

تأثیر نژاد موش بر تولید رده‌های سلولهای بنیادی جنینی

حسین بهاروند Ph.D، عادل طائی B.Sc، محمد معصومی M.Sc، هانیه جعفری M.Sc، سیده ملامحمدی B.Sc*

مریم حاتمی M.Sc، شبنم زرعی مرادی M.Sc**

* گروه پژوهشی سلولهای بنیادی پژوهشکده رویان

** گروه پژوهشی ژنتیک پژوهشکده رویان

تاریخ وصول: مهر ماه ۸۳، تاریخ پذیرش: آذر ماه ۸۳

چکیده

هدف: سلولهای بنیادی جنینی از توده سلولی داخلی بلاستوسیستها به دست می‌آیند که دارای خاصیت پرتوانی و قابلیت نوسازی هستند. این سلولها برای مطالعات تمایز آزمایشگاهی، طب پیوند و عملکرد ژن و غیره به کار می‌رود. بنابراین، این مطالعه در جهت تولید رده‌های جدید سلولهای بنیادی جنینی و ارزیابی تأثیر نژاد بر تولید آنها انجام شد.

مواد و روشها: توده سلولی داخلی بلاستوسیستهای موشهای نژاد BALB/C، NMRI، C57BL/6، یا هیبرید (نر NMRI با ماده BALB/C) تهیه و بر سلولهای تغذیه کننده با محیط سلولهای بنیادی در حضور ۵۰۰۰۰ iu/ml فاکتور ممانعت کننده لوکمیایی (LIF: Leukemia Inhibitor Factor) کشت داده شدند. رده‌های تولید شده با مورفولوژی، پاساژ، انجماد و ذوب، بیان الکالین فسفاتاز، Oct-4 و تمایز خودبه خودی و تهیه کاریوتیپ مورد ارزیابی قرار گرفتند.

یافته‌ها: یک رده از ۲۶۰ بلاستوسیست نژاد BALB/C و دو رده از ۷۰ بلاستوسیست هیبرید BALB/C×NMRI تولید شد. اما از نژادهای دیگر رده‌ای تولید نشد. رده‌های سلولی تولیدی طی پاساژهای متوالی به صورت غیر متمایز باقی ماندند و کاریوتیپ طبیعی XY را حفظ کرده و Oct-4 و الکالین فسفاتاز را بیان کردند. این سلولها در محیط آزمایشگاهی در غیاب سلولهای تغذیه کننده و LIF متمایز شدند و بعد از تشکیل اجسام شبه جنینی به سلولهای متفاوت از جمله سلولهای عضله قلبی دارای انقباض و عصب متمایز شدند. این داده‌ها تولید سه رده جدید سلولهای بنیادی و بیشتر بودن قابلیت تولید سلولهای ES در نژاد هیبرید (NMRI×BALB/C) را نسبت به نژاد BALB/C inbred نشان داد.

نتیجه گیری: نتایج این مطالعه تولید سه رده جدید سلول بنیادی جنینی را از موش نژاد همخون BALB/C و هیبرید (NMRI×BALB/C) نشان داد. در ضمن آنکه به نظر می‌آید بازدهی تولید سلولهای بنیادی جنینی در هیبرید نژادها بیشتر است.

کلید واژه‌ها: سلولهای بنیادی جنینی، پرتوانی، موش

مقدمه

(LIF) تکثیر پیدا می‌کنند و همچنین قابلیت تمایز به انواع رده‌های سلولی مانند سلولهای زایا را با انتقال به بلاستوسیست میزبان یا ترکیب با مورولا (Morula aggregation) حفظ می‌کنند [۳، ۴ و ۵]. پرتوانی سلولهای بنیادی منجر به تولید هر سه لایه جنینی (اکتودرم، مزودرم، اندودرم) می‌شود. تولید جنینهای کایمرا، ترانژنس و تمایز به انواع سلولها در محیط آزمایشگاهی

بن‌یافته‌های جنینی (Embryonic stem cells) سلولهایی پرتوان و با قابلیت نوسازی (Self-renewal) بالا هستند که از توده سلولی داخلی (ICM)^۱ بلاستوسیستها به دست می‌آیند [۱ و ۲]. این سلولها در حالت تمایز نیافته در محیط آزمایشگاه با استفاده از سلولهای تغذیه کننده و فاکتور ممانعت کننده لوکمیایی

آدرس مکاتبه: تهران، پژوهشکده رویان، گروه سلولهای بنیادی
سندوق پستی ۴۶۴۴-۱۹۳۹۵ Email: Baharvand50@Yahoo.com

مواد و روشها

جنینها از موشهای همخون (inbred) نژاد BALB/C (انستیتو پاسستور، انستیتورازی) و C57Bl/6 (انستیتو پاسستور) و ناهمخون نژاد NMRI (انستیتو پاسستور) و هیبرید [نر NMRI (انستیتو پاسستور) و ماده BALB/C (انستیتو پاسستور)] (NMRI×BALB/C) تهیه شدند. بلاستوسیتها، ۳/۵ روز بعد از مشاهده پلاک واژنی به دنبال هورمون درمانی با PMSG (Pregnant Mare's Serum Gonadotropin) و HCG (Human Chorionic Gonadotropin) با شستشوی رحم به دست آمدند. زوناپلوسیدای جنینها با محلول اسیدتایرود ($1/6\text{mM CaCl}_2 + \text{H}_2\text{O}$, 100mM NaCl , $2/6\text{mM KCl}$ و $4/9\text{mM MgCl}_2 + 2\text{H}_2\text{O}$, $5/4\text{mM}$ گلوکز، 1mM پلی وینیل پیرولیدون) حذف شد.

بلاستوسیتها به مدت ۴ روز بر سلولهای تغذیه کننده کشت شدند. سلولهای تغذیه کننده، فیبروبلاستهای جنین ۱۲/۵ روزه موش (MEF) نژاد NMRI بود که با مایتوماکسین C (Sigma, M-0503) به غلظت $10\mu\text{g mL}^{-1}$ و به مدت ۹۰ دقیقه تقسیم آنها متوقف شده بود.

محیط کشت شامل: Knockout (Gibco, 10829-018)، Dulbecco's Modified Eagle's Medium، ۱۵ درصد سرم جنینی - ویژه سلولهای بنیادی (Gibco, 16141-079)، $0/1\text{mM}$ میلی مولار بتامرکاپتوتاتانول (Sigma, M-7522)، $0/1\text{mM}$ اسیدهای آمینه غیر ضروری (Gibco, 11140-035)، ۲ میلی مولار گلوتامین (Gibco, 25030-034) بود. فاکتور ممانعت کننده لوکمیا (Chemicon, ESGRO ESC1107) با غلظت 5000unit mL^{-1} هنگام تولید رده و 1000unit mL^{-1} زمان کشت و فریز سلولها در محیط فوق الذکر به کار برده شد.

بعد از گذشت ۴ روز، توده های گنبدی شکل حاصل از رشد ICM، به روش مکانیکی از تروفواکتودرم جدا شد. ICM به دو روش کشت داده شد. روش اول، توده سلولی داخلی به مدت ۳ دقیقه تحت تیمار با آنزیم EDTA^۱/تریپسین (Gibco, 25300-05) قرار گرفت؛ سوسپانسیون سلولی حاصل در ظروف ۹۶ خانه پوشیده با MEF^۲ غیر فعال شده، کشت داده شد.

1. Ethylenediaminetetraacetic Acid
2. Mouse Embryonic Fibroblast

تأییدکننده این مطلب است.

با تغییر شرایط کشت سلولهای بنیادی جنینی، نظیر افزودن فاکتورهای رشد به محیط کشت یا تغییر اجزای شیمیایی سطحی که سلولهای بنیادی جنینی بر آن رشد می کنند، امکان تمایز جهت دار این سلولها وجود دارد. از جمله سلولهای متمایز شده می توان به کاردیومیوسیتها [۷ و ۶]، ماهیچه صاف [۸] و اسکلتی، چربی [۹]، اندوتلیال [۸ و ۱۰] اشاره کرد. تشکیل اجسام شبه جنینی (Embryoid Bodies) (EB) اولین مرحله در تمایز است. زیرا ژنهای نشانگر سه لایه جنینی (اکتودرم، مزودرم، اندودرم) در اجسام شبه جنینی بیان می شود و به دنبال آن مشتقات سه لایه جنینی ساخته می شود [۱۱].

استفاده از این مدل سلولی، امکان مطالعه در مورد فرآیندهای تکوینی مانند ایجاد دودمانهای سلولی، تغییرات سلولی طی تمایز، تعیین الگوی بدنی، ریخت زایی و... را در جنین فراهم می کند [۱۲].

مطالعات سلولهای بنیادی جنینی موشی حدود ۲۰ سال پیش آغاز شد [۲۰]. از جانوران دیگری نظیر ماهیان [۱۳ و ۱۴]، جوجه [۱۵ و ۱۶]، خرگوش [۱۷ و ۱۸]، خوک [۱۹ و ۲۰]، گاو [۲۱]، گوسفند [۱۱] و میمون رزوس [۲۲] تولید سلولهای بنیادی جنینی انجام شده است. در سال ۱۹۹۸ از بلاستوسیتهای انسانی بن یاخته های جنینی تولید شد [۲۳]. بن یاخته های جنینی را در محیط آزمایشگاهی نیز می توان از لحاظ ژنتیکی دستکاری کرد؛ بنابراین این سلولها ابزار سودمندی جهت مطالعه هدفدار جهشها و تغییرات ژنتیکی هستند [۲۴].

همچنین امید است در آینده بیماریهایی که به علت تخریب یا از دست رفتن عملکرد تعداد محدودی از سلولها ایجاد می شوند با پیوند سلولهای تمایز یافته از سلولهای بنیادی جنینی درمان شوند [۲۵]. آزمایش کردن آثار داروهای جدید از دیگر کاربردهای بن یاخته های جنینی است [۲۶].

بنابراین با توجه به اهمیت تولید سلولهای بنیادی جنینی، این مطالعه به منظور تولید رده (های) جدید سلولهای بنیادی جنینی شروع شد و در آن اثر نژاد بر بازدهی تولید سلولهای بنیادی جنینی موش ارزیابی شد.

محلول نیتريت سدیم (Sigma, 91-4) و ۰/۱ میلی لیتر محلول الکالین - REV (Sigma, 86-2) تهیه شده پس از دو دقیقه ۴/۵ میلی لیتر، آب بدون یون به آن اضافه شد. به دنبال آن ۰/۱ میلی لیتر از محلول الکالین AS-B1 (Sigma, 86-1) اضافه شد و سپس مخلوط شد. از سوی دیگر سلولها در بافر سیتراتی استن (شامل ۲۵ میلی لیتر محلول سیترات، ۶۵ میلی لیتر استن و ۸ میلی لیتر فرمالدئید ۳۷٪) برای مدت ۳۰ ثانیه در دمای ۱۸-۲۶ درجه سانتیگراد تثبیت شدند. سلولها با آب بدون یون به مدت ۴۵ ثانیه شستشو شدند و سپس محلول فاز قبلی در تاریکی به سلولها افزوده شد. بعد از ۱۵ دقیقه سلولها به مدت ۲ دقیقه شستشو شدند.

بررسی بیان ژن Oct-4 با استفاده از روش نسخه برداری معکوس

در ابتدا با استفاده از محلول RNXTM-plus (سیناژن RN7713c)، استخراج total RNA از بن یاختهای جنینی موشی صورت گرفت. قبل از نسخه برداری معکوس (RT)^۲، نمونههای RNA استخراج شده تحت تیمار با DNase I (Roche, 104132) قرار گرفتند تا آلودگیهای احتمالی مربوط به DNA ژنومیک از نمونههای RNA حذف شود. سپس غلظت RNA استخراج شده با روش اسپکتروفتومتری تعیین شد. ۲ میکروگرم از RNA استخراج شده برداشته شد و با استفاده از پرایمر Random Hexamer و کیت Rvert AidTM H Minus First strand cDNA synthesis (Fermentas, K1622) نسخه برداری معکوس انجام شد. سپس روی cDNA تولید شده PCR^۳ صورت گرفت. در اینجا مواد مخلوط شده برای انجام PCR دقیقاً مشابه مواد مخلوط شده برای انجام PCR ژن SRY بود که توضیح داده می شود. برای پی بردن به بیان ژن Oct-4 و همچنین β -tubulin که گروه شاهد داخلی است از پرایمرهای زیر استفاده شد [۲۷]:

cot-4
Forward: 5'GGC GTT CTC TTT GGA AAG GTG TTC 3'
Reverse: 5'CATACT CGA ACC ACA TCC TTC TCT A 3'

1. Phosphate Buffered Salin
2. Reverse Transcription
3. Polymerase Chain Reaction

روش دوم، ICM بعد از جداسدن از تروفوکتودرم، مجدداً بر یک لایه تغذیه کننده کشت داده شد و روز بعد تحت تیمار با آنزیم قرار گرفت [۲۷].

پس از یک هفته، سلولها تریپسینه شدند. بعد از مشاهده کلونیهایی شبیه سلولهای بنیادی به منظور ارزیابی سلولها و ازدیاد آنها، از ظروف کشت با سطوح بالاتر استفاده شد. به این ترتیب که سلولها از ۹۶ خانه به Central well و بعد به ۶ خانه و فلاسک ۲۵cm² منتقل شدند.

پاساژ هر ۲۴-۴۸ ساعت یکبار، هنگامی که پوشش کلونیهی ۹۰-۸۰ درصد بود انجام شد. تعویض محیط به صورت روزانه انجام گرفت و سلولها در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد با CO₂ ۵ درصد و ۸۵ درصد رطوبت نگهداری شدند.

به منظور ارزیابی رده های سلولی تولیدشده آزمایشهای زیر صورت گرفت.

تهیه کاریوتایپ و نواربندی G

سلولهای بنیادی جنینی به روش جداسازی افتراقی از سلولهای MEF جدا شدند و تحت تیمار با ۰/۵mg/ml کالسمید (Gibco, 15212-046) به مدت ۳۵ دقیقه قرار گرفتند. از KCl ۵۶ درصد (Merk Art4951) به عنوان هیپوتونیک استفاده شد و با محلول متانول و اسید استیک (۱:۳) سلولها تثبیت شدند. بعد از تهیه گستره کروموزومی، با محلول ۵ درصد گیمسا تهیه شده در بافر سورنسون کروموزومها رنگ شدند.

پس از تهیه لام از سلولها، به مدت یک هفته، در محیط آزمایشگاه در دمای اتاق قرارداده شدند سپس لامها تحت تیمار با تریپسین (با غلظت ۰/۵ درصد در PBS^۱) قرار گرفتند (به مدت ده ثانیه) و به ترتیب با اتانول ۷۰ و ۸۰ درصد شستشو داده شدند؛ پس از این مرحله لامها با آب مقطر شسته و با ۵ درصد گیمسا در بافر سورنسون به مدت ده دقیقه رنگ آمیزی شدند.

فعالیت آلكالین فسفاتاز

فعالیت آلكالین فسفاتاز سلولها مطابق روش موجود در کیت (Sigma) انجام شد. این آنزیم در سلولهای تمایز نیافته بیان می شود. محلول نمکی دیازونیوم شامل ۰/۱ میلی لیتر از

Foward: 5'GTC AAG CGC CCC ATG AAT GCA TTT 3'
Reverse: 5'TGT TGA GGC AAC TGC AGG CTG TAA 3'

طول قطعه تکثیر شده: ۲۷۵ جفت باز، درجه حرارت: ۶۷ درجه سانتی‌گراد

شرایط PCR نیز عبارت بود از: (۱) واسرشتگی (Denaturation) اولیه: ۵ دقیقه، ۹۳ درجه سانتی‌گراد، (۲) واسرشتگی هر سیکل: ۴۵ ثانیه، ۹۳ درجه سانتی‌گراد، (۳) Annealing: ۴۵ ثانیه، ۶۷ درجه سانتی‌گراد، (۴) extension: ۱۰ سیکل: ۴۵ ثانیه، ۷۲ درجه سانتی‌گراد، (۵) extension نهایی: ۱۰ دقیقه ۷۲ درجه سانتی‌گراد. محصولات PCR روی آگارز ۱/۵ درصد جدا شده و با اتیدیوم بروماید قابل مشاهده شدند. نشانگر وزن مولکولی PUC 19 DNA/MSPI (HyPII) بود.

تمایز بن‌یاخته‌های جنینی در محیط آزمایشگاه

به منظور ارزیابی خاصیت پرتوانی سلولهای بنیادی جنینی تولیدی، تمایز آنها به سلولهای عضله قلبی و عصبی در محیط آزمایشگاهی روشهایی که قبلاً ذکر شده است انجام گرفت [۲۸] و [۲۹].

ایمونوسیتوشیمی

رنگ‌آمیزی ایمونوسیتوشیمی از سلولهای عصبی و قلبی متمایز شده از سه رده حاصل به ترتیب زیر انجام گرفت: سلولها ابتدا دوبار با PBS شستشو شدند و بعد با محلول متانول: استن (۱:۳) در ۲۰- درجه سانتی‌گراد و یا پارافرمالدئید ۴ درصد در دمای اتاق تثبیت شدند. به دنبال شستشوی مجدد (دوبار با PBS)، سلولها با سرم ۱۰ درصد بز پوشانده شدند (۳۰ دقیقه)، آنتی‌بادیهای اولیه ضد دسیمین (Sigma)، D-1033 و α -اکتینین (Sigma, A-7811) و تروپونین I (Chemicon, MAB1691) و کانکسین ۴۳ (Sigma, c-8093) در مورد سلولهای قلبی و آنتی‌بادی اولیه توپولین (Sigma, T-5293) برای سلولهای عصبی به کار برده شد.

به مدت ۶۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد جداگانه به مجموعه‌های سلولی متفاوت اضافه شد. سپس سلولها سه بار با PBS شستشو شده (هر بار ۱۰ دقیقه) و به دنبال آن آنتی‌بادی

طول قطعه تکثیر شده: ۳۱۷ جفت باز، درجه حرارت: ۶۷ درجه سانتی‌گراد

β -tubulin:

Foward: 5'GGA ACA TAG CCG TAA ACT GC3'
Reverse: 5'TCA CTG TGC CTG AAC TTA CC 3'

طول قطعه تکثیر شده: ۳۱۷ جفت باز، درجه حرارت: ۶۰ درجه سانتی‌گراد

شرایط PCR نیز عبارت بود از: (۱) واسرشتگی (Denaturation) اولیه: ۵ دقیقه، ۹۳ درجه سانتی‌گراد، (۲) واسرشتگی هر سیکل: ۴۵ ثانیه، ۹۳ درجه سانتی‌گراد، (۳) بازسرشتگی (Annealing): ۴۵ ثانیه، برای پرایمرهای ژن Oct-4 دمای ۶۷ درجه سانتی‌گراد و برای پرایمرهای ژن β -tubulin دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد، (۴) طول‌شدگی (extension): هر سیکل ۴۵ ثانیه، ۷۲ درجه سانتی‌گراد، (۵) extension نهایی: ۱۰ دقیقه ۷۲ درجه سانتی‌گراد. محصولات PCR روی آگارز ۱/۵ درصد جدا شده و با اتیدیوم بروماید قابل مشاهده شدند. نشانگر وزن مولکولی PUC ۱۹ DNA/MSPI (HyPII) بود.

تعیین جنسیت سلولهای بنیادی جنینی

در ابتدا بن‌یاخته‌های جنینی که به طور جداگانه بر MEF کشت شده بودند از MEF تفکیک شد و DNA این بن‌یاخته‌ها با استفاده از کیت DNPTM (سیناژن DN8115c) استخراج شد. غلظت DNA استخراج شده با استفاده از روش اسپکتروفتومتری تعیین شد. در اینجا برای کنترل مثبت و منفی به ترتیب از DNA استخراج شده از طحال موش نر و ماده استفاده شد. به منظور انجام PCR مواد زیر در یک لوله PCR با یکدیگر مخلوط شدند:

۱۰X PCR buffer (AMS)، ۲ میکرولیتر، (۵۰ng/ μ l) DNA، ۲/۵، ۵۰mM MgCl₂ (۰/۷۵ میکرولیتر، dNTPmix (۱۰mM)، ۰/۵ میکرولیتر، از هر پرایمر (۱۰ میکرولیتر، ۱ میکرولیتر، ۵smartaq μ l (۵ μ l/unit) (سیناژن TA8110C).

در نهایت با استفاده از آب دوبار تقطیر به حجم ۲۵ میکرولیتر رسانده شد. برای پی بردن به حضور یا عدم حضور ژن SRY که ژن شاخص کروموزوم Y و نشان دهنده نر بودن رده سلولی است از پرایمرهای زیر استفاده شد [۲۷]:

بعد از فریز بن یاخته‌ها و ذوب و کشت آنها، بقاء و تقسیم و تشکیل کلونی‌های نامتمایز و پرتوانی سلولها پایدار بود. رده‌های سلولهای بنیادی تولید شده دارای فعالیت الکالین فسفاتازی بودند (شکل ۲).

جدول ۲. خصوصیات سه رده سلولهای بنیادی جنینی تولید شده

نام رده	خصوصیات	کاریوتیپ (Modal No)	ژن SRY	بیان Oct-4	بیان الکالین فسفاتاز	تمایز به نورون	تمایز به کاردیومیوسیت
Royan C4	۴۰ (٪۷۶)	+	+	+	+	+	+
Royan C5	۴۰ (٪۷۸)	+	+	+	+	+	+
Royan C6	۴۰ (٪۸۰)	+	+	+	+	+	+

هر سه رده فاکتور رونویسی Oct-4 را بیان می‌کردند (شکل ۳). PCR ژن SRY نیز در هر سه رده دلالت بر نر بودن آنها می‌کرد (شکل ۴).

کاریوتیپ هر ۳ رده طبیعی و دارای ۴۰ کروموزوم بود مقایسه کاریوتایپ تهیه شده از این سلولها، با کاریوتایپ طبیعی سلولهای موش نشان داد که این سلولها در سطح کروموزومی بدون نقص بوده و تغییری در ساختار کروموزومی آنها دیده نشد (شکل ۵).

در تمایز سلولهای بنیادی مناطق دارای انقباض مشاهده شد که پس از رنگ‌آمیزی ایمنونوسیتو شیمی با آنتی‌بادیهای اختصاصی پروتئین‌های قلبی، کاردیومیوسیت بودن این سلولها کاملاً مشخص شد (شکل ۶) و سلولهای با مورفولوژی سلولهای عصبی نیز مشاهده شد که استفاده از آنتی‌بادی ضدتوبولین و مشاهده این پروتئین‌ها با میکروسکوپ فلورسنتس تأییدی بر عصبی بودن آنها بود (شکل ۷).

بحث

نتایج این مطالعه تولید یک رده سلول بنیادی جنینی از موش BALB/C و دو رده از موش هیبرید BALB/C×NMRI را نشان داد ولی از نژادهای C57BL/6 و NMRI رده سلولی تولید نشد.

سلولهای بنیادی جنینی به عنوان ابزاری توانمند در تولید

ثانویه نشاندار با FITC^۱ (Sigma, F-9006) اضافه شد. (۱:۱۰۰) و به مدت ۶۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. در پایان سلولها سه بار با PBS شستشو و با میکروسکوپ فلورسنتس (Nikon/TE 2000) مورد ارزیابی قرار گرفتند. لازم به ذکر است که مناطق ضرباندار سلولهای عضله قلبی قبل از رنگ‌آمیزی جدا شد، هر ۳-۵ قطعه تحت تیمار با آنزیم تریپسین/EDTA قرار گرفت و بعد از منفرد شدن ۴۸ ساعت بر coverslip ژلاتینه کشت داده شد.

یافته‌ها

از سه نژاد موشی NMRI, C57BL/6, BALB/C یک رده از نژاد BALB/C و دو رده از جنینهای هیبرید (BALB/C×NMRI) به دست آمد که Royan C4 (با منشأ BALB/C) و Royan C5 و Royan C6 (با منشأ هیبرید BALB/C ماده NMRI× نر) نامیده شدند.

نتایج حاصل از تولید سلولهای بنیادی از موشهای با نژاد مختلف در جدول ۱ آمده است.

جدول ۱. نتایج حاصل از تولید سلولهای بنیادی از نژادهای مختلف

نژاد موشی	متغیر	تعداد بلاستوسیت	تعداد ICM جدا شده	تعداد رده تولید شده
BALB/C		۲۶۰	۲۶۰	۱
C57BL/6		۱۲	۱۲	۰
NMRI		۵۷۰	۵۷۰	۰
BALB/C×NMRI		۷۰	۷۰	۲

خصوصیات سه رده تولیدی در جدول ۲ آمده است.

هر سه رده از لحاظ مورفولوژی کلونی منطبق با کلونی سلولهای بنیادی جنینی بود. کلونیه‌ها دوکی شکل، سه بعدی، با کناره کاملاً صاف و سلولها غیر قابل تفکیک از یکدیگر بودند (شکل ۱).

تقسیم سلولها با سرعت بسیار خوب انجام شد به طوری که هر ۲۴-۴۸ ساعت یکبار پاساژ صورت گرفت. سلولها تا پاساژ ۱۵ همچنان حالت غیر تمایزی خود را حفظ کرده‌اند.

جدول ۳. رده‌های سلولی بنیادی جنینی و نژادهای موشی

ر	نام رده سلولی بنیادی جنینی	نژاد موش	ماخذ
1	CCE	129	Robertson et al, 1986(۱۳۱)
2	D3	129	Gossler et al, 1986(۱۳۲)
3	E14	129	Hooper et al, 1987(۱۳۳)
4	AB1	129	McMahan and Bradley, 1990 (۱۳۴)
5	MBL-5	129	Pease et al, 1990(۱۳۵)
6	EFC-3	129	Nichols et al, 1990(۱۳۶)
7	BL/6-III	C57BL/6	Ledermann and Burki 1991(۱۳۷)
8	J1	129	Li et al, 1992(۱۳۸)
9	PJ5	129	Johnson et al, 1992(۱۳۹)
10	F1/1	CBA, C57BL/6	Tokunaga and Tsunoda 1992(۱۴۰)
11	TT2	CBA, C57BL/6	Yagi et al, 1993(۱۴۱)
12	-	NOD	Nagafuchi et al, 1999(۱۴۲)
13	MPI	129	Voss et al, 1997(۱۴۳)
14		DBA/1Lac J	Roach et al, 1995(۱۴۴)
15		C57BL/6	Brook and Gardner 1997(۱۴۵)
16		PO	Brook and Gardner 1997(۱۴۵)
17		CBA/Ca	Brook and Gardner 1997(۱۴۵)
18		MRL	Goulet et al, 1997(۱۴۶)
19	WWG	C57BL/6, 129/Sv and SIL	Loffe et al, 1995(۱۴۷)
20	R1	129	Nagy A et al, 1990 PNAS(۱۴۸)
21		C57BL/6	Auerbach et al, 2000(۱۴۹)
22	ALK1, ALKA2 ALK4, ALKA5, ALK3	BALB/C	Kawase et al, 1994(۱۴۹)
23	MS8, MS9, MS11, MS12	C57BL/6	Kawase et al, 1994(۱۴۹)
24	A32, A414, B310, B410	129/SV	Sukoyan et al, 2002(۱۵۰)
25		129	Abbondanzo et al, 1993(۱۵۱)
26	Royan B1, B2	C57BL/6	Baharvand, Mathaei, 2004(۱۵۲)
27	Royan C1, C2, C3	BALB/c	Baharvand, Mathaei, 2004(۱۵۲)

حیوانات ترانس ژن هستند. با تقلید از شرایط *in vivo* می‌توان از سلولهای بنیادی جنینی برای تولید انواع سلولها در محیط آزمایشگاهی به منظور اهداف طب پیوند، مطالعات زیست‌شناسی تکوینی و تولیدمثل و توسعه صنایع داروسازی استفاده نمود. یک نکته مهم در این خصوص، تولید سلولهای بنیادی جنینی از نژادهای مختلف موشی است.

از جمله خصوصیات مهم سلولهای بنیادی که در تمامی رده‌ها وجود دارد عبارتند از: منشأ ICM، توان تقسیم نامحدود و بدون تمایز، کاربوتیپ طبیعی کروموزومی، قابلیت کلونی‌زایی، بیان الکالین فسفاتاز و OCT-4 [۳۰] که هر سه رده تولیدشده دارای خصوصیات مذکور بودند.

از جمله نکات مهم در تولید رده سلولهای بنیادی، نژاد موش مورد استفاده است. فراوانی تولید رده در موش نژاد ۱۲۹SV، ۳۰-۱۰ درصد [۲۸] و از نژاد BALB/C، ۲/۵ درصد [۲۷] گزارش شده است. در این مطالعه، ۳/۰٪ از نژاد BALB/C و ۲/۸۵٪ از هیبرید دو نژاد NRMI و BALB/C حاصل شد و از نژاد C57BL/6، NMRI رده‌ای به دست نیامد.

جدول ۳ به بیان رده‌های سلولهای بنیادی جنینی و نژادهای مختلف موشی می‌پردازد.

همان‌طور که در جدول ۳ آمده است بیشتر رده‌های موجود از نژاد موش ۱۲۹ به دست آمده‌اند. ولی رده‌های F1/1 و TT2 از هیبرید نرهای نژاد CBA و ماده‌های نژاد C57BL/6 تولید شده‌اند (جدول ۳).

فراوانی کم تولید سلولهای بنیادی جنینی از این نژادها نسبت به نژاد ۱۲۹ به اختلاف ژنتیکی نژادها بستگی دارد. شرایط مطلوب کشت از قبیل نوع سرم، غلظت LIF، نحوه دستکاری و زمان منفرد کردن سلولهای ICM از نکات مهم دیگر در تولید رده سلولهای بنیادی جنینی است [۵۲ و ۵۳].

غلظت LIF در تولید بن‌یاخته‌های جنینی در این مطالعه 5000 iuml^{-1} و بعد از آن یعنی زمان نگهداری این سلولها 1000 iuml^{-1} بود. در گزارش قبلی که از دو غلظت 5000 iuml^{-1} و 1000 iuml^{-1} برای تولید رده سلولهای بنیادی جنینی از نژاد BALB/C استفاده شده بود [۲۷]؛ مشاهده شد که به کارگیری غلظت بالای LIF ابتدای کار مناسب‌تر است.

PCR ژن SRY نشان داد که هر سه رده تولید شده نر هستند.

این موضوع بسیار حایز اهمیت است زیرا (۱) نگهداری حیوان حاصل از آن راحت‌تر است؛ (۲) طی پاساژهای متوالی، پایداری کروموزومی آن نسبت به سلولهای بنیادی جنینی ماده بالاتر است؛ به‌طوری‌که در سلولهای بنیادی جنینی ماده مانند اپی‌بلاست هر دو کروموزوم X فعال و در نتیجه ناپایدار هستند [۵۴] طی پاساژهای متوالی معمولاً یک کروموزوم X از بین می‌رود و رده سلولی ES تبدیل به کاربوتیپ ۳۹XO می‌شود؛ (۳) تولید حیوان کایمرا از سلولهای بنیادی جنینی نر راحت‌تر است. زیرا به دلیل مشارکت سلولهای بنیادی جنینی در برآمدگی گنادی حتی اگر جنین میزبان ماده باشد، از آنجا که در سلولهای XX در محیط بیضه‌ای رشد نمی‌کنند سلولهای زاینده حاصل از

تمایز آزمایشگاهی این سلولها دلالت می‌کند. بدین ترتیب نتایج این مطالعه، حصول یک رده جدید و دو سلولهای بنیادی جنینی موشی نژاد BALB/C رده جدید از هیبرید دو نژاد پرتوان NMRI×BALB/C خصوصیات سلولهای را نشان داد.

تقدیر و تشکر

این مطالعه براساس طرح تولید رده‌های جدید سلولهای بنیادی جنینی موشی، مشترک بین پژوهشکده رویان و شبکه پزشکی مولکولی انستیتو پاستور است. بدینوسیله نویسندگان مقاله از مسئولین هر دو مرکز قدردانی می‌نمایند.

References

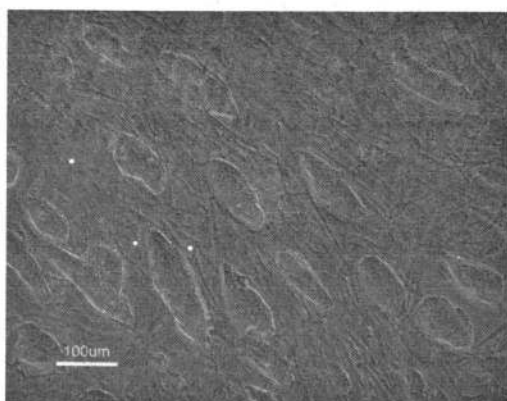
- Evans MJ, Kaufman MH. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature* 1981; 292: 154-6.
- Martin GR. Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos culture in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1981; 78: 7634-8.
- Beddington, RSP, Robertson EJ. An assessment of the developmental potential of embryonic stem cells in the midgestation mouse embryo. *Development* 1989; 105: 733-7.
- Nagy A, Gocza E, Diaz EM, Prideaux VR, Ivanyi E, Markkula M, Rossant J. Embryonic stem cells alone are able to support fetal development in the mouse. *Development* 1990; 110: 815-21.
- Robertson EJ. embryo-derived stem cell lines. In Robertson, EJ (ed.), *Teratocarcinomas and Embryonic stem cells: a Practical Approach*, IRL Press, Oxford. 1987, pp. 71-112.
- Doetschman T, Eistetter H, Katz M, Schmit W, Kemler R. The in vitro development of blastocyst derived embryonic stem cell line: formation of visceral yolk sca, blood Islands and myocardium. *J Embryol Exp Morph* 1985; 87: 27-45.
- Maltsev VA, Rohwedel J, Hescheler J, Wobus AM. Embryonic stem cells differentiate in vitro into cardiomyocytes representing sinus nodal, atrial and ventricular cell types. *Mech Dev* 1993; 44: 41-50.
- Yamashita J, Itoh H, Hirashima M, Ogawa M, Nishikawa S, Yurugi T, Naito M, Nakao K, Nkshikawa S. F1K1- Positive cell derived from embryonic stem cells serve as vascular progenitors. *Nature* 2000; 408: 92-6.
- Dani C, Smith AG, Dessolin S, Leroy P, Staccini L, Villageois P, Darimont C, Aihaud G. Differentiation of embryonic stem cells into adipocytes in vitro. *J Cell Sci* 1997; 110: 1279-85.
- Risau W, Sariola H, Zerwes HG, Sasse J, Eklblom P, Kemler R, Doetschman T. Vasculogenesis and angiogenesis in embryonic stem-cell-derived embryoid bodies. *Dvelopment* 1988; 102: 471-8.
- Wells ON, Misica PM, TA Day M, Tervit HR. Production of cloned lambs from an stem (ES) cell lines. *Int J Dev Biol* 1994; 38: 385-90.
- Rodde ASJ, Kavanagh SJ, Rathjen J, Rathjen PD. Embryonic stem cell differentiation and the analysis of mammalian development. *Int J Dev Bio* 2002; 46: 449-58.
- Hong YC, Winkler M. Scharl production of medakafish chimerae from a stable embryonic stem cell line. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 3679-84.
- Sun LCS, Bradford G, Ghosh PCollodi. ES- like cell cultures derived from early zebra fish embryos. *Mol Mar Biol Biotechnol* 1995; 4: 193-9.
- Pain B, ME Clark M, Shen H, Nakazawa M, Sakura J, Samarut Etches RJ. Long term in vitro culture and characterizations of avian embryonic stem cells with multiple morphogenic potentialities. *Development*

سلولهای بنیادی جنینی نر بوده و کایمرهای تولیدی نر می‌شوند [۵۵].

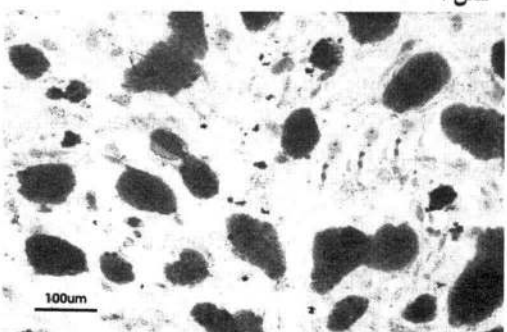
مهمترین ویژگی سلولهای بنیادی جنینی توانایی آنها به تمایز آزمایشگاهی به اکتودرم، مزودرم و اندودرم و سلولهای منشعب از آن است، با این سلولها می‌توان اجسام شبه جنینی را به وجود آورد. در این ساختار فرآیندهای تکوینی طبیعی مراحل اولیه جنینی ظاهر می‌شود و واکنش سلول به سلول مورد نیاز برای تمایز سلولی پیش می‌رود. یک لایه اندودرمی اطراف اجسام شبه جنینی را احاطه می‌کند و مخلوط ناهمگونی از انواع سلولها را دربرمی‌گیرد. شناسایی مشتقات سلولی لایه‌های جنینی مثل نورون و کاردیومیوسیت بر پرتوان بودن و توانایی

- 1996; 122: 2339-48.
16. Chang IK, DL Jeong, YH Hong, TS Park, YK Moon, T Ohon, JY Han. Production of germ line chimeric chickens by transfer of cultured primordial germ cells. *Cell Biol Int* 1997; 21: 495-9.
17. Schoonjans L, GM Albricht, JL Li, D Collen, RW Moreadith. Pluripotential rabbit embryonic stem (ES) cells are capable of forming ovecoat color chimeras following injection into blastocysts. *Mol Reprod Dev* 1996; 45: 439-43.
18. Mones AB, Flechon J, Degrouard X, Vignon J, Ding JE, Flechon KJ, Betteridge JP Renard. Ultra structural and immunocytochemical analysis of diploid germ cells isolated from fetal rabbit gonads. *Zygote* 1997; 5: 47-60.
19. Wheeler MB. Development and validation of swine embryonic stem cells. A review. *Reprod Fertil Dev* 1994; 6: 563-8.
20. Piedrahita JA, Moore K, Octama B, Lee CK, Seales N, Ramsoondar J, Baze FW, Ott T. Generation of transgenic porcine chimeras using primordial germ cell-derived colonies. *Biol Reprod* 1998; 58: 1321-9.
21. Cibelli JB, Stice SL, Golueke PG, Kane J, Jerry JJ, Blackwell ESC, Ponce de Lone FA, Robl MJ. Transgenic bovine chimeric offspring produced from somatic cell-derived stem-like cells. *Nat Biotechnol* 1998; 16: 642-6.
22. Thomson JA, Kalishman J, Golos TG, Durning M, Harris CP, Becker RA, Hearn J. Isolation of a primate embryonic stem cell line. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92: 7844-8.
23. Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* 1998; 282: 1145-7.
24. Wang ZQ, Kiefer F, Urbanek P, Wagner EF. Generation of completely embryonic stem cell-derived mutant mice using tetraploid blastocyst injection. *Mech Dev* 1997; 62: 137-45.
25. Henningson CT, Stanislaus MA, Gewirtz AM. Embryonic and adult stem cell therapy. I *Allergy Clin Immunol* 2003; 111: S753-4.
26. Gorba T, Allsopp TE. Pharmacological potential of embryonic stem cells. *Pharmacol Res* 2003; 47: 269-78.
27. Baharvand H, Matthaei KI. Culture condition difference for establishment of new embryonic stem cell lines from the C57BL/6 and BALB/C mouse strains. *In Vitro Cell. Dev Biol Anim* 2004; 40: 76-81.
28. Baharvand H, Fower JM, Ozsarac N, Matthaei KI. Differentiation of embryonic stem cells into functional neurons in vitro. *Neurosci Res Commun* 2004; 35(2): 130-8.
۲۹. بهاروند حسین، آذرnia مهناز، پریور کاظم، کاظمی آشتیانی سعید. خصوصیات ضرباهنگی (کرونوتروپی) سلولهای عضله قلبی مشتق از بن یاخته‌های جنینی. *مجله پزشکی کوثر*، زمستان ۸۳، ۹(۴)، ۲۶۱-۲۷۱.
30. Smith AG. Embryo-derived stem cells of mice and men. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2001; 17: 435-62.
31. Robertson E, Bradley A, Kuehn M, Evans M. Germ-line transmission of genes introduced into cultured pluripotential cells by retroviral vector. *Nature* 1986; 323: 445-8.
32. Gossler A, Doetschman T, Korn R, Serfling E, Kemler R. Transgenesis by means of blastocyst derived embryonic stem cell lines. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986; 83: 9065-9.
33. Hooper M, Hardy K, Handyside A, Hunter S, Monk M. HPRT - Deficient (Lesch - Nyhan) mouse embryos derived from germline colonization by cultured cells. *Nature* 1987; 326: 292-5.
34. McMahon AP, Bradley A. The Wnt-1 (int-1) proto-oncogene is required for development of a large region of the mouse brain. *Cell* 1990; 62: 1073-85.
35. Pease S, Braghetta P, Gearing D, Grail D, Williams RL. Isolation of embryonic stem (ES) cells in media supplemented with recombinant leukemia inhibitory factor (LIF). *Dev Biol* 1990; 141: 344-52.
36. Nichols J, Evans EP, Smith AG. Establishment of germ-line competent embryonic stem (ES) cells using differentiation inhibiting activity. *Development* 1990; 110: 1341-8.
37. Ledermann B, Burki K. Establishment of a germ line competent C57BL/6 embryonic stem cell line. *Exp Cell Res* 1991; 197: 254-8.
38. Li E, Bestor TH, Jaenisch R. Targeted mutation of the DNA methyltransferase gene results in embryonic lethality. *Cell* 1992; 69: 915-26.
39. Johnson RS, Spiegelman BM, Papaioannou V. Pleiotrophic effects of a null mutation in the c-fos proto-oncogene. *Cell* 1992; 71: 577-86.
40. Tokunaga T, Tsunoda Y. Efficacious production of viable germ-line chimeras between embryonic stem(ES) cell and 8-cell stage embryo. *Dev Growth*

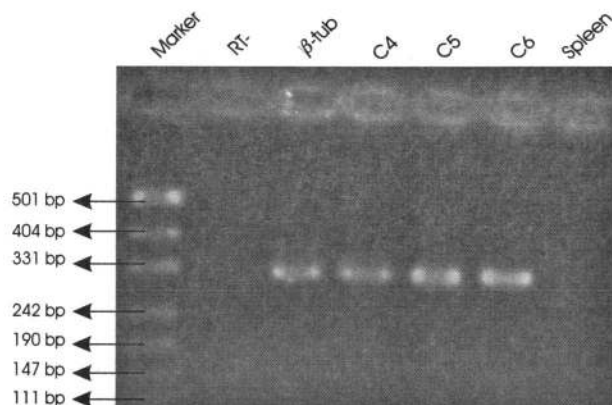
- Differ 1992; 34: 561-6.
41. Yagi T, Tokunaga T, Furuta T, Nishida S, Yoshida M. A novel ES cell line, T12, with high germ line differentiating potency. *Anat Bloch* 1993; 214: 70-6.
42. Nagafuchi S, Katsuta H, Hogaeva K, Akashi T. Establishment of an embryonic stem (ES) cell line derived from a nonobese diabetic (NOD) mouse: In vitro differentiation into lymphocytes and potential for germ line transmission. *FEBS Letters* 1995; 455: 101-4.
43. Voss AK, Thomas T, Gruss P. Germ line chimeras from female ES cells. *Exp Cell Res* 1997; 230: 45-9.
44. Roach ML, McNeish W. Methods for the isolation and maintenance of murine embryonic stem cells. *Methods in Mol Biol* 2002; 1850: 1-16.
45. Brook FA, Gardner RL. The origin and efficient derivation of embryonic stem cells in the mouse. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94: 3709-12.
46. Goulet JL, Wang CY, Koller EH. Embryonic stem cell lines from MRL mice allow genetic modification in a murine model of autoimmune disease. *J Immunol* 1997; 159: 4376-81.
47. Loffe E, Liu Y, Bhaumik M, Poirier F, Factor SM, Stanley P. WW6: An embryonic stem cell line with an inert genetic marker that can be traced in chimeras. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92: 7357-61.
48. Auerbach JH, Dunmore JH, Fairchild-Huntress, Fang Q, Auerbach AB, Huszar D, Joyner AL. Establishment and chimera analysis of 129/SvEv and C57BL/6 derived mouse embryonic stem cell lines. *Biotechniques* 2000; 29: 1025-31.
49. Kawase E, Saemori H, Takahashi N, Okazaki K, Hashimoto K, Nakatsuji N. Strain difference in establishment of mouse embryonic stem (ES) cell lines. *Int J Dev Biol* 1994; 38: 385-90.
50. Sukoyan MA, AN Golubitsa, AI, Zhelezova AG, Shilov SY, Vatolin LP, Maximovsky, LE Andreeva, J McWhir, SD Pack, SI Baybordin, AY Kerkis, HI Kizilova, OL Seov. Isolation and cultivation of blastocyst derived stem cell lines from American mink (*Mustela vison*). *Mol Reprod Dev* 1992; 33: 418-31.
51. Abbondanzo SJ, Gadi I, Stewart CL. Derivation of embryonic stem cells lines. *Methods in Enzymology*, (Wasserman. PM and Depamphilis ML, eds.) Academic Press, San Diego 1993; 225: 803-23.
52. Hogan B, Constantini F, Lacy E. Manipulating the mouse embryo: A laboratory manual. Cold Spring Harbor laboratory, Cold Spring Harbor, NY. 1994.
53. Bradley A. Teratocarcinomas and embryonic stem cells: A practical approach (Roberson, EJ, Ed). 1987; pp. 113-152, IRL Press, Oxford.
54. Rastan S, Robertson EJ. X-chromosome deletions in embryo-derived (EK) cell lines associated with lack of X-chromosome inactivation. *J Embryol Exp Morphol* 1985; 90: 379-88.
55. Bradley A, Evans MJ, Kaufman MH, Robertson E. Formation of germ-line chimaeras from embryo-derived teratocarcinoma cell lines. *Nature* 1984; 309: 255-6.



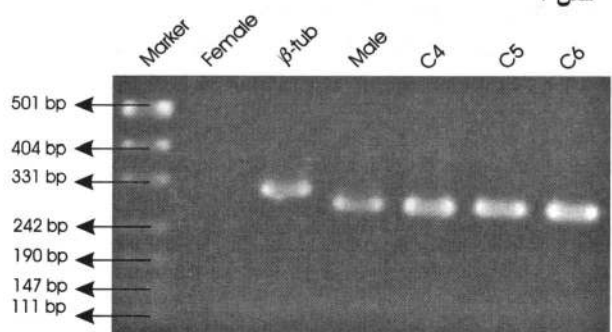
شکل ۱



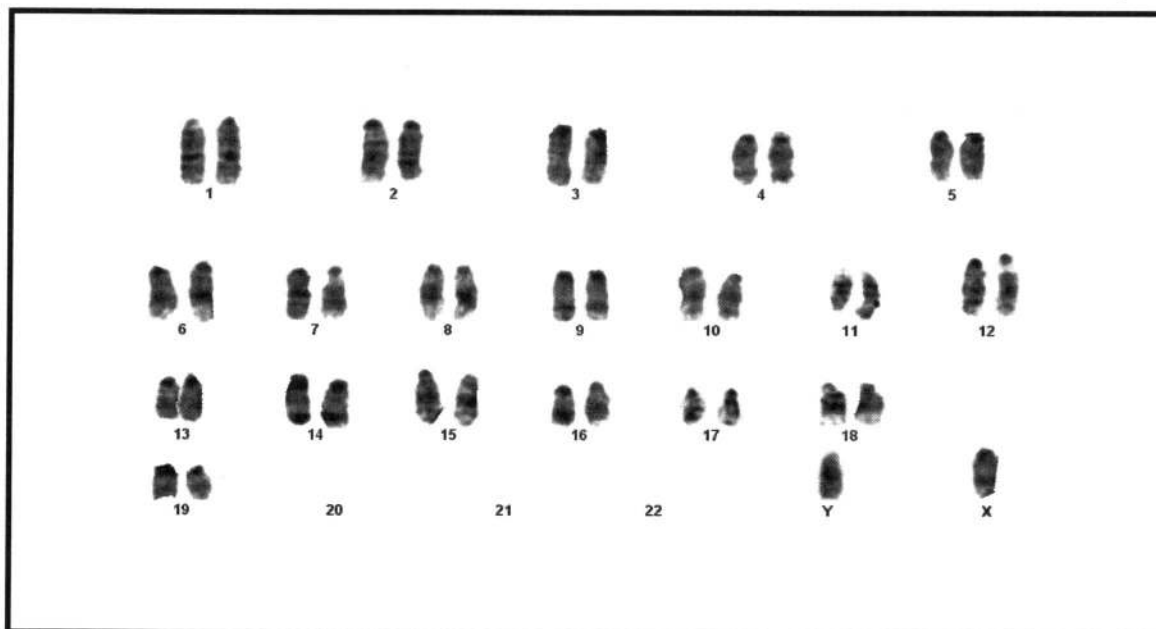
شکل ۲



شکل ۳



شکل ۴



شکل ۵

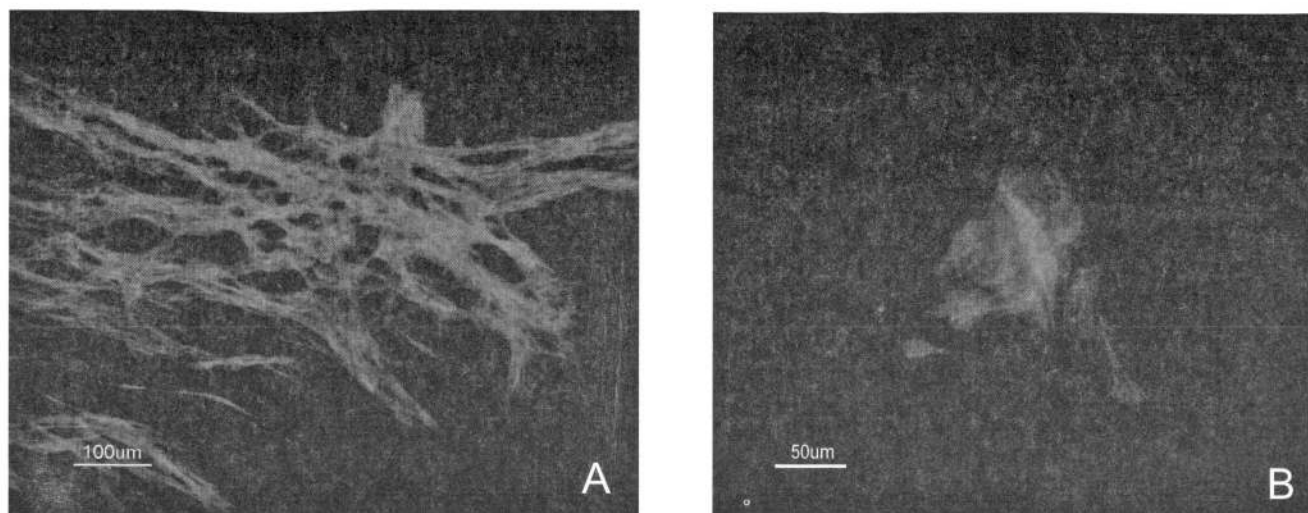
شکل ۱. کلونیه‌های سلولهای بنیادی جنینی کشت داده شده بر فیبروبلاستهای جنینی موش

شکل ۲. فعالیت الکالین فسفاتاز کلونی‌های سلولهای بنیادی

شکل ۳. بیان ژن Oct-4 در رده‌های سلولهای بنیادی جنینی تولید شده

شکل ۴. الکتروفورز محصول PCR ژن SRY

شکل ۵. نواربندی G سلولهای بنیادی جنینی تولید شده



شکل ۶. ایمونوسیتوشیمی سلولهای ماهیچه قلبی با آنتی بادی علیه (A) تروپونین α 1 (B) -اکتینین

شکل ۷. ایمونوسیتوشیمی سلولهای عصبی با آنتی بادی علیه β توبولین

