4): 475-84.
- 21-McBurney MW. Clonal lines of teratocarcinoma cells in vitro: differentiation and cytogenetic characteristics. *J Cell Physiol*. 1976;89(3): 441-55.
- 22-Vannucchi MG F-PM. Synapse formation during neuron differentiation: an in situ study of the myenteric plexus during murine embryonic life. *J Comp Neurol*. 2000;425(3): 369-81.
- 23-Sortwell CE et al. Pattern of synaptophysin immunoreactivity within mesencephalic grafts following transplantation in a parkinsonian primate model. *Brain Res*. 1998;791(1): 117-24.

Investigation of Neuronal Phenotype Induction in P19 Stem Cells Influenced by Extract of Neonatal Rat Brain and Deprenyl

Nazila Momendoust^{1*}, Jamal Moshtaghian², Fariba Esmaeili³

1-Ms of Biology.

2-Associate Professor of Biology.

3-Assistant Professor of Biology.

1-Department of Biology, Faculty of Sciences, University of Isfahan, Hezarjerib Avenue, Isfahan.

*Corresponding author:

Nazila Momendoust; Department of Biology, Faculty of Sciences, University of Isfahan, Hezarjerib Avenue, Isfahan.

Tel: +989149465391

Email: nazilamomendost@gmail.com

Abstract

Background and Objective: Parkinson's disease is caused by selective loss of a group of dopaminergic cells in the dense part of substantial nigra. One of the treatment options for this disease is the replacement of lost cells by stem cells. The purpose of this study was to investigate the effect of inducers of extract of neonatal rat brain and deprenyl on neural differentiation of P19 embryonic carcinoma cells.

Materials and Methods: P19 stem cells were cultured in alpha-MEM medium supplemented with 10% FBS serum. Then, the cells were cultured on low-adhesion culture plates to create pseudo-embryonic bodies. In order to differentiate, germ cells were cultured in medium containing 3% FBS serum and extract of neonatal rat brain, deprenyl and mixture of deprenyl and rat neonatal extract for 28 days. Immunofluorescence assay was used to detect specific proteins of neurons including synaptophysin, beta-tubulin 3 and nestin. Immunofluorescence assay and Real-time PCR was used to detect and evaluate the expression specific proteins of neurons including synaptophysin, beta-tubulin 3 and nestin, respectively.

Results: Regarding to immunofluorescence results, differentiated P19 cells, positively affected by three inducers such as nestin, synaptophysin and beta-3. Relative expression of transcription factors of nestin, synaptophysin in cells differentiated by all three inducer using Real-time PCR demonstrated that in P19 embryonic carcinoma cells, Nestin and Synaptophysin expression increased in the second week, while, their expression were significantly reduced in the third and fourth weeks.

Conclusion: The results of this study show P19 embryonic carcinoma stem cells are potential to differentiate into neurons, especially dopaminergic phenotype, following laboratory conditions and inducing factors.

Key words: P19 embryonic carcinoma cells, Deprenyl, Extracts of neonatal rat brain, Neural differentiation.

►Please cite this paper as:

Momendoust N, Moshtaghian J, Esmaeili F. Investigation of Neuronal Phenotype Induction in P19 Stem Cells Influenced by Extract of Neonatal Rat Brain and Deprenyl. *Jundishapur Sci Med J* 2020; 19(1):83-95

Received: Aug 1, 2019

Revised: Feb 21, 2020

Accepted: Feb 29, 2020