مقاله تحقیقی

بیان رسپتور اکسی توسین در سلولهای بنیادی جنینی موش و تأثیر هورمون اکسی توسین در تمایز آنها به سلولهای قلبی

لیلی حاتمی.Ph.D *،*،**** مجتبی رضازاده .Ph.D *،** سید جواد مولی .Ph.D******

* گروه آناتومی دانشگاه تربیت مدرس

** گروه جنین شناسی پژوهشکده رویان

** گروه زیست شناسی دانشکده علوم دانشگاه زابل

**** گروه ژنتیک بخش زیست شناسی دانشگاه تربیت مدرس

تاریخ وصول: مهرماه ۸۶ ، تاریخ پذیرش: آبان‌ماه ۸۶

چکیده

هدف: بررسی نقش سیستم اکسی توسین ـ رسپتور اکسی توسین در تمایز سلولهای بنیادی جنینی به سلولهای قلبی در شرایط in vitro

مواد و روشها: در این مطالعه که به روش تجربی انجام شد، از سلولهای بنیادی جنینی 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 برای القای تمایز، هورمون اکسی توسین به محیط کشت افزوده شد. اجسام جنینی هفت روزه، به صورت تکی در چاهکهای ظروف کشت ٢٤ خانه منتقل شده و تعداد اجسام جنینی ضربان دار، روز شروع ضربان و فرکانس ضربان در گروهها به کمک میکروسکوپ معکوس مطالعه شد. همچنین برای تثبیت حضور سلولهای قلبی و مشاهده ارگانیزاسیون پروتئینهای انقباضی/ سارکومریک، ارزیابی ایمونوسیتوشیمی انجام شد. برای اثبات وجود رسپتور اکسی توسین در سلولهای بنیادی جنینی و بررسی بیان برخی ژنهای خاص قلبی، RT-PCR (Reverse transcriptase-polymerase chain reaction) انجام شد.

یافته‌ها: نتایج به دست آمده در این تحقیق برای اولین بار، وجودmRNA ی رسپتور اکسی توسین را در سلولهای بنیادی جنینی موش و سلولهای تمایز یافته حاصل از آن نشان داد و نقش اکسی توسین نیز توسط افزایش طول دوره انقباض اجسام شبه جنینی، سطح بیان برخی از ژنهای خاص قلبی و تعداد بیشتر سلولهای قلبی حاصل از سلولهای بنیادی جنینی تیمار شده با آن ثابت شد.

نتیجه‌گیری: اکسی توسین دارای رسپتورهایی روی سلولهای بنیادی جنینی تمایز نیافته و سلولهای تمایز یافته حاصل از آن است و سیستم اکسی توسین ـ رسپتور اکسی توسین ممکن است از جمله فاکتورهایی باشد که نقش مهمی را در تکوین سلولهای قلبی در طول دوره جنینی ایفا می‌کند.

کلید واژه‌ها: تکوین قلب، سلولهای بنیادی جنینی، سلولهای قلبی، اکسی توسین

آدرس مکاتبه: تهران، پژوهشکده رویان جهاد دانشگاهی، گروه جنین شناسی، صندوق پستی ١٩٣٩٥-٤٦٤٤

E-mail: royaninstitute.org

مقدمه

برای سالیان متوالی، اکسی توسین به عنوان هورمون سیستم تناسلی ماده شناسایی شده بود که موجب تحریک انقباضات رحم در طی زایمان، رفلکس خروج شیر در دوران شیردهی و تخمک گذاری می‌شود [۱]. مکان اصلی بیان ژن آن، هسته های هیپوتالاموس است همچنین نورونهای اکسی توسینرژیک در سرتاسر سیستم عصبی مرکزی پراکنده‌اند. علاوه بر سیستم عصبی مرکزی، در بافتهای محیطی از جمله رحم، جفت، آمنیون، بیضه، پروستات، تیروئید، قلب و عروق نیز اکسی توسین ساخته می‌شود [۱].

به تازگی پیشنهاد شده که اکسی توسین به عنوان فاکتور رشد و تمایز سلولی است. در مطالعات اخیر نشان داده اند که اکسی توسین در بافتهای توموری مختلف می‌تواند به عنوان یک تنظیم کننده منفی برای تکثیر سلولها عمل کند از جمله کارسینومای پستان انسان [۲]، تومورهای پستان جوندگان [۳]، تومورهای عصبی انسان [٤] و رده های سلولی استئوکارسینومای انسان. این اثرهای ضد تکثیر با واسطه رسپتور اکسی توسین و توسط مسیر CAMP-PKA انجام می‌شود [٦-٤].در مقابل این اثر ضد تکثیر اکسی توسین، یک عمل میتوژنیک نیز برای آن تعریف شده است. اکسی توسین می‌تواند موجب تحریک تکثیر تیموسیتها، افزایش فعالیت میتوزی در اپیتلیوم پروستات، اندوتلیوم عروق و تروفوبلاستها شود همچنین باعث تمایز سلولهای میواپی تلیال و تکثیر غده پستانی موش می‌شود [۷]. از طرف دیگر نشان داده شده که اکسی توسین روی قلب در حال تکوین تأثیر دارد به طوری که تزریق زیاد اکسی توسین به جنین منجر به تخریب رشد قلب در انسان و رت شده [۸ و۹] و خاموش کردن رسپتور اکسی توسین توسط آنتاگونیست آن در مرحله اولیه تکوین تخم جوجه منجر به نقص قلبی در جنین جوجه می‌شود [۱۰]. پاکویین (Paquin) و همکارانش در سال ۲۰۰۲ دریافتند که اکسی توسین و رسپتور آن در قلب در حال رشد جنین بسیار بیشتر از قلب بالغین بیان می‌شود بنابراین آنرا یک کاردیومورفوژن معرفی کرده، از آن به عنوان یک فاکتور تمایزی در القای سلولهای P19به سلولهای قلبی استفاده کردند [۷]. در مطالعه اخیر محققان حاضر توسط اکسی توسین در محیط DMEM ، کاردیومیوسیتها از سلولهای کارسینومایی P19 به دست آمده و به ارزیابی مورفولوژی و ملکولی آن پرداخته شد [۱۱].

سلولهای بنیادی جنینی[1]، سلولهای تمایز نیافته، پرتوان[2] و نامیرایی هستند که قابلیت تمایز به انواع سلولهای بدن را دارند. این سلولها از توده سلولی داخلی[3] بلاستوسیست به دست می‌آیند. اگرچه سلولهای بنیادی جنینی و کارسینومایی جنینی[4] شباهتهای زیادی به هم دارند حتی در یک گونه هم تا حدودی از نظر مورفولوژی، بیان نشانگرهای سطحی و نیازهای غذایی در محیط کشت با یکدیگر متفاوتند [۱۲]. از نظر کروموزومی سلولهای ES دیپلویید [۱۲] و EC آنوپلویید هستند [۱۲و۱۳]. بنابراین احتمالاً سلولهای EC مدل مناسبی برای بررسی مراحل رشد و نمو طبیعی نیستند. شناخت فاکتورهای رشد موضوع مهمی برای فهم کاردیوژنزیز و همچنین پیشرفت درمان با استفاده از سلولهای بنیادی در بیماریهای قلبی عروقی است [۱٤].

تا به حال وجود رسپتور اکسی توسین در سلولهای بنیادی جنینی تمایز نیافته و همچنین اثر هورمون اکسی توسین در تمایز این سلولها به سلولهای قلبی بررسی نشده است. در این تحقیق آثار هورمون اکسی توسین بر سلولهای بنیادی جنینی موش بررسی شد و برای تعیین اثر این هورمون بر سلولهای ES در ابتدا بیان رسپتور خاص آن ارزیابی شد.

1. Embryonic stem cells (ESC)
2. Pluripotent
3. Inner cell mass
4. Embryonic carcinoma cells (ECC)

مواد و روشها

کشت و تمایز سلولهای بنیادی جنینی

در این تحقیق از رده سلولهای بنیادی جنینی موش Royan B1 مشتق از موش نژاد C57BL/6 استفاده شد [۱۵]. این سلولها روی لایه تغذیه کننده[1]، فیبروبلاستهای جنینی موش، کشت شدند. سلولهای لایه تغذیه کننده که توسط مایتومایسین C (Sigma,U.S.A) تقسیمشان متوقف شده بود، مانع از تمایز خود به خودی سلولهای بنیادی جنینی می‌شوند. برای رشد و تکثیر این سلولها از محیط کشت(DMEM KO-(Gibco، U.S.A با ۱۵ درصد FBS[2] (Gibco،U.S.A)، ۱ میلی مولارL-glutamine، ۰/۱ میلی مولار مرکاپتواتانول (Sigma،U.S.A)، یک درصد اسیدهای آمینه غیر ضروری (Sigma، U.S.A) و 1000 iu/ml فاکتور ممانعت کننده لوکمیایی[3](emicon) استفاده شد.

پس از حذف سلولهای لایه تغذیه کننده و فاکتور مهار کننده لوکمیایی، سلولهای بنیادی جنینی به صورت سوسپانسیون در محیط کشت قرار گرفتند سپس قطرات آویزان[4] ۲۰ میکرولیتری حاوی ۸۰۰ سلول روی درب پتری دیش حاوی آب استریل بدون یون گذاشته شده که به مدت دو روز تا زمان تشکیل اجسام جنینی[5] حفظ شدند پس از آنEB ها برای پنج روز در ظروف کشت باکتریایی و در حالت سوسپانسیون کشت شدند. در این مرحله برای القای تمایز، هورمون اکسی توسین (Sigma،U.S.A) با غلظتهای 10^{-8}، 10^{-7}، 10^{-6} مولار به محیط کشت افزوده شد. EB های هفت روزه به صورت تکی در چاهکهای ظروف کشت ۲۴ خانه پوشیده شده با ۰/۱ درصد ژلاتین کشت شدند. محیط کشت EB ها در سرتاسر آزمایش به صورت یک روز در میان تعویض شد. برای مطالعه اثر مستقیم و بی واسطه هورمون اکسی توسین بر القای تمایز سلولهای بنیادی جنینی به سلولهای قلبی، از محیط بدون FBS نیز استفاده شد. جدول ۱ نشان دهنده گروههای مورد استفاده در این مطالعه، برای انتخاب بهترین شرایط برای کشت و تمایز سلولها است.

جدول ۱. گروههای مورد مطالعه بر اساس وجود سرم در محیط کشت

محیط کشت	مرحله قطره گذاری	مرحله سوسپانسیون	مرحله اتصال(plating)
FBS +++	+	+	+
FBS + – –	+	–	–
FBS – – –	–	–	–

ارزیابی مورفولوژیک سلولهای تمایز یافته

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

ارزیابی ایمونوسیتوشیمی سلولهای تمایز یافته

برای بررسی ایمونوسیتوشیمی کاردیومیوسیتهای تمایز یافته، ابتدا نواحی خود به خود منقبض شونده به طور مکانیکی با استفاده از نوک کشیده و نازک شده میکروپیپتهای شیشه ای جدا شده سپس سلولهای قلبی به طریق آنزیمی توسط انکوبه شدن با تریپسین به مدت ۵ دقیقه در۳۷ 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+ Tween20 شسته شده، ثبوت توسط پارافرمالدهید ٤ در صد انجام شد. از Triton X-100 (Sigma،U.S.A) به مدت پنج دقیقه ، برای نفوذپذیر شدن غشای سلولها استفاده شد. سلولها پس از یک ساعت در محلول ۱۰ درصد goat serum (Sigma،U.S.A)، در PBS[6] با

1. Feeder layer
2. Fetal bovine serum
3. Leukemiae inhibitory factor (LIF)
4. Hanging drops
5. Embryoid bodies (EBs)
6. Phosphate Buffer Saline

آنتی بادیهای اولیه انکوبه شدند. آنتی بادیهای اولیه مدنظر در بررسی حاضر شامل آنتی بادیهای مونوکلونال علیه آلفا اکتینین(۱:۸۰۰)، دسمین(۱:۲۰)، کاردیاک تروپونین I (۱:۲۰۰) و کانکسین (۱:۲۰۰) بودند. پس از آن آنتی بادی ثانویه کنژوکه شده با FITC[1] با غلظت ۱:۱۰۰ به مدت یک ساعت و در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد به سلولها اعمال شد و پس از سه بار شستشو با PBS با میکروسکوپ فلوئورسنت (Nikon,Japan) مطالعه شدند. برای تعیین درصد سلولهای قلبی حاصل از سلولهای بنیادی جنینی در گروههای تیمار شده و نشده با اکسی توسین، آنتی کاردیاک تروپونین I آنتی بادی و پروپودیوم یدید، به ترتیب برای رنگ آمیزی اختصاصی سلولهای قلبی و هسته تمام سلولها استفاده شد.

مطالعات RT-PCR

برای ارزیابی بیان ژن رسپتور اکسی توسین و ژنهای خاص قلبی از جمله α-MHC ، β- MHC MLC-2v, ANF در سلولهای بنیادی جنینی تمایز نیافته و اجسام جنینی تمایز یافته حاصل از آن از روش نسخه برداری معکوس- واکنش زنجیرهای پلی مراز (RT-PCR) استفاده شد. بدین منظور RNA آنها با RNX Plus TM (Fermentas) استخراج شد. با استفاده از پرایمر الگو dT و آنزیم Reverse transcriptase(Fermentas) ، cDNA ساخته شد. پرایمرهای مورد استفاده برای PCR در جدول۲ آمده است. محصولات واکنش PCR توسط الکتروفورز ژل آگاروز ۲ درصد جدا شدند و پس از رنگ آمیزی با اتیدیوم بروماید، با استفاده از دستگاه ترانس لومینوتر UV (Uvido,UK) مشاهده شدند. آزمون برای بررسی سطح بیان ژنهای خاص قلبی و مقایسه آنها سه بار تکرار شد.

آنالیز آماری

تمام آزمایشها حداقل ۳ بار تکرار شد و داده های مربوط به مناطق دارای ضربان اجسام جنینی و تعداد میوسیتهای قلبی تمایز یافته در اجسام جنینی به صورت درصد در هر دو گروه کنترل و آزمون نشان داده شد که توسط برنامه SPSSو با روش آماری مربع کای آنالیز شدند. داده های مربوط به فرکانس ضربان در دقیقه و RT-PCR نیمه کمی به صورت میانگین ± انحراف معیار نشان داده شد و با روش آماری Student's t test آنالیز شدند.

یافته‌ها

سلولهای بنیادی جنینی با حذف لایه تغذیه کننده و فاکتور مهار کننده لوکمیایی از محیطشان و پس از انتقال به قطرات آویزان، تجمعات پرسلولی به نام اجسام جنینی را تشکیل دادند. با تیمار اجسام جنینی توسط غلظتهای مختلف اکسی توسین و بدون آن در گروه +++FBS، سلولهای قلبی به صورت مناطق دارای ضربان خود به خودی مشاهده شدند. مطابق شکل ۱، درصد بیشتری از اجسام جنینی در گروه تیمار شده با غلظت 10^{-8} مولار اکسی توسین به ویژه از روز ۱۷ پس از plating دارای ضربان خود به خودی هستند. به این ترتیب، طول دوره ضربان خودبخودی کلاسترهای قلبی در این گروه بیشتر از دیگر گروههاست. به طوری که در پایان دوره کشت، گروه تیمار شده با کمترین غلظت اکسی توسین در این مطالعه، دارای بیشترین درصد اجسام جنینی ضربان دار بوده است.

اجسام جنینی در محیط- -+FBS با غلظتهای 10^{-8} ، 10^{-7}، 10^{-6} مولار اکسی توسین در اواسط دوره کشت (روز ۱۰-۱٤+۷ تمایز) به ترتیب ۰/۱۳± ۰/۹۸ ، ۰/۰۹±۱/۷۸ و ۰/۱۸±۱/۸۳ درصد مناطق ضربان دار را نشان دادند (جدول۳). اما در گروه کنترل (بدون اکسی توسین) سلولهای قلبی ضربان دار مشاهده نشد و بیشترین شکل تمایز سلولهای شبه عصبی بودند. همچنین در محیط ---FBS تا پایان دوره کشت، در هیچ کدام از گروهها سلولهای ضرباندار مشاهده نشد و فقط سلولهای شبه عصبی به صورت شبکه هایی در سرتاسر اجسام جنینی به چشم می‌خوردند.

1. Fluorescein isothiocyanate

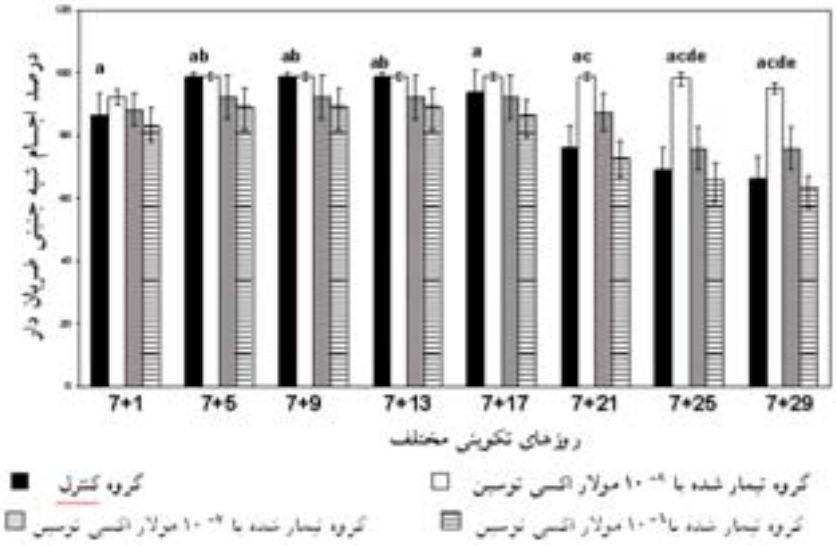
جدول۲. پرایمرهای مورد استفاده در PCR

Gene product	Primer sequences (5′-3′)	Size(bp)	Annealing Temperature
Oxytocin receptor	TCTTCTTCGTGCAGATGTGG AGGACGAAGGTGGAGGAGTT	391	60
Cardiac α-MHC	CTGCTGGAGAGGTTATTCCTCG GGAAGAGTGAGCGGCGCATCAAGG′	301	65
Cardiac, β-MHC	TGCAAAGGCTCCAGGTCTGAGGGC GCCAACACCAACCTGTCCAAGTTC	205	68
MLC-2V	TGTGGGTCACCTGAGGCTGTGGTTCAG GAAGGCTGACTATGTGTCCGGGAGATGC	189	68
ANF	TGATAGATGAAGGCAGGAAGCCGC AGGATTGGAGCCCAGAGTGGACTAGG	203	68
Oct-4	GGCGTTCTCTTTGGAAAGGTGTTC CTCGAACCACATCCTTCTCT	317	61
β--tubulin	GGAACATAGCCGTAAACTGC TCACTGTGCCTGAACTTACC	317	63

جدول ۳. مقایسه درصد اجسام شبه جنینی ضربان دار در روزهای تکوینی ۱٤-۱۰+۷ تمایز بین گروههای کنترل و تیمار شده با غلظتهای مختلف اکسی توسین در مدل تمایزی --+FBS

گروهها	درصد اجسام شبه جنینی ضربان دار
کنترل	۰
تیمار شده با 10^{-8} مولار اکسی توسین	۰/۹۸±۰/۱۳
تیمار شده با 10^{-7} مولار اکسی توسین	۱/۷۸ ±۰/۰۹
تیمار شده با 10^{-6} مولار اکسی توسین	۱/۸۳±۰./۱۸

با توجه به نتایج حاصل از مقایسه گروههای مورد بررسی، گروه تیمار شده با 10^{-8} مولار اکسی توسین در محیط +++FBS برای بررسی آثار این هورمون در تمایز میوسیتهای قلبی حاصل از سلولهای بنیادی جنینی موش انتخاب و با گروه کنترل مقایسه شد. از نظر مورفولوژی، مناطق ضربان دار ابتدا کم (به صورت یک یا دو مرکز ضربان دار)، نسبتا گرد و کوچک بوده، اما به تدریج بر تعداد این مناطق افزوده شده و به صورت توده های نواری شکل تغییر یافتند. سپس چند مرکز ضربان دار به یکدیگر وصل شده و شکل شبکه مانندی را در اجسام جنینی تشکیل دادند که سطح زیادی از آنها را اشغال می‌کرد و به صورت هماهنگ تر از قبل به ضربان ادامه دادند. هیچ اختلاف واضحی در مورفولوژی مناطق ضربان دار گروههای اکسی توسین و کنترل مشاهده نشد (شکل ۲).



شکل ۱. مقایسه درصد اجسام شبه جنینی ضربان دار در روزهای تکوینی مختلف بین گروههای کنترل و تیمار شده با غلظتهای مختلف اکسی توسین

a: اختلاف بین دو گروه تیمار شده با 10^{-8} و 10^{-6}مولار اکسی توسین معنی دار است (حداقل $p<0.05$)

b: اختلاف بین دو گروه کنترل و تیمار شده با 10^{-6} مولار اکسی توسین معنی دار است ($p<0.05$)

c : اختلاف بین دو گروه کنترل و تیمار شده با 10^{-8} مولار اکسی توسین معنی دار است (حداقل $p<0.05$)

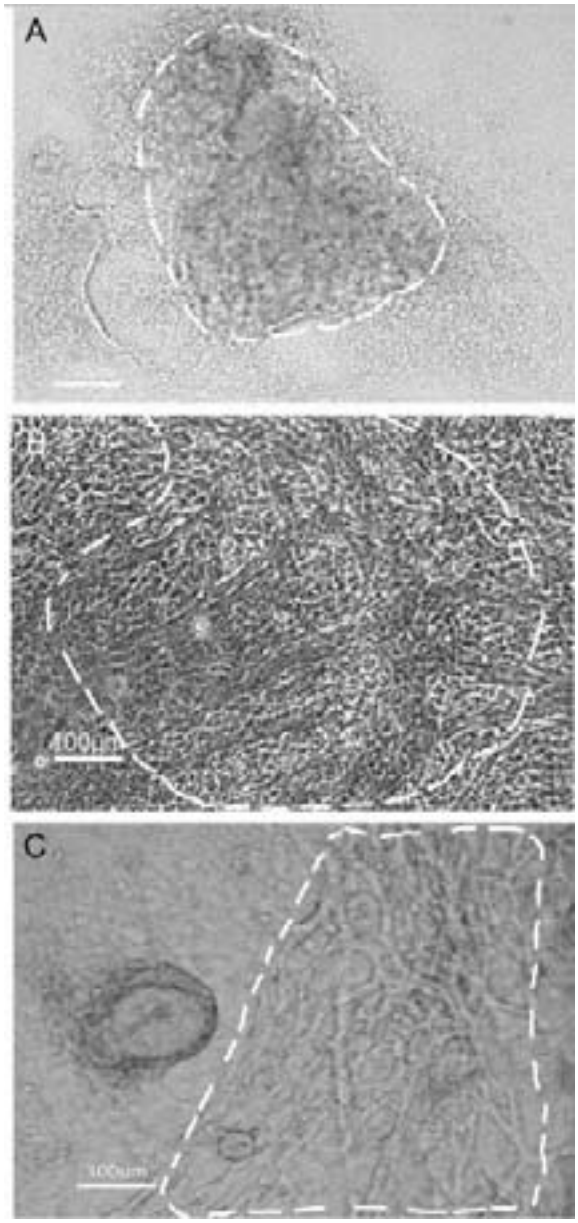
d : اختلاف بین دو گروه تیمار شده با 10^{-8} و 10^{-7}مولار اکسی توسین معنی دار است (حداقل $p<0.01$)

e : اختلاف بین دو گروه تیمار شده با 10^{-7} و 10^{-6}مولار اکسی توسین معنی دار است ($p<0.05$)

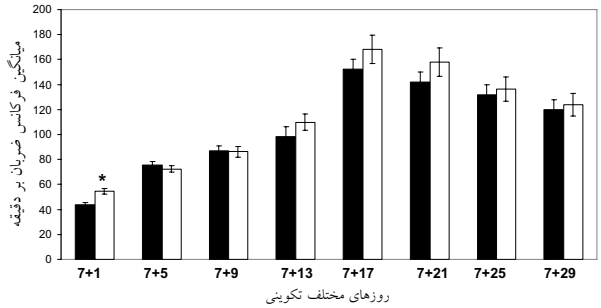
برای مقایسه عملکرد انقباضی میوسیتهای قلبی در گروههای کنترل و تیمار شده با ۸–۱۰ مولار اکسی توسین، فرکانس ضربان مناطق دارای طپش اجسام شبه جنینی در روزهای تکوینی مختلف شمارش شد سپس میانگین فرکانس ضربان در دقیقه دو گروه محاسبه و با یکدیگر مقایسه شد. نتایج شمارش فرکانس ضربان کلاسترهای قلبی، الگوی مشابهی را در هر دو گروه نشان داد. به طوری که فرکانس ضربان توده های قلبی با آهنگ پایینی شروع شد و به تدریج افزایش یافت تا اینکه در اواسط دوره کشت به حداکثر رسید سپس این فرکانس به تدریج کاهش یافت و یا به طور کلی متوقف شد. فرکانس ضربان در طول سی روز کشت در شکل ۳ آمده است. حداقل فرکانس ضربان در گروههای کنترل و تیمار شده با اکسی توسین به ترتیب۹/٤۱± ٤۳/۹٦ و ۱۷/۸۹± ٥٤/٥۱ ضربان در دقیقه در روز ۱+۷ بود که اختلاف بین آنها از نظر آماری معنی دار است ($p<0.001$) و حداکثر فرکانس ضربان در روز ۱۷+۷، ۸/۷ ±۱۵۲/۲۳ و ۱۱/٦±۱٦۸/۲۱ ضربان در دقیقه شمارش شد که پس از آن رو به کاهش رفت در حالی که اختلاف معنی داری بین دو گروه مشاهده نشد.

برای تثبیت حضور سلولهای قلبی در اجسام جنینی ضربان دار و مشاهده ارگانیزاسیون پروتئینهای خاص عضلانی و قلبی، رنگ آمیزی ایمونوسیتوشیمی سلولهای شبه قلبی ۳، ۷ و ۱٤ روز پس از plating با استفاده از آنتی بادیهای آلفا اکتینین، دسمین، کاردیاک تروپونینI و کانکسین انجام 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 و کانکسین ٤۳ از جمله پروتئینهای مهم اتصال باز (Gap junction) است. در مشاهدات ما مطابق شکل ٤ سلولهای دارای ضربان خود به خودی هر دو گروه (کنترل

و اکسی توسین با غلظت مطلوب) اشکال دوکی، گرد و سه تا چند وجهی و الگوی رنگ آمیزی مخطط و فیلامنتی را مشابه سلولهای قلبی بالغ از خود نشان دادند. در هر سه مرحله تکوین، الگوهای مختلفی از میوفیلامنتهای ارگانیزه نشده تا کاملا ارگانیزه مشاهده شد. هر چند در مراحل نهایی تمایز بیشتر سلولها الگوی کاملا ارگانیزه را از خود نشان دادند.



شکل۲ منطقه دارای ضربان در روز ۷+۱ تمایز در گروه کنترل (محدوده نقطه چین) (A) , نوارهای عضلانی قلبی در روز ۷+۱٤ تمایز در گروه کنترل (محدوده نقطه چین) (B), شبکه های عضلانی قلبی در روز ۷+۲۱ تمایز در گروه کنترل (محدوده نقطه چین) (C)



شکل ۳. مقایسه میانگین ضربان در دقیقه (± خطای استاندارد) در روزهای تکوینی مختلف بین گروههای کنترل و تیمار شده با 10^{-8} مولار اکسی توسین

گروه تیمار شده با 10^{-8} مولار اکسی توسین□ گروه کنترل ■

*: اختلاف بین دو گروه از نظر آماری معنی دار است ($p<0.001$).

نتایج حاصل از شمارش درصد سلولهای قلبی دو گروه نشان می‌دهد که اجسام جنینی تیمار شده و نشده با اکسی توسین در روز ۷+۳ تمایز به ترتیب دارای ۱/٤۰ ±۱۰/٤ و ۱/۱±۷/۱ درصد و در روز ۷+۱٤ تمایز دارای ۱/۸±۱۱/۲ و۱/۷۸±۹/۲ درصد میوسیتهای قلبی بودند. آنالیز آماری وجود تفاوت معنی داری را بین دو گروه فوق در هر دو مرحله تمایزی نشان داد ($p<0.05$) (جدول ٤).

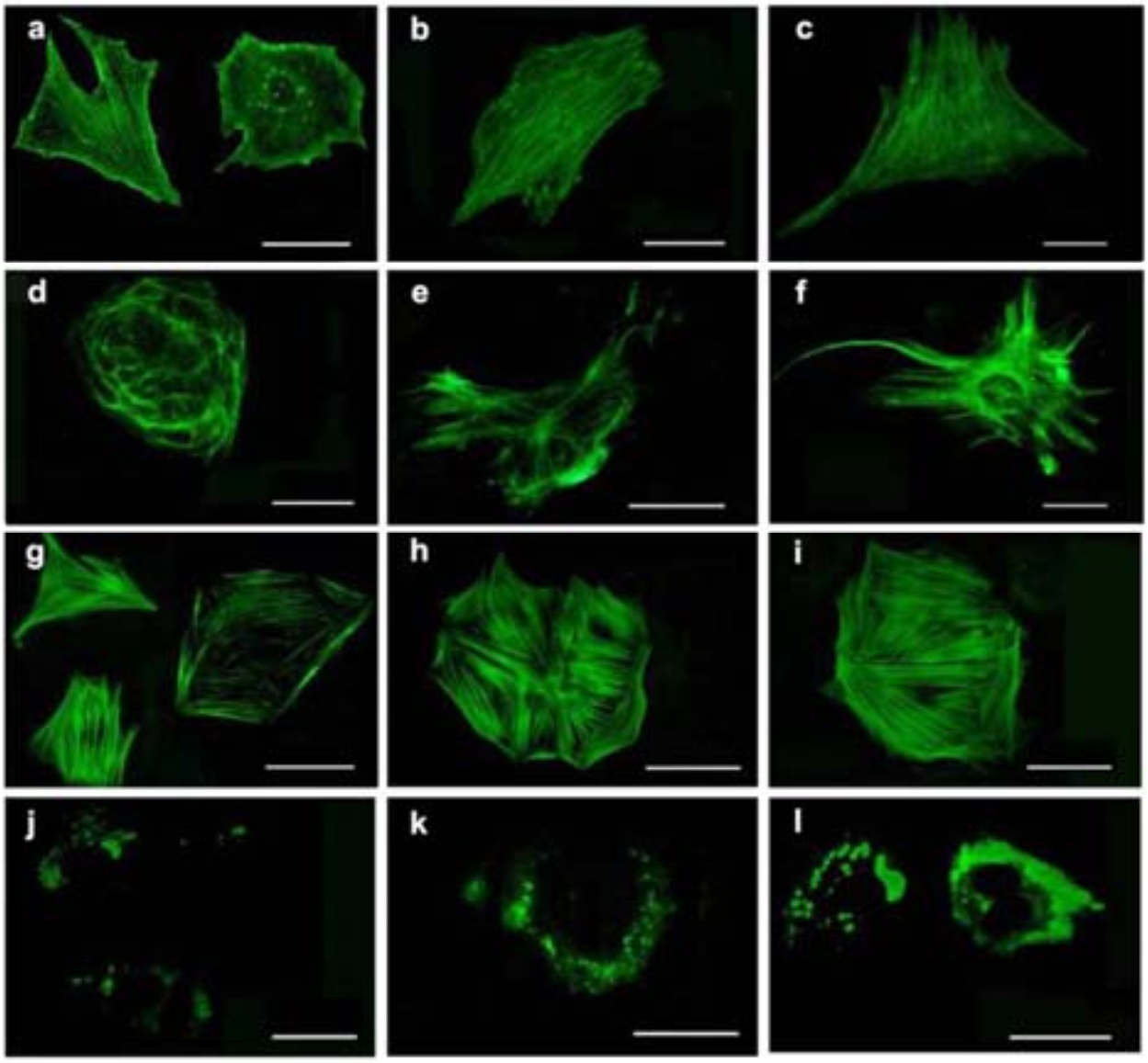
جدول ٤. مقایسه درصد میوسیتهای قلبی موجود در اجسام شبه جنینی بین گروههای کنترل و تیمار شده با 10^{-8} مولار اکسی توسین در مدل تمایزی +++FBS , در روز ۷+۳ و ۷+۱٤ تمایز

گروهها	درصد میوسیتهای قلبی در هر جسم شبه جنینی	
	روز ۷+۳ تمایز	روز ۷+۱٤ تمایز
کنترل	۱/۱±۷/۱	۱/۷۸±۹/۲
تیمار شده با 10^{-8} مولار اکسی توسین	۱/٤۰±۱۰/٤ *	۱/۸± ۱۱/۲ *

* اختلاف بین دو گروه از نظر آماری معنی دار است ($p<0.05$).

در تحقیق حاضر، حضور رسپتور اکسی توسین در سلولهای بنیادی جنینی تمایز نیافته و اجسام جنینی تمایز یافته حاصل از آن بررسی شد.RNA از سلولهای بنیادی جنینی تمایز نیافته و اجسام جنینی ۲ و ۷ روزه (تیمار شده و بدون تیمار با

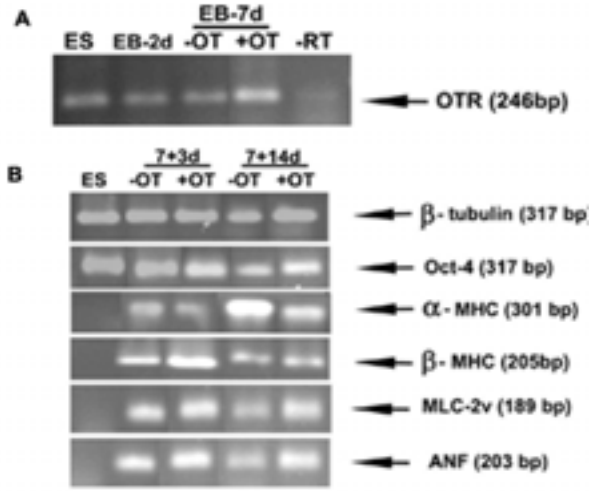
اکسی توسین) استخراج و واکنش RT-PCR با پرایمر ویژه رسپتور اکسی توسین انجام شد. نتایج RT-PCR وجود mRNAی رسپتور اکسی توسین را در سلولهای بنیادی جنینی تمایز نیافته و اجسام جنینی حاصل از آن نشان داد (شکل۵).



شکل٤. رنگ آمیزی ایمنوسیتوشیمی میوسیتهای قلبی حاصل از سلولهای بنیادی جنینی در گروه تیمار شده با اکسی توسین در سه مرحله تکوینی مختلف به ترتیب در روز ۳+۷، ۷+۷ و ۱٤+۷. A, B, C: آلفا اکتینین، D, E, F: دسمین، G, H, I: کاردیاک تروپونین آی، J, K, L: کانکسین.
m.µscale bars: 50

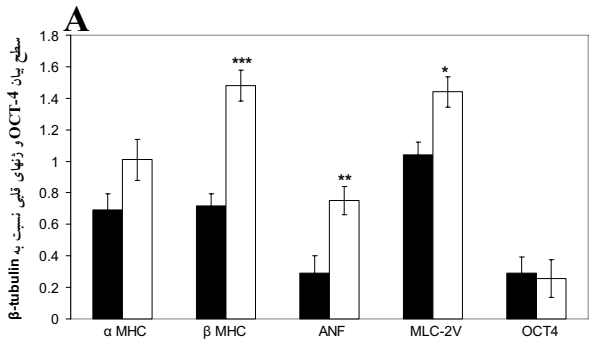
مقایسه نتایج حاصل بین دو گروه تیمار شده و نشده با اکسی توسین نشان می دهد که افزودن اکسی توسین بیان این رسپتور را تا حدی افزایش داده است هرچند که بررسی کمی در این زمینه صورت نگرفته است. همچنین بیان ژنهای خاص قلبی از جمله α-MHC، β-MHC، MLC-2v و ANF در سلولهای بنیادی جنینی تمایز نیافته و اجسام جنینی تمایز یافته نشان داد که سلولهای بنیادی جنینی تمایز نیافته هیچ یک از ژن های خاص قلبی را بیان نکردند. در حالی که با القای تمایز، این

ژنها بیان شدند. در مقابل OCT-4 بـه عنـوان مـارکر سـلولهای بنیادی جنینی تمایز نیافته در این سلولها بیان شـده و بیـان آن در سرتاسر تمایز در هر دو گروه ادامه یافت (شکل۵ AوB).

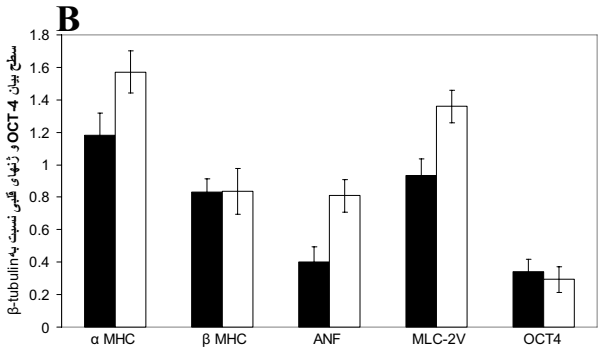


شکل۵. بیان ژن رسپتور اکسی توسین در سلولهای بنیادی جنینی و اجسام شبه جنینی ۲ و ۷ روزه تیمار شده و نشده با اکسی توسین (A) و بیان ژن OCT-4 و ژن های قلبی در سلولهای بنیادی جنینی و گروههای کنترل و تیمار شده با $۱۰^{-۸}$ مولار اکسی توسین (B).

آنالیز بیان MHC قلبی نشان داد که بیان α-MHC طـی تکـوین اجسام شبه جنینی افزایش غیر معنی داری یافت در حالی کـه بیان β-MHCدر هر دو گروه کاهش پیدا کرد. به این ترتیب بـا ادامه تمـایز تغییـری از β-MHCبـه α-MHC صـورت گرفـت. علاوه بر این بیان β-MHC در گروه تیمار شده با اکسی توسین در روز ۳+۷ بیشتر از گروه کنترل بوده و از نظر آمـاری معنـی دار بود ($p<0.05$). آنالیز بیان MLC-2vوANF در هر دو گـروه بیان زیاد آنها را در مراحل مختلف تکوین نشان داد به طوری که در هر دو گروه سطح بیان این ژنها طی تکوین تقریبا ثابت باقی ماند. علاوه بر این بیان هر دو ژن در گروه تیمار شده بـا اکسی توسین در روز ۳+۷ تمایز نسبت به گروه کنتـرل بیـشتر بود ($p<0.05$) در حالی که هیچ اخـتلاف معنـی داری بـین دو گروه در روز ۱٤+۷ تمایز مشاهده نشد (شکل٦ AوB).



گروه تیمار شده با۸- ۱۰ مولار اکسی توسین□ گروه کنترل ■



گروه تیمار شده با $۱۰^{-۸}$ مولار اکسی توسین□ گروه کنترل ■

بحث

چندین تحقیق نقشی را برای اکسی توسین بـه عنـوان فـاکتور رشد و تمایز یا بلوغ در زمان بـارداری و پـری ناتـال در نظـر گرفته اند. در مادر اکـسی توسـین موجـب تحریـک تمـایز و تکثیر سلولهای میواپی تلیال غدد پستانی می‌شود [۱]. سیـستم اکسی توسین- رسپتور اکسی توسین در سلولهای کومولـوس/ لوتئال انسان که اووسیت را احاطه کرده اند بیـان مـی‌شـود و حتی بیان ضعیف ژن رسپتور اکسی توسـین در اووسـیت نیـز مشاهده شده است [١٦]. علاوه بر این، وقتی اووسیتهای لقاح یافته مـوش بـا اکـسی توسـین در in vitro کـشت شـوند، در مقایسه با آنهایی که تحریک نشده اند بـه نـسبت بـالاتری بـه مرحله بلاستوسیست می‌رسند [۱]. تمام ایـن مطالعـات نقـش سیستم اکسی توسین– رسـپتور اکـسی توسـین را در مـادر و جنین در حین تکوین نشان می‌دهد و تحقیـق حاضـر نیـز بـه

نقش اکسی توسین در تکوین سلولهای قلبی حاصل از سلولهای بنیادی جنینی در شرایط in vitro اشاره دارد. در مطالعه حاضر، برای تحقیق بیشتر درباره عملکرد اکسی توسین در کاردیومیوژنزیز، بیان رسپتور آنرا در سلولهای بنیادی جنینی تمایز نیافته و اجسام جنینی حاصل از آن و آثار افزودن اکسی توسین به محیط کشت این سلولها بررسی شد.

در تحقیق حاضر برای شناخت پتانسیل تکوینی اکسی توسین از دوزیابی استفاده شد که بر اساس نتایج حاصله از غلظت 10^{-8} مولار اکسی توسین به عنوان بهترین غلظت آن در این مطالعه استفاده شد. در مطالعات قبلی پاکویین (Paquin) و همکارانش برای تمایز سلولهای بنیادی کارسینومایی P19 به میوسیتهای قلبی از غلظت 10^{-7} مولار اکسی توسین استفاده کردند [۷].کاتساهیسا (Kutsuhisa) و همکارانش نیز برای تمایز سلولهای بنیادی بالغ +Sca-1 به میوسیتهای قلبی غلظت ۷-۱۰ مولار اکسی توسین را به کار بردند [۱۷] که اختلاف غلظت در دوز به دست آمده در مطالعه حاضر شاید ناشی از اختلاف در رده سلولی و محیط کشت مورد استفاده باشد.

نتایج حاصل حضور mRNA ی رسپتور اکسی توسین را در سلولهای بنیادی جنینی تمایز نیافته و اجسام جنینی حاصل از آن تایید کرد که نشان می‌دهد این سلولها در حضور رسپتور اکسی توسین می‌توانند به اکسی توسین پاسخ دهند. اخیرا پاکویین (Paquin) و همکارانش وجود رسپتور اکسی توسین را در سلولهای کارسینومایی P19 نشان دادند و به نقش اکسی توسین در بلوغ سلولهای قلبی تازه تمایز یافته اشاره کردند [۷]. همچنین وجود رسپتورهای فانکشنال در میوبلاستهای کشت یافته نشان داده شد [۱۸]. اما تابه حال هیچ گزارشی از بیان رسپتور اکسی توسین در سلولهای بنیادی جنینی و نقش این هورمون در تکوین سلولهای قلبی حاصل از سلولهای بنیادی جنینی در شرایط in vitro وجود ندارد.

مشاهدات ما نشان داد که هرچند اکسی توسین در محیط فاقد سرم توانایی شروع تمایز سلولهای بنیادی جنینی به سلولهای قلبی را ندارد اما در محیط حاوی سرم همراه با دیگر فاکتورهای ناشناخته موجود در آن می‌تواند در تکوین سلولهای قلبی نقش ایفا کند. سلولهای بنیادی جنینی تیمار شده با اکسی توسین به خوبی به سلولهای قلبی فعال تمایز یافتند. وجود اجسام جنینی ضربان دار بیشتری تا پایان دوره کشت، تجلی نشانگرهای سلولی و ملکولی خاص قلبی و افزایش بیان برخی از آنها نسبت به گروه تیمار نشده با اکسی توسین و همچنین افزایش درصد سلولهای قلبی حاصل از سلولهای بنیادی جنینی تیمار شده با اکسی توسین، از جمله نشانه های نقش اکسی توسین در تکوین سلولهای قلبی است. سلولهای قلبی ضربان دار در حال تکوین، برخی از ژنهای خاص قلبی را بیان می‌کنند. در این مطالعه بیان ژنهای α-MHC، β-MHC، ANFو MLC-2v و مقایسه سطح بیان آنها بین دو گروه تیمار شده و نشده با اکسی توسین توسط RT-PCR نیمه کمی بررسی شد. الگوهای بیان ژنهای مختلف در قلب طی تکوین تفاوت می‌یابد و بسیاری از ژنها، الگوی بیان وسیعتری را در دوره جنینی نسبت به دوره بالغ دارند [۱۹]. در شرایط in vitro، MLC-2v mRNA در سطح بالایی در روز ۳+۷ مشاهده شد. لکان دپرز (Lekanne Deprez)نیز سطح بالایی از بیان MLC-2v mRNA را در مرحله اولیه تکوین سلولهای قلبی حاصل از سلولهای بنیادی جنینی به دست آورد اما در برخی از مطالعات تأخیری در بیان این ژن گزارش کرده‌اند [۲۰].

بیان هر دو ایزوفورمهای β –MHC , α در سرتاسر تمایز اجسام جنینی مشاهده شد که آنالیز بیان آنها افزایش بیان α-MHC و کاهش بیان β– MHC را طی تکوین اجسام جنینی در هر دو گروه کنترل و اکسی توسین نشان داد. این یافته ها با مطالعات in vivo مطابقت دارد که در میوسیتهای بطنی پستانداران کوچک تغییر در فنوتیپ MHC ازβ به α وجود دارد. همچنین متزگر (Metzger) و همکاران [۲۱] شیفتی را ازβ به α طی تمایز ESC ها گزارش کرده اند و توضیح دادند که ممکن است دلالت بر تغییر تکوینی ژن MHC در in vitro داشته باشد یا به خاطر القای سلولهای دهلیزی در اجسام

جنینی باشد زیرا این سلولها بیشتر MHC- α را بیان می‌کنند. با مقایسه سطح بیان این ژنها در دو گروه افزایش معنی داری در بیان MHC- β، ANF و MLC- 2v در مرحله اولیه تکوین سلولهای قلبی در in vitro نشان داده شد.

نتایج حاصل از پژوهش حاضر بیانگر این است که سلولهای بنیادی جنینی Royan B1 تیمار شده و نشده با اکسی توسین به میوسیتهای قلبی عملکردی تمایز یافتند که این نتیجه گیری بر اساس مشاهده انقباض سلولهای تمایز یافته و بیان چندین مارکر ملکولی مربوط به قلب توسط میوسیتهای قلبی حاصل به دست آمد. به این ترتیب نشان داده شد که اکسی توسین به واسطه رسپتورش در تکوین سلولهای قلبی حاصل از سلولهای بنیادی جنینی نقش دارد. هرچند که مکانیسم آن هنوز شناسایی نشده است ولی شاید ANF حاصل از ترشح اکسی توسین بتواند به عنوان یک فاکتور رشد سلولی در کاردیومیوژنزیز نقش ایفا کند.

از آنجایی که اکسی توسین منجر به افزایش تمایز سلولهای بنیادی جنینی به میوسیتهای قلبی شده است نتایج مطالعه حاضر ممکن است کاربردی در درمان های ترمیمی برای جایگزین بافت قلبی از دست رفته پس از صدمه داشته باشد و اکسی توسین بتواند به عنوان یک فاکتور تروفیک در تقسیم جبرانی میوسیتهای قلبی در قلب انفارکته یا در کاردیوژنز سلولهای پیش ساز یا سلولهای پیوند شده به قلب صدمه دیده نقش داشته باشد.

تقدیر و تشکر

این مقاله حاصل یک طرح پژوهشی (کد ٤-١-١٣٧) است و کلیه هزینه های مصرفی و غیر مصرفی بر مبنای قرار داد شماره ٨٤/١٨٢٦٢/پ از بودجه تحقیقاتی پژوهشکده رویان تامین شده است. نویسندگان مراتب تقدیر و تشکر خود را از تمامی دست اندرکاران این پژوهشکده اعلام می‌دارند.

References

1. **Gimpl G, Fahrenholz F.**The oxytocin receptor system: structure,function,and regulation. Physiol. Rev. 2001; 81: 629–683.
2. **Cassoni P, Sapino A, Negro F, BussolatiG.** Oxytocin inhibits proliferation of human breast cancer cell lines. Virchows Arch .1994; 425:467-472.
3. **Cassoni P, Sapino A, Papotti M, Bussolati G.** Oxytocin and oxytcin- analogue F314 inhibit cell proliferation and tumour growth of rat and mammary carcinomas. Int J Cancer. 1996; 66:817–820
4. **Cassoni P, Sapino A, Fortunati N, Stella A, Bussolati G.** Presence and significance of oxytocin receptors in human neuroblastomas and glial tumors. Int J Cancer. 1998; 77:695–700
5. **Cassoni P, Fulcheri E, Carcangiu ML, Stella A,** Deaglio S, Bussolati G. Oxytocin receptors in human adenocarcinomas of the endometrium: presence and biological significance. J Pathol. 2000; 190:470–477
6. **Cassoni P, Sapino A, Fortunati N, Munaron L, Chini B, Bussolati G.** Oxytocin inhibits the proliferation of MDA-MB231 human breast-cancer cells via cyclic adenosine monophosphate and protein kinase A. Int J Cancer.1997; 72:340-344
7. **Paquin J, Danalache B A. Jankowski M, McCann SM.** Gutkowska J. Oxytocin induces differentiation of P19 embryonic stem cells to cardiomyocytes. PNAS. 2002; 99:9550-9555
8. **Chard T, Boyd N. R, Forsling M. L, McNeilly A.** S, 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;48: 223–234.
9. **Schriefer J. A, Lewis P. R, Miller J. W.** Role of

fetal oxytocin in parturition in the rat. Biol. Reprod. 1982 ;27:362–368.

10. **Widmer, H., Durroux, T., Kempf, H., Mouillac, B., Gasc, J. M. & Barberis, C.,** World Congress on Neurohypophysial Hormones, Aug. 28 to Sept. 12, 1999, Edinburgh, Scotland, p. 94 (abstr.).
11. القای تمایز سلولهای p19 به سلولهای قلبی با استفاده از هورمون اکسی توسین. لیلی حاتمی، مجتبی رضازاده، ۱۳۸۳، شماره ۴: ۳۹-۳۳.
12. **DAmour K.** Gage F.H.New tools for human developmental biology. Nature Biotechnology.2000; 18: 381-382
13. **Evans M. Kaufman M.H.**Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos.Nature.1981; 292: 154-156
14. **Agapios S, Bernd K.** Fleischmann, Eugen Kolossov, Maria Wartenberg, Cardiac specific differentiation of mouse embryonic stem cells. Cardiovascular Research. 2003; 58: 278–291
15. **Baharvand H, Matthaei KI.** Culture condition difference for establish- ment 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.
16. **Furuya K, Mizumoto Y.** Gene expression of oxytocin and oxytocin receptor in cumulus cells of human ovary. Human Res. 1995;44: 49-47
17. **Katsuhisa M, Toshio N, Nobuhiro N, et al.** Adult cardiac sca-1-positive 581 cells differentiate into beating cardiomyocytes. J Biol Chem 2004; 279 (12):11384–91.
18. **Jankowski M, Bogdan D, Donghao W, et al.** Oxytocin in cardiac ontogeny. PNAS 2004; 101:13074–9.
19. **Fijnvandraat AC, Van Ginneken ACG, de Boer PAJ, et al.** Cardiomyocytes derived from embryonic stem cells resemble cardiomyocytes of the embryonic heart tube. Cardiovasc Res 2003; 58:399–409.
20. **Fijnvandraat AC, Lekanne Deprez RH, Moorman AFM**. Development of heart muscle-cell diversity: a help or a hindrance for phenotyping embryonic stem cell-derived cardiomyocytes. Cardiovasc Res 2003; 58:303–12.
21. **Metzger JM, Lin W-I, Johnston RA, Westfall MW, Smuelson LC.** Myosin heavy chain expression in contracting myocytes isolated during embryonic stem cell cardiogenesis. Circ Res 1995; 76:710–9.