

تأثیر محیط کشت روی سلولهای آستروسیت و رتینوئیک اسید بر تمایز عصبی سلولهای بنیادی جنینی موش

رضا مقدس علی^{*}، بهمن زینلی^{Ph.D.}، مسعود سلیمانی^{Ph.D.}، حسین بهاروند^{Ph.D.}

^{*} دانشکده زیست‌شناسی، پردیس علوم، دانشگاه تهران

^{**} پژوهشکده رویان، گروه سلولهای بنیادی

تاریخ وصول: مهرماه ۸۴، تاریخ پذیرش: آذرماه ۸۴

چکیده

هدف: ارزیابی خاصیت فاکتورهای مترشحه از سلولهای آستروسیت در محیط کشت سوسپانسیون در جهت‌دهی تمایز سلولهای بنیادی جنینی موش به سلولهای عصبی

مواد و روشها: در این مطالعه از سلولهای بنیادی جنینی (ES: Embryonic Stem Cell) موش رویان B1 استفاده شد. برای تمایز سلولهای ES به سلولهای عصبی از Astrocyte-conditioned-medium (ACM) آستروسیت‌های هیپوکمپ جنین موش استفاده شد. نحوه تمایز سلولهای ES به سلولهای عصبی براساس تشکیل اجسام شبه جنینی (Embryoid bodies: EBs) بود. این EBs در ۷ گروه با رتینوئیک اسید (RA: Retinoic Acid)، فاکتور رشد فیروبلاستی بازی (bFGF: basic Fibroblast Growth Factor) و محیط کشت آستروسیتی (ACM: Astycyte- Conditioned Medium) به مدت ۴ روز (2+4d) تحت شرایط سوسپانسیون تیمار شدند. سپس تمایز این EBs روی پلی-L- لیزین پیش برده شد. با استفاده از روشهای ایمونوسیتوشیمی و RT-PCR تجلی نشانگرهای عصبی و قلبی سلولهای تمایز یافته از سلولهای ES بررسی شد.

یافته‌ها: در این تجربه EBs به مدت ۵ روز (2+4+5d) به انواع سلولهای عصبی از جمله نورونها و آستروسیت‌ها و سلولهای قلبی تمایز یافتند. آنالیز آماری درصد EBs تمایز یافته نشان داد که تحت تأثیر ACM سلولهای ES به سلولهای عصبی تمایز نمی‌یابند و تنها از تمایز قلبی آنها کاسته می‌شود. درحالی که تحت تأثیر RA بیش از ۵۰ درصد از سلولهای ES با تمایز عصبی بالای ۴۰ درصد تمایز پیدا کردند و سلولهای ES تحت تأثیر bFGF به سلولهای قلبی تمایز یافتند.

نتیجه‌گیری: نتایج این مطالعه نشان داد ACM احتمالاً در جهت‌دهی تمایز سلولهای ES به سلولهای عصبی نقشی ندارد و تنها از تمایز قلبی آنها می‌کاهد. و RA به‌عنوان یک القاء کننده قوی باعث تمایز سلولهای ES به سلولهای عصبی می‌شود.

کلید واژه‌ها: سلولهای بنیادی جنینی موش، اجسام شبه جنینی، محیط کشت رویی آستروسیت‌ها، رتینوئیک اسید، فاکتور رشد فیروبلاستی بازی

مقدمه

(Nervous System) تأثیر می‌گذارند [۹-۱۱]. شواهد زیادی هم در *in vivo* و هم در *in vitro* ثابت می‌کنند که آستروسیتها یک ماده مقدماتی را برای مرحله رشد فراهم می‌کنند [۱۴-۱۲]. تجربیات کشت بافت نیز ثابت می‌کنند که امکان دارد آستروسیتها یک نقش هدایتی در تمایز عصبی بازی کنند. برهمکنشهای نورو-آستروسیت می‌تواند به‌وسیله انواع زیادی از فاکتورها شامل فاکتورهای تروفیک محلول، مولکولهای وابسته به غشاءهای سلولی مانند مولکولهای چسبندگی سلولی، اجزای ماتریکس خارج سلولی، پارامترهای فیزیکی مانند چسبندگی و سیستمهای پیام‌رسان ثانویه وساطت شود. انواع این فاکتورها که هم شامل فاکتورهای تروفیک انتشاری و هم فاکتورهایی که نیازمند اتصال سلول-سلول می‌شود، به‌عنوان تنظیم‌کننده‌های مهم رشد اکسون شناخته شده‌اند [۱۷-۱۵].

بیشتر گزارشهای اخیر ثابت می‌کنند که آستروسیتها نورو-زایی را هم به‌وسیله سلولهای بنیادی عصبی بزرگسالان و هم بوسیله سلولهای بنیادی جنینی در محیط آزمایشگاهی القاء می‌کنند [۱۸ و ۱۹]. این اطلاعات پیشنهاد می‌کنند که آستروسیتها فاکتور یا فاکتورهای انتشاری را سنتز و آزاد می‌کنند که حداقل تا اندازه‌ای از رشد هم اکسون و هم دندریت حمایت می‌کنند. اگر چه که این مشاهدات تأیید می‌کنند که آستروگلیالها دارای پتانسیل هدایت سلولهای بنیادی غیرمتعهد برای تمایز به یک سرنوشت عصبی هستند اما درباره فاکتورهای مسئول برای چنین اثر هدایتی اطلاعات زیادی در دست نیست.

بنابراین تمایز سلولهای بنیادی جنینی در محیط آزمایشگاهی (*in vitro*) به طرف سلولهای عصبی درک ما را از مکانیسم‌های تکوین بیشتر می‌کند. بنابراین در این مطالعه با استفاده از روش کشت سوسپانسیون سلولهای بنیادی جنینی موش (mES) به‌عنوان یک مدل تکوینی مناسب به‌صورت اجسام شبه جنینی (EBs) در محیط کشت آستروسیت (ACM) نقش فاکتورهای مترشحه از آستروسیتها در القای تمایز عصبی بررسی شد.

تکوین سیستم عصبی در پستانداران توسط عوامل اپی ژنتیکی و پیامهای سلولی اندوژن طی جنین‌زایی و بعد از آن انجام می‌شود. تبیین دقیق این پیامها طی جنین‌زایی مشکل است. از این رو شناخت مکانیسمهای تنظیم‌کننده این مراحل هدف بسیاری از مطالعات زیست‌شناسی تکوینی است. از سوی دیگر؛ تولید برنامه‌ریزی شده فراوان سلول تمایز یافته، برای به‌کارگیری در طب پیوند، مورد توجه دانشمندان است. در این ارتباط، سلولهای بنیادی جنینی (ES) مشتق از توده سلولی داخلی (ICM) بلاستوسیست می‌توانند به‌صورت سلولهای بنیادی پرتوان (pluripotent) در محیط کشت حفظ شده و با قابلیت تمایز زیاد، طیف وسیعی از انواع سلولهای تمایز یافته، شامل نورونها را ایجاد کنند [۱ و ۲]. بیشتر مطالعات روی تمایز سلولهای بنیادی جنینی (ES) به سلولهای عصبی در محیط *in vitro* همراه با کشت سوسپانسیون اجسام شبه جنینی (EBs) و به‌صورت شناور در محیط حاوی سرم انجام شده است [۳ و ۴]. در واقع اجسام شبه جنینی ساختارهایی متشکل از سلولهای ES هستند که تمایز ابتدایی در آنها رخ داده است. به‌طوری‌که سلولهای آن، ژنهای سه لایه زاینده جنینی را بیان می‌کنند و در واقع با تقلید از همان مراحل ابتدایی جنینی القای لازم صورت می‌گیرد. به‌دنبال آن تمایز سلولهای بنیادی جنینی به سلولهای عصبی با روشهای متفاوتی همچون تیمار اجسام شبه جنینی بارتینوئیک اسید [۱، ۵ و ۶]، انتخاب دودمان سلولهای عصبی به‌واسطه فاکتورهای رشد [۲] یا تقلید از شرایط *in vitro* در محیط آزمایشگاهی [۷] انجام می‌گیرد.

یکی از روشهای جهت‌دهی تمایز سلولهای بنیادی جنینی به طرف سلولهای عصبی استفاده از سلولهای گلیال به‌ویژه آستروسیتها به‌عنوان سلولهای پشتیبان سیستم عصبی مرکزی است. سلولهای گلیال در میان اجزای اصلی میلیونها سلول اطراف سلولهای بنیادی عصبی هستند که هم در تکوین و هم بلوغ مغز شرکت دارند [۸]. به‌ویژه آستروسیتها که سلولهایی با منشأ عصبی هستند یک‌سری فاکتورهای محلول و فاکتورهای در ارتباط با غشاء تولید می‌کنند که روی انواع زیادی از پدیده‌ها و عملکرد سیستم عصبی مرکزی (CNS: Central

مواد و روشها

مواد و محیطهای کشت

مواد شیمیایی و محیطهای کشت به کار گرفته شده در این مطالعه به شرح زیر است:

Knock-out DMEM (ko-DMEM) (Gibco, 10829-018), Leukemia inhibitory factor (LIF) (chemicon, ESG, 1107), Es-qualified serum (Gibco, 16141-079), L-Glutamin (1-glu) (Gibco, 25030-024), Nonessential amino acids (NEAA) (Gibco, 11140-35), β -Mercaptoethanol (β ME) (sigma, M7522), penicillin/ streptomycin (pen/ strep) (Gibco, 15070-063), DMEM /F12 (Gibco, 21331-020), N2 (Gibco, 17502-048), Fetal Bovine serum (FBS) (Gibco, 16141-079), bFGF (sigma, F0291), heparin (Manufactured- by: I.P.D.I.C.RASHT-IRAN), Retinoid Acid (RA) (sigma, R2625), poly-L-lysine (sigma, P4832), Trypsin- EDTA (Gibco, 25300-054), Hank's balanced salt solution (HBSS) (Gibco, 14185-045), β -tubulin III (sigma, T5293), Glial Fibrillary acidic protein (GFAP) (chemicon, MAB3402), Fluorescein isothiocyanate (FITC) (Jackson Immono research Laboratories, 715-095-150), Agaros jel (cinnaGen, MR7730), Bacterial dish (Griener; 648-102, 60mm, پلیت باکتریایی (Falcon, Germany), Tissue culture plate (Falcon, 353004)

کشت سلولهای بنیادی جنینی موش

در این مطالعه از سلولهای بنیادی جنینی موش (mES) رویان B1 استفاده شد [۲۰]. این سلولها دارای مورفولوژی ES، کاربوتیپ طبیعی، جنسیت نر و الکالین فسفاتاز مثبت بودند و ژن oct-4 (نشانهگر pluripotency) را بیان می کردند. سلولهای مزبور بر سلولهای فیروبلاستی جنینی موش و در محیط کشت Ko-DMEM همراه با افزودنیهای زیر که به عنوان محیط کشت ES گفته می شود کشت می شوند:

LIF 1000 I.u, Es- qualified serum, L-glu 2Mm, NEAA 0.1Mm, β ME 0.1 Mm, pen/strep (100 u/ml pen, 100 mg/ml strep).

کشت سلولهای آستروسیتی هیپوکمپ موش

مغز موش از جنینهای موش سوری روز ۱۸ یا ۱۹ جنینی در محلول HBSS: Hank's Balanced Salt Solution جدا شدند. سپس ناحیه هیپوکمپ مغز جنینهای موش زیر یک میکروسکوپ کالبد شکافی شناسایی شده و در محیط کشت DMEM/F12: Dulbeco's Modified Eagle's Medium F/12 حاوی N2 و L-glu کشت شدند. برای خالص کردن سلولهای آستروسیتی از الیگودندروسیتها در محیط کشت از روش

تریپسین کردن استفاده شد و به دلیل مقاومت کم این سلولها به تریپسین - EDTA در مدت ۲ الی ۳ دقیقه از کف فلاسک جدا شده و به محیط کشت جدید منتقل (passage) شدند. از طرف دیگر برای جدا شدن آستروسیتها از نورونها از اختلاف چسبندگی سلولها به کف فلاسک استفاده شد، بدین صورت که آستروسیتها به سرعت به کف فلاسک می چسبند (حدود ۴hr) در صورتی که نورونها در محیطی که با پلی-L- لیزین مفروش نشده است، اتصال بالایی ندارند و دیر می چسبند. بنابراین بعد از حدود ۴ ساعت محیط کشت تعویض شد و بدین صورت کشت آستروسیتها خالص شد. برای شناسایی آستروسیتها با استفاده از آنتی بادی اختصاصی آستروسیتها یعنی GFAP: Glial Fibrillary Acidic Protein سلولها رنگ آمیزی شدند (شکل ۲). زمانی که تراکم سلولی آستروسیتها به حدود ۷۰ الی ۸۰ درصد رسید از محیط رویی آن^۱ به عنوان یک محیط القاء کننده عصبی استفاده شد. برای تهیه محیط رویی سلولهای آستروسیتی، محیط حاوی DMEM/F12/N2/1-glu به مدت ۱۲ الی ۲۴ ساعت روی سلولهای آستروسیتی قرار داده شد و از آن به عنوان Astrocyte-Conditioned Medium (ACM) استفاده شد. برای تهیه ACM رتینوئیک اسیدی ACM.RA به همراه محیط DMEM/F12/N2/1-glu رتینوئیک اسید (RA) با غلظت 10^{-6} M نیز به محیط کشت آستروسیتها اضافه شد.

روش تمایز

نحوه تمایز سلولهای بنیادی جنینی موش به سلولهای عصبی براساس تشکیل اجسام شبه جنینی انجام شد. در حالت تمایز نیافته سلولهای مزبور، کلونیهای متراکمی را بر سلولهای تغذیه کننده ایجاد می کنند. در حالت سوسپانسیون، این سلولها به مدت ۲ روز تشکیل اجسام شبه جنینی (EB) را می دهند (2d). سپس اجسام شبه جنینی به مدت چهار روز در ظرف باکتریایی به صورت سوسپانسیون کشت داده شدند (2+4d) و در ۷ گروه تحت تیمار فاکتورهای القاء کننده مختلف و محیطهای کشت مجزا قرار گرفتند (گروههای زیر). از فاکتورهای رشد فیروبلاستی بازی (bFGF) (20ng/ml) و رتینوئیک اسید

1. confluency

2. condition medium

شمارش قرار شدند. سلولهای عصبی تولید شده از سلولهای رویان B1 مشخصات نوروها را داشتند به طوری که از نظر مورفولوژیکی دارای اکسون و دندریت بودند.

آنتی بادی ها و ایمونوفلورسنس

پنج روز پس از کشت نهایی (2+4+5d) سلولهای کشت شده در پلیت های کشت ابتدا دو بار با PBS شستشو شدند و بعد با محلول پارافرمالدئید ۴ درصد در دمای ۴° سانتی گراد درون یخچال تثبیت شدند. سپس سلولها دوبار با ۰.۰۵% Tween + PBS شستشو داده شده و با محلول ۰.۲% Triton x-۱۰۰ نفوذپذیر شده و مجدداً دوبار با محلول PBS + ۰.۰۵ Tween شسته شدند (هر بار به مدت ۵ دقیقه). سپس سلولها با سرم ۱۰ درصد بز پوشانده شدند (۳۰ دقیقه). آنتی بادهای اولیه (β-توبولین III با غلظت ۱/۲۵۰ و GFAP با غلظت ۱/۵۰) به مدت ۶۰ دقیقه در دمای ۳۷° سانتی گراد جداگانه به مجموعه های سلولی متفاوت اضافه شد. سپس سلولها دوبار با PBS+Tween شستشو شده (هر بار ۱۰ دقیقه) و به دنبال آن آنتی بادی ثانویه نشان دار با FITC اضافه شد و به مدت ۶۰ دقیقه در دمای ۳۷° سانتی گراد انکوبه شدند. در پایان سلولها دوبار با PBS+Tween شستشو و با میکروسکوپ فلورسنس (Nikon/TE2000) یا (Olympus, Bx51) ارزیابی شدند.

تجلی ژنهای خاص عصبی با RT-PCR

از روش نسخه برداری معکوس واکنش زنجیره ای پلی مرز (RT-PCR) برای ارزیابی تجلی رونوشت های (transcripts) خاص عصبی استفاده شد. RNA (Total RNA) با استفاده از کیت Nucleospin RNA II از سلولهای بنیادی جنینی (ES)، اجسام شبه جنینی (EB) (2d)، اجسام شبه جنینی (2+4d) و دسته های سلولی منشاء گرفته از کلنی های پلیت شده (2+4+5d) استخراج شدند. با استفاده از پرایمر هگزامر تصادفی و آنزیم ریورس ترانسکریپتاز (cDNA(k1632, Fermentas) ساخته شد. سپس PCR با استفاده از کیت (Smart tag kit (cinnagen, IRAN) همراه با پرایمرهایی که در جدول ۲ آمده است انجام شد. محصولات

(10^{-6} M) به عنوان فاکتورهای القاء کننده تمایز اکتودرمی و عصبی استفاده شد [۱، ۲، ۵، ۶]. همچنین در جریان تیمار اجسام شبه جنینی با فاکتور رشد فیبروبلاستی بازی، هپارین به فعال شدن رسپتورهای FGF کمک می کند. در فاصله چهار روز تیمار هر دو روز یکبار محیط با کاهش سرم تعویض شد. در نهایت در روز 2+4d این اجسام در پلیتهای کشت سلولی ۶۰mm مفروش شده با پلی-L-لیزین کشت شدند. برای ارزیابی نتایج حاصل از تمایز سلولهای بنیادی جنینی، به اجسام شبه جنینی حدود ۴ الی ۵ روز فرصت داده شد تا کاملاً در محیط کشت پهن شده و سلولهای آنها مهاجرت کنند (2+4+5d). در مرحله تشکیل اجسام شبه جنینی (EBs) برای جلوگیری از هر گونه القای EBs توسط فاکتورهای مختلف از محیط Ko-DMEM استفاده شد. و در جریان مرحله القای اجسام شبه جنینی بتدریج از محیط Ko-DMEM به محیط DMEM/F12/N2 منتقل شدند و در نهایت در این محیط پلیت شدند. همچنین برای مهار تمایز مزودرمی و قلبی اجسام شبه جنینی و تولید بیشتر سلولهای اکتودرمی و عصبی در مراحل القاء و کشت میزان سرم به تدریج از حدود ۱۵ درصد به ۵ درصد کاهش داده شد.

تیمار	گروه
FBS+bFGF 20ng/ml+Heparin+ACM	1
FBS+bFGF 20ng/ml+Heparin	2
FBS+RA 10^{-6} M+ACM	3
FBS+RA 10^{-6} M	4
FBS+ bFGF 20ng/ml+ACM	5
FBS+RA.ACM	6
FBS	7

مطالعات مورفولوژیکی

برای آنالیز آماری درصد EBهای تمایز یافته به سلولهای عصبی و قلبی، کلونیهای تمایز یافته قلبی (تپش دار) و عصبی با درصد تمایز عصبی بالای ۴۰ درصد در ۷ گروه با کمک میکروسکوپ فاز کنتراست معکوس (Nikon, Ts100) در روز 2+4+5d

در ۷ گروه تحت تأثیر فاکتورهای القاء کننده مختلف تیمار شدند (2+4d). به دنبال کشت EBها در پلیتهای کشت سلولی، EB به کف ظرف چسبیده و سلولها شروع به مهاجرت از آن کردند (2+4+5d). معمولاً ضربان در گروههایی که به

PCR روی ژل آگارز ۱/۵ درصد جدا شده و همراه با اتیدیوم بروماید رنگ آمیزی شد. شدت فلورسنس باند همراه با ترانس لومینوتور (uvidoc, uv) ارزیابی و مشاهده شد.

جدول ۲. پرایمرهای مورد استفاده در PCR

Genes	Primer sequences (5'-3')	Size (bp)	Annealing Temperature	References
Nestin	F:TCGAGCAGGAAGTGGTAGG R:TTGGGACCAGGGACTGTT A	351	53/5	19
Pax-6	F:GAAATCCGAGACAGATTATTATCCGAG R:CCATTGGCCCTTCGATTAGA	494	59/2	19
NF-M	F:GCACTACTTGGAAACAACAGAACA R:CGTGCGAGGCCTGCTT	74	62	31
Nurr1	F:AGAGGGTGGGCAGAGAAG AT R:GGTAGTTGGGTCGGTTCAAA	402	59/5	19
Brachyury	F:AGTATGAACCTCGGATTCACATCG R:GCAGATGAATTGTCCGCATAGG	432	63	19
GATA4	F:CTCTATCACAAGATGAACGGCA R:CTGCTGTGCCCATAGTGAGA	413	59/5	19
Cytokeratin-17	F:AGAGGGTGGGCAGAGAAGAT R:GGTAGTTGGGTCGGTTCAAA	367	59/8	19
Oct-4	F:GGCGTTCTCTTTGAAAAGGTGTTT R:CTCGAACCACATCCTTCTCT	317	71	20
β -tubulin	F:GGAACATAGCCGTAAACTGC R:TCACTGTGCCTGAACTTACC	317	63	32

کاردیومیوسیتها تمایز پیدا کرده بودند در روز 2+4+1d شروع شد و گروههایی که به سلولهای عصبی تمایز پیدا کرده بودند در روز 2+4+2d کاملاً قابل مشاهده بودند. برای آنالیز آماری درصد EBهای تمایز یافته به سلولهای قلبی و عصبی در ۷ گروه تحت تأثیر فاکتورهای القاء کننده مختلف از جمله محیط کشت رویی آستروسیتها (ACM)، رتینوئیک اسید (RA) و فاکتور رشد فیبروبلاستی بازی، کلنیهای قلبی تپشدار و کلنیهای عصبی با درصد تمایز عصبی بالای ۴۰ درصد در روز 2+4+5d شمارش شدند. (نمودار ۱ و ۲).

نتایج حاصل از شمارش اجسام شبه جنینی تمایز یافته در گروه ۱ و ۲ که تفاوت آنها به ترتیب در داشتن و نداشتن ACM بودنشان داد که تحت تأثیر ACM افزایشی در تمایز عصبی به وجود نمی آید، اما به طور معنی داری از تمایز قلبی کاسته می شود. از طرف دیگر تفاوت معنی داری بین تمایز عصبی در گروه ۳ که دارای ACM بود و گروه ۴ که فاقد ACM بود نیز

آنالیز آماری

آنالیز آماری داده های مورفولوژیکی کلنی های تمایز یافته (2+4+5d) با استفاده از آزمون آماری Mann-whitney و با نرم افزار spss (ویرایش ۱۳) ارزیابی شدند. نتایج به صورت [میانگین $\pm$ خطای استاندارد (SEM)] نشان داده شده اند. $P < 0.05$ از نظر آماری معنی دار در نظر گرفته شد.

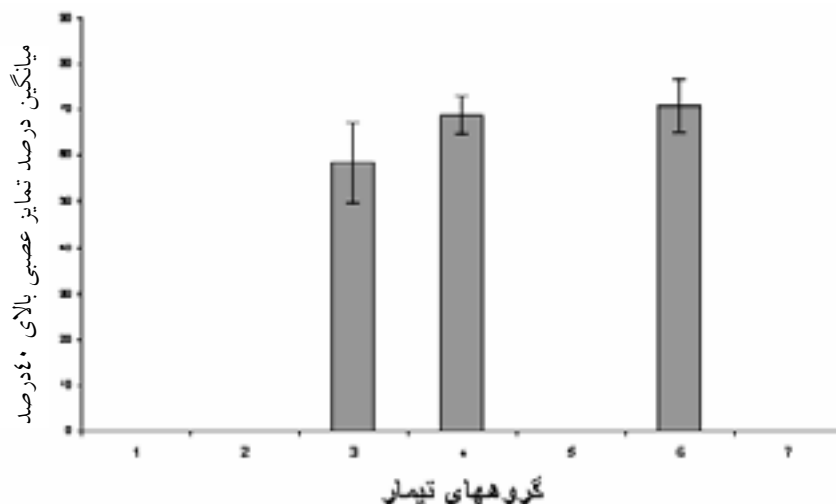
یافته ها

تمایز سلولهای عصبی از سلولهای بنیادی جنینی

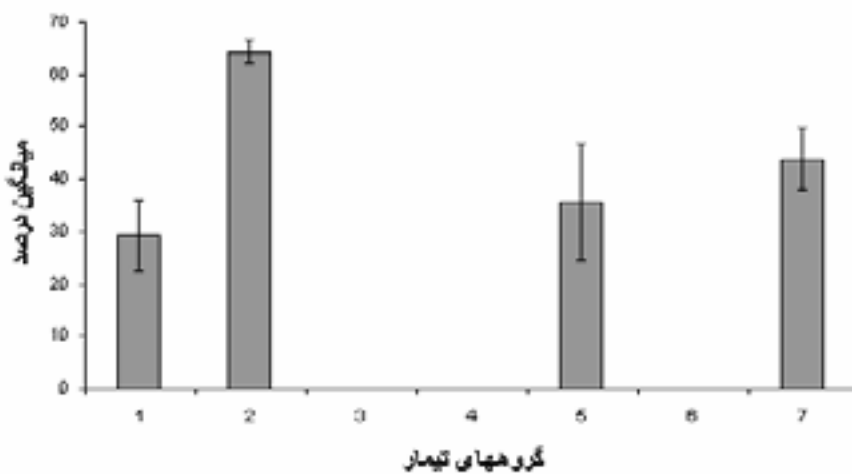
قبلاً مشخصات شاخص سلولهای بنیادی جنینی (رویان B1) همراه با مورفولوژی شاخص (تیپیک) و قدرت تمایز بالای آنها در شرایط آزمایشگاهی نشان داده شده است [۲۱]. معمولاً دو روز بعد از کشت سلولهای بنیادی جنینی به صورت سوسپانسیون اجسام شبه جنینی شکل می گیرند (2d). به منظور تمایز سلولهای بنیادی جنینی، اجسام شبه جنینی به مدت ۴ روز

مشاهده نشد. همچنین با مقایسه تمایز عصبی در گروه ۶ با گروه‌های ۳ و ۴ مشخص شد که تفاوت معنی‌داری بین تمایز عصبی این گروه‌ها وجود ندارد، بنابراین براساس این نتایج

به‌طور معنی‌داری افزایش یافت؛ بطوری که با مقایسه گروه ۲ و گروه کنترل مشخص می‌شود که فاکتور رشد فیبروبلاستی ۲ به‌عنوان یک القاء‌کننده تمایز قلبی عمل می‌کند. از طرف دیگر



نمودار ۱: مقایسه میانگین درصد تمایز عصبی بالای ۴۰ درصد



نمودار ۲: میانگین درصد تمایز قلبی

ACM نقشی در تمایز عصبی ندارد و در حقیقت نقش اصلی در جهت‌دهی تمایز عصبی بر عهده رتینوئیک اسید (RA) است. از طرف دیگر؛ درصد تمایز عصبی در گروه‌های ۳، ۴، و ۶ در مقایسه با گروه کنترل (گروه ۷) افزایش معنی‌داری نشان می‌داد و این موضوع نقش RA را به‌عنوان یک القاء‌کننده قوی تمایز عصبی تأیید می‌کند.

تحت تأثیر فاکتور رشد فیبروبلاستی ۲ درصد تمایز قلبی

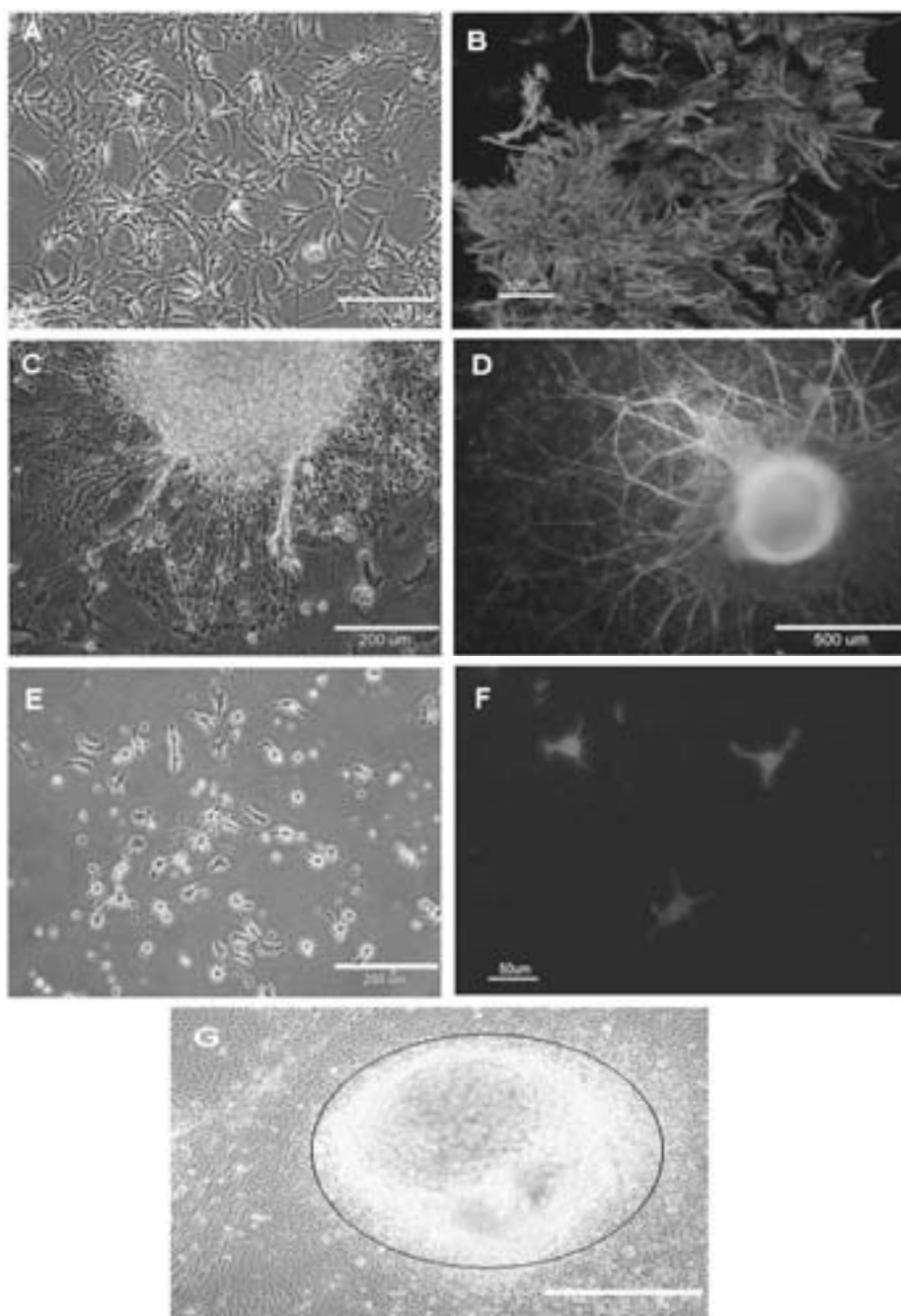
با مقایسه گروه ۱ و ۵ مشخص شد که درصد تمایز قلبی تحت تأثیر bFGF در حضور هپارین افزایش معنی‌داری نمی‌یابد و این موضوع نشان داد که هپارین باعث افزایش اثر القاء‌کنندگی bFGF روی جهت‌دهی تمایز قلبی نمی‌شود.

تجلی نشانگرهای عصبی در سلولهای عصبی مشتق از سلولهای بنیادی جنینی

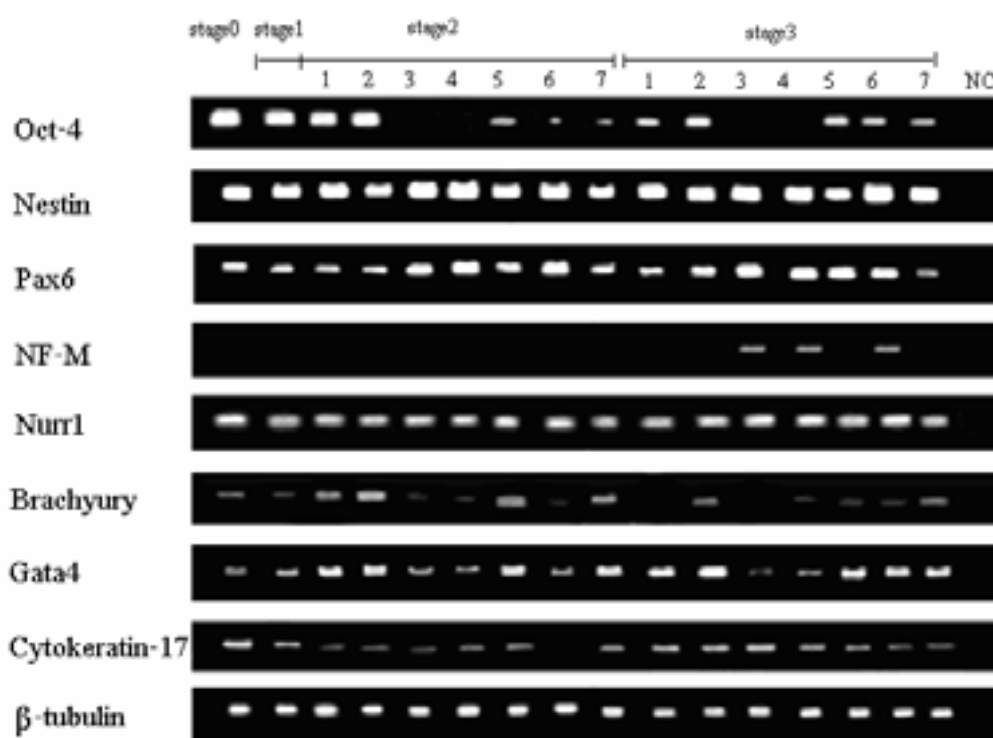
ایمونوسیتوشیمی سلولها نشان داد که سلولهای عصبی حاصل

2+4+5d و سلولهای عصبی نشان داد که در تمام گروهها نشانگرهای اکتودرمی و عصبی شامل nestin، pax6، NF-M، Nurr1، cytokeratin-17 و نیز نشانگرهای مزودرمی و قلبی شامل Brachyury و GATA4 تجلی می‌یابند (شکل ۲).

دارای زواید اکسونی و دندریتی مشخصه سلولهای عصبی هستند. در ضمن سلولهای عصبی نشانگرهای عصبی β -tubulin III و GFAP نشانگر سلولهای آستروسیتی را بیان کردند (شکل ۱). علاوه بر این بررسی RT-PCR اجسام شبه جنینی



شکل ۱ آستروسیت های مشتق از هیپوکمپ جنین موش فازکنتراست (A) وایمونوسیتوشیمی با آنتی بادی علیه GFAP (B)، سلولهای عصبی با درصد تمایز عصبی بالای ۴۰ درصد: فازکنتراست (C) و ایمونوسیتوشیمی با آنتی بادی علیه β -tubulin III (D)، آستروسیت های تمایز یافته از سلولهای بنیادی جنینی: فازکنتراست (E) و ایمونوسیتوشیمی با آنتی بادی علیه GFAP (F)، سلولهای قلبی تمایز یافته از سلولهای ES (G) (دایره محدوده تپش دار را نشان می دهد).



شکل ۲: بررسی تجلی ژنهای خاص عصبی و قلبی با روش RT-PCR در سلولهای عصبی و قلبی مشتق از سلولهای بنیادی جنینی. NC نشان دهنده بدون cDNA است

Stage 1: اجسام شبه جنینی (2d)
Stage 3: اجسام شبه جنینی پلیت شده (2+4+5d)

Stage 0: سلولهای بنیادی جنینی (ES)
Stage 2: اجسام شبه جنینی (2+4d)

بحث

محیطی هستند که ممکن است در رشد آنها تأثیر بگذارند. در میان این سیگنالهای محیطی، سلولهای گلیال به‌ویژه آستروسیتها به‌عنوان سلولهای پشتیبان سیستم عصبی مرکزی (CNS) با تولید فاکتورهای تروفیک محلول و مولکولهای وابسته به غشاءهای سلولی از اهمیت خاصی برخوردار هستند [۲۲]. آستروسیتها برای پیشبرد بقاء و بلوغ نورونهای جوان و پیش‌سازهای عصبی به‌وسیله محققان زیادی نشان داده شده است [۲۳-۲۵]. همچنین در توافقی با مطالعات *in vivo* چندین رده از شواهد *in vitro* نشان می‌دهند که فاکتورهای محلول آستروسیت در مورفوزنریس عصبی شرکت دارند. بنابراین یکی از روشهایی که در سالهای اخیر برای تمایز سلولهای ES به سلولهای عصبی مورد توجه قرار گرفته است به‌کارگیری سلولهای آستروسیت

تولید سلولهای عصبی از سلولهای بنیادی جنینی دارای کاربردهای بالقوه‌ای در مطالعات زیست‌شناسی تکوینی، طب پیوند و توسعه داروسازی و ناهنجاری‌شناسی است. اما این کاربردها و سایر تواناییهای بالقوه سلولهای عصبی مشتق از سلولهای بنیادی جنینی بطور عمده به جنبه‌های عملی تولید شرایط کشت مطلوب این سلولها بستگی دارد. از جمله عواملی که در تمایز سلولهای بنیادی جنینی به سلولهای عصبی مؤثرند، فاکتور یا فاکتورهای القاء‌کننده تمایز عصبی، برهمکنشهای سلولی، مدت زمان القاء و تمایز اجسام شبه جنینی و عوامل ناشناخته در سرم جنین گاو است.

سلولهای عصبی (نورونها) به‌عنوان اجزای عملکردی سیستم عصبی همواره در معرض طیف وسیعی از سیگنالهای

است. اگر چه مشاهدات تأیید می‌کند که سلولهای آستروگلیال دارای پتانسیل آموزش و هدایت سلولهای بنیادی غیرمتعهد برای سازگاری با یک سرنوشت عصبی هستند اما برخلاف یافته‌های (Nakayama) و همکارانش [۱۹] که نشان دادند تحت تأثیر فاکتورهای مشتق از آستروسیت‌ها سلولهای ES به سلولهای عصبی و نورونها تمایز پیدا می‌کنند، یافته‌های ما نشان داد که محیط رویی سلولهای آستروسیتی حاوی فاکتورهای مترشحه از آستروسیت‌ها نقشی در تمایز عصبی سلولهای ES ندارد و فقط تمایز قلبی را کاهش می‌دهند.

نقش رتینوئیک اسید (RA) در جریان تکوین جنین و به‌خصوص در فرایندهای تمایز عصبی مدتهاست مشخص شده است و تمایز دودمانهای عصبی از سلولهای پرتوان در پاسخ به RA مدتهاست که ثابت شده است و در این ارتباط گزارشهای متعددی در زمینه تمایز نورونها از سلولهای بنیادی جنینی به‌صورت اجسام شبه جنینی (EBs) تحت تأثیر غلظت 10^{-6} و 10^{-7} اسید رتینوئیک وجود دارد [۱، ۶ و ۲۶] مطابق با این گزارشها یافته‌های ما نیز نقش رتینوئیک اسید را به‌عنوان یک القاءکننده قوی تمایز عصبی تأیید می‌کند. و آنالیز آماری درصد تمایز اجسام شبه جنینی در گروههایی که تحت تیمار RA قرار گرفته بودند نشان می‌دهد که در این گروهها بیشتر از ۵۰ درصد از سلولهای بنیادی جنینی با تمایز عصبی بالای ۴۰ درصد به سلولهای عصبی تمایز پیدا کرده‌اند.

در این مطالعه مشخص شد که فاکتور رشد فیروبلاستی بازی به‌عنوان یک فاکتور القاءکننده قلب‌زایی عمل می‌کند به‌طوری که تحت تأثیر این فاکتور میزان تمایز قلبی به مقدار زیادی افزایش می‌یابد. از جمله سیگنالهایی که فعالیت میتوزی و بقای میوسیت‌های جنینی را در مراحل اولیه قلب‌زایی تنظیم می‌کنند سیگنالهای FGF است. به طوری که مهار سیگنالهای FGF از القای سلولهای مزودرمی و محتوی پیش‌سازهای قلبی ممانعت می‌کند [۲۷ و ۲۸]. از طرف دیگر تأثیر FGF روی قلب‌زایی جوجه هم مطالعه شده است به‌طوری که نتایج نشان می‌دهد سیگنالهای FGF رشد میوسیت‌های قلبی را در مرحله توپولار تنظیم می‌کنند و تخریب گیرنده‌های FGF، تکثیر و

بقای قلب جنینی جوجه را در این مرحله متوقف می‌کند و القای سلولهای مزودرمی محتوی پیش‌سازهای میوسیتی قلبی را مهار می‌کند [۲۹]. bFGF هم به‌عنوان عضوی از خانواده FGF در القای مزودرم، تنظیم تمایز و رشد سلولی، چسبندگی، مهاجرت، مرگ سلولی و غیره نقش مهمی ایفا می‌کند. bFGF به‌وسیله گیرنده‌های سطح سلولی خاص از خانواده تیروزین کینازی به‌نام FGFR1 عمل می‌کند که حضور این گیرنده برای تکوین قلبی ضروری است [۳۰]. هپارین به‌عنوان یک ماده فعال‌کننده گیرنده‌های FGF به فعال شدن رسپتورهای فاکتور رشد فیروبلاستی بازی کمک می‌کند [۲۲]. بنابراین در حضور این ماده تأثیر فاکتور رشد فیروبلاستی بازی روی سلولهای بنیادی جنینی افزایش می‌یابد. اما یافته‌های ما نشان داد که درصد تمایز قلبی تحت تأثیر bFGF در حضور هپارین افزایش معنی‌داری نمی‌یابد و مشخص شد که هپارین باعث افزایش اثر القاءکنندگی bFGF بر جهت‌دهی تمایز قلبی نمی‌شود.

مجموع نتایج حاصل نشان داد که تحت تأثیر رتینوئیک اسید درصد بالایی از سلولهای بنیادی جنینی به سلولهای عصبی تمایز پیدا می‌کنند و فاکتور رشد فیروبلاستی بازی به‌عنوان یک القاءکننده تمایز قلبی شناخته شد و معلوم شد که فاکتورهای مشتق از سلولهای آستروسیتی در محیط کشت آستروسیتی (ACM) نقشی در تمایز عصبی ندارند.

اما به هر حال تکوین سیستم عصبی به‌وسیله فعالیت متوازن بین فاکتورهای داخلی بیان شده توسط برنامه ژنتیکی و فاکتورهای اپی‌ژنتیک مشخص شده به‌وسیله برهمکنشهای سلول-سلول که ممکن است سلولهای عصبی در سراسر مورفوژنیز سیستم عصبی انجام دهند هدایت می‌شود. بیشترین این برهمکنشها میان نورون-گلیا است. چندین فاکتور محلول ترشح شده به‌وسیله سلولهای گلیال یا سلولهای عصبی در اثرهای متقابل که این سلولها روی یکدیگر اعمال می‌کنند شرکت دارند. بنابراین معماری عملکردی مغز بستگی به شراکت نزدیک و زیاد نورون-گلیا دارد. بنابراین با توجه به این اطلاعات فاکتورهای محلول آستروسیتی یک نقش مهمی در چندین مرحله مورفوژنیز عصبی از حوادث اولیه تکثیر

تقدیر و تشکر

بدینوسیله از آقایان محمد پاکزاد، محمد معصومی و خانم‌ها مریم حاتمی و سپیده ملامحمدی و کلیه کسانی که در پژوهشکده رویان در انجام مراحل مختلف این پژوهش همکاری نمودند تشکر و قدردانی می‌نمایم.

پیش‌ساز عصبی تا دوره‌های بعدی تمایز عصبی و تثبیت جریان عصبی بازی می‌کنند. به هر حال بررسی نقش سلولهای آستروسیتی در جهت‌دهی تمایز سلولهای بنیادی جنینی به سلولهای عصبی در گرو تحقیقات بیشتر در جهت شناخت سیگنالها و مولکولهای آزاد شده از سلولهای آستروسیتی در محیط کشت و هم‌کشتی سلولهای بنیادی جنینی با سلولهای آستروسیتی است.

References

1. **Bain G, Kitchens D, Yao M, Huettner JE, Gottlieb DI.** Embryonic stem cells express neuronal properties invitro. *Dev Biol* 1995; 168 : 342-57.
2. **Okabe S, Forsberg- Nilsson K, Spiro AC, Segal M, Mckay RD.** Development of neuronal precursor cells and functional postmitotic neurons from embryonic stem cells invitro. *Mech Dev* 1996 ; 59 : 89-102.
3. **Reubinoff BE, Pera MF, Fong CY, Trounson A, Bongso A.** Neural progenitors from human embryonic stem cells. *Nat Biotechnol* 2000; 18 : 399-404.
4. **Guan K, chang H, Rolletschek A, Wobus AM.** Embryonic stem cell derived neurogenesis. Retinoic acid induction and lineage selection of neuronal cells. *Cell Tissue Res* 2001 ; 305 : 171-6.
5. **Beddington Rs, smith JC.** Control of vertebrate gastrulation: inducing signals and responding genes. *Curr opin Genet Dev* 1993; 3: 655-61.
6. **Fraichard A, chassande O, Bilbaut G.** Dehayc, savatierp, samaruty: invitro different of embryonic stem cells into glial cells and functional neurons. *J Cell Science* 1995; 108 : 3181-8.
7. **Rathjen J, Haines BP, Hodson KM, Nesci A. Dunns, Rothjen PD:** Directed differentiation of pluripotent cells to neural lineages: Homogeneous formation and differentiation of a neurectoderm formation and different of a neurectoderm population. *Development* 2002; 129: 2649-61.
8. **Doetsch F.** A niche for adult neural stem cells. *Curr Opin Genet Dev* 2003 ;13 : 543-50.
9. **Ridet JL, Malhotra SK, Privat A, Gage FH.** Reactive astrocytes: cellular and molecular cues to biological function. *Trends Neurosci* 1997; 20, 570-7.
10. **Engle J.** Changing responsiveness of developing modbrain dopaminergic neurons for extracellular growth factors. *J Neurosci Res* 1998; 15: 508-16.
11. **Song HJ, Sterens CF, Gage FH.** Neural stem cells from adult hippocampus develop essential properties of functional CNS neurons. *Nat Neurosci* 2002; 5 : 438-45.
12. **Noble M, Fok-seang J, Cohen J.** Glia are a unique substrate for the invitro growth of central nervous system neurons. *J Neurosci* 1984; 4: 1892-903.
13. **Norris CR, Kalil K.** Guidance of callosal axons by radial glia in the developing cerebral

- cortex. *J Neurosci* 1991; 11: 3481-92.
14. **Smith GM, Rutishauser Y, Silver J, Miller RH.** Maturation of astrocytes invitro alters the extent and molecular basis of neurite outgrowth. *Dev Biol* 1990; 138: 377-90.
15. **Aoyagi A, Nishikawa k, saito H, Abe K.** characterization of basic fibroblast growth factor- mediated acceleration of axonal branching in cultured rat hippocampal neurons. *Brain Res* 1994; 661: 117-26.
16. **Lowenstein OH, Arsenault K.** Dentae granule cell layer collagen explantcultures: spontaneous axonal growth and induction by brain- derived neurotrophic factor or basic fibroblast growth factor. *Neuroscience* 1996; 74: 1197-208.
17. **Mueller BK.** Growth cone guidance: first steps towards a deeper understanding. *Ann Rev Neurosci* 1999; 22: 351-88.
18. **Song H, stevens CF, Gage FH.** Astroglia induce neurogenesis from adult neural stem cells. *Nature* 2002; 417: 39-44.
19. **Nakayama T, Momoki-Soga T, Inoue N.** Astrouyte- derived factors instruct differentiation of embryonic stem cells into neurons. *Neurosci Res* 2003; 46: 241-9.
20. **Baharvand H, Matthaei KI.** Culture condition difference for establishment of new embryonic stem cell lines from the C57BL/6 and BALB/C mouse strains. *Invitro cell Dev Biol Anim* 2004; 40: 76-81.
21. **Baharvand H, Matthaei KI.** The ultrastructure of mouse embryonic stem cells *RBM online* 2003; 7: 330-5.
22. **Roux, peter D Le, Esquenazi, Susana.** Astroytes mediate cerebral cortical neuronal axon and dendrite growth, in part, by release of fibroblast growth factor. *Neurolog Res*, Jan 2002 Jan; 24(1): 81-92.
23. **Banker GA.** Trophic interactions between astroglial cells and hippocampal neurons in culture. *Science* 1980; 209: 809-10.
24. **Temple S, Davis AA.** Isolated rat cortical progenitor cells are maintained in division in vitro by membrane- associated factors. *Development* 1994; 120: 999-1008.
25. **Nedergaard M.** Direct signaling from astrocytes to neurons in cultures of mammalian brain cells. *Science* 1994; 25: 263: 1768-71.
26. **Strubing C, Ahnert- Hilger G, Shan J, Wiedenmann B, Heschelery, Wobus AM.** Differentiation of pluripotent embryonic stem cells into the neural lineage in vitro gives rise to matare inhibitory and excitatory neurons, *Mech Dev* 1995; 53: 275-87.
27. **Sachindis A, Fleischman BK, Kolossov E, Wartenberg M, Sauer H, Heschelery J.** Cardiac specific differentiation of mouse embryonic slem cells. *Cardiovasc Res* 2003; 58: 278-91.
28. **Schuldiner M, Yanuka O, Itskovitz- Eldor J, melton D, Benvenisty N.** Effects of eight growth factors on the differentiation of cells derived from human embryonic stem cells. *PNAS* 2000; 97: 11307-12.
29. **Mima T, Ueno H, Fischman D, Mikawa T, Williams L.** Fibroblast growth factor receptoris required for invivo cardiac myocyte proliferation at early embryonic stages of heart development. *Proc proc Natl Acad Sci USA* 1995 jan 17; 92(2): 467-71.

30. **Detillieux K, Sheikh F, Kardami E, Cattini P.** Biological activities of fibroblast growth factor-2 in the adult myocardium. *Cardiovasc Res* 2003; 57: 8-19.
31. **Pisano MM, Mukhopadhyay P, Greene RM.** Molecular Fingerprinting of TGF β -treated embryonic maxillary mesenchymal cells. *Orthod craniofacial Res* 6, 2003; 194-209.
32. **Wobus AM, Guan K, Yang HT, Boheler KR.** Embryonic stem cells as a model to study cardiac, skeletal muscle, and vascular smooth muscle cell differentiation. *Methods Mol Biol* 2002; 185: 127-56.