مقاله تحقیقی

القای تمایز سلولهای P19 به سلولهای قلبی با استفاده از هورمون اکسی‌توسین

لیلی حاتمی .M.Sc*، مجتبی رضازاده .Ph.D*،**

*گروه علوم تشریح دانشگاه تربیت مدرس

**گروه جنین‌شناسی پژوهشکده رویان

تاریخ وصول: بهمن ماه ۸۳، تاریخ پذیرش: اسفند ماه ۸۳

چکیده

هدف: بررسی نقش هورمون اکسی‌توسین در تمایز سلولهای بنیادی کارسینومایی P19 به سلول‌های قلبی

مواد و روشها: از سلولهای P19 در قطرات آویزان به مدت دو روز اجسام جنینی تشکیل شد. سپس برای پنج روز در ظروف کشت باکتریایی و در حالت سوسپانسیون کشت شدند. در این مرحله جهت القای تمایز، DMSO (Dimethyl-sulfoxide) و هورمون اکسی‌توسین به محیط کشت افزوده شد. اجسام جنینی هفت روزه، به صورت تکی در چاهک‌های ظروف کشت ۲۴ خانه منتقل شده و تعداد اجسام جنینی ضربان‌دار، روز شروع ضربان و تعداد ضربان در دو گروه به کمک میکروسکوپ معکوس مورد مطالعه قرار گرفت. همچنین در روز بیست و یکم برای تثبیت حضور سلولهای قلبی و مشاهده ارگانیزاسیون پروتئین‌های انقباضی / سارکومریک، ارزیابی ایمونوسیتوشیمی انجام شد.

یافته‌ها: اکسی‌توسین موجب تولید ضربان در روز دهم تمایز (۳+۷) در اکثر اجسام جنینی شد در حالی که همان نتیجه در سلولهای تحریک شده با DMSO در روز دوازدهم (۵+۷) به دست آمد. در بررسیهای ایمونوسیتوشیمی که برای مارکرهای دسمین، آلفاکتینین و کاردیاک تروپونین I انجام شد وجود این مارکرهای خاص عضلانی و قلبی به وضوح مشاهد شد.

نتیجه‌گیری: نتایج به دست آمده در این تحقیق نشان داد که هورمون اکسی‌توسین موجب تمایز سلول‌های بنیادی کارسینومایی جنینی P19 به قلبی و عمل آن توسط مسیری که هنوز شناسایی نشده واسطه می‌شود. بنابراین شاید هورمون اکسی‌توسین از جمله فاکتورهایی باشد که در کاردیوژنزیز نقش ایفا می‌کند.

کلید واژه‌ها: سلولهای بنیادی کارسینومایی P19، سلولهای قلبی، اکسی‌توسین

مقدمه

P19 رده سلولی کارسینومایی جنینی موش[1] است که پرتوان بوده، می‌تواند با استفاده از مکانیسم‌های مشابه سلول‌های بنیادی جنینی[2]، هر سه لایه جنینی (اکتودرم، مزودرم و اندودرم) را تشکیل دهد. این سلولها شبیه توده درونی بلاستوسیست جنین بوده، رویدادهای اولیه امبریوژنزیز را تقلید می‌کنند [۱]. برخلاف سلولهای بنیادی جنینی که به صورت خودبخودی به انواعی از سلولها تمایز می‌یابند، سلولهای کارسینومایی جنینی توسط فاکتورهای تحریک کننده مثل DMSO یا رتینوئیک اسید وادار به تمایز می‌شوند [۲].

هورمون اکسی‌توسین یک پپتید بزرگی است که در هیپوتالاموس بیان می‌شود و به‌عنوان هورمون سیستم تناسلی ماده شناسایی شده که برای انقباض رحم طی زایمان، خروج شیر در دوران شیردهی و تخمک‌گذاری لازم است [۳]. اخیراً دید جدیدی راجع به عملکرد اکسی‌توسین به‌دست آمده به طوری که‌نشان داده شده غلظت یکسانی از اکسی‌توسین در هیپوفیز و پلاسمای هر دو جنس وجود دارد و به همان مقدار تعداد

آدرس مکاتبه : تهران، دانشگاه تربیت مدرس، گروه علوم تشریح، صندوق پستی ۱۱۱-۱۴۱۱۵ Email:MR-valojerdi@modres.ac.ir

1. Embryonic carcinoma cell line
2. Embryonic stem cell (ESC)

نورونهای اکسی‌توسینرژیک در هیپوتالاموس مساوی است [۴] که می‌تواند نشان دهنده اعمال دیگر اکسی‌توسین به‌عنوان فاکتور رشد و تمایز سلولی باشد. اکسی‌توسین موجب تحریک تکثیر تیموسیت‌ها می‌شود [۵] همچنین موجب فعالیت میتوزی در اپیتلیوم پروستات [۶]، اندوتلیوم عروق [۷] و تروفوبلاست‌ها [۸] و تمایز سلولهای میواپی تلیال و تکثیر در غده پستانی موش می‌شود [۹]. از طرف دیگر پیشنهاد شده است که شاید اکسی‌توسین روی تکوین قلب تأثیر داشته باشد به طوری که تزریق زیاد اکسی‌توسین به جنین منجر به تخریب رشد قلب در انسان و رت شده [۱۰و۱۱] و خاموش کردن رسپتور آن توسط آنتاگونیست، موجب نقص قلبی در جنین می‌شود [۱۲]. در تأیید عملکرد اکسی‌توسین روی تکوین قلب سطح بالایی از آن در قلب در روزهای ۲۱ بارداری و ۴-۱ روز از تولد مشاهده می‌شود [۱۳]. Paquin و همکارانش در سال ۲۰۰۲ به دلیل آنکه اکسی‌توسین و رسپتور آن در قلب در حال رشد جنین بسیار بیشتر از قلب بالغین بیان می‌شود آن را به‌عنوان یک کاردیومورفوژن معرفی کردند. این محققین با استفاده از RT-PCR[1] نشان دادند که رسپتور اکسی‌توسین در سطح پایینی در سلولهای تمایز نیافته P19 وجود دارد و بیان آن پس از تیمار سلولها با اکسی‌توسین افزایش می‌یابد. بنابراین با استفاده از تیمار سلولهای P19 با اکسی‌توسین توانستند سلولهای قلبی در حال طپش به دست آورند و در محیط حاوی اکسی‌توسین و آنتاگونیست رسپتور آن، تمایز سلولهای P19 به سلولهای قلبی را مهار کنند [۱۲]. اما در این آزمایش ماهیت سلولهای قلبی توسط مارکرهای خاص عضلانی و قلبی بررسی نشد.

محققین دیگر سلولهای P19 را با استفاده از رتینوئیک اسید [۱۴و۱۵] و DMSO به سلولهای قلبی تمایز داده و نشان دادند که سلولهای قلبی حاصل از P19 خصوصیات بیوشیمیایی و فیزیولوژیک مشابه سلولهای قلبی جنینی را دارند. این سلولها تک هسته‌ای بوده، ANF[2] [۱۶] و ایزوفورمهای پروتئینهای سارکومریک [۱۷] و بسیاری از الگوهای بیان را مشابه بافت جنینی نشان می‌دهند [۱۸].

هدف از این تحقیق القای تمایز سلولهای P19 به سلولهای قلبی و ارزیابی مورفولوژیکی و مولکولی سلولهای شبه قلبی تمایز یافته در محیط DMEM[3] بوده است.

مواد و روشها

کشت و تمایز سلولهای P19

برای رشد و تکثیر این سلولها از محیط کشت DMEM (Glbco,U.S.A) با ۱۵ درصد FBS[4] (Gibco,U.S.A)، ۱ میلی‌مولار L-glutamine، ۰/۱ میلی‌مولار مرکاپتواتانول (Sigma,U.S.A) و یک درصد اسیدهای آمینه غیرضروری (Sigma. U.S.A.) استفاده شد.

سلولهای P19 به صورت سوسپانسیون در محیط کشت قرار گرفتند سپس قطرات آویزان[5] ۲۰میکرولیتری حاوی ۴۰۰ سلول روی درب پتری دیش حاوی آب استریل بدون یون گذاشته شده که به مدت دو روز تا زمان تشکیل اجسام جنینی[6] حفظ و پس از آن EBها برای پنج روز در ظروف کشت باکتریایی و در حالت سوسپانسیون کشت شدند. در این مرحله برای القای تمایز، هورمون اکسی‌توسین (Sigma, U.S.A) با غلظت 10^{-7} مولار و یک درصد DMSO به محیط کشت افزوده شد. EBهای هفت روزه به صورت تکی در چاهک‌های ظروف کشت ۲۴ خانه پوشیده شده با ۰/۱ درصد ژلاتین کشت شدند. محیط کشت EBها در سرتاسر آزمایش به صورت یک روز در میان تعویض شد. به این ترتیب برای انجام این تحقیق سه گروه مورد مطالعه وجود داشت یک گروه بدون فاکتور القا کننده به‌عنوان گروه کنترل و دو گروه با فاکتور اکسی‌توسین و DMSO.

ارزیابی مورفولوژیک سلولهای تمایز یافته

کشتها به‌طور روزانه توسط میکروسکوپ نوری معکوس مشاهده شدند تا روز شروع انقباض برای کانون‌های میوسیتی مشخص شود. به علاوه درصد EBهای حاوی کاردیومیوسیتهای ضربان‌دار و تعداد ضربان بر دقیقه آنها در هر آزمایش محاسبه شد.

1. Reverse transcriptase-polymerase chain reaction
2. Atrial natriuretic factor
3. Dulbecco's modified Eagle's medium
4. Fetal bovine serum
5. Hanging drop
6. Embryoid bodies (EBs)

ارزیابی ایمونوسیتوشیمی سلولهای تمایز یافته

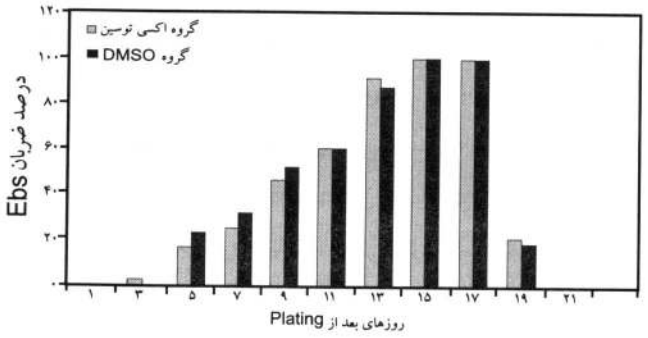
برای بررسی ایمونوسیتوشیمی کاردیومیوسیتهای تمایز یافته، ابتدا نواحی خودبه‌خود منقبض شونده به‌طور مکانیکی با استفاده از نوک کشیده و نازک شده میکروپیپت‌های شیشه‌ای جدا شده سپس سلولهای قلبی به طریق آنزیمی توسط انکوبه شدن با تریپسین به مدت ۵ دقیقه در ۳۷ درجه سانتی گراد پراکنده شدند. به این ترتیب برای فراهم نمودن امکان مشاهده کاردیومیوسیتهای مجزا، سلولها با تراکم پایین در ظرفهای کشت چهارخانه پوشیده شده با ژلاتین به مدت ۴۸ ساعت کشت شدند. سپس این سلولها با PBS+Tween ۲۰[1] شسته شده، ثبوت توسط پارافرمالدیید ۴ درصد انجام شد. از Triton X-100 (Sigma, U.S.A) به مدت پنج دقیقه، برای نفوذپذیر شدن غشای سلولها استفاده شد. سلولها با ۱۰ درصد goat serum (Sigma,U.S.A) در PBS برای یک ساعت و سپس ئر آنتی‌بادیهای اولیه انکوبه شدند. آنتی‌بادیهای اولیه مدنظر در بررسی حاضر شامل آنتی‌بادیهای مونوکلونال علیه آلفا اکتینین (۱:۸۰۰)، دسمین (۱:۲۰) وکاردیاک تروپونین I (۱:۲۰۰) بودند. پس از آن آنتی‌بادی ثانویه کونژوگه شده با FITC[2] با غلظت ۱:۱۰۰ به مدت یک ساعت و در دمای ۳۷ درجه به سلولها اعمال شد و پس از سه بار شستشو با PBS با میکروسکوپ فلوئورسنت (Nikon, Japan) مطالعه شدند.

آنالیز آماری

مقایسه درصد EBهای حاوی مناطق ضربان دار در روزهای متوالی کشت، توسط آزمون آماری مربع کای[3]، بین گروهها انجام شد و تعداد ضربان بر دقیقه آنها به صورت میانگین ± خطای استاندارد نشان داده شد و برای پی بردن به اختلاف بین دو گروه از آزمون ANOVA یک‌طرفه استفاده شد.

یافته‌ها

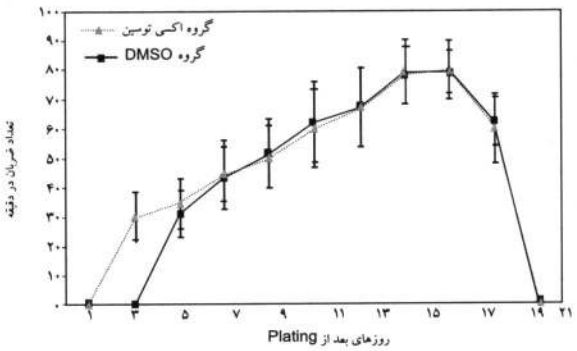
نتایج به دست آمده در این تحقیق نشان می‌دهد که اکسی‌توسین مانند DMSO می‌تواند سلولهای کاسینومایی جنینی P19 را به سلولهای قلبی ضربان دار تمایز دهد با این تفاوت که سلولهای P19 در معرض اکسی‌توسین با غلظت 10^{-7} مولار، ۳ روز پس از Plating (روز دهم) و در معرض یک درصد DMSO، ۵ روز پس از آن (روز دوازدهم) مراکز دارای ضربان خودبه‌خودی را نشان دادند که به تدریج در روزهای بعد به تعداد اجسام جنینی دارای ضربان افزوده شد و ۱۵ روز پس از plating صد درصد اجسام جنینی در هر دو گروه ضربان داشتند. در نمودار ۱ درصد اجسام جنینی ضربان‌دار در روزهای متوالی کشت در هر دو گروه نشان داده شده است. هر چند اجسام جنینی گروه اکسی‌توسین زودتر از DMSO مناطق ضربان‌دار را نشان دادند اما در میزان درصد اجسام جنینی ضربان دار هیچ تفاوت معنی داری بین دو گروه تا پایان دوره کشت مشاهده نشد و ۱۹ روز پس از plating ضربان در هر دو گروه متوقف شد. مراکز ضربان‌دار زیادی که در ابتدا بسیار کوچک و گرد و پراکنده بودند به تدریج بزرگتر و دراز شدند و به‌طور واضحی مراکز ضرباندار گروه درمان شده با اکسی‌توسین بزرگتر از گروه DMSO بود. این مراکز در اولین روز شروع ضربان از ۸/۲±۳۴/۷ و ۸/۵±۳۰/۵ ضربان بر دقیقه به ترتیب در گروه DMSO و اکسی‌توسین طپش داشتند. در نمودار ۲ میانگین ± خطای استاندارد فرکانس ضربان دو گروه در روزهای متوالی کشت نشان داده شده است. به این ترتیب فرکانس ضربان مناطق دارای طپش در هر دو گروه با افزایش تمایز، زیاد شده و در روزهای ۱۷ و ۱۵+۷ بیشترین میانگین فرکانس ضربان در دو گروه مشاهده شد و پس از آن کاهشی در این میانگین در هر دو گروه وجود دارد. در هیچ یک از روزهای کشت تفاوت آماری معنی داری بین میانگین فرکانس ضربان بر دقیقه در هر گروه مشاهده نشد.



نمودار ۱. اجسام جنینی ضربان‌دار در گروههای اکسی‌توسین و DMSO

1. Phosphate Buffer Saline
2. Fluorescein isothiocyanate
3. Chi-Square Test

در گروه کنترل (بدون فاکتور تمایزی) تا پایان دوره کشت (۲۴+۷ روز) هیچ مرکز ضرباندارى مشاهده نشد به طوری که پس از چسبیدن اجسام جنینی به کف ظرفهای کشت، اکثر سلولها که همان سلولهای P19 تمایز نیافته هستند به صورت تک لایه‌ای مشاهده شدند؛ هر چند تعداد کمی از سلولهای چند وجهی که مورفولوژی آنها با سلولهای P19 متفاوت است نیز به چشم می‌خورد. محققینی که در زمینه تمایز سلولهای P19 کار کرده‌اند با استفاده از بررسی‌های ایمنوسیتوشیمی و فراساختاری آنها را سلولهای اندودرمی خارج رویانی معرفی کرده‌اند [۱۹].



نمودار ۲. میانگین ضربان سلولهای قلبی در دقیقه در گروههای اکسی‌توسین و DMSO

به منظور بررسی ایمونوسیتوشیمی سلولهای شبه قلبی ۱۴ روز پس از plating از آنتی‌بادیهای آلفا اکتینین، دسمین، کاردیاک تروپونین I استفاده شد. آلفا اکتینین پروتئینی است که فیلامنتهای اکتین را در صفحه Z نگه می‌دارد. دسمین یک نوع فیلامان حد واسط است که میوفیبریلهای مجاور را به یکدیگر و به غشای سلول متصل می‌کند و کاردیاک تروپونین I نیز یک پروتئین اختصاصی در سلولهای قلبی است [۱۷]. در مشاهدات تحقیق حاضر مطابق شکل ۱ سلولهای دارای ضربان خودبه‌خودی هر دو گروه اشکال دوکی، گرد و سه تا چند وجهی و الگوی رنگ‌آمیزی مخطط و فیلامنتی را مشابه سلولهای قلبی بالغ از خود نشان دادند.

بحث

در این تحقیق کشت و تمایز سلولهای P19 به سلولهای قلبی توسط هورمون اکسی‌توسین در محیط DMEM انجام و فنوتیپ سلولهای قلبی تمایز یافته با مشاهدات مورفولوژیکی و ایمونوسیتوشیمی بررسی شد. رده سلولهای P19 دارای پتانسیل تکوینی مشابهی با سلولهای اولیه جنینی بوده، قادرند هم در شرایط *in vivo* و هم *in virto* به انواع زیادی از سلولها تمایز یابند. به همین دلیل می‌توان از این سلولها برای مطالعه مراحل تکوین سلولهای مختلف از جمله سلولهای قلبی و بررسی فاکتورهای تمایزی دخیل در آن استفاده کرد. نتایج این تحقیق نشان داد که اکسی‌توسین منجر به تمایز سلولهای P19 به سلولهای ضربان دار می‌شود که پروتئین‌های خاص عضلانی و قلبی در این سلولها فنوتیپ خاص قلبی آنها را نشان می‌دهد.

Paquin و همکارانش در سال ۲۰۰۲ نشان دادند که سلولهای تمایز نیافته P19 در سطح پایینی دارای رسپتور اکسی‌توسین هستند و استفاده از این هورمون سلولهای P19 را به سمت سلولهای قلبی هدایت می‌کند. آنها همچنین نشان دادند که استفاده از آنتاگونیست رسپتور اکسی‌توسین در گروه تیمار شده با اکسی‌توسین و همچنین DMSO تمایز سلولهای قلبی از سلولهای P19 را مهار می‌کند. هر چند مکانیسم اثر عمل اکسی‌توسین و DMSO تا کنون ناشناخته باقی مانده است اما این گروه نتیجه گرفتند که یکی از مکانیسمهایی که توسط آن اکسی‌توسین موجب تمایز سلولهای قلبی می‌شود درگیری رسپتور اکسی‌توسین است [۱۲].

نتایج به‌دست آمده در تحقیق حاضر تقریباً مشابه نتایج تحقیق فوق است؛ با این تفاوت که Paquin و همکارانش از روش mass culture برای تشکیل اجسام جنینی استفاده کردند و ۴ روز پس از plating (۴+۴) در گروه اکسی‌توسین و ۸ روز پس از آن (۸+۴) در گروه تیمار شده با DMSO سلولهای قلبی ضربان‌دار به‌دست آوردند [۱۲] اما در مطالعه حاضر ۳ روز پس از plating در گروه اکسی‌توسین و ۵ روز پس از آن در گروه DMSO، سلولهای قلبی ظاهر شدند. اما محققان دیگر حتی دو روز پس از plating با روش mass culture نیز با استفاده از DMSO سلولهای قلبی به‌دست آوردند [۲۰]. به این ترتیب نوع محیط کشت، سرم و درصد آن و همچنین شرایط پاساژ سلولهای P19 و تعداد سلولهای در حال تمایز در اجسام جنینی می‌تواند بر توانایی تمایز این سلولها تأثیر بگذارد [۲۰].

درباره فرکانس ضربان سلولهای قلبی حاصل از P19 گزارشی وجود ندارد اما به هر حال نتایج این تحقیق نشان می‌دهد که سلولهای قلبی به دست آمده در هر دو گروه این تحقیق، به تدریج با افزایش زمان و میانگین فرکانس بیشتری می‌یابند و سپس افتی در این میانگین در هر دو گروه مشاهده می‌شود.

در بیشتر مقالاتی که تا به حال در مورد سلولهای P19 منتشر شده است از محیط کشت (Alpha-modified Wgale's medium) Alpha-MEM برای رشد و تکثیر این سلولها و نیز از همین محیط برای تمایز سلولهای P19 به سلولهای قلبی و عصبی استفاده شده است. در حالی که در تحقیق حاضر هم برای تکثیر و هم برای تمایز سلولهای P19 به سلولهای قلبی از محیط DMEM و از روش hanging drop برای تشکیل اجسام جنینی استفاده شد.

به‌طور خلاصه در تحقیق حاضر با تأثیر اکسی‌توسین بر سلولهای کارسینومایی جنینی سلولهای شبه قلبی ضربان‌دار به‌دست آمد و آرایش پروتئین‌های سارکومری مشابه سلولهای قلبی بالغ نشان داده شد و نیز با استفاده از آنتی کاردیاک تروپونین I، آنتی بادی که اختصاص به سلولهای قلبی دارند، نشان داده شد که این سلولهای ضربان‌دار حاصل از سلولهای P19، قلبی هستند. علاوه بر این مشخص شد که سلولهای P19 نه تنها در محیط Alpha-MEM بلکه در محیط DMEM هم قادر به رشد و تکثیر، و در حضور فاکتور القا کننده مناسب قادر به تمایز به سلولهای قلبی هستند.

نتایج تحقیق حاضر ممکن است راهگشایی برای کاربرد فاکتورهای مختلف از جمله هورمون اکسی‌توسین در درمانهای ترمیمی باشد که جایگزین بافت قلبی از دست رفته پس از صدمه است. شاید اکسی‌توسین بتواند به‌عنوان یک فاکتور تروفیک در تقسیم جبرانی میوسیت‌ها در قلب صدمه دیده یا برای شروع کاردیومیوژنز یا بلوغ سلولهای قلبی حاصل از سلولهای بنیادی پیوند شده در آن نقش داشته باشد.

تقدیر و تشکر

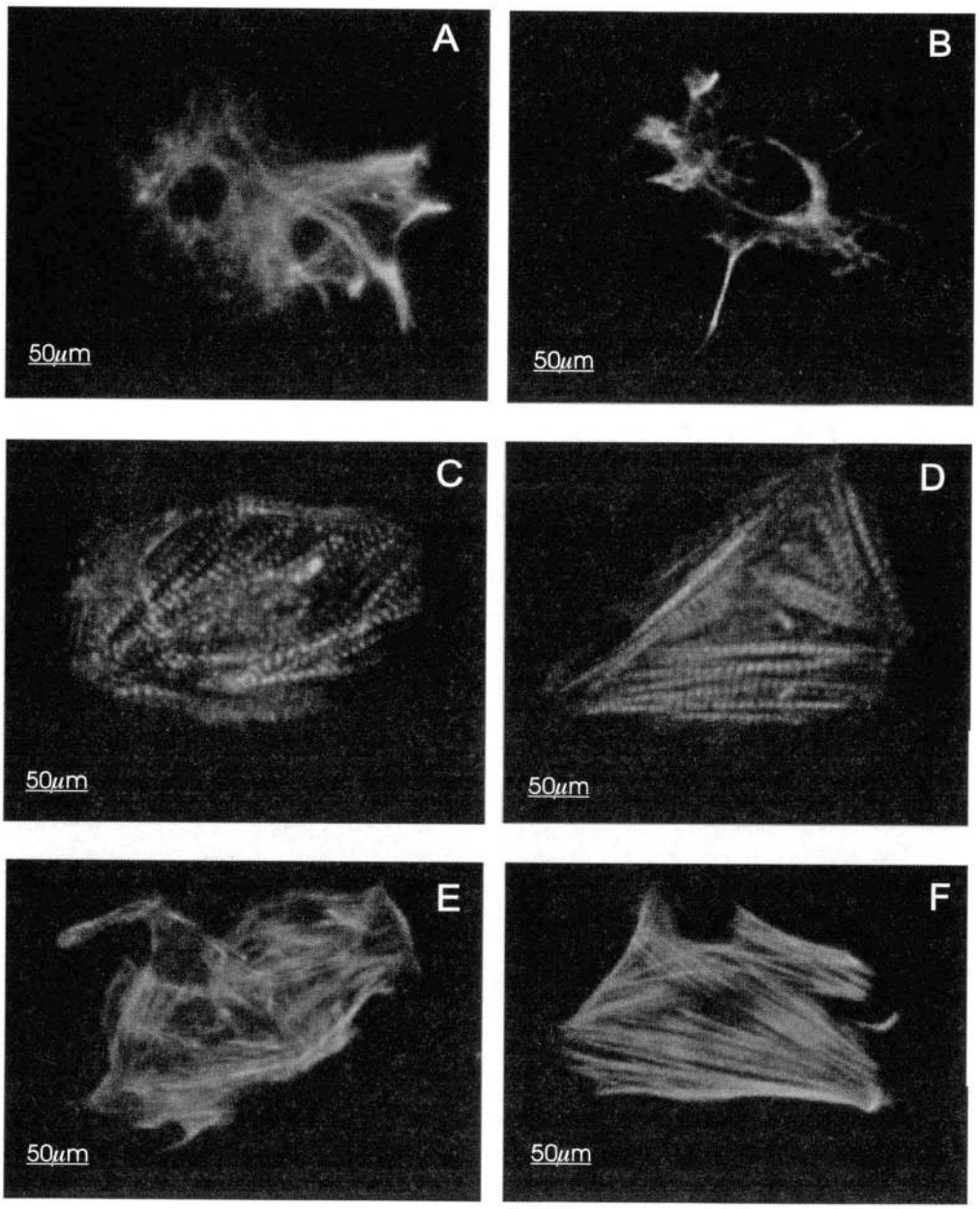
این مقاله حاصل یک طرح پژوهشی (کد ۴-۱-۱۳۷) است و کلیه هزینه‌های مصرفی و غیرمصرفی بر مبنای قرارداد شماره ۸۴/۱۸۲۶۲/پ/ از بودجه تحقیقاتی پژوهشکده رویان تأمین گردیده است. نویسندگان مراتب تقدیر و تشکر خود را از ریاست محترم پژوهشکده رویان، جناب آقای دکترسعید کاظمی و معاونت محترم پژوهشی، جناب آقای عبدالحسین شاهوردی و آقای دکترحسین بهاروند اعلام می‌دارند.

References

1. **Habara- ohkubo A.** Differentiation of beating cardiac muscle cells from a derivative of P19 embryonal carcinoma cells. Cell Struct Funct 1996; 21: 101-10.
2. **Wobus AM.** Characterization of a pluripotent stem cell line derived from a mouse embryo. Exp Cell Res 1984; 152: 212-9.
3. **Gimpl G, Fahrenholz F.** The oxytocin receptor system: structure, Function, and regulation. Physiol Rev 2001; 81: 629-983.
4. **Ashton N, Balment RJ.** Sewual dimorphism in renal function and hormonal status of new zeland genetically hypertensive rats. Acta Endocrinol 1991; 12a: 91-7.
5. **Geenen V, Kecha O, Brilot F, Charlet-Renard C, Martens H.** The thymic repertoire of neuroendocrine-related self antigens: biological role in T-cell selection and pharmacologicall implications. Neuroimmuno-modulation 1999; 6: 115-25.
6. **Plecas B, Popovic A, Jovovic D, Hristic M.** Mitotic activity and cell deletion in ventral prostate epithelium of intact and castrated oxytocin-treated rats. J Endocrinol Invest 1992; 15: 249-53.
7. **Thibonnier M, Conarty DM, Preston JA, Plesnichr CL, Dweik RA, Erzurum S.** Human vascular endothelial cells express oxytocin receptors. Endocrinology 1999; 140: 1301-9.
8. **Cassoni P, Sapino A, Munaron L, Deaglio s, Chini B, Graziani A, Ahmed A, Bussolati G.** A ctivation of functional oxytocin receptors stimulates cell proliferation in human trophoblast and choriocarcinoma cell lines. Endocrinology 2001; 142: 1130-1.
9. **Sapino A, Macri L, Tonda L, Bussolati G.** Oxytocin enhances myoepithelial cell differentiation and proliferation in the mouse mammary gland.

Endocrinology 1993; 133: 838-42.

10. **Chard T, Boyd NR, Forsling ML, McNeilly AS, Landon J.** The development of a radioimmunoassay for oxytocin: the extraction of oxytocin from plasma, and its measurement during parturition in human and goat blood. J Endocrinol 1970; 78: 223-34.
11. **Schriefer JA, Lexis PR, Miller JW.** Role of Fetal oxytocin in Parturition in the rat. Biol Reprod 1982; 27: 362-8.
12. **Paguin J, Bogdan A.** Oxytocin induces differentiation of P19 embryonic stem cells to cardiomyocytes. PNAS 2002; 99: 955-55.
13. **Gutkowska J, Bhat P.** 19th Scientific Meeting of the International Society of Hypertension, 2002; Prague, in Press (abstr.)
14. **Yao M, Bain G, Gottlieb DI.** Neuronal differentiation of P19 Embryonal carcinoma cells in defined media. J Neuroscience Reasearch 1995; 41: 792-804.
15. **Rudnicki MW, Kenneth RR.** Cell lines with developmental potential restricted to mesodermal lineages isolated from differentiating cultures of pluripotential P19 embryonal carcinoma cells. Development 1989; 107: 361-71.
16. **Boer PH.** Activation of the gene for atrial natriuretic factor during in vitro cardian myogenesis by P19 embryonal carcinoma cells. Exp Cell Res 1993; 207: 421-9.
17. **Rudnicki MA, Jackowski G, Saggin L.** Actin and myosin expression during development of cardiac muscle form cultured embryonal carcinoma cells. Dev Biol 1990; 138: 348-58.
18. **Ilona S, Skerjanc Is.** Cardiac and Skeletal Muscle Development in P19 Embryonal Carcinoma Cells. TCM 1999; 9: 51-8.
19. **McBurney MV, Jones V.** Control of muscle and neuronal differentiation in a cultured embryonal carcinoma cell line. Nature 1982; 299: 165-8.
20. **Wilton S, Skerjanc IS.** Factors in serum regulate muscle development in P19 cells In Vitro Cell Dev Biol Anim 1990; 35: 175-7.



شکل ۱. رنگ‌آمیزی ایمونوسیتوشیمی سلولهای قلبی گروه اکسی‌توسین و DMSO در روز ۱۴+۷ توسط مارکرهای خاص عضلانی و قلبی. (A) رنگ‌آمیزی دسمین گروه اکسی‌توسین، (B) رنگ‌آمیزی دسمین گروه DMSO، (C) رنگ‌آمیزی آلفا اکتینین گروه اکسی‌توسین، (D) رنگ‌آمیزی آلفا اکتینین گروه DMSO، (E) رنگ‌آمیزی کاردیاک تروپونین I گروه اکسی‌توسین، (F) رنگ‌آمیزی کاردیاک تروپونین I گروه DMSO.